

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ
BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI
PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

PharmaScar

PROJE ADI

Tıbbi Aromatik Bitki Ekstraktı ile Nano-Biyobozunur Yara Örtüsü

Filmi Geliştirilmesi

BAŞVURU ID

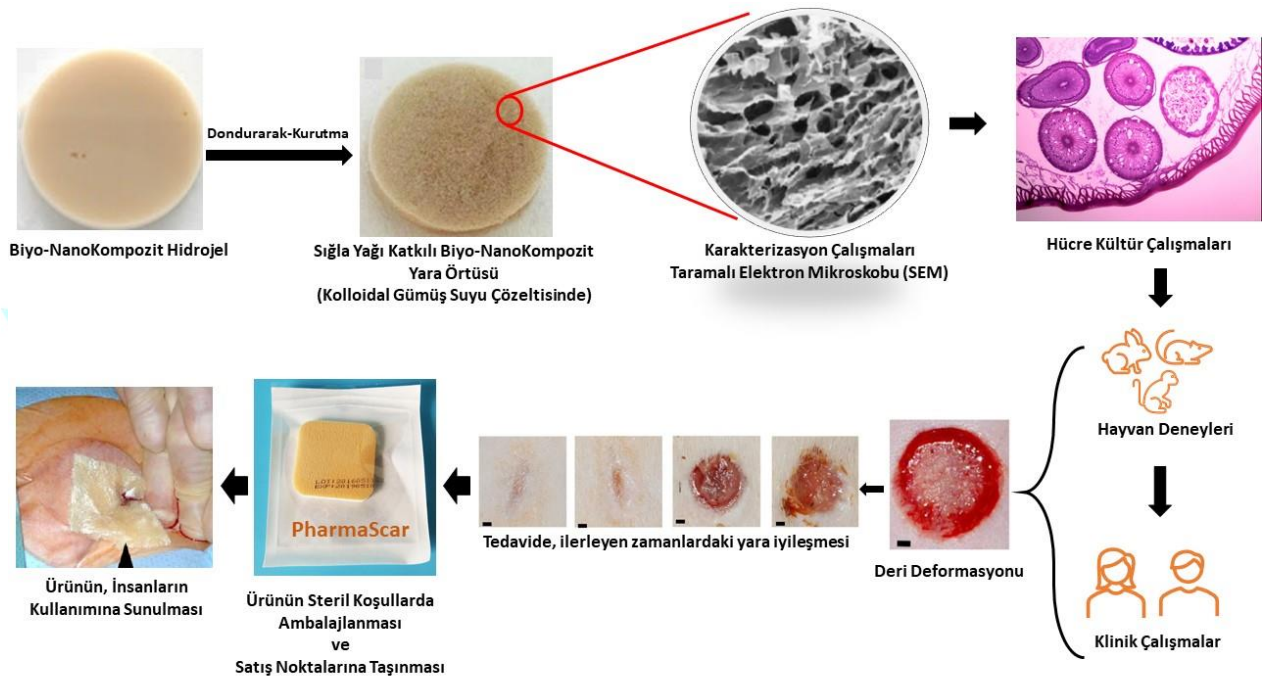
54890

KATEGORİ

Proje Kategorisi

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Her yıl milyonlarca insan ameliyat, travma veya yanıklardan dolayı ciddi fiziksel ve psikolojik etkiye sahip cilt yaralanmalarından muzdariptir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre, dünya çapında her yıl 11 milyondan fazla kişide herhangi bir sebeple meydana gelen deri yaralanmasının tıbbi bakım gerektirdiği bilinmektedir [1]. Bu deri yaralanmaları, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki yoksul insanlar için maliyet bakımından büyük bir yük oluşturmakta ve bu yük dengeli bir şekilde karşılanmamaktadır. Bu tedavilerin yüksek maliyetlerinin olmasının yanında tekrarlanan tedaviler uygulama yöntemlerinden dolayı tedavi görmekte olan insanlar için sancılı bir süreç başlatmaktadır [2].



Grafiksel Özet: Proje kapsamında yapılacak olan ve ileride planlanan çalışmaların genel özeti verilmiştir.

Cilt yara iyileşmesi, derinin yaralanmadan sonra kendini onardığı süreçtir. İyileşmenin temel amacı, daha fazla hasarı önlemek veya sınırlamak, yarayı enfeksiyona karşı temizlemek ve mühürlemek, doku gücünü ve mümkünse doku fonksiyonunu geri kazandırmaktır. Derideki yaralar, epidermal (dermisin sağlam kaldığı sığ) veya derin (dermisin hasar gördüğü; bu bazen tam kalınlıkta yara olarak da adlandırılır) olarak sınıflandırılabilir.

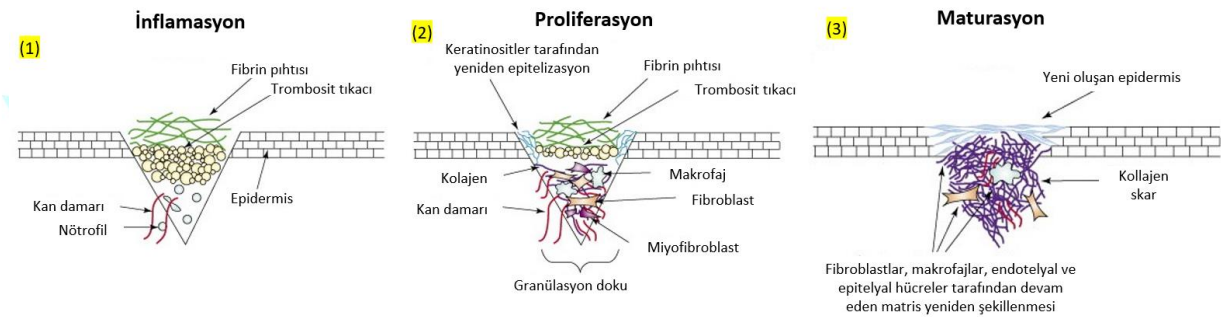
Yara İyileşme Sürecinin Aşamaları

Yara iyileşme süreci, örtüşen üç aşama ile karakterize edilebilir:

1. İnflamasyon-Yangı Safhası (1-5 gün)
2. Proliferasyon-Hücresel Çoğalma Safhası (5-14. gün)
3. Maturasyon-Doku Olgunlaşması Safhası (14. gün sonrası)

İnflamasyon, cilt yaralanmasından birkaç dakika sonra başlar; İlk inflamatuvar yanıt verenler, yerel kan damarlarından endotel boyunca göç eden kan yoluyla taşınan nötrofillerdir (bir tür beyaz kan hücresi veya lökosit). Daha sonra monositler (başka bir lökosit ve makrofaj

progenitör) benzer bir mekanizma ile yaraya girer. Proliferasyon aşaması tipik olarak sonraki beş ila on dört gün içinde ilerler ve cildin hem epidermal hem de dermal katmanları için onarım işlemlerinin başlatılmasını içerir. Fibroblastlar, makrofajlar ve vasküler dokular, yeni bir dermal kompozitin (granülasyon dokusunun) oluşumuna başlamak için koordineli olarak yaraya girerler. Fibroblastlar ve miyofibroblastlar, bu kompoziti içeren kolajen açısından zengin bağ dokuları oluşturur ve miyofibroblastlar da yara kontraksiyonuna katkıda bulunur. Eşzamanlı olarak, reepitelizasyon olarak adlandırılan bir süreçte, yara kenarındaki keratinositler, yeni bir epidermin dış tabakasını ayırt etmek için granülasyon dokusu üzerinde göç eder. İyileşen yara nihayet olgunlaşma evresine girer, bu süre zarfında granülasyon dokusu, kendisini oluşturan hücreler tarafından yeniden şekillenmeye devam eder. Bu son aşamada, kolajen gibi yapısal proteinlerin sentezi, altı ila on iki ay boyunca yükselmeye devam eder, ancak yara izi, en iyi ihtimalle, yaralanmamış derinin gerilme gücünün sadece %70'ine ulaşır [5]. Şekil 1'de yetişkin bir insanda bir cilt yarasının iyileşmesine ilişkin genel bir bakış sunulmaktadır.



Şekil 1.1. Cilt yarasının iyileşme sürecine ait görsel.

İdeal bir yara örtüsü, yara arayüzünde nemli bir ortam sağlamalı, gaz alışverişine ve oksijene izin vermeli, mikroorganizmalara karşı bir bariyer sağlamalı, yeterli mekanik özelliklere sahip olmalı ve yara yüzeyinden fazla vücut içi sıvısını ve toksik bileşenleri uzaklaştırmalıdır. Ayrıca alerjik, toksik olmayan ve travma yaratmadan tedaviyi destekleyen ekonomik bir ürün olmalıdır. Hem kronik hem de akut yaraların tedavisi için hidrojeller, poliüretan köpükler, şeffaf filmler gibi farklı formlarda yara örtüsü malzemeleri tasarlanmıştır. Bununla birlikte çoğu doğal biyomateryaller antimikrobiyal özellikleri, kolay işlenebilmeleri ve hücre proliferasyonu yeteniği ile yara iyileştirmesini hızlandırdıkları için daha çok tercih edilmektedir.



Şekil 1.2. Biyo-nanobozunur yara örtüsüne ilişkin örnek görsel.

Kitosan, biyolojik pansuman malzemelerinden olup biyopolimer yapısı ile biyouyumlu, biyobozunur, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, nemlendirici etki, ve yara iyileştirici özellikleri ile dikkat çekmektedir. Kitosan, matris görevi görür ve hücre çoğalmasını uyararak 3 boyutlu doku büyümesini destekler. Ayrıca kitosan ağrıyı azaltmak için sinir uçlarını bloke etmekte önemli bir rol oynar [3]. Kitosanın granülasyon (yaraların içinde oluşan ve onların iyileşmesini sağlayan ufak, yuvarlak, kabarcıklardan oluşan bağ doku üretmesi) dokusundaki inflamatuvar hücrelerin proliferasyonu ve aktivasyonu yardımıyla yara iyileşmesini desteklediği ve buna bağlı olarak yeniden epitelizasyonu ve dermal rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Ayrıca kitosan antibakteriyel özelliğiyle yara bölgesini enfeksiyondan korur [4]. Bu nedenle kitosan bazlı yara örtüleri yara iyileşmesi çalışmalarında tatmin edici bir ürün olma potansiyeline sahiptir.

Sığla, dünyada doğal olarak belli yerlerde yetişir. Türkiye’de daha çok Muğla’nın özellikle Köyceğiz, Marmaris, Dalaman ve Fethiye dolaylarında görülmektedir. Sığla yağı elde etme işlemi, ağaç gövdesine dikey olarak açılan damarların sıyırılmasıyla oluşan yağın toplanması, kaynatılması ve preslenmesinden oluşur. Sığla yağı, Muğla’da bitkilere dayalı geleneksel tedaviler kapsamında insan ya da hayvanlardaki cilt hastalıklarında, kesi, yara ve yanıklarda kullanılır. Eskiden sünet olan çocuklarda yara iyileştirici olarak kullanılmıştır [6]. Sığla ağacı çevresinde yaşayan hayvanların bile yaralarını, ağaçtan akan balsama sürerek iyileştirdikleri söylenir. Sığla yağı antiseptik, ağrı dindirici, vücuttan enfeksiyon ve iltihap attırıcı gibi özelliklere sahip olması ile cildimizde oluşan yaraların iyileşmesini kolaylaştırıcı özelliğe sahiptir.



Şekil 1.3. Sığla ağacı ve kendisinden üretilen sığla yağına ilişkin görsel.

Koloidal gümüş, bir sıvı içinde asılı olan küçük gümüş parçacıklarını ifade eder. Koloidal gümüş içindeki gümüş parçacıklarının büyüklükleri değişebilir, ancak bazıları çok küçük boyutlarda olmasından dolayı “nanopartiküller” olarak adlandırılırlar. Bu terim 100 nm’den küçük ve çıplak gözle görünmez oldukları anlamına gelir. Modern antibiyotikler geliştirilmeden önce, koloidal gümüş çeşitli enfeksiyonlar ve hastalıklar için çok amaçlı bir çare olarak kullanılmıştır. Gümüş suyunun son zamanlarda, bazı antibiyotikleri veya bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonları tedavi etmek için diğer tıbbi tedavilerin yerini alabileceği iddia edilerek popüler bir canlanma etkisi göstermektedir. Koloidal gümüş suyunun oral olarak alındığında veya bir yara üzerine temas ettirildiğinde geniş antibakteriyel ve antiseptik etkileri olduğu söylenir. Koloidal gümüşün etkilerinin, gümüş partiküllerinin büyüklüğüne, şekline ve bunların bir solüsyondaki konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Gümüş iyonları, vücut sıvıları gibi neme temas ettiğinde gümüş

parçacıklarından salınır. Bunlar, koloidal gümüşün tıbbi açıdan “biyolojik olarak aktif” özelliğini vermektedir [7].

Bu proje, kitosan, sıgla yağı ve koloidal gümüş suyunun birlikte kullanıldığı kompozit biyo-nanomalzemenin biyolojik, kimyasal ve mekanik özelliklerini araştırarak umut verici yara örtüsü filmi geliştirmeyi hedeflemektedir.

Bunun yanısıra, tüm bu çalışmalar sonucunda ortaya çıkacak olan inovatif yara örtüsü filmi patentli bir ürün haline getirmeyi amaçlamaktayız.

2. Problem/Sorun:

Yaygın travma biçimlerinden biri olan cilt yaralanmaları, küresel sağlık sistemi için uzun süredir devam eden bir sorun olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre, dünya çapında her yıl milyonlarca insanda herhangi bir sebeple meydana gelen cilt yaralanmalarının tıbbi bakım gerektirdiği bilinmektedir ve buna bağlı olarak ortaya çıkan yıllık cilt yaralanmalarını tedavi etme maliyeti keskin bir şekilde artmaktadır.

Bu alandaki problemler başlıca aşağıda verilmektedir:

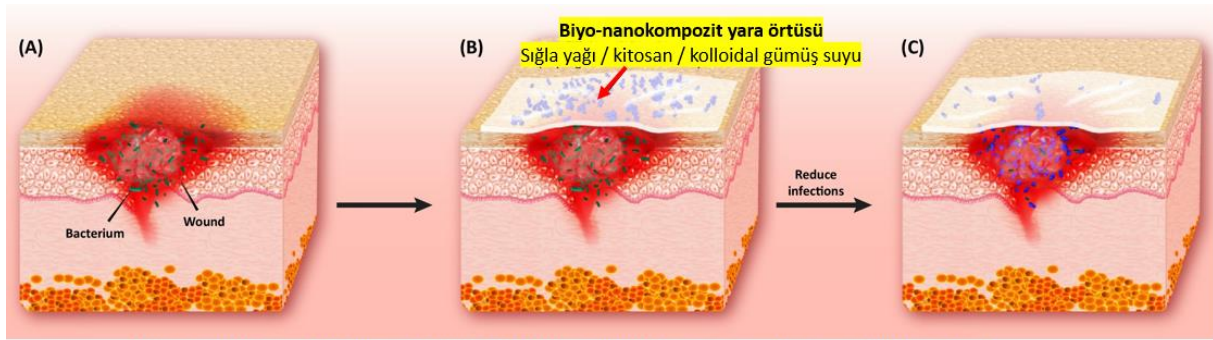
- Cilt yaralanması tedavilerinde, deforme bölge iyileşene dek sürekli pansuman değişimi yüzünden hasta için sancılı bir tedavi sürecinin olması.
- Ayrıca sürekli pansuman değişiminin doğaya kalıcı atık olarak dönerek küresel kirliliğe neden olması ve bu malzemelerin sürekli devam eden maliyeti ile ekonomik boyutta zarar vermesi.
- Ülkemizde bu alanda üretime yönelik bir çalışmanın bulunmaması, klasik tedavi yöntemlerinde dışa bağımlı olması.
- Dünyada benzer ar-ge çalışmaları için sıgla yağı gibi özgün ve ucuz malzemelerden ziyade üretimi çok uzun süren, yüksek maliyetli reaksiyonlarla elde edilen malzemelerin kullanılması. İstenen sonuçların alınamaması.

Bu alandaki mevcut sorunlara karşı alternatif bir tedavi yöntemine ihtiyaç vardır, bu çalışma ile bunu gerçekleştirmeyi amaçlamaktayız.

3. Çözüm

Yukarıda verilen problemlere paralel olarak aşağıda bunlara yönelik çözüm önerileri sunulmaktadır:

- Ürünün biyobozunur özelliği sayesinde deforme olan bölge ile direkt temas ederek zamanla orada hem bir ameliyat ipliği gibi kendi kendine bozunacak hem de proliferasyonu destekleyerek tedavi edecektir. Böylece tedavi süresince hasta konforu sağlanacaktır.
- Bu özelliği ile sürekli pansuman değişimi olmayacağı için hem doğaya atık olarak giden malzemelerin önüne geçilecek hem de sürekli malzemeye ihtiyaç duyulmayacağı için ekonomik olarak büyük avantaj sağlayacaktır.
- Bu proje ile ülkemiz adına, dünyaya sunulacak bir ürün olması sağlanacaktır.
- Proje kapsamında kullanılacak malzemelerin özgün ve tarihten gelen şifa niteliğine sahip sıgla yağı ve gümüş suyunun olması ile hem özgün hem de uygun bütçeli bir ürün olacaktır.



Biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin yaralı bölgeye uygulamasına ilişkin görsel

Şekil 3.1. Proje kapsamında üretilecek olan yara örtüsünün deforme bölgede uygulamasına ait örnek görsel.

4. Yöntem

Biyomalzemeler, geçmiş yıllardan günümüze büyük bir ilgi konusu olmuştur. Halihazırda birçok biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Sayısız türü olduğu ve ulaşılabilirliği bakımından kolaylıklar sağladığı için uygulamalarda büyük bir potansiyele sahip olmasıyla dünya çapında incelenmeye devam etmektedir. “Dokuları, organları veya bir işlevi tedavi eden, iyileştirmeyi hızlandıran veya değiştiren bir sistemin tamamı veya bir parçası olarak kullanılabilen doğal veya sentetik kökenli herhangi bir madde veya madde kombinasyonu” veya “tıbbi bir amaç için biyolojik sistemlerle etkileşime girmek üzere tasarlanmış herhangi bir madde” olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle kemik, kıkırdak, cilt ve organları kapsayan doku mühendisliği için iskele oluşturmada, ilaç dağıtım sistemlerinde, hücre kültürü çalışmalarında biyolojik ikameler olarak olası bir çözüm sunarlar. Biyomalzemeler arasında oldukça ilgi çeken, hidrojel adı verilen bir tür üç boyutlu (3D) yapı ikameleri dikkat çekmektedir.

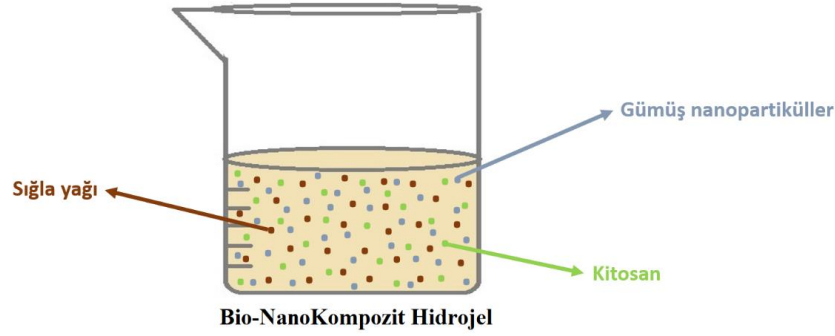
Hidrojel terimi, önemli miktarda suyu emebilen ve tutabilen bir sentetik ve/veya doğal polimer sınıfından elde edilen 3 boyutlu ağ yapılarını tanımlar. Hidrojeller, doğal dokuya benzer fiziksel özelliklere sahip şişmiş 3D viskoelastik polimerik ağlardır. Ağ, polimerlerin kovalent bağlarla veya kovalent olmayan etkileşimlerle çapraz bağlanmasıyla oluşturulur ve yapıları daha sonra nihai uygulamaya uyacak şekilde tasarlanabilir. Suyu emme ve tutma konusundaki benzersiz yetenekleri, hidrofilik yapıları tarafından verilir, emdikleri su miktarı, hidrojel yapısı, çapraz bağ yoğunluğu, çözeltinin bileşimi ve onu sentezlemek için kullanılan teknik gibi faktörlere bağlıdır. Doğal veya sentetik hidrojelleri sentezlemek için kullanılan malzemelere göre veya bunları sentezlemek için kullanılan yöntemlere göre fiziksel veya kimyasal çapraz bağlama olabilen çeşitli hidrojel türleri vardır. Genel olarak hidrojeller, onları

ilginç bir araştırma konusu yapan birçok özelliğe sahiptir: gerekli uygulama için en uygun jeli tasarlamak adına kimyasal ve fiziksel özelliklerinin manipüle edilebilmesi gerçeğinden dolayı çok yönlülüğe sahiptirler. Hidrojellerin şişmiş 3D ağlar oluşturma konusundaki benzersiz yeteneği, onlara molekülleri ve hücreleri yayma imkanı verir. Bununla birlikte doğal yumuşak dokuya benzerlikleri de biyomedikal uygulamalar için büyük ilgi görmektedir [8]. Eşsiz özellikleri şunları içerir: biyoyoumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük sitotoksosite, gözenekli 3D yapı iskelesi oluşturma ve fizyolojik çevreye benzerlikleri. Ayrıca, bu özelliklerin sağlanabilmesi için kullanılan her malzemenin en iyi özellikleri hedef alınarak biyo-nanokompozit yapıda hidrojel üreteceğiz.

4.1. Sıgla yağı katkılı kolloidal gümüş suyu ile kitosan hidrojelinin hazırlanması

Bu projede cilt yarası tedavisine yönelik kitosan, sıgla yağı ve kolloidal gümüş suyunu içeren biyo-nanokompozit hidrojel üretimi üzerine odaklanılmıştır. İlk aşamada toz formda kitosanın çözülerek hidrojel haline getirilmesi vardır. Standart olarak kitosan saf su içerisinde, çözülmesine katkıda bulunan asetik asit ilavesiyle çözündürülmektedir. Ancak biz burada çözücü olarak saf su yerine kolloidal gümüş suyunu kullanmayı amaçlamaktayız. Buradaki amaç, gümüşün antibakteriyel, yara bakımı/cilt sağlığını desteklemek, antiviral, anti-inflamatuar gibi tartışılmaz özelliklerinin olmasıdır. Kolloidal gümüş suyu içerisinde kitosan çözeltisi homojen form alana kadar karıştırıldıktan sonra sıgla yağının damla damla çözeltiye damlatılarak homojen bir çözelti oluşana kadar karıştırılır. Sıgla yağı, tarih boyunca insanlardan hayvanlara kadar yara tedavisinde kullanılan bir ürün olma özelliğindedir. Bu eşsiz özelliğiyle kompozit yapıda kullanılması için önemli bir yere sahip olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçta oluşan sıgla yağı/kitosan/kolloidal gümüş kompozit yapısının mikro ve nano boyutta birbirine daha kusursuz karışmaları ve bağlantı kurmaları adına çapraz bağlama yapılır. Çapraz bağlama için literatür de en çok tercih edilen glutraldehit kullanılır. Aşağıda en yalın haliyle, maddeler halinde sıgla yağı/kitosan/kolloidal gümüş biyo-nanokompozit hidrojelinin oluşturulması sıralanmıştır:

1. 250 ppm'lik gümüş suyuna kitosanın çözünmesine yardımcı olacak miktarda asetik asit eklenir.
2. Uygun sıcaklığa erişildikten sonra kitosan eklenerek homojen karışım oluşturulur.
3. Oluşan homojen karışıma damla damla sıgla yağı eklenir ve homojen olana kadar karıştırılır.
4. Sonuçta oluşan kompozit jelin çapraz bağlanması için glutraldehit eklenir.
5. Oluşan biyo-nanokompozit hidrojel, dondurarak-kurutma metodu uygulanana dek soğuk ortamda bekletilir.



Şekil 4.1. Biyo-nanokompozit hidrojel ve içeriğine ilişkin görsel görülmektedir.

4.2. Dondurarak-kurutma (liyofilizasyon) yöntemi ile biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin oluşturulması

Dondurarak-kurutma yöntemi, malzemeyi dondurarak, ardından basıncı azaltarak ve malzemedeki donmuş suyun süblimleşmesini sağlamak için ısı ekleyerek çalışır. Dondurarak kurutma, düzlemsel 3D geometrilerde yapı iskeleleri oluşturmak için kullanılan bir tekniktir. Burada, büyük bir yükseklik-genişlik oranına ve kontrollü bir gözenekli mikromimariye sahip sıgla yağı katkılı kolloidal gümüş/kitosan üç boyutlu yapı iskelesinin oluşturulması planlanmaktadır. Özellikle, böyle bir yapı oluşturmak için dondurarak-kurutmanın kullanılmasındaki amaç, iç bağlantıları ile oldukça gözenekli bir yapıya sahip üç boyutlu yara örtüsü filminin oluşturulmasıdır. Bu içsel bağlantılara sahip gözenekli mimari; hücre tutunmasında, yeni oluşan dokunun yapısal olarak desteklenmesinde, ekstrasellüler matriks oluşumunda ve kan dolaşımı için yer sağlanmasında kritik rol oynar.

Önceki aşamada ürettiğimiz biyo-nanokompozit hidrojel, içsel bağlantılara sahip gözenekli bir süngerimsi forma getirilmesi için dondurarak-kurutma işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem kısaca şöyle sıralanabilir:

1. Sıgla yağı/kitosan/kolloidal gümüş biyo-nanokompozit hidrojel içeriğindeki suyu dondurmak için bir gece boyunca $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donmaya bırakılır.
2. Donmuş olan malzeme liyofilizatör cihazına koyularak yüksek basınç altında, içeriğindeki donmuş su süblimleştirilerek uzaklaştırılır.
3. Sonuçta oluşan gözenekli, 3D yara örtüsü filmi karakterizasyon ve test çalışmaları için hazır hale gelir ve steril koşullarda saklanır.

4.3. Karakterizasyon çalışmaları

4.3.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi

Sıgla yağı/kitosan/kolloidal gümüş biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin gözenek boyutu, morfolojisi ve dağılımını araştırmak için SEM analizi yapılır. Analiz öncesi örnekler kaplama

cihazı ile argon gazı altında paladyum/altın levha ile kaplanır.

4.3.2. EDS (Enerji Dağılımı Spektrometresi) analizi

EDS, biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin içeriğinde hangi kimyasal elementlerin bulunduğunu belirlemek ve bunların nispi bolluğunu tahmin etmek için kullanılır.

4.3.2. EDS haritalama

Haritalama özelliği sayesinde biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin elde edilen görüntü üzerinde numunenin içerisinde bulunan elementlerin dağılımı hakkında bilgi sahibi olmak için kullanılır.

4.3.4. BET (Yüzey Alanı Ölçümü ve Gözeneklilik Dağılımı) analizi

Makro ve mikro boyutlarda gözenek içeren biyo-nanokompozit yara örtüsü filminin fiziksel absorpsiyon yöntemiyle absorblayıcı azot gazı kullanılarak numunenin yüzey alanının hesaplanması ve aynı zamanda numune içerisindeki gözenekli malzemenin boyutlarını ve dağılımlarını belirlemek amacıyla kullanılır.

4.4. Hücre kültür çalışmaları

Bu projede, sentezlenen yara örtüsü filmleri keratinosit hücre hattı kullanılarak hücre kültür çalışmalarına tabi tutulacaktır. Keratinosit hücre hattı ile 4, 7, 14 ve 21 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yapılacaktır. Keratinosit hücrelerinin, hazırlanan yara örtüsü filmi üzerindeki canlılığı, yapıya yapışması gözlemlenecektir.

Hücre kültür çalışmaları baştan sona özetlenecek olunursa:

1. Yara örtüsü filmleri kültür çalışmaları öncesinde farklı derişimde etil alkol çözeltileri içinde ve ardından UV ışın altında sterilize edilir.
2. Sterilize edilen örneklerin PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile yıkaması yapılır.
3. Örnekler steril hücre kaplarına taşınır ve üzerine besiyeri eklenir.
4. Besiyerindeki protein ve yapıların emilmesi için örnekler 1 gün boyunca, uygun koşullarda inkübatörde bekletilir.
5. Ertesi gün kültür ortamına keratinosit hücreleri ekilir.
6. Hücre ekimi farklı örnekler kullanılarak 4, 7, 14 ve 21 gün boyunca kültürlenir.
7. Kültür süresi biten ürünler besiyeri ortamından uzaklaştırılarak PBS ile yıkanır.
8. Örnekler fiksasyon işlemi için gluteraldehit ile muamele edilir.
9. Fikse edilen örnekler farklı derişimlerde etil alkol çözeltilerinde sterilize edilir.
10. Son olarak hücrelerin SEM altında gözlemlenmesinden önce örnekler HDMS (heksametildisilazan) ile dehidre edilir.

Hücre kültürü boyunca hücreler, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyeri ile iki günde bir ortamı değiştirilir. Kültür kapları, kültür boyunca 37 °C, %95 nem ve

%5 CO₂ ortamında, inkübatörde tutulur.

4.5. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite testleri, yara örtüsü filminin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak tercih edilir duruma gelmiştir. Keratinosit hücreler, yara örtüsü filmine maruz kaldığında toksik etki yaşarsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da proliferasyon yetilerini kaybedebilirler. Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, mazuriyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır.

Bu çalışmada keratinosit hücre hattındaki yara örtüsü filminin in vitro sitotoksisitesini belirlemek için MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromide) tahlili kullanılır.

Sitotoksisite testleri baştan sona özetlenecek olunursa:

1. Yara örtüsü parçaları, orbital çalkalayıcıda 24 saat boyunca 37 °C'de DMEM'de özümleir. 24 saat sonra ortamdan çıkarılarak süzülür.
2. Muamele edilmemiş hücrelere (kontrol) eşit miktarda özüt içermeyen ortam ilave edilir.
3. Hücreler (1.5 x 10³ hücre/kuyu), 96 oyuklu plakalarda 37°C'de gece boyunca inkübe edilir.
4. İnkübasyondan sonra hücreler, iskelelerin farklı konsantrasyonlarda, 24 saat daha tutulduğu bir ortama maruz bırakılır.
5. Daha sonra ortam çıkarılır ve her bir kuyucuğa MTT reaktifi ilave edilir ve aynı koşullarda 4 saat inkübe edilir.
6. Ardından, MTT dikkatlice çıkarılır ve her bir kuyucuğa DMSO (Dimetil Sülfoksit) ilave edilir. Absorbans, Epoch Mikroplaka Spektrofotometresi kullanılarak 590 nm'de ölçülür ve ortalaması alınır ve canlılık eğrileri çizilir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Cilt yaralanmalarında kullanılan mevcut ürünlerden farkı;

- Hastaya pansuman değişim sürecinde yaşadığı acılı süreçten kurtarması
- Ürünün maliyet açısından her kesimin rahat elde edebilecek olması
- Ürün için kullanılan sıgla yağının dünya da endemik bir tür olup Türkiye'de de yetişiyor olması ve böylece ürünün özgünlük ve iyileştirici özellik kazanması
- Ürün lifsi ve ağımsı üç boyutlu bir yapı oluşturduğu için cilt yaralarının iyileşme süresini artırması

- Ürün içinde bulunan koloidal gümüş suyu sayesinde antiseptik özellik kazandırılarak ürün enfeksiyonu önleyebilir olmasıdır.

Piyasada bulunan diğer ürünler;

- Geleneksel tarzda yara örtüleri; gazlı bez, yara bandı, bandaj, pamuk, yün gibi ürünler olup bu ürünler yara yayılımını engelleyen kuru örtülerdir. Bu sebeple yara iyileşmesinde kuru bir ortam sağladıkları için yaranın iyileşme süreci ve enfeksiyon riskini artırmaktadır. Yapacağımız ürünün farkı ise yara üzerinde nemli ve yaranın hava almasını sağlayan yapıda olacaktır. Bunun yanında yarayı enfeksiyon riskini minimum seviyeye düşürecek koloidal gümüş suyu da etkili olacaktır.
- Modern tarzda yara örtüler; film, hidrokolloid ve hidrojel formunda bulunan ürünlerdir. Bu ürünler ise yaranın pansuman sürecinde hastada psikolojik ve immünolojik sorunlardan dolayı hastaya acılı bir süreç yaşatmaktadır. Yapacağımız ürünün farkı ise hastada immünolojik bir acı yaratmadan biyobozunur bir malzeme olmasıdır. Bunun yanında bahsedilen bu ürünlerin avantajlı özellikleri alınarak tek bir ürün haline getirilmesi amaçlanmıştır.

6. Uygulanabilirlik

Projeyi hayata geçirmek için gerçekleştirilmesi gereken önemli noktalar;

- Biyo-nanobozunur yara örtüsü filminin üretilme amacı, çeşitli cilt yaralanmalarında kullanılan ürünlerin maliyetli olmasından ortaya çıkmıştır. Öncelikli amaç elde bulunan ürünlere göre maliyetini düşürmektir.
- Ürünün biyobozunur olması amaçlanmıştır. Bunun nedeni ise tedavi bitene dek sürekli tekrarlanan yara pansumanlarından dolayı acılı bir süreç yaşanmasını engellemektir.
- Yara örtüsü filminin özgünlüğünü sağlamak için Dünya’da yetişen endemik bir tür olan sığıla ağacının yağı kullanılmak istenmiştir. En önemlisi, sığıla yağının geçmiş tarihlere dayanan yara iyileştirme özelliğinden de yararlanılmak istenmiştir.
- Üründe kullanılan koloidal gümüş suyunun antiseptik özelliğinden yararlanarak ürünün yara üzerinde enfeksiyonel durumu azaltması sağlanmak istenmiştir.
- Ürün için kullanılan dondurarak-kurutma yöntemi ise ürüne hem üç boyutlu bir yapı hem içsel bağlantılara sahip gözenekli yapı hem de ağsı bir yapı oluşturmak için kullanılmıştır. Böylece yaranın yeterli oksijeni alması, ekstraselüler ortamı desteklemesi ve hücre proliferasyonunu destekleyerek tedaviyi teşvik etmesi sağlanmış olacaktır.
- Ürün için gerekli üretim, karakterizasyon ve test çalışmaları yapıldıktan sonra ürünün hayvan deneyi çalışmaları için daha sonra etik kuruldan izin alınarak hayvan deneylerin de yapılması hedeflenmektedir.
- Hayvan deneyleri, tamamlanan ürünümüzün gerekli onayları alınarak ve patent başvuru yapılarak ürünün piyasa da yer alması beklenmektedir.
- Ürünün piyasada yer alması için steril bir şekilde ambalajlanması planlanmaktadır. Bu steril işlemi çok önemlidir. Çünkü ürün, deforme bölgeye temas ettiği zaman dış ortamdan kapılabilecek mikroplar yüzünden enfeksiyona sebep olmasını engellemek istenmektedir.

- Ürünümüz tüm çalışmalarını başarı ile tamamladıktan sonra piyasada ticarileşebilir bir ürün olma potansiyeline sahiptir. Böylece ürünümüz diğer ürünlere kıyasla hem yerli ve özgün malzeme kullanımı hem seri üretim aşamasında düşük maliyet sağlaması hem de cilt yaralanmalarının iyileşmesi bakımından diğer ürünlerle rekabet edebilecek durumda olduğunu ve küresel tedaviye sunulabileceğini düşünmekteyiz.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tahmini maliyet tablosu ve proje zaman çizelgesi aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 7.1. Tahmini maliyet tablosu.

Alınması Önerilen Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımı Listesi (Sarf Malzemesi)				
Ürün	Birim Fiyatı (TL)	Adet/Miktar	Toplam Fiyat (TL)	Kullanım Amacı
Kitosan	662,29 (64,30 € * 10,3 ₺)	50 gr	662,29	Biyo-NanoKompozit yara örtüsü üretiminde hammadde olarak kullanılacaktır.
Sıgla Yağı	50	40 gr	50	Biyo-NanoKompozit yara örtüsü üretiminde hammadde olarak kullanılacaktır.
Kolloidal Gümüş Suyu	260	1000 ml (250 ppm)	260	Biyo-NanoKompozit yara örtüsü üretiminde hammadde ve çözelti sıvısı olarak kullanılacaktır.
Asetik Asit	231,75 (22,50 € * 10,3 ₺)	100 ml (glacial, ≥%99)	231,75	Kitosanı çözebilmek için kullanılacaktır.
Gluteraldehit	1761,3 (171,0 € * 10,3 ₺)	50 ml (Grade I, %25 in H ₂ O, for fixative)	1761,3	Biyo-NanoKompozit hidrojelinin çapraz bağlanmasında kullanılacaktır.
Etil Alkol	258,53 (25,10 € * 10,3 ₺)	1000 ml	258,3	Üretilen yara örtüsünü hücre kültür çalışmaları öncesinde steril etmek için ve hücre kültür çalışmaları sonrasında fiksasyon için kullanılacaktır.
PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi)	226,6 (22,20 € * 10,3 ₺)	500 ml	226,6	Yara örtüsü filminin hücre kültüründen önce ve sonra yıkanmasında, şişme testlerinde kullanılacaktır.
Lizozim	1936,4 (188€ * 10,3 ₺)	5 gr (protein ≥%90. ≥40,000 birim/mg protein)	1936,4	PBS ile karıştırılarak yara örtüsü filminin biyobozunurluk testlerinde kullanılacaktır
DMEM (besiyeri)	547,96 (53,2€ * 10,3 ₺)	1000 ml (suitable for cell culture)	547,96	Hücre kültür çalışmalarında besi yeri olarak kullanılacaktır.
DMSO (dimetil sülfoksit)	969,23 (94,1€ * 10,3 ₺)	5x5 ml (suitable for hybridoma, , ≥ %99,7)	969,23	Sitotoksite çalışmalarında çözücü olarak ve hücre pasajlamasında kullanılacaktır.
HMDS (heksametildisilazan)	674,5 (65,5€ * 10,3 ₺)	100 ml (grade, ≥ %99)	674,5	Kültüre edilmiş yara örtüsü filminin SEM görüntülenmesi öncesinde kullanılacaktır.
Au/Pd İle Kaplama	40 (1 set=1-3 adet)	6 set	240	Hücre kültürü yapılmadan önce morfolojik gözlem için ve farklı sürelerde hücre

				kültür yapıldıktan sonra hücre bağlanmasını, çoğalmasını gözlemek için yapılacaktır
SEM Analizi	250 (1 saat)	6 saat	1500	Hücre kültürü yapılmadan önce morfolojik gözlem için ve farklı sürelerde hücre kültürü yapıldıktan sonra hücre bağlanması, çoğalmasını gözlemek için yapılacaktır
EDS	250 (1 saat)	6 saat	1500	Hücre kültürü yapılmadan önce ve farklı sürelerde hücre kültürü yapıldıktan sonra malzeme içeriğindeki element ve yapıların tespitinde kullanılacaktır.
EDS Haritalama	250 (1 saat)	6 saat	1500	Hücre kültürü yapılmadan önce ve farklı sürelerde hücre kültürü yapıldıktan sonra malzeme içeriğindeki element ve yapıların dağılımının gözlemlenmesinde kullanılacaktır
Yüzey Alanı Ölçümü ve Gözeneklilik Dağılımı (BET)	400 (1 numune)	6 numune	2400	Hücre kültürü yapılmadan önce ve farklı sürelerde hücre kültürü yapıldıktan sonra malzemenin yüzey alanının hesaplaması ve aynı zamanda numune içerisindeki gözenekli malzemenin boyutlarını ve dağılımlarını belirlemede kullanılacaktır.

Not: Projenin her aşamayı başarı ile geçmesinin ardından seri üretim aşamasına geçildiğinde, çoklu ürün oluşturulurken ciddi oranda maliyetten kazanç sağlanacaktır.

Tablo 7.2. Tahmini proje zaman çizelgesi.

IP No	İş Paketlerinin Adı ve Hedef Süreleri		Kimler Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (AY)
1	Biyo-Nanokompozit Hidrojel Üretimi ve Dondurarak-kurutma Yöntemi ile Yara Örtüsü Filminin Oluşturulması		Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	2 Ay
2	Karakterizasyon Çalışmaları	Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	3 Ay
3		Enerji Dağılımı Spektrometresi (EDS)	Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	
4		EDS Haritalama	Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	
5		Yüzey Alanı Ölçümü ve Gözeneklilik Dağılımı (BET)	Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	
6	Hücre Kültür Çalışmaları		Ayşe Hale KARAMAN	3 Ay
7	Sitotoksosite Testleri		Ayşe Hale KARAMAN	1 Ay
8	Biyobozunurluk Testleri		Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	1 Ay
9	Şişme Testleri		Dicle ERDEN GÖNENMİŞ Esranur KIZILHAN	1 Ay
10	Sonuçların Değerlendirilmesi		Dicle ERDEN GÖNENMİŞ	1 Ay

		Esranur KIZILHAN Ayşe Hale KARAMAN	
--	--	---------------------------------------	--

Not: Tüm çalışmalar başarı ile tamamlandıktan sonra gelecekte planlanan hayvan deneyleri de yapılacaktır. Ayrıca hayvan deneyleri yapmak için alınacak etik kurul izinleri oldukça zaman almaktadır.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Projemiz hedef kitlesi olarak dünyada azımsanmayacak sayıda cilt yaralanmalarından muzdarip insanları ele almaktadır. Farklı cilt yaralanmalarına rağmen ürün kullanımı için herhangi bir sınıfsal kısıtlama bulunmamaktadır. Bu ürün düşük maliyetli ve kolay ulaşılabilir olmasıyla düşük ve orta gelirli yoksul insanları da eşit bir şekilde hedeflemektedir. Üretilecek biyo-nanokompozit yara örtüsü filmi direkt olarak hedef odaklıdır ve düşük maliyeti ve kolay ulaşılabilirliği ile cazip bir tedavi yöntemi haline gelecektir. Bundan dolayı ürünümüz her yaşta, her cinsiyette ve ekonomik gücü gözetmeksizin herkese tedavi sağlayabilecektir. Bu yüzden ürünümüz yaralı bölgede zamanla bozunurken içeriğindeki malzemelerin deforme bölgeye salınımı ile proliferasyonu destekleyerek tedavi sağlayabilecektir.

9. Riskler

Tablo 9.1. Projedeki riskler ve alternatif planlar

İP No	Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Biyobozunur yara film örtüsünde kullanılacak sıgla yağının iyileştirici etkiyi istenen düzeyde artırmaması	Bu durumda kullanılacak sıgla yağının kullanım miktarında artışa gidilebilir.
2	Biyobozunur yara örtüsü filminin steril bir şekilde ambalajlanmaması durumunda yara üzerinde enfeksiyon riskinin bulunması	Bu durumda hazırlanan malzemenin gerekirse sterilizasyon işlemleri iki kere tekrar edilmeli
3	Biyobozunur yara örtüsü filminin raf ömrünün kısa olması	Bunun için raf ömrünün uzatıcı etken maddelerin kullanılması

10. Kaynaklar

- [1] *Dünya Sağlık Örgütü: DSÖ EESC Küresel Veritabanı*. [7 Haziran 2021'de erişildi.]. mevcut http://www.who.int/surgery/eesc_database/en/
- [2] Lee RC. Injury by electrical forces: pathophysiology, manifestations, and therapy. *Curr. Probl. Surg.* 1997;34:677–764.
- [3] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S.V. Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnol. Adv.*, 29 (2011), pp. 322-337.
- [4] Altıok, D., Altıok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2227–2236.
- [5] P. Mignatti, et al. Proteinases and tissue remodeling, *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Plenum Press (1996), pp. 427-474.
- [6] T.C. Kültür ve Turizm Bakanlığı; Muğla İl Kültür ve Turizm Müdürlüğü, [11 Haziran 2021'de erişildi.]. mevcut <https://mugla.ktb.gov.tr/TR-73678/sigla-yagi-ve-gunluk-kabugu.html>
- [7] [11 Haziran 2021'de erişildi.]. <https://www.milliyet.com.tr/pembenar/gumus-suyu-nedir-faydolari-nelerdir-2744672>
- [8] Jabbari, E., Leijten, J., Xu, Q., & Khademhosseini, A. (2016). The matrix reloaded: the evolution of regenerative hydrogels. *Materials Today*, 19(4), 190–196.