



## Kollajen/Jelatin/Bal Esaslı Çift Katmanlı Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

### Fabrication of Double-layered Tissue Scaffolds with Collagen/Gelatin/Honey Blends and Its Characterization

Yaren Erdem<sup>1</sup> , Sahra Ezgi Süngü<sup>1</sup> , Ömer Aktürk<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, 71450 Kırıkkale, Türkiye

**Başvuru/Received:** 01/03/2022 **Kabul / Accepted:** 30/06/2022 **Çevrimiçi Basım / Published Online:** 31/07/2022  
**Son Versiyon/Final Version:** 31/07/2022

#### Öz

Bu projede, doğal, biyouyumlu ve biyobozunur polimerler olan kollajen/jelatin karışımından liyofilizasyon yoluyla gözenekli bir doku iskelesi üretilmiş, daha sonra bu katman üstüne elektro-eğirme yöntemi ile jelatin/polietilen oksit (PEO)/bal karışımıyla nanofibröz bir tabaka biriktirilmiştir. Doku iskelesi, gluteraldehit buharı ile muamele edilip sonrasında EDC/NHS kimyasallarıyla çapraz bağlanmıştır. Karakterizasyon için; Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, Termogravimetrik analiz (TGA), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), gözenek boyut dağılımı testi ve sulu ortamda degradasyon testleri yapılmıştır. Liyofilize katman, 1:1 (w/w) kollajen/jelatin karışımıyla üretilip, üst tabaka ise jelatin/PEO/bal karışımlarının en uygun oranı (2:2:2 w/w, %6 w/v toplam malzeme) seçilerek elektro-eğirme yöntemiyle bu katman üstüne toplanmıştır. İskelenin liyofilize katmanı 5–200 µm arasında geniş bir gözenek boyut dağılımına sahiptir. Çapraz bağlamadan sonra, gözenek boyut dağılımı (30–40 µm civarında yoğunlaşarak) daha homojen hale gelmiştir. SEM analizine göre, düzenli bir fiber boyut dağılımı ( $D_{ort} = 423 \pm 85$  nm) elde edilmiş ve çapraz bağlama ve yıkama işlemlerinden sonra az miktarda fiber kaynaşması meydana gelmiştir. TGA ve degradasyon sonuçlarına göre, çapraz bağlama sonrasında iskele sağlamlığı artmıştır. Sonuç olarak, geliştirilen doku iskelesi, sahip olduğu sağlam, gözenekli ve fiberli yapısıyla farklı doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir aday olabilir.

#### Anahtar Kelimeler

“Kollajen, jelatin, bal, elektro-eğirme, doku iskelesi”

#### Abstract

In this project, a porous tissue scaffold composed of collagen/gelatin, which are natural, biocompatible, and biodegradable polymers, was fabricated by lyophilization, then a nanofibrous gelatin/polyethylene oxide (PEO)/honey blend was accumulated onto this layer via the electro-spinning process. The tissue scaffold was cross-linked by treating with glutaraldehyde vapor followed by EDC/NHS reagents. For the characterization, Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectroscopy, Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM), pore size distribution analysis, and aqueous degradation tests were performed. While the lyophilized layer was fabricated by 1:1 (w/w) collagen/gelatin mixture, the top layer was electro-spun onto this layer by selecting the most appropriate blend ratio (2:2:2 w/w, %6 w/v total material). The lyophilized scaffold layer had a wide pore size distribution in the 5–200 µm range. After the cross-linking, pore size distribution became more homogenous (concentrating around 30–40 µm). According to SEM analysis, a uniform fiber size distribution ( $D_{ave} = 423 \pm 85$  nm) was obtained and after the cross-linking and rinsing processes a slight fiber fusion occurred. Regarding the TGA and degradation results, the scaffold robustness increased after the cross-linking. Overall, the developed tissue scaffold with its stable, porous and fibrous form could be a suitable candidate for different tissue engineering applications.

#### Key Words

“Collagen, gelatin, honey, electro-spinning, tissue scaffold”

## 1. Giriş

Kollajen hayvanlardaki ve insan vücudundaki temel yapısal proteindir ve hücre dışı matrisinin (ECM) biyolojik ve yapısal bütünlüğünü sağlama konularında önemli bir rol oynar ve dokulara fiziksel bir dayanak sağlar. Kollajenin biyomalzeme geliştirilmesinde ve doku mühendisliği uygulamalarında çok tercih edilen doğal bir polimer olması onun sahip olduğu biyoyumluluğu, biyobozunurluğu, gözenekli yapısı, iyi geçirgenliği ve düşük immünojenite özelliklerine bağlanabilir (Dong & Lv, 2016). Doku mühendisliği uygulamalarında arzulanan bütün bu önemli özelliklere sahip olmasına rağmen kollajen saf halinde mekanik olarak zayıftır ve sulu ortamda hızlı degradasyon göstermektedir (Dong & Lv, 2016). Bu sebeple kollajenin çapraz bağlanması için fiziksel ya da kimyasal yöntemler tercih edilebilmektedir. En yaygın olan fiziksel yöntemler, Morötesi (UV) ve gamma ışınımı ve dehidrotermal muameledir (Maslennikova vd., 2015; Takitoh vd., 2015; Wang vd., 2015). Ayrıca, genipin (Liu & Wang, 2013; Nagaoka vd., 2014), glutaraldehit (Yoshioka & Goissis, 2008), N-hidroxy-sulfosuccinimide (NHS) ile birlikte 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) gibi karbodiimidler, (Arafat vd., 2015; Vrana vd., 2007) kollajenin sulu ortam kararlılığını ve mekanik bütünlüğünü arttırmak için yaygın bir şekilde kullanılan biyolojik ya da sentetik çapraz bağlayıcılardan bazılarıdır.

Kollajene alternatif olarak kullanılan jelatinin kökeni de hidrolize kollajene dayanmaktadır ve doku mühendisliği alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, çünkü biyolojik kökenlidir, ayrıca biyoyumluluk, biyobozunurluk, immünojenik olmama, iyi hücre etkileşimi ve ticari olarak kolay bulunabilirlik, kolay işlenebilirlik, düşük maliyet gibi özellikleri mevcuttur (Campiglio vd., 2019). Ancak, kollajenin kısmi hidrolizi sonucu elde edilen jelatin doğal halinde (çapraz bağlı olmadığında) suda çözünen bir proteindir ve bu sebeple onu biyolojik ortamlarda suda çözünmeyen bir forma getirmek, mekanik özelliklerini geliştirmek ve kararlılığını arttırmak için çapraz bağlamak gereklidir (Campiglio vd., 2019). Jelatini çapraz bağlamak için birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Yine kollajende olduğu gibi genipin (Nguyen vd., 2016), glutaraldehit (Gomes vd., 2017) ve karbodiimidler (Skopinska-Wisniewska vd., 2021) gibi kimyasallar yaygındır.

Jelatinden nanofiberlerin elektro-eğrilmesi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında çok popülerdir, çünkü dokuların doğal hücre dışı matrisinin (ECM) biyokimyasal ve ultra yapısal özelliklerini taklit ederler (Campiglio vd., 2019). Bu sebeple, birçok çalışma jelatinden ya da jelatinin doğal ya da sentetik polimer karışımlarından, doku mühendisliği için elektro-eğrilmiş iskele geliştirmek üstüne odaklanmıştır (Dias vd., 2017; Gautam vd., 2014; Gomes vd., 2017). Bu çalışmalarda özellikle deri (Dias vd., 2017; Gautam vd., 2014; Gomes vd., 2017), kornea (Rose vd., 2019), kıkırdak (Aliakbarshirazi & Talebian 2017), sinir (Heidari vd. 2019) doku mühendisliği alanlarında başarılı sonuçlar elde edildiği söylenebilir.

Yukarıda bahsedilen bu elektro-eğrilmiş jelatin nanofiberlerin özellikleri içerisine doku mühendisliği açısından önemli bir katkı maddesi olan bal eklenerek daha da geliştirilebilir. Balın geçmişten bu yana gelen önemli yara iyileştirici potansiyeli olduğu farklı kaynaklarda bildirilmektedir (Martinotti vd., 2015; Ranzato & Martinotti, 2016). Bununla birlikte, balın antimikrobiyal etkinliği, immün düzenleyici etkisi, yaralı dokulardaki enflamasyonu başlatıp, baskılıyor olması ve deri hücrelerindeki (fibroblast ve keratinosit) olumlu etkileri (hücre göçü, kollajen organizasyonu, tekrardan epitelleşme vb) mevcuttur (Martinotti & Ranzato, 2018). Bal, bu bahsedilen antienflamatuar, antibakteriyel etkinliği ve yara tedavi edici etkisi gibi özellikleri sayesinde rejeneratif tıp araştırmacılarının ilgisini çekmektedir. Örneğin; Hixon vd. (2017a) içine %5 Manuka balı katılmış ipek fibroin kriyojel ve elektro-eğrilmiş iskeleleri antimikrobiyal etkinlikleri açısından kıyaslamıştır. Yine aynı araştırma grubu başka bir çalışmada (Hixon vd., 2017b) kronik kemik enfeksiyonları tedavisi için Manuka balı katılmış ipek fibroin kriyojeller ile çalışma yapmışlardır. Başka bir çalışmada, Manuka balı içeren poli(e-kaprolakton) (PCL) nanofiber iskeleler, fibroblastların iskele içine girişini arttırırken, gram negatif *E. coli* bakterisinin büyümesini baskılamıştır (Minden-Birkenmaier vd., 2015). Maleki vd. (2013), elektro-eğirme yoluyla polivinil alkol (PVA) ve İran-Tebriz balı kullanarak nanolifli ağ üretmiş ve antienflamatuar ilaç uygulaması denemiştir. Bunlarla birlikte balın, kitosan (El-Kased vd., 2017), jelatin (Wang vd., 2012) ve aljinat (Nazeri vd., 2015) gibi çeşitli biyopolimerler ile harmanlandığı çalışmalar da mevcuttur.

Torras vd. (2018), üç boyutlu hücre kültür modelleriyle epitel dokuların taklit edilmesi konusunu derinlemesine irdelemiştir. Buna göre; epitel katmanlar için işlevsel *in vitro* modeller, temel araştırma, hastalık modellemesi, ilaç keşfi ve doku replasmanı için anahtar öğedirler. Dokuların *in vivo* ortamda kompleks mimari yapısını taklit edebilen *in vitro* modeller için artan bir talep mevcuttur. Geleneksel önklinik modeller genel olarak iki boyutludur ya da hayvan modellerine dayanmaktadır. Bu modeller, erken biyolojik yanıtlar konusunda faydalı bilgiler sağlayabilirler ve yüksek verimli ilaç taraması için uygundur, ayrıca hayvan modellerinde canlıdaki dokuların etkileşimi ve karmaşık fizyolojisi de taklit edilmektedir. Ancak iki boyutlu modellerin düşük tahmin kapasitesi ve hayvan modellerindeki türe özgü farklılıklar ve etik kaygılar gibi sorunlar yüzünden kısıtlamalar mevcuttur. Bu sebeple 3 boyutlu *in vitro* modeller geliştirilmiştir ve bu modeller hücre biyolojisindeki, mikromühendislik, biyomalzeme ve biyofabrikasyon konularındaki gelişmelere dayanmaktadır. Tekrardan inşa edilmiş insan epitelyumu 3 boyutlu doku modelleri (kornea epiteli ya da deri epidermisi için) bu alanda en çok çalışılan konulardandır, çünkü hayvanlarda yapılan iritasyon testlerinin yerini başarılı bir şekilde alabilmektedirler (Lee vd., 2017).

Literatürde yapılan benzer çalışmalarda, balın nanofiberli iskeleler içine başarılı bir şekilde eklenip farklı doku mühendisliği uygulamaları için deneyler yapılmış olsa da bu çalışmada geliştirilen iki katmanlı doku iskelesi benzersizdir. İki katmanlı doku iskelesinin yapısı, deri ve kornea gibi bazı dokuların orijinal yapısını taklit etmektedir, yani gözenekli alt katman (deri dermisi ya da kornea stroması) ve daha sıkı fiberli üst katmandan (deri epidermisi ya da kornea epitelyumu) oluşmaktadır. Deri (epidermis) ve kornea gibi dokularda epitelyum, hücrelerin büyümesi için gözenekli ve katman katman farklılaşmış hücrelerden oluşan bir yapıdadır. Bu çalışmanın hipotezi de geliştirilecek iki katmanlı yapı ile epitel hücreler için bir taşıyıcı görevi görececek olan bir doku

iskelesi geliştirilmesidir. Üst katman (nanofiberli yapı), hücrelerin iskeleye ilk tutulumu ve hızlı proliferasyonu için uygun ağısı yapıda, alt katman (köpüksü yapı) hücre göçü ve farklılaşması için uygun gözenekli yapıda tasarlanmıştır. Doku iskelesini karakterize etmek için bu çalışma kapsamında bazı fiziksel ve kimyasal testler yapılmıştır: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, Termogravimetrik analiz (TGA), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), gözenek boyut dağılımı testi ve sulu ortamda hidrolitik ve enzimatik degradasyon testleri. Bu ön deneylerle elde edilen ilk sonuçlar, gelecekte yapılması planlanan hücre kültürü çalışmaları ve farklı doku iskelesi uygulamaları için (deri ve kornea gibi) önemlidir.

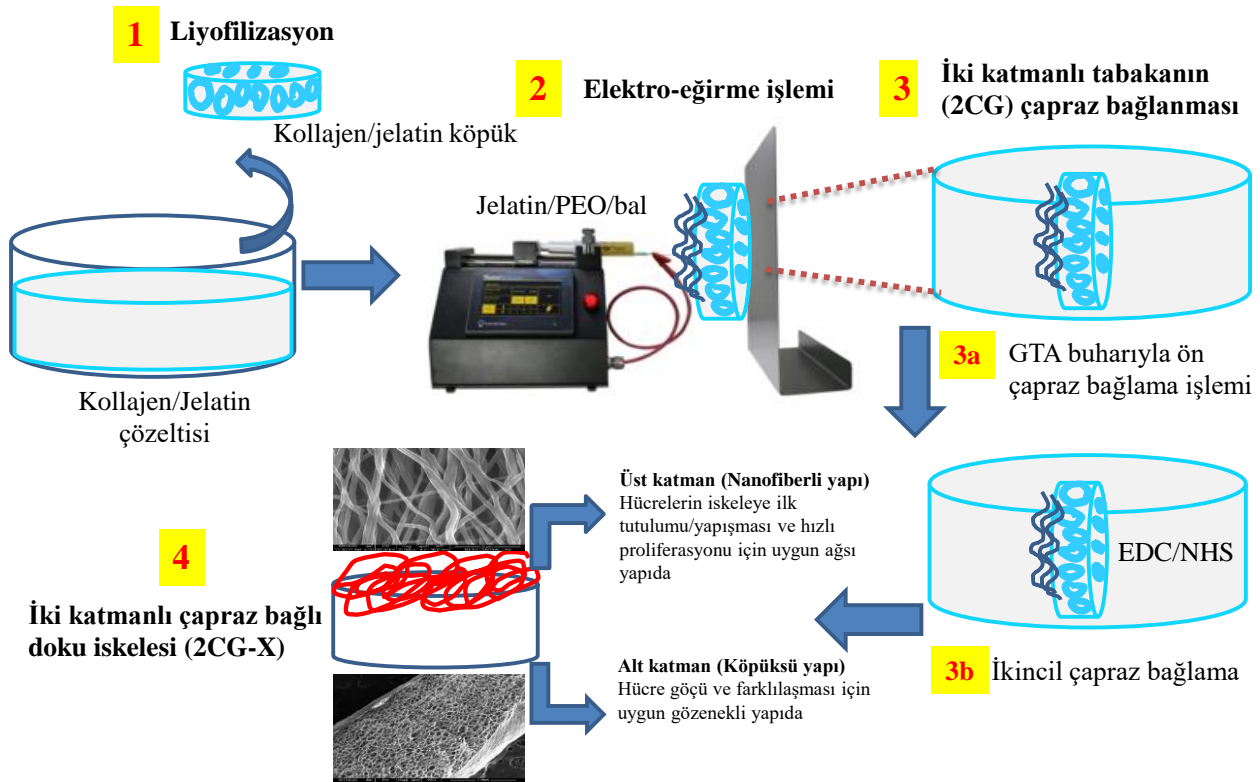
## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Kollajen (Tip I, öküz aşıl tendonundan elde edilmiş), jelatin (Tip A, domuzdan elde edilmiş), polietilen oksit (PEO, ortalama Mw ~4,000,000) glutaraldehit (Derece I, %25 H<sub>2</sub>O içinde), EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidehydrochloride), NHS (*N*-Hydroxysuccinimide), etanol [Absolute, ≥ 99.8% (GC)], asetik asit, fosfat tamponlu salin (PBS) tabletler, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır. Lokal bir marketten bal (Balpamak süzme çiçek balı) alınmıştır. Bütün diğer kimyasallar (hepsi analitik derecede) ve sarf malzemeler, aksi belirtilmediği müddetçe, ISOLAB (Germany) firmasından alınmıştır.

### 2.2. Doku iskelesinin üretimi

Bu çalışmada; iskele ana malzemesi (alt katman) olarak kollajen/jelatin, üst katmanda ise jelatin, PEO ve bal kullanılmıştır. Doku iskelesinin alt katmanı olan jelatin/kollajen köpüğü üretmek için öncelikle %3'lük asetik asit çözeltisi içinde jelatin (%1 w/v) ve kollajen (%1 w/v) çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından bu çözeltilerden eşit hacimde (5 mL) alınarak karıştırılmış, cam petri kalıplara dökülerek -80 °C buzdolabında 1 gün boyunca dondurulmuştur. Daha sonra liyofilizatörde dondurup-kurutma işlemiyle (yaklaşık -40 °C çember sıcaklığı, 0,07 mbar vakum basınçta) tamamen kuruyana kadar köpüksü yapı üretilmiştir. Nanofiberli yapının, yani doku iskelesinin üst katmanının, üretilmesi için elektro-eğirme yöntemi kullanılmıştır. Elektro-eğirme cihazı ile nanofibröz matris üretiminde optimum koşullar belirlenmiş ve bu koşullara göre elektro-eğirme işlemi yapılmıştır. Optimize edilen alet çalışma parametreleri; şırınga pompası akış hızı 0,6 mL/h, voltaj 8 kV, şırınga metal ucu toplayıcı arası mesafe 23,5 cm aralıklarında ayarlanmıştır. Belirlenen bu koşullarla sağlam ve nanofiberli yapıda iskeleler üretilmiştir. Bu nanofiberli iskeleler, toplayıcı olarak seçilen hareketli (1200 rpm) alüminyum disk üstüne sabitlenmiş liyofilize jelatin/kollajen köpükler üstünde 1 saat boyunca toplanmıştır. Üretilen iskelelerin sulu ortam dayanıklılıklarını artırmak için ilk olarak 45 dakika boyunca geniş bir kap içerisinde %3 (w/v) glutaraldehit (GTA) buharı ile ve daha sonra 2 saat boyunca EDC/NHS kimyasallarıyla (2 mg/mL: 1 mg/mL, %100 etanol içinde çözünmüş) çapraz bağlama işlemi yapılmıştır. Sonrasında, reaksiyona girmemiş GTA kalıntılarını temizlemek için 0,2 M glisin çözeltisi ile 1 saat boyunca muamele edilmiş ve son olarak da büyük bir behere saf su alınarak iyice yıkanmıştır. Bu işlemler bittikten sonra bütün iskeleler, liyofilizatörde dondurup-kurutma işlemine (yaklaşık -40 °C çember sıcaklığı, 0,07 mbar vakum basınçta) tabi tutulmuş ve +4 °C'de buzdolabındaki desikatör içinde bir sonraki testlere kadar saklanmıştır. Bütün yapılan test basamakları aşağıdaki gibi şematize edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. İki katmanlı doku iskelesinin üretilme basamakları.

### 2.3. Doku iskelesinin karakterizasyonu

#### 2.3.1. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi

Test gruplarının kimyasal yapısı; ATR Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi ile (ATR FT-IR) (IFS/66S, Hyperion 1000) Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda (ODTÜ Merlab) analiz edilmiştir. Her bir spektrum ZnSe ATR kristal hücresi üstünde transmittans modu içinde  $4 \text{ cm}^{-1}$  netliği ve  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$  spektral aralıkta 256 taramanın toplamıyla elde edilmiştir.

#### 2.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Test gruplarının morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu ile ODTÜ Merlab'da incelenmiştir. Analizden önce numuneler altın-paladyum ile kaplanmış ve iskelelerin tepeden ve yandan kesit mikrografi görüntüleri alınarak yüzey yapısı incelenmiştir.

#### 2.3.3. Gözenek boyut dağılımı analizi

İskelelerin gözenek boyut dağılımı, cıvalı porozimetre ile (Poremaster 60, Quantachrome Corporation, USA) düşük basınç analizi yapılarak (0–50 psi) ODTÜ Merlab'da gerçekleştirilmiştir. Kısaca, iskele gözenekleri basınç 0'dan (büyük gözenekler) 50 psi (nispeten küçük gözenekler) değerine arttırılarak cıva ile doldurulmuştur. Gözenek hacmine (gözenekler içine giren cıva hacmi/iskele ağırlığı) karşı ilgili gözenek boyutunu gösteren data porozimetre ile elde edilmiştir.

#### 2.3.4. Sulu ortamda hidrolitik ve enzimatik degradasyon testleri

Test gruplarının enzimli ya da enzimsiz sulu ortamlardaki degradasyonu (bozunum) incelenmiştir (Akturk & Keskin, 2016). Hidrolitik degradasyon (HD) için, kesilen numuneler ( $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ ) PBS (pH: 7,2, 0,01M, 5 mL) içine konmuş ve  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de 1 hafta inkübe edilmiştir. Enzimatik degradasyonu (ED) incelemek için ise, iskeleler  $60 \text{ }\mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg/mL}$ , d-H<sub>2</sub>O) tip I kollajenaz çözeltisi eklenmiş aynı inkübasyon ortamına (pH: 7,2, 0,01M, 5 mL) konulmuştur. Belirli inkübasyon periyotlarında (hidrolitik degradasyon için 1, 4 ve 7 gün; enzimatik degradasyon için ise 2, 4 ve 6 saat) iskeleler inkübasyon ortamından alınarak gravimetrik analiz ile kuru ağırlıkları ölçülmüş ve % degradasyon sonuçları aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır:

$$\% \text{Degradasyon} = \frac{W_d - W_t}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

$W_d$  test örneklerinin başlangıçtaki kuru ağırlığını,  $W_t$  ise her bir inkübasyon zamanı sonundaki kuru ağırlıkları temsil etmektedir.

#### 2.3.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

Test gruplarının TGA analizi ODTÜ Merlab'da yapılmıştır. İskeleler azot içeren atmosferde  $22\text{--}700 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklık aralığında dakikada  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  tarama hızıyla analiz edilerek termogramları çıkarılmıştır.

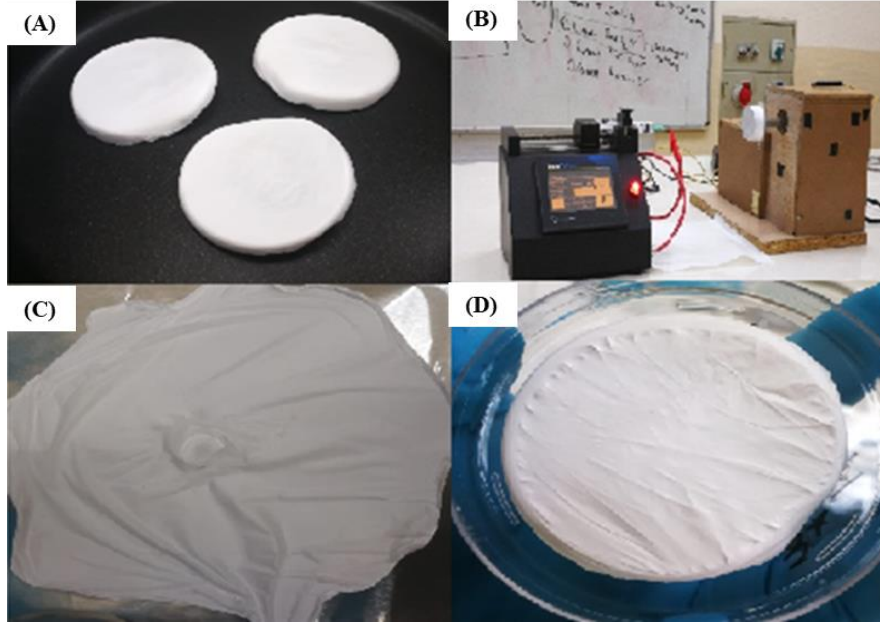
### 2.4. İstatistik analizi

Elde edilen bulgular, Excel paket program kullanılarak değerlendirilmiştir. Excel programındaki Veri Çözümleme Aracı kullanılarak ikili gruplar arasındaki istatistiksel kıyaslama eşit varyanslar varsayarak t-Test ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar  $p < 0,05$  değeri için anlamlı kabul edilmiştir. Data; ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

## 3. Sonuçlar ve Tartışma

### 3.1. Doku iskelesinin üretilmesi

Doku iskelesinin liyofilize köpük katmanını üretmek için eşit derişimde (1%) kollajen ve jelatin karışımları kullanılarak dondurup-kurutma işlemi sonunda sağlam ve homojen yapılar elde edilebilmiştir (Şekil 2A). Daha sonra bu köpük katman, elektro-egirme aletinin dönen alüminyum diski üstüne sabitlenerek üzerine nanolifli bir membran biriktirilmiştir. (Şekil 2B). Nanofiberli katman üretmek için jelatin/PEO/bal malzemelerinin farklı karışım oranları kullanılmış ve en başarılı olan iki ağırlık oranı, ilk olarak sadece metalik toplayıcı ekranda denenerek, 1:2:2 ve 2:2:2 (w/w) olarak bulunmuştur (Şekil 2C). En son olarak, jelatin/PEO/bal için 2:2:2 (w/w) oranı, kollajen/jelatin (1:1 w/w) köpük katmanı üstüne başarılı bir şekilde toplanabilmiştir (Şekil 2D). Bu iki katmanlı tabakanın birbirine sıkıca bağlandığı, Şekil 2A ve 2D'den net bir şekilde anlaşılmaktadır.



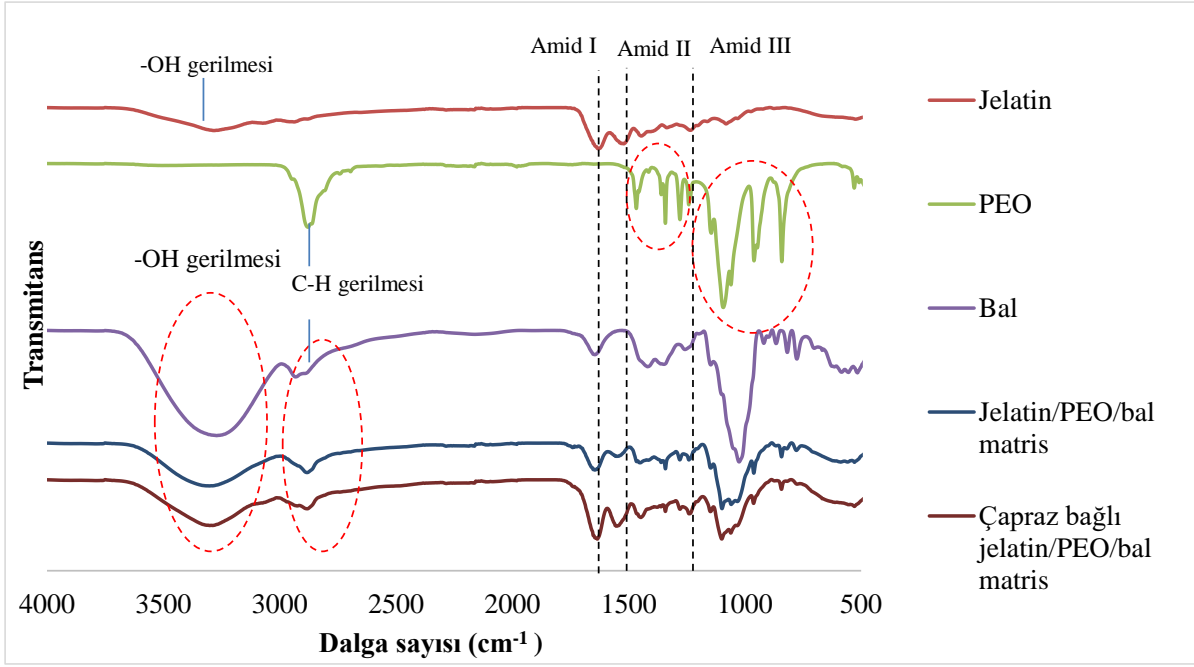
**Şekil 2.** (A) Kollajen/jelatin (1:1 w/w, %1 w/v toplam polimer) çözeltisiyle liyofilizatörde üretilmiş köpüksü yapı, (B) elektro-eğirme cihazı, (C) jelatin-PEO-bal (2:2:2 w/w, %6 w/v toplam malzeme) çözeltisi ile elde edilen nanofiber yapı örneği, (D) elde edilen iki katmanlı yapı (2CG) (köpüksü yapı üzerine nanofiber yapı sentezlenmiş numuneler).

### 3.2. Doku iskelesinin karakterizasyonu

#### 3.2.1. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi

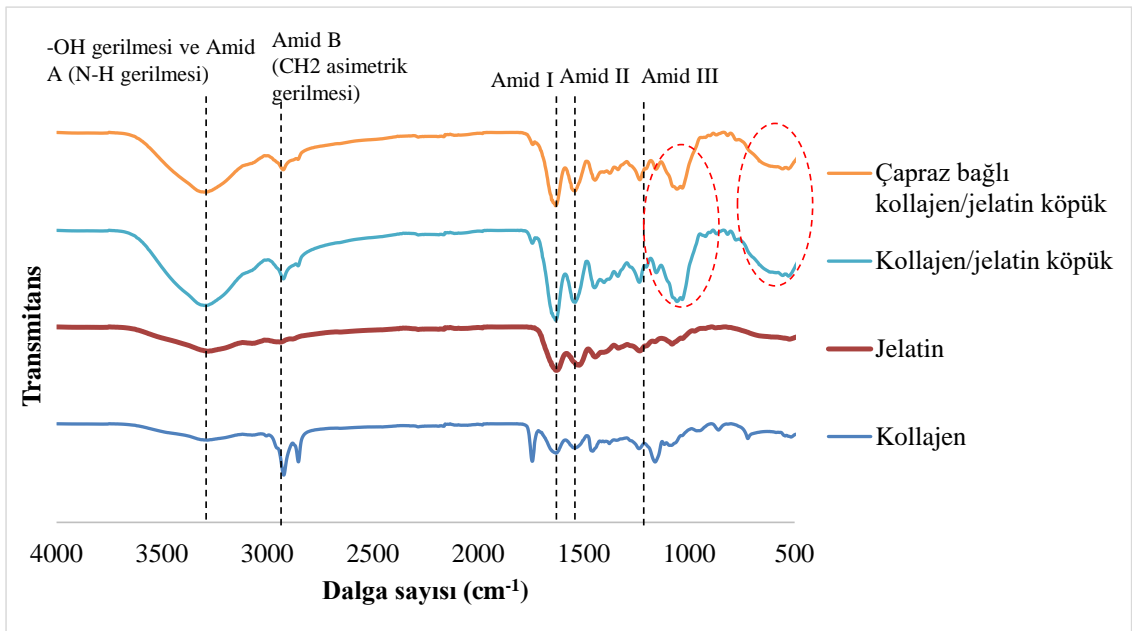
Şekil 3'te gösterildiği gibi çapraz bağlı olan ve olmayan nanofiber grupları ve grupları oluşturan tüm bileşenlere ait karakteristik pikler FTIR spektrumlarında gözlemlenmiştir. Jelatin/PEO/bal nanofiber gruplarında (çapraz bağlı olan ve olmayan),  $840\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen küçük pikler, karbonhidratlara ait C–O ve C–C gerilme titreşimlerini (Nguyen vd., 2019; Pataca vd., 2007),  $780\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen küçük pikler ise baldaki sakkarit konfigürasyonları için C–H bükülme titreşimlerini (Gok vd., 2015; Nguyen vd., 2019) işaret eder. Çapraz bağlama işleminden sonra bu piklerin şiddetinde hafif bir düşüş görülmesi, balın işlemler sırasında bir miktar sulu ortama özütlendiğini gösterir.  $550\text{ cm}^{-1}$  civarında görülen geniş pik yine baldaki şeker moleküllerine bağlı C–H bükülme titreşimlerini göstermektedir (Sarkar vd., 2018) ve nanofiber gruplarında da bu bant görülmektedir. Baldaki şekerlere (ya da su ve organik asitlere) bağlı OH grupları sayesinde nanofiberli grupların her ikisinde de  $3300\text{ cm}^{-1}$ 'deki (–OH gerilmesi) geniş ve derin pik belirgindir (Kozłowicz vd., 2020).  $1150\text{ cm}^{-1}$ – $950\text{ cm}^{-1}$  arasında görülen pikler karbonhidratlardaki C–H gerilme titreşimini, C–O–C grubu içindeki C–O gerilme titreşimini, C–OH grubu içindeki C–O gerilme titreşimini ve karbonhidrat yapısındaki C–C gerilme titreşimini gösterir (Kozłowicz vd., 2020). Balın nanofiberler içine katılmasıyla hidroksil gruplarına ait absorpsiyon piklerinde artış diğer çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Sarkar vd., 2018). Balda görülen  $2931\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler (C–H gerilmesi) şeker omurgasında bulunan  $-\text{CH}_2$  ve  $-\text{CH}_3$  fonksiyonel gruplarına aittir (Kozłowicz vd. 2020) ve yine her iki nanofiber grubunda belirgindir. Jelatindeki amid bant bölgeleri literatüre bakarak çıkarılmıştır (Dias vd., 2017). Balda ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) ve jelatinde ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ) üst üste binmiş halde bulunan –OH deformasyon titreşimi ve amid I bandına ait pik (C = O gerilme ve C–N gerilme titreşimi) şiddeti ve yeri çapraz bağlı olan jelatin/PEO/bal nanofiber grubunda ( $1634\text{ cm}^{-1}$ ) değişmiştir. Çapraz bağlı olmayan jelatin/PEO/bal nanofiber grubunda ise balınkiyle aynıdır. Sadece jelatinde görülen amid II için  $1526\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler (C–N gerilme ve N–H bükülme) nanofiber gruplarında belirgin bir şekilde sola kaymış ( $1550\text{ cm}^{-1}$  civarı) ve çapraz bağlı grupta şiddeti iyice artmıştır. Yine jelatine özgü amid III için  $1234\text{ cm}^{-1}$  (N–H bükülme ve C–N gerilme titreşimi) bantlarında görülen pikler fiber gruplarında yaklaşık aynı konumda ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ) bulunmuştur. Özellikle jelatinde doğal olarak görülen peptid bağlarıyla alakalı amid bantlarındaki değişimler (çapraz bağlama işleminden sonra bazı piklerde görülen şiddet ve konum değişiklikleri) buradaki kimyasal fonksiyonel grupların çapraz bağlamada görev aldığına işaret eder. Balda bulunan  $1419\text{ cm}^{-1}$  (C–OH grubundaki O–H deformasyonu ve alkenlerdeki C–H deformasyonu) piki fiberlerde yok olmuşken ve  $1348\text{ cm}^{-1}$  (C–OH grubundaki –OH deformasyonu) görülen pik (Kozłowicz vd., 2020), PEO'dan kaynaklı  $1342\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  asimetric bükülme) piki (Abdelrazek vd., 2018) ile üst üste binmiştir. Şekil üstünde de kesikli çizgi şeklinde daire içine alınan PEO'ya ait pikler fiberli grupta gözlemlenmiştir, yani PEO, işlemler sonunda yapıda hala bulunmaktadır. PEO için bant atamaları literatür bilgisine dayandırılmıştır (Abdelrazek vd., 2018).  $2878\text{ cm}^{-1}$ 'deki keskin bant metilen grubunun asimetric C–H gerilimine aittir. Diğer bantlar:  $1467\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  makaslama) ve  $1342\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  asimetric bükülme),  $1241\text{ cm}^{-1}$ 'deki nispeten küçük bant ( $\text{CH}_2$  simetric burulma),  $1145\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan absorpsiyon bandı (C–O–C gerilme),  $961\text{ cm}^{-1}$  (C–O gerilme hareketi ile  $\text{CH}_2$  rocking) ve  $841\text{ cm}^{-1}$ 'de ( $\text{CH}_2$  rocking hareketi) görülen bantlar olarak sıralanabilir.





Şekil 3. Nanofiberli iskele üst katmanı ve bunun bileşenlerinin FTIR spektrumları.

Şekil 4'te gösterildiği gibi kollajen ve jelatine ait karakteristik amid pikleri köpüklerin FTIR spektrumlarında görülmüştür. Kollajene tip I'e ait karakteristik absorpsiyon bantları:  $3286\text{ cm}^{-1}$ 'de (N-H grubu gerilme titreşimi),  $1631\text{ cm}^{-1}$ 'de (amid I bandıyla alakalı N-H bükülme titreşimi ile çiftlenmiş C = O gerilme titreşimi),  $1540\text{ cm}^{-1}$  (amid II bandıyla alakalı C-N gerilme titreşimine çiftlenmiş N-H bükülme titreşimi) ve  $1238\text{ cm}^{-1}$  (amid III bandıyla alakalı N-H deformasyon ve C-N gerilim titreşimi kombinasyon pikleri) olarak sıralanmıştır (Gautam vd., 2014). GTA buharıyla çapraz bağlama işlemi sadece nanofiberli kısmın alt köpük katmana daha homojen şekilde bağlanmasını sağlamıştır ve bu çapraz bağlama etkisi Şekil 3'te gösterilmiştir. EDC/NHS çapraz bağlama işlemi ise ana çapraz bağlama yöntemidir. Bu ikinci çapraz bağlama işleminden sonra, köpük katmanların (çapraz bağlı olan ve olmayan) spektrum sonuçlarında dikkate değer bir değişim olmamıştır, çünkü EDC/NHS sıfır uzunlukta bir çapraz-bağlayıcıdır. Benzer sonuçlar Skopinska-Wisniewska vd. (2021) ve Hoon Lee vd. (2019) çalışmalarında da görülmüştür. Köpük gruplarında  $1000$  ve  $500\text{ cm}^{-1}$  civarlarındaki bantlar (Şekil 4'te kırmızı kesikli daireler içine alınmıştır), yukarıda detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi köpük içine nüfuz etmiş baldan kaynaklıdır. FTIR için hazırlanan köpük numuneler iki katmanlı yapılardan alındığı için spektrumda bunlar da görülmüştür.

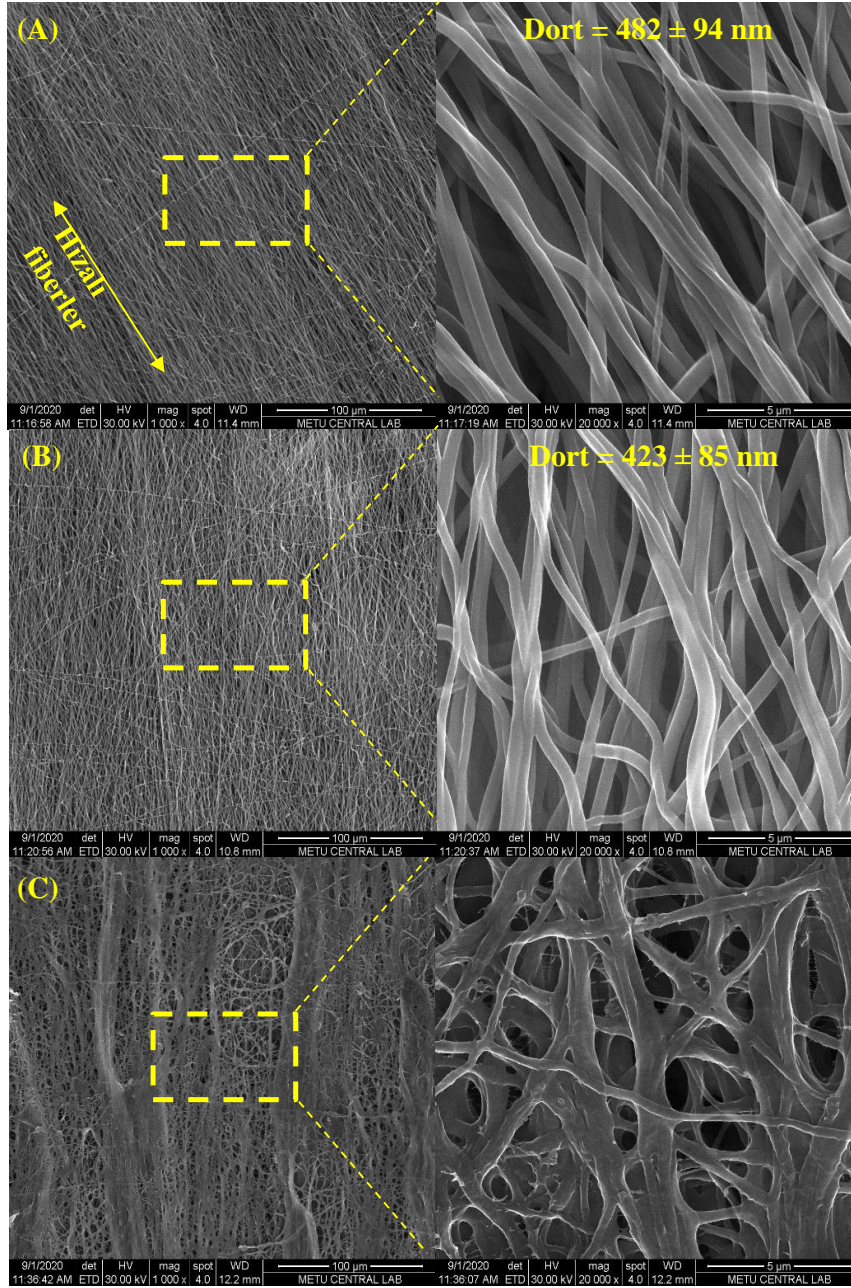


Şekil 4. Köpük yapıda iskele alt katmanı ve bunun bileşenlerinin FTIR spektrumları.

### 3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

SEM görüntülerine göre (Şekil 5A, 5B), iki farklı deney grubunda da nanofiber morfolojisi yoğun, düzleşmiş (şerit benzeri), düzgün boyut dağılımlı ve damla (boncuk) içermeyen yapıdadır. Farklı jelatin miktarlarıyla hazırlanan bu gruplarda  $400\text{--}500\text{ nm}$

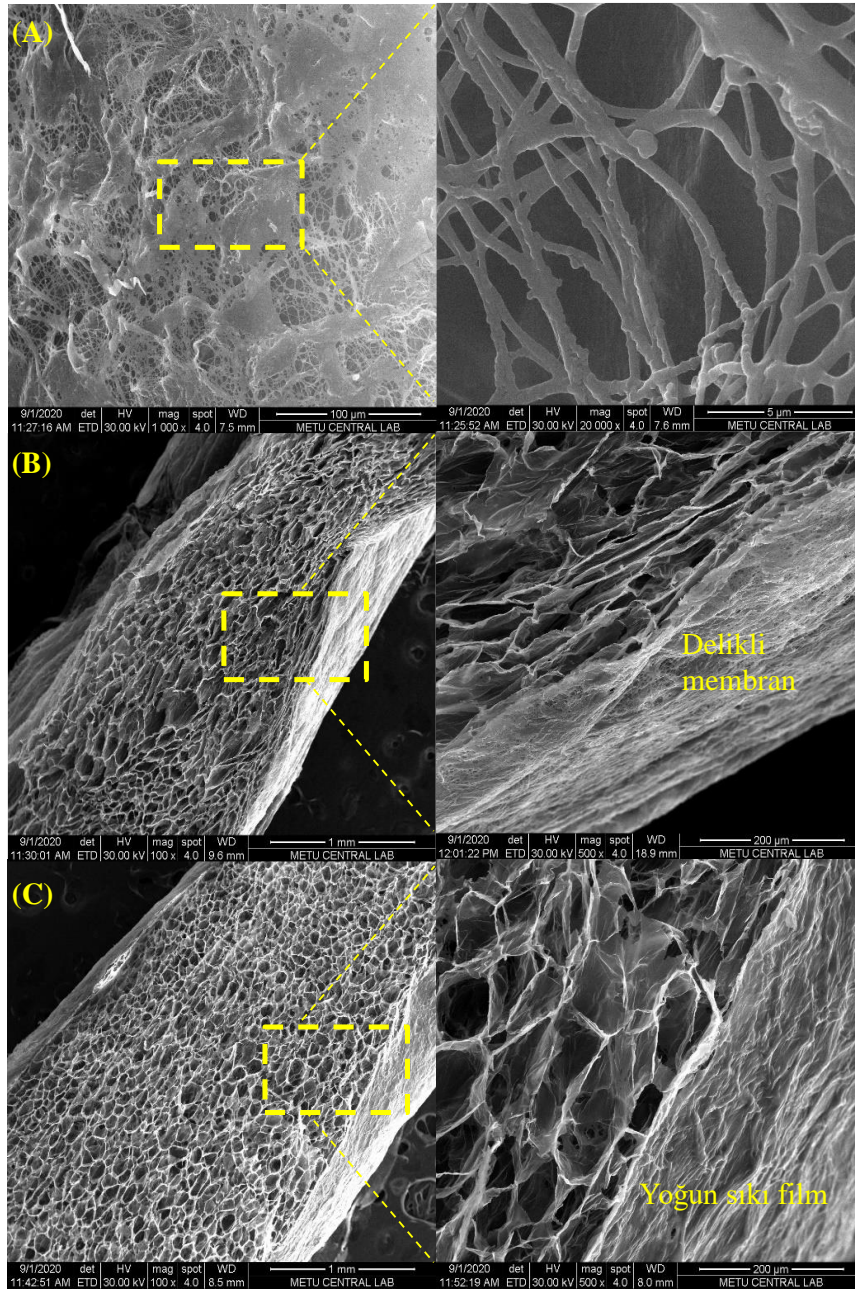
fiber çap aralığında nanofiberli yapılar elde edilmiştir. Nanofiberlerin düzleşmiş yapısı elektro-eğirme çözeltilerinin yüksek polimer konsantrasyonu sebebiyle viskoz olmasına ve balın higroskopik (nem tutan) özelliğine bağlanabilir. Elektro-eğirme çözeltilerinin viskozitesi arttığında ve bal kullanılan benzer diğer çalışmalarda fiberin toplayıcı üstünde nemli bir şekilde birikmesi sebebiyle benzer morfolojiler gözlenmiştir (Sarkar vd., 2018; Topuz & Uyar, 2017). Zaten toplayıcı diskin dönme etkisiyle de bu morfoloji daha belirgin hale gelmiş olabilir. Toplayıcı ekranın bu dönme etkisiyle belli bir yönde hizalı fiberler de oluşmuştur (Şekil 5A). Çapraz bağlama işlemi sonunda fiber yapısı korunmuş, bazı bölgelerdeki fiberler de birbirine GTA etkisiyle kaynaşmıştır (Şekil 5C). Ancak, çapraz bağlama işleminden sonraki suda yıkama sırasında bazı fiberlerde kopmalar ve suda çözümler de meydana gelmiştir. Literatürde balla yapılan elektro-eğirme çalışmalarında bu çalışmadakine benzer fiber çapı aralıkları elde edilmiştir. Örneğin; PVA/jelatin/çam balı kullanılarak elde edilen nanofiberli matlarda ortalama fiber çapı, kullanılan balın derişimi artıkça büyümüşür (321–494 nm) ve elde edilen düzgün ve boncuk içermeyen fiberlerin doku mühendisliği uygulamaları için uygunlukları vurgulanmıştır (Parin vd., 2021). Benzer şekilde Sarhan vd. (2016), ürettiği PVA/kitozan/bal nanofiberleri için ortalama fiber çapını 284–464 nm aralığında bulmuş ve bal derişimiyle doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermiştir. Tang vd. (2019) çalışmasında yine aynı paralellikte sonuçlar bulunmuştur. Çalışmalarında, bal içeren aljinat/PVA nanofibröz membranların yüksek bal içeriğiyle ortalama fiber çapları artmış (379–528 nm) ve geniş fiber çap dağılımlı, nispeten düzensiz morfolojide fiberler elde edilmiştir.



**Şekil 5.** Farklı fiberli matrislerin SEM mikrografileri ve fotoğrafları: (A) jelatin/PEO/bal (1:2:2 w/w, %5 w/v toplam malzeme), (B) jelatin/PEO/bal (2:2:2 w/w, %6 w/v toplam malzeme), (C) çapraz bağlı jelatin/PEO/bal (2:2:2 w/w, %6 w/v toplam malzeme, GTA ve EDC/NHS karışımıyla çapraz bağlanmış).



Şekil 6'da gösterildiği gibi iki katmanlı çapraz bağlı kollajen/jelatin köpüklerin (2CG-X kodlu grup) farklı yönlerden çekilen SEM görüntülerine göre fiberli yapıların Şekil 6A'da kısmen korunduğu görülmektedir. Bazı bölgelerde alt kısmın konturlarıyla iyice kaynaşmış ve bazı yerlerde delikli, bazı yerlerde de yoğun membran (film) benzeri katmanlar oluşturmuşlardır. Kesitten alınan görüntülerde köpüksü yapılarıdaki gözeneklerin homojen yapıda ve birbirleriyle bağlantılı olduğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 6B ve 6C kesit görüntüleri numunelerin köşesinden (köpük ve fiberlerin birbirine iyice kaynaştığı yerler) alındığı için sıkı film katmanlar arasında köpük şeklinde sandviç yapılar görülmektedir.

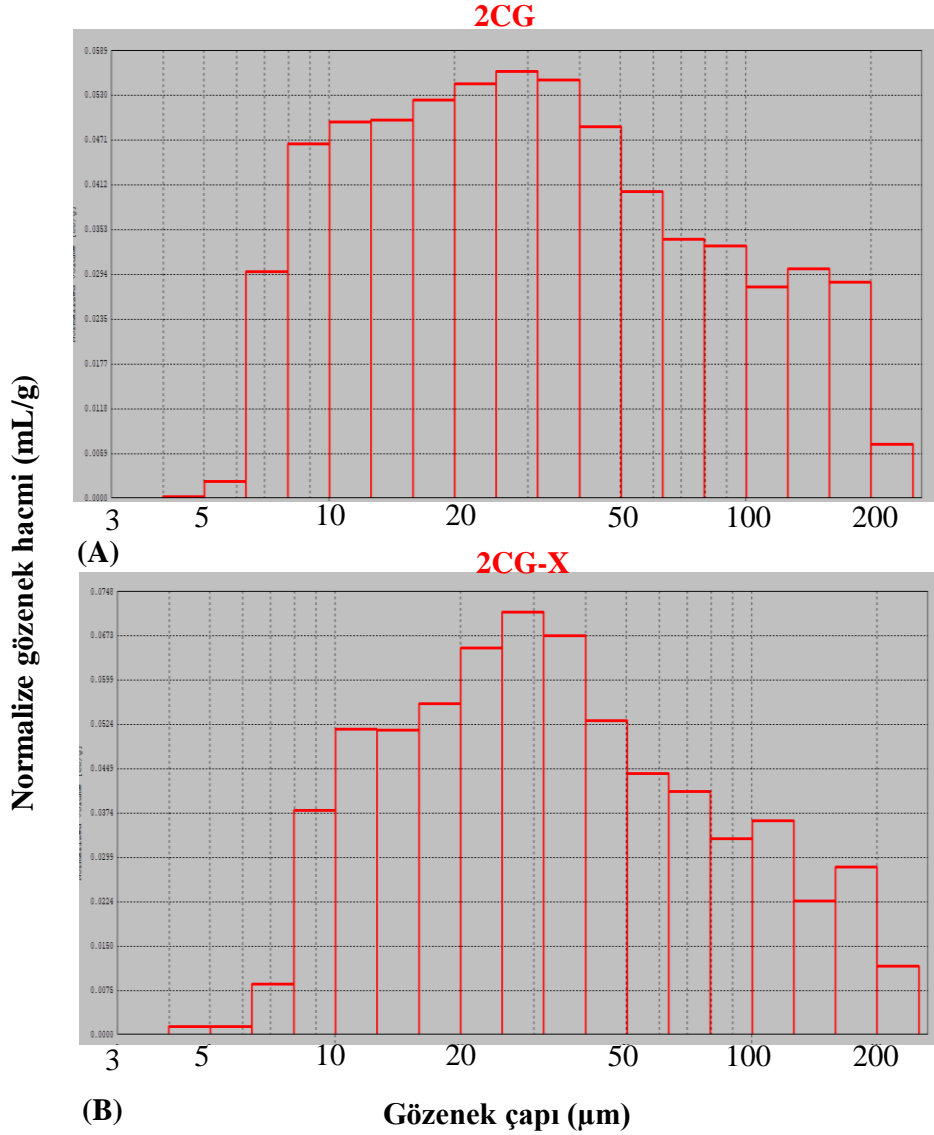


**Şekil 6.** İki katmanlı çapraz bağlı kollajen/jelatin köpüklerin (2CG-X kodlu grup) farklı yönlerden çekilen SEM görüntüleri: (A) Tepeden fiberli kaplamanın olduğu bölge, (B) ve (C) numunelerin kesiti (köpük ve fiberlerin birbirine iyice kaynaştığı köşe bölgeler büyütülmüştür).

### 3.2.3. Gözenek boyut dağılımı analizi

İki katmanlı doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı, civalı porozimere ile düşük basınç analizi yapılarak analiz edilmiştir (Şekil 7). Bütün iskeleler 5–200 µm arasında geniş bir gözenek dağılımına sahiptir. Çapraz bağlanmayan 2CG grubunda 40 µm altındaki gözenek miktarı daha fazladır (Şekil 7A), ancak çapraz bağlama işleminden sonra gözenek boyut dağılımı (30–40 µm civarında yoğunlaşarak) daha homojen bir hale gelmiştir (Şekil 7B). Doku iskelelerindeki gözenek boyutunun ve gözenekliliğin hücre davranışı (proliferasyon ve farklılaşma) ve mekanik özellikler üstünde etkisi olduğu literatürde bildirilmektedir (Loh & Choong, 2013). Deri doku mühendisliği uygulaması için geliştirilen kollajen esaslı köpüklerde 10–200 µm arasındaki gözenek boyutunun fibroblast yapışması ve proliferasyonu için uygun olduğu gösterilmiştir (Akturk vd., 2016). Ayrıca bazı araştırmacılar, ortalama 100–200 µm gözenek boyut aralığını deri doku mühendisliği için önermektedirler (Han vd., 2014; Liu vd., 2007).





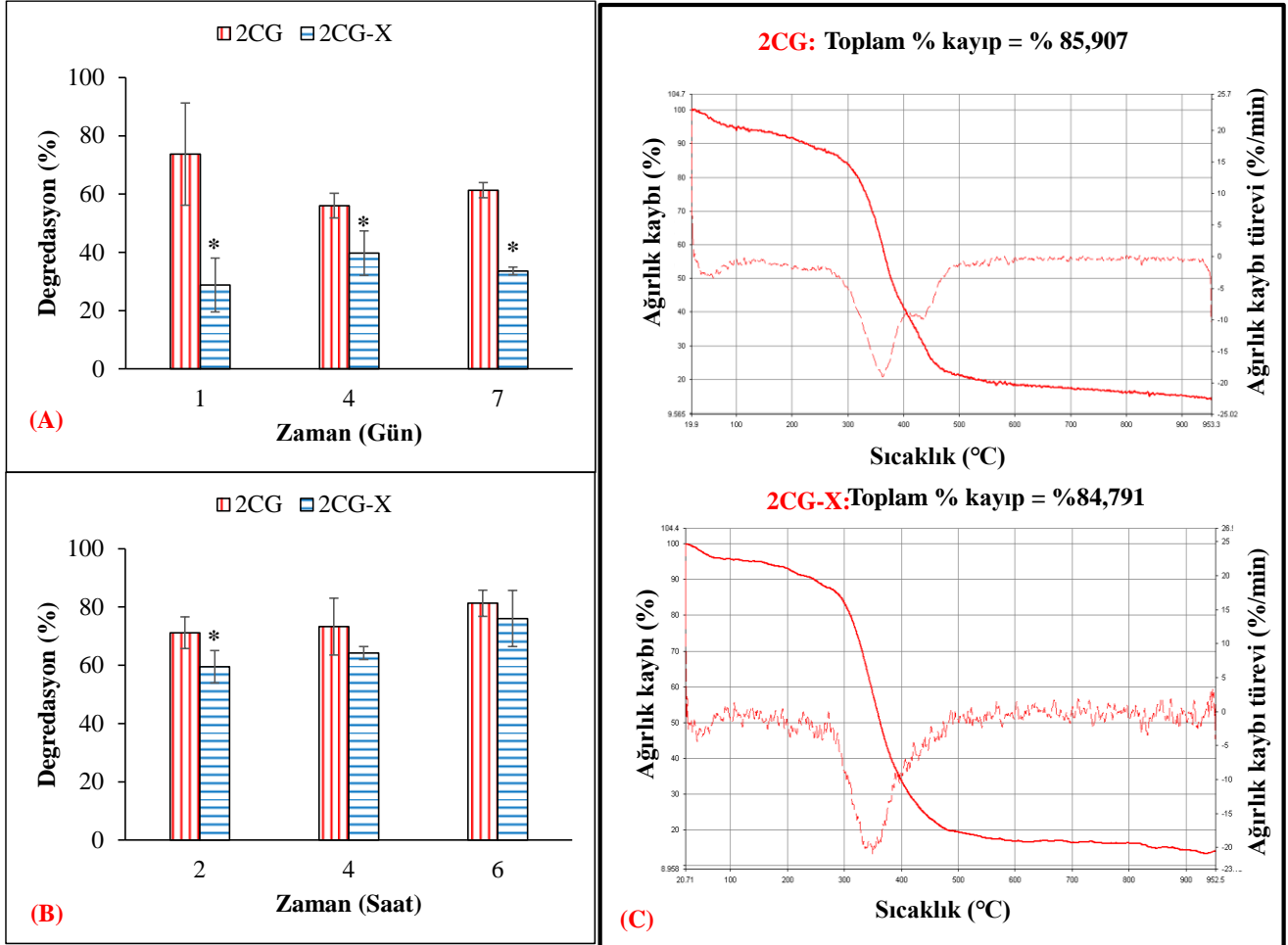
**Şekil 7.** Farklı iki katmanlı iskele gruplarının Civalı Porozimetre ile gözenek boyut dağılım analizleri: (A) 2CG ve (B) 2CG-X.

### 3.2.4. Sulu ortamda hidrolitik ve enzimatik degradasyon testleri

Şekil 8A ve 8B’de gösterildiği gibi çapraz bağlama işlemi iskelenin sulu ortam kararlılığını belirgin bir şekilde arttırmıştır. Çözünmeye hassas olan kısım bal içeren fiberli kısımdır. Fiberli üst katmanda bulunan yüksek bal içeriği sebebiyle çapraz bağlanma yapılmış olsa bile fiber çözünmesi hızlıdır. Bal kompozisyonunda hızlı çözünmeye meyilli parçalar (örneğin früktoz ve glikoz gibi şekerler) bulunmaktadır. Ayrıca bal, osmotik bir ajan olduğu için nanofiber içine su geçişi hızlanmakta ve bu da polimer liflerin hidrolizine sebep olmaktadır (Sarkar vd., 2018). Yani, sulu ortamdaki bu kütle kaybı hem hızlı çözünür bileşenlerin salınmasına hem de artan hidrolize bağlanabilir. Literatürde bal içeren farklı iskelelerde de bal sebebiyle su tutulumu artarak degradasyon hızının arttığı kaydedilmiştir (Rajput vd., 2014; Sarhan vd., 2016; Wang vd., 2012). Hidrolitik degradasyon testinde çapraz bağlanan ile çapraz bağlı olmayan tüm gruplar arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. Farklı zaman periyotları arasındaki dalgalanma deneylerin farklı numuneler üstünden yapılmasına bağlanabilir. Gruplar arasındaki fark, enzimatik bozunum testinde ise küçüktür ve her iki grupta da enzimatik degradasyon ikinci saatten itibaren yaklaşık %60 seviyelerine ulaşmıştır, yani hem 2CG hem de 2CG-X grubu enzimatik bozunuma karşı dirençsizdir. Böylece geliştirilen doku iskelelerinin, yoğun enzimatik ortamlarda kullanıma elverişli olmadığı sonucuna varılmıştır. Kollajenaz enzimi, yara tedavisi için geliştirilen yara örtüsü malzemelerinin enzimatik degradasyona karşı direncini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Akturk & Keskin, 2016; Akturk vd., 2016; Eskandarinia vd., 2020). Özellikle kronik deri yaralanmalarında enfeksiyon sonucu proteaz enzimlerinin seviyesinde artış olduğu, yani yoğun bir enzimatik etkinlik olduğu için (McCarty & Percival, 2013) bu tarzdaki yara tedavisi uygulamaları için bu çalışmada geliştirilen doku iskelelerinin uygun olmayabileceği düşünülmektedir. Literatürde aynı enzim derişiminin kullanıldığı çalışmalarda da kollajen temelli biyomalzemelerin (kollajen nanofibröz matris ve ticari yara örtüsü Matriderm) 1 gün içinde %80’den daha fazla degrade olduğu görülmüştür (Akturk & Keskin, 2016). Yine aynı enzim derişiminin kullanıldığı başka bir çalışmada (Akturk vd., 2016), gluteraldehitte çapraz bağlanmış kollajen esaslı köpük formundaki iskelelerin enzimatik degradasyona karşı, bu çalışmadaki 2 katmanlı iskelelere kıyasla daha dayanıklı (2 saatte %10, 4 saatte %20 civarında bozunum) olduğu görülmüştür. Bu belirgin fark, iki katmanlı iskelede kullanılan suda kolay çözünür malzemelere (jelatin, PEO ve bal) ve çapraz bağlama prosedürüne bağlanabilir.

### 3.2.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

Şekil 8C'de gösterildiği gibi 2 grubun termogramları birbirine benzerdir. Çapraz bağlı olmayan grubun toplam ağırlık kaybı bir miktar daha yüksektir (%86 civarında). İki grupta da birinci termal dekompozisyon 20–100 °C aralığında gerçekleşmiştir. İlk ağırlık kaybı iskele içinde absorbe edilmiş su (özellikle nanofiberli katmanda bal sebebiyle) ve polimer içinde bulunan moleküler sudur. %5 civarında bir su kaybı gerçekleşmiştir ve maksimum ağırlık kaybı hızı da her iki grup için de 60 °C'de olmuştur. Bu su kaybı 2CG grubu için 250 °C, 2CG-X grubu içinse 275 °C'ye kadar devam etmiş ve toplam su kaybı %12 civarında sonlanmıştır. İkinci termal dekompozisyon aşaması (yani, kollajen ve jelatin polimer zincirlerinin dekompozisyonu ya da en iç kısımda bulunan sıkıca bağlı su molekülleri) 2CG grubunda iki parçalıdır (250–400 °C ve 400–500 °C aralığında), 2CG-X (iki katmanlı çapraz bağlı yapı) için ise 275–550 °C olarak tek parçadır. Bunun sebebi 2CG'de çapraz bağlanmadığı için daha fazla moleküler su tutması, 2CG-X yapıda çapraz bağlama işlemi sırasında fiberli katmanın bir kısmının çözünerek kaybolması olabilir. İskelenin termal dekompozisyonu için elde edilen sıcaklık değer aralıkları literatür bulguları ile uyumludur (Nuvoli vd., 2020; Skopinska-Wisniewska vd., 2021). Çapraz bağlı yapıların daha kapalı olduğu ve daha az su kaybettiği, ayrıca degradasyon sıcaklıklarının sağa doğru kayması diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (Skopinska-Wisniewska vd., 2021).



Şekil 8. İskele gruplarının (2CG ve 2CG-X) sulu ortam ve termal degradasyon sonuçları: (A) PBS içinde hidrolitik degradasyon, (B) tip I kollajenaz içinde enzimatik degradasyon testleri ve (C) TGA termogramları (\*: Aynı zaman periyodunda ikili gruplar arasındaki  $p < 0,05$  değeri için anlamlı fark).

## 4. Sonuç

Bu projede geliştirilen doku iskelesi, sahip olduğu nanofibröz üst katmanı sayesinde hücrelerin ilk yapışması ve çoğalması için uygun ağısı bir mimari yapı oluşturmuştur. Çapraz bağlama ve yıkama işlemleri sonrasında, fiberler arasında bazı kaynaşmalar meydana gelse de bu nanofibröz yapı büyük oranda korunmuştur. Çapraz bağlama işlemi sonunda, doku iskelesinin sulu ortam dayanıklılığı önemli ölçüde artmış ve gözenekli yapısı da korunmuştur. Geliştirilen 2CG-X iskele, bu özellikleriyle, yara örtüsü, deri ikamesi, *in vitro* test modelleri için tekrardan yapılandırılmış deri ya da kornea epitelyumu vb. gibi farklı doku mühendisliği uygulamaları için uygun adaylar olabilir. 2CG-X iskele grubuna gelecekte insan epidermal keratinosit hücreleri ekilerek deri doku iskelesi olarak *in vitro* koşullardaki uygunluğunun da araştırılması planlanmaktadır.

## Teşekkür

Bu proje, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı (Başvuru No: 1919B011901535) kapsamında desteklenmiştir. Projedeki yardımlarından ötürü Raziye Koraş ve Baraa Mehyo'ya teşekkürlerimizi sunarız.

## Referanslar

Abdelrazek, E. M., Abdelghany, A. M., Badr, S. I., & Morsi, M. A. (2018). Structural, optical, morphological and thermal properties of PEO/PVP blend containing different concentrations of biosynthesized Au nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 7(4), 419–431. doi: 10.1016/j.jmrt.2017.06.009

Akturk, O., & Keskin, D. (2016). Collagen/PEO/gold nanofibrous matrices for skin tissue engineering. *Turkish Journal of Biology*, 40, 380–398. doi: 10.3906/biy-1502-49

Akturk, O., Kismet, K., Yasti, A. C., Kuru, S., Duymus, M. E., Kaya, F., Caydere, M., Hucumenoglu, S., & Keskin D. (2016). Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(2), 283–301. doi: 10.1177/0885328216644536

Aliakbarshirazi, S., & Talebian, A. (2017). Electrospun gelatine nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Materials Today: Proceedings*, 4(7), 70597064. doi: 10.1016/j.matpr.2017.07.038

Arafat, M. T., Tronci, G., Yin, J., Wood, D. J., & Russell, S. J. (2015). Biomimetic wet-stable fibres via wet spinning and diacid-based crosslinking of collagen triple helices. *Polymer*, 77, 102–112. doi: 10.1016/j.polymer.2015.09.037

Campiglio, C. E., Contessi Negrini, N., Farè, S., & Draghi, L. (2019). Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds. *Materials (Basel)*, 12(15), 2476. doi: 10.3390/ma12152476

Dias, J. R., Baptista-Silva, S., de Oliveira, C. M. T., Sousa, A., Oliveira, A. L., Bártolo, P. J., & Granja, P. L. (2017). In situ crosslinked electrospun gelatin nanofibers for skin regeneration. *European Polymer Journal*, 95, 161–173. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.08.015

Dong, C., & Lv, Y. (2016). Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers (Basel)*, 8(2), 42. doi: 10.3390/polym8020042

El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., & Elmazar, M. M. (2017). Honey-based hydrogel: *in vitro* and comparative *in vivo* evaluation for burn wound healing. *Scientific Reports*, 7, 9692. doi: 10.1038/s41598-017-08771-8

Eskandarinia, A., Kefayat, A., Agheb, M., Rafienia, M., Baghbadorani, M. A., Navid, S., Ebrahimpour, K., Khodabakhshi, D., & Ghahremani, F. (2020). A novel bilayer wound dressing composed of a dense polyurethane/propolis membrane and a biodegradable polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffold. *Scientific Reports*, 10, 3063. doi: 10.1038/s41598-020-59931-2

Gautam, S., Chou, C. F., Dinda, A. K., Potdar, P. D., & Mishra, N. C. (2014). Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 34, 402-409. doi: 10.1016/j.msec.2013.09.043.

Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F. (2015). Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, 234–240. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.040

Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C., & Silva, J.C. (2017). Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1174–1185. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.004

Han, F., Dong, Y., Su, Z., Yin, R., Song, A., & Li, S. (2014). Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1-2), 124–133. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.036

Heidari, M., Bahrami, S. H., Ranjbar-Mohammadi, M., & Milan, P. B. (2019). Smart electrospun nanofibers containing PCL/gelatine/graphene oxide for application in nerve tissue engineering. *Materials science and Engineering: C*, 103, 109768. doi: 10.1016/j.msec.2019.109768

Hixon, K. R., Lu, T., McBride-Gagy, S. H., Janowiak, B. E., & Sell, S. A. (2017a). A comparison of tissue engineering scaffolds incorporated with manuka honey of varying UMF. *BioMed Research International*, 2017, 4843065. doi: 10.1155/2017/4843065



- Hixon, K. R., Lu, T., Carletta, M. N., McBride-Gagy, S. H., Janowiak, B. E., & Sell, S. A. (2017b). A preliminary *in vitro* evaluation of the bioactive potential of cryogel scaffolds incorporated with Manuka honey for the treatment of chronic bone infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(5), 1918–1933. doi: 10.1002/jbm.b.34002
- Hoon Lee, D., Arisaka, Y., Tonegawa, A., Woong Kang, T., Tamura, A., & Yui, N. (2019). Cellular orientation on repeatedly stretching gelatin hydrogels with supramolecular cross-linkers. *Polymers*, 11(12), 2095. doi: 10.3390/polym11122095
- Kozłowicz, K., Różyło, R., Gładyszewska, B., Matwijczuk, A., Gładyszewski, G., Chocyk, D., Samborska, K., Piekut, J., & Smolewska, M. (2020). Identification of sugars and phenolic compounds in honey powders with the use of GC-MS, FTIR spectroscopy, and X-ray diffraction. *Scientific Reports*, 10(1), 16269. doi: 10.1038/s41598-020-73306-7
- Lee, M., Hwang, J. H., & Lim, K. M. (2017). Alternatives to *in vivo* Draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicological research*, 33(3), 191–203. doi: 10.5487/TR.2017.33.3.191
- Liu, H., Fan, H., Cui, Y., Chen, Y., Yao, K., & Goh, J. C. (2007). Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan–gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan–gelatin scaffold. *Biomacromolecules*, 8(5), 1446–1455. doi: 10.1021/bm061025e
- Liu, T., & Wang, Z. (2013). Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin. *Acta Ophthalmologica*, 91(4), e253–e257. doi: 10.1111/aos.12172
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485–502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437
- Maleki, H., Gharehaghaji, A. A., & Dijkstra, P. J. (2013). A novel honey-based nanofibrous scaffold for wound dressing application. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(5), 4086–4092. doi: 10.1002/app.37601
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2018). Honey, wound repair and regenerative medicine. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(2), 34. doi: 10.3390/jfb9020034
- Martinotti, S., Calabrese, G., & Ranzato, E. (2015). Honey and wound healing: New solutions from an old remedy. In *Wound Healing: Cellular Mechanisms, Alternative Therapies and Clinical Outcomes*, Wade, L. E. (ed). Nova Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA.
- Maslennikova, A., Kochueva, M., Ignatieva, N., Vitkin, A., Zakharkina, O., Kamensky, V., Sergeeva, E., Kiseleva, E., & Bagratashvili, V. (2015). Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *International Journal of Radiation Biology*, 91(3), 240–247. doi: 10.3109/09553002.2014.969848
- McCarty, S. M., & Percival, S. L. (2013). Proteases and delayed wound healing. *Advances in Wound Care*, 2(8), 438–447. doi: 10.1089/wound.2012.0370
- Minden-Birkenmaier, B. A., Neuhalfen, R. M., Janowiak, B. E., & Sell, S. A. (2015). Preliminary investigation and characterization of electrospun polycaprolactone and manuka honey scaffolds for dermal repair. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 10(4), 126–138. doi: 10.1177/155892501501000406
- Nagaoka, H., Nagaoka, H., Walter, R., Boushell, L. W., Miguez, P. A., Burton, A., Ritter, A. V., & Yamauchi, M. (2014). Characterization of genipin-modified dentin collagen. *BioMed Research International*, 2014, 702821. doi: 10.1155/2014/702821
- Nazeri, S., Ardakani, E.M., Babavalian, H., & Latifi, A. M. (2015). Evaluation of effectiveness of honey-based alginate hydrogel on wound healing in rat model. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2(3), 293–297.
- Nguyen, H. T. L., Katopo, L., Pang, E., Mantri, N., & Kasapis, S. (2019). Structural variation in gelatin networks from low to high solid systems effected by honey addition. *Food Research International*, 121, 319–325. doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.048
- Nguyen, T., Ventura, R., Min, Y., & Lee, B. (2016). Genipin cross-linked polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel for bone regeneration. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 9, 419–429. doi: 10.4236/jbise.2016.99037
- Nuvoli, L., Conte, P., Fadda, C., Reglero Ruiz, J. A., García Pérez, J. M., Baldino, S., & Mannu, A. (2020). Structural, thermal, and mechanical properties of gelatin-based films integrated with tara gum. *Polymer*, 214, 123244. doi: 10.1016/j.polymer.2020.123244

- Parin, F. N., Terzioğlu, P., Sicak, Y., Yildirim, K., & Öztürk, M. (2021). Pine honey-loaded electrospun poly (vinyl alcohol)/gelatin nanofibers with antioxidant properties, *The Journal of The Textile Institute*, 112(4), 628–635, doi: 10.1080/00405000.2020.1773199
- Pataca, L. C. M., Neto, W. B., Marcucci, M. C., & Poppi, R. J. (2007). Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Talanta*, 71(5), 1926–1931. doi: 10.1016/j.talanta.2006.08.028
- Rajput, M., Bhandaru, N., Barui, A., Chaudhary, A., Paul, R.R., Mukherjee, R., & Chatterjee, J. (2014). Nano-patterned honey incorporated silk fibroin membranes for improving cellular compatibility. *RSC Advances*, 4, 44674–44688. doi: 10.1039/C4RA05799F
- Ranzato, E., & Martinotti, S. (2016). The secrets of honey: Why this old remedy is still useful. In *Honey: Geographical Origins, Bioactive Properties and Health Benefits*, Ramirez, R. (ed.). Nova Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA.
- Rose, J. B., Sidney, L. E., Patient, J., White, L. J., Dua, H. S., El Haj, A. J., Hopkinson, A., & Rose, F. R. A. J. (2019). *In vitro* evaluation of electrospun blends of gelatin and PCL for application as a partial thickness corneal graft. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(4), 828–838. doi: 10.1002/jbm.a.36598
- Sarhan, W.A., Azzazy, H. M. E., & El-Sherbiny, I. M. (2016). The effect of increasing honey concentration on the properties of the honey/polyvinyl alcohol/chitosan nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 276–284. doi: 10.1016/j.msec.2016.05.006
- Sarkar, R., Ghosh, A., Barui, A., & Datta, P. (2018). Repositing honey incorporated electrospun nanofiber membranes to provide anti-oxidant, anti-bacterial and anti-inflammatory microenvironment for wound regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(3), 31. doi: 10.1007/s10856-018-6038-4
- Skopinska-Wisniewska, J., Tuszynska, M., & Olewnik-Kruszkowska, E. (2021). Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents. *Materials (Basel)*, 14(2), 396. doi: 10.3390/ma14020396
- Takitoh, T., Bessho, M., Hirose, M., Ohgushi, H., Mori, H., & Hara, M. (2015). Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(2), 217–225. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.008
- Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., Zhou, Y., Miao, X., Wang, H., & Wang, W. (2019). Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 219, 113–120. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.004
- Topuz, F., & Uyar, T. (2017). Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon. *Materials Science and Engineering C*, 80, 371–378. doi: 10.1016/j.msec.2017.06.001
- Torras, N., García-Díaz, M., Fernández-Majada, V., & Martínez, E. (2018). Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. *Frontiers in Bioengineering and bBiotechnology*, 6, 197. doi: 10.3389/fbioe.2018.00197
- Vrana, N. E., Builles, N., Kocak, H., Gulay, P., Justin, V., Malbouyres, M., Ruggiero, F., Damour, O., Hasirci, V. (2007). EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2007, 18(12), 1527–1545. doi: 10.1163/156856207794761961
- Wang, T., Zhu, X. K., Xue, X. T., & Wu, D. Y. (2012). Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 75–83. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.069
- Wang, W., Zhang, Y., Ye, R., & Ni, Y. (2015). Physical crosslinkings of edible collagen casing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 920–925. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.032
- Yoshioka, S. A., & Goissis, G. (2008). Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(3), 1215–1223. doi: 10.1007/s10856-007-0151-0