T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOAKTİF DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilbeste BONCUKÇU

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Şubat, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOAKTİF DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilbeste BONCUKÇU tarafından hazırlanan tez çalışması 23.02.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI, Üye
İstinye Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Biyoaktif Doku İskelesi Üretimi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nilbeste BONCUKÇU

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FCD-2021-4266 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Nilbeste BONCUKÇU, Biyomalzemeler ve Doku Mühendisliği alanında YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Cumhuriyetin

Tüm

Kadınlarına,

Bilime

Ve

Atatürk'e.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca, ilk andan itibaren önüme çıkan engellere göğüs germemi sağlayan, yılmadan çözüm önerileri üretmeye çalışan, bilgisini ve emeğini 2008'den beri her daim paylaşan, "iyi ki aynı yıllarda aynı yerlerdeydik" deyip o yılları birlikte geçirdiğimiz için gururlanmaktan asla vazgeçmeyeceğim canım yol göstericim, sevgili danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN'a,

"Şimdi burada olsa bu konuya nasıl yaklaşırdı" diye düşündüğüm her an doğru cevapları bulmamı sağlayan düşünce yapısını ustalıkla, ilmek ilmek, yıllar boyunca içime işleyen çok değerli hocam Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na,

Bilgisini, ilgisini ve ağabeyliğini hep hissettiğim, çok uzaktayken bile elinin üzerimde olduğunu bildiğim sevgili hocam Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Doktora boyunca Tez İzleme Komitesi'ndeki çok değerli yorumların yanı sıra, ne zaman konuşsak yollarımızın yeniden kesiştiğine şükrettiğim canım hocam Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY'e,

Birçok güzel ve hüzünlü anlarımda yanımda olan, kendisinden her daim öğrenmeye devam ettiğim fütüristik hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Bize güvenerek işin çok büyük bir kısmını üstlenen, Biyomalzemeler ve Doku Mühendisliği alanındaki bu çalışmamı ve doktora çalışmalarımızda 100/2000 Doktora Burs Programı ile benim gibi birçok öğrenciyi destekleyen YÖK'e teşekkür ederim.

Samimiyetle beni destekleyen, yüreklendiren canım arkadaşlarım, fahrî eş danışmanlarım Dr. Öğr. Üy. Benan İNAN ve Dr. Pelin Pelit ARAYICI'ya,

Ekip olmanın, bir ve beraber olmanın, dahası bir abla, kardeş, arkadaş, hoca olarak sevilmenin ve bunu hissetmenin ne kadar önemli ve rahatlatıcı olduğunu bunca yıl sonra sonuna kadar iliklerimde bana hissettiren, isimlerini tek tek yazsam bir tez hacmi daha yazı edecek sevgili meslektaşlarım, KMC 306-307 Laboratuvarları ailesine,

Doktora sürecim boyunca okul içi ve dışı birçok meselede desteklerini hiç esirgemeyen değerli meslektaşlarım, Dr. Öğr. Üy. Fatih ÇİFTÇİ, Dr. Anıl Tevfik KOÇER, Dr. Ali Can ÖZARSLAN, PhD (c) Cemre SÜZGÜN ve PhD (c). Emre KARADUMAN'a,

Lisanstan beri her gün konuştuğumuz, birbirimizin kız kardeşi olmaktan asla vazgeçmediğimiz meslektaşlarım ve canım dostlarıma,

Zor birçok zamanımızı paylaştığımız, birbirimize hep ihtiyaç duyduğumuz ve uzaktayken bile hep yan yana olduğumuz canım arkadaşlarım Elif KAYA ve Firuze Fulya HATAY'a,

Beni koşulsuz şartsız destekleyen Anneciğim, Babacığım, Ablacığım ve Kardeşime, değerli eşimin Annesi, Babası ve Kardeşine çok teşekkür ederim.

Her gün birlikte öğrenmeye devam ettiğim, soluksuz kaldığımda gölgesinde dinlendiğim, hakkında ne yazsam az kalacağını bildiğim, ideallerimizi gerçekleştirmek uğruna çok zor bir yola girmekten çekinmeyeceğim kadar sevdiğim ve güvendiğim, bu satırları yazarken de sevgimden ve minnetimden gözlerimin dolmasına engel olamadığım, belki de bu tezin ve yaşamımın en büyük mimarı olan Canım Süha'ma çok teşekkür ederim.

Anadolu'da adına Trabzon denen bir taşra memleketinde dünyaya gelip devlet okulunda öğrenimine başlayan bu kadının Fen Lisesi'ni ve ardından Yıldız Teknik Üniversitesi gibi bir okulu kazanmasına fırsat tanıyan, bizzat şahidim ki, Anadolu'nun birçok köyünden birçok kişinin de bileğinin hakkıyla Fen Lisesi'nde ve birçok iyi üniversitede okumasının imkanını sağlayan, değerini her gün büyük bir coşkuyla anlamaya devam ettiğim Canım Cumhuriyet'e, temelini atan Başöğretmenimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'e, tüm silah arkadaşlarına, şehit ve gazilere, adını bilmediğim o birçok isimsiz kahramana,

Cumhuriyetin en önemli eğitim kurumları olan öğretmen okulları ve köy enstitülerinden yetişen, eğitimimizin önemini ve bu vatanı sevmeyi her daim hatırlatan, çok bunaldığım zamanlarda bilgelikleriyle beni yönlendirerek bu doktora tezini tamamlamamda çok kritik eşikleri aşmamı sağlayan değerli aile büyüklerimiz Mukaddes KEMERTAŞ ile İsmet KEMERTAŞ'a minnet ve saygıyla teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bilgisayarlarım, monitörlerim, yapışkanlı kâğıt ve defterlerim, renkli ve fosforlu kalemlerim, yaz-kış-pandemi demeden beni hep güzelliklere kavuşturan dört tekerim, bulut sistemlerim, harici belleklerim ve Spotify listelerime,

Laboratuvarı keyifli bir ortama çeviren canlarım, "aman" dediğimde yardımıma koşanlarım, zor zamanları atlatmama yardımcı olanlarım, Spotify laboratuvar listemizi beraber oluşturarak tanışlığımızda seviye atladığımız canlarım Cansu GÜLCAN, İrem ÇOKSU, Kaan EREN, Kaan NEGİZ ve Koray KAHRAMAN'a,

Son olarak, onca olana rağmen asla yılmadığım için kendime,

Çok teşekkür ederim.

Nilbeste BONCUKÇU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xiv

TABLO LİSTESİ xvi

ÖZET xvii

ABSTRACT xix

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 6

1.3 Hipotez ... 6

2 GENEL BİLGİLER 8

2.1 Doku Mühendisliği ... 8

2.2 İskele Üretim Yöntemleri ... 11

2.2.1 Çözücü Dökme/Partikül Uzaklaştırma Yöntemi ... 11

2.2.2 Isıl Olarak Tetiklenen Faz Ayrımı Yöntemi ... 12

2.2.3 Elektroeğirme ... 13

2.2.4 Dondurarak Kurutma Yöntemi ... 14

2.2.5 Hücresizleştirilmiş İskeleler ... 15

2.2.6 Üç Boyutlu Basılan İskeleler ... 16

2.2.7 Hücre Tabakaları ... 17

2.2.8 Kendiliğinden Düzenlenen Hidrojel Matrikste Hücre Enkapsülasyonu ... 18

2.3 Polimerik Jeller ve Sınıflandırılması ... 18

2.3.1 Fiziksel Jeller ... 19

2.3.2 Dolaşık Ağ Jeller ... 19

2.3.3 Kovalent Olarak Çapraz Bağlı Jeller ... 20

2.4 Hidrojeller ... 20

2.5 Doku İskelelerinde Kullanılan Polimerler ... 23

2.5.1 Hyaluronik Asit ... 23

2.5.2 Kondroitin Sülfat ... 24

2.5.3 Kitosan ... 25

2.6 Çapraz Bağlama Yöntemleri 26
2.6.1 Kimyasal Çapraz Bağlama 28
2.6.2 Küçük Moleküllü Çapraz Bağlayıcılar 31
2.7 Biyobozunurluk 38
2.8 Yara İyileşmesi 40
2.8.1 Yara İyileşmesinin Basamakları 40
2.8.2 Enfeksiyon 42
2.8.3 Antibiyotik Direnci 43
2.9 Antimikrobiyal Peptidler 45
2.9.1 HF-18 46
2.10 İlaç Taşıma Sistemleri 47
2.11 İlaç Salımı 48
2.12 Yara Örtüleri ve Örtü Malzemesi Olarak Biyomalzemeler 51
2.12.1 Gazlı Bezler 51
2.12.2 Hidrokolloidler 51
2.12.3 Aljinatlar 51
2.12.4 Yarı Geçirgen Filmler 52
2.12.5 Süngerimsi Yara Örtüleri 52
2.12.6 Hidrojel Yara Örtüleri 52
2.13 Yara İyileşmesinde Ch, HA ve CS'nin Yeri 53
2.14 AMP'ler ve İlaç Taşıma Sistemleri 54
3 DENEYSEL YÖNTEM **56**
3.1 Deney Malzemeleri 56
3.2 Karışımın Tasarımı ve Çapraz Bağlı İskelenin Optimizasyonu 56
3.3 HF-18 Peptidi Yüklü İskelenin (MP) Üretimi 59
3.4 M ve MP'nin Karakterizasyonu 59
3.4.1 Renklenme ve Faz Ayrımı Gözlemleri 59
3.4.2 Şişme Çalışmaları 59
3.4.3 Yüzeydeki Fonksiyonel Grupların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometri Yöntemiyle (FTIR) Tayini 60
3.4.4 Taramalı Elektron Mikroskopisiyle (SEM) Morfolojik Analiz 60
3.4.5 Termogravimetrik Analiz 60
3.4.6 MP'den Peptid Salımı 60
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 61

3.5.1 Biyouyumluluğun Tespiti 62
3.5.2 Yara İyileşme Kapasitesinin Tespiti 62
3.5.3 Hücre Tutunması Çalışmaları 63
3.6 Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları 63
4 BULGULAR **65**
4.1 Karışım Tasarımı ve Çapraz Bağlı İskelenin Optimizasyonu 65
4.2 Morfolojik Gözlemler 69
4.3 Yüzeydeki Fonksiyonel Grupların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisiyle Karakterizasyonu 70
4.4 Termogravimetrik Analiz 74
4.5 Şişme Çalışmaları 75
4.6 MP'den Peptid Salımı Çalışmaları 77
4.7 Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi 78
4.8 Yara İyileşme Kapasitesinin Değerlendirilmesi 79
4.9 Hücre Tutunma Çalışmaları 81
4.10 Antibakteriyel Aktivite Çalışması 82
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **86**
5.1 Sonuçlar 86
5.2 Öneriler 89
KAYNAKÇA **90**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **109**

SİMGE LİSTESİ

t_R	Alıkonma Zamanı
pK_a	Asitlik Derecesi
G_0	Başlangıçta Oluşturulan Yara Alanı
W_{pH}	Belirlenen pH Değerindeki Islak İskele Kütlesi
°C	Derece Santigrat
kPa	Kilopaskal
kV	Kilovolt
$A570_{kontrol}$	Kontrolün 570 nm'deki Absorbansı
C_c	Kontrolün Hücre Sayısı
W_d	Kuru İskele Kütlesi
μg	Mikrogram
G_t	Belirli Bir Zamanda Kalan Yara Alanı
$A570_{örnek}$	Örneğin 570 nm'deki Absorbansı
C_s	Örneğin Hücre Sayısı
T	Sıcaklık
t	Zaman

KISALTMA LİSTESİ

AcAc	Asetik Asit
aMKH	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
ACN	Asetonitril
AMP	Antimikrobiyal Peptid
ASTM	Amerikan Test ve Malzeme Derneği, *American Society for Testing and Materials*
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma, *Attenuated Total Reflectance*
BALB/3T3	Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı
CA	Sitrik Asit
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım, *Computer-Aided Design*
CAS	*Chemical Abstract Service*
CD	Ayrım Sınıfı, *Cluster of Differentiation*
CFU	Koloni Oluşturan Birim
Ch	Kitosan
CH_3COONa	Sodyum Asetat
CS	Kondroitin Sülfat
CS*	Optimal Kondroitin Sülfat Miktarı
CSA	Kondroitin-4-Sülfat
CSB	Kondroitin-2,4-Disülfat
CSC	Kondroitin-6-Sülfat
CSD	Kondroitin-2,6-Disülfat
CSE	Kondroitin-4,6-Disülfat
DAPI	4′,6-Diamidino-2-Fenilindol
dH_2O	Distile Su
DMEM/F-12	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
E. coli	*Escherichia coli*
ECM	Ekstraselüler Matriks, Hücreler Arası Matriks
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetil Aminopropil)-Karbodiimid
EDGE	Etilen Glikol Diglisidil Eter

EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EN ISO	Avrupa Normu-Uluslararası Standartlar Organizasyonu, *European Norm-International Organization for Standardization*
FA	Formik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometri/Spektroskopisi
G*	Optimal Genipin Miktarı
GA	Gluteraldehit
GAG	Glikozaminoglikan
GalNAc	N-Asetil-Galaktozamin
GlcA	Glukuronik Asit
GlcN	Glukozamin
GlcNAc	N-Asetil Glukozamin
HA	Hyaluronik Asit
HA*	Optimal Hyaluronik Asit Miktarı
HGT	Yatay Gen Transferi, *Horizontal Gene Transfer*
HUVEC	İnsan Endotelyal Hücre Hattı
IPN	İç İçe Geçmiş Ağ Yapısı, *Interpenetrating Network*
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
LC-ESI-MS	Sıvı Kromatografisi-Elektrospray İyonizasyon-Kütle Spektrometrisi, *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*
M	Optimize iskele
MAPK	Mitojenlerce Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
MEK	Minimum Efektif Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon, MIC
Mix	Çapraz Bağlanmamış İskele Karışımı
MRSA	Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
MSSA	Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
MTK	Minimum Toksik Konsantrasyon
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
N_2	Moleküler Azot
NaOH	Sodyum Hidroksit
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NIH 3T3	Fare Fibroblast Hücre Hattı

NIH	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü, *National Institute of Health*
NO	Nitrik Oksit
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Poli(Kaprolakton)
PDGF	Plateletten Türevlenen Büyüme Faktörü
PEG	Poli(Etilen Glikol)
PLA	Poli(Laktik Asit)
PLGA	Poli(Laktik-*ko*-Glikolik Asit)
PRP	Plateletçe Zengin Plazma
RT	Oda Sıcaklığı, *Room Temperature*
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi, *Scanning Electron Microscopy*
TGA	Termogravimetrik Analiz
TGF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-α
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-β
TIPS	Isıl Olarak Tetiklenen Faz Ayrımı, *Thermally Induced Phase Seperation*
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-α
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
v/v	Hacim/Hacim, *Volume/Volume*
w/v	Kütle/Hacim, *Weight/Volume*

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliğinin üç temel bileşeni....9
Şekil 2.2 Çözücü dökme/partikül uzaklaştırma yöntemi....12
Şekil 2.3 Isıl olarak tetiklenen faz ayrımı yöntemi....12
Şekil 2.4 Elektroeğirme yöntemi ve eğirmede oluşan Taylor konisi....13
Şekil 2.5 Suyun faz diyagramı....14
Şekil 2.6 Dondurarak kurutma yöntemi....15
Şekil 2.7 Üç boyutlu basım yöntemi....16
Şekil 2.8 Hyaluronik asidin molekül yapısı....24
Şekil 2.9 Kondroitin sülfatın molekül yapısı....25
Şekil 2.10 Kitosanın molekül yapısı....25
Şekil 2.11 Çapraz bağlama reaksiyonları....28
Şekil 2.12 Genipinin çapraz bağlama reaksiyonları için önerilen iki mekanizma....34
Şekil 2.13 Asidik ve nötral koşullarda genipinin kitosanla çapraz bağlanma reaksiyonu....35
Şekil 2.14 Bazik koşullarda genipinin kendi kendine polimerizasyonunun mekanizması....36
Şekil 2.15 Kuvvetli bazik koşullarda genipinin kitosanla çapraz bağlanma reaksiyonu....37
Şekil 2.16 Yüzey erozyonu ve yığın erozyona ait şematik gösterim....39
Şekil 2.17 Yara iyileşmesinin dört basamağı....41
Şekil 2.18 HF-18 peptidinin moleküler yapısı....47
Şekil 2.19 Tek doz uygulamasıyla, çoklu doz uygulamasıyla ve sıfırıncı dereceden kontrollü salımla elde edilen plazma ilaç konsantrasyonu....48
Şekil 2.20 Hidrojellerden ilaç salım mekanizmaları....50
Şekil 4.1 Optimizasyon deneylerine ait görüntüler....66
Şekil 4.2 SEM mikrografları ve C mikrografının analizine ait histogramı....69
Şekil 4.3 Polimerler ve Mix'e ait kızılötesi spektrumu....71
Şekil 4.4 Genipin, polimer karışımı Mix ve M'ye ait kızılötesi spektrumu....72
Şekil 4.5 HF-18, M ve MP'ye ait kızılötesi spektrumu....73
Şekil 4.6 Mix, M ve MP'ye ait termogram....74
Şekil 4.7 Farklı pH'taki ortamlarda M'nin şişme karakteri....76
Şekil 4.8 MP'den farklı pH'larda HF-18 salım profilleri....78

Şekil 4.9 MTT sonunda elde edilen yüzdece hücre canlılıkları 79
Şekil 4.10 Çizik testi sonunda gözlemlenen yara iyileşmesi (10X büyütme) 80
Şekil 4.11 Yara iyileşmesine ait 24, 48, 72 ve 96 saat sonundaki yüzdece iyileşme grafiği 81
Şekil 4.12 Hücre tutunmasına ait DAPI boyaması görüntüleri (20X büyütme)...81
Şekil 4.13 M ve MP'nin *S. aureus* ve MRSA üzerine antibakteriyel etkisini gösteren petri görüntüleri 83
Şekil 4.14 M ve MP'ye ilişkin logaritmik azalma ve yüzdece ölüm grafikleri.....84

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Çapraz bağlama yöntemleriyle bunların avantaj ve dezavantajları.....27

Tablo 2.2 Yöneldikleri fonksiyonel gruplara göre çapraz bağlayıcılar 29

Tablo 2.3 Kimyasal çapraz bağlayıcıların avantajları ve dezavantajları 30

Tablo 2.3 Kimyasal çapraz bağlayıcıların avantajları ve dezavantajları (devamı) 31

Tablo 3.1 Optimizasyon koşulları 57

Tablo 3.2 LC-MS cihazında kullanılan elüsyon programı 61

Tablo 4.1 Antibakteriyel çalışmanın yürütüldüğü zaman aralıklarındaki HF-18 salım miktarları 83

ÖZET

Biyoaktif Doku İskelesi Üretimi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Nilbeste BONCUKÇU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Yara iyileşmesi sürecinde yararlanılan antibiyotiklere karşı ortaya çıkan antibakteriyel direnç, son 20 yılda artan ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun üstesinden gelinmesi amacıyla alternatif yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Konak savunma peptidleri olarak da bilinen antimikrobiyal peptidler, geniş spektruma sahip olmaları ve hızlı etki etmeleri sayesinde antibiyotiklere güçlü birer muadil olarak araştırmalara konu edilmektedir. Antimikrobiyal peptidlerin yara bölgesinde uzun süre etkin dozda salımın sağlamak gerekmektedir. Polimerik hidrojel doku iskeleleri ilaç taşıma sistemi olarak kullanıldığında kontrollü salım profili sağlayarak etkin çözümler sunmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında polimerik hidrojel iskele yapısını oluşturmak için; biyouyumlu ve biyobozunur olan, yüksek su tutma özelliğine sahip hyaluronik asit, bağ dokularda bulunan sülfatlı bir glikozaminoglikan olan kondroitin sülfat ve doğrusal, biyobozunur ve katyonik bir polisakkarit olan kitosan kullanılmıştır.

Bu iskelenin yara iyileşmesinde ilaç taşıyıcı olarak uygulaması amacıyla, iskeleye antimikrobiyal bir peptid olan HF-18 yüklenerek genipinle çapraz bağlanmıştır.

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, üretilen iskelenin bağlantılı porlara sahip olduğu ve asidik ortamda %5446.5 şişme oranıyla 5 günde %45.12'lik salım gerçekleştirdiği görülmüştür. Biyolojik aktivite testleri sonucunda ise iskelenin L929 hücrelerine biyouyumlu olduğu, hücre tutunması ve yara iyileşmesini tetiklediği, ayrıca *S. aureus* ve MRSA suşlarına karşı yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Tez kapsamında HF-18 ilk kez yara iyileşmesi alanında test edilmiş, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve üretilen iskelenin antimikrobiyal peptid taşıyıcı olarak uygun olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal peptidler, HF-18, hidrojel, polimerik doku iskelesi, yara iyileşmesi

ABSTRACT

Fabrication of Bioactive Tissue Scaffold and Evaluating Its Antimicrobial Activity

Nilbeste BONCUKÇU

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Antibacterial resistance, emerged against antibiotics used in the wound healing process, is a severe problem increased in the last 20 years. In order to overcome this, alternative approaches are needed. Antimicrobial peptides, also known as host defense peptides, are the subject of research as powerful substitutes for antibiotics due to their broad spectrum and rapid action. It is necessary to deliver long-term release at effective dose of antimicrobial peptides in the wound area. Polymeric hydrogel scaffolds as drug delivery systems provide effective solutions by providing a controlled release profile.

In the thesis, to create the polymeric hydrogel scaffold hyaluronic acid, which is biocompatible and biodegradable, with high water retention; chondroitin sulfate, a sulfated glycosaminoglycan found in connective tissues; and chitosan, a linear, biodegradable and cationic polysaccharide, were used. In order to use this scaffold as a drug delivery system in wound healing, HF-18, an antimicrobial peptide, was loaded into the scaffold and crosslinked with genipin.

As a result of the characterization studies, it was seen that the produced scaffold had interconnected pores and released HF-18 at a rate of 45.12% in 5 days with

a swelling rate of 5446.5% in acidic environment. Biological activity tests revealed that the scaffold was biocompatible with L929 cells, triggered cell adhesion and wound healing, and showed high bactericidal activity against *S. aureus* and MRSA strains. Within the scope of the thesis, HF-18 was tested for the first time in the field of wound healing and the produced scaffold was evaluated to be suitable as an antimicrobial peptide carrier.

Keywords: Antimicrobial peptides, HF-18, hydrogel, polymeric scaffold, wound healing

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Doku mühendisliği, fonksiyonunu kısmen ya da tamamen yitirmiş bir dokunun fonksiyonunun yeniden kazandırılması, iyileştirilmesi veya sürdürülmesi amaçlarıyla mühendislik, yaşam bilimleri, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanlarını bir araya getirerek çözümler oluşturan çok disiplinli bir mühendislik alanıdır [1]. Doku mühendisliğinin dokuları iyileştirmede yararlandığı 3 temel bileşen dokuların da bileşenlerini oluşturan hücreler, biyosinyal molekülleri ve ekstraselüler matriks ikamesi olarak görev yapan doku iskelesidir. Bu üç bileşenin her biri tek başına kullanılarak doku mühendisliğine konu edilebileceği gibi, bileşenlerin ikili kombinasyonları ve üçünün de birlikte kullanıldığı farklı stratejilerin uygulanması da söz konusu olabilmektedir.

İskele üretim yöntemleri, iskeledeki por yapılarının oluşturulması açısından iki gruba ayrılabilir. İlki, üretilmiş yapıda porları oluşturup iskelenin katı kısmının üretimini konu alır. İkinci grup yöntemler ise yığın malzeme ya da etkileşime girdiği malzemelerin, por üretimi prosesi için başlangıç noktasını oluşturduğu ve bu katı malzemenin üzerinde porların oluşturulduğu yöntemlerdir [2]. Geleneksel üretim yöntemleri çözücü dökme/partikül uzaklaştırma, ısıl olarak tetiklenen faz ayrımı, gaz köpürtme, elektroeğirme ve dondurarak kurutma yöntemleri şeklinde özetlenebilir [3]. Bu üretim yöntemleri kullanılarak jel, fiber, film ya da üç boyutlu süngerimsi formlarda doku iskelesi üretimi gerçekleştirilebilir.

Hidrojeller, biyolojik sistemlerde çokça çalışılan iskele tipleridir. Bu jeller, ağırlıkla hidrofilik polimerlerden oluşur ve hidrofilik üç boyutlu ağ yapısı biyolojik sıvılar içinde çözünmeden yüksek oranlarda şişme kapasitesine sahiptir [4]. Hidrojellerin temel özellikleri, hidrofilisiteleri, yüksek şişme kapasitesi, sıvıyı emme kapasitesi, yumuşaklık, elastiklik olarak sayılabilir [5].

Doku iskelesi üretim yöntemlerine doğal ve sentetik birçok polimer konu edilebilmektedir. Ancak söz konusu doğal polimerler olduğunda, doku mühendisliği elemanı olarak kullanımları sıkça araştırılan bazı polimerler öne çıkmaktadır.

Hyaluronik asit, biyouyumlu ve biyobozunur olan, yüksek su tutma özelliğine sahip bir biyopolimer olup göz, beyin, kıkırdak, deri ve aort gibi dokuların ekstraselüler matrikslerinde bulunmaktadır. Özellikle reseptörlere substrat gibi davrandığında hyaluronik asit, hücre sağ kalımı, çoğalması ve göçü gibi hücresel davranışları etkiler. Bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşimi de yine CD44 üzerinden meydana gelir ve bu yolla enflamasyonu da etkiler [6, 7]. Hyaluronik asit fibroblastları prolifere ederek yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [8]. Ayrıca bakteriyle tutunmayı geciktirip biyofilm oluşumunu önleyerek bakteriyostatik etki göstermektedir [9-11].

Kondroitin sülfat bağ dokularda doğal olarak bulunan sülfatlı bir glikozaminoglikandır. Hücre yüzeylerinde, ekstrasülüler matriksi ve hücreyi çevreleyen periselüler matrikste yer almaktadır. Antibakteriyel özellikte olmayıp yara iyileşmesinde etkilidir. Çalışmalar, kondroitin sülfatın mitojenlerce aktifleştirilmiş protein kinaz sinyal yolağını upregüle ederek fibroblast büyüme faktörü-2 ile tetiklenen hücre proliferasyonu ve hücre tutunmasını desteklediğini ortaya çıkarmıştır [12, 13].

Kitosan, kitinin kimyasal hidroliz yoluyla kısmi deasetilasyonundan türetilen, doğrusal, biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakkarittir [14]. Kitosan sulu çözeltisi, çeşitli doku mühendisliği ve ilaç dağıtım uygulamaları için filmler, tüpler, süngerler ve diğer gözenekli yapılar gibi farklı formlar kolayca üretilebilir [15].

Kitosanın katyonik polimer zincirlerinin, belirli büyüme faktörleri ve negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturabildiği ve böylece onları ısı inaktivasyonundan ve proteolizden koruduğu gösterilmiştir [14]. Üç boyutlu kitosan doku iskeleleri, insan vücudunda doğal olarak bulunan glikozaminoglikanlara benzer yapısal ve fonksiyonel özellikler göstermesiyle glikozaminoglikanların iyi bir taklit malzemesi olarak kabul görmüştür [14]. Bu nedenle, tek başına veya diğer doğal polimerlerle kombinasyon halinde kitosanın 3 boyutlu yapı iskeleleri, çok sayıda

doku mühendisliği uygulaması için jel, sünger veya fiber formlarında kullanılır [16, 17].

Doğal biyopolimerler, özellikle mekanik dayanımlarının düşük olması ve önemli bir kısmının suda çözünebilmesi nedeniyle, daha dayanıklı hale getirilmek üzere çapraz bağlama reaksiyonlarına sokulmaktadır. Çapraz bağlama yöntemleri fiziksel, enzimatik ve kimyasal çapraz bağlama yöntemleri olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır [18]. Kimyasal çapraz bağlayıcılar, polimerik yapı iskelelerinin ve hidrojellerin mekanik özellikleri ile bozunma özelliklerini iyileştirmek amacıyla en yaygın şekilde kullanılan çapraz bağlama ajanlarıdır. Sentetik ve doğal reaktifler dahil olmak üzere birçok kimyasal çapraz bağlayıcılar, doku iskelelerinin morfolojik ve biyomekanik özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır.

Çalışmaların çoğu, tasarlanan bileşimlerin stabilitesini arttırmak için çapraz bağlanmasını kapsamaktadır. Konu edilen çapraz bağlayıcılardan EDC/NHS [19, 20] ve glutaraldehit [21], sıklıkla kullanılmakla birlikte memeli hücrelerine toksisite göstermektedirler. Bu nedenle bunları biyouyumlu bir çapraz bağlayıcıyla değiştirmek, tasarlanan sistemin biyouyumluluğunun geliştirilmesi için büyük önem taşır.

Genipinin toksisitesinin çok düşük olduğu, hatta bu molekülün biyouyumlu olduğu ifade edilmekle birlikte, yapılan çalışmalar genipinin aynı zamanda koleretik, antidepresan, antidiyabetik, antikanser, antitrombotik, antienflamatuar, antibakteriyel; mide, karaciğer ve sinir koruyucu (gastroprotektif, hepatoprotektif, nöroprotektif) olduğunu, lipid proksidasyonunu engellediğini ve Alzheimer hastalığında amiloid beta proteinine karşı olan hipokampal nöronlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir [22-24]. Biyouyumlu olan bu çapraz bağlayıcı homobifonksiyonel olup çapraz bağlama reaksiyonunu primer amin grupları üzerinden gerçekleştirmektedir [25].

Sağlıklı dokular; hastalıklar ya da kazalar gibi birçok iç ve dış faktörün etkisiyle hasarlanabilir ve dokular bütünlüğünü, fonksiyonlarını kaybedebilir. Bu hasarlı dokuların restorasyonu, yeniden yapılanması süreci yara iyileşmesi olarak adlandırılır [26, 27].

Yaralanmadan sonra doku; bütünlüğünü, doğal bariyer yapısını ve patojenlere karşı bağışıklık koruyuculuğunu kaybettiğinden enfeksiyonlara açık hale gelir [26, 27]. Enfeksiyonların yara iyileşmesini kesintiye uğrattığı uzun zamandan beridir bilinmektedir [28-32]. Yaralı dokunun tamamen iyileşmesi ve yeniden yapılanması zaman aldığı için yara bölgesinin iyileşme boyunca steril tutulması, gecikmiş yara iyileşmesini engellemek açısından önem arz etmektedir. Son 20 yılda bilinçsiz ve yönergesine uygun olmayan şekilde antibiyotik kullanımının artması, özellikle önemli bakteriyel patojenlerde genel kullanımda olan antibiyotiklere karşı direnç oluşmasına neden olmuştur [33, 34].

Konak savunma peptidleri (*host defense peptides*) olarak da bilinen antimikrobiyal peptidler, memeliler, hayvanlar, bitkiler ve tek hücrelilerde doğal bağışıklığın ilk savunma hattı olan doğal bileşenlerdir [35, 36]. Bu peptidler bazı özgül genler tarafından, sürekli olarak ya da bazı uyaranlar altında ifade edilir. Etki mekanizmaları geleneksel antibiyotiklerden farklı olduğu için daha geniş spektrumda ve ilaç direnci gösteren mikroorganizmalarda bile etkilidirler. Patojenler üzerinde hücre zarının tahribi, konakta ise bağışıklık yanıtını ve enflamasyonu düzenleme özelliklerine sahiptirler [37, 38]. Etki alanları yalnız Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerle sınırlı olmayıp mantarlar ve virüsleri de içeren geniş bir spektruma yayılmış haldedir [39, 40]. Antimikrobiyal peptidlerin %88'i pH:7'de +2 ilâ +9 mV arası net pozitif yüke sahipken [41, 42] %6'sı nötr ve %6'sı da anyonik peptidlerdir [43, 44].

Bu peptidlerin etki mekanizmalarıyla ilgili çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bu mekanizmalar arasında hücre zarı hasarı, hücre içi bakterisidal mekanizma, makromolekül sentezinin inhibisyonu, organellerin DNA parçalanmasına neden olacak şekilde hasar görmesi, enzim aktivitesinin inhibisyonu ve bağışıklığın düzenlenmesine katılarak antimikrobiyal etki göstermeleri sayılabilir [39, 45]. Bunların arasında özellikle katyonik antimikrobiyal peptidlerle hücre zarları veya zar geçirgenliği arasındaki etkileşimin potansiyel ve bilinen mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir.

Myxine glutinosa'nın bağırsağından izole edilen HFIAP-1 peptidinin iki aminoasidinin değiştirilmesiyle (His^{12} ve Gly^{14} → Lys^{12} ve Phe^{14}'e

dönüştürülmüştür) elde edilen HF-18'in (dizi: GFFKKAWRKVKKAFRRVL), *Staphylococcus aureus* üzerinde 4 μg/ml gibi düşük bir MIC değerine, hızlı bir bakterisidal etkiye, *S. aureus* ile tetiklenen fare bakteremisinde enflamatuar sitokinlerin salımını inhibe edici özelliğe sahip olduğu, *in vivo*da da memeli hücrelerine düşük toksisite gösterdiği ortaya konmuştur [36]. Söz konusu peptidin önemli özelliklere sahip olması, yara iyileşmesi süresince sergileyeceği antibakteriyel etkinin korunumunun da çok değerli olduğu anlamına gelmektedir. İlaç taşıma sistemleri bu uzatılmış etkinin sergilenmesi için uygun adaylardır.

İlaç taşıma sistemleri, taşıdıkları etken maddenin sudaki çözünürlüğünü arttırarak, taşındığı bölgede kalma zamanını uzatarak, enzimatik ve hidrolitik bozunmaya karşı maddeyi koruyarak biyoyararlanımın arttırılmasını, daha uzun sürede ve kontrollü salımın gerçekleşmesini sağlayan sistemlerdir. İlaç taşıyıcı olarak hidrojel doku iskelelerinde, taşınacak molekül polimerik yapı içinde dağılır. Salım, suyun hidrojele nüfuzu ve şişme kontrollüdür [46].

Yara iyileşmesi konusundaki güncel yaklaşımlarda fonksiyonel biyomalzemeler ve doku mühendisliği ürünü deri ikameleri vazgeçilemez birer parça haline gelmişlerdir. Biyomalzemelerle üretilen yara örtüleri, tedavi edici ajanların lokal olarak gönderilmesinde büyük bir potansiyel taşımaktadır [47]. Hidrojellerin suyla şişebiliyor olmaları ve yara bölgesini nemli tutmaları yara örtü malzemesi olarak kullanımlarını önemli hale getirmektedir. Özellikle yaralarda meydana gelen sızıntıların tutulabilmesi, yara bölgesinin kuru bırakılmaması, por büyüklüklerinin ayarlanabilmesi sayesinde patojenlere geçirgenliklerinin azaltılması ve yara iyileşmesine katkı sunacak etken maddelerin taşınıp salınması yoluyla yara bölgesinin iyileşmesinde aktif rol oynar [48].

Yaraların mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu yara iyileşmesini geciktirdiği gibi sistemik enfeksiyon riskini de beraberinde getirir [47]. Bu nedenle antienfektif ajanların bölgeye topikal olarak uygulanması, burada kontrollü salımın gerçekleşmesiyle enfeksiyonun engellenmesi hem yara iyileşmesinin kesintiye uğramaması hem de aşırı dozda ilaç kullanımı nedeniyle antibiyotik direncinin artmasının önüne geçilmesi açısından önem taşımaktadır.

Literatürde yer alan çalışmalar kitosan, hyaluronik asit ve kondroitin sülfatın kullanımını içerse de bunlardan hiçbiri bahsi geçen üç polimerin zincir formlarının genipinle çapraz bağlanacağı şekilde tasarlanmamıştır. Daha önce bahsi edilen çalışmalar kondroitin sülfatın nanopartikül formunda kullanımını [49], karboksimetil kitosan kullanımıyla birlikte genipin yerine EDC/NHS çapraz bağlayıcısının kullanımını incelemiştir [50]. Çalışmalardan biri kitosanın genipinle çapraz bağlandığı bir yapının oluşturulmasını ortaya koymuş olsa da bu çalışmada yapı oluşturulurken jelatin biyopolimeri kullanılmıştır [51]. Aynı zamanda literatürde yer alan bu doğal polimerlerin kullanılması ile hazırlanan doku iskelesi çalışmalarının hiçbirinde HF-18 peptidinin yer almadığı bilinmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Mevcut tez çalışmasının amaçları;

- Hidrojel tabanlı, yara iyileşmesinde kullanılabilecek kitosan, hyaluronik asit ve kondroitin sülfattan oluşan bir doku iskelesi üretiminin optimize edilmesi ve optimum koşullarda üretilen iskelenin karakterizasyonu,
- Optimize koşullarda HF-18 peptidi yüklü doku iskelesi üretilmesi ve karakterizasyonu,
- HF-18 içeren (MP) ve HF-18 içermeyen (M) doku iskelelerinin karşılaştırmalı olarak biyolojik aktivitesinin; biyouyumluluk, hücre çoğalmasına etki, hücre tutunmasına etki ve antimikrobiyal etki açılarından incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında da kullanılan; antimikrobiyal katyonik bir polimer olan kitosanın, yara iyileşmesini ve hücre proliferasyonunu tetikleyen, biyouyumlu ve biyobozunur bir polianyon olan hyaluronik asitin, yara iyileşmesinde hücre proliferasyonu ve hücre tutunmasını destekleyen kondroitin sülfatın doğal biyopolimerler olarak doku iskelesi üretiminde ayrı ayrı kullanıldığı bilinmektedir. Genipin ise amin grupları üzerinden çapraz bağlı doku iskelesi üretiminde toksik etkileri olmaması nedeni ile son zamanlarda sıklıkla tercih edilen bir çapraz

bağlayıcı, HF-18 de literatüre son yıllarda kazandırılmış olan katyonik özellikte antimikrobiyal bir peptiddir.

Bu bilgiler doğrultusunda mevcut tez çalışmasının hipotezi; genipin ile çapraz bağlanmış kitosan, hyaluronik asit ve kondrotin sülfattan oluşan hidrojel yapılı doku iskelesinin; biyouyumlu olacağı, yara iyileşmesini, hücre proliferasyonunu ve hücre tutunmasını destekleyeceği ve HF-18 katyonik peptidi bu sisteme yüklendiğinde antimikrobiyal özelliğinin iyileştirileceğidir.

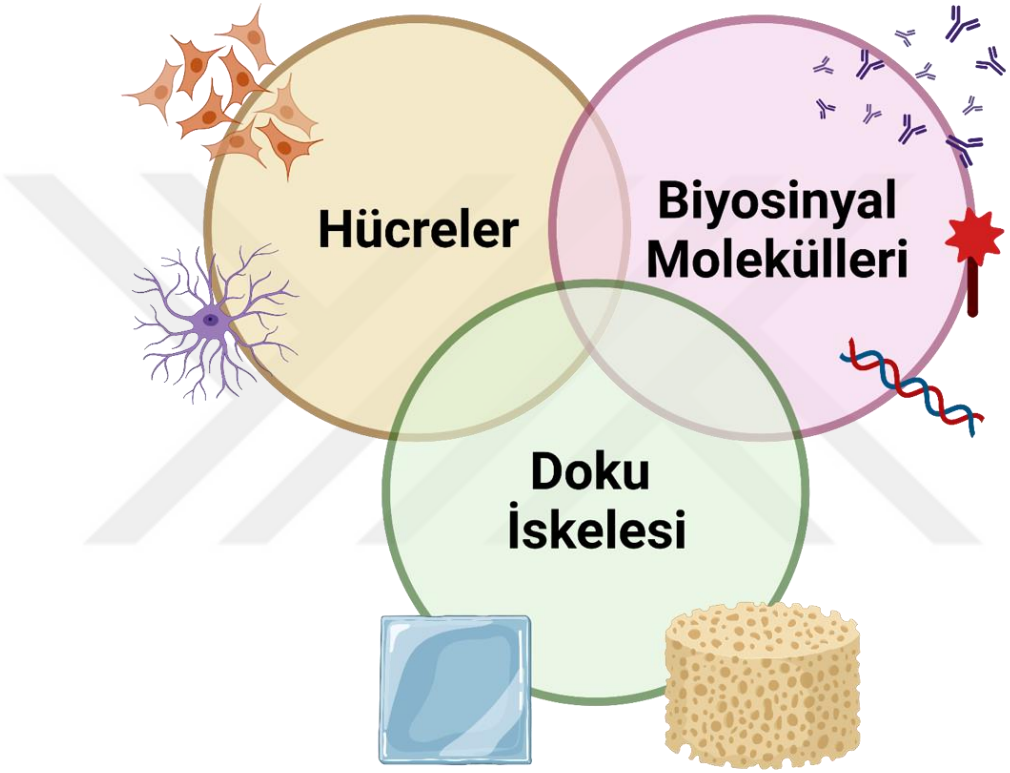
2
GENEL BİLGİLER

2.1 Doku Mühendisliği

Dokular; endotel ve epitel hücreler, fibroblastlar, bağışıklık sistemi hücreleri gibi çeşitli hücresel bileşenlerle bu hücrelerin içine yerleşik halde bulunduğu hücresel olmayan ağ yapıların yani ekstraselüler matriksin (*extracellular matrix*, ECM) birlikte oluşturduğu yapılardır [52]. ECM, hücreler için yalnızca fiziksel yapısal bariyer oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri yoluyla hücresel fonksiyonları düzenleme görevi de üstlenir [53]. Bu fonksiyonlar, hücre çoğalması (proliferasyon), hücre göçü (migrasyon), hücresel sağ kalım, hücre farklılaşması, homeostaz, morfogenez, damarlanma (anjiyogenez), bağışıklık fonksiyonları ve otofajidir [54-57]. Hücrelerin bu fonksiyonları için önemli sinyaller olan büyüme faktörleri, sitokinler ve matriksi yeniden düzenleyici enzimler de ECM ortamında bulunurlar ve hücresel davranışlar ile ECM yapısı üzerinde etkili olurlar [7]. Ayrıca hücrelerde bulunan integrinler, sindekanlar ve CD44 (CD: ayrım sınıfı, *cluster of differentiation*) gibi reseptörler ECM ile etkileşime girerek daha önce bahsedilen hücresel davranışların ortaya konmasına olanak tanırlar [58]. Örneğin CD44, ECM bileşenlerinden biri olan hyaluronik asite (HA) bağlandığında hücre içi sinyalizasyon aktive olur ve hücre iskeleti yeniden düzenlenir.

ECM'nin ana makromolekülleri, kolajen, fibronektin, lamininler, elastin, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (GAG), ve çeşitli glikoproteinlerin de içinde olduğu fibriler (zincir şeklinde) proteinlerdir. Bu moleküller üç boyutlu (3B), kompleks fakat iyi düzenlenmiş ağ yapılarını oluşturur [59]. ECM bileşenleri, o dokuda bulunan hücrelerin tamamının katkısıyla sentezlenip salgılanan moleküllerin bileşiminden oluşur ve bu bileşim dokudan dokuya, dokunun patofizyolojisine, gelişimsel evresine göre değişkenlik gösterir [59].

Doku mühendisliği, fonksiyonunu kısmen ya da tamamen yitirmiş bir dokunun fonksiyonunun yeniden kazandırılması, iyileştirilmesi veya sürdürülmesi amaçlarıyla mühendislik, yaşam bilimleri, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanlarını bir araya getirerek çözümler oluşturan çok disiplinli bir mühendislik alanıdır [1]. Doku mühendisliğinin dokuları iyileştirmede yararlandığı 3 temel bileşen de elbette dokuların da bileşenlerini oluşturan hücreler, biyosinyal molekülleri ve ECM ikamesi olarak görev yapan doku iskelesidir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Doku mühendisliğinin üç temel bileşeni (BioRender.com ile oluşturuldu)

Bu üç bileşenin her biri tek başına kullanılarak doku mühendisliğine konu edilebileceği gibi, bileşenlerin ikili kombinasyonları ve üçünün de birlikte kullanıldığı farklı stratejilerin uygulanması da söz konusu olabilmektedir. Sıklıkla kullanılan iki yaklaşımdan ilki, iskelenin hücrelere destek malzeme olarak kullanıldığı yaklaşımdır. Burada hücreler *in vitro* ortamda iskeleye ekilir ve bu sistem bir dokuya transplante edilir. Diğer yaklaşımda ise doku iskelesi biyosinyal moleküllerinin taşıyıcısı olarak kullanılır ve *in vivo*da hücreler bu iskele üzerinde ve boyunca doku yenilenmesini devam ettirir [60]. Söz gelimi yara iyileşmesi için

gerekli moleküllerin taşınması gerçekleştirildiğinde, ortam şartlarını uygun tutarken aynı zamanda iyileşmeye katkıda bulunan moleküllerin kontrollü salımında da aktif görev alarak çok yönlü bir yaklaşım sunar. Bu stratejiler, hakkında çözüm üretilmek istenen mühendislik problemine özel olarak tasarlanabilir olduklarından, özel problemlere etkin çözümler üretilebilmektedir.

Doku iskeleleri, hücrelere uzaysal bir tutunma yüzeyi sağlayarak hücresel davranışları yönlendiren ve destekleyen yapılardır. Dokuların *in vivo*da hücrelerin yerleşim gösterdiği ve biyosinyal moleküllerinin de biriktiği, sekestre olduğu yapılar olduğu düşünüldüğünde, doku iskelelerinin de bu görevi üstlenen yapılar olacağı kolaylıkla anlaşılabilir. Dolayısıyla doku mühendisliğindeki görevleri de bu doğrultuda şekillenir. Ancak ECM'nin kendisinin hücreler için bir sinyal oluşuna paralel olarak, doku iskeleleri de tek başlarına doku mühendisliğine konu edilebilir ve hasarlı dokuda iyileştirici sinyalin ta kendisi olarak kullanılabilir. Doku iskelelerinin mekanik dayanımı ve yüzey kimyası, hücre tutunmasını (adezyon) ve diğer hücresel fonksiyonları düzenleyici bir rol oynar.

İdeal bir doku iskelesinin taşıması gereken özellikler, şu 5 maddede özetlenebilir [61]:

- ✓ İskelenin yüzeyi hücre tutunmasını, büyümesini ve farklılaşmış hücre davranışlarını desteklemelidir.
- ✓ Biyouyumlu olmalı, iskele bileşenleri ya da bu bileşenlerin bozunma ürünleri *in vivo*da enflamasyon ya da toksisiteye sebebiyet vermemelidir.
- ✓ Biyobozunur olmalı, zaman içinde biyolojik ortamdan uzaklaşmalı ve yerini doğal dokuya bırakmalıdır.
- ✓ İskelenin porözitesi kültür süresi boyunca hücre tutunmasını, ECM yenilenmesini ve minimal difüzyonal sınırlamayı (*diffusional constraints*) sağlayacak şekilde yeterli alanı sağlamalıdır. Por yapısı, hücrelerin 3B olarak da homojen bir dağılım göstermesini desteklemelidir.
- ✓ İskele üretim prosesi iskelenin tekrar tekrar aynı özelliklerde üretilebilmesine olanak sağlamalı ve dokuya uygun bir mekanik dayanım göstermelidir. Bu amaçlarla farklı yöntemlerle, çeşitli doku iskeleleri üretilebilmektedir.

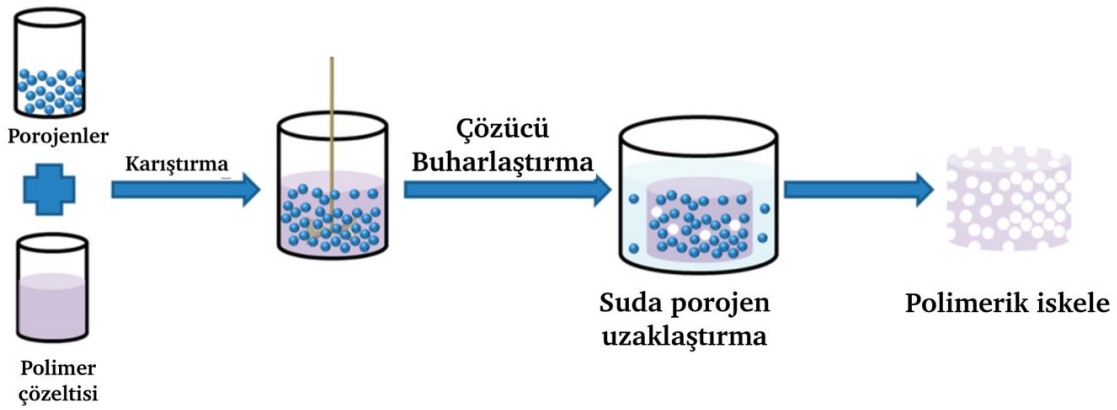
2.2 İskele Üretim Yöntemleri

İskele üretim yöntemleri, iskeledeki por yapılarının oluşturulması açısından iki gruba ayrılabilir. İlki, üretilmiş yapıda porları oluşturup iskelenin katı kısmının üretimini konu alır. Bu yöntemler arasında elektroeğirme, tekstil fiber ağlar ve katı serbest form üretimi yer alır. İkinci grup yöntemler ise yığın malzeme ya da etkileşime girdiği malzemelerin, por üretimi prosesi için başlangıç noktasını oluşturduğu ve bu katı malzemenin üzerinde porların oluşturulduğu yöntemlerdir ki bu yöntemler arasında da dondurarak kurutma, gaz köpürtme, partikül uzaklaştırma ve faz ayrımı yöntemleri sayılabilir [2]. İlerleyen bölümlerde bu yöntemlerden bazılarına değinilecektir.

Geleneksel üretim yöntemleri çözücü dökme/partikül uzaklaştırma, ısıl olarak tetiklenen faz ayrımı, gaz köpürtme, elektroeğirme ve dondurarak kurutma yöntemleri şeklinde özetlenebilir [3]. Bu üretim yöntemleri kullanılarak jel, fiber, film ya da 3B süngerimsi formlarda üretimler gerçekleştirilebilir.

2.2.1 Çözücü Dökme/Partikül Uzaklaştırma Yöntemi

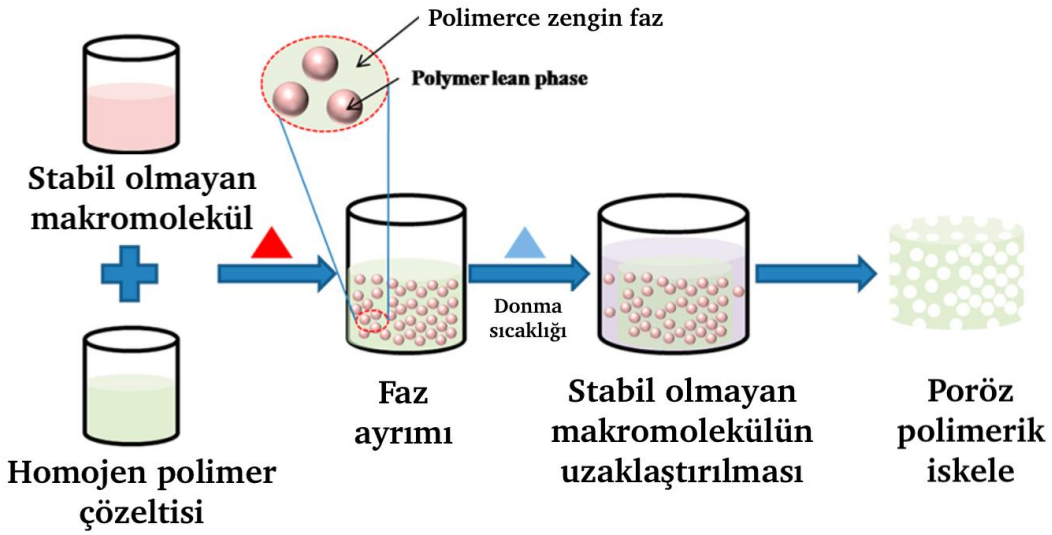
Bu yöntemin ilk aşaması, içine poröjen eklenmiş bir polimer çözeltisinin bir kalıba dökülmesiyle başlar. Bu aşama iki şekilde gerçekleşebilir: **1)** Polimer çözeltisi kalıba döküldüğünde çözücüye buharlaşacağı yeterli süreyi tanıyıp uzaklaşmasını sağlayarak ya da **2)** polimer çözeltisinin döküldüğü kalıbın çözücüyü emen bir membran gibi davranmasıyla polimerin katılaşmasına yardım ederek [62]. Ardından ikinci aşamada ise partikül uzaklaştırma basamağı gerçekleşir. Polimer çözeltisine karıştırılmış poröjeni yani por oluşturacak partikülü uzaklaştıracak bir başka çözeltiye (örneğin tuz poröjeni için su) daldırılarak poröjen uzaklaştırılır. Poröjenin ayrıldığı bölgelerde por oluşur. Poröjenin boyutu ve miktarı ayarlanabildiğinden polimer iskelenin porözitesi, por şekli ve por boyutları ayarlanabilir (Şekil 2.2) [3, 63].



Şekil 2.2 Çözücü dökme/partikül uzaklaştırma yöntemi [3]

2.2.2 Isıl Olarak Tetiklenen Faz Ayrımı Yöntemi

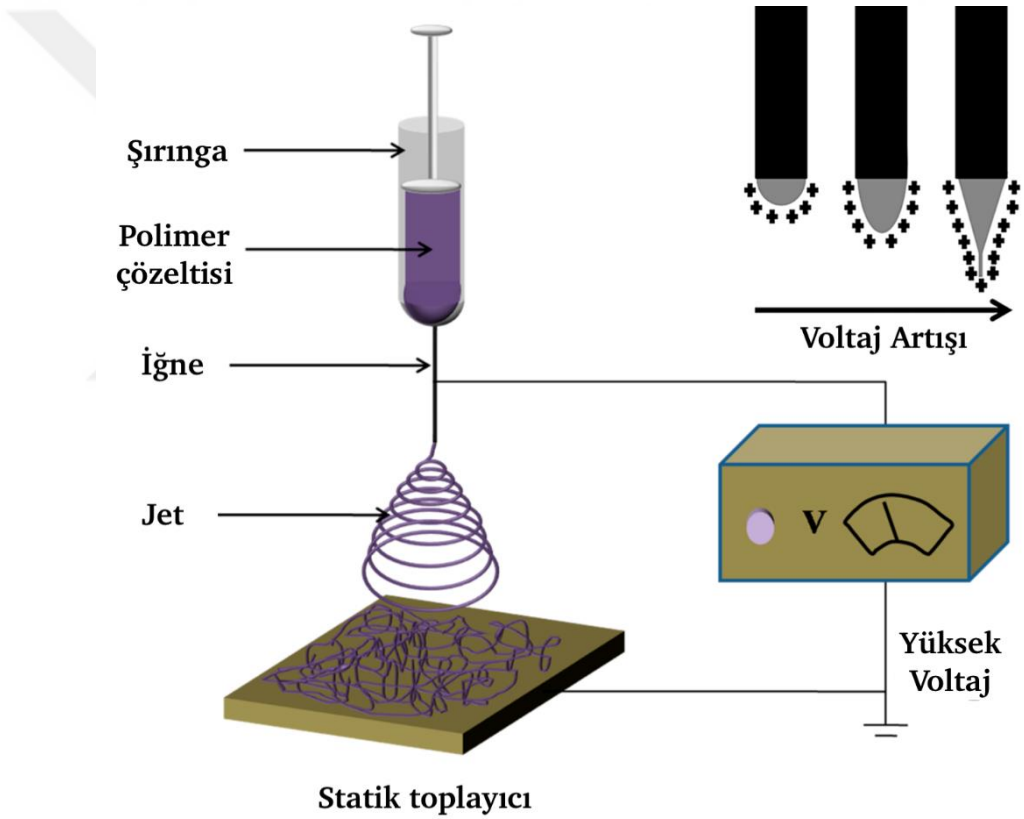
Isıl olarak tetiklenen faz ayrımı yönteminde (*thermally induced phase seperation*, TIPS) polimer çözeltisindeki, düşük ve yüksek konsantrasyonlardaki polimerler gibi, iki ayrı fazın ısıl olarak tetiklenmesi gerçekleşir. Bu ayrımı gerçekleştiren mekanizmalar katı-sıvı ve sıvı-sıvı faz ayrımlarıdır. Her iki mekanizmanın kullanıldığı tekniklerde de düşük erime noktalı polimerler yüksek sıcaklıkta çözülür. Sıvı-sıvı faz ayrımında polimer çözeltisi donma noktasının altına soğutulur ve böylelikle faz ayrımı gerçekleşir. Katı-sıvı faz ayrımındaysa bu durum, çözücünün katılaşmasıyla tetiklenir. Katı çözücü, polimeri çözmeyen çözücülere daldırılarak uzaklaştırılır. Vakum altında kurutma sonucunda da iskele çözücüden arınmış olarak elde edilir (Şekil 2.3) [3].



Şekil 2.3 Isıl olarak tetiklenen faz ayrımı yöntemi [3]

2.2.3 Elektroeğirme

Elektroeğirme yönteminde, polimer çözeltisi bir şırıngada bulunur ve şırınga pompası yardımıyla toplayıcıya gönderilmeye çalışılır. Polimer çözeltisine, toplayıcıya ya da her ikisine birden yüksek voltaj uygulanır. Polimer damlacığı şırınga ucundan çıkarken, uygulanan elektrik akım sayesinde yüklenir, elektrostatik itme kuvvetleri yüzey gerilimine karşı koyar ve damlacık gerilir. Kritik bir voltaja ulaşıldığında yük birikmesinin sonucunda polimerik sıvının yüzey gerilimi aşılır. Böylelikle damlacıklar, kesintisiz bir jet haline gelir, Taylor konisi şeklinde elektrostatik kuvvet tarafından toplayıcıya doğru çekilip burada birikir (Şekil 2.4) [64].

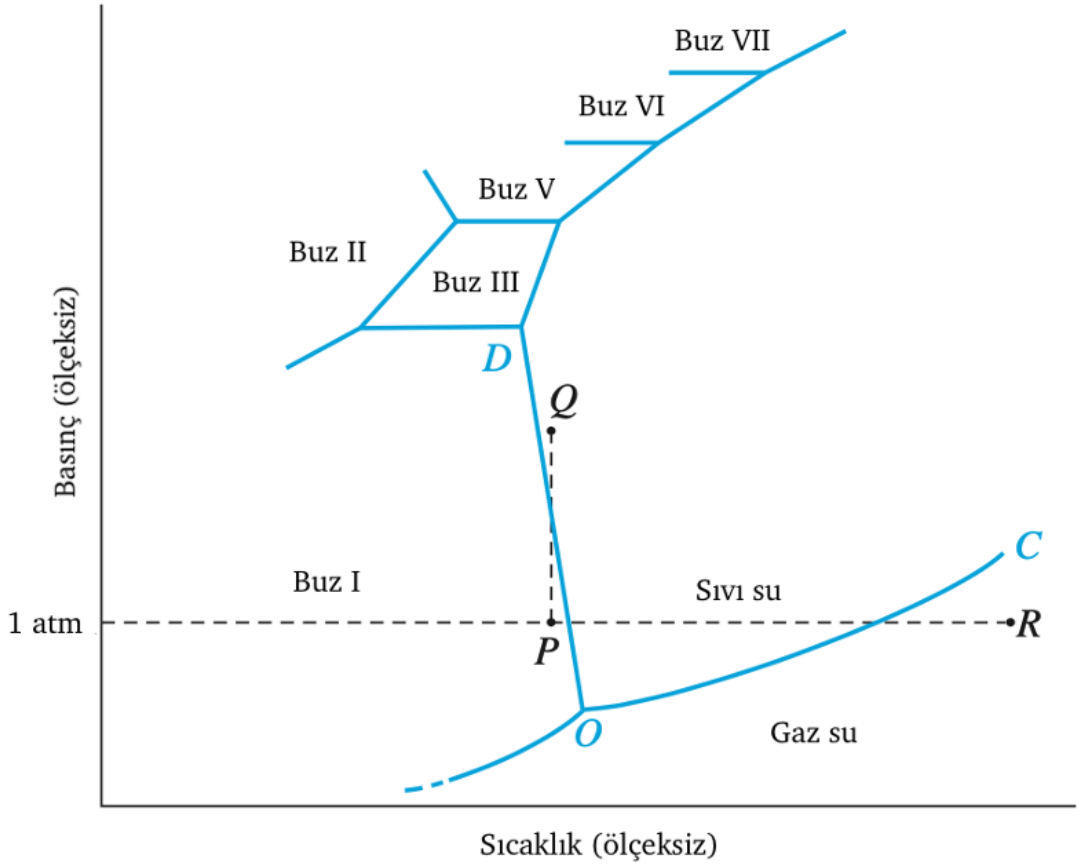


Şekil 2.4 Elektroeğirme yöntemi ve eğirmede oluşan Taylor konisi [3]

Elektroeğrilmiş nanofiber yapıdaki iskeleler, yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları, yüksek mekanik özellikleri, poröziteleri ve por büyüklüğü dağılımlarıyla ECM'yi taklit etmede başarılıdırlar. Fiber yönlenmesi ve çapı da değiştirilebildiğinden, farklı uygulamalara yönelik düzenlemeler yapılabilmektedir [65-67]. Ancak çözeltilerin viskoziteleri, yüzey gerilimleri ve

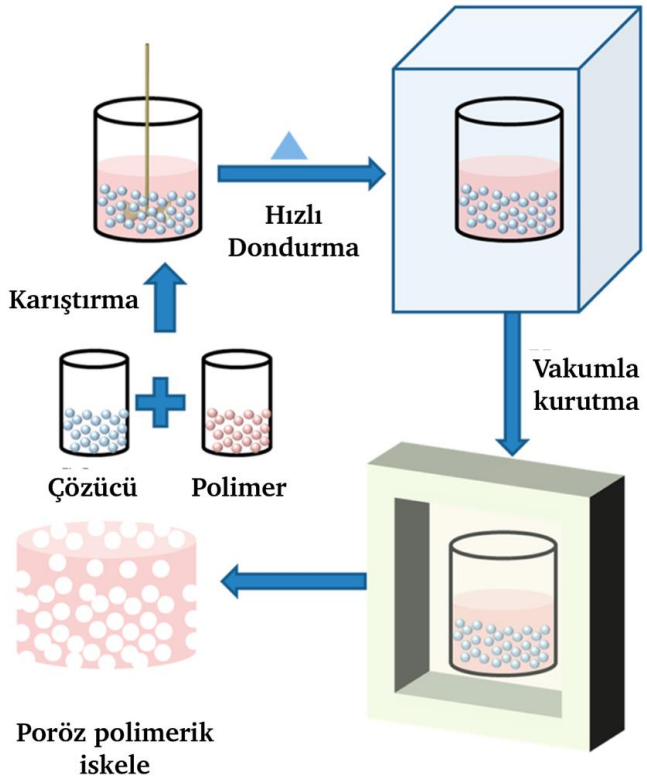
iletkenlikleri her koşulda elektroeğirmeye uygun olmayabileceğinden, tek başlarına bu yönteme tabi tutulmaları söz konusu olmayabilir. Bunun yerine başka polimerlerle karıştırılarak elektroeğirmeye uygun hale getirilmeleri söz konusu olabilir.

2.2.4 Dondurarak Kurutma Yöntemi



Şekil 2.5 Suyun faz diyagramı [68]

Şekil 2.5, suyun faz diyagramını göstermektedir. Bilindiği gibi su, 1 atmosfer basınçta 0 ve 100 °C'de sırasıyla katı-sıvı ve sıvı-gaz geçişlerini gösterir. Şekil 2.5'teki grafikten anlaşılabilecek bir başka şeyse, uygun basınç ve sıcaklık altında maddelerin katıdan gaza doğrudan geçiş yapabileceği yani süblimleşebileceğidir. Dondurarak kurutma yani liyofilizasyon (*freze-drying*) yönteminde polimer çözeltisi dondurulur ve vakum uygulanarak ortam basıncı düşürülür. Böylelikle çözeltide yer alan kristallerin süblimleşmesi sağlanarak, bu kristallerden açılan bölgelerin por halinde iskeleye kazandırılması sağlanır (Şekil 2.6) [2, 3].



Şekil 2.6 Dondurarak kurutma yöntemi [68]

Yukarıda bahsi geçen geleneksel yöntemlerle üretilen doku iskelesi türleri jel, sünger, film ve fiber formlarıdır [65]. Geleneksel üretimde elde edilen formlara ek olarak yenilikçi bazı yaklaşımlar da doku mühendisliği çalışmalarında yer almaktadır.

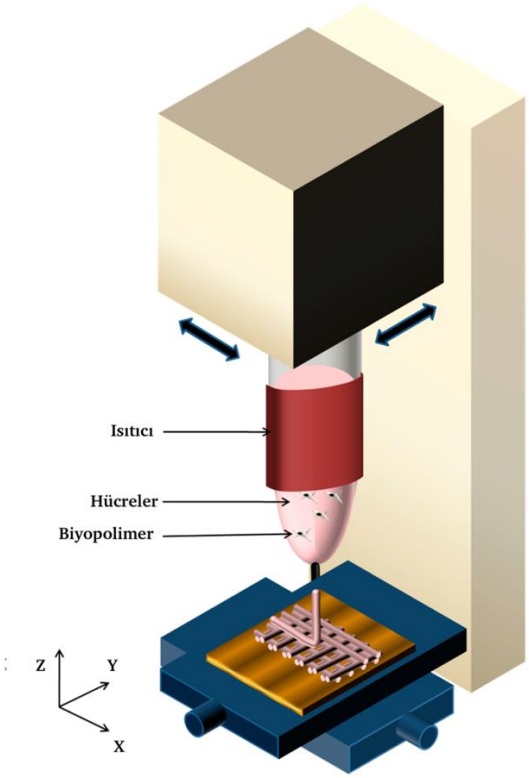
2.2.5 Hücresizleştirilmiş İskeleler

Bu yöntemde bir donörden alınan doku ya da organ, çeşitli deterjan uygulamalarıyla tüm hücrelerinden ve bağışıklığı tetikleyen antijenik yapılardan arındırılır. Elde edilen bu iskele, ECM'nin tüm doğal bileşenlerini, organizasyonunu ve doğal olarak karakterini taşırken hücrelere biyolojik ve mekanik sinyal görevini de yürütür. Bu yolla elde edilen hücresiz organlara kök hücreler ekilerek yeniden hücre kazandırılır [67]. Hücre farklılaşmasını yönlendirmek ve hızlandırmak amacıyla bu iskeleye biyosinyal moleküllerinin kazandırılması da uygulanan yaklaşımlar arasındadır. Ancak bu yöntemde hücrelerin homojen olarak dağılım göstermemesi, tam bir ECM'nin oluşumunda yaşanan gecikmeler, tam bir hücresizleştirilme gerçekleşemediyse ortamda var

olan immunojen (bağışıklık yanıtını tetikleyici) grupların varlığı riskleri söz konusudur. Özellikle bağışıklık yanıtının çok ya da istisnai şekilde tetiklenmesi, bağışıklık baskılayıcı ilaçların alınmasıyla son bulacaktır ki bu da riskli ve istenmeyen bir durumdur [65, 69].

2.2.6 Üç Boyutlu Basılan İskeleler

3B yazıcılar kullanılarak elde edilen bu iskelelerde, geleneksel üretim yöntemlerine kıyasla iskelenin boyutları üzerinde nano ölçekte bir kesinlik ve hakimiyet söz konusudur. Bilgisayar destekli tasarım (*computer-aided design,* CAD) programlarıyla bilgisayar ortamında modellenen bir yapı, x, y ve z eksenlerinde hareket eden bir mekanizma sayesinde tabaka tabaka basılır (Şekil 2.7). Yazıcıya beslenen biyomürekkeplerin çeşitliliği arttıkça dokular, organlar gibi kompleks yapıların üretimi de söz konusu olabilir. Biyomürekkepler yalnız polimerleri içerebileceği gibi, hücre yüklü polimer mürekkepler kullanılarak hücrelerin 3B yazımı da gerçekleştirilebilir. Birçok hidrojel yapı da bu yolla elde edilebilmektedir [70].



Şekil 2.7 Üç boyutlu basım yöntemi [71]

Yapı üzerinde hassas bir kontrol sağlanır ve maliyet düşüktür ancak çözünürlük arttıkça bu üretimin maliyeti de artar. Gözeneklilik, geçirgenlik ve mekanik özellikler bu yöntemle rahatlıkla ayarlanabilir. Özellikle hastalara kişiselleştirilmiş bir tedavi deneyimi sunma imkânı sağlamaları, düşük maliyetleri ve kısa sürede ürün çıktısının elde ediliyor oluşu bu yöntemi avantajlı kılmaktadır [70, 72, 73].

2.2.7 Hücre Tabakaları

Hücre tabakası (*cell sheet*) mühendisliğinde hücrelerin kendi ECM'lerini üretmeleri ve enzim kullanılmaksızın kültür kabından ayrılmaları esastır. Yöntemde hücrelerin kültüre edildiği kültür kabı, poli(N-izopropil akrilamid) gibi ısıya duyarlı bir polimerle kaplıdır. Normal bir kültürde %100 konfluensi (yoğunluk) istenmezken bu yöntemde hücrelerin ECM salgılayabilmeleri için sıkı bir bağlantı içinde olmaları istenir. Hücreler, kültür kabının sıcaklığı değiştirildiğinde polimerlerin 3B konformasyonunun değiştirilmesiyle hidrofilisitesinin de değişmesi sayesinde yüzeyden ayrılır [69].

Bu yaklaşımla elde edilen tabakalar hızlı neovaskülarizasyon sağlamaları, kolay toplanmaları, dikişle sabitlenmeye ihtiyaç duymamaları ve hücrelerin tabakada kütle transferi sorunu olmaksızın dağılımı gibi diğer avantajları bulunmaktadır [74]. Bu yaklaşımda daha kalın bir katman oluşturmak üzere birden çok hücre tabakası kullanılabilir. Yüksek hücre yoğunluğu ve yakın ilişki, epitel ve endotelyumun bir özelliğidir. Bu nedenle kornea epiteli ve endoteli, damar endoteli ve trakeal epitel bu yaklaşımın iyi adaylarıdır. Bununla birlikte, bu yaklaşımın bir dezavantajı, her bir tabaka yaklaşık 30 μm kalınlığında olduğu için kalın dokular oluşturmanın zor olmasıdır. 300 μm kalınlığında bir miyokardiyal yama oluşturmak için bu işlemi 10 ameliyatla tekrarlamak gereklidir ancak hastaları bu şekilde tekrarlayan operasyonlara sokmak muhtemel değildir [75]. Bu nedenle önceden oluşturulmuş yamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yine de bu yöntemin klinik uygulama potansiyeli sınırlıdır. Bir diğer sınırlama, salgılanan ECM miktarı sınırlı olduğundan, ECM açısından zengin olan kemik, kıkırdak ve intervertebral disk gibi hiposelüler dokuları oluşturmak zordur [76].

2.2.8 Kendiliğinden Düzenlenen Hidrojel Matrikste Hücre Enkapsülasyonu

Bu yöntemde canlı hücreler hidrojellere enkapsüle edilir [77, 78]. Kapsülleme için kullanılan biyomalzemeler genellikle suda çözünebilen doğal ve sentetik polimerlerin kovalent veya iyonik çapraz bağlanmasıyla oluşturulan hidrojellerdir.

Bu yaklaşımda enkapsülasyon malzemelerinin çapraz bağlanması veya hücrelere, antikorlara ve hücresel antijenler gibi büyük moleküllere karşı geçirimsiz, ancak oksijen ve glikoz gibi besinlere, karbondioksit ve laktik asit gibi metabolitlere karşı geçirgen olacak şekilde tasarlanmalıdır. Hücreler ve enkapsüle edildiği malzemeler sıkı bir temasta olduklarından malzemenin hücrelere biyouyumlu olması çok önemlidir. [79]. Hidrojele hücre enkapsülasyonunun önemli bir özelliği, kullanılan biyomalzemelerin genellikle pH, sıcaklık, iyonik güç ve ışık kontrollü başlatma üzerine kendiliğinden bir araya gelerek sıvı monomerlerden katı polimer yapıyı oluşturabilmesidir. Bu sayede monomer halindeyken hücrelerle karıştırılan polimer çözeltisi polimerleşme esnasında hücreleri de araya alarak sabit bir yapı oluşturur ve hücre ekimi için ek bir adım uygulanmasına gerek kalmaz. Bu yaklaşımın avantajları arasında basit tek adımlı prosedür oluşu, hidrojelde homojen hücre dağılımı, mükemmel hücre canlılığı, bu yolla enjekte edilebilen hücreli iskelelerin üretilmesi sayılabilir. Enjekte edilebilirliği nedeniyle bu yaklaşım enjekte edilebilir iskele yaklaşımı veya *in situ* doku mühendisliği olarak adlandırılır [69].

2.3 Polimerik Jeller ve Sınıflandırılması

Jeller genel olarak en az iki bileşenden oluşan yarı katı sistemler olarak tanımlanır. Bu bileşenlerden biri diğer bileşenle (genellikle sıvıdır) kurduğu kovalent olan ve olmayan tüm etkileşimler sayesinde 3B bir ağ yapısı kurar [80]. Bu jel yapıda en küçük miktardaki sıvı bile jelin elastik karakterlerini sağlamaya yeterdir [81]. Polimerik jellerse bir veya daha fazla polimerle oluşturulan yumuşak ve/veya katımsı sistemler olarak tanımlanır [82]. Polimerik jeller, çoğunlukla polimer ve çözücüden oluşan çoğunlukla ikili sistemlerdir ve makromoleküllerden ve/veya bunların agregatlarından oluşan bu 3B yapı, büyük hacimde çözücülerin tutulmasını sağlar [83].

Polimerik jellerin aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması beklenir:

- ✓ Sınırlı molekül ağırlığı
- ✓ Çözünmezlik ve erimezlik
- ✓ Geri dönüşümlü olarak şişme ya da büzüşme [84]

Bileşimdeki polimerler, polimerik matriks türleri, çapraz bağlanmanın doğası, boyut vb. gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak, polimerik jeller çok çeşitli ve ayırt edici özelliklere sahip olabilir. Polimerik jellerin önemli özellikleri şişme, psödoplastik reolojik davranış, büzülme (sinerez), yaşlanma, elektrostatik potansiyel dağılımı, elektriksel salınım, elektriksel kasılma, mekanoelektrik etki, zıt yüklü yüzey aktif maddelerle etkileşim olarak sayılabilir. Bu jeller çoğunlukla pH, basınç, sıcaklık, elektrik alanı gibi uyaranlara duyarlı davranış sergiler [85].

Çapraz bağlama karakterine göre polimerik jeller 3 sınıfa ayrılır: fiziksel jeller, birbirine dolaşık ağ jeller, kovalent olarak çapraz bağlı jeller [86].

2.3.1 Fiziksel Jeller

Düşük dielektrik sabitli çözücülerdeki iyonomerler, çözücülerdeki izotaktik polimerler ve blok kopolimerler gibi farklı sentetik polimerler kullanılarak çeşitli fiziksel jeller hazırlanabilir [84]. Polimerik jel sistemlerinde, polimerik yapının eş yapısal özellikte olmayan zincirlerinin toplanması genel bir özelliktir. Bu jellerin çapraz bağlanması geçicidir ve sıvılaştırılabildikleri ve/veya çözülebildikleri için bazı fiziksel jeller ısıyla tersine çevrilebilir. Bu tersinirlik malzeme çeşidi ve karakterlerine bağlıdır. Fiziksel jellerde, bağlantı bölgeleri arasındaki düzensiz zincirin uzunluğunun, kimyasal jellerdeki rastgele sarmal bölümlerine kıyasla genellikle daha kısa ve daha az esnektir [87]. Farklı türde fiziksel jellerin genel ve en önemli özellikleri, ağ bağlantılarının sıcaklıkların değişmesiyle geri dönüşümlü olarak görünüp kaybolmalarıdır. Genel olarak, bu fiziksel jeller, çözeltilerin soğuması ve ısı uygulanmasıyla erimesiyle üretilir.

2.3.2 Dolaşık Ağ Jeller

Dolaşık (*entangled*) ağ jeller, polimer çözeltilerinin konsantrasyonu ve molekül ağırlıkları dolaşıklık için kritik molekül kütlesinden ve konsantrasyondan daha yüksek olduğunda ortaya çıkan bir yapıdır [87]. Bu tür bir dolaşıklık ağı genellikle

daha yüksek moleküler ağırlıklara sahip polimerler içeren polimerik jellerde, özellikle elastomerlerde görülür.

2.3.3 Kovalent Olarak Çapraz Bağlı Jeller

Bu grup jeller aynı zamanda kimyasal olarak çapraz bağlı jeller olarak da adlandırılır. Burada makromoleküller ve çapraz bağlayıcılar arasında kovalent bağ kurularak bir ağ yapısı oluşturulduğundan, ancak bağların yıkılması ya da ısıl bozunma yoluyla bu yapılar hasarlanabilir. Bu jeller şişerken çözünmezler [80, 86, 87]. Polimerik hidrojeller de kovalent çapraz bağlı jellerin önemli bir elemanı olarak suda şişebilen hidrofilik polimerik yapılardır ve ileriki bölümlerde polimerik hidrojellere değinilecektir.

Çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılarak oluşturulan bu jel yapılarda değişik çapraz bağlayıcıların kullanımı yapıya farklı özellikler katar.

2.4 Hidrojeller

Hidrojeller, biyolojik sistemlerde çokça çalışılan iskele tipleridir. Bu jeller, ağırlıkla hidrofilik polimerlerden oluşur ve hidrofilik 3B ağ yapısı biyolojik sıvılar içinde çözünmeden yüksek oranlarda şişme kapasitesine sahiptir [4]. Bu özelliklerini polimer iskeletinde bulunan hidroksil, karboksil, sülfonik asit, amid ve imid grupları gibi hidrofilik gruplardan alırlar [80]. Jelin içindeki sıvılar, çözünebilen moleküllerin jelin içine nüfuz olmasını sağlarken sabit polimerler de sıvıyı tutan hidrofilik ağ yapıyı oluşturur [5].

Hidrojellerin temel özellikleri, hidrofilisiteleri, yüksek şişme kapasitesi, sıvıyı emme kapasitesi, yumuşaklık, elastiklik olarak sayılabilir [5].

Kimyasal ve fiziksel hidrojeller için; lineer kopolimerler, dolaşık çapraz bağlı ağ yapısında lineer polimerler ve onların kopolimerleri, poliiyon/poliiyon, poliiyon/multivalent iyonlar veya hidrojen bağları kompleksleri, iç içe geçmiş ağ yapısı (*interpenetrating network,* IPN), yarı iç içe geçmiş ağ yapısı (*semi*-IPN) gibi çok çeşitli makromoleküler yapısal özellikler mümkündür [88].

Fiziksel çapraz bağlı hidrojellerin ve kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojellerin sentezleri için çeşitli sentez metodolojileri kullanılır. Fiziksel çapraz bağlı hidrojellerin sentezinde hidrojen bağı etkileşimi, hidrofobik etkileşim, iyonotropik

etkileşim, stereokompleksleme, inklüzyon kompleksi gibi etkileşimlerden yararlanılır. Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller radyasyon, küçük molekül çapraz bağlanması, polimer/polimer çapraz bağlanması gibi yöntemlerle üretilir. [89]. Son zamanlarda, farklı model ve boyutlardaki *click* hidrojellerini sentezlemek için *click* kimyası kullanılmıştır [90]. Daha yüksek verim, daha yüksek derecede reaktivite, mükemmel özgüllük, daha yumuşak reaksiyon koşulları, biyoortogonallik, gibi nedenlerle *click* kimyası yaklaşımları, *click* hidrojelleri sentezlemek için en potansiyel strateji olarak ortaya çıkmıştır. Bu hidrojeller doku mühendisliği, yara pansumanları, ilaç verme, hücre ve enzim enkapsülasyonu gibi farklı biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilmektedir [91].

Hidrojeller polimerik bileşimlerine, konfigürasyonuna, çapraz bağlama tipine ve ağın elektrik yüküne göre farklı sınıflamalara tabi tutulabilir.

2.4.1.1 Polimerik Bileşimlerine Göre Hidrojeller

Polimerik bileşime göre hidrojeller; **1)** homopolimerik hidrojeller, **2)** kopolimerik hidrojeller ve **3)** IPN hidrojeller olmak üzere 3 gruba ayrılabilir [92].

Homopolimerik hidrojeller, tek bir monomerin polimerizasyonuyla elde edilen bir homopolimerden oluşan hidrojellerdir. monomerin karakterine ve polimerizasyon yöntemlerine bağlı olarak çapraz bağlı iskelet yapısı içerebilirler [92].

Kopolimerik hidrojeller rastgele, blok ve/veya sıralı değişken (*alternating*) konfigürasyonda birleştirilmiş en az bir monomeri hidrofilik olan kopolimerlerden elde edilen hidrojellerdir.

IPN hidrojelleri multipolimerik yapılardır. Bunlar, bir ağ formunda bulunan iki bağımsız çapraz bağlı polimerden yapılmış özel bir polimerik hidrojel kategorisi olarak kabul edilmektedir [93]. Önceden polimerize edilmiş bir hidrojel yapısı içinde ikinci bir polimerik yapı polimerize edildiğinde IPN yapısı elde edilir [94]. Bu işlem genellikle, önceden polimerize edilmiş bir hidrojel matrisinin, polimerizasyon için bir başlatıcı ile monomerleri içeren bir çözeltiye daldırılması yoluyla gerçekleştirilir.

2.4.1.2 Konfigürasyonuna Göre Hidrojeller

Fiziksel yapılara ve kimyasal bileşimlere bağlı olarak, hidrojeller; **1)** amorf (kristal olmayan), **2)** kristal ve **3)** yarı kristal hidrojeller olarak sınıflandırılabilir.

2.4.1.3 Çapraz Bağlanma Tipine Göre Hidrojeller

Çapraz bağlanma tiplerine, yani çapraz bağlanma bağlantılarının fiziksel veya kimyasal karakterlerine dayalı olarak, hidrojeller; **1)** fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller ve **2)** kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller olarak gruplanabilir [95]. Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller, polimerik zincir dolaşmaları veya hidrofobik etkileşimler, iyonotropik etkileşimler, hidrojen bağı gibi etkileşimlerle çapraz bağ kurarlar ve bu etkileşimlerin kalıcı olmaması nedeniyle geçici çapraz bağ oluştururlar. Buna karşın kimyasal çapraz bağlı hidrojeller, kalıcı olan kovalent bağlar yoluyla oluşturulur [80].

2.4.1.4 Ağ Yapısının Elektrik Yüküne Göre Hidrojeller

Hidrojel yapısındaki çapraz bağlı polimerik zincirlerde bulunan elektrik yüklerinin yokluğuna ve varlığına bağlı olarak, hidrojeller dört ana sınıfa ayrılabilir: **1)** iyonik (katyonik ve anyonik), **2)** noniyonik (nötr), **3)** amfolitik (hem asidik hem de bazik gruplara sahip) ve **4)** Zwiteriyonik (her tekrar eden birimde hem katyonik hem de anyonik grupları içerenler) [92].

2.4.1.5 Partikül Büyüklüğüne Göre Hidrojeller

Ortalama partikül çaplarına göre polimerik hidrojeller makrojel, mikrojel ve nanojel olarak sınıflandırılır [90]. Her bir hidrojel partikülünün ortalama çapı 1 μm'den büyük olduğunda makrojel, 100 nm-1 μm aralığında olduğunda mikrojel, ortalama çap 100 nm'den küçük olduğunda da nanojel adını alırlar.

Jeli oluşturan fazların özellikleri göz önüne alındığında ise organojeller, bijeller, emüljeller, aerojeller, zerojeller ve kriyojellerin karşımıza çıktığı görülmektedir.

Organojeller, immobilize harici apolar faza sahip yarı katı sistemlerdir. Bu apolar faz, jelatörler olarak bilinen çeşitli kendi kendine birleşen yapısal bileşikler arasındaki fiziksel etkileşimlerle oluşturulmuş 3B yapının boşlukları içinde immobilize olur [96]. Bu nedenle organojeller, jelatörlerin kendiliğinden düzenlenen farklı yapıları içinde hapsolmuş, sulu molekülleri kısıtlayabilen veya

kısıtlayamayan jelatörler ve apolar çözücüleri içeren çift sürekli (*bicontinuous*) sistemler olarak kabul edilir [97].

Bijeller, farklı jelatörler sayesinde birbirinden bağımsız olarak stabilize edilen, birbirine karışmayan iki sıvı fazın oluşturduğu sistemlerdir [98]. Mikromimari yapıları nedeniyle aynı zamanda bifazik jeller olarak da adlandırılırlar.

Emüljeller, emülsiyon temelli jellerdir. Sürekli faz ile disperse fazın çeşidine göre yağ/su veya su/yağ şeklinde iki çeşit olabilen bu jeller, jelatörle jelleşmeye tabi tutulur [99].

Aerojeller, jel sistemdeki sıvı bileşenin gazla yer değiştirdiği sol-jel malzemelerdir. Bu materyallerin yaklaşık %90 ilâ %99'u havadır [100].

Zerojeller oda sıcaklığında sınırsız bir büzülme ile yavaş yavaş kurutularak hazırlanan katı formdaki bir jel türüdür [101]. Genellikle çok daha küçük gözenek boyutlarıyla birlikte daha yüksek porözite ve daha büyük yüzey alanı özelliklerine sahiptir.

Kriyojeller genellikle apozit monomerlerin veya polimerik öncüllerin sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleştirilmesiyle geliştirilen süper makrogözenekli jel ağlarıdır [102]. Kriyojel sisteminin avantajlı yönü, jel sisteminin çeşitli biyomedikal kullanımlar için ileriye dönük yapı iskelesi malzemeleri olarak tahmin edilmesinden dolayı, yeterli osmotik kararlılık ve mekanik mukavemet ile oldukça gözenekli özelliklerin istisnai bir kombinasyonudur.

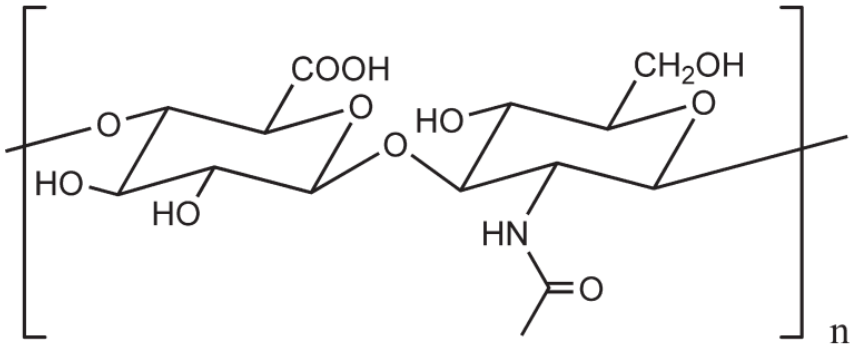
2.5 Doku İskelelerinde Kullanılan Polimerler

2.5.1 Hyaluronik Asit

HA, biyouyumlu ve biyobozunur olan, yüksek su tutma özelliğine sahip olan ve göz, beyin, kıkırdak, deri ve aort gibi dokuların ECM'lerinde bulunan bir biyopolimerdir (Şekil 2.8). Bu sülfatlanmamış GAG, sıralı tekrarlayan (*alternating*) glukuronik asit (GlcA) ve N-asetil-glukozamin (GlcNAc) birimlerinden oluşur. 30.000'den fazla olan bir polimerizasyon derecesine sahiptir [103]. ECM'de en bol bulunan bileşenlerden biri olan HA'nın 3 temel görevi bulunmaktadır: **1)** ECM'deki diğer proteoglikanlarla bağlanarak ECM'yi düzenleyen yapısal bir bileşen görevini üstlenir, **2)** viskozitesi sayesinde, sinoviyal

sıvıda olduğu gibi hareketi kolaylaştırmak ya da gözdeki camsı cisimde (*vitreous humour*) olduğu gibi diğer ECM bileşenleriyle jel yapısını oluşturmak üzere, dokulardaki boşlukları doldurup lubrikan görevi üstlenir, **3)** CD44 gibi membran reseptörleriyle etkileşerek sinyal molekülü gibi davranır [104, 105]. Özellikle reseptörlere substrat gibi davrandığında HA, hücre sağ kalımı, çoğalması ve göçü gibi hücresel davranışları etkiler. Bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşimi de yine CD44 üzerinden meydana gelir ve bu yolla enflamasyonu da etkiler [6, 7].

HA çoğunlukla bağ, epitel ve nöral dokularda bulunan, biyobozunur bir polimerdir [106]. HA'nın doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak hidrojel formunda kullanıldığı görülmektedir. Bunun nedeni, su tutma kapasitesi ile hücre enkapsülasyonu potansiyelidir. Ancak elektroeğirme [107], ıslak eğirme [108], partikül uzaklaştırma [109] ve 3B basım yöntemleriyle [110] de işlenebilmektedir.

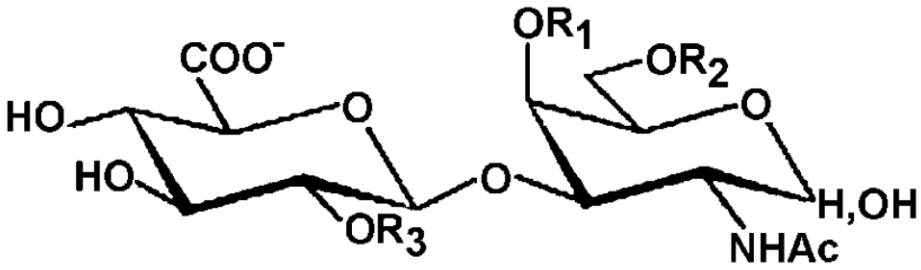


Şekil 2.8 Hyaluronik asidin molekül yapısı [111]

2.5.2 Kondroitin Sülfat

CS bağ dokularda doğal olarak bulunan sülfatlı bir GAG grubudur (Şekil 2.9). Hücre yüzeylerinde, ECM ve hücreyi çevreleyen periselüler matrikste bulunurlar. Genellikle proteoglikan olarak, merkez bir proteine kovalent olarak bağlı formdadırlar ve GlcA ile galaktozamin (GalNAc) birimlerinin sıralı tekrarlanmasıyla oluşurlar [112]. Şekil 2.9'daki adlandırma göz önüne alınarak yan grupların taşıyacağı gruplara göre; $R_1 = R_2 = R_3 = H$ iken sülfatlanmamış kondroitin; $R_1 = SO_3^-$ ve $R_2 = R_3 = H$ iken kondroitin 4 sülfat (CSA); $R_2 = SO_3^-$ ve $R_1 = R_3 = H$ iken kondroitin 6 sülfat (CSC); $R_2 = R_3 = SO_3^-$ ve $R_1 = H$ iken kondroitin 2,6 disülfat (CSD); $R_1 = R_2 = SO_3^-$ ve $R_3 = H$ iken kondroitin 4,6

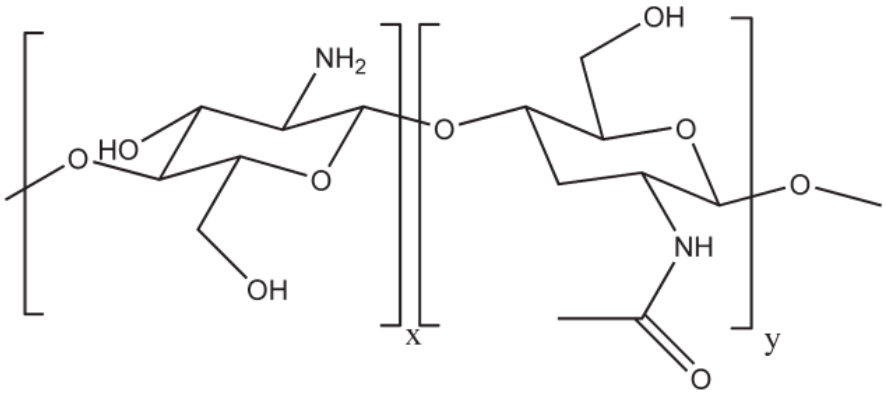
disülfat (CSE); $R_1 = R_3 = SO_3^-$ ve $R_2 = H$ iken kondroitin 2,4 disülfat (CSB); $R_1 = R_2 = R_3 = SO_3^-$ iken trisülfatlanmış kondroitin olarak adlandırılır [113].



Şekil 2.9 Kondroitin sülfatın molekül yapısı [113]

2.5.3 Kitosan

Kitosan (Ch), kitinin kimyasal hidroliz yoluyla kısmi deasetilasyonundan türetilen, doğrusal, biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakkarittir (Şekil 2.10). GlcNAc ve glukozamin (GlcN) birimlerinden oluşur. GlcNAc birimlerinin sayısı, diğer bir deyişle deasetilasyon derecesi %60'tan fazla olduğunda, biyopolimer Ch olarak adlandırılır [16, 114]. Ch, zincirlerinin amino grupları aracılığıyla protonlandığı asetik asit veya hidroklorik asit gibi asitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür. Ch sulu çözeltisi, çeşitli doku mühendisliği ve ilaç dağıtım uygulamaları için filmler, tüpler, süngerler ve diğer gözenekli yapılar gibi farklı formlarda kolayca üretilebilir [15]. Ayrıca, protonlanmış Ch'ın katyonik yapısının birçok durumda önemli biyolojik öneme sahip olduğu bulunmuştur. Katyonik polimer zincirlerinin belirli büyüme faktörleri ve negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturabildiği ve böylece onları ısı inaktivasyonundan, proteolizden koruduğu gösterilmiştir [14].



Şekil 2.10 Kitosanın molekül yapısı [111]

3B Ch doku iskeleleri, insan vücudunda doğal olarak bulunan GAG'lara benzer yapısal ve fonksiyonel özellikler göstermesiyle GAG'ların iyi bir taklit malzemesi olarak kabul görmüştür [14]. Bu nedenle, tek başına veya diğer doğal polimerlerle kombinasyon halinde Ch'ın 3 boyutlu yapı iskeleleri, çok sayıda doku mühendisliği uygulaması için jel, sünger veya fiber formlarında kullanılır [16, 17]. Bir biyomateryal olarak Ch fizyolojik pH'ta sınırlı çözünürlüğe sahiptir ve bu durun *in vivo*da uzun süre kullanımı için avantajlıdır [115]. Bu nedenle Ch'ın 3B iskele olarak doku mühendisliği uygulamaları için uygun bulunmaktadır. Ayrıca çok işlevli yapısı ve çapraz bağlanma yeteneği sayesinde Ch doku iskelelerinin özelliklerini değiştirmek için genellikle diğer biyomateryallerle harmanlanarak kullanılır. Bu durum aynı zamanda diğer malzemelerle kullanılarak onların da biyoaktivitesinden yararlanılabileceğinin altını çizmektedir [116].

2.6 Çapraz Bağlama Yöntemleri

Doğal biyopolimerler, özellikle mekanik dayanımlarının düşük olması ve önemli bir kısmının suda çözünebilmesi nedeniyle, daha dayanıklı hale getirilmek üzere çapraz bağlama reaksiyonlarına sokulmaktadır.

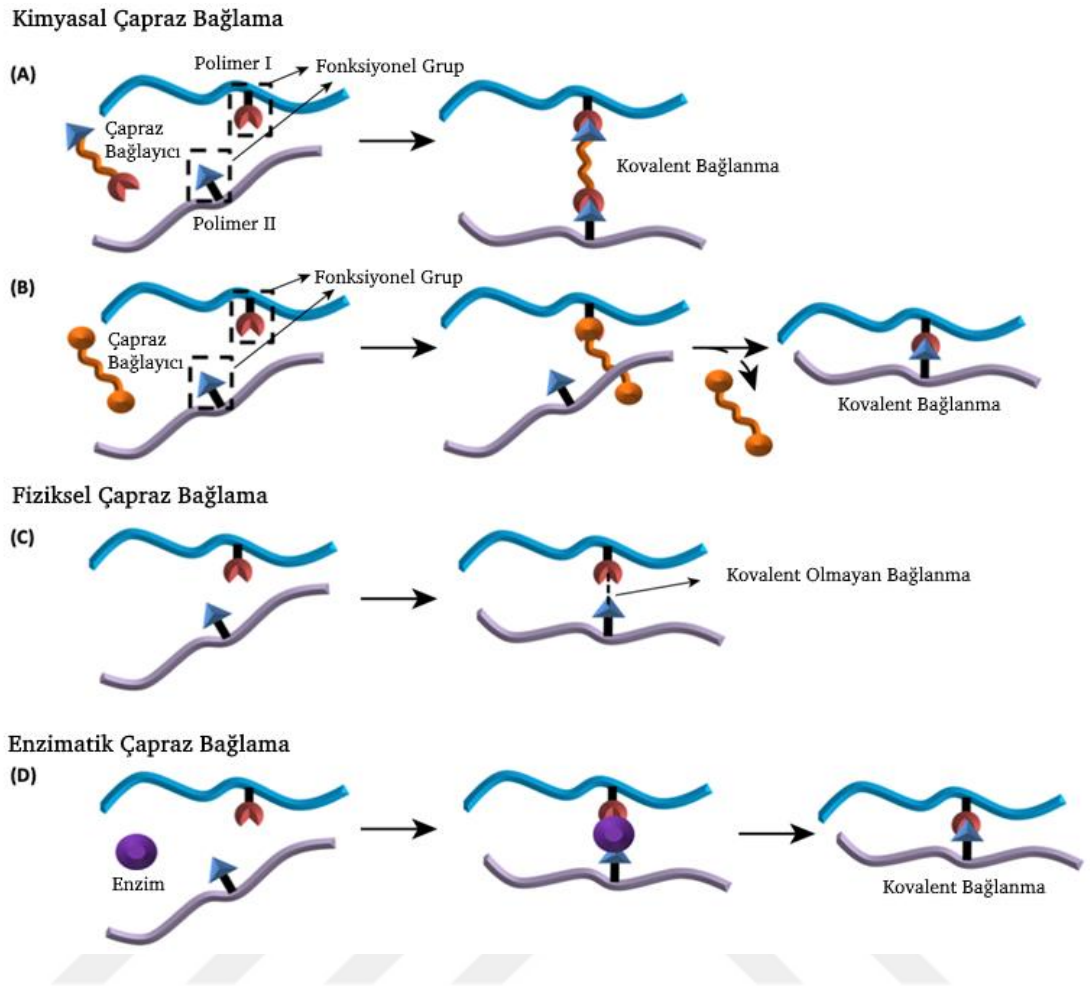
Çapraz bağ, bir polimer zincirinin fonksiyonel gruplarını diğerine iyonik bağ, hidrojen bağı gibi moleküller arası kullanılan aracı moleküllere de çapraz bağlayıcılar ya da çapraz bağlama ajanları adı verilir.

Polimerlerin doğasına bağlı olarak çeşitli doku iskeleleri üretmek için farklı çapraz bağlama yöntemleri kullanılabilir. Çapraz bağlama reaksiyonlarında polimer zincirlerinin aktif fonksiyonel grupları çapraz bağlayıcılarla kimyasal veya fiziksel olarak reaksiyona girer ve 3B bir ağ yapısı oluşturur [117].

Çapraz bağlama yöntemleri fiziksel, enzimatik ve kimyasal çapraz bağlama yöntemleri olmak üzere üç büyük gruba ayrılmıştır (Şekil 2.11) [18]. Bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Çapraz bağlama yöntemleriyle bunların avantaj ve dezavantajları [18]

Çapraz bağlama yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Fiziksel	Güvenlidir Birçok kimyasal ajandan daha az toksisiteye sahiptir Ucuzdur Çapraz bağlama reaksiyonundan sonra en az doku reaksiyonu ortaya çıkar	Kurulan bağlar kimyasal çapraz bağlamadan daha zayıftır Malzemelerin özellikleri değişebilir Çapraz bağlama için daha uzun zaman geçmesi gerekir Daha düşük oranda çapraz bağlama gerçekleşir
Enzimatik	Birçok kimyasal ajanın ve enzimlerin aksine ılımlı sulu reaksiyon koşullarında yüksek aktiviteye sahiptir Çapraz bağlama reaksiyonları sıcaklık, pH veya iyonik güç değiştirilerek düzenlenebilir	En pahalı çapraz bağlayıcılardır Substrata özgüldür
Kimyasal	Çok kuvvetli bağlar kurar	İstisnai yeşil çapraz bağlayıcılar dışında hücrelere toksisite gösterirler Bağlanmayan çapraz bağlayıcıların uzaklaştırılması için yıkama adımlarına ihtiyaç duyulur Fiziksel çapraz bağlayıcılara göre daha pahalıdır



Şekil 2.11 Çapraz bağlama reaksiyonları [18]

2.6.1 Kimyasal Çapraz Bağlama

Kimyasal çapraz bağlayıcılar, polimerik yapı iskelelerinin ve hidrojellerin mekanik özellikleri ile bozunma özelliklerini iyileştirmek amacıyla en yaygın şekilde kullanılan çapraz bağlama ajanlarıdır. Sentetik ve doğal reaktifler dahil olmak üzere birçok kimyasal çapraz bağlayıcılar, doku iskelelerinin morfolojik ve biyomekanik özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır.

Çapraz bağlayıcılar, reaksiyon verdikleri iki fonksiyonel grubun çeşidine göre homobifonksiyonel ya da heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar olarak adlandırılır [118]. Eğer aynı cins fonksiyonel gruplar çapraz bağlanıyorsa homobifonksiyonel, farklı cins fonksiyonel gruplar çapraz bağlanıyorsa heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı adını alır. Tablo 2.2, homobifonksiyonel ve heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların etkileştikleri fonksiyonel gruplara göre sınıflamasını içermektedir.

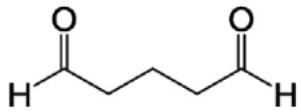
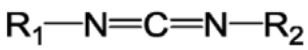
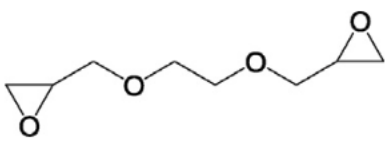
Çapraz bağlama reaksiyonu sonrası, çapraz bağlayıcının atomları ya da çeşitli grupları bağlanan yapıya katılabilir. Bu gruba arabulucu (*spacer*) adı verilir. Çapraz bağlayıcılar arabulucu içeren ve içermeyen (direkt çapraz bağlayıcı, *zero length crosslinker*) çapraz bağlayıcılar olmak üzere ikiye ayrılabilir. Burada arabulucu molekülün uzunluğu, rijitliği ve yapıya katacağı hidrofobisite gibi etmenler, neticede elde edilecek son ürünün özelliklerini etkileyeceğinden her uygulamaya göre özenle tasarlanmalıdır [118].

Tablo 2.2 Yöneldikleri fonksiyonel gruplara göre çapraz bağlayıcılar [118]

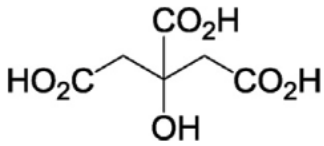
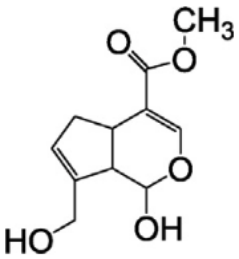
Çapraz bağlayıcı	**Yöneldiği fonksiyonel gruplar**
Homobifonksiyonel	Amino
	Sülfidril
	Karboksil
Heterobifonksiyonel	Amino ve sülfidril
	Amino ve karboksil
	Karbonil ve sülfidril
	Amino grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren
	Sülfidril grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren
	Karbonil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren
	Karboksil grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren
	Arjinin grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren

Tablo 2.3 çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcıların avantajlarını ve dezavantajlarını göstermektedir [18].

Tablo 2.3 Kimyasal çapraz bağlayıcıların avantajları ve dezavantajları [18]

Çapraz bağlayıcı	Avantajları	Dezavantajları
Glutaraldehit (GA) 	Ucuzdur Çapraz bağlama derecesi yüksektir İskelelerin immunojenisitesini azaltır Zenojenik matrikslerin immunojenisitesini değiştirir Polimerlerin çoğunu çapraz bağlayabilir	Yüksek toksisiteye sahiptir Kamu sağlığına zararlıdır Çapraz bağlamadan sonra özel çözeltilerle yıkanarak uzaklaştırılması gerekir Çapraz bağlı iskelenin rengi sarıya döner
Karbodiimid 	GA ve EDGE'den daha az toksiktir Distile suyla uzaklaştırılabilir	Pahalıdır GA'ya göre daha düşük çapraz bağlama derecesine sahiptir
Etilen glikol diglisidil eter (EDGE) 	Ucuzdur	GA ve karbodiimid çapraz bağlayıcılar arasında en düşük çapraz bağlama derecesine sahiptir

Tablo 2.3 Kimyasal çapraz bağlayıcıların avantajları ve dezavantajları [18] (devamı)

Sitrik asit 	Biyouyumludur Kolay ulaşılabilir ve düşük maliyetlidir İyi çapraz bağlama derecesine sahiptir Kendi kendine mineralize olma kapasitesine sahiptir	Genelde bir katalizöre ihtiyaç duyar Çapraz bağlama için polimer yapısını bozabilecek kadar yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyar
Genipin 	Biyouyumludur En düşük toksisiteye sahiptir Yüksek çapraz bağlama derecesine sahiptir Zenojenik matrikslerin immunojenisitesini GA'dan da fazla düşürür	Pahalıdır Çapraz bağlı iskelelerin rengi maviye döner

2.6.2 Küçük Moleküllü Çapraz Bağlayıcılar

2.6.2.1 Glutaraldehit

Gluteraldehit (GA), proteinlerin ve polimerlerin amin veya hidroksil fonksiyonel grupları ile sırasıyla bir Schiff bazı reaksiyonu yoluyla reaksiyona girer ve molekül içi veya moleküller arası etkileşimlerle çapraz bağ kurar. Bu nedenle proteinlerin çapraz bağlaması için sıklıkla başvurulan bir çapraz bağlayıcı olmuştur [119, 120]. Ancak yapısında bulunan aldehit grupları organizmada toksisiteye, enflamasyona neden olur. Bu durumun önüne geçmek için GA çapraz bağlama reaksiyonundan sonra aldehit gruplarını uzaklaştırmak üzere amin grubu içeren çözeltilerle

yıkama adımlarının yapılması önerilmiştir [121]. Bu yöntemin geliştirilmesine rağmen ciddi bir toksisiteye neden olabilmesi, ticari olarak yaygınlaşmasına engel olmaktadır.

2.6.2.2 Karbodiimidler

C=N=C fonksiyonel grubuna karbodiimid adı verilir. Karbodiimid kimyası yoluyla çapraz bağlamada en sık kullanılan çapraz bağlayıcı, 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)-karbodiimid (EDC) adı verilen bir moleküldür. EDC'nin çapraz bağlama reaksiyonu verdiği gruplar karboksil, hidroksil ve sülfidril fonksiyonel gruplarıdır. Asidik ve nötral koşullarda çapraz bağlama reaksiyonu verebilmektedir. Karboksil gruplarını aktive ederek çapraz bağlama verimini arttırmak üzere EDC ile N-hidroksisüksinimid (NHS), kullanılır. Karbodiimid çapraz bağlayıcılarının avantajı, çapraz bağlama reaksiyonunun ara basamaklarında ortaya çıkan ara ürünlerin suda çözünür olması ve reaksiyon sonunda kolaylıkla uzaklaştırılabiliyor oluşudur [122, 123].

2.6.2.3 Epoksiler

Epoksiler, bir oksijen atomu ve iki karbon atomundan oluşan üç üyeli halkalı kimyasallardır. Epoksi çapraz bağlayıcıların çapraz bağlama reaksiyonu verdiği gruplar amin, karboksil ve hidroksil gruplarıdır. Epoksi çapraz bağlayıcıların bilinen bir üyesi etilen glikol diglisidil eter (EGDE), hacimli yan zincirlere sahip doğrusal bir epoksi çapraz bağlayıcıdır. Epoksi çapraz bağlayıcıların enzimatik bozunmaya karşı düşük dirençleri nedeniyle sert doku uygulamalarında kullanımı sınırlıdır, ayrıca sitotoksisite problemi taşırlar [18, 124].

2.6.2.4 Sitrik asit

Sitrik asit (CA), turunçgillerde bulunan zayıf bir trikarboksilik asittir. CA'nın çapraz bağlama reaksiyonu verdiği gruplar amin ve hidroksil gruplarıdır. CA ile çapraz bağlama sonucu malzemelerin kan uyumluluğu artar ve polimer yapının hidrofilikliği dengelenir [125].

2.6.2.5 Genipin

Çalışmaların çoğu, tasarlanan bileşimlerin stabilitesini arttırmak için çapraz bağlanmasını kapsamaktadır. Konu edilen çapraz bağlayıcılardan EDC/NHS [19,

20] ve glutaraldehit [21], sıklıkla kullanılmakla birlikte memeli hücrelerine toksisite göstermektedirler. Bu nedenle bunları biyouyumlu bir çapraz bağlayıcıyla değiştirmek, tasarlanan sistemin biyouyumluluğunun geliştirilmesi için büyük önem taşır.

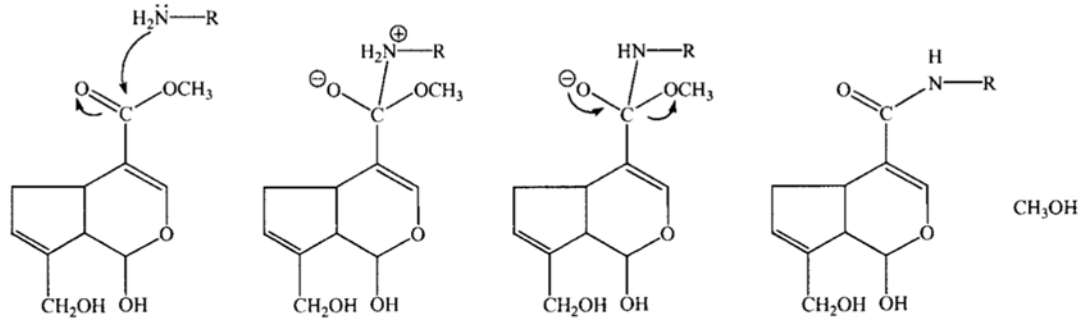
Genipin, *Gardenia jasminoides Ellis* ve *Genipa americana* bitkilerinden elde edilen genipozidin β-glukozidazla hidroliz edilmesiyle oluşan bir bileşendir. CAS numarası (CAS: *Chemical Abstract Service*) 6902-77.8 olup kimyasal formülü $C_{11}H_{14}O_5$ ve molekül ağırlığı 226.226 g/mol'dür. *Gardenia jasminoides* bitkilerinden elde edilen meyve ekstraktlarının, gardenya mavisi adıyla Uzak Doğu'da besin renklendiricisi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu pigmentlerin ısı, ışık ve pH değişimlerinde bile stabil oldukları belirtilmektedir [126].

Genipinin toksisitesinin çok düşük olduğu, hatta bu molekülün biyouyumlu olduğu ifade edilmekle birlikte, yapılan çalışmalar genipinin aynı zamanda koleretik, antidepresan, antidiyabetik, antikanser, antitrombotik, antienflamatuar, antibakteriyel; mide, karaciğer ve sinir koruyucu (gastroprotektif, hepatoprotektif, nöroprotektif) olduğunu, lipid proksidasyonunu engellediği ve Alzheimer hastalığında amiloid beta proteinine karşı olan hipokampal nöronlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir [22-24].

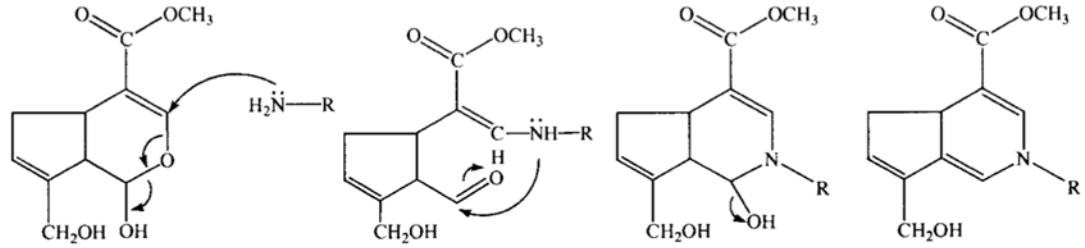
Biyouyumlu olan bu çapraz bağlayıcı homobifonksiyonel olup çapraz bağlama reaksiyonunu primer amin grupları üzerinden gerçekleştirir (Şekil 2.12) [25].

Asidik ve nötral koşullarda önce Ch'daki primer amin grupları dihidropiran halkasını açmak üzere genipinin deoksiloglikanin aglikonundaki olefinik C3 karbonuna nükleofilik saldırı yapar. Halkası açılmış genipin türevi ara bileşikler, dimer trimer, tetramer köprüleri oluşturacak şekilde etkileşebilir. İkinci ve daha yavaş reaksiyon ise genipindeki ester grubunun sekonder amid oluşturmak üzere Ch'la nükleofilik yer değiştirme reaksiyonudur. Asit varlığında ester grubu genipin üzerindeki nükleofilik yer değiştirme reaksiyonunu iyileştirir ve Ch'la sekonder amid oluşturur. Asidik koşullardaki çapraz bağlama sonucu, kısa genipin köprülerinden oluşan bir çapraz bağ yapısı ortaya çıkar (Şekil 2.13) [126].

Reaksiyon Mekanizması 1



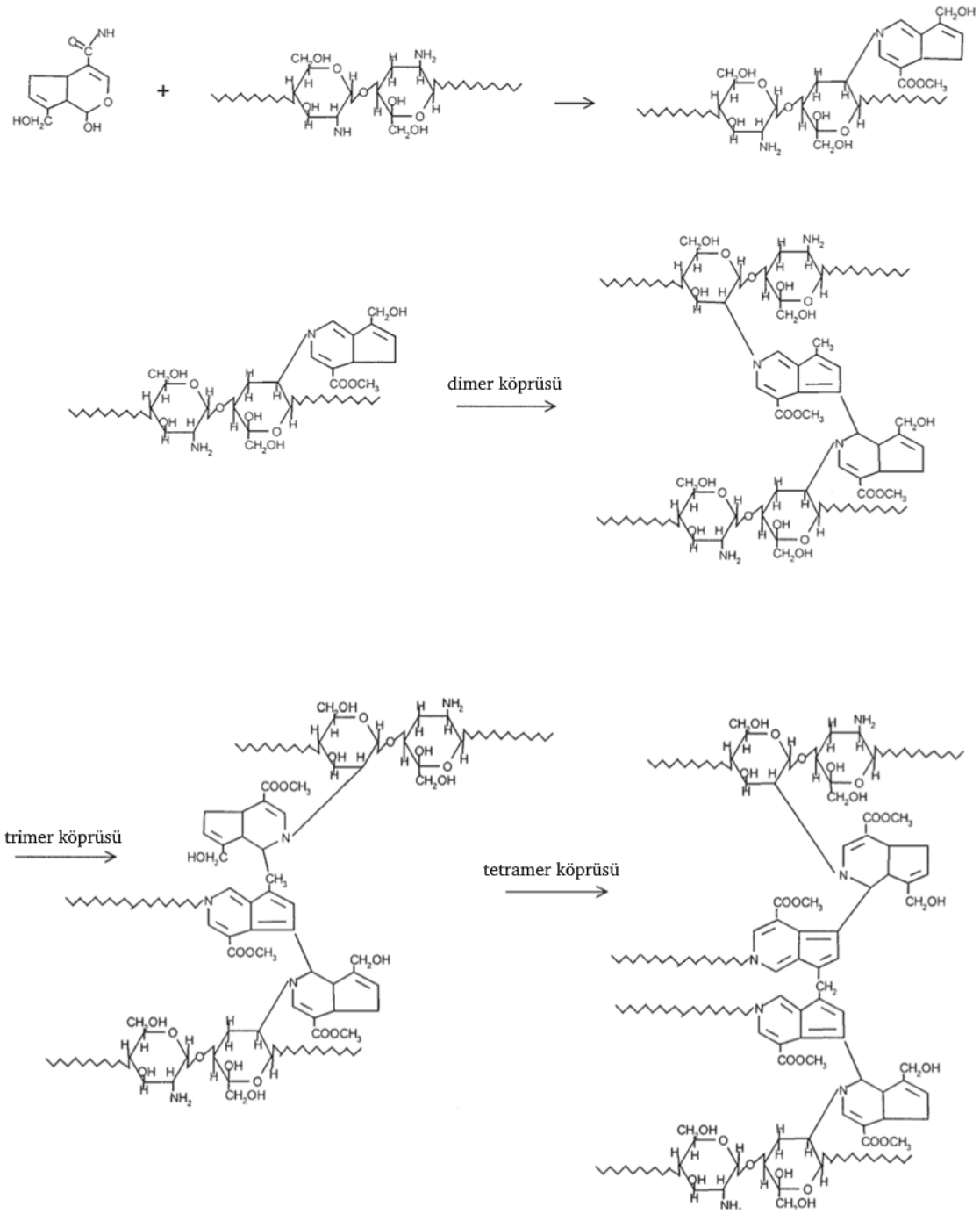
Reaksyion Mekanizması 2



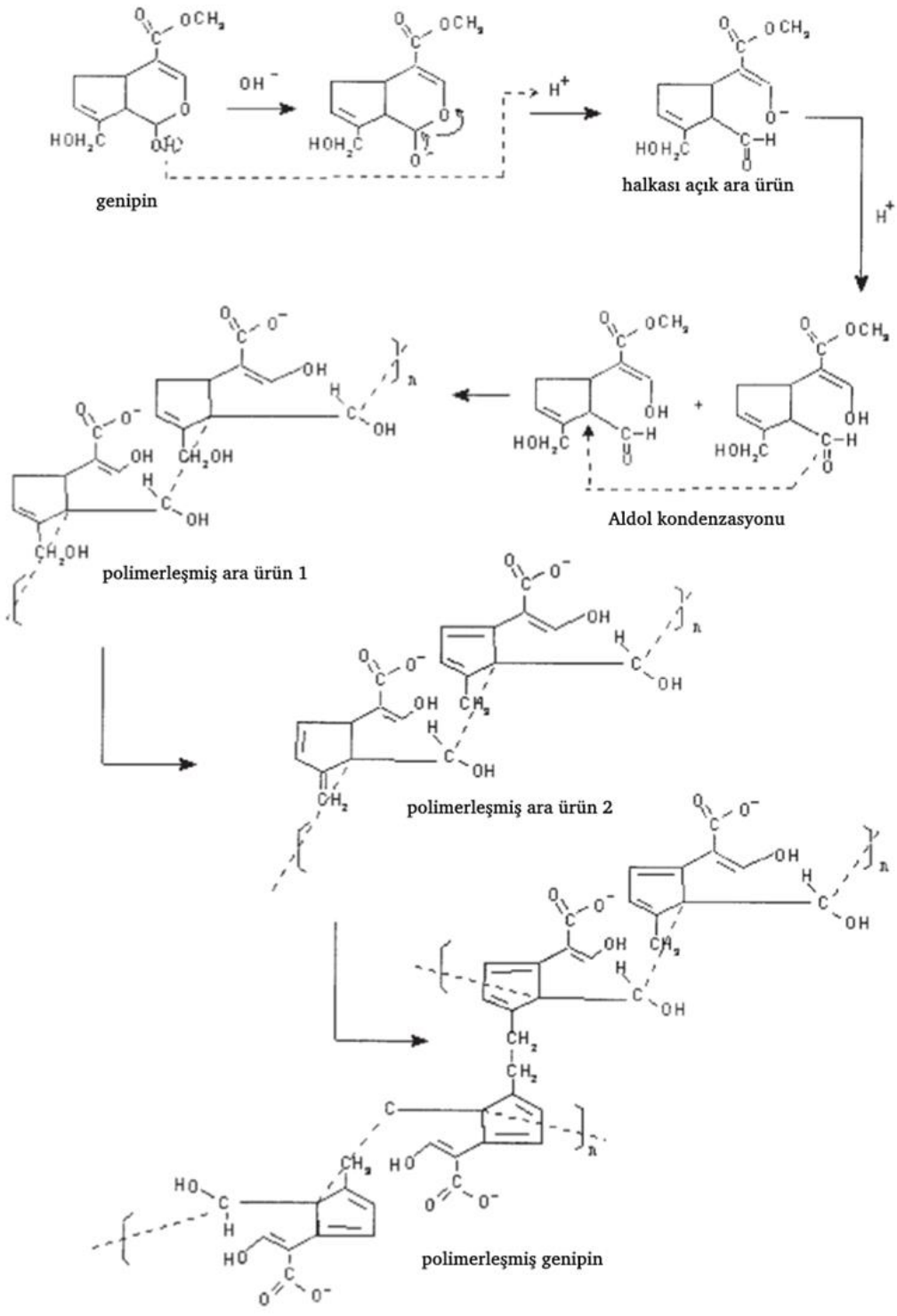
Şekil 2.12 Genipinin çapraz bağlama reaksiyonları için önerilen iki mekanizma [25]

Bazik koşullarda sulu çözeltideki nükleofilik OH^-, genipin moleküllerine saldırır ve genipin halkasını açarak aldehit grupları oluşturur. Daha sonra, halkası açık genipin monomerleri, bir aldol kondenzasyonuyla makromerler oluşturmak üzere polimerize olur (Şekil 2.14) [126]. Polimerize genipin üzerindeki aldehit grupları, Ch'daki amino gruplarıyla bir Schiff bazı reaksiyonu verir. Yani güçlü bazik koşullarda genipin çapraz bağlama öncesi polimerize olduğundan, Ch'daki genipin köprüleri uzun olacaktır (Şekil 2.16).

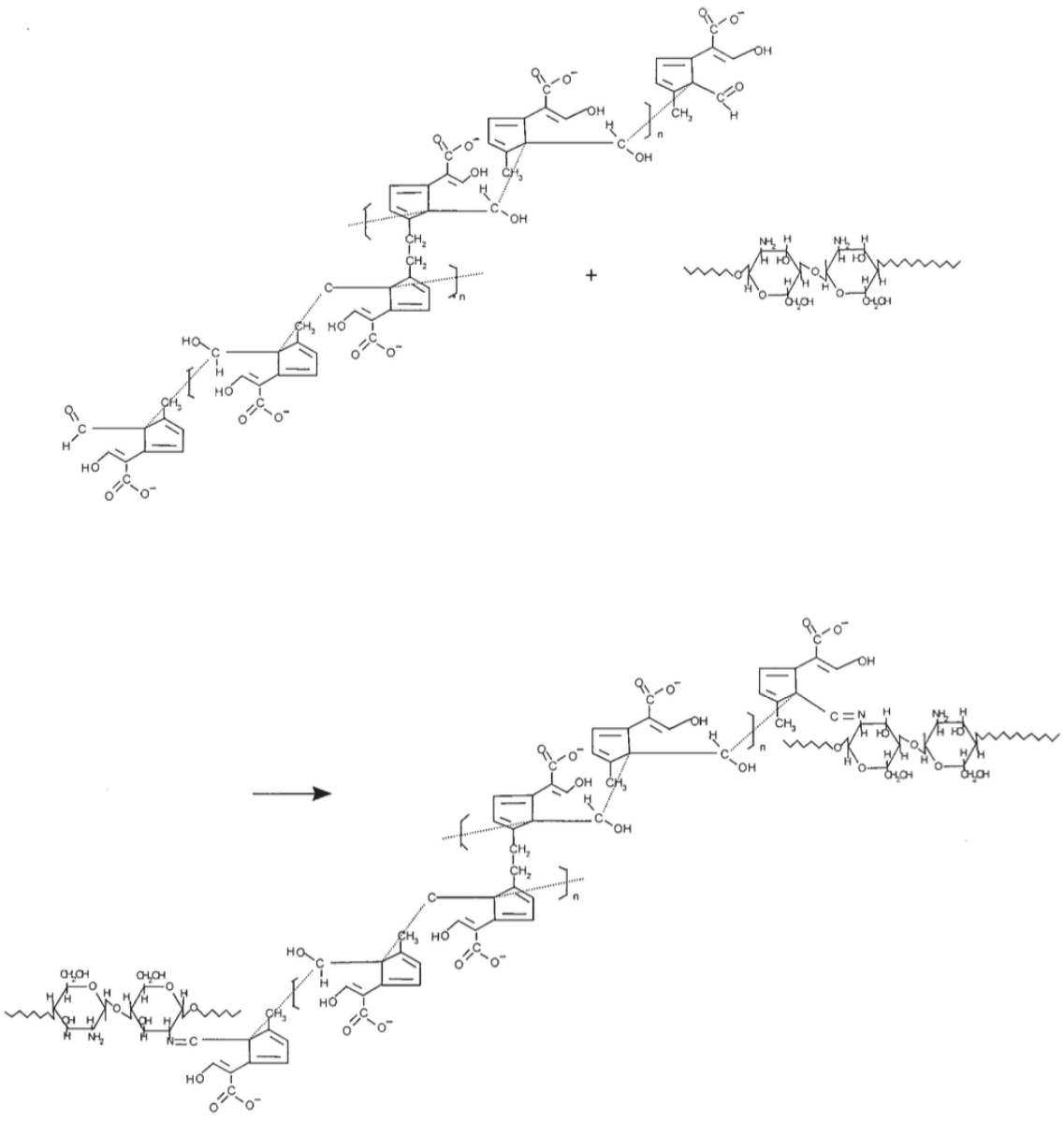
Özetle, genipinle çapraz bağlı Ch jellerinin konformasyonları, ilişkili heterosiklik aminlerin kısa çapraz bağ köprülerinden ve polimerize genipinin uzun çapraz bağ köprülerinden oluşur [126].



Şekil 2.13 Asidik ve nötral koşullarda genipinin kitosanla çapraz bağlanma reaksiyonu [126]



Şekil 2.14 Bazik koşullarda genipinin kendi kendine polimerizasyonunun mekanizması [126]



Şekil 2.15 Kuvvetli bazik koşullarda genipinin kitosanla çapraz bağlanma reaksiyonu [126]

2.7 Biyobozunurluk

Bir polimer malzemenin bozunması karmaşık bir işlemdir ve bu işlem sırasında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Moleküler ağırlık, oksidasyon, zincir kırılması ve çapraz bağlanma gibi kimyasal değişiklikler ile kristalleşme, gevşeme, sürünme ve morfoloji gibi fiziksel değişiklikler meydana gelir. Bu kimyasal ve fiziksel değişimler, nihayetinde dayanıklılık, modüller, elastikiyet, şeffaflık, renklenme gibi özelliklerin değişimine yol açar [127].

Bozunma, zincir yapısı, agregasyon yapısı, kimyasal bileşen ve safsızlıklar dahil olmak üzere doğal faktörlere (polimerin organik doğasına) bağlıdır. Ayrıca ultraviyole (UV) ışınımı, sıcaklık, atmosfer, nem, kimyasallar, stres, mikroorganizmalar gibi dış faktörlerle (çevresel şartlar) de ilişkilidir. Bozunma davranışı, bahsi geçen doğal ve dış faktörlerin kapsamlı bir bileşkesidir [127].

Biyobozunur malzemelerin taşıması gereken özellikler aşağıda özetlenmektedir [128, 129]:

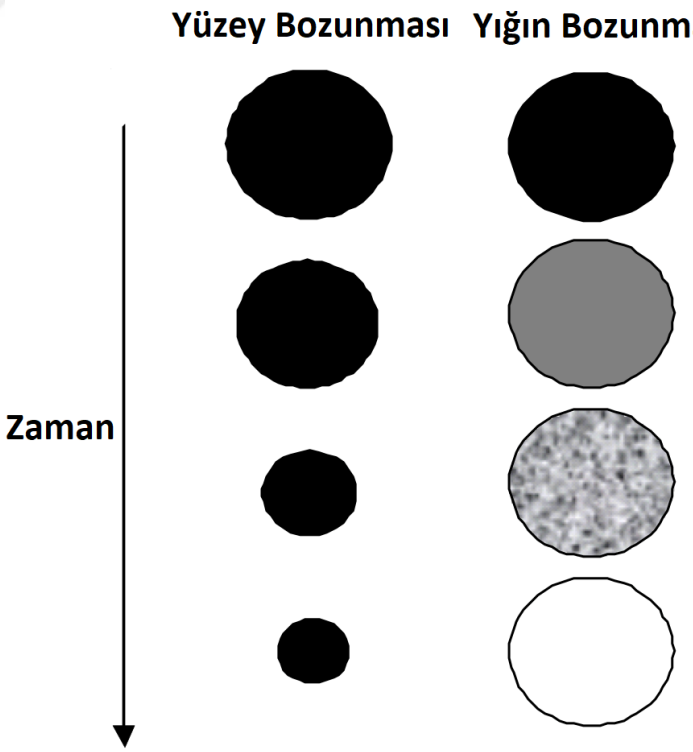
- ✓ Malzeme vücutta uzun süreli enflamatuar ya da toksik yanıt oluşturmamalıdır.
- ✓ Malzemenin raf ömrü kabul edilebilir uzunlukta olmalıdır.
- ✓ Malzemenin bozunma hızı, ilgili dokunun yenilenme ve iyileşme hızıyla denk olmalıdır.
- ✓ Malzemenin bozunma ürünleri toksik olmamalı, metabolize edilerek vücuttan uzaklaştırılabilmelidir.

Biyolojik ortamlar göz önüne alındığında biyobozunmanın iki ana yolla ortaya çıktığı görülmektedir. Bunlar hidrolitik ve enzimatik bozunmalardır.

Biyolojik sistemin sulu bir sistem oluşu ve biyolojik sistemler için üretilen iskele sistemlerinin ağırlıkla hidrofilik polimerlerden oluşması, su moleküllerinin iskeleye nüfuz etmesiyle sonuçlanır. Bunun sonunda suyla yıkılabilen anhidrit bağı (R-(C=O)-O-(C=O)-R), ester bağı (R-O-(C=O)-R), ortoester bağı (C-(O-R)$_3$-R) gibi bağlar, rastgele şekilde yıkılmaya başlar ve bozunma gerçekleşir [130, 131].

Öte yandan enzimatik bozunma, enzim aracılı oksidasyon veya hidrolizin gerçekleşmesiyle cereyan eder. Yani enzimatik bozunmada yer alan enzimler *horseradish* peroksidaz, katalaz ve ksantin oksidaz gibi oksidatif enzimler ile fosfatazlar, esterazlar ve proteazlar gibi hidrolitik enzimler sayesinde gerçekleşir. Ch'ın enzimatik bozunması, glikozidazlar aracılığıyla gerçekleşir. Bu bozunmanın kitosanaz ve biyolojik dokularda bulunan lizozim enzimleriyle gerçekleştiği belirtilmektedir [131]. Ayrıca mikroorganizmaların aktivitesi sonucu ortama salınan enzimler de enzimatik bozunmadan sorumludur [131].

Hidrolitik biyobozunmada hidrolize uğrayan bağlar sonucu suda çözünebilen ürünler oluşur. Bu ürünlerin ana yapıdan uzaklaşması sonucu, erozyon adı verilen bir aşınma durumu ortaya çıkar. Biyobozunma kimyasal bir durumu temsil ederken erozyon daha çok bozunma, şişme, çözünme ve difüzyonla ilişkilendirilen fiziksel bir durumu tanımlar. Şu hâlde, bozunurluğun erozyon için ana mekanizmayı oluşturduğu söylenebilir. Erozyon iki ana yolla gerçekleşir, bunlardan ilki yığın erozyon, diğeri de yüzey erozyonudur (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Yüzey erozyonu ve yığın erozyona ait şematik gösterim [131]

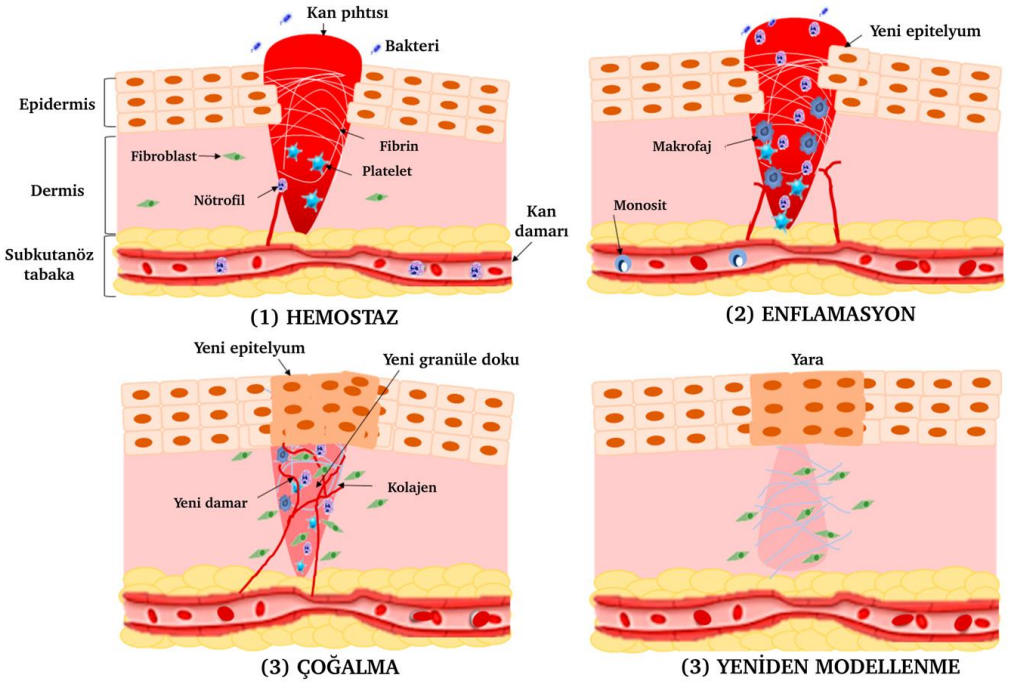
2.8 Yara İyileşmesi

Sağlıklı dokular; hastalıklar ya da kazalar gibi birçok iç ve dış faktörün etkisiyle hasarlanabilir ve dokular bütünlüğünü, fonksiyonlarını kaybedebilir. Bu hasarlı dokuların restorasyonu, yeniden yapılanması süreci yara iyileşmesi olarak adlandırılır [26, 27]. Yara iyileşme süreci oldukça karmaşıktır ve uyaranın iç veya dış uyaran olmasına bağlı olmaksızın, birbirinden tamamen ayrılmamış hatta kısmen birbiriyle çakışan 4 fazın bileşiminden oluşmaktadır. Bu fazlar hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma fazlarıdır [132, 133].

Yaralanmadan sonra, doku bütünlüğünü, doğal bariyer yapısını ve patojenlere karşı bağışıklık koruyuculuğunu kaybettiğinden enfeksiyonlara açık hale gelir [26, 27]. Enfeksiyonların yara iyileşmesini kesintiye uğrattığı uzun zamandan beridir bilinmektedir [28-32]. Yaralı dokunun tamamen iyileşmesi ve yeniden yapılanması zaman aldığı için yara bölgesinin iyileşme boyunca steril tutulması, gecikmiş yara iyileşmesini engellemek açısından önem arz etmektedir.

2.8.1 Yara İyileşmesinin Basamakları

Yaralara normal fizyolojik yanıt, yara iyileşme yanıtı olarak adlandırılır. Yara iyileşmesi, kan kaybının önlenmesi için pıhtılaşmanın başlatılmasını, granülasyon dokusunun oluşturulmasıyla enflamasyon yanıtının tetiklenmesini amaçlar ve son olarak yeniden epitelizasyonla doku olgunlaşmasına ve yeniden modellenmesine yol açar [134]. Bu aşamalar birbirinin peşi sıra gerçekleşirken birbirinden tamamen ayrı değillerdir, bir süreç tam olarak tamamlanmadan bir sonraki aşama da aynı anda başlar. Yani yara iyileşmesinin alt basamakları kısmen çakışık durumdadır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Yara iyileşmesinin dört basamağı [135]

Yaralanma gerçekleştiği ve doku bütünlüğü bozulduğu anda yara iyileşmesinin ilk basamağı olan hemostaz ile yara iyileşmesi de başlar. Plateletler aktive olur ve tıkacı oluşturacak olan fibrin, fibronektin, vitronektin ve trombospondinden oluşan kan pıhtısının oluşturulması amacıyla uygun sinyal verilir. Ardından epidermal büyüme faktörü, plateletten türevlenen büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β) gibi büyüme faktörleriyle kemokinlerin salımıyla yapım süreci başlatılır [136]. Prostaglandin H_2, güçlü bir platelet aktivatörü ve vazokonstriktör (damar kasılmasını tetikleyen) olan tromboksan A_2'ye çevrilir. Tromboksan A_2 sayesinde aynı zamanda makrofajlar, nötrofiller ve endotelyal hücrelerin de yara iyileşmesi boyunca salımı gerçekleştirilir [137].

Hemostazın ardından enflamasyon adımları başlar. İmmun hücreler yarayı baskılamaya başlar ve özellikle nötrofillerin göçüyle mikroorganizmaların nüfuzunu engellemek için bir immun bariyer oluşturulur. Enflamatuar yanıt olarak proenflamatuar sitokinler, tümör nekroz faktörü α (TNF-α), PDGF, transforme edici büyüme faktörü α (TGF-α), TGF-β, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi birçok çözünebilir aracı molekül salınır ve fibroblastlarla epitelyal

hücreler aktive edilir. Monositler yara bölgesine göç edip makrofajlara farklılaşır, böylelikle bağışıklık yanıtı güçlendirilir [136, 138, 139].

Proliferatif faz, lezyonlu doku alanının küçültülmesini hedefleyen fazdır. Bu aşamada epidermal yenilenme, anjiyogenez, granüle doku oluşumu, kolajen birikimi ve yara bölgesinin kasılmasıyla yara bölgesinin küçültülmesi gerçekleşir [140, 141]. Son faz olan yeniden yapılanma fazında olgunlaşma ve yapım süreci devam ederek yara bölgesinde ECM yavaş yavaş olgun yaraya dönüştürülür. Proliferatif fazda üretilen tip 3 kolajen, tip 1 kolajene dönüştürülür. Kan damarları ve kan akışı ortadan kaldırılır, hücrelerin bulunduğu olgun avasküler doku oluşturulur. Doku, orijinal geriliminin ancak %80'ini kazanabilir [133, 142].

Yara iyileşmesi konusundaki güncel yaklaşımlarda fonksiyonel biyomalzemeler ve doku mühendisliği ürünü deri ikameleri vazgeçilemez birer parça haline gelmişlerdir. Önceleri hemostatik mekanizmalarla kan kaybına engel olmak ve fiziksel bariyer olarak mikroorganizmaların nüfuzunu engel olmak şeklinde ortaya çıkan birincil görevleri, malzeme biliminin gelişmesi ve yara iyileşme mekanizmalarının günbegün daha iyi anlaşılmasıyla yerini yara iyileşmesi sürecini aktif olarak etkiler pozisyona evrilmiştir. Bu nedenle de biyomalzemelerle üretilen yara örtüleri, tedavi edici ajanların lokal olarak gönderilmesinde büyük bir potansiyel taşımaktadır [47].

2.8.2 Enfeksiyon

Fizyolojik yara iyileşmesinde önemli bir husus, yara yatağının oksijenlenmesidir. Oksijen yara iyileşmesinde, çok sayıda sitokinle etkileşime girmesi, aktif olarak çoğalan hücrelerin metabolik aktivitelerinde yer alması ve nötrofil solunum patlaması için bir efektör olması rollerini alır. Bir yaranın iyileşmesi için en az 20 mmHg doku oksijen basıncı gerektirdiği ve iyileşmeyen yaraların oksijen basınçlarının 5 mmHg kadar düşük olduğu ölçülmüştür. Oksijen basıncı düşük olduğunda, nekrotik kalıntılar bakteriyel üremeyi kolaylaştırır. Ayrıca bu mikroplarla mücadelede bağışıklık sisteminin birincil mekanizması tehlikeye girer [143]. Önemli bir diğer husus da besinlerin sistemik optimizasyonudur. Özellikle protein seviyesinin yara iyileşmesinde büyük bir etkisi bulunmaktadır [144].

Yara iyileşmesi sürecinde enfeksiyonları önlemek için kullanılan stratejiler arasında antiseptiklerin ve topikal veya oral antibiyotiklerin kullanımı [145, 146], antibiyotiklerin ilaç taşıma sistemleri olan nanoformülasyonlarla birlikte kullanımı [147], gümüş [148], çinko [149], altın [150] ve titanyum dioksit [151] gibi metal nanopartiküllerin kullanım, yara örtüleriyle büyüme faktörlerinin ilgili bölgeye gönderilmesi [152] ve benzerleri yer almaktadır.

2.8.3 Antibiyotik Direnci

Bakteriyel patojenlerde antimikrobiyal direnç, yüksek hastalık oranı (morbidite) ve ölüm oranı (mortalite) ile sonuçlanan ve dünya çapında geçerli olan bir sorundur [71]. Gram pozitif ve negatif bakterilerde ortaya çıkan çoklu ilaç direnci, geleneksel antimikrobiyallerle tedavisi zor olan veya mümkün olmayan bir noktaya gelmiştir [153].

Son 20 yılda bilinçsiz ve yönergesine uygun olmayan şekilde antibiyotik kullanımının artması, patojenlerde ancak özellikle önemli bakteriyel patojenlerde genel kullanımda olan antibiyotiklere karşı direnç oluşmasına neden olmuştur [33, 34]. Yalnız klinik patojenlerdeki antibiyotik direnç genlerinin değil, tüm patojenik, komensal ve çevresel bakterilerin, mobil genetik elementler ve bakteriyofajların bir antibiyotik direnç geni rezervuarı (rezistom) oluşturabileceği kabul görmektedir. Yatay gen transferi ile de (*horizontal gene transfer,* HGT) antibiyotik direncinin komensal ve çevresel bakterilerden patojenlere yayılır [154].

2.8.3.1 Biyofilm Oluşumu

Bakteriler doğada yüzeylerde biyofilmler oluşturarak hayatta kalırlar ve muhtemelen hepsi değilse de çoğu bakteri (ve mantarlar) biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bir biyofilm, polisakkarit, protein ve hücre dışı DNA'dan oluşan kendi kendine üretilen bir polimer matris içine gömülmüş yapılandırılmış bir bakteri konsorsiyumudur. Bakteriyel biyofilmler antibiyotiklere, dezenfektan kimyasallara ve fagositoza ve vücudun doğal ve adaptif enflamatuar savunma sisteminin diğer bileşenlerine dirençlidir [155]. Besin ve oksijen gradyanları, biyofilmlerin tepesinden dibine kadar mevcuttur ve besin yönünden fakir bölgelerde bulunan bakteri hücrelerinin metabolik aktivitesi azalmış ve iki katına

çıkma süreleri artmıştır. Bu az ya da çok uyuyan hücreler bu nedenle antibiyotiklere toleransın bir kısmından sorumludur. Biyofilm büyümesi, artan bir mutasyon seviyesi ile ilişkilidir. Biyofilmlerdeki bakteriler, virulans faktörlerinin ve bir dereceye kadar biyofilm yapısının üretiminden sorumlu belirli genleri aktive eden moleküller aracılığıyla iletişim kurar [155]. Bu fenomen *quorum* algılama (*quorum sensing, quorum:* belirli bir bakteri popülasyonunda gen ifadesini değiştiren asgari bakteri hücre yoğunluğu) olarak adlandırılır ve bakteri sayısına bağlı olarak belirli bir niş içindeki *quorum* algılayan moleküllerin konsantrasyonuna bağlıdır. Biyofilm oluşumu antibiyotik profilaksisisiyle ya da erken dönem yoğun antibiyotik tedavisiyle engellenebilir, ardından da kronik baskılayıcı antibiyotik tedavisi uygulanabilir biyofilm matriksi çözen bileşiklerin kullanımı veya *quorum* algılayıcı inhibitörlerinin kullanımı biyofilmlerin antibiyotiklere ve fagositoza duyarlılığını arttırarak biyofilm oluşumunu engeller.

2.8.3.2 Virulans

S. aureus, fırsatçı bir patojendir ve ağır klinik enfeksiyonların birçoğunun ana etmenidir, Hastalıkların çeşitliliği bu patojenden kaynaklanan virulans faktörlerinin çeşitliliğini de ortaya koymaktadır. Konak canlıda bir enfeksiyon oluşturmak için toksinler, enzimler, adezinler ve patojenin aşırı koşullar altında hayatta kalmasına izin veren ve bakterinin dokulardan yayılma yeteneği için gerekli olan diğer yüzey proteinleri gibi birçok faktörden oluşan kapsamlı bir virulans faktörleri seti *S. aureus* tarafından ifade edilir. Bu toksin ve enzimlerin ifadesi, birçok regülatör sistem tarafından kontrol edilir.

S. aureus'un şu anda mevcut olan antibiyotiklere direnç yeteneği, çeşitli çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus* klonlarının yayılması, bir *S. aureus* enfeksiyonu için tedavi seçeneklerini kısıtlayan faktörlerdir. *S. aureus* toksinlerini nötralize eden veya toksin üretimini düzenleyen yolları bloke eden antivirulans terapötiklerinin geliştirilmesi, bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasını engelleme potansiyeli göstermiştir [156].

S. aureus toplumdaki ve sağlık hizmeti ortamlarındaki enfeksiyonlardan sorumlu önemli bir insan patojenidir. Dikkatin çoğu metisiline dirençli *S. aureus*'a (MRSA) odaklanmış olsa da metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) enfeksiyonlarda birincil

tür olmaya devam etmektedir [157]. *S. aureus* epidemiyolojisi, özellikle MRSA'nınki, son yıllarda hızla gelişmiştir. İlk olarak tipik bir çoklu ilaç dirençine sahip hastane patojenini temsil eden MRSA, evrim geçirme ve farklı ortamlara uyum sağlama yeteneği nedeniyle son zamanlarda toplumda ve çiftlik hayvanları arasında ortaya çıkmıştır [158]. Bu süreçte yatay gen transferi sayesinde kazanılan genlerin, değişen çevresel şartlarda sağ kalım üzerinde önemli etkileri olduğu vurgulanmaktadır. MRSA'nın tüm kıtalarda ve ülkelerde bir sorun teşkil ettiği, mortalitede artış ve pahalı antibiyotiklere ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. *S. aureus* antibiyotiklere kolayca direnç kazanabilir ve MRSA karakteristik olarak birden çok ilaca dirençlidir [159].

Bu bağlamda, antimikrobiyal peptidlerin kullanımı antibakteriyel direncin üstesinden gelmek için etkili bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.9 Antimikrobiyal Peptidler

Konak savunma peptidleri (*host defense peptides*) olarak da bilinen antimikrobiyal peptidler (AMP), memeliler, hayvanlar, bitkiler ve tek hücrelilerde doğal bağışıklığın ilk savunma hattı olan doğal bileşenlerdir [35, 36]. Bu peptidler bazı özgül genler tarafından, sürekli olarak ya da bazı uyaranlar altında ifade edilir.

Etki mekanizmaları geleneksel antibiyotiklerden farklı olduğu için ilaç direnci gösteren mikroplarda bile etkilidirler, geleneksel antibiyotiklere kıyasla daha geniş spektrumda etkilidirler. Patojenler üzerinde hücre zarının tahribi, konakta ise bağışıklık yanıtını ve enflamasyonu düzenleme özelliklerine sahiptirler [37, 38]. Etki alanları yalnız Gram pozitif ve negatif bakterilerle sınırlı olmayıp mantarlar ve virüsleri de içeren geniş bir spektruma yayılmış haldedir [39, 40]. AMP'lerin %88'i pH:7'de +2 ilâ +9 mV arası net pozitif yüke sahipken [41, 42] %6'sı nötr ve %6'sı da anyonik peptidlerdir [43, 44].

AMP'lerin çoğu, ağırlıkla katyonik ve hidrofobik aminoasitlerden oluşur. Detaylı incelendiğinde, hidrofobik gruplarca zengin olmasına rağmen hidrofilik gruplar da içerdiği ve bu nedenle amfifilik karakter taşıdığı görülür [39]. Genellikle 100'den az aminoasitten oluşurlar ki bu aminoasitlerin çok büyük bir kısmı pozitif yüklü lizin ve arjinin olduğundan katyonik karakter kazanırlar [160]. Amfifilik

AMP'ler serbest halde düzensiz formdayken bakteriyel hücre zarlarıyla etkileştiklerinde α sarmal yapıya katlanır. Bu sarmalın bir yarısı hidrofilik öteki yarısı hidrofobiktir. Hücre zarlarıyla etkileştiklerinde zar tarafından adsorbe edilirken konformasyonel değişikliğe uğrayarak α sarmal şeklini alırlar. Bu esnada hidrofobik kısımları, etkileştikleri çift katmanlı hücre zarının hidrofobik kısmına bağlanır. Bu peptidler N terminalinde güçlü bazik aminoasitlere sahipken C terminal nötral hidrofobisitesiyle amidatlanmıştır. Bu peptidlerin katyonikliği antibakteriyel etkileriyle ilişkilendirilirken hidrofobisitesi de hemolitik aktiviteleriyle ilişkilendirilmektedir [35, 45, 161].

Peptidlerin etkileşim mekanizmasıyla ilgili birkaç model önerilmiştir. Bunların arasında fıçı tahtası (*barrel-stave*) modeli, toroidal model ve kilim modeli öne çıkmaktadır [45]. Fıçı tahtası modeli ile toroidal modellerde AMP'ler por oluşturarak zarda etkileşim gösterirken kilim modelinde por oluşmaksızın peptidler zarda birikim göstermektedir.

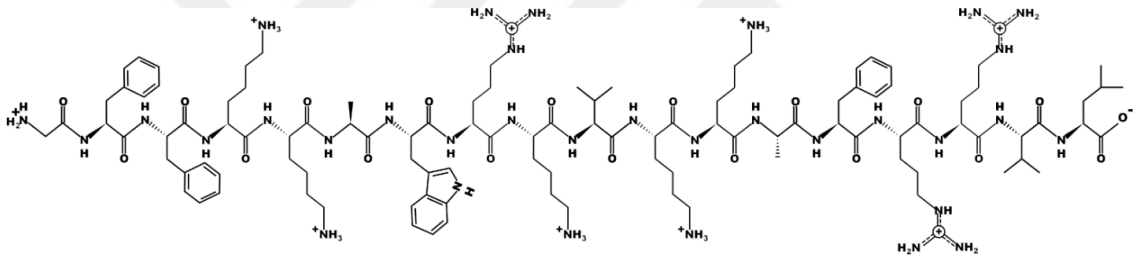
Bu peptidlerin etki mekanizmalarıyla ilgili çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bu mekanizmalar arasında hücre zarı hasarı, hücre içi bakterisidal mekanizma, makromolekül sentezinin inhibisyonu, organellerin DNA parçalanmasına neden olacak şekilde hasar görmesi, enzim aktivitesinin inhibisyonu ve bağışıklığın düzenlenmesine katılarak antimikrobiyal etki göstermeleri sayılabilir [39, 45]. Bunların arasında özellikle katyonik AMP'lerle hücre zarları veya zar geçirgenliği arasındaki etkileşimin potansiyel mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir.

2.9.1 HF-18

Ölü balıkların kalıntılarıyla beslenen yılan balığı benzeri bir çürükçül balık olan *Myxine glutinosa* (*Atlantic hagfish*), çürüyen deniz canlılarıyla beslendiği için bu canlılardan geçebilecek mikroplara karşı kendini koruyacak şekilde evrimleşmiş bir bağışıklık sistemine sahiptir. Çürükçül beslenmesi, ilgiyi bu canlının özellikle bağırsağındaki bağışıklığın nasıl sağlandığına ve burada yer alan AMP'lerin incelenmesine kaydırmıştır [36]. *Myxine glutinosa*'nın bağırsağından izole edilen HFIAP-1 peptidinin (dizi: GFFKKAWRKVKHAGRRVLDTAKGVGRHYVNNWLNRYR) incelendiği çalışmalar olmakla birlikte, araştırmacılar daha kısa zincirli, daha katyonik ve daha

hidrofobik peptidler elde edebilmek için HFIAP-1'in türevlendirilmesiyle ilgilenmişlerdir. Yapılan çalışma sonunda [36] iki aminoasit değiştirilerek (His^{12} ve Gly^{14} → Lys^{12} ve Phe^{14}'e dönüştürülmüştür) elde edilen HF-18'in (dizi: GFFKKAWRKVKKAFRRVL) (Şekil 2.18), *Staphylococcus aureus* üzerinde 4 μg/ml gibi düşük bir MIC değerine, hızlı bir bakterisidal etkiye, *S. aureus* ile tetiklenen fare bakteremisinde enflamatuar sitokinlerin salımını inhibe edici özelliğe sahip olduğu, *in vivo*da da memeli hücrelerine düşük toksisite gösterdiği ortaya konmuştur [36].

Yakın zamanda yayınlanan bir başka çalışma, HF-18'in klaritromisin ve amoksisiline dirençli *Helicobacter pylori* üzerindeki etkilerinin, negatif yüklü bakteri hücre zarının nötralizasyonuyla zar bütünlüğünün bozulması ve tutunma genlerinin transkripsiyonunun inhibe edilmesiyle bakteriyel virulansın azaltılması aracılığıyla ortaya çıktığını kanıtlamıştır [162].



Şekil 2.18 HF-18 peptidinin moleküler yapısı (PepDraw ile çizildi)

2.10 İlaç Taşıma Sistemleri

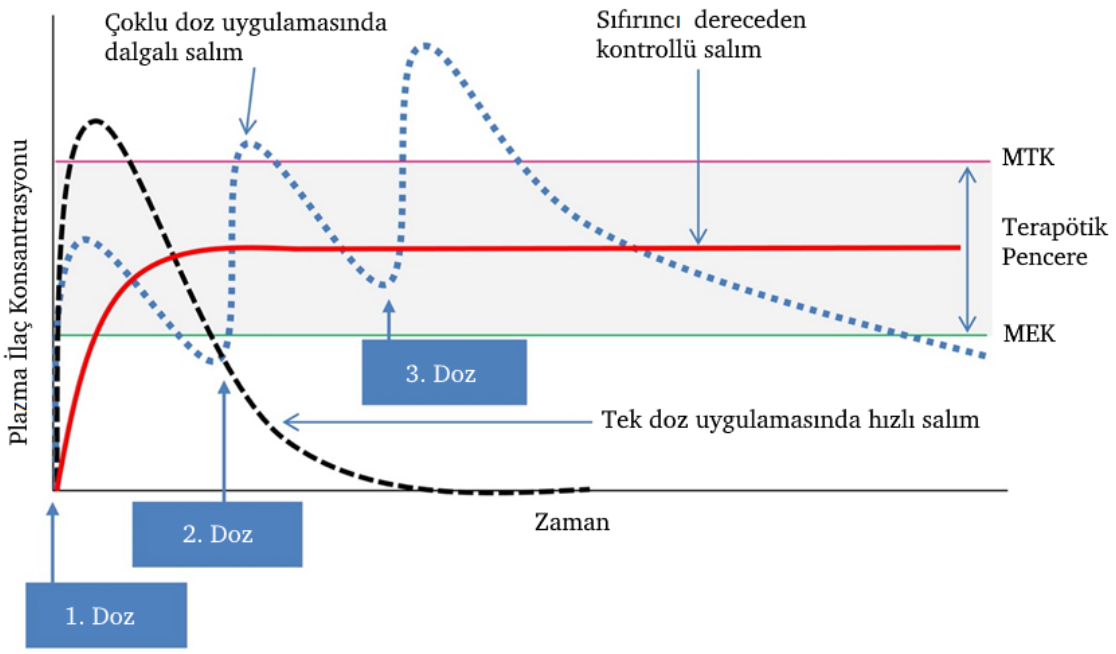
Söz konusu peptidin önemli özelliklere sahip olması, yara iyileşmesi süresince sergileyeceği antibakteriyel etkinin korunumunun da çok değerli olduğu anlamına gelmektedir. İlaç taşıma sistemleri bu uzatılmış etkinin sergilenmesi için uygun adaylardır. İdeal bir ilaç taşıma sisteminin;

- ✓ Hedef etken madde için yüksek yükleme verimini sağlaması,
- ✓ Yüklenen etken maddeyi enzimatik ve hidrolitik bozunmadan ve oksidasyondan koruması,
- ✓ Hedef doku veya organda uzatılmış bir sürede sabit bir konsantrasyonda kontrollü ilaç salımını sağlaması,
- ✓ Biyouyumlu, biyobozunur olması
- ✓ Düşük immunojenisiteye sahip olması istenir [163-165].

İlaç taşıma sistemleri, taşıdıkları etken maddenin sudaki çözünürlüğünü arttırarak, taşındığı bölgede kalma zamanını uzatarak, enzimatik ve hidrolitik bozunmaya karşı maddeyi koruyarak biyoyararlanımını arttırır, dolayısıyla vücuda yüklenen etken madde dozu azaltılmış olur. Çünkü daha az miktarda maddeden daha fazla yararlanılmış olur. Birçok farklı sistem araştırılmakta ve kullanılmakta olup bu sistemlerden bazıları nanopartiküller, miseller, lipozomlar, veziküller ve hidrojellerdir. Hidrojellerle ilgili detaylı bilgilere daha önceki bölümlerde değinilmiştir.

İlaç taşıma sistemlerinin işlev görmesi, ilacı etkin bir şekilde salmalarına bağlıdır. Bu durumda ilaç salımıyla ilgili mekanizmaların incelenmesi gerekmektedir.

2.11 İlaç Salımı



Şekil 2.19 Tek doz uygulamasıyla, çoklu doz uygulamasıyla ve sıfırıncı dereceden kontrollü salımla elde edilen plazma ilaç konsantrasyonu [167]

Salım kinetiğinin kontrol edilmesiyle ilgili en büyük amaçlardan biri, salınan ilaç seviyesinin minimum efektif konsantrasyonla (MEK) minimum toksik konsantrasyon (MTK) arasındaki terapötik pencerede tutulmasıdır [166, 167]. Tek seferde yüksek dozda ilaç alındığında plazmadaki ilaç konsantrasyonu MTK'nin üzerine çıkıp hızla MEK'in altına düşer. Tekrarlayan doz uygulamaları bu dalgalanmanın önüne bir nebze geçebilir ancak hastada problemler yaşanması

muhtemel olur. Bu nedenle de doz uygulama sıklığının azaltılması için kontrollü salım sistemlerinin kullanımı önerilmektedir. Bu sistemlerde özellikle sıfırıncı dereceden salım profilinin yakalanması hedeflenmektedir [166, 167].

İlacın taşıyıcıdan salım mekanizmasına göre 4 salım çeşidinden bahsedilebilir: difüzyon kontrollü, çözücü kontrollü, kimyasal reaksiyon kontrollü ve uyarı kontrollü salım [167].

Difüzyon kontrollü salımda kapsül ya da matriks tipi bir salım sisteminden bahsedilebilir. Bu tipte salım için itici güç molekülün yüklendiği alanla salınacağı yüzey arasındaki konsantrasyon farkı ve dağıtıldığı sistemden salınacağı yüzeye olan mesafesidir. Kapsül tipinde bir membranla çevrili olan bir sistem söz konusu olduğu için membran, difüzyonu zorlaştırıcı yönde etki eder. Öte yandan matriks tipi sistemler salım ortamına temas eden yüzeyde difüzyonu zorlaştıracak bu tip bir bariyerden yoksun oldukları için ilk anlarda patlama etkili salım (*burst release*) görülür.

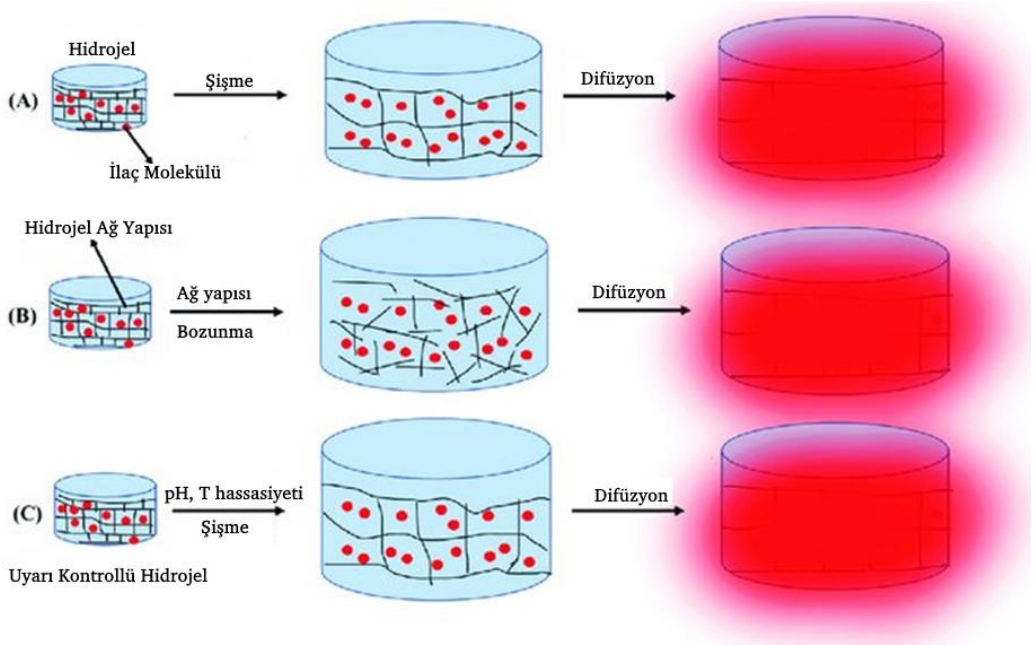
Çözücü kontrollü salım, ozmos kontrolü salım ve şişme kontrollü salımı bünyesinde barındırır. Ozmos kontrollü salım, yarı geçirgen polimerik zarla çevrili bir taşıyıcıda, ilaç konsantrasyonunun düşük olduğu dış çevreden yüksek olduğu iç çevreye çözelti akışı olur. Bu durumda sabit konsantrasyon gradyanı sağlandığı sürece sıfırıncı dereceden bir salım kinetiği yakalanır. Öte yandan şişme kontrollü salımda, su ortamına konan hidrofilik polimerlerden oluşan bir sistem suyla şişer. Şişme sonucu polimer zincirler birbirinden uzaklaşır ve zincir rahatlaması sayesinde ilaç molekülleri salınır. Başlangıçtaki ilaç dağılımı ya da polimerlerin bileşimine bağlı olarak sıfırıncı derece salım kinetiği sağlanabilir.

Eğer taşıyıcı sistem yapısında biyobozunur polimerler (poliesterler, poliamidler, poliamino asitler, polisakkaritler gibi) taşıyorsa bu polimerler ana zincirlerindeki ester, amid ve hidrazon bağlarının hidrolitik ve/veya enzimatik bozunmasıyla ilaç salarlar. Bozunma iki ana şekilde gerçekleşebilir. Eğer taşıyıcı sistemde poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA), poli(laktik asit) (PLA), poli(kaprolakton) (PCL) gibi polimerler varsa sistem yığın bozunmaya uğrar (*bulk degradation*). Yığın bozunmada tüm sistem aynı anda bozunur. Öte yandan poli(anhidrit) ve poli(ortoester) yapısındaki polimerler varsa polimerlerin bozunması suyun

matriks içine difüzyonundan daha hızlı gerçekleşeceği için yüzeyden bozunma başlar (*surface degradation*).

Uyarı kontrollü salım sistemleri ise pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, ses, elektrik alan ya da manyetik alan gibi uyaranlarla kontrol edilir. Burada uyaran kontrol edilebildiği için hedefe yönelik ilaç taşınması için sıklıkla kullanılan sistemlerdir.

İlaç taşıyıcı olarak hidrojel doku iskelelerinde taşınacak molekül polimerik yapı içinde dağılır. Salım, suyun hidrojele nüfuzu ve şişme kontrollüdür [46]. Hidrojellerdeki şişme davranışı, polimer zincir gevşemesini ve ilaç difüzyonunu kolaylaştırmaktadır [168]. Hidrojeller, makromoleküler ilaçlar, küçük moleküllü ilaçlar ve hücreler dahil olmak üzere çeşitli terapötik ajanların salımı üzerinde kontrol sunabilir. Ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri, kontrol edilebilir bozunurlukları ve ilaçları bozunmaya karşı koruma kapasiteleri sayesinde hidrojeller, ilaç salımını kontrol eden bir taşıyıcı görevi görür. Suya maruz kalan hidrojeller, polimerler arasındaki boşlukları açacak şekilde çapraz bağlı ağı genişletir. İlacın difüzyonu, gözeneklerin boyutuna ve poröziteye bağlıdır. İlaç, oldukça gözenekli bir hidrojelden serbestçe yayılırken, daha az gözenekli hidrojellerden ilaçların salımı için hidrojelin bozunması gereklidir. Sıcaklık, pH ve iyonik güç hidrojelin şişmesine etki eden faktörler arasında olduğu için şişmenin, dolayısıyla ilaç salımının bu faktörlere göre değiştirilebilmesi mümkündür [169].



Şekil 2.20 Hidrojellerden ilaç salım mekanizmaları [170]

2.12 Yara Örtüleri ve Örtü Malzemesi Olarak Biyomalzemeler

İdeal bir yara örtüsünün taşıması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Bunlar,

- ✓ Yara bölgesindeki fazla sızıntıyı emmesi ancak belli bir nemliliği sağlaması
- ✓ Bakteriyel enfeksiyonları engellemesi
- ✓ Yara yatağına yapışmaması
- ✓ Yara iyileşmesini engellememesi ve hastayı rahatsız etmemek için yumuşak olması [171, 172] şeklinde sayılabilir.

2.12.1 Gazlı Bezler

Ana amacı temizlik nedenleriyle kullanım olsa da gazlı bez yara iyileşmesinde en sık kullanılan üründür. Kanı ve yara sızıntısını emmekte iyi olsa da yara bölgesini kurutma eğilimindedir. Ayrıca yara bölgesine yapışması da gazlı bezi değişirken yara kabuğunun kalkmasıyla yaranın tekrar kanamasına ve acıya neden olur. Ayrıca hidrofilik yapısı nedeniyle mikroorganizmaların lokalizasyonu için uygun nem, oksijen ve besin sağlar [172-174].

2.12.2 Hidrokolloidler

Hidrokolloidler, film ya da ince tabaka halinde üretilebilen kolloidal malzemelerdir. Kuru ve ıslak alanlara yapışabilme özelliğindedirler. Başlangıçta su buharına geçirimsiz olmalarına rağmen sıvı emdiklerinde jel oluştururlar ve tuttukları su miktarı arttıkça su ve hava geçirgenlikleri artar. Özellikle kısmî sızıntı yapan yaralarda kullanımları uygundur [48, 143].

2.12.3 Aljinatlar

Aljinatlar poröz tabakalar ya da esnek fiberler halinde üretilebilirler. Suyla temas ettiklerinde jel yapısını oluştururlar. Monomerlerinden mannuronik asit miktarı arttıkça daha yumuşak jeller üretilebilirken guluronik asit miktarı arttıkça daha sert jeller elde edilir. Kalsiyum iyonlarıyla basitçe çapraz bağlanarak daha kuvvetli bir bariyer oluşturulabilir. Orta-yüksek seviye sızıntıları tutabilir ancak kuru yaraları daha da kurutabilir. Bu tip bir yara örtüsünün sık sık değiştirilmesine ihtiyaç duyulur [48, 175].

2.12.4 Yarı Geçirgen Filmler

Yarı geçirgen filmler sıvı buharına geçirgen olup sıvı sızıntılara geçirgen değillerdir. İnce, genellikle de transparan yapıdadırlar. Son derece esnek yapılarıyla deri yüzeyine iyi uyum sağlayabilirler. Görece yüzeysel yaralarda kullanımı tercih edilen malzemelerdir [48, 143].

2.12.5 Süngerimsi Yara Örtüleri

Süngerimsi örtüler yüksek emiş kabiliyetine sahip poröz yapılardır ve koruyucu bir yüzey oluştururlar. Yaranın şekline göre şekillendirilebilir, boyutlandırılabilirler. Kısmî ya da tam kalınlıktaki yaralarda veya çok sızıntılı yaralarda kullanımları uygundur [48].

2.12.6 Hidrojel Yara Örtüleri

Önceki bölümlerde sınıflandırma ve özelliklerine detaylı olarak değinilen hidrojeller çok değişik şekillerde ve boyutlarda, kullanılan polimere bağlı olarak çeşitli kristalinite ya da amorflukta üretilebilmektedir. Hidrojellerin suyla şişebiliyor olmaları ve yara bölgesini nemli tutmaları yara örtü malzemesi olarak kullanımlarını önemli hale getirmektedir. Özellikle yaralarda meydana gelen sızıntıların tutulabilmesi, yara bölgesinin kuru bırakılmaması, por büyüklüklerinin ayarlanabilmesi sayesinde patojenlere geçirgenliklerinin azaltılması ve yara iyileşmesine katkı sunacak etken maddelerin taşınıp salınması yoluyla yara bölgesinin iyileşmesinde aktif rol oynar [48].

Bahsi geçen tüm malzemeler doğal ve sentetik polimerlerle üretilebilmekle, bu polimerlerin kendi biyolojik fonksiyonlarından yararlanılmakta ya da bu polimerlerin daha ileriki fonksiyonelleştirilmeleriyle kazanılan ek fonksiyonlar sayesinde malzemeler farklı uygulamalara uygun hale getirilmektedir.

Yara tabiri genellikle tek tip bir hasarı temsil etmez, küçük bir sıyrıktan yanıklarda olduğu gibi dokuların büyük bir kısmının kaybına kadar uzanan geniş bir spektrumu kapsar [176]. Vücudun yarayı kendi başına iyileştirme kapasitesi, yaranın tipine ve ağırlığına, altta yatan hastalıklara ve enfeksiyonun varlığına göre değişir. Örneğin kütanöz yaralarda, derinin en dış katmanı fizyolojik koşullarda patojen geçişine izin vermeyecek şekilde tasarlanmışken yaralanma durumunda

bu bütünlük bozulduğundan patojenler kolaylıkla bölgeye nüfuz edebilirler. Yaraların mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu yara iyileşmesini geciktirdiği gibi sistemik enfeksiyon riskini de beraberinde getirir [47]. Bu nedenle antienfektif ajanların bölgeye topikal olarak uygulanması, burada kontrollü salımın gerçekleşmesiyle enfeksiyonun engellenmesi hem yara iyileşmesinin kesintiye uğramaması hem de aşırı dozda ilaç kullanımı nedeniyle antibiyotik direncinin artmasının önüne geçilmesi açısından önem taşımaktadır.

2.13 Yara İyileşmesinde Ch, HA ve CS'nin Yeri

Çalışmalar; Ch-CS [177-179], Ch-HA [178], CS-sodyum aljinat [180], Ch-CS-silk fibroin [181], kolajen-Ch-CS [182], kolajen-HA [19], kolajen-CS-HA [20], O-karboksimetil-N,N,N-trimetile Ch-HA [183], metoksi poli(etilen glikol) (mPEG)-poli(kaprolakton) (PCL)-jelatin-HA-CS [21] gibi çeşitli kombinasyonlarla yara iyileşmesi çalışmalarında ana malzeme olarak kullanımını içermektedir. Bu çalışmalarda çoğunlukla CS ve HA'nın yara iyileştirici özelliklerinden, Ch'nin de antibakteriyel etkisinden faydalanmaktadır.

HA fibroblastları prolifere ederek yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [8]. Ayrıca bakteriyle tutunmayı geciktirip biyofilm oluşumunu önleyerek bakteriyostatik etki göstermektedir [9-11]. HA'nın bu etkilerini özgül bir reseptöre bağlanarak göstermek yerine fizikokimyasal karakteriyle ortaya çıkardığı anlaşılmaktadır. Çalışmalar HA'nın antibakteriyel etkilerinin, HA zincir uzunluğuyla orantılı olarak arttığını ve antibakteriyel etkiyi ortaya çıkaran iki mekanizma olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmalardan ilki yüksek viskoziteye sahip HA çözeltilerinin, bakterilerin yara bölgesine difüzyonunun engellenmesi, ikincisi de bakterilerin yara bölgesine nüfuzunda etkili olan hyaluronat liyaz enziminin HA tarafından emilmesidir [11, 184, 185].

CS biyouyumlu ve biyobozunurdur [13, 186]. Antibakteriyel etkisi olmayıp yara iyileşmesinde etkilidir. Çalışmalar, CS'nin mitojenlerce aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolağını upregüle ederek fibroblast büyüme faktörü-2 ile tetiklenen hücre proliferasyonu ve hücre tutunmasını desteklediğini ortaya çıkarmıştır [12, 13]. CS, gümüş [148] ve çinko [187] nanopartiküllerde (NP)

indirgeme ajanı olarak kullanılmıştır. Ayrıca ilaç taşıma sistemi olarak hidrojellerde kullanımı diyabetik yara iyileşmesinde çalışılmıştır [180].

Yara iyileşmesi için yapılan çalışmalardan bir tanesi CS NP içeren Ch-HA sünger yapısının üretimini konu edinmiştir [49]. Bu çalışmada sistem EDC/NHS ile çapraz bağlanmış ve karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Şişme, porözite, hücre uyumluluğu (sitokompatibilite) ve hücre tutunması açısından incelendiğinde sistemin yara iyileşmesinde kullanılmaya uygun olduğu değerlendirilmiştir. Bir başka çalışma, HA ve CS ile karboksimetil Ch'ın plateletçe zengin plazma (PRP) taşınımı için kullanımı ve bu sistemin EDC/NHS ile çapraz bağlanmasını çalışıp sistemin kıkırdak yenilenmesindeki etkinliğini adipotik mezenkimal kök hücreler (aMKH) üzerinde incelenmiştir [50]. PRP ve hidrojel yapıyı oluşturan iskele elemanlarının sinerjik etki göstererek aMKH'leri kondrojenik soya farklılaşmaya tetiklediği bulunmuştur. Anlaşıldığı üzere, bu çalışma yara iyileşmesine değil hidrojel yapının kök hücre farklılaşması üzerine etkisine yoğunlaşmıştır.

Görüldüğü gibi literatürde yer alan çalışmalar Ch, HA ve CS'nin kullanımını içerse de bunlardan hiçbiri bahsi geçen üç polimerin zincir formundayken genipinle bağlanacak şekilde tasarlanmamıştır. Daha önce bahsi edilen çalışmalar CS'nin NP formunda kullanımını [49], karboksimetil Ch kullanımıyla birlikte genipin yerine EDC/NHS çapraz bağlayıcısının kullanımını incelemiştir [50]. Çalışmalardan biri Ch'ın genipinle çapraz bağlandığı bir yapının oluşturulmasını ortaya koymuş olsa da bu çalışmada yapı oluşturulurken jelatin biyopolimeri kullanılmıştır [51].

2.14 AMP'ler ve İlaç Taşıma Sistemleri

AMP'lerin ilaç taşıma sistemlerine yüklenmesi yeni bir yaklaşım değildir. Şu ana dek doku mühendisliği ürünleriyle AMP'lerin kontrollü salımına ilişkin birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin bir çalışma; HA, aljinat ve kolajenden oluşan bir iskelenin Tet213 AMP'inin taşınması için yara örtüsü amacıyla kullanımını konu almıştır [188]. Bu sistemin antibakteriyel etkisi *Escherichia coli,* MRSA ve *S. aureus* üzerinde test edilmiştir. Tet213'ün hızlı salımı sayesinde yara iyileşmesinin kolajen birikimi ve anjiyogenezle desteklendiği ortaya konmuştur. Bir başka çalışmada ise nizin peptidi ve CS ile nanojel oluşturulan sistem test edilmiştir [189]. Sonuçlar bu sistemin nizinin kontrollü salımını gerçekleştirebildiği ve

MRSA'ya etkili olduğu yönünde bulunmuştur. CS ile yapılan bir diğer çalışmada CS, dekstran sülfat ve aljinik asitle birlikte kullanılmış, katman katman üretilen ince film sistem, bir başka AMP olan ponerisin G1 salımında test edilmiştir [190]. Çalışma, bu polianyonların kullanımının *S. aureus* biyofilm üretimini engellediğini, yara iyileşmesiyle ilgili olan insan fibroblastları (NIH 3T3) ve insan kordon kanı endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde biyouyumlu olduğunu göstermiştir.

İyi bilinen bir biyopolimer olan Ch, AMP'lerin taşınmasında ilaç taşıyıcı sistemin bir parçası olarak çokça çalışılmıştır. Bu çalışmalardan birkaçı, *E. coli*'ye karşı gelişmiş minimum inhibisyon konsantrasyonuna (MİK) sahip olan protamin yüklü Ch NP'lerin kullanımını [191], *Stapylococcus epidermidis*'e karşı uzatılmış antibakteriyel aktivite ve fare embriyonik fibroblastlarına (BALB/3T3) karşı düşük toksisite gösteren temporin yüklü Ch NP'lerin kullanımı [192], memeli hücrelerine düşük toksisite gösteren ve LL-37 ile NO'in *in vitro*da kontrollü salımını sağlayan Ch/poli-γ-glutamik asit kompozit mikropartiküllerinin kullanımını [193] içermektedir.

3
DENEYSEL YÖNTEM

3.1 Deney Malzemeleri

Hyaluronik asit (HA), kitosan (Ch), glasiyal asetik asit (AcAc), sodyum hidroksit (NaOH), asetonitril (ACN), formik asit (FA), dimetil sülfoksit (DMSO) ve tripsin-EDTA Sigma Aldrich'ten; kondroitin sülfat A (CS) Alfa Aesar'dan; genipin Cayman Chemicals'tan; etanol Tekkim'den; *Dulbecco's modified Eagle's medium*-12 (DMEM/F-12), fetal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve 4′,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Capricorn'dan; MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] Biomatik'ten, Müller-Hinton broth (besiyeri) ve Müller-Hinton agar Difco'dan ve HF-18 peptidi de GenScript'ten satın alındı. Distile su (dH_2O), Merck Milli-Q su arıtma sisteminden elde edildi. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 67101) Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan, L929 fare fibroblast hücre hattı da (ATCC CCL-1) Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan edinildi.

3.2 Karışımın Tasarımı ve Çapraz Bağlı İskelenin Optimizasyonu

İskeleler, literatürde yer alan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak dondurarak kurutma yöntemiyle elde edildi [194]. 3B hidrojel iskele üretilebilmesi amacıyla anyonik ve katyonik polimerlerin bileşimi ve genipinle çapraz bağlanmaları için uygun olan optimal karışım bileşimi araştırıldı.

Önce %1 AcAc (v/v) kullanılarak 70 °C'de yüksek hızlı manyetik karıştırma altında %3 Ch (w/v) çözeltisi hazırlandı. Benzeri şekilde 0.5 mg/ml HA (w/v) çözeltisi %1 AcAc (v/v) ile hazırlandı. 0.5 mg/ml CS (w/v) çözeltisi de dH_2O ile hazırlandı. Son olarak 1 mg/ml genipin çözeltisi saf etanolle hazırlandı ve çapraz bağlamadan önce pH'ı 13'e ayarlandı. Tüm çözeltiler Tablo 3.1'e göre birleştirildi.

Tablo 3.1 Optimizasyon koşulları

Grup	Ch	HA	CS	G	°C	Yıkama işlemi
1	90 mg	-	-	1 mg	4 °C	-
2	90 mg	-	-	1 mg	RT	-
3	90 mg	-	-	1 mg	50 °C*	-
4	90 mg	1 mg	-	-	-	-
5	90 mg	0.75 mg	-	-	-	-
6	90 mg	0.5 mg	-	-	-	-
7	90 mg	0.25 mg*	-	-	-	-
8	90 mg	0.1 mg	-	-	-	-
9	90 mg	0.25 mg	1 mg	-	-	-
10	90 mg	0.25 mg	0.75 mg	-	-	-
11	90 mg	0.25 mg	0.5 mg	-	-	-
12	90 mg	0.25 mg	0.25 mg*	-	-	-
13	90 mg	0.25 mg	0.1 mg	-	-	-
14	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	1 mg	-	-
15	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.75 mg	-	-
16	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg*	-	-
17	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.25 mg	-	-
18	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.1 mg	-	-
19	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	dH_2O (12 sa)
20	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	1 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)
21	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.5 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)
22	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.1 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)*
23	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.05 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)
24	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.01 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)
M	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.1 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)
MP[a]	90 mg	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	50 °C	0.1 N NaOH (2 sa)→dH_2O (12 sa)

Asteriks (*) işaretli değerler, bulunan optimal değerleri işaret etmektedir. [a]: MP, 200 μg peptid/ml iskele karışımı eklemesiyle oluşturulmuştur. G: genipin

Çözeltiler elde edildikten sonra optimizasyonun ilk aşaması çapraz bağlama sıcaklığının belirlenmesi üzerine gerçekleştirildi. Bu çalışmada 3 grup 90'ar mg Ch üzerine 1'er mg genipin eklendi. Gruplardan biri 4 °C'de, diğeri oda sıcaklığında (RT), sonuncusu da 50 °C'de inkübe edildi (Tablo 3.1, Grup 1-3). Peşi sıra gerçekleştirilen tüm çalışmalarda, aksi belirtilmedikçe, buradan elde edilen sonuçlara göre karar verilen inkübasyon sıcaklığı uygulandı.

Optimizasyon çalışmalarının ikinci basamağında optimal HA miktarına karar verildi. Bu amaçla değişik miktarlarda HA, sabit miktardaki Ch'nin üzerine karıştırma altında eklendi (Tablo 3.1, Grup 4-8). Sonuçlar, karışım içinde çökelti olup olmamasına göre gözlemsel olarak değerlendirildi ve çökelti oluşturmayan maksimum HA miktarına karar verildi.

Optimizasyon çalışmalarının üçüncü basamağında optimal CS miktarına karar verildi. İkinci aşamada yapılana paralel şekilde değişik miktarlarda CS, yine ikinci aşamada belirlenmiş sabit miktardaki Ch ve HA'nın üzerine karıştırma altında eklendi (Tablo 3.1, Grup 9-13). Polimer çözeltileri CS eklemesinden önce ve sonra 20'şer dk karıştırıldı. Sonuçlar, karışım içinde çökelti olup olmamasına göre gözlemsel olarak değerlendirildi ve çökelti oluşturmayan maksimum CS miktarına karar verildi.

Optimizasyon çalışmalarının dördüncü basamağında optimal genipin miktarına karar verildi. Önceki aşamalarda belirlenen miktarlarda Ch, HA ve CS üzerine değişen miktarlarda genipin eklenerek karışım ilk aşamada belirlenen inkübasyon sıcaklığında çapraz bağlandı (Tablo 3.1, Grup 14-18). Daha önceki gibi, her bir polimer eklenmeden önce çözeltiler 20 dk karıştırıldı ve homojen polimer karışımları elde edildi. Genipin eklendikten sonra 30 dk daha karıştırılıp yüksek molekül ağırlıklı poli(etilen) kaplarda kalıplandı, optimal inkübasyon koşulunda çapraz bağlama reaksiyonunun gerçekleşmesi beklendi. Sonuçlar, jelleşme ve renklenmeye göre gözlemsel olarak değerlendirilerek optimal genipin miktarına ve sonuçta optimal iskele bileşimine karar verildi.

Optimal iskele bileşiminin belirlenmesini takiben çeşitli yıkama işlemleri araştırıldı. Optimal iskele karışımı 24 saat inkübasyonla çapraz bağlanarak jelleşme gerçekleştirildi. Ardından elde edilen jeller dH_2O ve çeşitli konsantrasyonlarda NaOH çözeltilerine maruz bırakılarak yıkandı (Tablo 3.1, grup 19-24). Örnekler -20 °C'de dondurulup liyofilize edildi. Optimal bileşime sahip olan ve uygun şekilde yıkama işlemine tabi tutulan grup M olarak adlandırıldı ve bu grup ileri karakterizasyonlarda ve peptid yüklü iskele oluşturulmasında kullanıldı. Son olarak genipin kullanılmayan polimer karışımı Mix olarak adlandırıldı, karakterizasyonlar için liyofilize edildi.

3.3 HF-18 Peptidi Yüklü İskelenin (MP) Üretimi

Optimal iskele bileşiminin tespitinden sonra, dH_2O ile 1 mg/ml HF-18 çözeltisi hazırlandı. Grup 22'de olduğu gibi, Ch çözeltisi içine sırayla HA ve CS çözeltileri eklendi ve iyice karıştırıldı. Ardından her bir ml iskele karışımı için 200 μg peptid eklenerek (yani 200 μg peptid/ml iskele karışımı) 5 dk daha karıştırıldı. Bu basamağı takiben optimum miktarda genipin eklendi. M'den farklı olarak peptidin degredasyonunu engellemek için RT'de jelleşme ve renklenme görülene kadar inkübe edildi. Elde edilen jel, M'de yapıldığı gibi yıkanıp liyofilize edildi.

3.4 M ve MP'nin Karakterizasyonu

3.4.1 Renklenme ve Faz Ayrımı Gözlemleri

Jelleşme ve kompleks oluşumuyla ilgili ilk gözlemler, cihaz kullanmaksızın makroskopik gözlemlerle gerçekleştirildi. Renklenme, genipin çapraz bağlama reaksiyonunun takibinde belirteç olarak kullanıldı [25, 126, 195]. Mavi renk oluşumu, genipinle çapraz bağlamanın başarılı olarak gerçekleştiği yönünde yorumlandı. Bu gözlem, kalıpların ters çevrilmesiyle jelleşmenin kontrolü yoluyla desteklendi. Ayrıca birbiriyle elektrostatik kompleks oluşturan pozitif ve negatif yüklü polimerlerin varlığı da gözlemsel olarak belirlendi. Kompleks oluşumu, açık sarı polimer çözeltisi içinde mat beyaz ipliksi çökeltiler halinde ayırt edildi ve bu durumun ortaya çıktığı gruplar deneyden çıkarıldı.

3.4.2 Şişme Çalışmaları

M'nin şişme kapasitesi, çeşitli pH değerlerinde test edildi [196]. Kuru iskeleler hassas teraziyle tartıldı (W_d). Ardından kütlesi bilinen bu iskeleler pH:5, 7.4 ve 9'daki PBS çözeltilerine daldırılıp ıslak kütleleri tartıldı (W_{pH}). Yüzde şişme oranları, (3.1)'e göre hesaplandı.

$$Şişme\ (\%) = \frac{(W_{pH} - W_d)}{W_d} \times 100 \qquad (3.1)$$

3.4.3 Yüzeydeki Fonksiyonel Grupların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometri Yöntemiyle (FTIR) Tayini

Liyofilize Mix, M ve MP ile HF-18, Ch, HA ve CS, yüzeydeki fonksiyonel grupları açısından Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FTIR) yöntemiyle analiz edildi. Zayıflatılmış toplam yansıma (*attenuated total reflectance*, ATR) kristaliyle donatılmış olan FTIR spektrofotometresinde (IR Prestige, Shimadzu) 4000-700 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte alınan 16 taramanın çakıştırılmasıyla elde edilen spektrumlar yorumlanarak [197] çapraz bağlamanın etkisi ve peptid yüklemenin etkisi ortaya kondu.

3.4.4 Taramalı Elektron Mikroskopisiyle (SEM) Morfolojik Analiz

100 kPa vakum altında 15 kV voltaj uygulanarak, taramalı elektron mikroskopuyla (*scanning electron microscopy*, SEM) (Quattro ESEM, Thermo Scientific) çeşitli büyütmelerde mikrograflar elde edildi. İskelelerin morfolojik yapısı, mikrograflar yorumlanarak ortaya kondu [198].

3.4.5 Termogravimetrik Analiz

Mix, M ve MP'nin ısıl yanıtları, termogravimetrik analizle (TGA) incelendi [50]. Bunun için belli bir miktar liyofilize iskele cihaza kondu ve N_2 ortamında örnek bölmesinin sıcaklığı 10 °C/dk hızla 800 °C'ye çıkarıldı (EXSTAR 6000 TG/DTA, Seiko). Örneklerin ısıl yanıtları termogram halinde elde edildi ve termogramlar karşılaştırılarak çapraz bağlamanın ve peptid eklemenin etkileri yorumlandı.

3.4.6 MP'den Peptid Salımı

MP'den HF-18'in salımı, Çalman vd. çalışmasında (2019) bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi [199]. Asidik ve nötral koşullardaki salımın karşılaştırılabilmesi için iki adet MP tartıldı ve iki farklı santrifüj tüpüne alındı. Tüplerden birine 1.5 ml pH:5, diğerine de 1.5 ml pH:7.4 PBS eklendi. Tüpler 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi ve belirli zaman aralıklarında salım ortamı aspire edilip taze PBS eklenerek salım örnekleri toplandı. HF-18 salımı LC-ESI-MS (LC-MS 2010 EV, Shimadzu) cihazında, 25 cm uzunluk, 15 μm partikül çapı ve 6.0 mm iç çapa sahip C18 kolonla (Shim-pack MRC-ODS, Shimadzu) gradyan elüsyon yöntemine göre ayrılarak tespit edildi. Elüsyon, elüent A'dan (su,

%0.1 (v/v) FA) elüent B'ye (ACN, %0.085 (v/v) FA) 0.5 ml/dk akış hızıyla oluşturuldu. Elüsyon programı Tablo 3.2'ye göre oluşturuldu.

Tablo 3.2 LC-MS cihazında kullanılan elüsyon programı

Zaman (dk)	Modül	Aksiyon	Değer (%)
0.01	Pompa	B konsantrasyonu	5
3.00	Pompa	B konsantrasyonu	5
25.00	Pompa	B konsantrasyonu	80
30.00	Pompa	B konsantrasyonu	5
30.01	Pompa	B konsantrasyonu	5
35.01	Kontrolör	Dur	

Salım ortamından HF-18'in tespit edilebilmesi için öncelikle çeşitli konsantrasyonlarda HF-18 çözeltileri hazırlanarak cihazın UV detektörüyle analiz edildi ve 280 nm'de kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlarda ölçülen alıkonma zamanı (t_R) ve t_R'de ortaya çıkan pikin alan ölçümüyle de kalibrasyon eğrisi elde edildi. Salım ortamına ait kromatogramlar da benzeri şekilde elde edildi ve kromatogramlarda görülen piklerin alanları kalibrasyon eğrisine göre yorumlanarak t anında salınan HF-18 miktarı tespit edildi.

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında L929 fare fibroblast hücreleri kullanıldı. %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM/F-12 büyüme besiyerinde, koşulları 37 °C, %5 CO_2 ve %95 neme ayarlanmış olan bir inkübatörde (BD260, BINDER) hücrelerin tek katmanlı (*monolayer*) üretimi gerçekleştirildi. Hücreler kültür kabının %70-80'ini kapladığında %0.25'lik tripsin-EDTA ile kültür kabından kaldırıldı, hücrelere tripan mavisiyle muamele edildi ve Thoma lamında sayıldı [200]. Çalışmalar için gerekli olan hücre miktarına göre yeni bir kültür kabına, uygun miktar büyüme besiyeriyle ekim yapıldı ve analizler için kullanıldı.

3.5.1 Biyouyumluluğun Tespiti

M ve MP'nin biyouyumluluğu EN ISO 10993-5:2009 [201] yönergeleri takip edilerek MTT analizi ile dolaylı yöntemle tespit edildi [202]. Test öncesi kontaminasyonun engellenmesi amacıyla iskeleler 1 saat UV ışıkla sterilize edildi. Dolaylı yönteme göre belli bir miktar iskele büyüme besiyerine daldırılıp 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda iskele ortamdan alındı ve ekstrakt elde edilmiş oldu. Her bir örnek için aynı işlem uygulanarak ekstraktlar elde edildi. Öte yandan, L929 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve gece boyu inkübe edildi. Kuyucuklardaki tüm besiyeri aspire edilerek ekstraktlar kuyucuklara eklendi ve hücreler 24 saat ekstrakta maruz bırakıldı. İnkübasyonu takiben 10 μl MTT çözeltisi (10 mg/ml) kuyucuklara eklendi ve 4 saat karanlıkta inkübasyon sağlandı. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için 100 μl DMSO/kuyucuk eklendi. Her bir kuyucukta oluşan formazan kristallerinin maksimum absorbans verdiği 570 nm'de UV-görünür bölge spektroskopisiyle absorbans okumaları gerçekleştirildi (Multiskan™ FC, Thermo Scientific). Kontrol grubunda hücreler ekstrakt yerine büyüme besiyerine maruz bırakıldı. Kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek diğer grupların hücre canlılıkları denkleme göre ortaya kondu (3.2). Deneyler 3 kere tekrarlanarak standart sapma hesaplandı.

$$Hücre\ canlılığı\ (\%) = \frac{A570_{örnek}}{A570_{kontrol}} \times 100 \qquad (3.2)$$

3.5.2 Yara İyileşme Kapasitesinin Tespiti

İskelelerin sağlayabileceği yara iyileşme kapasitesinin ortaya konması için hücre göçü analizi gerçekleştirildi [200, 203, 204]. Bu değerlendirme için L929 hücreleri 24 kuyucuklu kaplara 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Büyüme besiyeriyle hücreler 24 saat inkübe edilerek kültür kaplarına yapışmaları sağlandı. 24 saat sonunda, pipet ucuyla çizgi şeklinde kazıma işlemi yapılarak hücreler yüzeyden kaldırıldı ve yara modeli oluşturuldu. Yapışmayan ve yüzeyden kaldırılan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve hücreler iskele ekstraktlarıyla inkübe edildi. Ekstrakt yerine büyüme besiyeriyle muamele edilen grup kontrol grubu olarak belirlendi. Hücrelerin yara bölgesine göçü ters

mikroskopla (CKX41, Olympus) 96 saat boyu takip edildi. Her 24 saatte bir fotoğraflama yapıldı. Ayrıca fotoğraflar ImageJ yazılımı kullanılarak (Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH) incelenip yara alanının kapanması yüzdesel olarak aşağıdaki denklemle (3.3) hesaplandı.

$$Yara\ İyileşmesi\ (\%) = \frac{(G_0 - G_t)}{G_0} \times 100 \qquad (3.3)$$

3.5.3 Hücre Tutunması Çalışmaları

Hücre tutunması (adezyon) çalışmaları için, bisturi yardımıyla iskelelerin 0.5 mm'lik kesitleri alındı ve UV ışınla 1 saat sterilize edildi. Bu kesitler 3 saat boyunca büyüme besiyerine daldırıldı ve 48 kuyucuklu kültür kaplarına alındı. $2x10^4$ hücre/iskele olacak şekilde her bir iskeleye hücre ekildi. Hücrelerin tutunması için 3 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 500 µl büyüme besiyeri eklendi ve kültür kapları 24, 48 ve 72 saat boyu inkübe edilip hücre tutunması ters mikroskopla (CKX41, Olympus) takip edildi ve fotoğraflandı.

Belirlenen zaman aralıkları sonunda DAPI boyamasıyla hücre yoğunluğu ve morfolojileri floresan mikroskopla görüntülenerek değerlendirildi [205, 206]. Bu amaçla önce kuyucuklardaki besiyeri aspire edilip iki kez DPBS ile yıkandı. Yüzeye tutunmuş hücrelere 500 μl metanol uygulanıp -20 °C'de 5 dk muamele edilerek hücreler fikse edildi. Ardından 3 kere DPBS ile yıkanıp 1 μg/ml'lik DAPI çözeltisiyle karanlıkta 15 dk muamele edildi. İnkübasyon sonunda bağlanmamış boya kuyucuklardan aspire edilerek uzaklaştırıldı ve iskeleler 2 kere DPBS ile yıkandı. Hücrelerin yoğunluğu, düzenlenmesi ve morfolojileri floresan mikroskopla incelenerek fotoğraflandı.

3.6 Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

M ve MP'nin *S. aureus* ve MRSA üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri ASTM E2149-13a standardında [207] Li vd. çalışmasına göre modifikasyonlar yapılarak incelenmiştir [208]. Kısaca, 0.2±0.02 absorbansa (1.5-3.0 $x10^8$ koloni oluşturan birim (CFU)/ml'ye karşılık gelir) ulaşan bakteri süspansiyonları, kütleleri bilinen (11.62±0.14 mg) iskele yüzeylerine damlatılıp 37 °C'de ve %90 nemlilikte 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 10 ml Müller-Hinton besiyeri içeren

kaplara alınıp çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de inkübe edilmeye başlandı. Belli zaman aralıklarında bu kaplardan bakteri örnekleri alınıp çeşitli dilüsyonlar yapılarak örnekler Müller-Hinton agara yayıldı, petriler 37 °C'de 24 saat inkübe edilip petri yüzeyinde büyümüş olan CFU miktarı ekipman kullanılmaksızın gözle sayıldı. İskelelerle muamele edilmeyen grup kontrol grubu olarak belirlendi. C_c kontrol hücre sayısını ve C_s örneğin hücre sayısını ifade etmek üzere, antibakteriyel aktivite kontrol grubuna göre logaritmik azalmanın (3.4)'e göre ve öldürme yüzdesinin (3.5)'e göre hesaplanmasıyla ortaya kondu.

$$\log bakteriyel\ azalma = \log(C_c) - \log(C_s) \tag{3.4}$$

$$Azalma\ (\%) = \frac{(C_c - C_s)}{C_c} \times 100 \tag{3.5}$$

4
BULGULAR

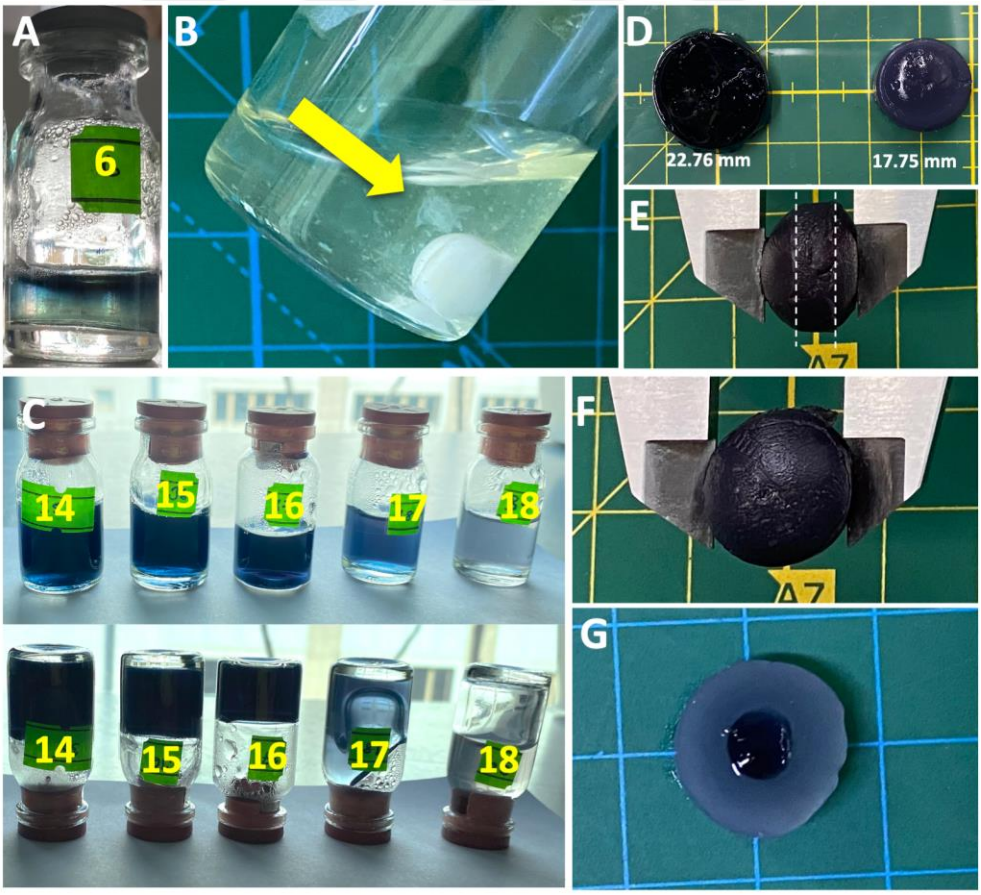
4.1 Karışım Tasarımı ve Çapraz Bağlı İskelenin Optimizasyonu

Mevcut tez çalışmasında doku mühendisliğinin bir elemanı olarak kullanılmak üzere bir ilaç taşıma sisteminin üretilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Ch, HA ve CS değişik oranlarda karıştırılıp genipinle çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlamada en önemli parametrelerden biri çapraz bağlama sıcaklığıdır. Yapılan deneylerde, çapraz bağlama sıcaklığı arttıkça çapraz bağlama hızının da arttığı gözlenmiştir. 50 °C'de çapraz bağlanan Grup 3'ün 24 saat sonunda diğer gruplara göre daha çok jelleşme, sertleşme ve renklenme gösterdiği gözlenmiştir. Renklenme, genipinle çapraz bağlamanın önemli karakteristiklerinden biridir. Bazik pH değerlerinde genipin molekülleri aldehit gruplarını oluşturacak şekilde halka açılması reaksiyonu verip kendi kendilerine polimerize olurlar ve bunun ardından da aldol kondenzasyonuna uğrarlar. Ch gibi primer amin içeren bir bileşenle etkileştiklerinde terminal aldehit grupları Schiff bazı reaksiyonu verir. Daha sonra açığa çıkan oksijen radikaliyle tetiklenen polimerizasyon sonucunda mavi renk oluşumu meydana gelir [25, 126, 195]. Bu durum, genipin çapraz bağlama reaksiyonlarında herhangi bir cihaz kullanılmaksızın reaksiyonun takip edebilmesini sağlar. Bu çalışmada da Grup 3'ün RT ve 4 °C'ye kıyasla en hızlı renklenmeyi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca renklenmeyle eşzamanlı olarak Ch çözeltisinin de jel formuna dönüştüğü ve bu renklenmenin hava-çözelti ara yüzünden başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1A). Daha önce de açıklandığı gibi genipin polimerizasyonu oksijen radikaliyle tetiklenen polimerizasyonla sonuçlandığı için bu fenomenin ara yüzeyden başlaması söz konusu olup daha evvel de çalışmalarda raporlanmıştır [51, 209].

Optimizasyon deneylerinin ikinci aşamasında, iskelede kullanılacak HA miktarı belirlenmiştir. Grup 4-6'da çok net bir çökelti oluşumu görülmüş ve bu çökelti karıştırma devam etse de çözünmemiştir (Şekil 4.1B). Bu çökeltinin oluşma

nedeni, pozitif ve negatif yüklü polimer zincirler arasında meydana gelen fiziksel çapraz bağlamadır. Bu yöntem doku iskelesi üretimi için de kullanılan bir yöntemdir [210] ancak çapraz bağlanacak gruplar halihazırda kapandığı için kimyasal çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleşememektedir. Daha evvel de açıklandığı gibi genipin çapraz bağlama reaksiyonu primer amin grupları üzerinden yürümektedir. Eğer Ch ve HA zincirleri arasında fiziksel çapraz bağlama gerçekleşirse genipinle kimyasal çapraz bağlama reaksiyonuna girecek serbest amin grubu azalacağından heterojen bir jel oluşumu meydana gelecektir. Bu durum, polikatyonik Ch ile etkileştirilecek polianyonların sınırının jel heterojenitesi üzerinde etkisi olduğu anlamına gelmektedir. Grup 4-6 böylesi bir heterojenite sergilemiş ve çalışmadan çıkarılmıştır. Homojenite gösteren gruplarda da biyoaktivite gözetilerek en çok miktarda polianyon kullanılması hedeflendiğinden optimal HA miktarı HA*, Grup 7'de olduğu gibi 0.25 mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Optimizasyon deneylerine ait görüntüler

Optimizasyon deneylerinin üçüncü basamağında optimal CS miktarı belirlenmiştir. HA'dakine benzer şekilde, CS de $-SO_4^{2-}$ fonksiyonel grupları nedeniyle polianyon karakterdedir. Sulu ortamda Ch ile etkileşimi HA'daki gibi gerçekleşir ve nötralizasyon reaksiyonu fiziksel çapraz bağlanmayla sonuçlanır. Yapılan deneylerde, Grup 9-11'de kompleks oluşumundan kaynaklanan beyaz çökelti oluşumu gözlenmiş ve heterojen bir karışım elde edilmiştir. Öte yandan Grup 12 ve 13 böyle bir oluşum göstermezken iyi karışmış bir çözelti yapısı ortaya koymuştur. HA'dakine benzer bir mantıkla biyoaktivitesinden en fazla seviyede yararlanmak için optimal CS miktarı CS*, Grup 12'deki gibi 0.25 mg olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon deneylerinin üçüncü basamağında optimal çapraz bağlayıcı miktarı belirlenmiştir. Genipin, primer amin gruplarından çapraz bağlama reaksiyonunu gerçekleştirerek amin grupları arasında çapraz bağ köprüleri kuran homobifonksiyonel bir çapraz bağlayıcıdır. Önceden de bahsedildiği gibi bu reaksiyon ilerledikçe ortaya çıkan mavi renklenmeyle, reaksiyonun takibi mümkündür. Şekil 4.1C'de de görüldüğü gibi Grup 17 ve 18'in yalnızca az bir miktar renklenme gösterdiği görülürken, kalıplar ters çevrildiğinde viskozitesinde az bir miktar artış görüldüğü ancak jelleşmenin tamamlanmadığı anlaşılmıştır. Bu işaretler, yetersiz çapraz bağlanmanın varlığı şeklinde değerlendirilmiştir. Grup 17 ve 18'in aksine, diğer gruplarda mavi rengin net olarak görülmesiyle birlikte kalıplar ters çevrildiğinde çapraz bağlamaya konu edilen polimer karışımının hareket etmediği ve jelleşmenin gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.1C). HA ve CS miktarlarındaki mantığın tersine fazla miktarda çapraz bağlayıcının kullanılmasının önüne geçmek amacıyla optimal genipin miktarı G*, Grup 16'daki gibi 0.5 mg olarak belirlenmiştir.

Yıkama aşamasında NaOH ile muameleden sonra, muamele edilen NaOH çözeltisi konsantrasyonundan bağımsız olarak gözlenen önemli değişikliklerden birisi, üretilen iskelenin renginde meydana gelen değişim olmuştur. Başlangıçta parlak ve transparan mavi renge sahip olan iskelelerin NaOH muamelesinden sonra mat mavi renge döndüğü tespit edilmiştir. Ch çözeltisinde çözücü olarak kullanılan AcAc'in nötralize edilmesi amacıyla NaOH ile yıkama adımında AcAc ile NaOH arasında şu reaksiyon meydana gelmektedir (4.1).

$$CH_3COOH\ (aq) + NaOH\ (aq) \rightarrow CH_3COONa\ (aq) + H_2O \qquad (4.1)$$

(4.1)'den de görüleceği gibi AcAc ile NaOH arasında meydana gelen reaksiyon sonucu sodyum asetat (CH_3COONa) tuzu oluşmaktadır. Literatürde NaOH muamelesi sonunda elde edilen sodyum asetatın mat beyaz renkte olduğu rapor edilmiştir [211]. Bu durum da deneylerde gözlemlenen, iskelenin renginin transparan maviden mat maviye dönüşünü (Şekil 4.1D) açıklar niteliktedir.

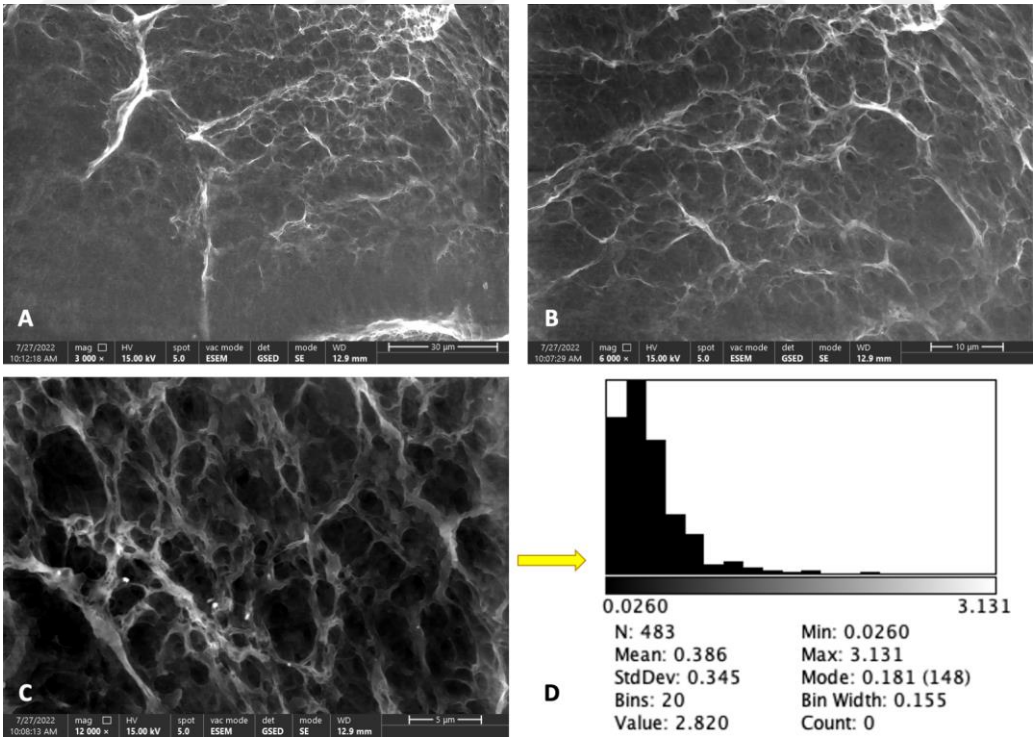
Yıkama basamağından sonra gözlenen bir diğer önemli değişiklik, iskelelerin büzüşmesi şeklinde ortaya çıkmıştır. NaOH muamelesinden sonra iskelelerin, muamele edilen çözelti konsantrasyonuna bağlı olarak ve yukarıda bahsedilen renk değiştirme davranışına ters orantılı olarak değişken hızlarda büzüştüğü görülmüştür. Bu büzüşmenin, NaOH muamelesi ile AcAc'in nötralizasyonundan kaynaklandığı söylenebilir. Bu nötralizasyonla protonlanmış $-NH_3^+$ grupları, $-NH_2$ nötral formuna dönüştürülür. Protonlanmış haldeki $-NH_3^+$ grupları birbirine elektrostatik bir itme kuvveti uygular. Ancak nötralizasyonla bu yük ve itme ortadan kalktığında zincirler birbirine yakınlaşır ve bunun sonucu olarak iskele büzüşür (Şekil 4.1D).

Nötralizasyonla ilgili dikkate alınması gereken önemli bir engel, NaOH konsantrasyonuna bağlı olarak iskelenin şeklinde meydana gelen değişimlerdir. Deneyler esnasında, yüksek konsantrasyonlu baz çözeltisiyle muamele sonrası, kaplarda silindirik şekilde üretilen iskelelerin hızla şekil değiştirerek küresel forma yakınlaştığı görülmüştür (Şekil 4.1E, F). Öte yandan düşük konsantrasyonlu baz çözeltileriyle muamelede silindirik şeklin korunarak büzüşmenin devam ettiği fark edilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda NaOH çözeltileriyle muamele edildiğinde, iskele-baz etkileşimi jelin dış yüzeyinden başlar çünkü NaOH moleküllerinin jele difüzyonu iskeleyle baz çözeltisinin birbirine temas ettiği sıvı-jel ara yüzünden itibaren gerçekleşir. Baz çözeltisinin konsantrasyonu arttıkça yüzeyden difüzyona uğrayan NaOH molekül sayısı, dolayısıyla konsantrasyon gradyanı ve buna bağlı olarak difüzyon hızı da artacaktır. Ancak iskelenin daha yoğun olması nedeniyle difüzyonun burada daha yavaş ilerleyeceği gerçeği nedeniyle, iskelenin iç kısmına moleküllerin nüfuzu aynı hızla gerçekleşemeyecektir. Bu durum iskelenin dış yüzeyden itibaren sıkıştırılmasına ve nihayetinde küresel bir form almasına neden

olmaktadır. Buna karşın, düşük konsantrasyonlu baz çözeltisiyle muamele edildiğinde bu iki güç (difüzyon hızı ile nüfuz etme hızı) arasındaki fark azalacağı için benzeri bir sıkıştırma etkisi ortaya çıkmamıştır. Fakat deneyler sırasında düşük konsantrasyonda baz çözeltisiyle muamelenin, yetersiz nötralizasyonla sonuçlanma riski fark edilmiştir. İskelelerin kesitleri alındığında merkezde nötralize edilmemiş parlak transparan mavi jel kısımların dış tarafında nötralize edilmiş mat mavi iskele kısmı ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.1G). Böyle bir durum, uygulamaya yönelik optimizasyonun önemini ortaya koyar niteliktedir.

4.2 Morfolojik Gözlemler

SEM mikrografları incelenerek iskelenin morfolojik yapısı yorumlanmıştır. Bu görüntüler, sürekli ve birbirleriyle iyi bağlantılı por yapılarını ortaya koymuştur (Şekil 4.2A, B, C). Bu mikrograflar ImageJ programıyla analiz edilerek elde edilen histogramlarla por çapları incelendiğinde porların nano ve mikro ölçekte dağılım gösterdiği görülmüştür. Histogramlar, popülasyonun 0.026-3.131 μm arasında dağılım gösterdiği ve 0.386 μm ortalama por çapına sahip olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.2D).



Şekil 4.2 SEM mikrografları ve C'de verilen mikrografın analizine ait histogramı

Yara örtülerinin, yaranın doğası gereği sıvı ve gaz geçişine izin vermesi ve hücre çoğalmasını destekleyecek şekilde poröz olması istenir. Por çapına göre iskele, patojenlerin yara bölgesine nüfuzunu, yerleşmesini ve çoğalmasını engelleyebilir, böylelikle iskele patojenlerin canlı dokuya nüfuzuna engel olma özelliği kazanabilir [212]. Literatürle karşılaştırıldığında çalışmayla elde edilen por çaplarıyla benzer çaplarda olan doku iskelesi çalışmalarının olduğu [213-215], öte yandan daha büyük por çapına sahip olan çalışmaların da raporlandığı görülmüştür [216, 217]. Özellikle patojen nüfuzu göz önüne alındığında üretilen iskelenin tercih edilebilir olduğu değerlendirilmiştir.

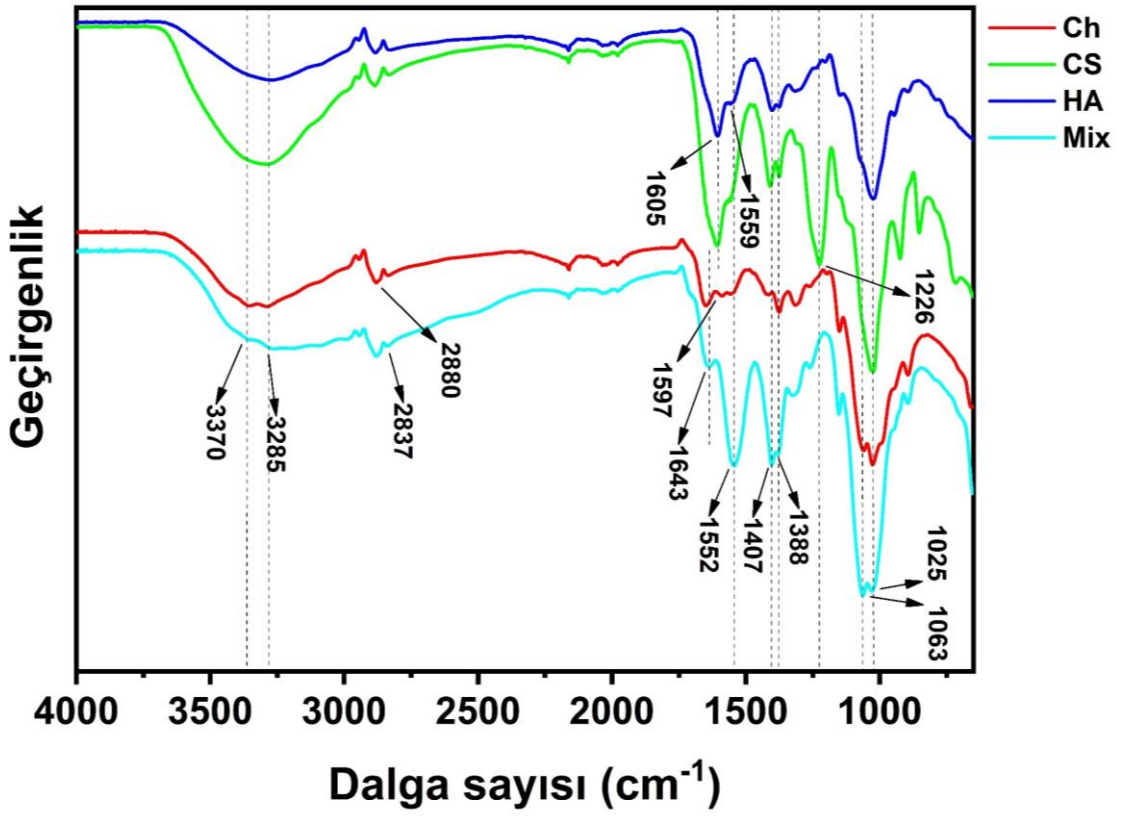
Çapraz bağlama sıcaklığının por çapını doğrudan etkileyen önemli bir parametre olduğu, sıcaklık arttıkça por çapının da arttığı belirtilmiştir [195, 218]. Buradan, arzu edilen por çapı daha küçükse çapraz bağlamanın daha düşük bir sıcaklıkta yapılması gerektiği anlaşılmaktadır. Bu parametre daha kolay değiştirilebilir ve kontrol edilebilir olmasıyla iskeleye ayarlanabilirlik, tasarlanabilirlik özelliği kazandırdığından diğer parametrelere kıyasla daha önemli olduğu değerlendirilmektedir.

4.3 Yüzeydeki Fonksiyonel Grupların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisiyle Karakterizasyonu

Bir doku iskelesinin yüzeyindeki fonksiyonel gruplarını tespit etmek, iskelenin çevresiyle olan ilişkisini tahmin edebilmek açısından önemlidir. Fonksiyonel gruplar, iskelenin işlevlerini de belirleyici etki gösterir. Dahası, herhangi bir prosesin etkisi veya ilerleyişiyle ilgili bilgi de bu grupların analiziyle mümkündür. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında üretilen iskeleler ve iskele bileşenleri, ATR kristali bulunan FTIR spektrofotometresiyle fonksiyonel grupları açısından incelenmiştir.

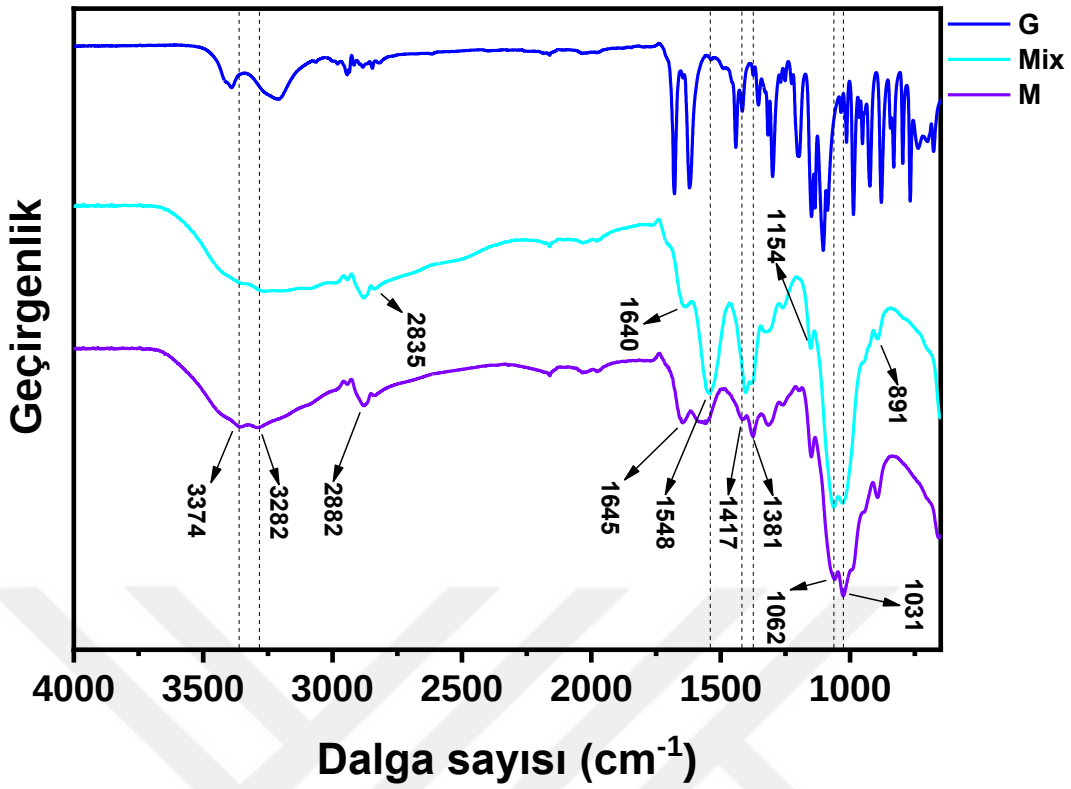
Öncelikle polimer karışımında meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amacıyla Ch, CS, HA ve Mix'in spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3). Mix'in spektrumunda N-H ve O-H gerilmeleri, sırasıyla 3371 ve 3285 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Ch ve Mix spektrumları karşılaştırıldığında, bu bantlardaki genişliğin değişmesi, moleküller arası H bağlarının oluşmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. 2888 ve 2837 cm^{-1}'deki polisakkaritlere özel bantların yanı

sıra, 1597 cm^{-1}'de C=O bandının varlığı görülmüştür. HA ve CS spektrumlarındaki 1605 cm^{-1}'de ortaya çıkan bandın zayıflayarak 1648 cm^{-1}'e kaydığı belirlenmiştir. Bu değişikliklerin, amid I karbonil grubunun Ch ile etkileşiminden kaynaklandığı belirtilmiştir [219, 220].



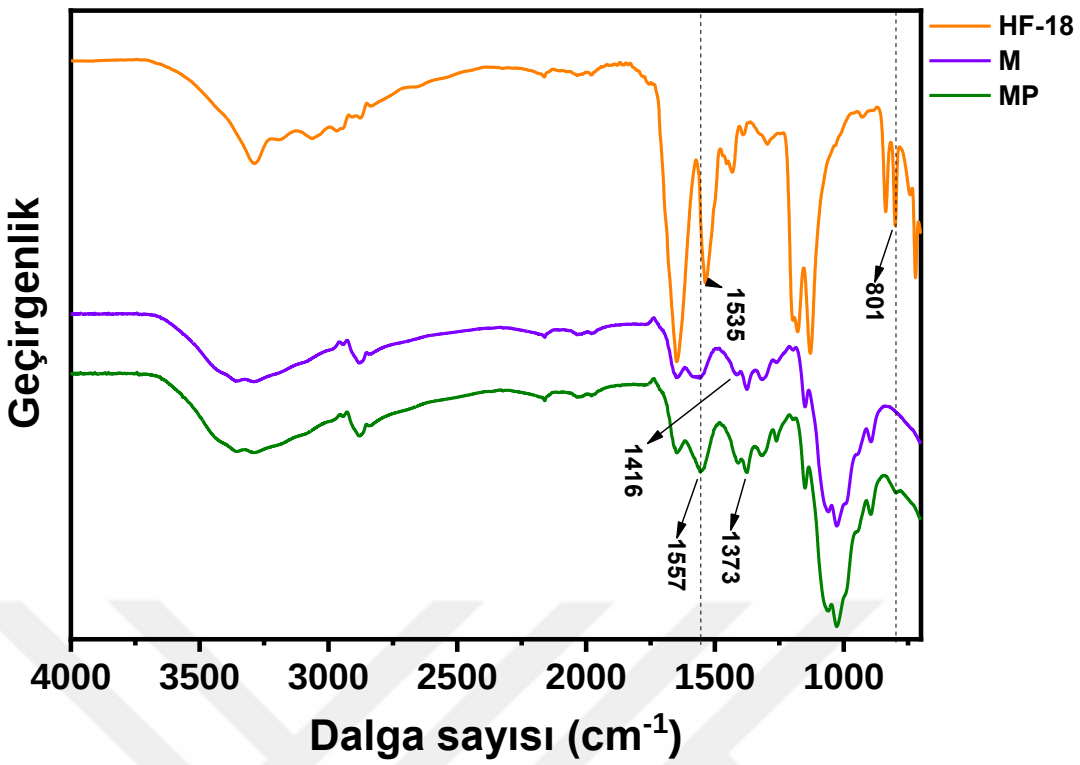
Şekil 4.3 Polimerler (Ch, CS ve HA) ve Mix'e ait FTIR spektrumu

Amid II N-H deformasyon bandı 1552 cm^{-1}'de her üç bileşende de görülmüş, Mix'in spektrumunda da güçlenmiştir. Benzeri değişiklikler 1063 cm^{-1}'deki C-O-C eter bandı için de aynı şekilde gerçekleşmiştir. Polimerik iskelenin oluşumuyla ilgili elde edilen önemli verilerden biri, CS spektrumunun 1226 cm^{-1} dalga sayısına karşılık gelen sülfonil grubuna ait bantta meydana gelen zayıflamadır [221]. Ayrıca 3650-3000 cm^{-1} dalga sayısında görülen -OH bandının da karakterini kaybederek adeta HA, CS ve Ch spektrumlarında ilgili bölgelerin bileşkesine yakınsayarak 3370 ve 3285 cm^{-1}'de primer amin bantlarını ortaya çıkardığı açıkça görülmektedir. Tüm bu bulgular literatürle uyumlu olup [220] Ch, HA ve CS arasındaki etkileşimlerin fonksiyonel grupları üzerinden gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. Özellikle 1605 ve 1226 cm^{-1} dalga sayılarındaki bantlarda meydana gelen kaymalar, moleküller arası etkileşimlere önemli birer delildir [220].



Şekil 4.4 Genipin, polimer karışımı Mix ve M'ye ait FTIR spektrumu

Şekil 4.4'te görülen spektrum, çapraz bağlamanın etkisini ortaya koymaktadır. Genipin spektrumunda 3400, 3100, 1625, 1600 ve 1062 cm^{-1} dalga sayılarında sırasıyla; -OH grubu, aromatik C-H gerilmesi, karboksimetil grubundan kaynaklanan karbonil grubu ve C=C çifte bağı, son olarak da C-O-C eter bağına ait bantları göstermiştir. M spektrumunda primer amin bölgeleri 3374 ve 3282 cm^{-1} dalga sayılarında varlığını korumuştur. Ayrıca hem M hem de Mix spektrumlarında monosakkarit halkasına ait C-H düzlem dışı bükülme 891 cm^{-1}'de görülmüştür. Çapraz bağlamadan sonra 1548 cm^{-1} dalga sayısında amid II'ye ait N-H deformasyon bandının genişlediği ve sola doğru kaydığı görülmüştür. Bu bandın zayıflaması ve kayması, primer amin gruplarının genipindeki karbona nükleofilik atak yapması ve bunun neticesinde tersiyer amin gruplarının oluşması nedeniyledir [222]. M'nin spektrumunda $-COO^-$ grubuna karşılık gelen 1381 cm^{-1}'deki bandın, HA ve CS'deki karboksilik asit gruplarının katkısıyla daha da şiddetlendiği görülmüştür. Ayrıca 1031 cm^{-1}'de C-O gerilmesinden kaynaklanan bandın da çapraz bağlamadan sonra güçlendiği görülmüştür. Bunun nedeni ise genipin çapraz bağ köprülerinde yeni oluşan $-CH_2OH$ gruplarıdır [51].



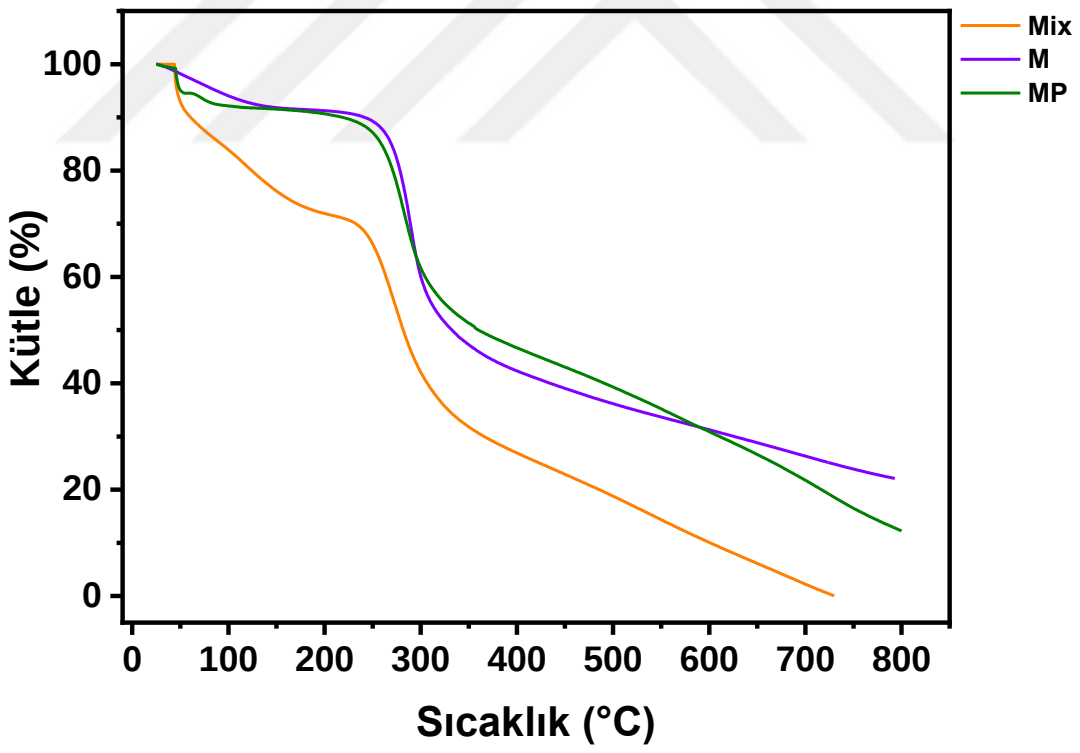
Şekil 4.5 HF-18, M ve MP'ye ait FTIR spektrumu

Hidrojele peptid yüklemesinin etkilerinin ortaya konması için M, MP ve HF-18 spektrumları Şekil 4.5'te karşılaştırılmıştır. HF-18'in spektrumunda, 1650 cm^{-1}'de amid I C=O gerilmesine, 1535 cm^{-1}'de amid II N-H deformasyonuna, 3285 cm^{-1}'de N-H gerilmesine, 801 cm^{-1}'de $-NH_3^+$ bükülmesine ait titreşim bantları görülmüştür. 2750 ve 3250 cm^{-1} dalga sayıları arasında H bağlarından kaynaklanan bandın varlığı gözlemlenmiştir. Çapraz bağlama reaksiyonu peptidlerin primer aminleri üzerinden gerçekleştiğinden, çapraz bağlama sonrası primer amin bantlarının şiddetinde bir azalma meydana gelmelidir. Ancak mevcut deney planında peptid eklenmesine yani çapraz bağlamaya katılacak primer amin miktarında artış olmasına karşın genipin miktarı sabit olduğundan, çapraz bağlama sonrası spektrumda primer amin bantlarının görülmesi ve şiddette artış meydana gelmesi beklenti dahilindedir. MP spektrumu incelendiğinde gerçekten de 1557 cm^{-1}'de çapraz bağlanmamış primer amin bantlarının şiddetinde artış görülmüştür. Ayrıca, 801 cm^{-1}'de bağlanmamış peptidlerin $-NH_3^+$ gruplarına ait bükülme titreşimi bandı MP'nin spektrumunda görülürken M'nin spektrumunda görülmemiştir. 1416 ve 1373 cm^{-1} dalga sayılarındaki bantların şiddetinde meydana gelen artış da peptid çapraz bağlamaya katıldıktan sonra oluşan C-N bağlarına aittir [223]. Her üç

spektrum da değerlendirildiğinde literatürle paralellik göstermekte [51, 221, 223] ve bu spektrumlar polimer zincirlerin birbirleriyle etkileşimlerini ve bu etkileşimlerin fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştiğini ortaya çıkarmaktadır.

4.4 Termogravimetrik Analiz

Mix, M ve MP'nin ısıl karakteristikleri termogravimetrik analizlerle incelenmiştir. Elde edilen termograma göre (Şekil 4.6) iskelelerin bozunma davranışı, 100 °C'de nem çıkışı ile başlamaktadır. Nem kaybının Mix, M ve MP'de sırasıyla %10, %8.76 ve %8.9 olduğu görülmüştür. Termogram incelendiğinde, iskelelerin tek basamaklı bozunma davranışı gösterdiği, ana bozunmanın 200-400 °C arasında meydana geldiği gözlenmiştir. Sıcaklık 400 °C'ye ulaştığında nem çıkışı ve zincir bozunmaları nedeniyle kütlece bozunma Mix'te %74.2, M'de %56.5 ve MP'de %53.5'ye ulaşmıştır. Sıcaklık 800 °C'ye ulaştığında ise M'nin %22.11'i ve MP'nin de %12.23'ü geri kalırken Mix'in neredeyse tamamının bozunduğu görülmüştür.



Şekil 4.6 Mix, M ve MP'ye ait termogram

Mix grubu incelendiğinde çapraz bağlamanın gerçekleşmediği bu karışımın ısıl dayanımının M ve MP'ye kıyasla çok düşük olduğu ve çok daha hızlı bir şekilde

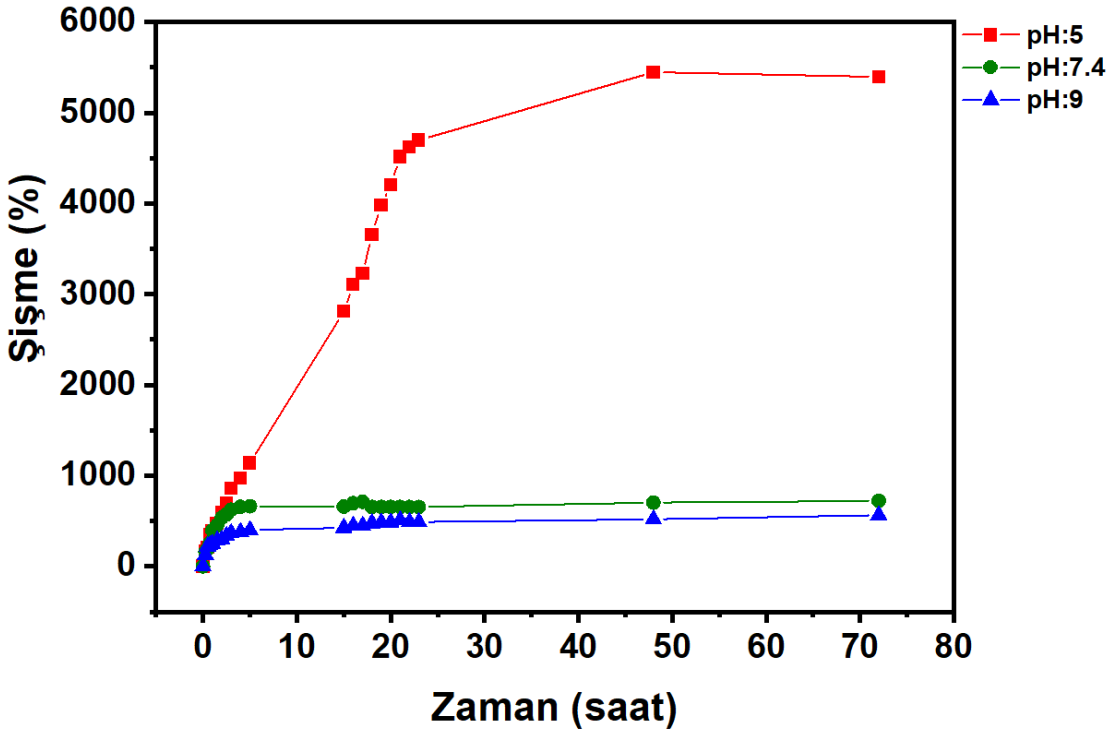
bozunduğu görülmüştür. MP'nin de M'den daha fazla bozunduğu görülmüştür. Bu durum, sabit genipin miktarı nedeniyle görece azalmış çapraz bağlama oranı nedeniyledir. FTIR spektrumlarında da rastlandığı ve yorumlandığı gibi, iskele bileşenleri optimize edilirken sadece Ch'dan kaynaklanan -NH_2 grupları dikkate alınmıştır. Dolayısıyla çapraz bağlanmaya katılmayan peptid MP'de safsızlık olarak davranarak ısıl dayanımın düşmesine neden olmuştur.

M'nin termogramı, CS'nin termogramıyla [187] benzer bir eğilim göstermekle birlikte ana bozunması 200-300 derece arasında gerçekleşen HA ile de benzerlik taşımaktadır [224]. Tüm bu sonuçlar çapraz bağlamanın ısıl dayanıma etkisini kanıtlamıştır ve sonuçlar literatürle benzerlik taşımaktadır [50, 224, 225]. Bu çalışmalar aynı zamanda Ch'ın iki basamaklı bozunma profilini ve çapraz bağlamanın etkisini ortaya koymaktadır.

4.5 Şişme Çalışmaları

Hidrojel yapısında bir iskele, çapraz bağlama derecesine ve yapısındaki fonksiyonel grupların çeşitlerine göre daha az veya çok şişme davranışı gösterir. Bilindiği gibi şişme, hidrojellerin ilaç salım davranışlarını belirleyen önemli bir özelliktir. Bu nedenle hidrojel iskelelerin değişik pH değerlerindeki yanıtlarını incelemek, iskelenin doku mühendisliği elemanı olarak kullanımına dair fikir verir. Herhangi bir organizmada birden çok tampon sistemi bulunur ve bu tamponların pH değerleri organizmanın fizyolojisi ve patolojisi hakkında önemli ipuçları verir. Bu nedenle bu koşullarda iskelenin davranışlarının incelenmesi, iskelenin gerçekçi tepkilerinin anlaşılması adına gereklidir.

Şişme deneyi pH:5, 7.4 ve 9'daki PBS'te gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Deneyin sonuçlarına göre iskeleler asidik koşullarda daha yüksek şişme seviyesi göstermiştir. pH:5'teki şişme oranı kütlece %5446.5 olarak bulunmuştur. Şişme grafiği incelendiğinde 48 saat sonunda plato fazına ulaştığı, bu aşamadan sonra iskelelerin kırılganlaştığı, 72 saat sonunda ise iskelelerin bütünlüklerini tamamen kaybettikleri görülmüştür. Bu nedenle şişme çalışmaları diğer gruplar için de 72 saate kadar yürütülmüştür. pH:7.4 ve 9'daki şişme oranları kütlece sırasıyla %722.6 ve %564.2 olarak bulunmuş, bu iki grup da 4 saatte plato fazına erişmiştir.



Şekil 4.7 Farklı pH'taki ortamlarda M'nin şişme karakteri

Sonuçlar karşılaştırıldığında pH azaldıkça şişme oranının arttığı ortaya çıkmaktadır. Bu durum, Ch'ın sulu çözeltideki davranışıyla açıklanabilir. Ch'ın pK_a değeri, primer amin grupları nedeniyle 6.3-6.5 olarak belirtilmektedir [226]. Bu değer, asidik ortamlarda $-NH_2$ gruplarının $-NH_3^+$ formuna dönüşmesi, yani amin gruplarının protonlanmasıyla zincirlerin net pozitif yüke sahip olması anlamına gelir. Burada polimer zincirlerdeki elektrostatik itme kuvveti, zincirlerin birbirinden uzaklaşmalarına ve su moleküllerinin zincirlerin aralarına dolmasına olanak tanır. Öte yandan, daha yüksek pH'larda amin grupları deprotone olur. Zincirler birbirlerine yaklaşır, su molekülleri zincir aralarına daha az girer ve iskele de suyla şişemez hale gelir.

Nötral ve bazik koşullarda iskelelerin hacmen stabil olmaları, yani boyutlarında dramatik bir değişim meydana gelmemesi de yine aynı etkilerle açıklanabilir. Bilindiği üzere $-SO_4^{2-}$ grupları nedeniye CS'nin pK_a'sı 2.6 [227, 228] ve -OH grupları nedeniyle de HA'nın pK_a'sı 12'dir [229]. Bu değerler göz önüne alındığında, nötral ve bazik koşulların çalışıldığı pH değerleri olan pH:7.4 ve 9'da CS zincirlerinin hep deprotone olduğu, HA zincirlerinin de protone olduğu anlaşılmaktadır. Yani çalışılan pH koşulları bu iki pK_a değerinin arasında kaldığı

için HA ve CS'nin protonlanmasında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bunun yerine ana değişim, Ch zincirlerindeki amin gruplarından ötürü meydana gelmiştir.

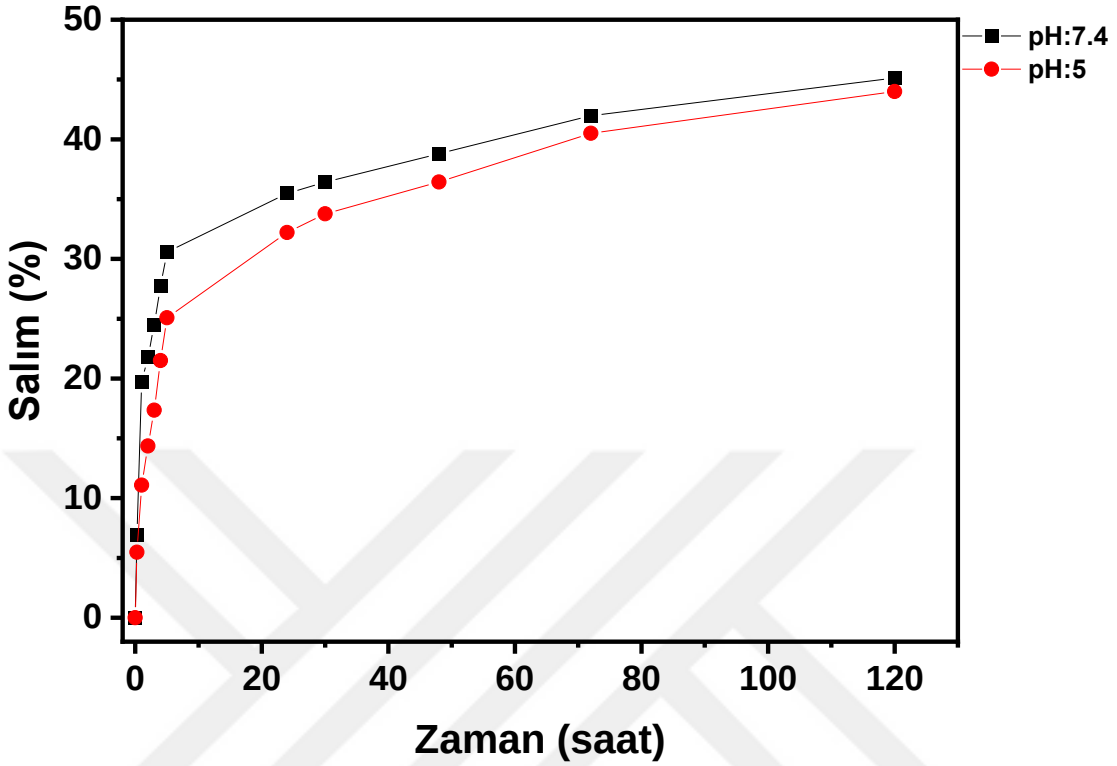
Elde edilen bu pH'a karşı yanıt özelliği, üretilen iskeleyi, anaerobik metabolizmaları ya da ortamda bulunan ölü hücrelerden ötürü asidik bir doğaya sahip olan enfektif dokularda [230] ilaç salımı için son derece uygun bir aday haline getirmektedir. Şişme çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, uygulamaya konu edildiği takdirde bu iskelenin doku asidikken ilacı salacağı, patolojik koşullar geçip doku yeniden fizyolojik koşullara geri döndüğünde ilacı daha düşük oranlarda salacağı düşünülmektedir.

4.6 MP'den Peptid Salımı Çalışmaları

MP'den farklı pH'larda HF-18'in salım profili, LC-MS cihazında sıvı kromatografi yöntemiyle analiz edildi (Şekil 4.8). İlk 5 saatte görülen patlama etkisi (*burst release*), her iki pH'ta da takip eden saatlerde lineer bir salım profiline yerini bırakmıştır. Asidik ve bazik koşullar arasında salımda özellikle salımın ilk saatlerinde belirgin bir fark ortaya çıkmış, asidik koşullarda daha çok peptidin salındığı görülmüştür. Sonuçlara göre ilk 5 saatte pH:5'te %30.56 ve pH:7.4'te %25.08 HF-18 salımı meydana gelmiştir. 120 saat içindeki salımlar ise pH:5 ve 7.4'te sırasıyla %45.12 ve %44 olarak tespit edilmiştir.

Salım koşullarıyla ilgili önemli bir kısıtlama, asidik ortamdaki iskelenin şişmesiyle meydana gelmiştir. Asidik ortamdaki iskelenin nötral ortamdakinden daha çok şişmesi, bu iskelenin daha çok salım ortamını kendi içine hapsetmesi anlamına gelmektedir. Bu durum da salım ortamı hacminin düşmesine neden olmaktadır. Nötral koşullarda ise hacimsel stabilite ve dolayısıyla salım ortamının hacmi korunmuş, HF-18'in salımı da asidik koşullardakine benzer bir profilde ancak daha düşük miktarlarda gerçekleşmiştir. Hacimsel stabilite sayesinde deney boyunca hep aynı miktarda salım ortamı ve dolayısıyla aynı konsantrasyon gradyanı ortama sağlanmıştır. Tüm bu nedenlerle asidik ve nötral koşullar arasındaki fark, yalnızca deneyin başında gözlenebilmiştir. Son olarak, HF-18'in bir kısmı çapraz bağlamaya katıldığı için, salım oranının %100'e ulaşması beklenmemektedir.

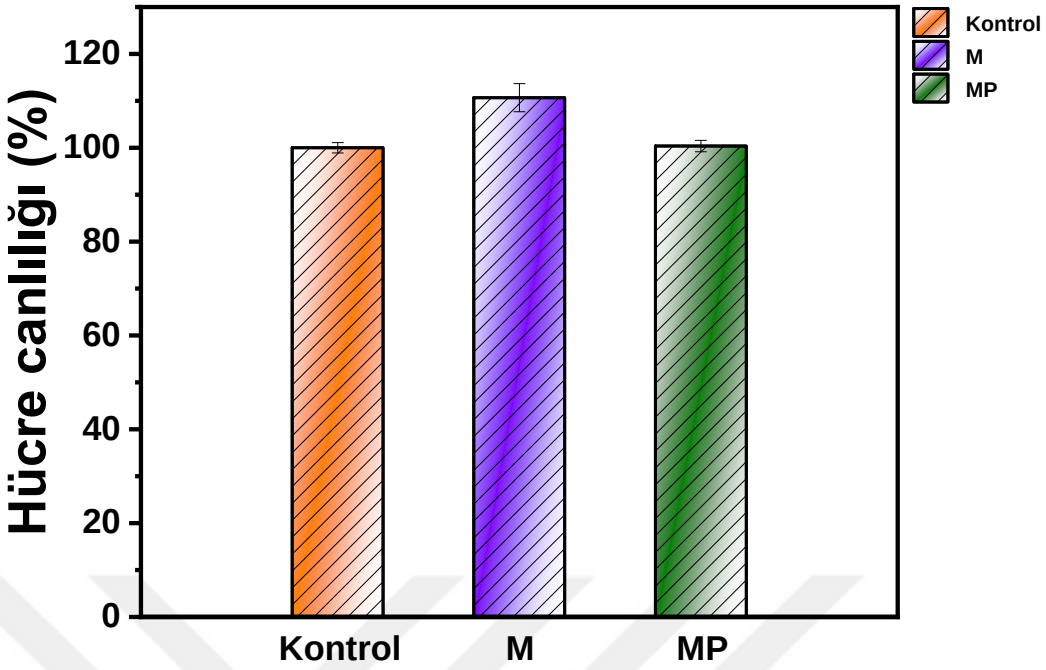
Sonuçlar peptidin uzatılmış bir sürede salımının gerçekleştiğini göstermiş olup diğer kontrollü salım çalışmalarıyla paralellik taşımaktadır [231-233].



Şekil 4.8 MP'den farklı pH'larda HF-18 salım profilleri

4.7 Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi

Şekil 4.9'da M ve MP'ye maruz bırakılan L929 hücrelerine ait fotoğraflar görülmektedir. Açıkça görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyaslandığında iskelelere maruz bırakılan hücrelerin canlılıklarında anlamlı bir değişme meydana gelmemiştir. Ancak M grubunda ortaya çıkan az miktardaki artış, bu iskelenin hücreler üzerinde çoğalmayı destekleyici etkilerini anlatır niteliktedir. Sonuçlar, üretilen iskelelerin hiçbir sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve biyouyumlu özellik gösterdiklerini ortaya koymaktadır.



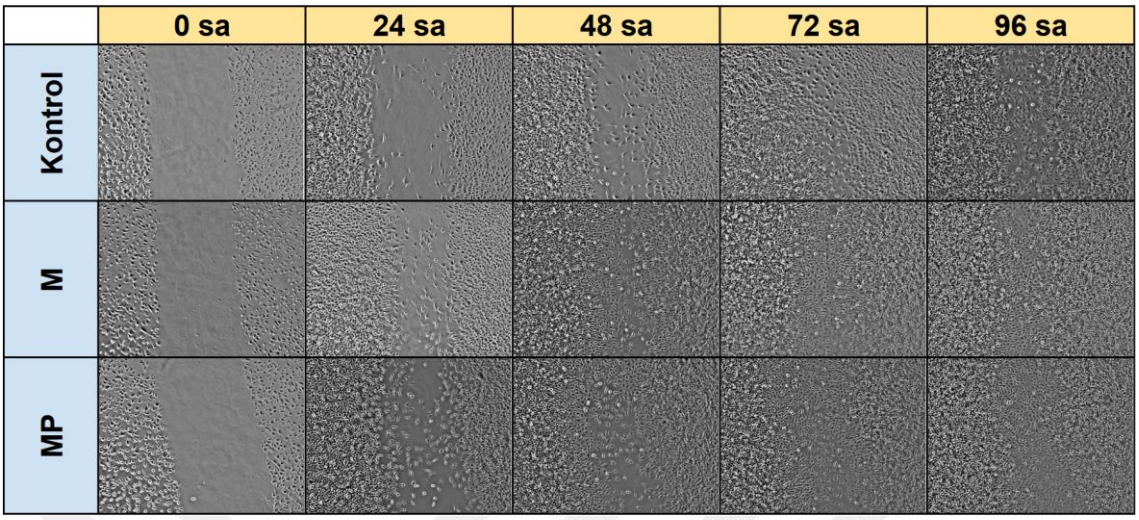
Şekil 4.9 MTT analizi sonunda elde edilen yüzdece hücre canlılıkları

Literatürde yer alan bir çalışmada jelatin ve Ch temelli, genipinle çapraz bağlı bir hidrojele siprofloksasin hidroklorür yüklü jelatin mikroküreleri yüklenmiştir [234]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, 24 saatin sonunda hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olmadığını, grupların canlılığının kontrole oranla az miktarda yükseldiğini ortaya koymuştur. Bunun yerine, 48 saatten sonra sonuçlarda anlamlı farklılıklar oluşmaya başlamıştır. Biyouyumluluk testi daha önce de belirtilen ISO standardına göre gerçekleştirildiğinden, elde edilen ekstraktlarla 24 saatlik inkübasyonun sonucunda hücre canlılığı test edilmiştir. Sonuç olarak üretilen iskeleler biyouyumlu bulunmuş olup sonuçlar literatürle de paralellik göstermektedir [234].

4.8 Yara İyileşme Kapasitesinin Değerlendirilmesi

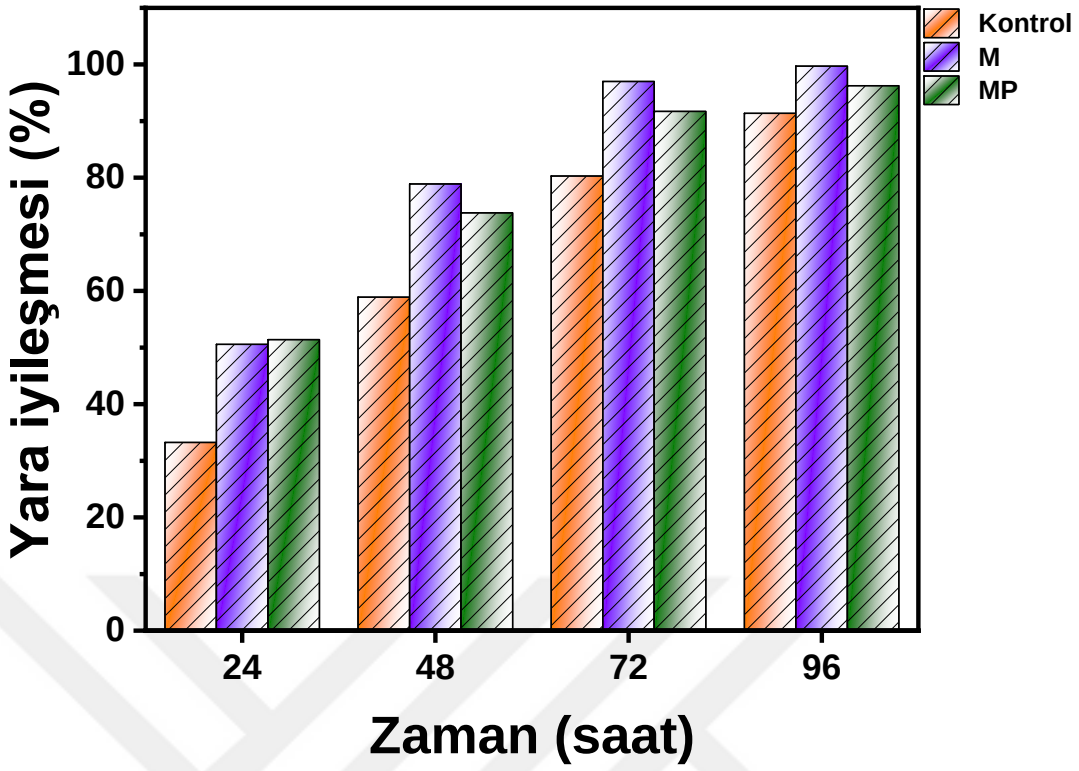
Üretilen iskelelerin yara iyileşmesini uyarıcı etkileri, kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir. Şekil 4.10'da, oluşturulan yara modelindeki kapanmanın belirli zaman aralıklarındaki fotoğrafları görülmektedir. Bu fotoğraflar incelendiğinde, iskele ekstraktına maruz bırakılan gruplarda yara bölgesinin kontrol grubuna oranla daha hızlı bir şekilde kapandığı gözlenmiştir. 72 saat sonunda bu grupların yara bölgelerinin tamamen kapandığı, buna karşın kontrol grubunda 96 saat

sonunda yara kapanmasının yalnız %90'a ulaşabildiği görülmüştür. Bu sonuçlar, iskelelerin yara kapanma modelinde uyarıcı etkilere sahip olduğunu göstermiştir.



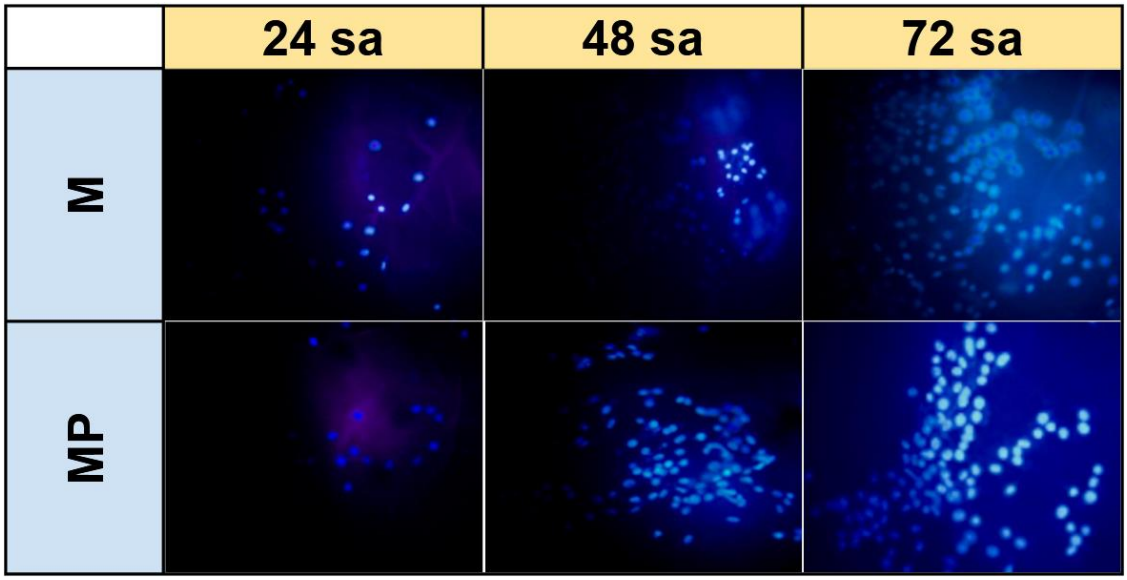
Şekil 4.10 Çizik testi sonunda gözlemlenen yara iyileşmesi (10X büyütme)

Öte yandan Şekil 4.11'deki grafik, yara iyileşme yüzdelerini göstermektedir. Bu verilere göre, 24 saat sonunda iskele ekstraktına maruz kalan gruplardaki yara iyileşmesi, kontrolün 1.5 katıdır. İskele ekstraktlarıyla muamele edilen gruplarda 48 saat sonunda yaranın yaklaşık %80'i kapanmışken kontrol grubunda bu oran %60'ta kalmıştır. 72 saat sonunda kontrol grubundaki kapanma %80'e çıkabilmiş, iskele gruplarında ise yara tamamen kapanmıştır. Bu sonuçlar, M ve MP'nin hücre çoğalmasını ve göçünü, böylelikle de yara iyileşmesini destekleyici etkilerini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11 Kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak M ve MP ekstraktları ile muamele sonrası yara iyileşmesine ait 24, 48, 72 ve 96 saat sonundaki yüzdece iyileşme grafiği

4.9 Hücre Tutunma Çalışmaları



Şekil 4.12 Hücre tutunmasına ait DAPI boyaması görüntüleri (20X büyütme)

Fare fibroblast hücrelerinin iskelelere tutunması ve iskele üzerindeki göçünün araştırılması için hücreler DAPI çekirdek boyasıyla boyanarak floresan

mikroskopta görüntüleme yapıldı. Hücrelerin tutunma ve göç davranışları 24, 48. ve 72. saatlerde gerçekleştirilen görüntülemelerle takip edildi (Şekil 4.12).

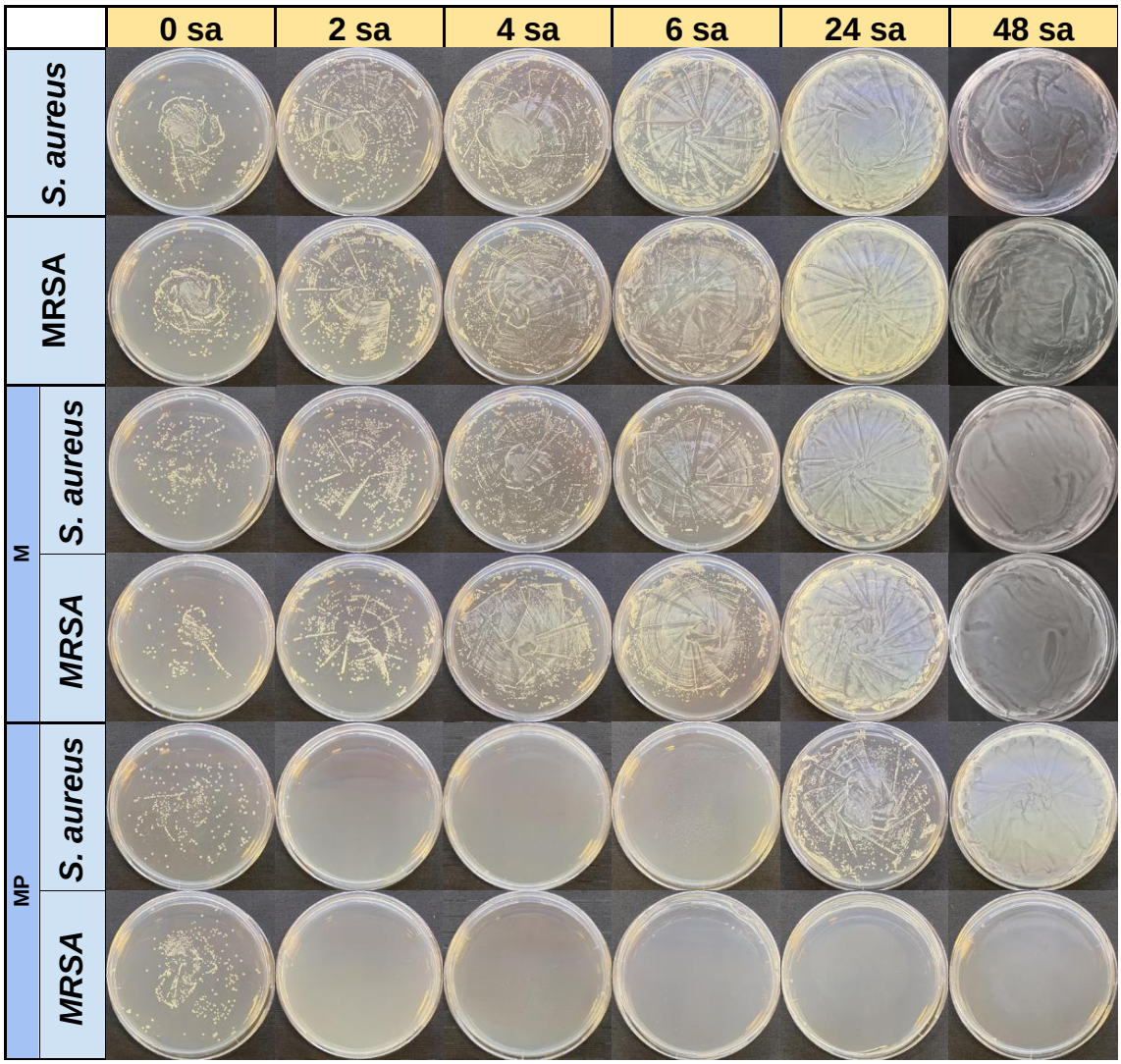
24 saatlik inkübasyona ait görüntülerde her grupta fibroblastların iskeleye başarılı bir şekilde tutundukları görülmüştür. Ayrıca 48 saat sonunda iskelelere tutunan hücre sayısında 24 saatte tutunan hücre sayısına oranla gözle görülür şekilde bir artış meydana gelmiştir. İskelelerde en yoğun hücre sayısı, 72 saatin sonunda elde edilmiştir. Bu durum, iskelelerin hücre çoğalmasını ve göçünü desteklediğini kanıtlar niteliktedir. DAPI boyaması, iskeleye tutunan hücrelerin morfolojilerini koruduğunu ve zamanla sayılarının hızla arttığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar üretilen iskelelerin yüksek biyouyumluluğa sahip olduklarını ortaya koyan önemli deliller olarak değerlendirilmiştir.

4.10 Antibakteriyel Aktivite Çalışması

Mevcut tez çalışmasında M ve MP iskelelerinin bakterisidal aktiviteleri, zamana bağlı öldürücülüğün tespitiyle (*time-kill*) *S. aureus* ve MRSA patojenlerine karşı ölçülmüştür. Şekil 4.13'te verilen petri fotoğraflarından da anlaşılabileceği gibi, MP'nin her iki suş üzerinde de yüksek öldürücülüğe sahip olduğu görülmüştür. Logaritmik azalma değeri en yüksek seviyeye, MRSA'ya karşı ulaşmıştır. MRSA'da bu etki 48 saat sürmüş olsa da *S. aureus*'a karşı 6 saatten sonra etkinin azalmaya başladığı görülmüştür. Petri görüntüleri ve sayılan kolonilerden elde edilen yüzde ölüm değeri, MP'nin MRSA suşunu 2 ilâ 48 saat arasında petride koloni oluşturmayacak şekilde öldürdüğünü göstermiştir ki bu durum, yüksek bakterisidal etki anlamına gelmektedir.

Sonuçlar, HF-18 peptidini içeren grupların uzun süren ve yüksek etkili öldürücü etkisini her iki bakteri suşu için de ortaya koymuştur. Jiang vd. [36] HF-18'in pozitif yük yoğunluğu ve hidrofobikliği sayesinde Gram negatif ve pozitif bakteriler üzerinde önemli antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (MİK aralığı 4–32 μg/ml). Bahsi geçen çalışmada *S. aureus* üzerindeki MİK değeri 8 μg/ml olarak tespit edilmiş ancak MRSA için MİK değeri tespit edilmemiştir. Mevcut tez çalışmasında, peptidin iskeleyle birlikte uygulanmasıyla MİK değerinin düşürüldüğü kanıtlanmıştır. Salım çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre (Tablo 4.1), Petri görüntülerinde bakterisidal etkinin çok düşük

konsantrasyonlarda bile ortaya çıktığı görülmektedir. Bu konsantrasyonlar (2, 4, 6, 24 ve 48 saatler için sırasıyla 1.45 μg/ml, 1.84 μg/ml, 2.14 μg/ml, 2.37 μg/ml ve 2.58 μg/ml) MİK değeri olarak belirtilen 8 μg/ml değerinden düşüktür.



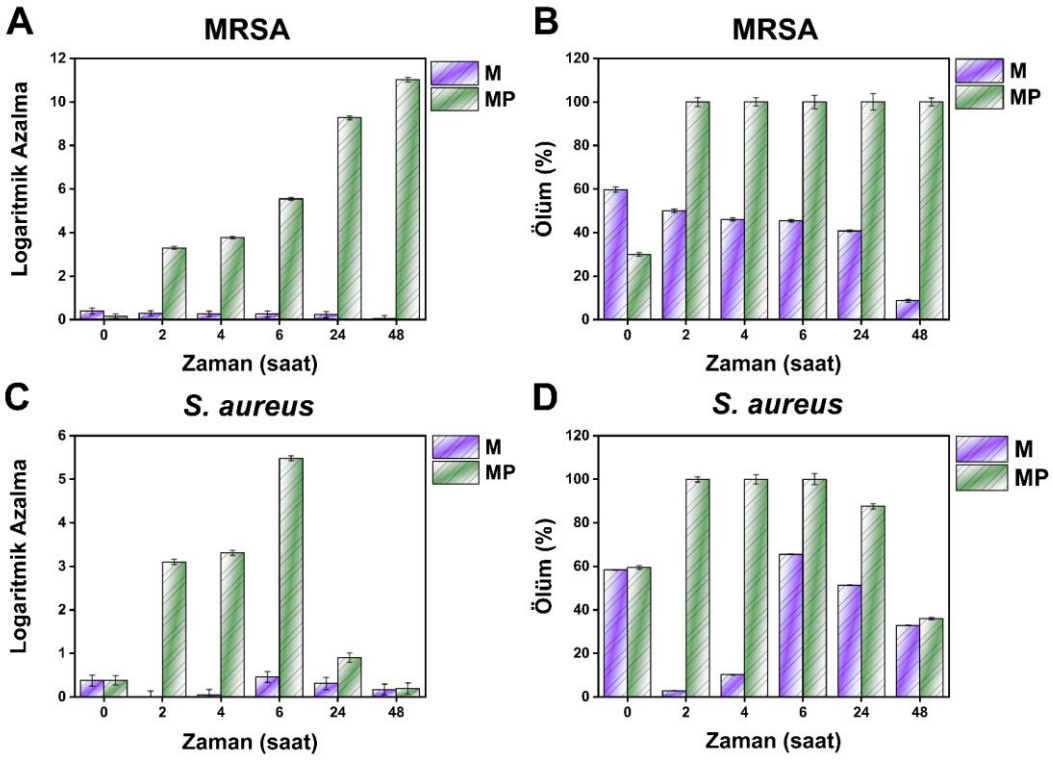
Şekil 4.13 M ve MP'nin *S. aureus* ve MRSA üzerine antibakteriyel etkisini gösteren petri görüntüleri

Tablo 4.1 Antibakteriyel çalışmanın yürütüldüğü zaman aralıklarındaki HF-18 salım miktarları

Zaman aralığı (saat)	Salım miktarı (μg/ml)
2	1.45
4	1.84
6	2.14
24	2.37
48	2.58

Bu arttırılmış etkinin, iskeledeki Ch'ın pozitif yüklü olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HF-18'in de katyonik yapısıyla birleştiğinde pozitif yük miktarı artmış olacağından HF-18'in iskeleye yüklenmesiyle birlikte sinerjik bir etki ortaya çıkmış olabilir.

Bu çalışmayla HF-18'in MRSA üzerindeki etkisi ilk kez ortaya konmuştur. Antibakteriyel aktivite çalışmalarının sonuçlarına göre, referans alınan *S. aureus*'a göre M ve MP'nin MRSA üzerindeki etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda HF-18 peptidinin eklenmesiyle MP'nin *S. aureus* ve MRSA üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesi sağlanmıştır.



Şekil 4.14 M ve MP'ye ilişkin logaritmik azalma ve yüzdece ölüm grafikleri

Şekil 4.14, M ve MP'nin etkisiyle *S. aureus* ve MRSA kolonilerinde meydana gelen logaritmik azalma ile yüzdece ölüm verilerini gösteren grafiklerden oluşmaktadır. Bu şekilden anlaşılacağı üzere, MP ile kıyaslandığında M'nin antibakteriyel etkisinin her iki suş üzerinde de çok düşük ve kısa süreli olduğu görülmektedir. M'nin logaritmik azalma etkisi MRSA'da tüm zaman aralıklarında benzeri olup %50'nin altındadır. *S. aureus*'taki antibakteriyel etkisinin çok düşük olmasına karşın (Şekil 4.14C, D) MRSA'da 6. saatte öldürme aktivitesinde %65 ile kısmî bir

artış görülmüştür (Şekil 4.14A, B). M; Ch, HA ve CS'den oluşan pozitif yüklü ve hidrofilik bir yapıya sahiptir. Bilindiği gibi yüzeyin karakteristik özellikleri bakterilerin yüzeylere tutunması açısından önem taşımaktadır. Özellikle bakterilerin hidrofilik yüzeylere daha az tutunacağı gerçeği, peptid yüklü olmayan iskelede kısa süreli antibakteriyel etkinin kaynağı olabilir [235]. Nemden ve hidrofilisiteden ötürü bakterilerin iskele yüzeyine tutunması güçleşir. Ch'nin etkisiyle bağlanan daha az bakteriyi ortadan kaldırmak mümkün olabilir. Pozitif yüklü Ch, negatif yüklü bakteri hücre zarları ile elektrostatik etkileşim yoluyla etkileşime girerek bakteriyel ölüme neden olacaktır ve ardından ölü bakteriler iskele yüzeyine yapışamayacaktır [236]. Ancak bu etki ortamdaki yük dengesi bozulana kadar devam edecektir. Daha önceden yapılan, lizostafin yüklü Ch'nin kullanımına dair gerçekleştirilen bir çalışma, Ch'nin tek başına *S. aureus* üzerinde herhangi bir antibakteriyel etki göstermediğini ancak üretilen jelin etkili olduğunu ortaya koymuştur [231]. Bu sonuç, M'nin *S. aureus* üzerinde önemli bir antibakteriyel etki göstermemesi bakımından benzerlik taşımaktadır. Yine de peptid yüklü jel, peptidin antimikrobiyal etkisini göstermesini engellemeyerek etkili olmuştur. Hatta M'nin, yapısında yer alan bileşenleri sayesinde, HF-18'in *S. aureus* ve MRSA üzerindeki etkilerine sinerjik bir katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Bir başka çalışmada Ch hidrojelde antimikrobiyal ajanlar olarak hidrojen peroksit ve bir peptid (dizi: RKKKKLLRKKC) taşınmıştır [237]. Çalışma, bu iki ajanın birlikte taşınmasının 10 saat içinde MRSA'yı tamamen yok ettiğini göstermiştir. Ancak mevcut tez çalışmasında, HF-18'in yalnız 2 saat içinde, hem de literatürde yer alan MIC değerinden daha düşük bir konsantrasyonda aktivite gösterdiği ve 48 saat sonuna kadar aktivitenin devam ettiği kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar, MP'nin HF-18'in salımı için uygun bir aday olduğunu, literatürle karşılaştırıldığında daha uzun bir zaman diliminde daha iyi bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur [231, 233, 237].

Birçok çalışma katyonik özelliği sayesinde Ch'ın güçlü bir antibakteriyel olduğunu belirtse de mevcut çalışmada kullanılan suşlarda bu fark ortaya çıkmamıştır. Ne var ki mevcut çalışma üretilen iskelenin HF-18 peptidine sinerjik etki göstererek etki konsantrasyonunun daha önceden rapor edilen MİK değerinden de düşürüldüğünü ortaya koymuştur.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Mevcut tez çalışması kapsamında; hidrojel tabanlı, yara iyileşmesinde kullanılabilecek kitosan, hyaluronik asit ve kondroitin sülfattan oluşan bir doku iskelesi üretiminin optimize edilmesi ve optimum koşullarda üretilen iskelenin karakterizasyonu, optimize koşullarda HF-18 peptidi yüklü doku iskelesi üretilmesi ve karakterizasyonu, HF-18 içeren (MP) ve HF-18 içermeyen (M) doku iskelelerinin karşılaştırmalı olarak biyolojik aktivitesinin; biyouyumluluk, hücre çoğalmasına etki, hücre tutunmasına etki ve antimikrobiyal etki açılarından incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla Ch, HA ve CS değişik oranlarda karıştırılıp genipinle çapraz bağlanmıştır. Bu karışımın bileşim oranları, çapraz bağlama ve yıkama basamakları optimize edilmiştir. Dondurarak kurutma yöntemiyle üretilen iskeleler SEM ile morfolojileri, FTIR ile fonksiyonel grupları, TGA ile ısıl karakteri, farklı pH koşullarındaki şişme davranışı, LC ile salım profili, MTT ile biyouyumlulukları, yara modeli üzerinde yara iyileşmesine etkileri, DAPI boyamasıyla hücre tutunmasına etkileri ve *time-kill* yöntemiyle antibakteriyel aktiviteleri irdelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre optimize iskele M, 90 mg Ch, 0.25 mg HA ve 0.25 mg CS içerip 0.5 mg genipinle çapraz bağlanarak elde edilmiştir. Bu iskele için yıkama, 0.1 N NaOH ile 2 saat ve ardından dH_2O ile 12 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

SEM mikrografları incelenerek iskelenin morfolojik yapısı yorumlanmıştır. Bu görüntüler, sürekli ve birbirleriyle iyi bağlantılı por yapılarını ortaya koymuştur. Bu mikrograflar ImageJ programıyla analiz edilerek elde edilen histogramlarla por çapları incelendiğinde porların nano ve mikro ölçekte dağılım gösterdiği görülmüştür. Histogramlar, popülasyonun 0.026-3.131 μm arasında dağılım

gösterdiği ve 0.386 μm ortalama por çapına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Patojen nüfuzu göz önüne alındığında bu bakterilerin derinlere nüfuz edemeyeceği, bu açıdan da üretilen iskelenin tercih edilebilir olduğu değerlendirilmiştir.

Üretilen iskeleler ve iskele bileşenleri, ATR kristali bulunan FTIR spektrofotometresiyle fonksiyonel grupları açısından incelenmiştir. HA ve CS spektrumlarındaki 1605 cm^{-1}'de ortaya çıkan bandın zayıflayarak 1648 cm^{-1}'e kaydığı belirlenmiş ve bu değişikliklerin, amid I karbonil grubunun Ch ile etkileşiminden kaynaklandığı belirtilmiştir. CS spektrumunun 1226 cm^{-1} dalga sayısına karşılık gelen sülfonil grubuna ait bandında meydana gelen zayıflama, etkileşimlerin bu gruplar üzerinden gerçekleştiğini anlatmaktadır. Ayrıca meydana gelen kaymalar, moleküller arası etkileşimlere önemli birer delildir.

Çapraz bağlamadan sonra 1548 cm^{-1} dalga sayısında amid II'ye ait N-H deformasyon bandının genişlediği ve sola doğru kaydığı görülmüştür. Bu bandın zayıflaması ve kayması, primer amin gruplarının genipindeki karbona nükleofilik atak yapması ve bunun neticesinde tersiyer amin gruplarının oluşması nedeniyledir. Ayrıca 1031 cm^{-1}'de C-O gerilmesinden kaynaklanan bandın da çapraz bağlamadan sonra güçlendiği görülmüştür. Bunun nedeni ise genipin çapraz bağ köprülerinde yeni oluşan $-CH_2OH$ gruplarıdır. Bu veriler, çapraz bağlamanın etkilerini ve başarısını ortaya koymuştur.

MP spektrumu incelendiğinde 1557 cm^{-1}'de çapraz bağlanmamış primer amin bantlarının şiddetinde artış görülmüştür. Ayrıca, 801 cm^{-1}'de bağlanmamış peptidlerin $-NH_3^+$ gruplarına ait bükülme titreşimi bandı MP'nin spektrumunda görülürken M'nin spektrumunda görülmemiştir. 1416 ve 1373 cm^{-1} dalga sayılarındaki bantların şiddetinde meydana gelen artış da peptid çapraz bağlamaya katıldıktan sonra oluşan C-N bağlarına aittir. Bu veriler de peptidin belli bir kısmının çapraz bağlamaya katıldığını, belli bir kısmının da katılmadığını ortaya koymuştur.

Mix, M ve MP'nin ısıl karakteristikleri termogravimetrik analizlerle incelenmiştir. Sıcaklık 800 °C'ye ulaştığında M'nin %22.11'i ve MP'nin de %12.23'ü geri kalırken Mix'in neredeyse tamamının bozunduğu görülmüştür. Mix grubu incelendiğinde

çapraz bağlamanın gerçekleşmediği bu karışımın ısıl dayanımının M ve MP'ye kıyasla çok düşük olduğu ve çok daha hızlı bir şekilde bozunduğu görülmüştür. Böylelikle çapraz bağlamanın yapıya ısıl dayanım kattığı kanıtlanmıştır.

Şişme deneyi pH:5, 7.4 ve 9'daki PBS'te gerçekleştirilmiştir. Deneyin sonuçlarına göre iskeleler asidik koşullarda daha yüksek şişme seviyesi göstermiştir. pH:5'teki şişme oranı kütlece %5446.5 olarak bulunmuştur. pH:7.4 ve 9'daki şişme oranları kütlece sırasıyla %722.6 ve %564.2 olarak bulunmuş, bu iki grup da 4 saatte plato fazına erişmiştir. Bu veriler, üretilen iskelenin asidik pH'ta yanıt verme özelliği taşıdığını ortaya koymuştur. Elde edilen bu pH'a karşı yanıt özelliği, üretilen iskeleyi, asidik bir doğaya sahip olan enfektif dokularda ilaç salımı için son derece uygun bir aday haline getirmektedir.

MP'nin asidik ve nötral koşullardaki salım profili incelendiğinde, ilk 5 saatte pH:5'te %30.56 ve pH:7.4'te %25.08 HF-18 salımının meydana geldiği görülmüştür. 120 saat içindeki salımlar ise pH:5 ve 7.4'te sırasıyla %45.12 ve %44 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar peptidin uzatılmış bir sürede salımının gerçekleştiğini göstermiş olup diğer kontrollü salım çalışmalarıyla paralellik taşımaktadır.

Biyouyumluluk çalışmalarında, iskele ekstraktlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılıklarında kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı bir değişme meydana gelmediği görülmüştür. Ancak M grubunda ortaya çıkan az miktardaki artış, bu iskelenin hücreler üzerinde çoğalmayı destekleyici etkilerini anlatır niteliktedir. Sonuçlar, üretilen iskelelerin hiçbir sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve biyouyumlu özellik gösterdiklerini ortaya koymaktadır.

Yara iyileşmesine yönelik yürütülen çalışmalarda iskele ekstraktına maruz bırakılan gruplarda yara bölgesinin kontrol grubuna oranla daha hızlı bir şekilde kapandığı gözlenmiştir. 72 saat sonunda bu grupların yara bölgelerinin tamamen kapandığı, buna karşın kontrol grubunda 96 saat sonunda yara kapanmasının yalnız %90'a ulaşabildiği görülmüştür. Bu sonuçlar, iskelelerin yara kapanma modelinde uyarıcı etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Hücre tutunmasının incelendiği DAPI boyaması sonuçlarına göre, 24 saatlik inkübasyona ait görüntülerde her grupta fibroblastların iskeleye başarılı bir

şekilde tutundukları görülmüştür. Ayrıca 48 saat sonunda iskelelere tutunan hücre sayısında 24 saatte tutunan hücre sayısına oranla gözle görülür şekilde bir artış meydana gelmiştir. İskelelerde en yoğun hücre sayısı, 72 saatin sonunda elde edilmiştir. Bu durum, iskelelerin hücre çoğalmasını ve göçünü desteklediğini kanıtlar niteliktedir.

Son olarak, gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite çalışmalarına göre MP'nin her iki suş üzerinde de yüksek öldürücülüğe sahip olduğu görülmüştür. Logaritmik azalma değeri en yüksek seviyeye, MRSA'ya karşı ulaşmıştır. MRSA'da bu etki 48 saat sürmüş olsa da *S. aureus*'a karşı 6 saatten sonra etkinin azalmaya başladığı görülmüştür. Yüzde ölüm değerleri, MP'nin MRSA suşunu 2 ilâ 48 saat arasında petride koloni oluşturmayacak şekilde öldürdüğünü göstermiştir ki bu durum, yüksek bakterisidal etki anlamına gelmektedir. Literatürde *S. aureus* üzerindeki MİK değeri 8 μg/ml olarak belirtilmiş, salım çalışmaları sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde ise MİK değerinden daha düşük miktarda peptid salındığında bile bakterisidal etkinin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlar, üretilen M iskelesinin sinerjik bir etki göstererek HF-18 peptidinin MİK değerini düşürdüğünü ortaya koymuştur.

5.2 Öneriler

Daha ileriki çalışmalarda iskelenin başka AMP'lerin taşınmasına uygunluğu test edilebilir. Bu AMP'lerle birlikte yeni bakteriyel suşlar üzerinde yapılacak çalışmalarla, iskelenin ve AMP'lerin bakteriyel kütüphanesi genişletilerek literatüre katkıda bulunulabilir. Aynı amaçlarla HF-18'in yeni bakteriyel suşlar üzerindeki etkileri incelenmeye devam edilmelidir.

Dokulara özel hücrelerle, özellikle primer kök hücre hatları, mezenkimal kök hücre hatları ve bağışıklık sistemi hücre hatları ile yapılacak çalışmalar sayesinde biyouyumluluk çalışmaları genişletilebilir. İskeledeki HA ve CS içeriğini arttırarak biyolojik aktivitenin güçlendirilmesi için farklı stratejiler belirlenebilir. Ayrıca iskelenin farklı karakterdeki doku mühendisliği alanlarında etkinliği test edilebilir. Bu amaçla iskele bileşiminin özellikle 3B yazıcılarda ve elektroeğirme sistemlerindeki işlenebilirliği test edilmeli ve bu sistemlere uyarlanabilir hale getirilmek üzere çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

[1] N. De Isla, C. Huseltein, N. Jessel, A. Pinzano, V. Decot, J. Magdalou, vd., "Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering," *Bio-medical materials and engineering,* vol. 20, pp. 127-133, 2010.

[2] Y. Elsayed ve C. Lekakou, "Designing and modeling pore size distribution in tissue scaffolds," in *Characterisation and design of tissue scaffolds*, ed: Elsevier, 2016, pp. 23-43.

[3] R. S. Ambekar ve B. Kandasubramanian, "Progress in the advancement of porous biopolymer scaffold: Tissue engineering application," *Industrial & Engineering Chemistry Research,* vol. 58, pp. 6163-6194, 2019.

[4] A. K. Nayak, D. Pal, ve K. Santra, "Swelling and drug release behavior of metformin hcl-loaded tamarind seed polysaccharide-alginate beads," *International journal of biological macromolecules,* vol. 82, pp. 1023-1027, 2016.

[5] A. Singh, P. K. Sharma, V. K. Garg, ve G. Garg, "Hydrogels: A review," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res,* vol. 4, pp. 97-105, 2010.

[6] M. E. Lauer, D. Mukhopadhyay, C. Fulop, A. Carol, A. K. Majors, ve V. C. Hascall, "Primary murine airway smooth muscle cells exposed to poly (i, c) or tunicamycin synthesize a leukocyte-adhesive hyaluronan matrix," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 284, pp. 5299-5312, 2009.

[7] D. Manou, I. Caon, P. Bouris, I.-E. Triantaphyllidou, C. Giaroni, A. Passi, vd., "The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues," *The Extracellular Matrix,* pp. 1-20, 2019.

[8] R. M. Greco, J. A. Iocono, ve H. P. Ehrlich, "Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix," *Journal of cellular physiology,* vol. 177, pp. 465-473, 1998.

[9] F. Zamboni, C. Okoroafor, M. P. Ryan, J. T. Pembroke, M. Strozyk, M. Culebras, vd., "On the bacteriostatic activity of hyaluronic acid composite films," *Carbohydrate Polymers,* vol. 260, p. 117803, 2021.

[10] P. Pirnazar, L. Wolinsky, S. Nachnani, S. Haake, A. Pilloni, ve G. W. Bernard, "Bacteriostatic effects of hyaluronic acid," *Journal of periodontology,* vol. 70, pp. 370-374, 1999.

[11] F. Della Sala, G. Longobardo, A. Fabozzi, M. di Gennaro, ve A. Borzacchiello, "Hyaluronic acid-based wound dressing with antimicrobial properties for wound healing application," *Applied Sciences,* vol. 12, p. 3091, 2022.

[12] X. Zou, W. Foong, T. Cao, B. Bay, H. Ouyang, ve G. Yip, "Chondroitin sulfate in palatal wound healing," *Journal of dental research,* vol. 83, pp. 880-885, 2004.

[13] A.-R. Im, Y. Park, ve Y. S. Kim, "Isolation and characterization of chondroitin sulfates from sturgeon (acipenser sinensis) and their effects on growth of fibroblasts," *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* vol. 33, pp. 1268-1273, 2010.

[14] C. T. Laurencin, T. Jiang, S. G. Kumbar, ve L. S. Nair, "Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine," *Current topics in medicinal chemistry,* vol. 8, pp. 354-364, 2008.

[15] T. Jiang, C. M. Pilane, ve C. T. Laurencin, "Fabrication of novel porous chitosan matrices as scaffolds for bone tissue engineering," *MRS Online Proceedings Library (OPL),* vol. 845, 2004.

[16] F. Croisier ve C. Jérôme, "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering," *European polymer journal,* vol. 49, pp. 780-792, 2013.

[17] N. B. Shelke, R. James, C. T. Laurencin, ve S. G. Kumbar, "Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering," *Polymers for Advanced Technologies,* vol. 25, pp. 448-460, 2014.

[18] A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri, H. Baharvand, ve H. Daemi, "Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds," *International journal of biological macromolecules,* vol. 107, pp. 678-688, 2018.

[19] S.-N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, ve H. Suh, "Biological characterization of edc-crosslinked collagen–hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration," *Biomaterials,* vol. 24, pp. 1631-1641, 2003.

[20] W. Wang, M. Zhang, W. Lu, X. Zhang, D. Ma, X. Rong, vd., "Cross-linked collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid imitating extracellular matrix as scaffold for dermal tissue engineering," *Tissue Engineering Part C: Methods,* vol. 16, pp. 269-279, 2010.

[21] S. Bhowmick, A. Thanusha, A. Kumar, D. Scharnweber, S. Rother, ve V. Koul, "Nanofibrous artificial skin substitute composed of mpeg–pcl grafted gelatin/hyaluronan/chondroitin sulfate/sericin for 2 nd degree burn care: In vitro and in vivo study," *RSC advances,* vol. 8, pp. 16420-16432, 2018.

[22] B. Manickam, R. Sreedharan, ve M. Elumalai, "'Genipin'–the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview," *Current drug delivery,* vol. 11, pp. 139-145, 2014.

[23] W. Winotapun, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, ve T. Rojanarata, "One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit," *Enzyme and microbial technology,* vol. 53, pp. 92-96, 2013.

[24] R. A. A. Muzzarelli, M. El Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili, ve A. Gigante, "Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and

regeneration of cartilage and bone," *Marine Drugs,* vol. 13, pp. 7314-7338, 2015.

[25] M. F. Butler, Y. F. Ng, ve P. D. Pudney, "Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 41, pp. 3941-3953, 2003.

[26] R. Deepachitra, R. P. Lakshmi, K. Sivaranjani, J. H. Chandra, ve T. P. Sastry, "Nanoparticles embedded biomaterials in wound treatment: A review," *J. Chem. Pharm. Sci,* vol. 8, pp. 324-329, 2015.

[27] A. Pormohammad, N. K. Monych, S. Ghosh, D. L. Turner, ve R. J. Turner, "Nanomaterials in wound healing and infection control," *Antibiotics,* vol. 10, p. 473, 2021.

[28] J. F. Burke, "The effective period of preventive antibiotic action in experimental incisions and dermal lesions," *Surgery,* vol. 50, pp. 161-168, 1961.

[29] M. C. Robson, "Wound infection: A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria," *Surgical Clinics of North America,* vol. 77, pp. 637-650, 1997.

[30] A. Carrel, "Cicatrization of wounds: Xii. Factors initiating regeneration," *The Journal of Experimental Medicine,* vol. 34, pp. 425-434, 1921.

[31] A. Carrel ve A. Hartmann, "Cicatrization of wounds: I. The relation between the size of a wound and the rate of its cicatrization," *The Journal of experimental medicine,* vol. 24, pp. 429-450, 1916.

[32] M. Wynn, "The impact of infection on the four stages of acute wound healing: An overview," *Wounds UK,* vol. 17, pp. 26-32, 2021.

[33] B. G. Bell, F. Schellevis, E. Stobberingh, H. Goossens, ve M. Pringle, "A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance," *BMC infectious diseases,* vol. 14, pp. 1-25, 2014.

[34] S. Das ve A. B. Baker, "Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing," *Frontiers in bioengineering and biotechnology,* vol. 4, p. 82, 2016.

[35] J. Lei, L. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, vd., "The antimicrobial peptides and their potential clinical applications," *American journal of translational research,* vol. 11, p. 3919, 2019.

[36] M. Jiang, X. Yang, H. Wu, Y. Huang, J. Dou, C. Zhou, vd., "An active domain hf-18 derived from hagfish intestinal peptide effectively inhibited drug-resistant bacteria in vitro/vivo," *Biochemical Pharmacology,* vol. 172, p. 113746, 2020.

[37] M. Magana, M. Pushpanathan, A. L. Santos, L. Leanse, M. Fernandez, A. Ioannidis, vd., "The value of antimicrobial peptides in the age of resistance," *The Lancet Infectious Diseases,* vol. 20, pp. e216-e230, 2020.

[38] N. Mookherjee ve R. Hancock, "Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections," *Cellular and Molecular Life Sciences,* vol. 64, pp. 922-933, 2007.

[39] A. A. Bahar ve D. Ren, "Antimicrobial peptides," *Pharmaceuticals,* vol. 6, pp. 1543-1575, 2013.

[40] M. Zanetti, "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity," *Journal of leukocyte biology,* vol. 75, pp. 39-48, 2004.

[41] J. M. Conlon, "Host-defense peptides of the skin with therapeutic potential: From hagfish to human," *Peptides,* vol. 67, pp. 29-38, 2015.

[42] Y. Huang, J. Huang, ve Y. Chen, "Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function," *Protein & cell,* vol. 1, pp. 143-152, 2010.

[43] G. Wang. Antimicrobial peptide database [Online]. Available: https://aps.unmc.edu

[44] G. Wang, "Unifying the classification of antimicrobial peptides in the antimicrobial peptide database," in *Methods in enzymology*. vol. 663, ed: Elsevier, 2022, pp. 1-18.

[45] A. Som, S. Vemparala, I. Ivanov, ve G. N. Tew, "Synthetic mimics of antimicrobial peptides," *Peptide Science,* vol. 90, pp. 83-93, 2008.

[46] J. Li ve D. J. Mooney, "Designing hydrogels for controlled drug delivery," *Nature Reviews Materials,* vol. 1, pp. 1-17, 2016.

[47] R. Braund ve N. J. Medlicott, "Biomaterials as platforms for topical administration of therapeutic agents in cutaneous wound healing," in *Polymeric biomaterials*, ed: CRC Press, 2020, pp. 837-849.

[48] C. Shi, C. Wang, H. Liu, Q. Li, R. Li, Y. Zhang, vd., "Selection of appropriate wound dressing for various wounds," *Frontiers in bioengineering and biotechnology,* vol. 8, p. 182, 2020.

[49] B. Anisha, D. Sankar, A. Mohandas, K. Chennazhi, S. V. Nair, ve R. Jayakumar, "Chitosan–hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use," *Carbohydrate polymers,* vol. 92, pp. 1470-1476, 2013.

[50] N. KhaliliJafarabad, A. Behnamghader, M. T. Khorasani, ve M. Mozafari, "Platelet-rich plasma-hyaluronic acid/chondrotin sulfate/carboxymethyl chitosan hydrogel for cartilage regeneration," *Biotechnology and Applied Biochemistry,* vol. 69, pp. 534-547, 2022.

[51] L. Cui, J. Jia, Y. Guo, Y. Liu, ve P. Zhu, "Preparation and characterization of ipn hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin," *Carbohydrate polymers,* vol. 99, pp. 31-38, 2014.

[52] Z. Werb ve P. Lu, "The role of stroma in tumor development," *Cancer journal (Sudbury, Mass.),* vol. 21, p. 250, 2015.

[53] A. D. Theocharis ve N. K. Karamanos, "Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms," *Matrix Biology,* vol. 75, pp. 220-259, 2019.

[54] C. Frantz, K. M. Stewart, ve V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of cell science,* vol. 123, pp. 4195-4200, 2010.

[55] K. C. Clause ve T. H. Barker, "Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair," *Current opinion in biotechnology,* vol. 24, pp. 830-833, 2013.

[56] M. W. Pickup, J. K. Mouw, ve V. M. Weaver, "The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer," *EMBO reports,* vol. 15, pp. 1243-1253, 2014.

[57] T. Neill, L. Schaefer, ve R. V. Iozzo, "Instructive roles of extracellular matrix on autophagy," *The American journal of pathology,* vol. 184, pp. 2146-2153, 2014.

[58] J. M. Muncie ve V. M. Weaver, "The physical and biochemical properties of the extracellular matrix regulate cell fate," *Current topics in developmental biology,* vol. 130, pp. 1-37, 2018.

[59] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, ve N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Advanced drug delivery reviews,* vol. 97, pp. 4-27, 2016.

[60] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, ve S. J. Roberts, "Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds," *Journal of Anatomy,* vol. 213, pp. 66-72, 2008.

[61] G. Chen, T. Ushida, ve T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromolecular Bioscience,* vol. 2, pp. 67-77, 2002.

[62] M. Kucharska, K. Walenko, B. Butruk, T. Brynk, M. Heljak, ve T. Ciach, "Fabrication and characterization of chitosan microspheres agglomerated scaffolds for bone tissue engineering," *Materials Letters,* vol. 64, pp. 1059-1062, 2010.

[63] J. Mao, S. Duan, A. Song, Q. Cai, X. Deng, ve X. Yang, "Macroporous and nanofibrous poly (lactide-co-glycolide)(50/50) scaffolds via phase separation combined with particle-leaching," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 32, pp. 1407-1414, 2012.

[64] T. D. Brown, C. Vaquette, D. W. Hutmacher, ve P. D. Dalton, "Electrospinning for regenerative medicine," in *Polymeric biomaterials*, ed: CRC Press, 2020, pp. 539-592.

[65] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, ve S. G. Kumbar, "Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering," *Bioactive materials,* vol. 1, pp. 93-108, 2016.

[66] S. Kumbar, R. James, S. Nukavarapu, ve C. Laurencin, "Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues," *Biomedical materials,* vol. 3, p. 034002, 2008.

[67] S. J. Lee, J. J. Yoo, G. J. Lim, A. Atala, ve J. Stitzel, "In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application," *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials,* vol. 83, pp. 999-1008, 2007.

[68] G. H. Ralph Petrucci, Jeffry Madura, Carey Bisonnette, *General chemistry : Principles and modern applications*, 11th ed.: Pearson Canada Inc., 2017.

[69] B. Chan ve K. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations," *European spine journal,* vol. 17, pp. 467-479, 2008.

[70] J. Gopinathan ve I. Noh, "Recent trends in bioinks for 3d printing," *Biomaterials research,* vol. 22, pp. 1-15, 2018.

[71] M. Akova, "Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections," *Virulence,* vol. 7, pp. 252-266, 2016.

[72] B. K. Gu, D. J. Choi, S. J. Park, M. S. Kim, C. M. Kang, ve C.-H. Kim, "3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications," *Biomaterials research,* vol. 20, pp. 1-8, 2016.

[73] S. V. Murphy ve A. Atala, "3d bioprinting of tissues and organs," *Nature biotechnology,* vol. 32, pp. 773-785, 2014.

[74] R. M. Da Silva, J. F. Mano, ve R. L. Reis, "Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: Switching cell-material boundaries," *TRENDS in Biotechnology,* vol. 25, pp. 577-583, 2007.

[75] T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, vd., "Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues," *The FASEB journal,* vol. 20, pp. 708-710, 2006.

[76] J. Yang, M. Yamato, T. Shimizu, H. Sekine, K. Ohashi, M. Kanzaki, vd., "Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering," *Biomaterials,* vol. 28, pp. 5033-5043, 2007.

[77] G. Orive, R. M. Hernández, A. R. g. Gascón, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. De Vos, vd., "History, challenges and perspectives of cell microencapsulation," *TRENDS in Biotechnology,* vol. 22, pp. 87-92, 2004.

[78] A. M. A. Rokstad, I. Lacík, P. de Vos, ve B. L. Strand, "Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation," *Advanced drug delivery reviews,* vol. 67, pp. 111-130, 2014.

[79] C. R. Nuttelman, M. C. Tripodi, ve K. S. Anseth, "Synthetic hydrogel niches that promote hmsc viability," *Matrix biology,* vol. 24, pp. 208-218, 2005.

[80] A. K. Nayak ve B. Das, "Introduction to polymeric gels," in *Polymeric gels*, ed: Elsevier, 2018, pp. 3-27.

[81] H. J. Rathod ve D. P. Mehta, "A review on pharmaceutical gel," *Int J Pharm Sci,* vol. 1, pp. 33-47, 2015.

[82] H. Hägerström, "Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery," Acta Universitatis Upsaliensis, 2003.

[83] L. Z. Rogovina, V. G. Vasil'ev, ve E. Braudo, "Definition of the concept of polymer gel," *Polymer Science Series C,* vol. 50, pp. 85-92, 2008.

[84] M. Suzuki, Y. Osada, ve K. Kajiwara, "Gels handbook, the fundamentals," ed: Academic Press New York, 2001.

[85] J. Jagur-Grodzinski, "Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications," *Polymers for Advanced Technologies,* vol. 21, pp. 27-47, 2010.

[86] H. B. Bohidar, P. Dubin, ve Y. Osada, *Polymer gels: Fundamentals and applications*: ACS Publications, 2002.

[87] G. M. Kavanagh ve S. B. Ross-Murphy, "Rheological characterisation of polymer gels," *Progress in Polymer Science,* vol. 23, pp. 533-562, 1998.

[88] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, ve H. M. Akil, "Classification, processing and application of hydrogels: A review," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 57, pp. 414-433, 2015.

[89] M. Ebara, Y. Kotsuchibashi, R. Narain, N. Idota, Y.-J. Kim, J. M. Hoffman, vd., *Smart biomaterials*: Springer, 2014.

[90] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen, ve Z. Zhong, "Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials,* vol. 35, pp. 4969-4985, 2014.

[91] V. Crescenzi, L. Cornelio, C. Di Meo, S. Nardecchia, ve R. Lamanna, "Novel hydrogels via click chemistry: Synthesis and potential biomedical applications," *Biomacromolecules,* vol. 8, pp. 1844-1850, 2007.

[92] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *Journal of advanced research,* vol. 6, pp. 105-121, 2015.

[93] D. Pal ve A. K. Nayak, "Interpenetrating polymer networks (ipns): Natural polymeric blends for drug delivery," in *Encyclopedia of biomedical polymers and polymeric biomaterials, 11 volume set*, ed: CRC Press, 2015, pp. 4120-4130.

[94] S. Jana, A. Saha, A. K. Nayak, K. K. Sen, ve S. K. Basu, "Aceclofenac-loaded chitosan-tamarind seed polysaccharide interpenetrating polymeric network microparticles," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 105, pp. 303-309, 2013.

[95] J. Maitra ve V. K. Shukla, "Cross-linking in hydrogels-a review," *Am. J. Polym. Sci,* vol. 4, pp. 25-31, 2014.

[96] S. Sahoo, N. Kumar, C. Bhattacharya, S. Sagiri, K. Jain, K. Pal, vd., "Organogels: Properties and applications in drug delivery," *Designed monomers and polymers,* vol. 14, pp. 95-108, 2011.

[97] M. Suzuki ve K. Hanabusa, "Polymer organogelators that make supramolecular organogels through physical cross-linking and self-assembly," *Chemical Society Reviews,* vol. 39, pp. 455-463, 2010.

[98] M. E. Cates ve P. S. Clegg, "Bijels: A new class of soft materials," *Soft Matter,* vol. 4, pp. 2132-2138, 2008.

[99] R. Asija, R. Sharma, ve A. Gupta, "Emulgel: A novel approach to topical drug delivery," *Journal of biomedical and pharmaceutical research,* vol. 2, pp. 91-94, 2013.

[100] C. A. García-González, M. Alnaief, ve I. Smirnova, "Polysaccharide-based aerogels—promising biodegradable carriers for drug delivery systems," *Carbohydrate Polymers,* vol. 86, pp. 1425-1438, 2011.

[101] K. Czarnobaj, "Preparation and characterization of silica xerogels as carriers for drugs," *Drug delivery,* vol. 15, pp. 485-492, 2008.

[102] V. I. Lozinsky, I. Y. Galaev, F. M. Plieva, I. N. Savina, H. Jungvid, ve B. Mattiasson, "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest," *TRENDS in Biotechnology,* vol. 21, pp. 445-451, 2003.

[103] R. D. Price, M. Berry, ve H. A. Navsaria, "Hyaluronic acid: The scientific and clinical evidence," *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery,* vol. 60, pp. 1110-1119, 2007.

[104] D. Vigetti, E. Karousou, M. Viola, S. Deleonibus, G. De Luca, ve A. Passi, "Hyaluronan: Biosynthesis and signaling," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,* vol. 1840, pp. 2452-2459, 2014.

[105] A. J. Day ve G. D. Prestwich, "Hyaluronan-binding proteins: Tying up the giant," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 277, pp. 4585-4588, 2002.

[106] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, ve J. Kolar, "Hyaluronic acid (hyaluronan): A review," *Veterinarni medicina,* vol. 53, pp. 397-411, 2008.

[107] Y. Ji, K. Ghosh, X. Z. Shu, B. Li, J. C. Sokolov, G. D. Prestwich, vd., "Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds," *Biomaterials,* vol. 27, pp. 3782-3792, 2006.

[108] I. P. Monteiro, A. Shukla, A. P. Marques, R. L. Reis, ve P. T. Hammond, "Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* vol. 103, pp. 330-340, 2015.

[109] T. G. Kim, H. J. Chung, ve T. G. Park, "Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles," *Acta biomaterialia,* vol. 4, pp. 1611-1619, 2008.

[110] R. Gaetani, D. A. Feyen, V. Verhage, R. Slaats, E. Messina, K. L. Christman, vd., "Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3d-printed

gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction," *Biomaterials,* vol. 61, pp. 339-348, 2015.

[111] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, ve E. Schacht, "Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review," *Biomacromolecules,* vol. 12, pp. 1387-1408, 2011.

[112] T. Mikami ve H. Kitagawa, "Biosynthesis and function of chondroitin sulfate," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,* vol. 1830, pp. 4719-4733, 2013.

[113] N. Volpi, "Chondroitin sulfate safety and quality," *Molecules,* vol. 24, p. 1447, 2019.

[114] E. Khor, "Chitin, fulfilling a biomaterials promise, dept," *Of Chemistry, National University of Singapore, Rep. Of Singapore,* 2001.

[115] M. Z. Albanna, T. H. Bou-Akl, O. Blowytsky, H. L. Walters III, ve H. W. Matthew, "Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials,* vol. 20, pp. 217-226, 2013.

[116] R. A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo, ve A. Gigante, "Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review," *Carbohydrate polymers,* vol. 89, pp. 723-739, 2012.

[117] F. J. O'brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials today,* vol. 14, pp. 88-95, 2011.

[118] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*: Academic press, 2013.

[119] H. Chajra, C. Rousseau, D. Cortial, M. Ronziere, D. Herbage, F. Mallein-Gerin, vd., "Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects," *Bio-medical materials and engineering,* vol. 18, pp. 33-45, 2008.

[120] B. Ma, X. Wang, C. Wu, ve J. Chang, "Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds," *Regenerative Biomaterials,* vol. 1, pp. 81-89, 2014.

[121] N. W. Guldner, I. Jasmund, H. r. Zimmermann, M. Heinlein, B. Girndt, V. Meier, vd., "Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: A new technology for cardiovascular tissue engineering," *Circulation,* vol. 119, pp. 1653-1660, 2009.

[122] J. Pieper, T. Hafmans, J. Veerkamp, ve T. Van Kuppevelt, "Development of tailor-made collagen–glycosaminoglycan matrices: Edc/nhs crosslinking, and ultrastructural aspects," *Biomaterials,* vol. 21, pp. 581-593, 2000.

[123] C. N. Grover, J. H. Gwynne, N. Pugh, S. Hamaia, R. W. Farndale, S. M. Best, vd., "Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films," *Acta biomaterialia,* vol. 8, pp. 3080-3090, 2012.

[124] P. B. van Wachem, L. A. Brouwer, R. Zeeman, P. J. Dijkstra, J. Feijen, M. Hendriks, vd., "In vivo behavior of epoxy-crosslinked porcine heart valve cusps and walls," *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials,* vol. 53, pp. 18-27, 2000.

[125] Z. Mao, C. Gao, D. Wang, L. Ma, ve J. Shen, "Controlling biostability of collagen films for fibroblast cytocompatibility," *Journal of bioactive and compatible polymers,* vol. 19, pp. 353-365, 2004.

[126] F. L. Mi, S. S. Shyu, ve C. K. Peng, "Characterization of ring-opening polymerization of genipin and ph-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 43, pp. 1985-2000, 2005.

[127] R. Yang, "Polymer degradation and stability," in *Polymer science and nanotechnology: Fundamentals and applications*, ed: Elsevier, 2020.

[128] A. W. Lloyd, "Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility," *Medical device technology,* vol. 13, pp. 18-21, 2002.

[129] L. S. Nair ve C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in polymer science,* vol. 32, pp. 762-798, 2007.

[130] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, ve J. Kohn, "Biodegradable polymers," *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices,* pp. 303-335, 2014.

[131] A. Lončarević, M. Ivanković, ve A. Rogina, "Lysozyme-induced degradation of chitosan: The characterisation of degraded chitosan scaffolds," *Journal of Tissue Repair and Regeneration,* vol. 1, p. 12, 2017.

[132] S. Singh, A. Young, ve C.-E. McNaught, "The physiology of wound healing," *Surgery (Oxford),* vol. 35, pp. 473-477, 2017.

[133] A. C. d. O. Gonzalez, T. F. Costa, Z. d. A. Andrade, ve A. R. A. P. Medrado, "Wound healing-a literature review," *Anais brasileiros de dermatologia,* vol. 91, pp. 614-620, 2016.

[134] J. L. Monaco ve W. T. Lawrence, "Acute wound healing: An overview," *Clinics in plastic surgery,* vol. 30, pp. 1-12, 2003.

[135] J. Koehler, F. P. Brandl, ve A. M. Goepferich, "Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds," *European Polymer Journal,* vol. 100, pp. 1-11, 2018.

[136] M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, ve G. C. Gurtner, "Wound healing: A cellular perspective," *Physiological reviews,* vol. 99, pp. 665-706, 2019.

[137] H. Pandith, X. Zhang, J. Liggett, K.-W. Min, W. Gritsanapan, ve S. J. Baek, "Hemostatic and wound healing properties of chromolaena odorata leaf extract," *International Scholarly Research Notices,* vol. 2013, 2013.

[138] T. Velnar, T. Bailey, ve V. Smrkolj, "The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms," *Journal of International Medical Research,* vol. 37, pp. 1528-1542, 2009.

[139] H. Sorg, D. J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, ve U. Mirastschijski, "Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts," *European Surgical Research,* vol. 58, pp. 81-94, 2017.

[140] G. Singh ve A. Chanda, "Biomechanical modeling of progressive wound healing: A computational study," *Biomedical Engineering Advances,* vol. 4, p. 100055, 2022.

[141] T. Kurahashi ve J. Fujii, "Roles of antioxidative enzymes in wound healing," *Journal of Developmental Biology,* vol. 3, pp. 57-70, 2015.

[142] N. X. Landén, D. Li, ve M. Ståhle, "Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing," *Cellular and Molecular Life Sciences,* vol. 73, pp. 3861-3885, 2016.

[143] G. Han ve R. Ceilley, "Chronic wound healing: A review of current management and treatments," *Advances in therapy,* vol. 34, pp. 599-610, 2017.

[144] R. L. Ruberg, "Role of nutrition in wound healing," *The Surgical Clinics of North America,* vol. 64, pp. 705-714, 1984.

[145] C. F. Heal, J. L. Banks, P. D. Lepper, E. Kontopantelis, ve M. L. van Driel, "Topical antibiotics for preventing surgical site infection in wounds healing by primary intention," *Cochrane Database of Systematic Reviews,* 2016.

[146] M. Zhang, Z. Jiang, D. Li, D. Jiang, Y. Wu, H. Ren, vd., "Oral antibiotic treatment induces skin microbiota dysbiosis and influences wound healing," *Microbial ecology,* vol. 69, pp. 415-421, 2015.

[147] E. B. Souto, A. F. Ribeiro, M. I. Ferreira, M. C. Teixeira, A. A. Shimojo, J. L. Soriano, vd., "New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 21, p. 393, 2020.

[148] A.-R. Im, J. Y. Kim, H.-S. Kim, S. Cho, Y. Park, ve Y. S. Kim, "Wound healing and antibacterial activities of chondroitin sulfate-and acharan sulfate-reduced silver nanoparticles," *Nanotechnology,* vol. 24, p. 395102, 2013.

[149] A. Azam, G. Muhammad, M. S. Aslam, M. M. Iqbal, M. A. Raza, N. Akhtar, vd., "Enhanced bactericidal and in vivo wound healing potential of biosynthesized zinc oxide nanoparticles from psyllium mucilage," *Applied Organometallic Chemistry,* p. e6923, 2022.

[150] J. E. Kim, J. Lee, M. Jang, M. H. Kwak, J. Go, E. K. Kho, vd., "Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes," *Biomaterials science,* vol. 3, pp. 509-519, 2015.

[151] G. A. Seisenbaeva, K. Fromell, V. V. Vinogradov, A. N. Terekhov, A. V. Pakhomov, B. Nilsson, vd., "Dispersion of tio2 nanoparticles improves burn

wound healing and tissue regeneration through specific interaction with blood serum proteins," *Scientific reports,* vol. 7, pp. 1-11, 2017.

[152] S. Mandla, L. Davenport Huyer, ve M. Radisic, "Multimodal bioactive material approaches for wound healing," *APL bioengineering,* vol. 2, p. 021503, 2018.

[153] M. F. Chellat, L. Raguž, ve R. Riedl, "Targeting antibiotic resistance," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 55, pp. 6600-6626, 2016.

[154] C. J. Von Wintersdorff, J. Penders, J. M. Van Niekerk, N. D. Mills, S. Majumder, L. B. Van Alphen, vd., "Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer," *Frontiers in microbiology,* vol. 7, p. 173, 2016.

[155] N. Høiby, O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. j. Song, C. Moser, P. Ø. Jensen, vd., "The clinical impact of bacterial biofilms," *International journal of oral science,* vol. 3, pp. 55-65, 2011.

[156] C. Kong, H.-m. Neoh, ve S. Nathan, "Targeting staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy," *Toxins,* vol. 8, p. 72, 2016.

[157] M. Monaco, F. Pimentel de Araujo, M. Cruciani, E. M. Coccia, ve A. Pantosti, "Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of staphylococcus aureus," *Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis,* pp. 21-56, 2017.

[158] S. Purrello, R. Daum, G. Edwards, G. Lina, J. Lindsay, G. Peters, vd., "Meticillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets," *Journal of global antimicrobial resistance,* vol. 2, pp. 61-69, 2014.

[159] M. Frieri, K. Kumar, ve A. Boutin, "Antibiotic resistance," *Journal of infection and public health,* vol. 10, pp. 369-378, 2017.

[160] R. Rathinakumar ve W. C. Wimley, "High-throughput discovery of broad-spectrum peptide antibiotics," *The FASEB journal,* vol. 24, pp. 3232-3238, 2010.

[161] Y. Chen, M. T. Guarnieri, A. I. Vasil, M. L. Vasil, C. T. Mant, ve R. S. Hodges, "Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α-helical antimicrobial peptides," *Antimicrobial agents and chemotherapy,* vol. 51, pp. 1398-1406, 2007.

[162] C. Zhou, M. Jiang, X. Ye, X. Liu, W. Zhao, L. Ma, vd., "Antibacterial activities of peptide hf-18 against helicobacter pylori and its virulence protein caga," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics,* vol. 28, pp. 1-12, 2022.

[163] P. Davoodi, L. Y. Lee, Q. Xu, V. Sunil, Y. Sun, S. Soh, vd., "Drug delivery systems for programmed and on-demand release," *Advanced drug delivery reviews,* vol. 132, pp. 104-138, 2018.

[164] T. Nie, W. Wang, X. Liu, Y. Wang, K. Li, X. Song, vd., "Sustained release systems for delivery of therapeutic peptide/protein," *Biomacromolecules,* vol. 22, pp. 2299-2324, 2021.

[165] Y. F. Tan, L. L. Lao, G. M. Xiong, ve S. Venkatraman, "Controlled-release nanotherapeutics: State of translation," *Journal of controlled release,* vol. 284, pp. 39-48, 2018.

[166] J. H. Lee ve Y. Yeo, "Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers," *Chemical engineering science,* vol. 125, pp. 75-84, 2015.

[167] R. A. Siegel ve M. J. Rathbone, "Overview of controlled release mechanisms," *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery,* pp. 19-43, 2012.

[168] F.-L. Mi, C.-Y. Kuan, S.-S. Shyu, S.-T. Lee, ve S.-F. Chang, "The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release," *Carbohydrate polymers,* vol. 41, pp. 389-396, 2000.

[169] W. Wei, J. Li, X. Qi, Y. Zhong, G. Zuo, X. Pan, vd., "Synthesis and characterization of a multi-sensitive polysaccharide hydrogel for drug delivery," *Carbohydrate polymers,* vol. 177, pp. 275-283, 2017.

[170] S. Bhaladhare ve D. Das, "Cellulose: A fascinating biopolymer for hydrogel synthesis," *Journal of Materials Chemistry B,* 2022.

[171] J. M. Souza, M. Henriques, P. Teixeira, M. M. Fernandes, R. Fangueiro, ve A. Zille, "Comfort and infection control of chitosan-impregnated cotton gauze as wound dressing," *Fibers and Polymers,* vol. 20, pp. 922-932, 2019.

[172] A. Sood, M. S. Granick, ve N. L. Tomaselli, "Wound dressings and comparative effectiveness data," *Advances in wound care,* vol. 3, pp. 511-529, 2014.

[173] W. J. Ennis, W. Valdes, M. Gainer, ve P. Meneses, "Evaluation of clinical effectiveness of mist ultrasound therapy for the healing of chronic wounds," *Advances In skin & wound care,* vol. 19, pp. 437-446, 2006.

[174] S. Dhivya, V. V. Padma, ve E. Santhini, "Wound dressings–a review," *BioMedicine,* vol. 5, p. 22, 2015.

[175] S. O'Meara ve M. Martyn-St James, "Alginate dressings for venous leg ulcers," *Cochrane Database of Systematic Reviews,* 2013.

[176] A. J. Singer ve A. B. Dagum, "Current management of acute cutaneous wounds," *New England Journal of Medicine,* vol. 359, pp. 1037-1046, 2008.

[177] S. Sharma, K. L. Swetha, ve A. Roy, "Chitosan-chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds," *International journal of biological macromolecules,* vol. 132, pp. 97-108, 2019.

[178] G. Sandri, D. Miele, A. Faccendini, M. C. Bonferoni, S. Rossi, P. Grisoli, vd., "Chitosan/glycosaminoglycan scaffolds: The role of silver nanoparticles to

control microbial infections in wound healing," *Polymers,* vol. 11, p. 1207, 2019.

[179] S. Sharma, H. Madhyastha, K. L. Swetha, K. S. Maravajjala, A. Singh, R. Madhyastha, vd., "Development of an in-situ forming, self-healing scaffold for dermal wound healing: In-vitro and in-vivo studies," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 128, p. 112263, 2021.

[180] S. A. Shah, M. Sohail, S. A. Khan, ve M. Kousar, "Improved drug delivery and accelerated diabetic wound healing by chondroitin sulfate grafted alginate-based thermoreversible hydrogels," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 126, p. 112169, 2021.

[181] S. Yan, Q. Zhang, J. Wang, Y. Liu, S. Lu, M. Li, vd., "Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction," *Acta biomaterialia,* vol. 9, pp. 6771-6782, 2013.

[182] W. Kangjian, D. Nianhua, X. Shiwei, Y. Yichun, ve D. Weihua, "Preparation and characterization of collagen–chitosan–chondroitin sulfate composite membranes," *The Journal of Membrane Biology,* vol. 245, pp. 707-716, 2012.

[183] V. Patrulea, L. A. Laurent-Applegate, V. Ostafe, G. Borchard, ve O. Jordan, "Polyelectrolyte nanocomplexes based on chitosan derivatives for wound healing application," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* vol. 140, pp. 100-108, 2019.

[184] C. Costagliola, A. Del Prete, N. R. Winkler, P. Carpineto, M. Ciancaglini, R. Piccolomini, vd., "The ability of bacteria to use na-hyaluronate as a nutrient," *Acta ophthalmologica Scandinavica,* vol. 74, pp. 566-568, 1996.

[185] G. A. Carlson, J. L. Dragoo, B. Samimi, D. A. Bruckner, G. W. Bernard, M. Hedrick, vd., "Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens," *Biochemical and biophysical research communications,* vol. 321, pp. 472-478, 2004.

[186] H. J. Kwon ve Y. Han, "Chondroitin sulfate-based biomaterials for tissue engineering," *Turkish Journal of Biology,* vol. 40, pp. 290-299, 2016.

[187] G. Wu, F. Ma, Y. Xue, Y. Peng, L. Hu, X. Kang, vd., "Chondroitin sulfate zinc with antibacterial properties and anti-inflammatory effects for skin wound healing," *Carbohydrate Polymers,* vol. 278, p. 118996, 2022.

[188] Z. Lin, T. Wu, W. Wang, B. Li, M. Wang, L. Chen, vd., "Biofunctions of antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound," *International journal of biological macromolecules,* vol. 140, pp. 330-342, 2019.

[189] M. Tayeferad, S. Boddohi, ve B. Bakhshi, "Dual-responsive nisin loaded chondroitin sulfate nanogel for treatment of bacterial infection in soft tissues," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 193, pp. 166-172, 2021.

[190] A. Shukla, K. E. Fleming, H. F. Chuang, T. M. Chau, C. R. Loose, G. N. Stephanopoulos, vd., "Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces," *Biomaterials,* vol. 31, pp. 2348-2357, 2010.

[191] F. R. Tamara, C. Lin, F.-L. Mi, ve Y.-C. Ho, "Antibacterial effects of chitosan/cationic peptide nanoparticles," *Nanomaterials,* vol. 8, p. 88, 2018.

[192] A. M. Piras, G. Maisetta, S. Sandreschi, M. Gazzarri, C. Bartoli, L. Grassi, vd., "Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin b exert a long-term antibacterial activity in vitro against clinical isolates of staphylococcus epidermidis," *Frontiers in Microbiology,* vol. 6, p. 372, 2015.

[193] Y. Sun, Y. Liu, W. Liu, C. Lu, ve L. Wang, "Chitosan microparticles ionically cross-linked with poly (γ-glutamic acid) as antimicrobial peptides and nitric oxide delivery systems," *Biochemical Engineering Journal,* vol. 95, pp. 78-85, 2015.

[194] N. Cui, J. Qian, T. Liu, N. Zhao, ve H. Wang, "Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering," *Carbohydrate polymers,* vol. 126, pp. 192-198, 2015.

[195] L. Bi, Z. Cao, Y. Hu, Y. Song, L. Yu, B. Yang, vd., "Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* vol. 22, pp. 51-62, 2011.

[196] L. Gao, H. Gan, Z. Meng, R. Gu, Z. Wu, L. Zhang, vd., "Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 117, pp. 398-405, 2014.

[197] C. R. Correia, L. S. Moreira-Teixeira, L. Moroni, R. L. Reis, C. A. van Blitterswijk, M. Karperien, vd., "Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering," *Tissue Engineering Part C: Methods,* vol. 17, pp. 717-730, 2011.

[198] G. Gorczyca, R. Tylingo, P. Szweda, E. Augustin, M. Sadowska, ve S. Milewski, "Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan–collagen–gelatin scaffolds using chitosan–co2 solution," *Carbohydrate polymers,* vol. 102, pp. 901-911, 2014.

[199] F. Çalman, P. Pelit Arayıcı, H. K. Büyükbayraktar, M. Karahan, Z. Mustafaeva, ve R. Katsarava, "Development of vaccine prototype against zika virus disease of peptide-loaded plga nanoparticles and evaluation of cytotoxicity," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics,* vol. 25, pp. 1057-1063, 2019.

[200] C. You, Q. Li, X. Wang, P. Wu, J. K. Ho, R. Jin, vd., "Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation," *Scientific reports,* vol. 7, pp. 1-11, 2017.

[201] I. O. f. Standardization, "Iso 10993-5:2009," in *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, ed, 2009, p. 34.

[202] J. Cao, P. Wang, Y. Liu, C. Zhu, ve D. Fan, "Double crosslinked hlc-ccs hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing," *International journal of biological macromolecules,* vol. 155, pp. 625-635, 2020.

[203] J. Y. Shin, D. Y. Lee, B. Y. Kim, ve J. I. Yoon, "Effect of polyethylene glycol molecular weight on cell growth behavior of polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose/polyethylene glycol hydrogel," *Journal of Applied Polymer Science,* vol. 137, p. 49568, 2020.

[204] C. L. Rettinger, A. B. Fourcaudot, S. J. Hong, T. A. Mustoe, R. G. Hale, ve K. P. Leung, "In vitro characterization of scaffold-free three-dimensional mesenchymal stem cell aggregates," *Cell and tissue research,* vol. 358, pp. 395-405, 2014.

[205] Z. Li, B. Yuan, X. Dong, L. Duan, H. Tian, C. He, vd., "Injectable polysaccharide hybrid hydrogels as scaffolds for burn wound healing," *RSC advances,* vol. 5, pp. 94248-94256, 2015.

[206] Z. Ruan, C. Zhang, T. Shi, Z. Luo, Y. Zhang, Z. Cao, vd., "Gold nanoclusters-loaded hydrogel formed by dimeric hydrogen bonds crosslinking: A novel strategy for multidrug-resistant bacteria-infected wound healing," *Materials Today Bio,* p. 100426, 2022.

[207] A. S. f. T. a. Materials, "Astm e2149-13a," in *Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*, ed, 2015, p. 5.

[208] P. Li, Y. F. Poon, W. Li, H.-Y. Zhu, S. H. Yeap, Y. Cao, vd., "A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability," *Nature materials,* vol. 10, pp. 149-156, 2011.

[209] A. A. d. N. Pomari, T. L. d. A. Montanheiro, C. P. de Siqueira, R. S. Silva, D. B. Tada, ve A. P. Lemes, "Chitosan hydrogels crosslinked by genipin and reinforced with cellulose nanocrystals: Production and characterization," *Journal of Composites Science,* vol. 3, p. 84, 2019.

[210] M. L. Pita-López, G. Fletes-Vargas, H. Espinosa-Andrews, ve R. Rodriguez-Rodriguez, "Physically cross-linked chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications: A state-of-the-art review," *European Polymer Journal,* vol. 145, p. 110176, 2021.

[211] J. H. R. Llanos, L. C. d. O. Vercik, ve A. s. Vercik, "Physical properties of chitosan films obtained after neutralization of polycation by slow drip method," *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology,* vol. Vol.06No.04, p. 16, 2015.

[212] D. Simões, S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, P. Coutinho, A. G. Mendonça, ve I. J. Correia, "Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* vol. 127, pp. 130-141, 2018.

[213] A. Aguanell, M. L. del Pozo, C. Pérez-Martín, G. Pontes, A. Bastida, A. Fernández-Mayoralas, vd., "Chitosan sulfate-lysozyme hybrid hydrogels as platforms with fine-tuned degradability and sustained inherent antibiotic and antioxidant activities," *Carbohydrate Polymers,* p. 119611, 2022.

[214] M. Borgolte, O. Riester, I. Quint, F. Blendinger, V. Bucher, S. Laufer, vd., "Synthesis of a biocompatible benzophenone-substituted chitosan hydrogel as novel coating for peek with extraordinary strong antibacterial and anti-biofilm properties," *Materials Today Chemistry,* vol. 26, p. 101176, 2022.

[215] S. Hu, S. Bi, D. Yan, Z. Zhou, G. Sun, X. Cheng, vd., "Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing," *Carbohydrate polymers,* vol. 184, pp. 154-163, 2018.

[216] Z. Bagher, A. Ehterami, M. H. Safdel, H. Khastar, H. Semiari, A. Asefnejad, vd., "Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model," *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* vol. 55, p. 101379, 2020.

[217] B. Gupta, A. Arora, S. Saxena, ve M. S. Alam, "Preparation of chitosan–polyethylene glycol coated cotton membranes for wound dressings: Preparation and characterization," *Polymers for Advanced Technologies,* vol. 20, pp. 58-65, 2009.

[218] S.-M. Lien, L.-Y. Ko, ve T.-J. Huang, "Effect of pore size on ecm secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering," *Acta biomaterialia,* vol. 5, pp. 670-679, 2009.

[219] A. Gilarska, J. Lewandowska-Łańcucka, W. Horak, ve M. Nowakowska, "Collagen/chitosan/hyaluronic acid–based injectable hydrogels for tissue engineering applications–design, physicochemical and biological characterization," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 170, pp. 152-162, 2018.

[220] J. Venkatesan, R. Pallela, I. Bhatnagar, ve S.-K. Kim, "Chitosan–amylopectin/hydroxyapatite and chitosan–chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *International journal of biological macromolecules,* vol. 51, pp. 1033-1042, 2012.

[221] A. Galus, J.-M. Mallet, D. Lembo, V. Cagno, M. Djabourov, H. Lortat-Jacob, vd., "Hexagonal-shaped chondroitin sulfate self-assemblies have exalted anti-hsv-2 activity," *Carbohydrate polymers,* vol. 136, pp. 113-120, 2016.

[222] Y. Zhang, Q. S. Wang, K. Yan, Y. Qi, G. F. Wang, ve Y. L. Cui, "Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications," *Journal of biomedical materials research Part A,* vol. 104, pp. 1863-1870, 2016.

[223] W. Yan, H. Sun, W. Liu, ve H. Chen, "Preparation and properties of blended composite film manufactured using walnut-peptide–chitosan–sodium alginate," *Foods,* vol. 11, p. 1758, 2022.

[224] K. Lewandowska, A. Sionkowska, S. Grabska, ve B. Kaczmarek, "Surface and thermal properties of collagen/hyaluronic acid blends containing chitosan," *International journal of biological macromolecules,* vol. 92, pp. 371-376, 2016.

[225] K. Rinki ve P. Dutta, "Chitosan based scaffolds by lyophilization and sc. Co2 assisted methods for tissue engineering applications," *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry,* vol. 47, pp. 429-434, 2010.

[226] Y. Sudhakar, M. Selvakumar, ve D. K. Bhat, "Methods of preparation of biopolymer electrolytes," in *Biopolymer electrolytes: Fundamentals and applications in energy storage*, Y. Sudhakar, M. Selvakumar, ve D. K. Bhat, Eds., 1st edition ed: Susan Dennis, 2018, pp. 35-52.

[227] A. R. Fajardo, L. C. Lopes, A. O. Caleare, E. A. Britta, C. V. Nakamura, A. F. Rubira, vd., "Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 33, pp. 588-595, 2013.

[228] C. S. Nunes, K. B. Rufato, P. R. Souza, E. A. de Almeida, M. J. da Silva, D. B. Scariot, vd., "Chitosan/chondroitin sulfate hydrogels prepared in [hmim][hso4] ionic liquid," *Carbohydrate polymers,* vol. 170, pp. 99-106, 2017.

[229] I. Gatej, M. Popa, ve M. Rinaudo, "Role of the ph on hyaluronan behavior in aqueous solution," *Biomacromolecules,* vol. 6, pp. 61-67, 2005.

[230] E. Boedtkjer ve S. F. Pedersen, "The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer," *Annual review of physiology,* vol. 82, pp. 103-126, 2020.

[231] S. Nithya, T. Nimal, G. Baranwal, M. K. Suresh, C. Anju, V. A. Kumar, vd., "Preparation, characterization and efficacy of lysostaphin-chitosan gel against staphylococcus aureus," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 110, pp. 157-166, 2018.

[232] N. Rezaei, H. G. Hamidabadi, S. Khosravimelal, M. Zahiri, Z. A. Ahovan, M. N. Bojnordi, vd., "Antimicrobial peptides-loaded smart chitosan hydrogel: Release behavior and antibacterial potential against antibiotic resistant clinical isolates," *International journal of biological macromolecules,* vol. 164, pp. 855-862, 2020.

[233] M. Zhu, X. Hu, H. Liu, J. Tian, J. Yang, L. Li, vd., "Antibacterial peptide encapsulation and sustained release from chitosan-based delivery system," *European Polymer Journal,* p. 111640, 2022.

[234] Q. Fang, Z. Yao, L. Feng, T. Liu, S. Wei, P. Xu, vd., "Antibiotic-loaded chitosan-gelatin scaffolds for infected seawater immersion wound healing," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 159, pp. 1140-1155, 2020.

[235] J. Zhu, H. Han, F. Li, X. Wang, J. Yu, X. Qin, vd., "Peptide-functionalized amino acid-derived pseudoprotein-based hydrogel with hemorrhage control and antibacterial activity for wound healing," *Chemistry of Materials,* vol. 31, pp. 4436-4450, 2019.

[236] O. C. Gunes ve A. Ziylan Albayrak, "Antibacterial polypeptide nisin containing cotton modified hydrogel composite wound dressings," *Polymer Bulletin,* vol. 78, pp. 6409-6428, 2021.

[237] V. O. Fasiku, C. A. Omolo, N. Devnarain, U. H. Ibrahim, S. Rambharose, M. Faya, vd., "Chitosan-based hydrogel for the dual delivery of antimicrobial agents against bacterial methicillin-resistant staphylococcus aureus biofilm-infected wounds," *ACS omega,* vol. 6, pp. 21994-22010, 2021.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. N. Boncukcu, B. Akgul, I. Akmayan, H. Berber, E. S. Abamor, T. Ozbek vd, “Biyoaktif doku iskelesi üretimi ve antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi”, 5th Int. Conf. on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022), 23-25 Aralık 2022. Ankara, Türkiye. [Online].

Makaleler

1. N. Boncukcu, B. Akgul, I. Akmayan, H. Berber, E. S. Abamor, T. Ozbek, vd., "Design of a bactericidal hydrogel scaffold containing genipin crosslinked HF-18 peptide," *Biotechnology Progress,* p. e3314, 2022.

Projeler

1. Prof. Dr. Serap Derman, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (YTÜ-BAP) Çok Disiplinli Araştırma Projesi (ÇAP) FCD-2021-4266, “İki farklı yöntemle osteoartrit tedavisinde kullanılabilecek doku iskelesi üretimi karakterizasyonu ve bu iskelelerin biyolojik etkinliğinin incelenmesi”, Araştırmacı, 29.04.2021.