

AKÜ FEMÜBİD 21 (2021) 045701 (922-926)

AKU J. Sci. Eng. 21 (2021) 045701 (922-926)

DOI: 10.35414/akufemubid.862875

Araştırma Makalesi / Research Article

Elastin Çözeltilerinin Viskoelastik Karakterizasyonları

Guler Bengusu TEZEL

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Gököy Yerleşkesi, 14030, Bolu

Sorumlu yazar e-posta: gulerbengusutezel@ibu.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0671-208X>

Geliş Tarihi: 17.01.2021

Kabul Tarihi: 31.07.2021

Öz

Anahtar kelimeler

Elastin; Reoloji;

Doğrusal

viskoelastiklik;

Doğrusal olmayan

viskoelastiklik

Bu çalışmada, izole ağırlıkça %0,1-%3 (w/w) elastin sulu çözeltilerinin viskoelastik karakterizasyonları incelenmiştir. Doğrusal ve doğrusal olmayan viskoelastik testleri reometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Düşük derişimlerde, Newtonumsu akış özelliği gösterirken, özellikle %2, %2,5 ve de %3' de artan elastik davranışları ile Newtonumsu olmayan viskoelastik akış özellikleri hakim olmaktadır. Bu kapsamda, eşik akış streslerine de yüksek derişimlerde rastlanmaktadır. Frekans aralığı 0.1-10 s⁻¹ de tutulan, elastik modül (G') ve viskoz modül (G'') derişimlerinin frekans derişimi ile doğrusal davrandığı gözlenmiştir. Artan derişimlerle, G' modülün G'' modülüne göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, %3' lük elastin çözeltilerinin dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak taramalı elektron mikroskopuyla, hidrojel yapılarının oluşumu gözlenmiştir.

Viscoelastic Characterizations of Elastin Solutions

Abstract

Keywords

Elastin; Rheology;

Linear viscoelasticity;

Non-linear

viscoelasticity

In this study, viscoelastic characterizations of isolated 0.1%-3% (w/w) elastin solutions were investigated. Linear and non-linear viscoelastic test were performed by using rheometer. At low concentrations, solutions behaves Newtonian flow, especially for 2%, 2.5%, 3% of elastin solutions have non-Newtonian viscoelastic flow properties. In this context, yield stress are also observed at high concentration values. It is indicated that elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') change linearly within the frequency range of 0.1- 10 s⁻¹. G' and G'' are found to be increased with increased concentration of elastin. In addition, 3% of elastin solutions using freeze dried method were analyzed with scanning electron microscopy, and hydrogelling formations are observed.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Elastin, son dönemde kozmetik dünyasında, şampuan, yaşlandırma karşıtı kremlerin yapısında sıklıkla kullanılan, inek, sığır kaslarından ya da çeşitli rekombinant gen teknikleri kullanılarak izole edilebilen bir proteindir (Kristensen ve Karsdal, 2016). Omurgalı dokularının ana yapısını oluşturan cildin, ciğerlerin, birçok kasın elastikliğini sağlayan fibröz proteinlerinden olan elastin proteini (EL) günümüzde izole ya da karışım hallerinde doku mühendisliği çalışmalarında oldukça yoğun ilgi görmektedir (We et al. 2020, Nieve et al. 2016). EL, kolajenden sonra cildin yapısında en fazla bulunan ve de cildin karakteristik esnekliğine önemli ölçüde katkı sağlayan proteindir (Mithieux et al. 2005,

Saxene et al. 2004). EL, sağlıklı bireylerde, tahmini olarak 70 yıllık bir yarılanma ömrüne (Patterson et al. 2002) ve de 300- 600 kPa arasında derişen mukavemete, 100-220% arasında derişen maksimum uzama değerlerine sahip olan önemli bir protein grubudur (Fung 1993). Oldukça yüksek geri dönme katsayılarına sahip elastin moleküllerinin davranışları rastgele zincir modeli ile açıklanabilmekte ve elastinin biyomekanik olarak kauçuk gibi davranabildiği gözlenmektedir (Saxene et al. 2004).

Malzeme ve doku bilimi açısından, biyo-baskılama yöntemiyle elastin üretimi ve de canlı dokuya nakli oldukça ilgi çeken çalışmalar arasında (An et al. 2014, Cung et al. 2015, Nuutila et al. 2015) yer alsa da, bunun yanı sıra, çözelti halindeki viskoelastik yapısının araştırılmasına dair az sayıda reolojik çalışma bulunmaktadır. Reolojik çalışmalarda izole elastinden çok karışım halinde elastin benzeri polipeptid (ELP) çözeltileri ve hidrojelleri kullanılmıştır.

Xu ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada sistein aminoasiti içeren elastinimsi polipeptid (Cys-ELP) çözeltisi ve hidrojeli kullanılmıştır. Cys-ELP çözeltileri düşük kayma hızlarında yüksek viskozite değerlerine sahiptir. Bu tür yüksek viskozite davranışlarının ara yüzey çarpaz bağlanma yapılarından dolayı kaynaklandığını ileri sürülmektedir. Öte yandan, yüksek kayma hızlarında ise bu tür yapılaşmaların kırıldığını ve de viskozitenin azaldığı gözlenmiştir. Sugawara-Narutaki ve diğ. (2019) ELP' ler üzerine yaptıkları çalışmada, çok düşük konsantrasyondaki nano dispersiyonlarında dahil elastik davranışların viskoz davranışlara göre daha hakim olduğu tespit edilerek, bunun sebebi nano küresel fiber parçacıkların uzunluk ve çap oranının yüksek olmasından kaynaklanmasına bağlanmıştır. Otto (2015), yaptığı tez çalışmasında, ELP çözeltilerinin reolojik davranışlarının 20-45 °C sıcaklık aralığında değişimlerine bakmışlardır. Artan sıcaklıkla elastik davranışlarının azaldığını öte yandan viskoz davranışlarının arttığı rapor edilmiştir. Cipriani ve diğ. (2019), elastinimsi biyoaktif hidrojeli üzerinde yaptıkları reolojik çalışmalarda G' (~960 Pa) değerlerinin G'' (~28 Pa) değerlerine göre oldukça yüksek olduğu tespit edilerek, kemik doku yenilenmesinde önemli rol aldığı gözlenmiştir. Contessotto ve diğ. (2021), yaptığı güncel çalışmada, elastinimsi hidrojelin zamana bağlı olarak 4 °C' de (G' ~50 Pa) düşük jelimsi özellik gösterirken, 37 °C' de artan elastik modül değerleri ile (G' ~750 Pa) jelimsi özelliklerinin hızlı bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir. Bu yüksek jelleşebilmenin koyun kalp dokusunda hızlı doku yenilenmesine ve mukavemet artışı sağladığını bulmuşlardır.

Sonuç olarak, izole elastin ya da elastin polipeptidin proteinimsi yapısı, yüksek mukavemetik özellikleri, biyolojik uyumlu malzeme olması yenilik ve de çığır

açıcı malzeme olarak görülmektedir. Güncel literatür çalışmalarında elde edilen bilgiler ışığında, elastin çözeltilerinin mekanik özelliklerinin araştırılmasında reoloji önemli bir araçtır. Bu kapsamda, bu çalışmada izole elastin proteinin doğrusal ve doğrusal olmayan viskoelastik testleri yapılmıştır. Burdan elde edilecek sonuçların, gelecekteki elastin içerekl malzeme tasarımlarında oldukça önem arz edeceği beklenmektedir.

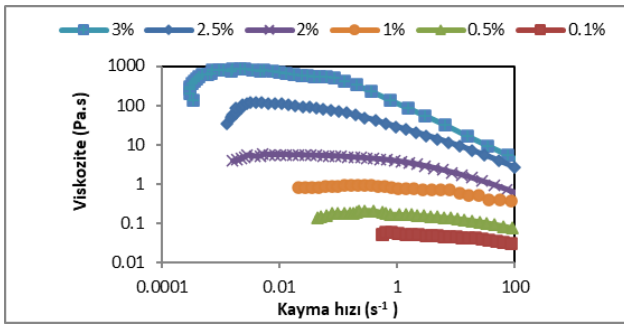
2. Materyal ve Metot

Elastin (Sigma Aldrich, 9007-58-03, soluble, lyophilized powder form) toz hali suda 25 °C de 48 saat karıştırıldıktan sonra, ağırlıkça (w/w) %0.1-%3.0 elastin çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan viskoelastik malzemelerin dinamik mekanik karakterizasyonları, dinamik kayma hızı ölçümleri ve düşük salınımlı osilasyon testleri stres kontrollü cone-plate reometresi (Malvern Kinexus Pro, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cone aparatının çapı 40 mm, açısı ise 4° olarak seçilmiştir. Ayrıca cone ve plate aparatları arasındaki boşluk 0.15 mm olarak ayarlanmıştır. Reometrenin sıcaklık probu hassasiyeti $\pm 0.1^\circ\text{C}$ dir. Ayrıca toz ve yüksek konsantrasyondaki (%3.0 w/w) elastinin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile görüntülerine bakılmıştır. SEM örneklerinin hazırlık aşamasında, çözeltiler 24 saat buzdolabında bekletildikten sonra, dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Tamamen suyundan uzaklaştığından emin olduktan sonra, numuneler altın kaplama Ion-coater KIC-IA COXEM (Daejeon, South Korea) kullanılarak SEM (15 kV lik JSM 6480-JEOL) görüntüleri elde edilmiştir.

3. Bulgular

Ağırlıkça farklı %0.1-%3.0 oranlarında hazırlanmış sulu elastin çözeltilerinin doğrusal ve de doğrusal olmayan viskoelastik analizleri yapılmıştır. Farklı derişimlerdeki elastin çözeltilerinin kayma streslerinin kayma hızına göre değişimini veren doğrusal olmayan viskoelastik test sonuçları Şekil 1 ve 2' de verilmiştir. Konsantrasyonun artmasıyla, Şekil 1' den görülebileceği üzere, ölçülebilen minimum kayma hızları artış göstermiştir. Bu durum, reometrenin tork limitasyonlarından

kaynaklanmaktadır. Örneğin, % 0.1 (w/w) elastin çözelti derişiminde yaklaşık olarak 0.5 s^{-1} kayma hızının altında, tekrar üretilebilen data sayısı az olduğundan $0.5-100 \text{ s}^{-1}$ aralığında çalışılmıştır. Ayrıca artan konsantrasyonla, stres ve kayma hızı arasındaki doğrusal olmayan davranış artış göstermektedir. Bu durum, elde edilen yüksek derişimdeki elastin çözeltilerinin Newtonumsu akış olmayan davranışından kaynaklanmaktadır. Buna benzer bir durum Yapıcı ve diğ. (2014) çalışmasında, yüksek derişimde suspense olan nano-akışkanın davranışına benzemektedir. Özellikle %2.5 ve %3.0 elastin derişimleri için, kayma hızları sıfıra yaklaşırken, akış için gerekli olan minimum eşik stres değerlerine sahip oldukları Şekil 1’de görülmektedir.

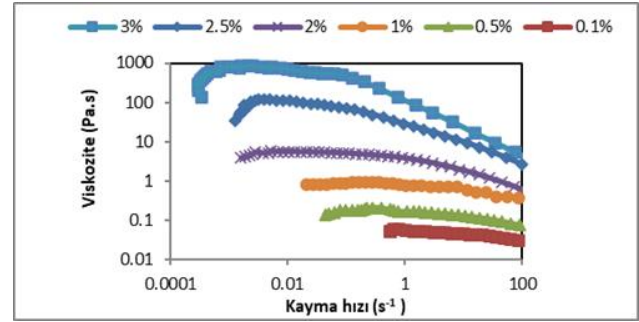


Şekil 1. Farklı derişimlerdeki elastin çözeltilerinin kayma streslerinin kayma hızına göre değişimi

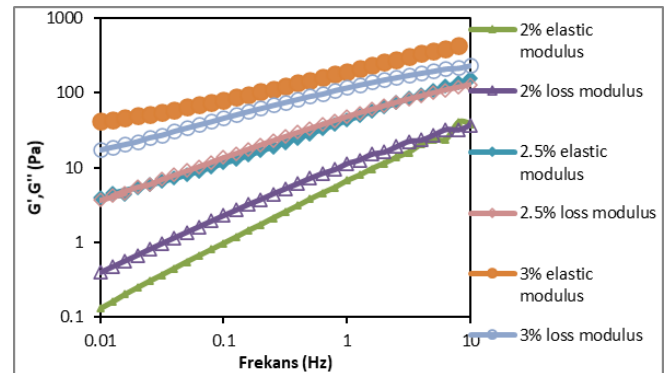
Şekil 2’de elastin viskozitesinin kayma hızı ile olan değişimi verilmiştir. Düşük derişimlerdeki elastin beklenildiği üzere daha düşük viskozitedir. Kayma hızı arttıkça, kayma incelmeye gösteren elastin çift sarmal konformasyonu ve iç içe geçmiş (entagle) molekül etkileşimleri, artan kayma hızı ile bozulmaktadır. Artan derişimlerde, sıfır kayma hızı bölgelerinde, ani viskozite artışına rastlanması moleküler yeniden düzenlemeden kaynaklanabileceği gibi, mevcut konvansiyonel reometrelerin torku limitasyonlarından da kaynaklanmaktadır (Tezel 2017).

Elastinin viskoelastik özelliklerini incelemek için elastik ve viskoz (loss) modüllerinin frekansla değişimleri Şekil 3’de incelenmiştir. Bu tür reolojik testler doğrusal reolojik testler olarak bilinmekte olup, öncesinde örnek yapısına zarar vermeyecek olan, güvenli liner viskoelastik bölge taraması yapılmaktadır (Yapıcı ve diğ. 2014, Tezel 2017) Bu çalışmada bu bölge %0.01-%0,5 gerginlik (strain) aralığında tespit edilmiştir. Bu çalışmada %0,3 gerginlik değerinde doğrusal viskoelastik testler gerçekleştirilmiştir.

Elastik ve viskoz modüllerinin frekansla değişimi artan ve de doğrusal şeklindedir. Bu tür davranışlar tipik jel davranışları olarak yorumlanabilmektedir. %2.0 elastin çözeltisinde viskoz özellikler hakimken, %2.5 oranında çözeltide ise elastiklikle dengeli seyreden viskoz özellikler hakimdir. %3’lük elastin çözeltisinde ise elastik özellikler daha ön plana çıkmaktadır. Bu durumun artan elastin derişimle ortamda daha fazla artan elastin molekülleri arasındaki Van der Waals ve hidrojen bağları gibi ikincil moleküler etkileşimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, elastin derişiminin yükselmesi ile çözeltilerdeki kompleks etkileşimler artmakta olup, elastik modül değerlerinde de Şekil 3’deki gibi artışlar görülmektedir.

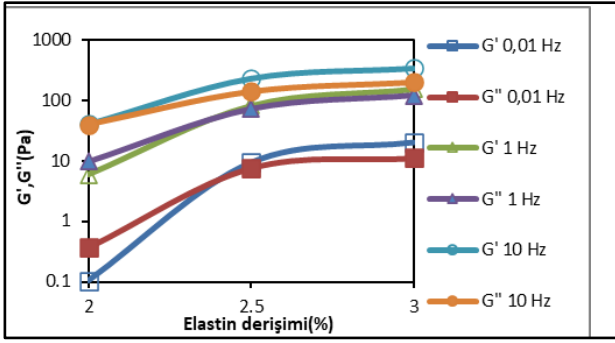


Şekil 2. Elastin viskozitesinin kayma hızı ile değişimi



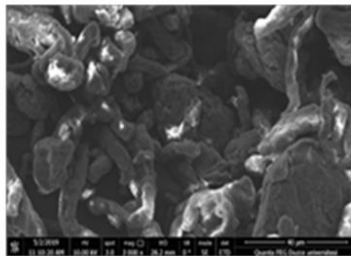
Şekil 3. Elastinin elastik ve viskoz modüllerinin frekansla değişimi

Doğrusal viskoelastik bölgesinde farklı frekans değerlerinde incelenen elastik ve viskoz modüllerin derişime bağlı değişimleri Şekil 4’de verilmiştir. Artan derişim değerleri ile artan elastik ve viskoz değerleri Şekil 3 ile de uyumludur. Yüksek frekans değerlerinde %2.5’lik ve %3.0’lık elastin viskoz davranışlara sahip olabilmektedir.

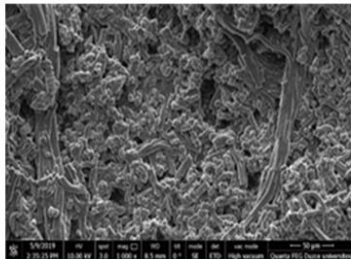


Şekil 4. Elastik ve viskoz modüllerinin elastin derişimi ile değişimi

Şekil 5' de elastin toz halinin ve de diğer derişimlere göre yüksek G' değerine sahip olan %3 lük jel halinin x1000 büyütme ile SEM görüntüleri verilmiştir. Jel halinde toza göre yapı daha sıkı ve de daha yoğun bir durumdadır. Jel halinde yapı globuler bir yapıdan daha çubuk yapısına dönmektedir. Bu durum daha kompleks olan elastin moleküllerinin arasına giren suyun yapıyı şişirip, hidrojele döndürmesinden kaynaklanmaktadır. Morfolojik yapıda gözlenen, sık yapı aynı zamanda güçlü jel dayanımı olarak da yorumlanabilmektedir (Tezel ve diğ. 2019).



(a) Toz elastin



(b) %3 lük elastin jel

Şekil 5. (a) Elastin (toz) SEM görüntüsü (b) %3 Elastin jelinin SEM görüntüsü

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, farklı derişimlerde hazırlanan elastin reolojisi incelenmiştir. Elde edilen temel sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Düşük derişim değerlerinde elastin Newtonumsu akış özelliği göstermektedir. Öte yandan, yüksek derişim değerlerinde viskozite değerleri artış göstermiş ve de artan kayma hızları ile azalmıştır.
- Düşük derişimlerde eşik akış streslerine rastlanmamıştır.
- Doğrusal viskoelastik testler sonucunda özellikle yüksek derişimlerde elastik davranışların, viskoz davranışlara göre daha fazla artış göstermiştir.
- Yüksek elastik modülüne sahip olan %3' lük elastinin SEM görüntülerinde çubuk yapısında şişen hidrojelleyen yapılar gözlenmiş ve de reolojik davranışlarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.
- Özellikle doku çalışmalarında, çığır açıcı malzeme olarak görülen elastinin gelecekte karışım halindeki reolojik davranışlarının incelenmesi planlanmaktadır.

5. Kaynaklar

- An B., Kaplan D. L., Brodsky B. 2014 Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering. *Frontiers in Chemistry*, **2** (40), 1–5.
- Chang, D. T., Chai, R., DiMarco, R., Heilshorn, S. C., Cheng, A. G. 2015 Protein-engineered hydrogel encapsulation for 3-D culture of murine cochlea. *Otology & Neurotology*, **36** (3), 531–538.
- Cipriani F., Palao B. A., Gonzalez F., Castrillo, V. A., Hernandez J.A., Alonso M., Barcia I.A. A., Sanchez A., Diaz V.G., Pena M.L, and Cabello, J., 2019. An elastin-like recombinamer-based bioactive hydrogel embedded with mesenchymal stromal cells as an injectable scaffold for osteochondral repair, *Regenerative Biomaterials*, **6**, 335-345.
- Contessotto P., Orbanic D., Da Costa M., Jin C., Owens, P., Chantepie S., Chinello C., Newell J., Magni F., Papy-Garcia D., Karlsson Niclas G., Kilcoyne M., Dockery P., Rodríguez-Cabello J. C., Pandit A. 2021. Elastin-like recombinamers-based hydrogel modulates post-ischemic remodeling in a non-transmural myocar, *Science Translational Medicine*, **13**, 53-80.
- Fung, Y.-C. 1993. *Bioviscoelastic Solids*. In *Biomechanics*; Springer: New York, NY, 1993; 242–320.

- Kristensen, J.H. Karsdal, M.A. 2016. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin Structure, Function and Biomarkers, Structure, Function and Biomarkers, Academic Press, New York, 197-201.
- Miranda-Nieves D., Chaikof L.E., 2017. Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues, *ACS Biomaterial Science Engineering*, 2017, **3**,694–711.
- Mithieux S. M., Weiss A. S., 2005. Elastin. *Adv. Protein Chemistry*, **70**, 437–461.
- Nuutila K., Peura M., Suomela S., Hukkanen M., Siltanen A., Harjula A., Vuola, J., Kankuri E. 2015. Recombinant human collagen III gel for transplantation of autologous skin cells in porcine full-thickness wounds. *Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine*, **9**, 1386–1393.
- Otto K. M., 2015. Characterization of Highly Concentrated Elastin-Like Polypeptide Solutions: Rheometric Properties and Phase Separation Analysis, Ms. C. Thesis, Cleveland State University, Ohio, 205.
- Patterson, C. E.; Gao, J.; Rooney, A. P.; Davis, E. C. 2002. Genomic Organization of Mouse and Human 65 kDa FK506-Binding Protein Genes and Evolution of the FKBP Multigene Family. *Genomics* , **79**, 881–889.
- Saxena T., Karumbaiah L., Valmikinathan, C. M. 2014. Proteins and Poly (Amino Acids), Elsevier Inc.: New York, 187-208.
- Sugawara-Narutaki A., Yasunaga S., Sugioka Y., and Le H.T., 2019. Rheology of Dispersions of High-Aspect-Ratio Nanofibers Assembled from Elastin-Like Double-Hydrophobic Polypeptides, *International of Journal of Molecular Science*, **24**, 2-12.
- Tezel G.B., 2017. Low shear rate rheology of Carbopol Solutions using MRI, *Material Science: Indian Journal*, **15**, 121-129.
- Tezel G., Uzuner, S., Akdemir Evrendilek G. 2019. Structural and Rheological Properties of Gelatin-Carrageenan Mixtures, *El-Cezeri Journal of Science and Engineering* , **6** , 525-532.
- Yapıcı K., Cakmak N.K, İlhan N., Uludag Y., 2014. Rheological characterization of polyethylene glycol based TiO₂ nanofluids, *Korea-Australia Rheology Journal*, **26**, 355-363.
- Xu D., Asai D., Chilkoti A., and Craig S.L. 2012. Rheological Properties of Cysteine-Containing Elastin-Like Polypeptide Solutions and Hydrogels, *BioMacromolecules*, **13**, 2315-2321.
- Wen Q., Mithieux S.M., and Weiss S. A. 2020. Elastin biomaterials in Dermal Repair, *Trends in Biotechnology*, **38**, 280-291.