

**KURKUMİN YÜKLÜ ÜÇ BOYUTLU POLİ(ε-  
KAPROLAKTON)/KİTOSAN NANOFİBRÖZ YARA ÖRTÜ  
MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CURCUMIN LOADED THREE  
DIMENSIONAL POLY(ε-CAPROLACTONE)/CHITOSAN  
NANOFIBROUS WOUND DRESSING MATERIALS**

**MERYEM UYAR**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ SONER ÇAKMAK**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

## ÖZET

### KURKUMİN YÜKLÜ ÜÇ BOYUTLU POLİ(ε-KAPROLAKTON)/KİTOSAN NANOFİBRÖZ YARA ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

**Meryem UYAR**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Soner ÇAKMAK**

**Ocak 2023, 105 sayfa**

Bu çalışma “Kurkumin İçeren Makrogözenekli ve Antibakteriyel Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Geliştirilmesi” başlıklı Kariyer Başlangıç Projesi (FKB-2022-19592) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Sunulan tez çalışmasında istenilen şekil ve boyutlarda kurkumin yüklü ve makrogözenekli üç boyutlu (3B) yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında ilk olarak geleneksel elektroçirme yöntemi ile poli(ε-kaprolakton)/kitosan (PCL/Kit) ve kütlece %5 ve %10 kurkumin içeren PCL-Kit (sırasıyla PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10) nanofibröz matrisler üretilmiştir. Daha sonra bu matrisler, homojenizatör aracılığıyla süspanse hale getirilmiş ve kalıplara dökülerek dondurulduktan sonra liyofilize edilerek istenen boyutta ve geometride 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri başarıyla üretilmiştir. Tez çalışması kapsamında 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Öncelikle, ATR-FTIR analizi ile üretilen malzemelerin kimyasal yapıları doğrulanmıştır. Üretilen malzemelerde PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait su temas açıları sırasıyla  $54^{\circ} \pm 7^{\circ}$ ,  $51^{\circ} \pm 14^{\circ}$  ve  $57^{\circ} \pm 9^{\circ}$

olarak ölçülmüş ve yine bu gruplara ait su alım kapasiteleri tüm gruplar için %400'ün üzerinde bulunmuştur. Yirmi sekiz gün boyunca gerçekleştirilen *in vitro* biyobozunurluk testlerinde tüm gruplar için ~%3-4 arasında kütle kayıpları görülmüştür. Mekanik basma testi sonucunda PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin elastik modülü sırasıyla  $7,6 \pm 1,2$  kPa,  $15,8 \pm 1,5$  kPa ve  $6,6 \pm 3,0$  kPa olarak bulunmuştur. Bilgisayarlı tomografi görüntülemesiyle tüm yara örtü malzemelerin için toplam gözenekliliğin ~%90 ve üzeri olduğu ve malzemelerde makrogözenekliliğin başarılı bir şekilde sağlandığı gösterilmiştir.

Üretilen malzemelere yüklenen kurkumin için enkapsülasyon verimi PCL-Kit-Kur5 grubu için  $60,8 \pm 2,5$ , PCL-Kit-Kur10 grubu için ise  $72,5 \pm 2,8$  olarak bulunmuştur. Ayrıca, kurkumin yüklü 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin kurkumin salım profilleri çıkarılmış ve salım kinetikleri matematiksel modeller ile analiz edilmiştir. PCL-Kit-Kur5 grubu için en yüksek korelasyon Higuchi modeli ile, PCL-Kit-Kur10 grubu için en yüksek korelasyon ise sıfıncı derece kinetik model ile gerçekleşmiştir.

Yara örtü malzemeleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları sonucunda sitotoksik etkiler gözlenmemiştir. Ayrıca, bu çalışmalar sonucunda kurkumin içeren 3B nanofibröz yara örtü malzemelerindeki hücrelerin özellikle kültürün ilk 7 günü boyunca diğer gruplara göre çok daha yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde, 2B nanofibröz matrislerde hücre yapışması ve yayılmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ancak bu yayılmanın yalnızca malzeme yüzeyinde kaldığı tespit edilmiştir. Bunun aksine, 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinde hücrelerin makrogözenekler etrafında malzeme derinliklerinde bile yapışıp yayıldıkları ve hücre-malzeme ve hücre-hücre etkileşimlerinin başarılı bir şekilde olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında kullanılan üretim yöntemi ile farklı boyut ve şekillerde makrogözenekliliğe sahip; hücre yapışması, göçü ve proliferasyonunu destekleyen 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri başarılı bir şekilde üretilmiştir. Tez sonucunda üretilen 3B yara örtü malzemelerinin, gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile geliştirildikten ve *in vivo* çalışmalarla detaylı olarak incelendikten sonra, deri doku mühendisliği alanında klinik olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Geleneksel elektroçirgeme, dispersiyon şekillendirme, makrogözeneklilik, kurkumin, yara örtü malzemesi

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF CURCUMIN LOADED THREE DIMENSIONAL POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE)/CHITOSAN NANOFIBROUS WOUND DRESSING MATERIALS**

**Meryem UYAR**

**Master of Science, Bioengineering**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Soner ÇAKMAK**

**January 2023, 105 pages**

This study was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with a career initiation project titled “Development of Curcumin Loaded Macroporous Antibacterial Three-Dimensional Nanofibrous Wound Dressing Materials” (FKB-2022-19592). The main goal of this thesis is to develop curcumin loaded macroporous three-dimensional (3D) wound dressing materials that can be manufactured in desired shapes and sizes.

Firstly, poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan (PCL-Chi) nanofibrous matrices and curcumin loaded PCL-Kit-Kur5 (5 wt% curcumin) and PCL-Kit-Kur10 (10 wt% curcumin) nanofibrous matrices are produced with traditional electrospinning method. Then, these matrices are dispersed by using a homogenizer and poured into molds of various shapes and sizes. After freeze-drying, 3D nanofibrous wound dressing materials are successfully produced. These 3D nanofibrous wound dressing materials were characterized in detail by various physical and chemical methods. First of all, the chemical structures of the wound dressings were verified using ATR-FTIR analysis. Water contact angles of the 3D nanofibrous wound dressings were measured as  $54^\circ \pm 7^\circ$ ,  $51^\circ \pm 14^\circ$  and  $57^\circ \pm 9^\circ$  for the PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5, PCL-Kit-Kur10 groups respectively; the water uptake capacities of the wound dressing materials were above 400% for the groups. In vitro

biodegradation tests were performed over 28 days and ~3-4% mass reduction is observed for all groups. According to the mechanical compression tests, the elastic modulus were found as  $7,6 \pm 1,2$  kPa,  $15,8 \pm 1,5$  kPa and  $6,6 \pm 3,0$  kPa for PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5, PCL-Kit-Kur10 groups, respectively. The structures of the 3D nanofibrous wound dressings are characterized by micro-computed tomography and the total porosity is found to be ~90% or over for all the groups.

Loading efficiency and drug release studies were conducted for the curcumin loaded 3D nanofibrous wound dressing materials. Encapsulation efficiency is calculated as  $60,8 \pm 2,5\%$  for PCL-Kit-Kur5 group and  $72,5 \pm 2,8\%$  for PCL-Kit-Kur10 group. To analyze the curcumin release kinetics from the 3D wound dressing materials, drug release profiles are fitted to mathematical kinetic models. The highest correlation was achieved with the Higuchi model for PCL-Kit-Kur5 and with the zero-order kinetic model for PCL-Kit-Kur10.

Lastly, cell culture studies were carried out and no cytotoxic effects are observed for any nanofibrous wound dressing materials. In addition, it was observed that cells in 3D nanofibrous wound dressing materials containing curcumin had much higher mitochondrial activity compared to other groups, especially during the first 7 days of culture. Scanning electron microscopy imaging is conducted and successful cell adhesion and migration was observed on the 2D nanofibrous materials; however, these were limited to only the surface of matrices. On the contrary, in 3D nanofibrous wound dressing materials, it was observed that cells adhered and spread around macropores even at material depths, and cell-material and cell-cell interactions were successfully formed.

In conclusion, 3D nanofibrous dressing materials with macroporosity in different sizes and shapes were successfully produced with the production method used, and they supported cell adhesion, migration, and proliferation. It is thought that the 3D wound dressing materials developed in this thesis study can be used clinically in the field of skin tissue engineering after being developed with future studies and examined in detail with in vivo studies.

**Keywords:** Conventional electrospinning, dispersion shaping, macroporosity, curcumin, wound dressing materials

## TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda başladığım eğitim hayatımda bana her zaman yol gösteren, kariyerim için değerli tavsiyelerde bulunan, yaşadığım problemlerde motivasyonumu geri kazanmama yardımcı olan, her zaman destek veren ve dinleyen, Hacettepe ailesine dahil olmamda yardımcı olan çok değerli hocam DR. ÖĞR. ÜYESİ SONER ÇAKMAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde laboratuvar olanaklarını bana açan, bu sayede çok kıymetli dostluklar edinmemi sağlayan, çalışmalarımı destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'nda laboratuvar ortamında birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, hepsinden çok şey öğrendiğim arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı Kapsamında tez çalışmama bursiyer olarak maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde zor zamanımda yardımlarını esirgemeyen, pozitif enerjisi, içtenliği ve desteğiyle sayın Dr. Öğr. Üyesi Gözde Koşarsoy Ağçeli'ye teşekkürlerimi sunarım.

Sıcakkanlılığı, içtenliği, yardımseverliği ve her zaman beni destekleyen, motive eden kardeşim olsa ancak bu kadar sevebilirim diyebildiğim canım arkadaşım Begüm Sargon'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ortaokul eğitimimden itibaren desteklerini bana her zaman hissettiren, motive eden, öğretmenim olduğu için kendimi şanslı hissettiren sayın Serkan Arın'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tanıştığımız andan itibaren hayatıma anlam, saygı, içtenlik, sevgi katan, beni her zaman mutlu etmeye çalışan ve her zaman destekleyen çok kıymetli eşim Talha'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda olan, aldığı kararlı destekleyen, sevgi ve emeklerini esirgemeyen canım aileme sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Deri.....	4
2.1.1. Epidermis.....	6
2.1.2. Dermis.....	6
2.1.3. Hipodermis.....	6
2.2. Yara.....	7
2.2.1. Yara Çeşitleri.....	7
2.2.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	8
2.2.2.1. Lokal Faktörler.....	8
2.2.2.2. Sistemik Faktörler.....	9
2.2.3. Yara İyileşme Fazları.....	9
2.2.3.1. Hemostaz.....	10
2.2.3.2. Enflamasyon.....	11
2.2.3.3. Proliferasyon.....	11
2.2.3.4. Matürasyon.....	12
2.3. Yara Örtüleri.....	12
2.3.1. Geleneksel Yara Örtü Malzemeleri.....	13
2.3.2. Modern Yara Örtüleri.....	14
2.3.2.1. Hidrojeller.....	15

2.3.2.2. Hidrokolloidler.....	15
2.3.2.3. Filmler.....	15
2.3.2.4. Köpükler.....	16
2.3.2.5. Aljinatlar.....	16
2.4. Nanofibröz Matrisler.....	17
2.4.1. Nanofiberler.....	17
2.4.2. Nanofiber Üretim Yöntemleri.....	19
2.4.3. Elektroeğirme Yöntemi.....	20
2.4.4. Elektroeğirme Yöntemini Etkileyen Parametreler.....	22
2.4.5. Üç Boyutlu (3B) Elektroeğirme Yöntemi.....	23
2.4.5.1. Islak Elektroeğirme.....	23
2.4.5.2. Şablon Destekli Elektroeğirme.....	24
2.4.5.3. Kriyojenik Elektroeğirme.....	24
2.4.5.4. Geleneksel Elektroeğirme Sonrası İşlemden Geçirme.....	24
2.4.5.5. Dispersiyon Şekillendirme.....	25
2.4.6. Elektroeğirme Yönteminde Kullanılan Polimerler.....	26
2.4.6.1. Kitosan.....	27
2.4.6.2. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL).....	28
2.4.7. Nanofiber Yara Örtü Malzemelerinde Biyoaktif Ajanların Kullanımı.....	29
2.4.7.1. Kurkumin.....	31
2.4.8. Nanofibröz Matrislerin Deri Doku Mühendisliğinde Kullanımları.....	32
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	35
3.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Üretimi.....	36
3.3. Kurkumin Yüklü PCL/Kitosan 3B Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Üretimi.....	38
3.4. Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Karakterizasyonu.....	39
3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	39
3.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi.....	39
3.4.3. Su Temas Açısı Ölçümü.....	39
3.4.4. Su Alım Kapasitesinin Belirlenmesi.....	40
3.4.5. <i>In Vitro</i> Biyobozunurluk Testi.....	40
3.4.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	40



3.4.7. Bilgisayarlı Tomografi ( $\mu$ -BT) Görüntülemesi .....	41
3.5. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerine Kurkumin Yükleme ve Salım Çalışmaları .....	41
3.5.1. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerine Yüklenen Kurkumin Miktarının Belirlenmesi .....	41
3.5.2. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinden Salınan Kurkumin Miktarının Belirlenmesi .....	42
3.5.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinde Kurkumin Salım Mekanizmasının Belirlenmesi.....	43
3.6. Antibakteriyel Testler.....	43
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	44
3.7.1. <i>İn Vitro</i> Sitotoksosite Testleri .....	44
3.7.1.1. Fare Fibroblast L929 Hücrelerinin Çoğaltılması .....	44
3.7.1.2. Hücre Canlılığının ve Morfolojilerinin Belirlenmesi .....	44
3.7.1.3. MTT Testi .....	45
3.7.1.4. Kristal Viyole Analizi .....	46
3.7.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin ve Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları .....	46
3.7.2.1. İnsan Dermal Fibroblast (HDF) Hücrelerinin Çoğaltılması.....	46
3.7.2.2. Nanofibröz Matrislere Hücre Ekimi.....	47
3.7.2.3. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi .....	47
3.7.2.3. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	48
3.8. İstatistiksel Analiz.....	48
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Üretimi .....	49
4.1.1. Geleneksel Elektroğirme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	49
4.1.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Elektroğrilmesi ve Morfolojik İncelemeleri.....	51
4.2. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu .56	
4.2.1. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Morfolojik İncelemeleri .....	56
4.2.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi.....	60

4.2.3. Su Temas Açısı Ölçümü .....	61
4.2.4. Su Alım Kapasitesi .....	63
4.2.5. <i>In Vitro</i> Biyobozunurluk Testi .....	63
4.2.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi .....	64
4.2.7. Bilgisayarlı Tomografi ( $\mu$ -BT) Görüntülemesi .....	66
4.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinde Kurkumin Salım Mekanizması .....	68
4.3.1. Yüklenen Kurkumin Miktarının Belirlenmesi .....	68
4.3.2. Kurkumin Salım Mekanizmasının Belirlenmesi .....	69
4.4. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Antibakteriyel Etkinliği .....	72
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	73
4.5.1. Sitotoksosite Çalışmaları .....	73
4.5.1.1. Hücre Canlılık Analizi – MTT Testi .....	73
4.5.1.2. Kristal Viyole Analizi .....	75
4.5.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerle Hücre Kültürü Çalışmaları .....	76
4.5.2.1. Hücre Proliferasyonu .....	76
4.5.2.2. Hücre Morfolojisi .....	78
4.5.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemeleriyle Hücre Kültürü Çalışmaları .....	80
4.5.3.1. Hücre Proliferasyonu .....	80
4.5.3.2. Hücre Morfolojisi .....	82
5. YORUM .....	87
6. KAYNAKLAR .....	90
ÖZGEÇMİŞ .....	105

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Deri dokusunun histolojik yapısı ve bileşenleri [14].	5
Şekil 2.2. (a) HDM'nin yapısındaki kollajen fiberler [17] ve (b) HDM'nin gözenekli yapısını gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri [15].	5
Şekil 2.3. Yara iyileşme fazları [25].	10
Şekil 2.4. İdeal yara örtü malzemelerinin özellikleri.	13
Şekil 2.5. (a) Geleneksel ve (b) modern yara örtü malzemeleri [32].	14
Şekil 2.6. Nanofiberlerin farklı biyomedikal alanlardaki uygulamaları [36].	17
Şekil 2.7. Nanofibröz matrislerde, hücre-matris etkileşimi ile matris morfolojisi arasındaki ilişki [38].	18
Şekil 2.8. (a) Gözenekli nanofiber yapısı [39], (b) içi boş nanofiberler [40], (c) kalıplanmış nanofibröz matrisler [41] (d) hizalanmış nanofiberler [42].	18
Şekil 2.9. Elektroğirme sisteminin bileşenleri.	20
Şekil 2.10. (a) Dönen silindir [48], (b) spiral bobin [48], (c) küresel [48], (d) çentikli metal plaka [47], (e) disk [47] ve (f) basamaklı piramit [47] eğirme sistemleri.	21
Şekil 2.11. (a) Islak elektroğirme [64], (b) şablon destekli elektroğirme [65], (c) elektroğirme sonrası işlemde geçirme [60] ve (d) dispersiyon şekillendirme [66] yöntemlerinin şematik olarak gösterimleri.	23
Şekil 2.12. Elektroğirmede kullanılan çeşitli sentetik ve doğal polimerden elde edilen nanofibröz matrislerin SEM görüntüleri (ölçek: 10 µm) [74].	26
Şekil 2.13. Kurkuminin deri doku mühendisliğinde kullanım alanları [98].	31
Şekil 3.1. İki boyutlu nanofibröz matrislerin üretimine ait şematik gösterim.	38
Şekil 3.2. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretimine ait şematik gösterim.	39
Şekil 4.1. (a) DCM:DMF karışımı içerisinde çözünmeyen kitosana ait kamera ve (b) %5 kitosan grubunun elektroğrilmesi sonucunda elde edilen boncuklu nanofiber yapıya ait optik mikroskop görüntüleri.	50
Şekil 4.2. Kitosan çözeltisi (AA) ile PCL çözeltisinin (DCM:DMF) karıştırılması ile oluşan jelleşmiş yapıya ait görüntüler.	50
Şekil 4.3. Yüzde 10 derişimindeki PCL (k/h) gruplarından üretilen nanofiberlere ait optik mikroskop görüntüsü. Görüntüde boncuklu yapıların fazlalığı PCL derişiminin yeterli gelmediğini göstermektedir.	51

<b>Şekil 4.4.</b> (a) PCL, (b) PCL-Kit5, (c) PCL-Kit10 ve (d) PCL-Kit20 nanofibröz matrislerin düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları. .....	53
<b>Şekil 4.5.</b> İki boyutlu üretim sonucunda oluşan nanofibröz matrislerin makroskopik görüntüleri.....	55
<b>Şekil 4.6.</b> (a) PCL-Kit-Kur5 ve (b) PCL-Kit-Kur10 nanofiber yapılarının düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları. ....	56
<b>Şekil 4.7.</b> Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin görüntüleri. ....	57
<b>Şekil 4.8.</b> Farklı çapta ve yükseklikte üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin görüntüleri.....	58
<b>Şekil 4.9.</b> (a) PCL-Kit, (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları. ....	59
<b>Şekil 4.10.</b> (a) PCL-Kit (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine ait düşük büyütmelelerdeki SEM görüntüleri..	60
<b>Şekil 4.11.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait FTIR spektrumları. .....	61
<b>Şekil 4.12.</b> (a) PCL, (b) PCL-Kit, (c) PCL-Kit-Kur5 ve (d) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 10. saniyedeki su temas açısı görüntüleri. ....	62
<b>Şekil 4.13.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait su tutma kapasitesi. .....	63
<b>Şekil 4.14.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait biyobozunurluk grafiği.....	64
<b>Şekil 4.15.</b> Mekanik özelliklerin belirlenmesi için yapılan basma testine ait görüntü. ..	65
<b>Şekil 4.16.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait gerilim-gerinim eğrisi.....	66
<b>Şekil 4.17.</b> (a) PCL-Kit, (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin $\mu$ -BT görüntüleri. ....	67
<b>Şekil 4.18.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenek çap dağılım histogramları.....	67
<b>Şekil 4.19.</b> PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için kümülatif kurkumin salım profilleri. ....	69
<b>Şekil 4.20.</b> PCL-Kit-Kur5 grubu için kurkumin salım kinetiği modellerine ait grafikler. .....	70

<b>Şekil 4.21.</b> PCL-Kit-Kur10 grubu için kurkumin salım kinetiği modellerine ait grafikler. .....	70
<b>Şekil 4.22.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait <i>E.coli</i> ve <i>S.aureus</i> bakterileri için 24. saatteki inhibisyon zonları. ....	73
<b>Şekil 4.23.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait sitotoksosite testi sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları. ....	74
<b>Şekil 4.24.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının %25, %50, %100 oranda ekstraktlarıyla muamele edilen L929 hücrelerinin ışık mikroskobu ile alınan 20X büyütmedeki görüntüleri. ....	75
<b>Şekil 4.25.</b> Pozitif ve negatif kontrol grupları için L929 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki 4X ve 20X büyütmelelerdeki görüntüleri. ....	76
<b>Şekil 4.26.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 2B nanofibröz matrislere ekilmiş hücrelerin 1., 7. ve 14. günlerdeki absorban değerleri. Veriler, 3 örneğin ortalaması ve standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar ise şu sembole gösterilmiştir; * $p<0,05$ . ....	77
<b>Şekil 4.27.</b> İki boyutlu nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 matrislere ait 1. gündeki farklı büyütmelelere ait SEM görüntüleri. ....	79
<b>Şekil 4.28.</b> 2B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 matrislerine ait 14. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. ....	80
<b>Şekil 4.29.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin 1., 4., 7. ve 14. günlerdeki MTT absorbanlarına ait grafik. Veriler, 3 örneğin ortalaması ve standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar ise şu sembollerle gösterilmiştir; * $p<0.05$ , ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ .....	81
<b>Şekil 4.30.</b> 3B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 yara örtü malzemelerine ait 1. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. ....	84
<b>Şekil 4.31.</b> 3B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 yara örtü malzemelerine ait 14. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri. ....	85

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Yara iyileşmesini etkileyen lokal ve sistemik faktörler [19].	8
<b>Çizelge 2.2.</b> Elektroğirmeyi etkileyen parametreler.	22
<b>Çizelge 2.3.</b> Nanofiber yara örtü malzemelerinde kullanılan biyoaktif ajanlar.	29
<b>Çizelge 3.1.</b> PCL12 grupları için elektroğirme parametreleri.	37
<b>Çizelge 3.2.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için elektroğirme parametreleri*.	38
<b>Çizelge 4.1.</b> Farklı örnek grupları için en uygun elektroğirme parametreleri.	52
<b>Çizelge 4.2.</b> Kurkumin yüklü 2B nanofibröz matrisler için en uygun elektroğirme parametreleri.	55
<b>Çizelge 4.3.</b> 2B nanofibröz matrisler ile 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine ait gözenek çapları.	60
<b>Çizelge 4.4.</b> İki boyutlu nanofibröz matrislerin su temas açısı ölçüm değerleri.	62
<b>Çizelge 4.5.</b> Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinde enkapsülasyon verimliliği.	68
<b>Çizelge 4.6.</b> PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için kurkumin salım verilerinin kinetik modellere uygulanması ile elde edilen model parametreleri ve belirme katsayısı değerleri.	71
<b>Çizelge 4.7.</b> PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait agar difüzyon yöntemi ile 24. saatin sonunda elde edilen zon çapları (mm).	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
g	Gram
k	Kilo
L	Litre
$\mu$	Mikro
m	Mili
n	Nano
N	Newton
Pa	Pascal
V	Volt

### Kısaltmalar

$\alpha$ -MEM	Minimum essential medium-alfa modifikasyonu
AA	Asetik asit
DBPS	Dulbecco fosfat tampon çözeltisi
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	Dimetiksülfoksit
FA	Formik asit
FBS	Fötal sığır serumu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre
GA	Glutaraldehit
Hap	Hidroksiapatit
HA	Hiyalüronik asit

HDM	Hücre dışı matris
HDF	İnsan dermal fibroblast hücresi
HMDS	Hekzametildisilazan
Kit	Kitosan
Kur	Kurkumin
MTT	3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
$\mu$ -BT	Bilgisayarlı tomografi
pH	Potansiyel hidrojen
PCL	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGA	Poliglikolik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLA	Polilaktik asit
PLLA	Poli-L-laktik asit
PU	Poliüretan
PVA	Polivinil alkol
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
t-But	Tert-bütanol
UV	Ultraviyole
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
h/h	Hacimce oran
k/h	Kütle-hacim oranı
k/k	Kütle-kütle oranı





# 1. GİRİŞ

İnsan vücudunun birincil savunma mekanizması olan derinin; çeşitli travmalar, yanık, kesik ya da cerrahi müdahaleler ile hasarlanması sonucunda, vücudun hemostazı bozulur ve vücut bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmasız hale gelir. Oluşan bu yaraların hızlı bir şekilde tedavi edilmesi hasta sağlığı açısından yüksek öneme sahiptir. Yara iyileşmesi, birbirini takip eden i) yaranın kanaması, ii) enflamasyon cevabı, iii) hücre çoğalması ve iv) doku yeniden modellenmesini içeren kompleks ve dinamik bir süreçtir. Tüm bu süreçler boyunca, yara bölgesinin enfeksiyondan korunamaması hastalarda ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. Ayrıca, hasarlı deri bölgesinde oluşan büyük miktardaki sıvının (eksüda) ortamdaki hızlı bir şekilde uzaklaştırılmaması da bakterilerin çoğalmasına ve enfeksiyonun artmasına neden olabilmektedir. Tüm bu nedenlerle, ideal bir yara örtü malzemesinden, kanamanın durdurulması, enflamasyonun azaltılması, doku rejenerasyonunu desteklemesi ve yara iyileşmesini hızlandırması beklenmektedir.

Yara iyileşmesinde sıklıkla kullanılan geleneksel yara örtü malzemeleri, yara bölgesine yapışma, yarayı kurutma, bakteriyel enfeksiyonu önleyememe, yeterli mekanik özelliklere sahip olmama ya da doku rejenerasyon kapasitelerinin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir. Alternatif olarak, modern yara örtü malzemeleri yaranın iyileşmesi için gerekli fiziksel şartları sağlamanın yanında; yara iyileşme sürecini de aktif bir şekilde desteklemeyi amaçlamaktadır. Bu tür yara örtü malzemeleri, birçok deri hasarının tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır; fakat bu malzemelerin de önemli eksiklikleri bulunmaktadır. Örneğin, mekanik özellikleri zayıf olan hidrojeller, eksüda emiliminde yetersiz kalarak yara bölgesinde iltihaplı sıvının birikmesine yol açabilmekte ve yaranın enfeksiyon riskini artırabilmektedir [1]. Benzer şekilde hidrokolloidler ve filmler de fazla eksüda emmekte yetersiz kalabilmekte ve enfeksiyona sebep olabilmektedir [2]. Köpükler ve aljinatlar ise nemli yaralar için uygun olmalarına rağmen, yarayı fazla kurutabildiklerinden kuru yaralar için uygun değildir [2]. Bu nedenle, yara iyileşmesi için tüm bu dezavantajları giderebilecek yeni biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanofibröz matrisler, yüksek sızıntı absorpsiyonları, oksijen geçirgenliği ve yüzey alanı/hacim oranları gibi üstün özellikleri nedeniyle, modern yara örtü malzemeleri arasında ön plana çıkmaktadır. Nanofiber yapıda biyomalzemelerin üretiminde, elektroçirme yöntemi basit oluşu, ucuz ekipmanlar gerektirmesi ve çok farklı

fonksiyonallığa sahip nanofiber yapılar üretebilmesi nedeniyle en çok kullanılan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, geleneksel elektroğirme yöntemiyle elde edilen biyomalzemeler, sıkıca paketlenmiş bir düzene sahip nanofiber katmanlarından oluştuğu için elde edilen son ürün küçük gözeneklere ve düşük kalınlığa sahip iki boyutlu (2B) yapılardır. Bu yapılar, yara iyileşmesinde etkinliği bilinen biyoaktif ajanlar için uygun taşıyıcı özellikler gösterse de küçük gözenekleri ve düşük kalınlıkları nedeniyle yara bölgesindeki eksüdanın uzaklaştırılmasında yetersiz kalabilmekte ve ayrıca doku rejenerasyonunu sağlayacak olan hücrelerin malzeme derinlikleri boyunca göçüne izin vermeyerek fonksiyonel doku oluşumunu da kısıtlayabilmektedir. Tüm bu sebeplerden, makrogözeneklere sahip ve hücre dışı matrisin (HDM) üç boyutlu (3B) yapısını daha iyi taklit edebilen nanofibröz matrislerin üretiminde yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanofiber yara örtü malzemelerinin birçok temel özelliği kullanılan polimerlere göre şekil almaktadır. Tez çalışması kapsamında, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış, doku rejenerasyonu ve yara örtüsü uygulamalarında yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir polimer olan poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) ile yine bandajlarda ve diğer hemostatik uygulamalarda kullanımı ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) özellikle yüksek biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri sebebiyle elektroğirilmiş nanofiberlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [3]. Ancak, PCL nanofibröz matrislerin, hidrofobik özellikleri nedeniyle hücrelerin çoğalması ve göçü için uygun bir mikroçevre oluşturamadığı da gösterilmiştir [4]. Bu nedenle, nanofiberlerin hidrofilitelerini iyileştirmek için çeşitli hidrofilik biyomalzemelerin PCL ile karışım yapılarak kullanılması yaygın bir uygulamadır [4]. Tez çalışması kapsamında PCL'nin hidrofilitelerinin artırılması amacıyla biyouyumlu, biyobozunur ve antibakteriyel doğal bir polimer olan ve insan vücudunda bulunan enzimlerle toksik kalıntı üretmeden parçalanabilen kitosan kullanılmıştır [5, 6].

Yara iyileşmesinin hızlandırılması ve etkin iyileşmenin sağlanması amacıyla, biyomalzemeler çeşitli biyoaktif ajanlarla desteklenebilmektedir. İdeal bir yara iyileştirici ajanın, yarayı bakteriyel enfeksiyondan koruması, enflamasyonu azaltması ve hasarlı dokuyu yeniden yapılandırmak için hücre göçünü ve proliferasyonunu uyarması beklenmektedir [7]. Antiinflamatuar ve antioksidan özelliklerinden dolayı kurkumin yara iyileştirme potansiyeli oldukça yüksek bir doğal bileşiktir ancak bu molekülün kararlılığı

ve biyoyararlanımı düşüktür [8]. Ayrıca, kurkuminden türetilen *in vivo* ürünler de çok düşük biyoaktiviteye sahiptir [9]. Bu sınırlamalar, kurkuminin stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmak için uygun taşıyıcıların geliştirilmesine yönelik çalışmaların artmasına yol açmıştır. Nanofiberler, yapıları sebebiyle ilaçların kontrollü bir şekilde salınmasına olanak sağlar [10]. Bu tez çalışmasında, elektroğirme yöntemi ile üretilen 3B nanofiber yara örtü malzemeleri aracılığıyla kurkuminin kontrollü salımı hedeflenmiştir.

Sunulan tez kapsamında sağlıklı dokuyu iyi taklit edebilecek nanofiber yapılı, 3B elektroğirme yöntemi ile üretilmiş, makrogözeneklere sahip, biyoyumluluğu yüksek ve biyoaktif ajan olarak kurkumini kontrollü bir şekilde salabilen bir yara örtü malzemesi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tez kapsamında ilk olarak, elektroğirme yöntemiyle kurkumin içeren PCL/kitosan 2B nanofibröz matrisler hazırlanmıştır. Devamında 2B nanofibröz matrisler sulu bir organik çözücüde süspansiyon haline getirildikten sonra bir kalıba dökülmüş ve dondurarak kurutma sonrasında kalıp içerisinde makrogözenekli 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri üretilmiştir. Üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin detaylı fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yara örtü malzemelerinden kurkumin salım mekanizmasını belirlemek için sıfıncı derece (zero-order), birinci derece (first-order), Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri kullanılarak salıma en uygun model ve model parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca, antibakteriyel çalışmalar *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ile, biyoyumluluk çalışmaları ise L929 fare fibroblast hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. Son olarak, biyomalzeme hücre etkileşimleri insan dermal fibroblast hücreleriyle (HDF) gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

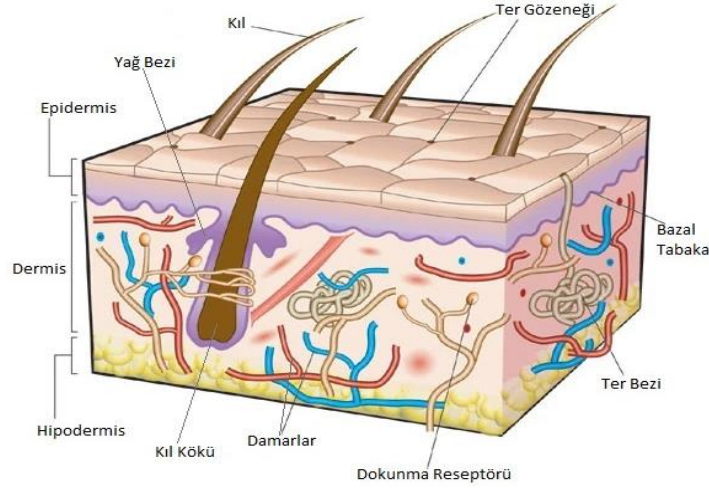
## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konular literatür araştırması ile birlikte ayrıntılı olarak sunulmuştur. Öncelikle, deri ve yara fizyolojisi hakkında genel bilgiler; yara iyileşmesini etkileyen faktörler ve yara iyileşme fazları anlatılmıştır. Sonraki bölümlerde geleneksel ve modern yara örtü malzemeleri açıklanmış ve özellikle nanofibröz yara örtü malzemeleri detaylandırılmıştır. Son olarak, geleneksel elektroçirme yöntemi ile ilgili bilgiler verilmiş; 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretim yöntemleri ve avantajlarına değinilmiş; nanofiber yara örtü malzemelerinde kullanılan polimerler ve biyoaktif ajanlar açıklanmıştır.

### 2.1. Deri

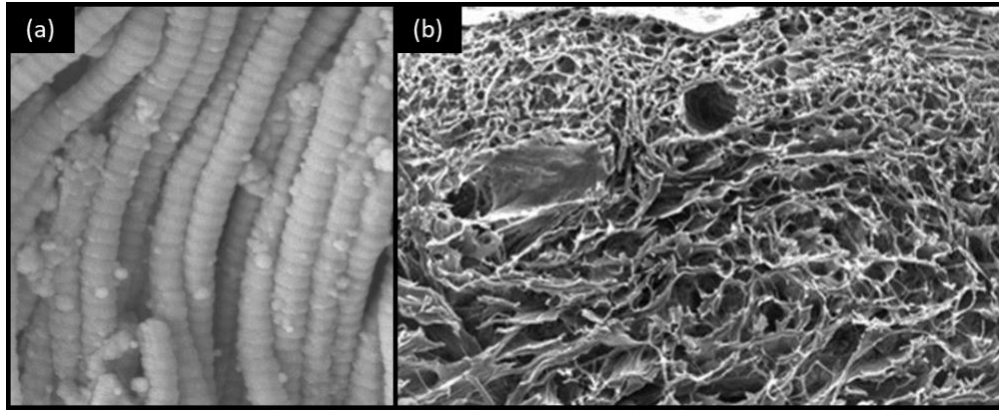
Deri, vücudun en büyük organıdır, ortalama bir yetişkinde 7.600 cm<sup>2</sup>'yi kaplar ve bir kişinin vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Saç, bezler ve tırnaklar gibi yapılar ile birlikte vücudun örtü sistemini oluşturur. Vücudun belirli bölgelerinde metabolik işlevlere göre farklılık gösteren bir yapıya sahiptir [11]. Sürekli değişen dış ortam ile vücudun iç ortamı arasında dinamik bir arayüz rolü oynayan deri, hemostazın korunmasına yardımcı olur. Deri, milyonlarca duyu alıcısı ve geniş damar ağı ile büyük bir sisteme dahildir. Çevre ile iletişime izin verdiği gibi vücudu mekanik, kimyasal ve biyolojik dış etkilere karşı koruyucu bir role de sahiptir [12]. Aynı zamanda, cildin yüzeyindeki yağlı salgılar, vücudu su geçirmez hale getiren ve çoğu patojenin büyümesini geciktiren asidik bir koruyucu film (pH 4.0–6.8) oluşturur. Deri, vücut boyunca değişken bir kalınlık gösterir. Örneğin, ayak tabanları ve avuç içi gibi vücudun aşınmaya maruz kalan kısımlarında kalın iken göz kapaklarında ve kulak zarında ise en ince yapıdadır [11].

Deri üç katmandan oluşur, bunlar en dıştan içeriye doğru olmak üzere: epidermis, dermis ve hipodermistir (Şekil 2.1). Embriyolojik olarak epidermis ektodermal kökenli iken dermis ve hipodermis mezodermal kökenlidir [13].



**Şekil 2.1.** Deri dokusunun histolojik yapısı ve bileşenleri [14].

Derinin yapısındaki en büyük bileşenlerden birisi deriye esneklik, gerilme mukavemeti ve sıkıştırılabilirlik özelliklerini veren HDM'dir. Temel olarak HDM, hücelere yapısal destek sağlamak için hücresel bileşenler, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, iyonlar ve fonksiyonel proteinler, proteoglikanlar ve sinyal moleküllerinden oluşan heterojen bir yapıdır. Hücre dışı matrisin, büyüme, yara iyileşmesi ve hücre sinyalleşmesinde de önemli roller oynadığı bilinmektedir. Ayrıca HDM'nin biyomekanik etkileşimler yoluyla hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü yönlendirebildiği de gösterilmiştir [15]. Hücre dışı matriste kollajen fiberlerin yoğun olarak bulunduğu düşük gözenekli alanlar hücre geçişine izin vermezken, kollajen fiberlerinin daha az yoğun bir şekilde bulunduğu yüksek gözenekli alanlar hücre geçişine izin vermektedir. HDM'nin gözenekli yapısındaki bu çeşitlilik, hücrelerin göçünü, yapışmasını, hücresel uzantıların yönelimini ve hücrelerin dizilim düzenini kontrol etmektedir [16]. Hücre dışı matrisin yapısındaki kollajen fiberler ve HDM'nin gözenekli yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** (a) HDM'nin yapısındaki kollajen fiberler [17] ve (b) HDM'nin gözenekli yapısını gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri [15].

### **2.1.1. Epidermis**

Epidermis derinin en dıştaki tabakasıdır. Ektodermden köken alan epidermis, çok katlı yassı epitel dokudan oluşur ve kalınlığı 0.007 – 0.12 mm arasında değişir. Yüzeyel katmanlarının tamamı ölü hücrelerden oluşur. Epidermis, bulunduğu yere bağlı olarak, dört veya beş katmandan oluşabilir. Avuç içi ve ayak tabanlarının epidermisi beş katmana sahiptir çünkü bu alanlar fazla sürtünmeye maruz kalır. Vücudun diğer tüm bölgelerinde epidermin sadece dört katmanı vardır [11]. Epidermis, dermin papiller tabakasından bir bazal membran ile ayrılır. Epidermis kan damarı içermez ve papiller tabakanın kılcal damarlarından difüzyonla beslenir. Epidermin çoğu hücresi keratinosit hücreleridir. Keratinositler, epidermin yapısal gücü ve geçirgenlik özelliklerinden sorumludur. Keratin proteinleri cildi su geçirmez hale getirir ve mikroorganizmaları da dışarıda tutar [11]. Ayrıca melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de epidermiste bulunur. Langerhans hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler ile birlikte derideki immün sistemin savunma mekanizmalarında rol alır [12].

### **2.1.2. Dermis**

Dermis tabakası, epidermal tabakanın altında bulunur. Dermis ana hücreleri fibroblastlardır ve bu hücreler dermin hücre dışı matrisini üretir. Dermisin kuru ağırlığının yaklaşık %70'i kollajen fiberlerden oluşur. Kollajen fiberlerin dermiste oluşturduğu ağ yapısı, deriye güç ve dayanıklılık sağlar. Dermisteki geniş kan damarı ağı, epidermin canlı kısmına besin sağlar, vücut ısısını ve kan basıncını düzenlemede de önemli bir rol oynar [11]. Sinir uçları, kıl folikülleri, düz kaslar, bezler ve lenf damarları da dermiste bulunur. Sinir uçları yapı ve işlev bakımından çeşitlilik gösterir: ağrı, kaşıntı ve sıcaklık algılamada serbest sinir uçları; hafif dokunuşları algılamada saç folikül reseptörleri; derin basınç algılamada Pacinian cisimcikleri; deride iki noktada eşzamanlı uyarıyı algılamada Meissner cisimcikleri; ve sürekli dokunma veya basınç algılamada Ruffini cisimcikleri rol alır [12].

### **2.1.3. Hipodermis**

Hipodermis veya deri altı doku aslında derinin bir parçası değildir, ancak dermisi alttaki organlara bağlar. Hipodermis, esas olarak gevşek bağ dokusundan ve kan damarlarıyla iç içe geçmiş yağ hücrelerinden (adiposit) oluşur. Hipodermisteki yağ dokusu miktarı vücudun bulunduğu bölgeye ve bireyin cinsiyetine, yaşına ve beslenme durumuna göre

değişir. Hipodermis, lipidleri depolamada, vücudu yalıtma ve sıcaklığı düzenlemede rol oynar [11, 12].

## **2.2. Yara**

Yara; yanık, travma, ameliyat veya yırtılma gibi çeşitli sebepler ile derinin veya mukozanın bütünlüğünün bozulmasıdır. Vücudumuzun birincil savunma mekanizması olan derinin hasarlanması sonucunda, vücudun hemostazı bozulur ve vücut bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmasız hale gelir. Deri yaralanmaları hastanın sağlığını ve yaşam kalitesini ciddi oranlarda tehdit eden ve hızlı tedavi edilmesi gereken bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaralanmaların boyutuna ve derinliğine bağlı olarak, yara iyileşmesi de karmaşık bir fizyolojik süreç haline gelebilmektedir. Yara iyileşmesinin tam olarak gerçekleşebilmesi için, iyileşme sürecindeki tüm adımların (hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve matürasyon) eksiksiz ve kesintiye uğramadan gerçekleşebilmesi büyük önem taşımaktadır [18]. Ayrıca bu süreç boyunca yaranın enfeksiyon riskine karşı korunması da hasta sağlığı açısından gereklidir.

### **2.2.1. Yara Çeşitleri**

Yaraların sınıflandırılmasında birçok kıstas kullanılmaktadır. Etiyolojisine göre yaralar; cerrahi yaralar, delici yaralar, ezik yaraları ve yanık yaraları olarak sınıflandırılabilir. Süresine göre yaralar; akut ve kronik olarak sınıflandırılır. Akut yaralar, öngörülebilir bir süre içerisinde iyileşen ve genelde travma sonucunda oluşan yaralar iken kronik yaralar ise zamanla tekrar eden ve öngörülebilir bir süre içerisinde iyileşmeyen yaralardır. Deri bütünlüğüne göre yaralar; derinin bütünlüğünün korunduğu kapalı yaralar ile deri bütünlüğünün bozulduğu açık yaralar olarak sınıflandırılır [18].

Yaraların kontaminasyon derecelerine göre sınıflandırılmasında, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri tarafından oluşturulan ve dört sınıftan oluşan sistem yaygın olarak kullanılmaktadır. Sınıf 1- Temiz yaralarda enflamasyon yoktur; gastrointestinal, solunum ve üreme-boşaltım sistemlerine girilmemiştir. Sınıf 2- Temiz-kontamine yaralarda gastrointestinal, solunum veya üreme-boşaltım sistemlerine kontrollü olarak girilmiş ve alışılmışın dışında bir kontaminasyon olmamıştır. Sınıf 3- Kontamine yaralar, açık ve yeni travmatik yaralar ile pürülan olmayan enflamasyon bulunan yaraları kapsamaktadır. Sınıf 4- Kirli ve enfekte yaralar ise ölü doku veya yabancı cisim bulunan yaraları, dışardan kirlenmiş yaraları ve bakteriyel enfeksiyon gözlenen yaraları kapsamaktadır [18].



## 2.2.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesi, hücreler ve mediatörler (düzenleyiciler) arasındaki kompleks bir dizi reaksiyon ve etkileşim ile meydana gelir. Yapılan araştırmalar ile her yıl yeni mediatörler keşfedilmekte ve hücrel etkileşimler konusundaki bilgi birikimi artmaktadır. Bu sürecin karmaşıklığı sebebiyle yara iyileşmesinin gecikmesine, kimi durumlarda ise tamamen durmasına yol açabilecek birçok faktör bulunmaktadır.

**Çizelge 2.1.** Yara iyileşmesini etkileyen lokal ve sistemik faktörler [19].

Lokal Faktörler	Sistemik Faktörler
Oksijenasyon	Yaş ve Cinsiyet
Damarlanma	Stres
Enfeksiyon	Diyabet
Yabancı Cisim	İyileşmeyi Etkileyen Hastalıklar
	Savunma Sistemini Etkileyen Hastalıklar
	Obezite ve Beslenme

Genel olarak, yara iyileşmesini etkileyen faktörler lokal faktörler ve sistemik faktörler olarak ikiye ayrılır. Lokal faktörler, spesifik bir yarayı ve bu yaranın iyileşmesini doğrudan etkileyen faktörlerdir. Sistemik faktörler ise hastanın genel iyileşmesini etkileyen hastanın yaşı, genel sağlık durumu gibi tüm durumlardır. Lokal ve sistemik faktörler Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

### 2.2.2.1. Lokal Faktörler

Oksijenasyon ve damarlanma hücre metabolizmasında büyük bir rol oynamaktadır. Yaranın ilk oluşumunda mikroçevredeki hücreler yüksek oranda oksijen tükettiğinden hipoksik bir ortam oluşmaktadır. Sonrasında oksijenlenmenin tekrar sağlanmaması halinde yara iyileşmesi sekteye uğramaktadır [20]. Enfeksiyona karşı direnç geliştirilmesi ve yeni doku oluşumu için de yaranın oksijenlenmesi yüksek öneme sahiptir [21]. Yaranın yetersiz damarlanması sonucunda oksijenasyon sağlanamayacağından, bu durum da benzer şekilde yara iyileşmesini geciktirmektedir [19].

Enfeksiyon, yara iyileşme sürecini geciktiren faktörlerden birisidir. Normal bir yara iyileşme sürecinin enflamasyon fazında yara çevresindeki bakterilerin giderilmesi gerekir; bu bakterilerin giderilememesi durumunda yara enfekte olabilmektedir. Bu

durum, enflamasyon fazının uzamasına sebep olarak yara iyileşmesini geciktirir [19, 22]. Yaranın çevresinde biriken eksüdalar bakterilere uygun ortam oluşturacaklarından, enfeksiyonun engellenmesi için bu sızıntıların hızlı bir şekilde uzaklaştırılması önemlidir [23].

Yabancı cisim, yara bölgesinde bulunan ve yaranın kapanmasını engelleyen; cam, kıymık, ölü doku vb. her türlü maddeye verilen genel isimdir. Yabancı cisimler yara çevresinde bakterilerin yaşayabileceği bir ortam oluşturarak enflamasyon sürecinin uzamasına ve epitelizasyonu engelleyerek yara iyileşmesinin durmasına sebep olur. Yara çevresinden yabancı cisimler uzaklaştırılmadan tam olarak iyileşme gerçekleşemez [22].

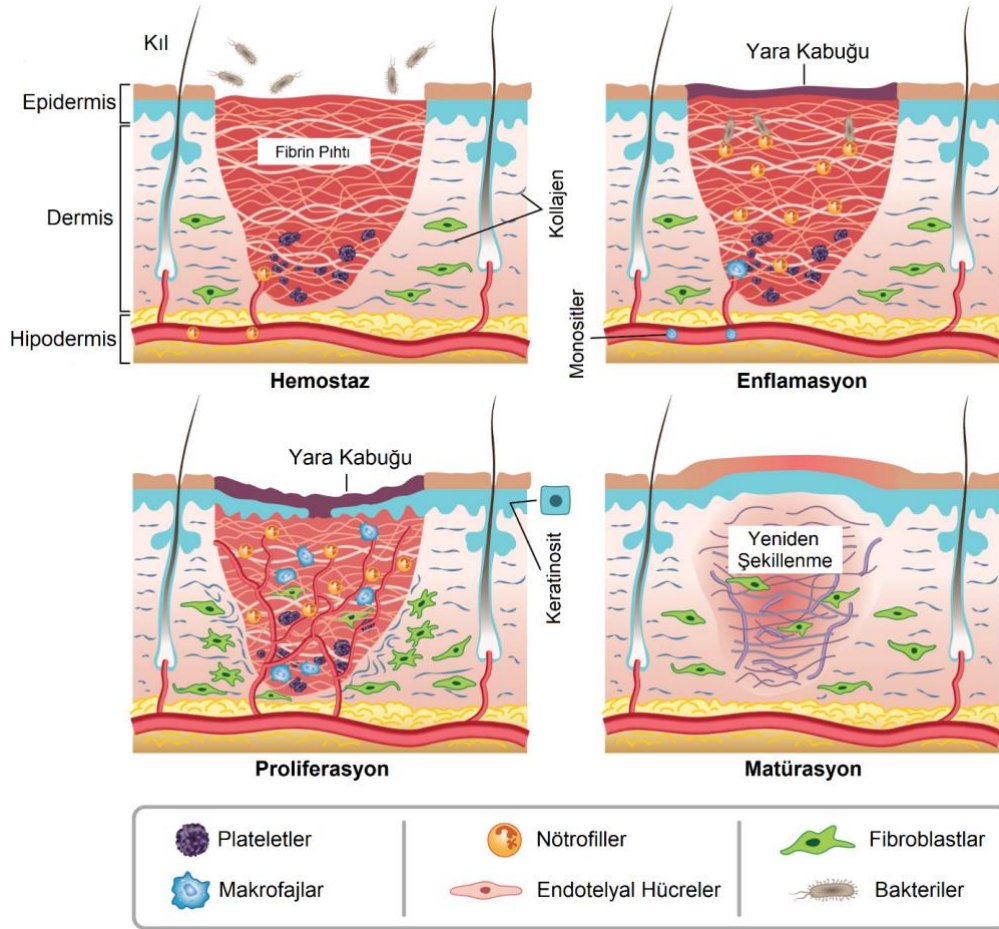
#### **2.2.2.2. Sistemik Faktörler**

Etkili bir yara iyileşmesi sürecinin gerçekleşmesi için sağlıklı bir vücut metabolizması çok önemlidir. Vücut metabolizmasında bozulmaya yol açan tüm durumlar yara iyileşmesini de dolaylı yoldan etkilemektedir. Yaşlı insanlarda enflamatuvar cevap ve epitelizasyon aşamaları daha yavaş gerçekleştiğinden yara iyileşmesi gecikebilmektedir. Ayrıca ileri yaş, birçok risk faktörü ile ilintili olduğu için de yara iyileşme sürecini etkileyen bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları vb. oksijenlenmeyi etkileyerek dolaylı yoldan yara iyileşmesini geciktirir. Benzer şekilde immün rahatsızlıklar da enflamasyon safhasında bakterilerin giderilmesini engellediğinden yara iyileşmesinde gecikmeye yol açar. Stres; kardiyovasküler hastalıklar, obezite, kanser gibi birçok hastalık ile ilintilidir ve yüksek stresin bağışıklık sistemini etkilediği de bilinmektedir. Beslenme ise genel metabolizmayı ve özellikle epitelizasyonu etkilediği için yara iyileşmesini etkileyen faktörler arasında sayılmaktadır [19, 22].

#### **2.2.3. Yara İyileşme Fazları**

Yara iyileşme süreci, birbiri ile örtüşen, düzenli ve her biri önemli dört temel fazdan oluşur. Bu fazlar hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve matürasyon olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Bu fazlarda gerçekleşen olaylar, sağlıklı, hızlı ve tam bir yara iyileşmesinin gerçekleşmesi için önemlidir [19]. Süreçte yaşanan kesintiler veya düzensizlikler yara iyileşmesinin gecikmesine veya kimi durumlarda tamamen durmasına neden olabilmektedir. Düzensiz bir yara iyileşmesi sürecinin sürekli olarak tekrar etmesi, kronik yaraların oluşumuna ve yara izi oluşumuna da sebep olabilmektedir [24]. Bu sebeple, yara

iyileşme sürecinin iyi anlaşılması ve gerektiğinde bu sürecin desteklenmesi, sağlıklı bir yara iyileşmesinin sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2.3. Yara iyileşme fazları [25].

### 2.2.3.1. Hemostaz

Hemostaz fazı, yaralanmadan hemen sonra damarların daralması ve fibrin pıhtısı oluşumu ile başlar. Bu faz yaklaşık olarak 1-3 gün boyunca sürer. Yara oluşumu sırasında açığa çıkan kollajen, pıhtılaşma aşamasını aktive eder. Pıhtı; kollajen, trombositler, trombin ve fibronektinden oluşur ve bunlar enflamatuvar yanıtı başlatan sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakır. Pıhtı içerisinde bulunan trombositler, makrofajları ve fibroblastları çeken ve aktive eden trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi faktörleri de salgılamaktadır. Fibrin pıhtısı, yara çevresine göç eden nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri için geçici bir hücre dışı matrisi sağlar [1, 19, 22, 26].

### **2.2.3.2. Enflamasyon**

Enflamasyon fazı, hemostaz fazından sonra gerçekleşir ancak hemostaz fazı ile önemli ölçüde örtüşür [24]. Bu faz esas olarak gereksiz doku hasarını önlemeyi ve patojenik organizmalar ile yabancı kalıntıları ortadan kaldırmayı amaçlar. Enflamasyon fazı, fagositik nötrofiller ve makrofajlar gibi kan hücrelerinin yara bölgesine göç etmesi ile başlar. Fagositler başlangıçta yabancı partikülleri uzaklaştırırken, aynı zamanda enflamasyon fazının sonuna doğru fibroblast göçünü ve proliferasyonunu teşvik etmek için uygun sitokinleri de serbest bırakır [27].

Enflamasyon fazında yara bölgesine nötrofil ve monosit geçişini kolaylaştıran karmaşık bir dizi moleküler sinyaller rol almaktadır. Akut bir yarada, yaralı hücreler ölür ve ürik asit, DNA, RNA, hücre dışı matris bileşenleri gibi hücre içi içerikler açığa çıkar. Bu ürünler, hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) olarak adlandırılmaktadır. Yara, bir patojen tarafından kontamine olmuş ise, patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler) de yara ortamına salınmaktadır. Lokal dokuda yerleşik hücreler, üzerindeki reseptörler ile bu tehlike sinyallerini tanır ve bu da yerel hücrelerin aktivasyonuna yol açar. Bu aktivasyon ile enflamasyon yanıtını artıracak sinyal yolları indüklenir [24].

Nötrofiller, yeni oluşmuş bir yarada en çok bulunan enflamasyon hücrelerini temsil etmektedir. Temel vazifeleri hücre kalıntıları gidermek ve enfeksiyonu önlemektir. Nekrotik hücrelerden salınan DAMP'lerin, nötrofilleri yara bölgesine toplayan ilk sinyaller olduğu düşünülmektedir. Nötrofiller, patojenleri fagosite ederek ve sonrasında reaktif oksijen türleri, proteazlar veya antimikrobiyal proteinler yoluyla bu patojenleri öldürerek yara enfeksiyonuna karşı savunmada rol alır. Patojenleri temizlemeye ek olarak, nötrofillerin ayrıca enflamasyonu düzenleyici ve anjiyogenezi destekleyici etkileri de gösterilmiştir [18, 19, 22, 24].

Makrofajlar; anjiyogeneze, fibroplazide, hücre proliferasyonunda ve enflamasyon fazından sonraki fazlara geçişte kritik bir rol oynamaktadır. Başlangıçta makrofajlar, ölü hücreleri, nekrotik dokuları ve toksik metabolitleri dokulardan yapısal olarak temizleyen ve uzaklaştıran fagositik monosit türevli hücrelerdir. Yaralanmadan sonra, bu hemostatik işlevler, doku onarımını kolaylaştırmak için çeşitli uyarımlarla güçlendirilir [18, 24].

### **2.2.3.3. Proliferasyon**

Proliferasyon fazı, yaralanmadan sonra yaklaşık 3. günde başlar ve 2-4 hafta sürer [18]. Bu faz; epitelizasyon, revaskülarizasyon ve granülasyon dokusunun oluşumunu

kapsamaktadır. Enflamasyon aşamasında aktif hale gelen makrofajlar, anjiyogenez faktörünü ve fibroblast uyarıcı faktörü salmaya başlar. Fibroblast uyarıcı faktörler, fibroblastları kollajen ve glikozaminoglikanlar üretmek üzere aktive eder ve yara bölgesine kan sağlayan yeni kılcal damarların gelişimini başlatır. Fibroblastlar, yapı taşları olarak kollajeni kullanarak hücre büyümesini desteklemek için gerekli olan yeni hücre dışı matrisi üreterek yara iyileşme sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır [19]. Hasardan yaklaşık 4 gün sonra yara bölgesinde granülasyon dokusu oluşumu başlar. Fibroblastlar ve makrofajlar tarafından salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü, anjiyogenez ve fibroplazileri teşvik ederek granülasyonun gerçekleşmesini sağlar. Fibroblastlar daha sonra fenotipik olarak miyofibroblastlara dönüşür ve yara kapanmasını sağlayan büzücü bir kuvvet oluştururlar [18]. Granülasyon fazı ve doku birikimi sürecinde, kılcal damarlar tarafından sağlanan besinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeterli besin sağlanamadığı takdirde kronik olarak iyileşmeyen bir yara oluşabilir [22].

#### **2.2.3.4. Matürasyon**

Matürasyon (yeniden şekillenme) fazı, yara iyileşmesinin en uzun evresidir ve sentez ile bozunma arasındaki hassas dengenin gerçekleştiği fazdır [1]. Anjiyogenezin yavaşlamasını ve granülasyon dokusundan yara izine geçişi içerir. Bu geçiş sırasında granülasyon dokusundaki tip III kollajen, tip I kollajen ile değiştirilir [24]. Klinik olarak, matürasyon fazı en önemli basamaklardan biridir. Bu aşamanın ana özelliği, HDM'nin normal dokuya benzer bir mimariye göre yeniden şekillenmesidir [19]. Kollajen sentezi yaralanmadan sonra en az 4-5 hafta boyunca devam eder. Zamanla, ilk kollajen iplikleri emilir ve tip I kollajen biriktirilerek stres hatları boyunca düzenlenir [22]. Ayrıca matürasyon fazında, yaranın vasküler yoğunluğunun normale dönmesi de gerçekleşir [19].

### **2.3. Yara Örtüleri**

Vücut ile dış ortam arasında fiziksel bir bariyer oluşturan, sağladığı estetik görünümün yanı sıra gerçekleştirdiği çok çeşitli fonksiyonlar ile hemostazın korunmasında önemli rol oynayan derinin hasar görmesi durumunda hızlı ve sağlıklı bir şekilde onarılması çok önemlidir. Ancak, yukarıda da değinildiği üzere, lokal ve sistemik birçok faktör sebebiyle yara iyileşme süreçleri aksayabilmektedir. Bu durum ise hastaların yaşam kalitesini düşürmekte ve sağlık sistemi üzerinde büyük bir sosyoekonomik yük oluşturmaktadır.

Yara bakımı, yara iyileşme süreçlerinin daha sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi amacıyla; yaranın temizlenmesi, debridmanı, eksüda absorpsiyonu ve korunmasını da kapsayan çok yönlü bir işlemdir.

Deri hasar gördüğünde yaranın seviyesine ve şiddetine göre uygun bir pansuman ile kapatılması gerekmektedir [28]. Yara iyileşmesi sürecinin hızlandırılması için uygulanan pansuman yara ortamında uygun bir fiziksel ortam sağlamalıdır. İdeal bir yara örtüsü, yara bölgesinde nemli ortamı uygun şekilde korumalı, yara yüzeyinden çıkan eksüdaları emmeli, mikroorganizmalara karşı bir bariyer görevi görürken gaz alışverişini de sağlamalıdır (Şekil 2.4) [29]. Bunların yanı sıra, yara örtüsü malzemelerinin iyileşme sürecini desteklemeleri için hücre farklılaşması, yapışması ve proliferasyonu gibi diğer karmaşık süreçleri de desteklemeleri beklenmektedir [30].



**Şekil 2.4.** İdeal yara örtü malzemelerinin özellikleri.

Son yıllarda, yara iyileşmesi ile ilgili moleküler ve hüresel süreçlerin daha iyi anlaşılması ile yara örtüsü malzemelerinde de gelişmeler gözlemlenmiştir. Bu kapsamda, yara örtüsü malzemelerini geleneksel ve modern yara örtüleri olarak sınıflandırmak mümkündür.

### **2.3.1. Geleneksel Yara Örtü Malzemeleri**

Geleneksel yara örtüleri olarak pamuk, doğal/sentetik bandajlar ve gazlı bezler örnek verilebilir. Bandajlar, farklı işlevleri yerine getiren doğal/sentetik malzemelerden üretilir

(Şekil 2.5a). Gazlı bezler; dokuma ve dokuma olmayan pamuk, suni ipek, poliester veya her ikisinin kombinasyonundan yapılabilir (Şekil 2.5a). Bu yara örtüleri kurudur ve nemli bir yara ortamı sağlamada yetersiz kalır [2, 31].



**Şekil 2.5.** (a) Geleneksel ve (b) modern yara örtü malzemeleri [32].

Steril gazlı bez pedler, yaradan sızan eksüdalara emmek için açık yaraları sarmada kullanılmaktadır. Sağlıklı dokunun eksüda birikmesinden dolayı zarar görmesini önlemek için gazlı bez sargılarının düzenli olarak değiştirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple modern sargılara kıyasla maliyet açısından daha dezavantajlı oldukları bildirilmiştir [2]. Gazlı bez sargılar bakterilere karşı bir miktar koruma sağlamaktadır. Ancak, sargının dış yüzeyi yara eksüdası tarafından nemlendiğinde bu koruma kaybolur. Ayrıca, gazlı bez sargıları, sıvı üretimi azaldıkça yaralara daha fazla yapışma eğilimi göstermekte ve böyle durumlarda çıkarılması ağrılı olduğundan hastada rahatsızlık yaratabilmektedir [2, 31].

Genellikle geleneksel yara örtüleri, hafif eksüda seviyelerine sahip temiz ve kuru yaralar için uygundur. Yarayı korumak için ikincil pansuman olarak da kullanılabilir [31].

### 2.3.2. Modern Yara Örtüleri

Geleneksel yara örtülerinin sahip oldukları dezavantajların üstesinden gelmek ve daha etkili bir yara iyileşmesini sağlamak amacıyla modern yara örtüleri geliştirilmiştir. Bunlar, yarayı sadece örtmek yerine yara iyileşmesini de aktif bir şekilde desteklemek amacıyla üretilmiştir. Modern yara örtülerine örnek olarak hidrojeller, hidrokolloidler, filmler, köpükler ve aljinatlar verilebilir (Şekil 2.5b).

### **2.3.2.1. Hidrojeller**

Yara örtü malzemesi olarak kullanılan hidrojeller sentetik polimerlerin çapraz bağlanması ile oluşan, yüksek oranlarda su içeren (70–90%), suda çözünmeyen hidrofilik materyallerdir. Bunlar, yüksek su içeriklerinden dolayı uygulandıkları bölgede nemli bir ortam oluşturabilir ve ortamdaki nemliliğin devamını sağlayabilir; bu sebeple kuru yaralar için kullanımları uygundur [31]. Üretim aşamasında, farklı polimer malzemeler veya farklı çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak hidrojellerin özellikleri değiştirilebilmektedir [1]. Hidrojel yara örtüleri biyolojik doku ile reaksiyona girmez ve tahriş edici değildir, ayrıca metabolitlere karşı geçirgendir. Hidrojeller ayrıca kalıntı bırakmaz ve yaraların yeniden epitelizasyonunu hızlandırır. Yumuşak ve elastik yapıları sayesinde iyileşme tamamlandıktan sonra yaradan kolaylıkla uzaklaştırılabilir [31]. Ancak, yüksek su oranlarından dolayı emme kapasiteleri düşüktür; bu sebeple eksüda miktarının fazla olduğu yaralarda kullanımları eksüda birikmesine sebep olabilmektedir [33]. Yüksek eksüda birikmesi, bakteriler için uygun bir ortam oluşmasına ve yaraların enfekte olmasıyla neticelenebilmektedir. Bu sebeple hidrojellerin eksüda miktarının fazla olduğu yaralarda kullanılmaları uygun değildir [1].

### **2.3.2.2. Hidrokolloidler**

Hidrokolloidler, koloidal (jel oluşturucu) malzemelerin, elastomer veya yapıştırıcı malzemeler ile birleştirilmesi ile oluşmaktadır. Tipik koloidal malzemeler arasında karboksimetilselüloz, jelatin ve pektin sayılabilir [1]. Bu malzemeler hem kuru yaralarda hem de nemli yaralarda kullanılabilir [31]. Hidrokolloid yara örtülerinin, kronik yaralarda salin veya parafinli gazlı bezden daha etkili olduğu gösterilmiştir [1]. Hidrokolloidler, yüksek oranda eksüdalı yaralar ve nöropatik ülserler için endike değildir; çoğunlukla ikincil pansuman olarak kullanılır [2]. Opak yapıları sebebiyle yara muayenesini zorlaştırdıkları ve yara eksüdasıyla temasları sonrasında oluşan jelin, kalın, sarı renkte ve kötü kokulu olması sebebiyle enfeksiyonla karıştırılabildiği de bazı çalışmalarda bildirilmiştir [31].

### **2.3.2.3. Filmler**

Yarı geçirgen filmlerin üretiminde çoğunlukla şeffaf ve yapışkan bir madde olan poliüretan (PU) kullanılmaktadır. Bu malzemeler, yaradan su buharı, O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> geçişine izin verir ancak sıvı ve bakterilerin geçişine izin vermez. Elastik bir yapıya sahip olan filmler dirsek, diz ve sakral bölgelerdeki yaralara kolaylıkla uygulanabilir. Şeffaf bir



yapıya sahip olmaları sebebiyle yaranın muayene edilmesi daha kolaydır [1]. İnce olmaları sebebiyle derin veya kavite yaralarda kullanılamaz ve nispeten sığ yaralar için uygundur [2]. Yine ince olmaları sebebiyle kolaylıkla kendi üzerlerine katlanabildikleri için kullanımları zor olabilmektedir [33]. Yarı geçirgen filmler sıvı ve bakteri geçişine izin vermedikleri için eksüda birikmesine sebep olabilirler. Bu durum, cildin yumuşamasına (maserasyon), bakteriyel çoğalmaya ve enfeksiyon riskine yol açabilir. Dolayısıyla, yüksek eksüdalı yaralar için kullanımları uygun değildir. Uzun süreli kullanımlarında düzenli olarak değiştirilmeleri ve yaranın salinle yıkanması gerekebilir [31].

#### **2.3.2.4. Köpükler**

Köpükler PU veya silikon bazlı malzemelerden oluşan, hidrofilik veya hidrofobik yapıdaki yarı geçirgen malzemelerdir. Dış katmanın hidrofobik özellikleri sıvı geçişini engeller ancak gaz ve su buharı alışverişine izin verir; merkez katman ise emici bir niteliğe sahiptir [33]. Emme kapasiteleri kalınlık ve gözenek boyutu gibi özellikler ile kontrol edilebilmektedir [31]. Yüksek emme kapasiteleri sebebiyle genellikle birincil yara örtüsü olarak kullanılır ve ikinci bir yara örtüsünün kullanımını gerektirmez [2]. Ancak, yara iyileştikçe yaranın yapısı da değiştiğinden maksimum iyileşme verimliliğinin sağlanması için sonraki aşamalarda başka bir yara örtü malzemesinin kullanılması daha uygundur [33]. Köpükler yaradan çıkan eksüda emerek nemli bir ortam oluşmasını sağlar. Eksüda miktarının düşük olduğu kuru yaralarda iyileştirici etkilerini kaybedeceklerinden bu tür yaralarda kullanılmaları uygun değildir. Ayrıca eksüda miktarının yüksek olduğu yaralarda köpüklerin sıklıkla değiştirilmesi gerekmektedir [2].

#### **2.3.2.5. Aljinatlar**

Aljinat yara örtüleri, bir polisakkarit olan aljinik asidin kalsiyum ve sodyum tuzlarından üretilir. Pansuman içerisindeki kalsiyum iyonları ile yara eksüdasındaki sodyum eksüda etkileşime girerek bir aljinat jeli oluşturur [2]. Aljinat pansumanları kendi ağırlıklarının 15-20 katı kadar sıvı emebildikleri için yüksek eksüdalı yaralar için idealdir. Ayrıca oluşan jel yaraya yapışma sağlar ve bakterilere karşı da koruma sağlar [33]. Aljinat yara örtüleri orta ve yüksek düzeyde eksüdalı yaralar için uygundur ve kuru yara, üçüncü derece yanık yarası gibi yaralar için önerilmez. Bazı durumlarda yarayı kurutarak iyileşmeyi geciktirebildikleri için ikincil bir yara örtüsüne de ihtiyaç duyulabilir [2].

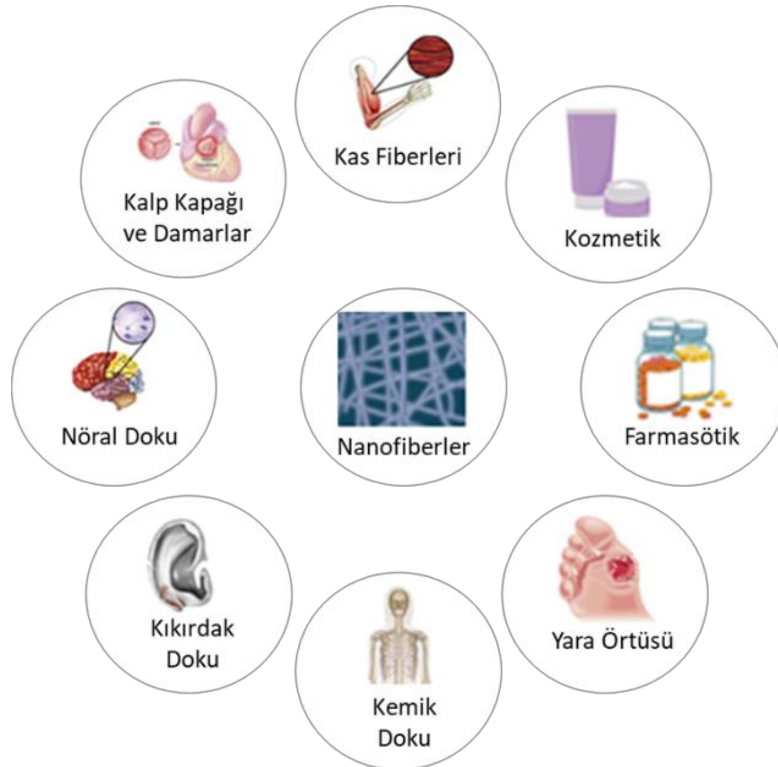
Aljınatlar çok sık değiştirilmediği takdirde yara kuruyabilir ve yara örtüsü yara tabanına yapışabilir [33].

## 2.4. Nanofibröz Matrisler

### 2.4.1. Nanofiberler

Fiberler, en boy oranı 1:1000'den küçük, esnek yapıya sahip doğrusal malzemelere verilen genel isimdir. Yüksek yüzey alanları, esneklikleri ve mukavemetleri sayesinde, fiber yapılar giyimden havacılığa kadar birçok uygulamada kullanılmaktadır [34].

Nanofiberler, çapı 100 nm'ye eşit veya daha küçük olan fiberler olarak tanımlanabilir ancak genel olarak 1 µm'nin (1000 nm) altındaki tüm fiberler nanofiber olarak kabul edilmektedir. Nanofiberler geniş yüzey alanları, yüksek en boy oranı ve biyomolekülleri hızlı soğurabilme gibi fonksiyonel özellikleri sayesinde, hücre reseptörlerine bol miktarda bağlanma yeri sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde nanofiberlerin hücreler, dokular ve organlar için güçlü bir hücre-matris etkileşiminin gerçekleşmesine izin verdikleri bilinmektedir. Nanofiberler, özellikle ilaç salımı, kök hücre tedavisi, kemik doku mühendisliği, kardiyak doku mühendisliği ve deri doku mühendisliği gibi temel biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.6) [35].

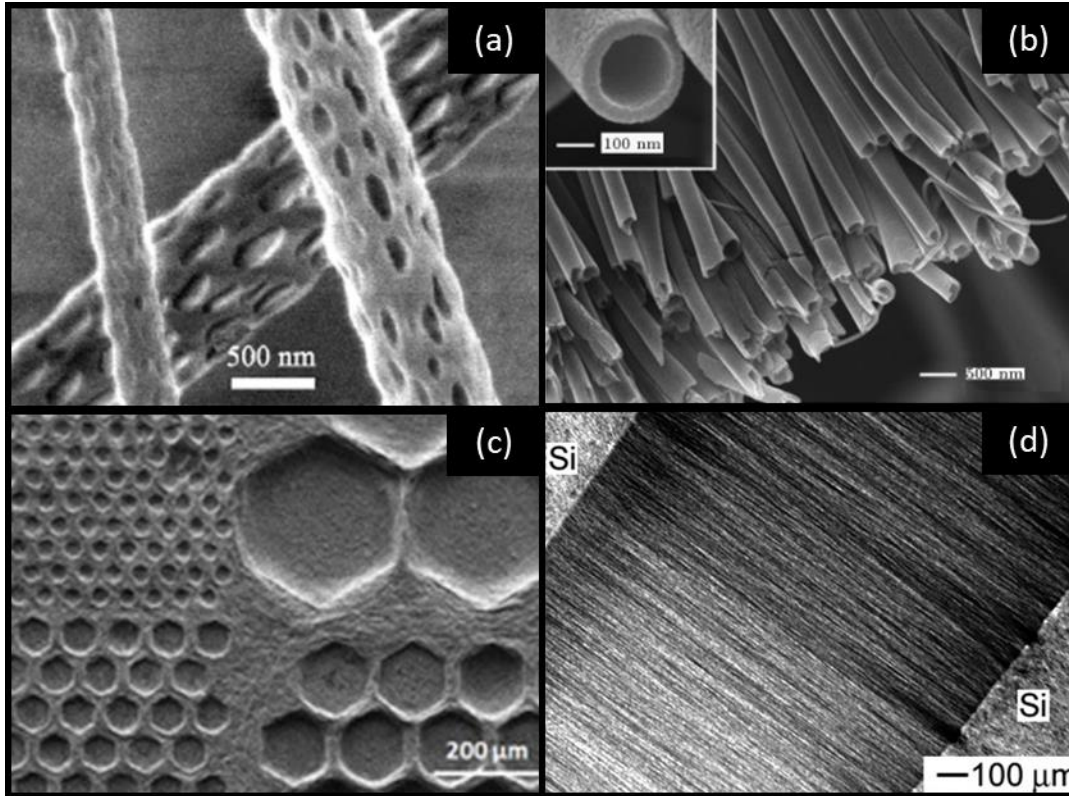


Şekil 2.6. Nanofiberlerin farklı biyomedikal alanlardaki uygulamaları [36].

Birçok nanofiberin iki boyutlu bir düzlemde kesişmesi ile oluşan nanofibröz matrisler gözenekli yapıları ve uygun mekanik özellikleri ile HDM'nin doğal yapısına benzerlik gösterir. Bu sebeple doku mühendisliği alanlarında kullanılırlar. Nanofiberlerin yüksek yüzey alanı/hacim oranı, sayısız nano boyutlu gözeneklere sahip olması ve HDM'nin yapısını iyi taklit etmesi sebebiyle hücre büyümesini kolaylaştırmada ve doku rejenerasyonuna rehberlik etmede kritik bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Şekil 2.7) [37].



**Şekil 2.7.** Nanofibröz matrislerde, hücre-matris etkileşimi ile matris morfolojisi arasındaki ilişki [38].



**Şekil 2.8.** (a) Gözenekli nanofiber yapısı [39], (b) içi boş nanofiberler [40], (c) kalıplanmış nanofibröz matrisler [41] (d) hizalanmış nanofiberler [42].

Ayrıca üretim yöntemleri ve kullanılan malzemeler üzerinde yapılan değişiklikler ile elde edilen nanofibröz matrisin gözenek çapı, fiber kalınlığı, morfolojisi gibi özellikler üzerinde ayarlamalar yapılabilmektedir. Bu sayede, istenilen uygulamaya göre özelleştirilmiş bir nanofibröz matris üretimi de kolaylıkla sağlanabilmektedir [43]. Özel üretim yöntemleri kullanılarak içi boş nanofiberler [40], kalıplanmış nanofibröz matrisler [41] ve hizalanmış nanofiberler [42] gibi çok çeşitli geometrilerde nanofibröz matrislerin üretimleri de mümkündür (Şekil 2.8).

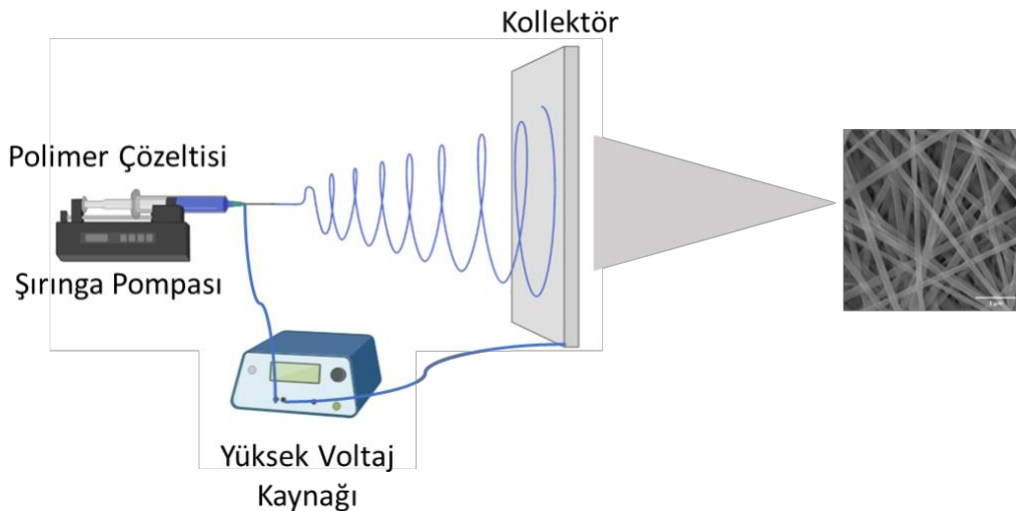
Nanofiberler, ilaç salımı uygulamalarında, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimliliği, ilaçların kontrollü salımını sağlamaları ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedir. Nanofibröz matrislerdeki gözenekli yapıya ek olarak, her bir fiberin de gözenekli bir yapıya sahip olması sebebiyle nanofibröz matrislerin yüzey alanı/hacim oranları oldukça yüksektir [39, 43]. Yüksek yüzey alanı hem nanofibröz matrislerin ilaç enkapsülasyon verimliliğinin artmasını sağlamakta hem de ilaç salımı esnasında ilacın difüzyonunu da kolaylaştırarak daha fazla miktarda ilaç salımına olanak sağlamaktadır [43]. Ayrıca, nanofibröz matrislerin morfolojik özellikleri ile ilaç salım kinetiği arasında yakın bir ilişki vardır. Dolayısıyla, nanofiber üretim parametreleri ve yöntemleri üzerinde yapılan değişiklikler ile morfolojik özelliklerinin kolaylıkla ayarlanabilmesi sayesinde istenilen ilaç salımına göre uygun bir nanofibröz matrisin üretimi de mümkün olmaktadır [43].

#### **2.4.2. Nanofiber Üretim Yöntemleri**

Sentetik ve doğal polimerlerden nanofiber üretimi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında temel olarak birkaç mikrometre çapa sahip mikropipetler yardımı ile tek ve uzun nanofiberlerin elde edildiği çekme yöntemi [44]; düzensiz moleküllerin dış müdahale olmaksızın bağ oluşturması ile düzenli yapıların elde edildiği kendiliğinden düzenlenme yöntemi [44]; silindirik gözeneklere sahip bir membran ve oksidatif polimerizasyon kullanılarak nanofiberlerin elde edildiği şablon sentez yöntemi [44]; bir polimer eriyiğinin bir kalıptan fışkırtılması ve yüksek hızdaki hava akımları kullanılarak inceltmesi ile nanofiberlerin üretildiği eriyik üfleme yöntemi [45]; jelleşme ve dondurarak kurutma işlemlerinin kullanıldığı faz ayırma yöntemi sayılabilir [44]. Bu yöntemler arasında elektroçirme yöntemi, hem doğal hem de sentetik polimerlerden çeşitli nano yapıların ve nanofiberlerin hazırlanmasında basit, ölçeklenebilir ve tekrarlanabilir bir sistem olarak ön plana çıkmaktadır [46].

### 2.4.3. Elektroğirme Yöntemi

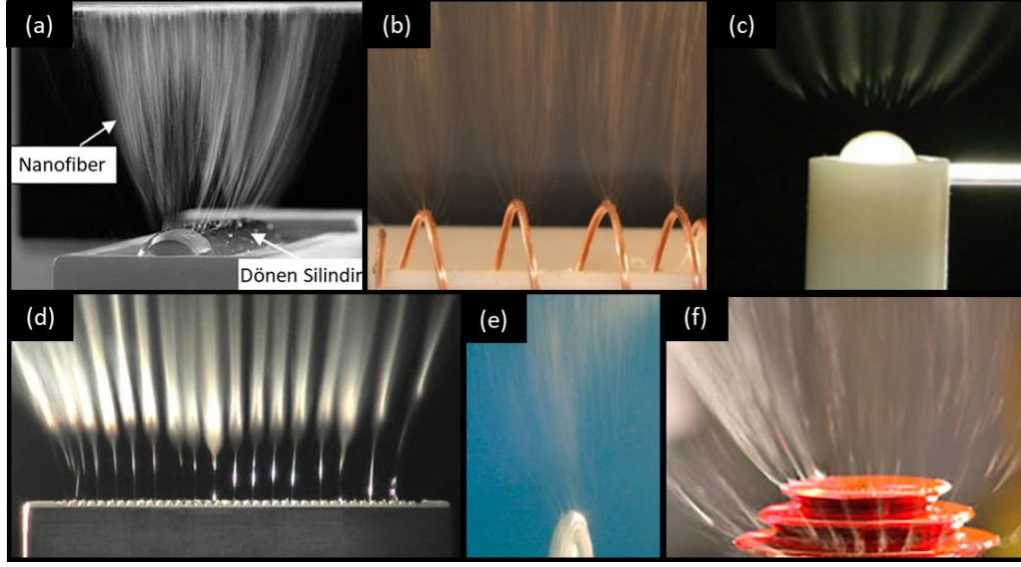
Elektroğirme yönteminde, yüksek voltajlı bir güç kaynağı, şırınga pompası ve topraklanmış bir toplayıcı levha (kollektör) olmak üzere üç ana parçadan oluşan bir sistem kullanılır (Şekil 2.9). Temel olarak, elektroğirmede, yüksek voltajlı bir elektrostatik alan, polimer çözeltisi damlacıklarını yüklemek için kullanılır. Yüklenen çözelti üzerinde oluşan elektriksel kuvvet ve iğnenin ucundaki damlacıkların yüzey gerilim kuvveti, damlacıkların Taylor konisi adı verilen konik bir şekil oluşturacak şekilde uzamasını sağlar. Sonunda, elektriksel itme kuvveti yüzey gerilimini aştığında, Taylor konisinden topraklanmış toplayıcıya doğru bir çözelti jeti hareketi başlar. Bu jet toplayıcıya ulaşana kadar incelmeye devam eder, bu esnada çözücü buharlaşır ve toplayıcı üzerinde nanofiberler birikir. Elektroğrilmemiş nanofiberlerin fiziksel özellikleri; viskozite, polimer çözeltisinin elektriksel iletkenliği, çözücülerin buharlaşma derecesi, toplayıcı geometrisi, uygulanan voltaj, çözelti akış hızı, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, sıcaklık ve nem gibi diğer parametreler üzerinde yapılan değişiklikler ile kolayca kontrol edilebilir [46].



**Şekil 2.9.** Elektroğirme sisteminin bileşenleri.

Geleneksel elektroğirme sisteminde kullanılan şırınga pompası ile yalnızca bir adet polimer jeti üretilebildiği için bu yöntem nanofiber eldesinde kimi uygulamalar için yavaş olarak değerlendirilebilmektedir. Bu durumun üstesinden gelmek için birden fazla şırınga pompası kullanılabilirdiği gibi polimer çözeltisinden şırınga kullanılmadan jet oluşturulduğu sistemler de geliştirilmiştir. Bu sistemlerde temel prensip, polimer çözeltisinden kılcal bir etki olmadan açık bir sıvı yüzeyinden jet oluşturulmasının sağlanmasıdır. Bu sistemlere örnek olarak dönen silindir, spiral bobin, küresel, çentikli

metal plaka, disk ve basamaklı piramit eğirme sistemleri gösterilebilir (Şekil 2.10) [47, 48].



**Şekil 2.10.** (a) Dönen silindir [48], (b) spiral bobin [48], (c) küresel [48], (d) çentikli metal plaka [47], (e) disk [47] ve (f) basamaklı piramit [47] eğirme sistemleri.

Elektroeğirme, çok çeşitli biyomalzemelerin üretimine izin veren kolay bir yöntem olması nedeniyle yara örtü malzemeleri üretiminde de sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, elektroeğirilmiş nanofiberler yüksek yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, değiştirilebilir morfoloji ve kontrol edilebilir mekanik özellikler gibi üstün özelliklere sahiptir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan yapıların hücrelerin doğal ortamlarını taklit edebilmeleri, besin alışverişine ve hücre atıklarının uzaklaştırılabilmesine izin verecek derecede gözenekliliğe sahip olmaları istenmektedir. Elektroeğirme yöntemi ayrıca ticari kullanıma olanak sağlayacak derecede gelişmiş üretim ekipmanlarına ve teknolojik çözümlere sahiptir. Günümüzde elektroeğirme yöntemi ile endüstriyel ölçekte üretim yapmak mümkündür [49].

Geleneksel elektroeğirme yönteminde, polimer çözeltisi içeren yüklü bir iğne ucu ve belirli bir mesafeye yerleştirilmiş sabit, düz metal bir toplayıcı kullanılır. İğne ucundan çıkan nanofiber jeti, elektriksel kuvvet yönünde çekilerek toplayıcı üzerinde toplandığında sıkıştırılmış 2B bir yapı ortaya çıkar. Elde edilen bu nanofibröz matrisler, sıkıca paketlenmiş bir düzene sahip nanofiber katmanlarından oluşur. Bu yapılar hücre geçişine ve çoğalmasına yüzeye yakın bölgelerde izin vermekte ancak derin seviyelerde düşük gözenek çapları nedeniyle izin vermemektedir. Bu durumun temel sebebi ise geleneksel elektroeğirme yönteminin yapısı gereği oluşturduğu nanofiberlerin düzlemsel

2B bir eksene yerleşmesidir. Her ne kadar düzlemsel nanofiber katmanlarında gözeneklilik yüksek olsa da bu gözenekler enine kesitlere ortogonal doğrultuda (derinlik ekseninde) devam etmemekte ve gözeneklerin sürekliliği 3B olarak sağlanamamaktadır. Bu durum, hücrelerin doku iskelesi derinliklerine göçünü engelleyerek matris bütününde etkin yeni doku oluşumunu sınırlamaktadır [50].

#### 2.4.4. Elektroğirme Yöntemini Etkileyen Parametreler

Elektroğirme yönteminin avantajlarından birisi de elde edilen nanofiberlerin fiziksel özelliklerinin çeşitli parametreler kullanılarak ayarlanabilmesidir. Bu parametreler için genel-geçer değerler belirlemek mümkün değildir, çünkü bu parametrelerin ideal değerleri polimer-çözücü sistemine bağlı olarak büyük oranda değişiklik göstermektedir [51]. Dolayısıyla, kullanılacak olan parametrelerin optimizasyonu ideal nanofiber yapıların elde edilebilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Elektroğirme temel olarak şırınga ucundaki polimer çözeltisinin yüzey gerilimi ile uygulanan elektrostatik voltaj arasındaki denge ile gerçekleşir. Bu dengeyi etkileyen tüm faktörlerin optimize edilmesi elektroğirme ile boncuksuz ve düzgün bir nanofiber yapının elde edilebilmesi açısından önemlidir [34].

**Çizelge 2.2.** Elektroğirmeyi etkileyen parametreler.

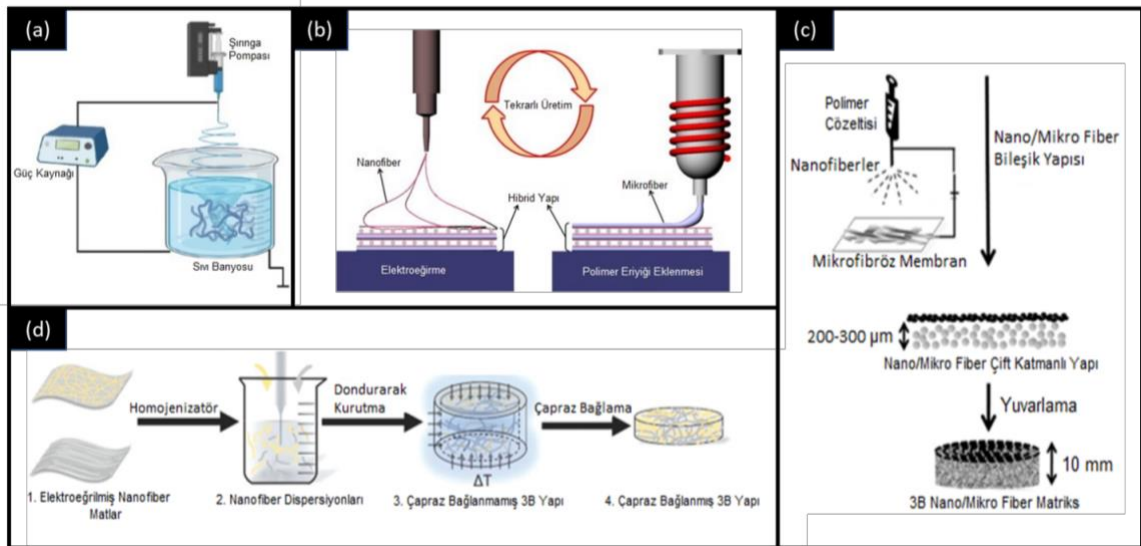
Çözelti Parametreleri	Sistem Parametreleri	Ortam Parametreleri
Çözelti yoğunluğu	Voltaj	Sıcaklık
Moleküler ağırlık	Polimer akış hızı	Bağıl nem
Viskozite ve yüzey gerilimi	Şırınga ucu ile kollektör arasındaki mesafe	
Yüzey yük yoğunluğu		

Genel olarak elektroğirme yöntemini etkileyen parametreler; çözelti parametreleri, sistem parametreleri ve ortam parametreleri olarak üç grup altında incelenebilir (Çizelge 2.2). Örneğin, çözelti yoğunluğunun çok düşük olması yüzey geriliminin ve viskozitenin düşük olmasına sebep olacağından elektroğirme gerçekleşemez ve bunun yerine polimerin sprey halinde püskürtülmesi görülebilir [52]. Çözelti yoğunluğunun idealden bir miktar daha düşük olması boncuklu yapıdaki nanofiberlere sebep olabilmektedir [53, 54]. Elektroğirmenin gerçekleşebilmesi için uygulanması gereken minimum bir kritik voltaj değeri vardır, bu kritik voltaj değerinin altında elektroğirme gerçekleşemez [52]. Uygulanan voltaj değerinin fazla artması ile koni yapısının kararlılığının azaldığı, birden

fazla jet oluşumu gözleendiği ve nanofiberlerdeki boncuklu yapıların arttığı bildirilmiştir [52, 53].

### 2.4.5. Üç Boyutlu (3B) Elektroğirme Yöntemi

Geleneksel elektroğirme yöntemi ile oluşturulan 2B nanofibröz matrislerin yapıları gereği sahip oldukları dezavantajlara çözüm bulmayı amaçlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda elektroğirme yöntemi ile 3B doku iskeleleri oluşturmak amaçlanmıştır. Üç boyutlu elektroğirilmiş yapıların üretiminde; ıslak elektroğirme [55], şablon destekli elektroğirme [56, 57], kriyojenik elektroğirme [58], dispersiyon şekillendirme [59] ve geleneksel elektroğirme sonrası işlemden geçirme [59-63] gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.



Şekil 2.11. (a) Islak elektroğirme [64], (b) şablon destekli elektroğirme [65], (c) elektroğirme sonrası işlemden geçirme [60] ve (d) dispersiyon şekillendirme [66] yöntemlerinin şematik olarak gösterimleri.

#### 2.4.5.1. Islak Elektroğirme

Islak elektroğirme yönteminde geleneksel elektroğirmeye benzer bir sistem kullanılır ancak iğne ucundan çıkan nanofiber jeti düz bir metal toplayıcı yerine bir sıvı banyosu üzerinde toplanır (Şekil 2.11a). Sıvı banyosu üzerinde toplanan nanofiber ağları sonrasında dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak 3B bir nanofibröz malzeme elde edilir [55]. Sıvı banyosunda kullanılan malzemelere örnek olarak metanol, etanol, tert-bütanol ve su verilebilir [55, 58]. Oldukça yaygın olarak kullanılan bu yöntemde, üretim veriminin düşük olması ve büyük boyutta doku iskelesi üretiminin oldukça zor olması



gibi dezavantajlar da bulunmaktadır [58].

#### **2.4.5.2. Şablon Destekli Elektroğirme**

Şablon destekli elektroğirme yönteminde, geleneksel elektroğirme ile elde edilen nanofiberlerin, üretim amacına göre özel tasarlanmış bir kollektör üzerinde veya şablon olarak kullanılan fibröz matris bir yapının üzerinde toplanması ile 3B bir yapı elde edilmektedir. Örneğin Koç ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada poli-L-laktik asit / hidroksiapatit (PLLA-Hap) çözeltisinin elektroğirilmesi ile elde edilen nanofiberlerin 15 cm çapında içi boş yarım bir kürede toplanması ile 3B kemik greftleri elde edilmiştir [56]. Şablon olarak kullanılan fibröz matrisler genel olarak mikrofiber yapılarıdır ve son ürün olarak katmanlı bir 3B yapı oluşturulur. Örnek olarak Martins ve ark. tarafından yapılan çalışmada nişasta-PCL prototipleri ile elde edilen katmanlı 3B matris yapısının katmanları arasına elektroğirme ile elde edilen nanofiber matları eklenmiştir [67]. Bir başka çalışmada Park ve ark. eriyik PCL katmanları arasına elektroğirme ile üretilmiş PCL/kollajen nanofiber matları ekleyerek 3B bir yapı elde etmişlerdir (Şekil 2.11b) [65]. Şablon destekli elektroğirme yönteminde 3B yapıların boyutları ve morfolojileri kontrol edilebilir ancak bu yöntem özel mekanik toplayıcılar ya da hibrit bir üretim sistemi gerektirmektedir [68].

#### **2.4.5.3. Kriyojenik Elektroğirme**

Kriyojenik elektroğirme, düşük sıcaklıktaki bir kollektör üzerinde elektroğirilmiş nanofiberlerin ve kristal yapıların birlikte toplanması ile gerçekleştirilir. Kristal yapılar nanofiberler arasında gözenekli bir 3B yapı oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Toplama işlemi sonrasında dondurarak kurutma gibi yöntemler ile kristaller uzaklaştırılır ve 3B nanofiber malzemeler üretilmiş olur. Bu yöntemin en büyük dezavantajı kristaller ile nanofiberler arasındaki dengenin sağlanmasının zor olmasıdır. Eğer fazla kristal yapı toplanırsa elde edilen 3B yapı mekanik açıdan zayıf olacaktır ancak eğer çok az kristal toplanırsa elde edilen yapının gözenekliliği ve gözenek boyutu düşük olacaktır [58, 69].

#### **2.4.5.4. Geleneksel Elektroğirme Sonrası İşlemden Geçirme**

Geleneksel elektroğirme işleminden sonra elde edilen 2B matlar üzerinde çeşitli işlemler uygulanması ile 3B yapılar elde edilebilir. Örneğin, Shim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, elektroğirme yöntemi ile kitosan mikrofiber yapıları elde edilmiş ve bu yapının üzerine kitosan nanofiber yapıları elektroğirme yapılarak eklenmiştir. Elde edilen yapı sonrasında yuvarlanıp toplanarak 3B makro yapılar elde edilmiştir (Şekil

2.11c) [60]. Leung ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada elektroğirme ile üretilen poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve hidroksiapatit nanofiber matları destelenmiş ve basınçlı gaz altında birkaç dakika işleme tabii tutularak 3B yapılar elde edilmiştir [61].

#### **2.4.5.5. Dispersiyon Şekillendirme**

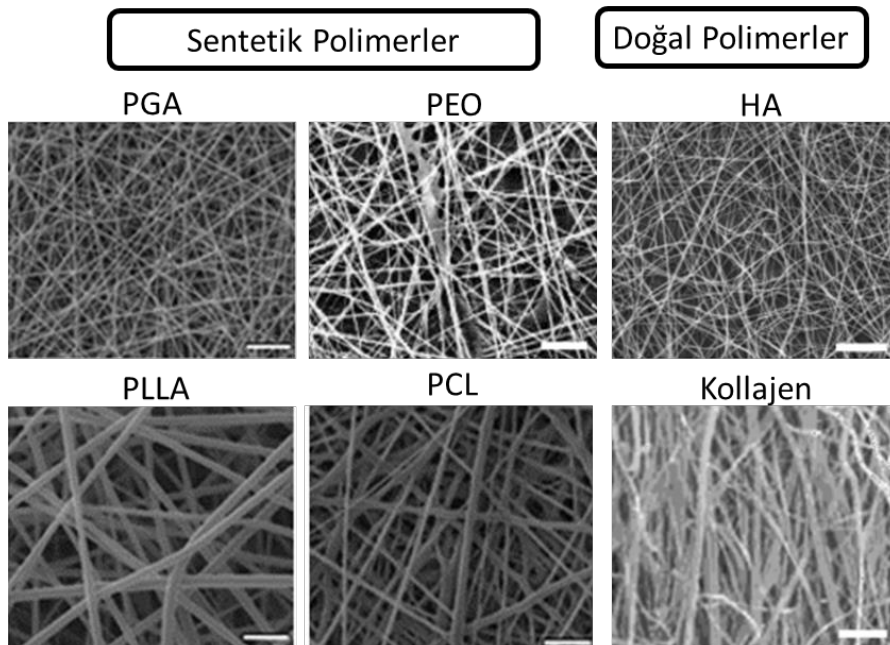
Dispersiyon şekillendirme yönteminde, geleneksel elektroğirme ile elde edilen 2B matlardan çeşitli ortamlarda (sıvı azot, tert-bütanol vb.) dispersiyonlar elde edilir. Sonrasında dispersiyonlar kalıplara dökülür ve dondurarak kurutma işlemi ile 3B nanofiber yapılar elde edilmiş olur (Şekil 2.11d). İki boyutlu nanofiber matlardan dispersiyonlar elde edilmesinde sonikasyon [66], aminoliz [70] ve homojenizatör kullanılması [59] gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Elde edilen 3B yapıların çapraz-bağlama işlemlerine tabii tutulması da yaygın bir tekniktir [59, 66]. Dispersiyon şekillendirme yönteminde kullanılacak olan kalıp kolaylıkla ayarlanabildiği için 3B nanofiber yapı iskeleleri hazırlamak için kullanılan diğer yöntemle karşılaştırıldığında, doku iskelesi şeklinin daha kolay kontrol edilebildiği ve diğer yöntemlere göre daha homojen bir gözenekli yapı elde edilebildiği belirtilmiştir.

Dispersiyon şekillendirme yönteminde elde edilen yapıların yapısal stabilitesinin ve mekanik dayanımlarının diğer 3B yöntemlere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu durumun temel sebebi olarak ise dondurarak-kurutma ve çapraz bağlama ile dispersiyonların birbirine sağlam bir şekilde bağlanması gösterilmiştir [71]. Ayrıca, dispersiyon şekillendirme yöntemi ile kullanılan kalıpların şekilleri değiştirilerek istenilen boyutta ve şekilde 3B yapıların elde edilebileceği de belirtilmiştir [72]. Son olarak dispersiyon şekillendirme yönteminin en büyük avantajlarından biri olarak elde edilen yapılardaki gözenek morfolojileri verilmiştir. Gözenek büyüklüklerinin ve şekillerinin uygunluğu, gözeneklerin birbiri ile bağlantılarının yüksek olması ve genel olarak 3B yapıdaki gözeneklilik oranının artırılması bu yöntemin temel avantajları olarak sayılmıştır [72].

Dispersiyon şekillendirme yöntemindeki gözeneklilik ve üretilen 3B yapının doğal HDM ile benzerliğinin yüksek olması sebebiyle tez çalışması kapsamında 3B yara örtü malzemelerinin üretilmesi için bu yöntem tercih edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak makrogözenekliliği artırılmış 3B doku iskelelerinin elde edilmesi ile hücre yapışması, hücre göçü ve hücre canlılığının artırılması hedeflenmiştir.

#### 2.4.6. Elektroğirme Yönteminde Kullanılan Polimerler

Elektroğirme yönteminde nanofiberlerin üretilmesi için doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerler genellikle bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Sentetik polimerlere göre genel olarak biyouyumlulukları, biyobozunurlukları ve biyoaktiviteleri daha fazladır; enzimatik yıkım ürünleri genelde toksik değildir. Ancak, doğal polimerlerin degradasyon hızları yüksek ve mekanik özellikleri düşük olduğundan, doku iyileşmesi sırasında 3B yapılarını korumaları zordur [18]. Literatürde elektroğirmede kullanılan doğal polimerlere örnek olarak kitosan, kollajen, pektin, jelatin, ipek fibroin, hiyalüronik asit ve dekstran verilebilir [73, 74]. Sentetik polimerler ise doğal polimerlere kıyasla daha düşük biyouyumluluğa sahiptir ve enzimatik yıkım ürünleri toksik olabilmektedir. Ancak, sentetik polimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri kontrol edilebilirdir ve bunlar doğal polimerlere göre çok daha kararlı ve homojen bir yapıya sahiptir. Bu sebeple özellikle yara örtü malzemelerinin üretim uygulamalarında sentetik polimerler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [18]. Literatürde elektroğirmede kullanılan sentetik polimerlere örnek olarak selüloz asetat, polivinil alkol (PVA), polilaktik asit (PLA), PU, poliglikolik asit (PGA), PCL ve polietilen glikol verilebilir [73, 74]. Yapıları itibariyle farklı avantajlara sahip olmaları nedeniyle, yara örtü uygulamalarında kullanılan doku iskelelerinin üretiminde yaygın olarak doğal ve sentetik polimer karışımları kullanılmaktadır.



**Şekil 2.12.** Elektroğirmede kullanılan çeşitli sentetik ve doğal polimerden elde edilen nanofibröz matrislerin SEM görüntüleri (ölçek: 10  $\mu$ m) [74].

Bu tez çalışmasında kullanılan polimerler olmaları sebebiyle aşağıdaki bölümlerde kitosan ve PCL hakkında daha ayrıntılı bilgiler yer almaktadır.

#### **2.4.6.1. Kitosan**

Kitin (poli-N-asetilglikozamin), selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan polisakkarittir. Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan (Kit), katyonik özelliklere sahip amino gruplarına sahiptir. Kitosanın bir monomer birimi olan N-asetil glikozaminin hemostazı uyardığı, hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve yara iyileşmesini hızlandırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [75, 76]. Kitosan, biyoyumlu bir doğal polimerdir ve insan vücudunda bulunan enzimlerle toksik kalıntı üretmeden parçalanabilmektedir [5]. Kitosan temelli biyomalzemeler, bandajlarda ve diğer hemostatik uygulamalarda kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır [77]. Kitosan; biyoyumluluk, biyobozunurluk ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle yara örtüsü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [6].

Gıdaların korunması, tarım uygulamaları, kozmetik ve biyomedikal gibi çok farklı alanlarda kullanılan kitosanın en önemli özelliklerinden birisi de antibakteriyel etkisidir. Kitosanın antibakteriyel etkisinden faydalanmayı veya bu etkiyi artırmayı hedefleyen birçok çalışma vardır. Bu çalışmalar sonucunda kitosan boncuklar, filmler, lifler, membranlar ve hidrojeller üretilmiştir. Özellikle yara örtü malzemeleri alanında kitosanın antibakteriyel özelliklerini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Chen ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, kollajen/kitosan karışımının elektroğrilmesi ile bir yara örtüsü üretilmiş ve bu malzemenin gazlı bez ve kollajen süngerlere göre yara iyileşmesini çok daha fazla desteklediği gösterilmiştir [78]. Başka bir çalışmada, kitosan ve ipek fibroini karışımından bir nanofibröz membran üretilmiş ve bu yapının gram-negatif *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu antibakteriyel etkinin karışımdaki kitosan konsantrasyonuna doğrudan bağlı olduğu ve kitosan oranı arttıkça antibakteriyel etkinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir [79]. Benzer bir çalışmada bal, kitosan ve PVA karışımının elektroğrilmesi ile üretilen bir yara örtüsünün antibakteriyel etkileri incelenerek; geliştirilen malzemenin *S.aureus*'a karşı belirgin bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Karışımdaki kitosan yoğunluğu ile antibakteriyel etkinlik arasında pozitif korelasyon olduğu da gösterilmiştir [80]. Yara örtü malzemeleri alanında özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, antibakteriyel etkilerinin artırılması ve yara iyileşme sürecinin hızlandırılması amacıyla kitosan nanofiberlere antibiyotikler, antimikrobiyal

ajanlar ve metal nanopartiküller gibi farklı bileşenlerin yüklenmesi de incelenmiştir [81-83].

Kitosan çözeltilerinin yüksek viskozitesi nedeniyle, saf kitosanın elektroğirme işlemi kolay bir şekilde yapılamaz. Ayrıca, saf kitosanın elektroğirilmesi ile oluşturulan doku iskelelerinin sulu ortamlarda yetersiz mekanik özellikler ve düşük yapısal kararlılık gösterdiği de bilinmektedir. Bu zorlukları aşmak amacıyla, elektroğirme için genellikle kitosan ile diğer biyoyumlu polimerlerin karışımları kullanılmaktadır [10].

#### **2.4.6.2. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)**

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış, doku rejenerasyonu ve yara örtüsü uygulamalarında kullanılan, biyoyumlu ve biyobozunur bir sentetik polimerdir. Yüksek biyoyumluluğu ve mekanik özellikleri sebebiyle elektroğirilmiş nanofiberlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, PCL nanofiberler, hidrofobik özellikleri nedeniyle hücrelerin çoğalması ve göçü için uygun bir mikroçevre oluşturamamaktadır. Bu nedenle, nanofiberlerin hidrofilitasını iyileştirmek için çeşitli hidrofilik biyomalzemeler PCL ile karışım yapılarak kullanılmaktadır [4].

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) ile yapılan deri doku mühendisliği çalışmalarında PCL'nin yüksek biyoyumluluğa ve yeterli mekanik dayanıma sahip olduğu gösterilmiştir [40]. Ancak, diğer biyobozunur polimerlerle karşılaştırıldığında PCL'nin *in vitro* ve *in vivo* degradasyonunun çok yavaş olduğu da bilinmektedir. Tüm bu nedenlerle, PCL temelli bir yara örtü malzemesi tasarlanırken, PCL'nin biyobozunurluğunun kontrol edilmesi ve biyofonksiyonelite gibi özellikler katılması doku mühendisliği araştırmacılarının üzerinde çalıştığı önemli konulardan biridir. Bu amaçla, PCL çeşitli doğal polimerlerle veya biyoaktif ajanlarla karıştırılarak çok daha etkin yara örtü malzemeleri geliştirilmiştir. Ayrıca, bu yapılar içerisine biyoaktif ajanlar yüklenerek elde edilen yapının daha fonksiyonel bir hale getirilmesi de sağlanmıştır.

Chong ve ark. PCL/jelatin nanofibröz matrisleri geleneksel elektroğirmeyle üretmişler ve elde edilen yapının derin yaraların tedavisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ancak, 28  $\mu$ m kalınlığında PCL/jelatin matris üretimi için elektroğirme işleminin çok uzun sürdüğü (2,5 saat) ve gözenekliliğinin ise %62-75 aralığında olduğu da aynı çalışmada belirtilmiştir [41]. Başka bir çalışmada, PCL/jelatin nanofibröz matrisler anjiyogenezi uyaran çinko oksit ve antibakteriyel bir ajan olan amoksisilin varlığında üretilmiştir. *In vivo* çalışmalarda, bu yapının sıçanlarda oluşturulan tam deri doku hasarını

skar doku oluşmadan iyileştirebildiği ve damarlanmayı hızlandırdığı gösterilmiştir [42]. Chandra ve ark. hiyaluronik asit (HA) ve kitosan içeren PCL matrislerin yalnızca PCL içeren matrislere göre daha yüksek hidrofilitateye ve antibakteriyel özellikliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen matrislerin yara iyileşmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi de *in vitro* testlerle gösterilmiştir [43].

#### 2.4.7. Nanofiber Yara Örtü Malzemelerinde Biyoaktif Ajanların Kullanımı

Modern yara örtülerinde nekrotik dokuyu ortadan kaldırmak veya temizlemek, enfeksiyonu önlemek veya tedavi etmek, doku yenilenmesine yardımcı olmak gibi çeşitli amaçlarla biyoaktif ajanlar kullanılmaktadır [31]. Farklı amaçlar için kullanılan biyoaktif ajanlardan bazıları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

**Çizelge 2.3.** Nanofiber yara örtü malzemelerinde kullanılan biyoaktif ajanlar.

Biyoaktif ajan	Kullanım amacı ve sonuçlar	Ref.
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yara iyileşme süreçlerini başlatması ve bu süreçlerde aracı bir rol oynaması.</li> <li>Çalışmada, PDGF'nin 48 saat boyunca kontrollü salımının fibroblast migrasyonunu artırdığı belirtilmiştir.</li> </ul>	[84]
Epidermal Büyüme Faktörü	<ul style="list-style-type: none"> <li>Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonunu, anjiyogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarması, reepitelizasyonu artırması</li> <li>Çalışmada, MTT analizi ile fibroblast proliferasyonunun artırıldığı tespit edilmiştir.</li> </ul>	[85]
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anjiyogeneze, düz kas hücre hiperplazisinde, pıhtılaşma mekanizmasında rol oynaması</li> <li>Çalışmada, VEGF ile anjiyogenezin artırıldığı belirtilmiştir.</li> </ul>	[86]
E vitamini	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antioksidan etkileri ve biyolojik membranlarda düzenleyici etkileri</li> </ul>	[87]

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çalışmada, E vitamini yüklü nanofibröz matrislerin L929 hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve reaktif oksijen türlerine karşı hücreleri koruduğu belirtilmiştir.</li> </ul>	
Kurkumin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antienflamatuar ve antioksidan etkileri</li> <li>• <i>İn vivo</i> çalışmalarda kurkumin yüklü nanofiberlerin diyabetik fare modelinde yara kapanma hızını artırdığı gösterilmiştir.</li> </ul>	[88]
Timol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioksidan etkileri</li> <li>• Timol yüklü HA nanofibröz matrislerin yüksek antioksidan etkiler gösterdiği belirtilmiştir.</li> </ul>	[89]
Propolis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibakteriyel etkileri</li> <li>• Çalışmada, propolis yüklü PU nanofibröz matrislerin <i>E. coli.</i>'ye karşı yüksek inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir.</li> </ul>	[90]
Aloe vera	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antienflamatuar etkileri ve hücre proliferasyonunu destekleyici etkileri</li> <li>• Çalışmada, aloe vera yüklü PCL ve Jelatin/PCL doku iskelelerinin fibroblast proliferasyonunu artırdığı belirtilmiştir.</li> </ul>	[91]
Gentamisin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiyotik etkileri</li> <li>• Çalışmada, gentamisin yüklü nanofibröz matrislerde <i>E. coli</i>'ye karşı antibakteriyel etkiler gözlenmiştir.</li> </ul>	[92]

Yara örtü malzemelerinin çeşitli yönlerden etkinliklerinin artırılması amacıyla kullanılan biyoaktif ajanlar arasında en sık kullanılanlar arasında biyomoleküller ve proteinler (büyüme faktörleri, sitokinler vb.) sayılabilir. Büyüme faktörleri, yeni dokunun rejenerasyonu için hücresel aktiviteleri yönlendirebilen endojen proteinlerdir. Büyüme faktörlerinin, doku gelişimi ve iyileşme sürecinde yer alan hücresel bileşenlerin üretiminde etkili oldukları ve bu sebeple yara iyileşme sürecini önemli ölçüde etkiledikleri düşünülmektedir [93]. Büyüme faktörlerinin bu avantajlarına rağmen, klinik çalışmalarda yara iyileşmesini beklenen düzeyde geliştirmedikleri belirtilmiştir [94]. Özellikle kronik yaralarda etkili olmaları beklenen büyüme faktörlerinin, yara iyileşme sürecini başlatmada etkili oldukları ancak etkin bir yara iyileşmesi için gerekli olan

enfeksiyonun engellenmesi, doku oksijenasyonunun ve beslenmenin sağlanması, dokuda yeterli damarlanmanın sağlanması ve yaranın debridmanı gibi işlemler yapılmadığı takdirde etkili olmadıkları belirtilmiştir. Ayrıca kanser geçmişi olan hastalarda büyüme faktörlerinin kötü huylu (malignant) tümörleri tetikleyebilecekleri de belirtilmiştir [95].

Alternatif olarak antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antibakteriyel gibi etkinlikleri bilinen doğal biyoaktif ajanlar da yara örtü malzemelerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında kullanılan kurkumin hakkında detaylı bilgiler aşağıda yer almaktadır.

#### 2.4.7.1. Kurkumin

Kurkumin (Kur), [1,7-bis(4-hidroksi-3-methoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion] Curcuma longa rizomlarından elde edilen bir polifenoldür. Kurkumin, Hint ve Çin halk tıbbında diyabet, karaciğer bozuklukları ve romatoid artrit gibi çok çeşitli hastalıkların ve ayrıca lokal iltihaplanma ve yaraların tedavisi için kullanılmıştır. Literatürde kurkuminin antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan, analjezik, antidiyabetik ve yara iyileştirici özellikleri gösterilmiştir (Şekil 2.13) [88, 96]. Kurkumin ve çeşitli formülasyonlarının terapötik etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır; ayrıca, kurkumin ile ilgili 180'den fazla klinik araştırma bulunmaktadır [97].



**Şekil 2.13.** Kurkuminin deri doku mühendisliğinde kullanım alanları [98].

İdeal bir yara iyileştirici ajan, enflamasyonu azaltır ve hasarlı dokuyu yeniden yapılandırmak için hücre göçünü ve proliferasyonunu uyarır [7]. Ayrıca, yara iyileşme sürecinde iltihabın ana nedeni olarak kabul edilen serbest radikalleri de azaltması istenmektedir [8]. Kurkumin, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden dolayı yara



iyileştirme potansiyeli oldukça yüksek bir doğal bileşiktir [88, 99, 100]. Kurkuminin granülasyon dokusu oluşumunu, doku yeniden modellemesini ve kollajen birikimini teşvik ederek yara iyileşmesini artırdığı da gösterilmiştir. Kurkumin, epitel rejenerasyonunu, fibroblast proliferasyonunu ve vasküler yoğunluğu artırabilir ve bu da yara iyileşmesini hızlandırıcı bir etkiye sahiptir. Bunların yanında, kurkumin ayrıca yüksek antioksidan özelliklere sahiptir ve E vitaminine göre 10 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [96].

Kurkuminin yara iyileşmesindeki benzersiz biyolojik etkilerine rağmen, bu molekülün kararlılığı ve biyoyararlanımı düşüktür. Ayrıca, kurkuminden türetilen *in vivo* ürünler de örneğin kurkumin sülfat ve kurkumin glukuronid, çok düşük biyoaktiviteye sahiptir [9]. Kurkuminin yüksek dozlarda sitotoksik özellikleri bulunduğundan, salımının kontrollü ve sürekli bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak önemlidir [10]. Bu sınırlamalar, kurkuminin stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmak için uygun taşıyıcıların geliştirilmesine yönelik çalışmaların artmasına yol açmıştır.

Literatürde, kurkuminin yara örtü malzemelerinde kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Fahimirad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kontrollü kurkumin salımı ile hücre canlılığının anlamlı derecede ilişkili olduğunu belirtilmiştir [10]. Saeed ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise biyoyumluluk testi sonuçlarında, kurkumin miktarı arttıkça fibroblast hücrelerinin canlılığının azaldığı görülmüştür. Ancak, yüksek miktarda kurkumin ile yüklenmiş (16%) örneklerde bile hücre canlılığı makul derecede yüksek (%58) olarak bulunmuştur [101].

#### **2.4.8. Nanofibröz Matrislerin Deri Doku Mühendisliğinde Kullanımları**

Geleneksel ve modern yara örtülerinde temel amaç, yara iyileşmesinin verimli ve hızlı bir şekilde gerçekleşmesi için uygun çevresel koşulların sağlanması ve yara iyileşmesini geciktirici etkenlerin engellenmesini sağlamaktır. Bu örtü malzemeleri her ne kadar etkili olsalar da yara iyileşmesini etkileme/hızlandırma ve enfeksiyonları önleme/tedavi etme açısından sınırlıdır.

Yara iyileşme sürecinin kontrolünde ve düzenlenmesinde HDM de önemli bir yere sahiptir. HDM, kendisini çevreleyen hücrelere yapısal ve biyokimyasal destek sağlayan kollajen, enzimler, glikoproteinler ve hidroksiapatit gibi hücre dışı makromoleküller ve minerallerden oluşan üç boyutlu bir ağıdır [102]. Hücrelere üç boyutlu bir mekanik destek

oluşturan HDM, ayrıca sinyal moleküllerinin aktivitesini de düzenleyerek hücrelerin hayatta kalma, çoğalma, göç ve farklılaşma gibi davranışlarını etkiler [103].

Nanofiber malzemelerin yüzey morfolojisi, kimyasal yapıları ve çeşitli fiziksel özellikleri kolaylıkla kontrol edilebilmektedir. Böylece birçok farklı biyomedikal uygulama için çeşitli nanofibröz yapıda malzeme üretilebilmekte ve nanofibröz malzemeler doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Birbiriyle kesişen birçok nanofiberden oluşan nanofibröz matrisler, yapıları sebebiyle oldukça yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve gözeneklilik sağlamaktadır. Bu yapılar, HDM'nin yapısına benzerlik göstermekte ve bu sayede hücrelerin birbiri ve ortam ile olan etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır [104]. Nanofibröz matrisler, yüksek gözenekli yapıları sayesinde su ve oksijen geçirgenliğini, besin maddelerinin değişimini ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırarak hemostazı sağlamaya da yardımcı olur [105]. Ayrıca, yüksek yüzey alanları sebebiyle yara tedavisinde kullanılan ilaçların verimli bir şekilde matris içerisine yüklenmesini/emdirilmesini ve kontrollü bir şekilde salımını da sağlayabilmektedir [104].

Tez çalışması kapsamında nanofiberlerin deri doku mühendisliğindeki kullanım alanları ile ilgili detaylı bir literatür taraması yapılmıştır ve ilgili literatür aşağıdaki paragraflarda detaylandırılmıştır.

Khazaeli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik sıçan modelinde deri yaralarını onarmak için elektroğirme yöntemiyle üretilen PLA/kitosan nanofibröz matrisler kullanılmıştır. Morina karaciğeri yağı içeren nanofibröz matrislerin, yüksek oksijen geçirgenliği ve yüksek nem tutma kapasitesine sahip oldukları ve 14. günün sonunda yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir [106]. Vashisth ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise elektroğirme kullanılarak gellan zıncı ile nanofibröz matrisler üretilmiştir. Üretilen nanofibröz yapıların yüksek biyoyumluluk ve yapısal bütünlük sergiledikleri ve insan dermal fibroblast hücre kültüründe, hücre büyümesi ve hücre yapışmasını teşvik ettikleri görülmüştür [107]. Başka bir çalışmada, Lai ve ark. kollajen ve hiyalüronik asit kullanarak nanofibröz matrisler üretmişlerdir. Üretilen nanofiber yapının, *in vitro* vasküler benzeri tübüler yapı oluşumunu iyileştirdiği ve diyabetik sıçanlarda yeni deri doku oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [108]. Son olarak, He ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PCL ve kitosan kullanılarak elektroğirme ile nanofibröz matrisler üretilmiştir. PCL/kitosan nanofiberlerin yüksek antibakteriyel

özelliğe, serbest radikal temizleme kapasitesine ve biyoyumluluğa sahip olduğu belirtilmiştir [109].

Tez kapsamında, dispersiyon şekillendirme yöntemiyle çeşitli kalıplar kullanılarak istenilen geometride ve kalınlıkta, makrogözenekli ve mekanik olarak kararlı 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen yapıların HDM'ye benzerliği ile 2B yapılara göre hücre yapışması ve canlılığını daha iyi desteklemesi hedeflenmiştir. Biyoaktif ajan olarak kullanılan kurkuminin üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinden kontrollü salımının incelenmesi da tez çalışmasının diğer hedeflerinden biridir. Literatür taramasında PCL/kitosan/kurkumin formülasyonu ile nanofiber formda 3B yara örtü malzemelerinin üretimine ve bunların yara örtü malzemesi olarak kullanımına dair bilimsel bir çıktı bulunamamıştır. Tüm bu özellikleriyle, tez kapsamında geliştirilen 3B yapı literatürden ayrılmaktadır ve tez çıktılarının literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve deneysel çalışmalar hakkında detaylı bilgiler verilmiştir. İlk aşamada, geleneksel elektroğirme yöntemiyle kurkumin içeren PCL/kitosan (PCL/Kit) 2B nanofibröz matris üretimi için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kullanılan polimerler için farklı çözücü karışımları kullanılarak en uygun polimer/çözücü sistemi için en uygun elektroğirme parametreleri belirlenmiştir. Sonrasında, bu parametreler üzerinden tezin sonraki aşamalarında kullanılacak 2B nanofibröz matrisler başarıyla üretilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında, makrogözenekli ve 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretimi için dispersiyon şekillendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu aşamada 1 cm x 1 cm boyutlarında kesilen 2B nanofibröz matrisler, homojenizatör kullanılarak sulu tert-bütanol çözeltisi içerisinde süspanse hale getirilmiştir. Sonrasında, dispersiyonlar kalıba dökülerek dondurarak kurutma işlemi ile 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri istenilen boyut ve geometride üretilebilmiştir.

Tezin son aşamasında, üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Kurkumin yüklü 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri için enkapsülasyon verimleri ve ilaç yükleme kapasiteleri hesaplanmış ve kurkumin salım profilleri çıkarılmıştır. Kurkumin salım profillerine kinetik modeller uygulanmış ve salıma en uygun model ile model parametreleri belirlenmiştir. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin antibakteriyel etkileri, *E.coli* ve *S.aureus* bakteri suşları kullanılarak incelenmiştir. Üretilen malzemelerin biyoyumluluğu, L929 hücreleri kullanılarak sitotoksisite testleri ile incelenmiştir. Ayrıca, insan dermal fibroblast (HDF) hücreleriyle yapılan 14 günlük hücre kültürü çalışması boyunca, HDF'lerin 3B nanofibröz yara örtü malzemelerindeki morfolojileri ve canlılıkları belirlenmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan PCL, kitosan (medium molecular weight) ve kurkumin Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Elektroğirme yönteminde kullanılan çözücüler; N,N-dimetilformamid (DMF), diklorometan (DCM), formik asit (FA; 98-100%) ve asetik asit de (AA) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İki boyutlu nanofibröz matrislerin süspanse haline getirilmesinde kullanılan tert-bütanol (t-But) Merck (Almanya) firmasından alınmıştır.

Sitotoksosite testleri için kullanılan L929 fare fibroblastik hücre hattı Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'nun hücre kültürü laboratuvarından temin edilmiştir. Minimum essential medium-alfa modifikasyonu ( $\alpha$ -MEM) ve Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) kültür ortamları Biochrom (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kaldırılmasında kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından; kültür ortamına eklenen L-glutamin, penisilin-streptomisin(P/S), fetal sığır serumu (FBS) ile Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) Biowest (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve izopropanol Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan glutaraldehit (GA) ve hekzametildisilazan (HMDS) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

### 3.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Üretimi

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/kitosan (PCL-Kit) nanofiberlerin üretiminde kullanılan elektroçirime çözeltileri 3 farklı şekilde hazırlanmıştır. Bunlar;

a) Fahimirad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmadaki çözelti hazırlama yöntemi temel alınmıştır [10]. Bunun için, DCM:DMF (75:25, hacim/hacim) karışımı içerisinde, kitosan kütlesi toplam polimer kütlesine göre hesaplanarak %5, %10 ve %20 oranlarında (kütle/toplam kütle; k/k) kitosan grupları oluşturulmuştur. Sonikatör kullanılarak kitosanın çözücü içerisinde homojen dağılması sağlanmıştır. Sonrasında, kitosan çözeltisine kütlece %10 PCL (%PCL kütlesi/çözücü hacmi) eklenmiş ve elde edilen çözelti bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

b) Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/kitosan çözeltisi hazırlamak için ikinci bir yöntem olarak literatürde kitosan çözeltilerinde çözücü olarak kullanılan asetik asit tercih edilmiştir [110-114]. Su ile %80, %90 oranında seyreltilmiş asetik asit ve saf asetik asit çözücüleri içerisinde kitosan kütlesi bir önceki paragrafta verilen oranlara göre hesaplanarak kitosan eklenmiştir. Çözeltiler manyetik karıştırıcıda bir gece karıştırılmıştır. Ayrıca ilk yöntem ile benzer şekilde DCM:DMF (75:25, hacim/hacim) içerisinde kütlece %10 PCL (%PCL kütlesi/çözücü hacmi) eklenmiş ve elde edilen çözelti bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan AA ve DCM:DMF çözeltileri, toplam karışımın hacimce %10'u asetik asit olacak şekilde birleştirilmiştir. Bu karışım da 1 saat boyunca sonikatör yardımı ile karıştırılmıştır.

c) Bir diğerk yöntemde, PCL-Kit çözeltilisi için formik asit ve asetik asit karışımı kullanılmıştır. Liverani ve ark. [115] yapmış olduğu bir çalışma referans alınarak hacimce (7:3) oranında FA:AA karışımı hazırlanmıştır. Çözücü ortamına kütle / çözücü hacmi (k/h) %10 (PCL10) ve %12 (PCL12) olacak şekilde PCL eklenmiş ve karışım manyetik karıştırıcıda tam olarak çözüne kadar (6 saat) karıştırılmıştır. Kitosan kütlesi toplam polimer kütlesine göre %5 (Kit5), %10 (Kit10) ve %20 (Kit20) olacak şekilde kitosan çözeltiliye eklenerek manyetik karıştırıcıda 1 gece karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin elektroğirme parametreleri için en uygun koşullar belirlenmiştir. Bunun için denenen parametreler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** PCL12 grupları için elektroğirme parametreleri.

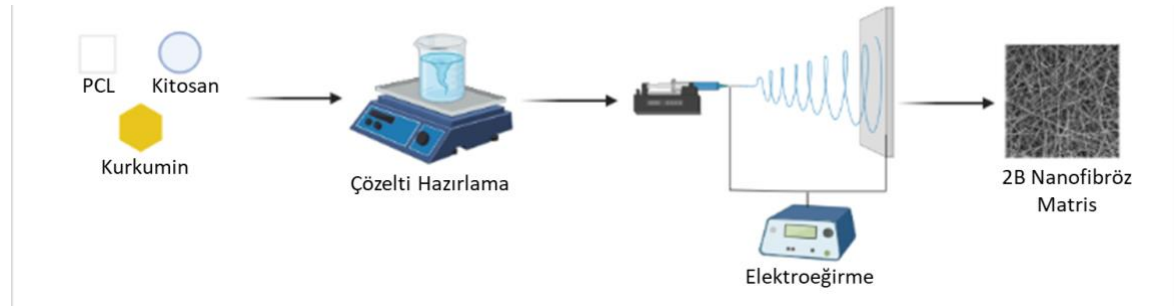
Gruplar	Voltaj	Akış Hızı	Uzaklık
PCL12	10-20 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm
PCL12-Kit5	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm
PCL12-Kit10	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm
PCL12-Kit20	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm

Yara iyileşmesinde kullanılan ve kurkumin içeren elektroğirilmiş matrislerin üretimi ile ilgili literatür incelendiğinde, kurkumin kütlesinin toplam polimer kütlesine oranı %3-10 arasında olacak şekilde kullanıldığı görülmüştür [116-118]. Bu yüzden, tez çalışması kapsamında kurkumin için %5 (Kur5) ve %10 (Kur10) (kütle/toplam polimer kütlesi) derişimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu iki grup için (7:3) oranında FA:AA çözücü karışımı hazırlanmış ve bu karışıma PCL kütlesi / çözücü hacmi %12 olacak şekilde PCL eklenmiştir. Karışım manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında, tam olarak çözüne kadar (6 saat) karıştırıldıktan sonra içerisine kütlece toplam polimer kütlesinin %5 ve %10’u olacak şekilde kurkumin eklenmiştir. Kurkumin homojen olarak dağılana kadar çözeltili (30 dakika) manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonrasında, bu çözeltilere kitosan kütlesi toplam polimer kütlesine göre %10 olacak şekilde kitosan eklenerek manyetik karıştırıcıda 1 gece daha karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltilerle en uygun elektroğirme koşullarının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu nanofibröz matrislerin üretim aşamaları Şekil 3.1’de özetlenmiştir. Elektroğirme çalışmalarında denenmiş olan parametreler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için elektroğirme parametreleri\*.

Gruplar	Voltaj	Akış Hızı	Uzaklık
PCL-Kit	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm
PCL-Kit-Kur5	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm
PCL-Kit-Kur10	15-25 kV	0,2 – 0,6 mL/sa	10-18 cm

\* Çizelge 3.2’de PCL derişimi %12 olarak, kitosan derişimi ise %10 olarak kullanılmıştır (Bknz. Sonuçlar Bölüm 4.1.2).

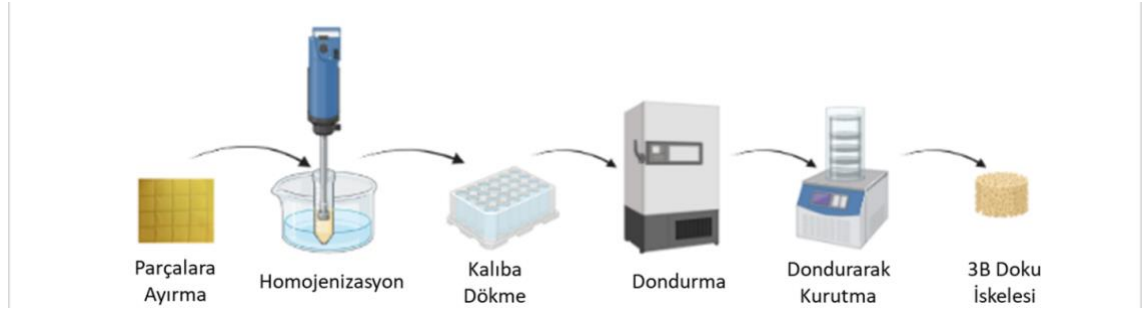


**Şekil 3.1.** İki boyutlu nanofibröz matrislerin üretimine ait şematik gösterim.

### 3.3. Kurkumin Yüklü PCL/Kitosan 3B Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Üretimi

Elektroğirme ile elde edilen 2B nanofibröz matrislerden 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretiminde PCL, PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları kullanılmıştır. Bu adımda Mader ve ark. tarafından yapılan çalışmada kullanılan yöntemler referans alınmıştır [119]. Geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilmiş olan nanofibröz matrisler 1 cm x 1 cm boyutlarında kesilmiştir. Hacimce 1:4 oranında tert-bütanol/saf su (t-But/UW) karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan t-But/UW karışımından 15 mL alınmış ve içerisine hacimce %0,045 oranında DCM eklenmiştir. Küçük parçalar halinde kesilmiş olan 0,2 g nanofibröz matrisler, sıvı karışımına eklenmiş ve 40 dk. boyunca 15,000 rpm hızında homojenizatör kullanılarak süspanse hale getirilmiştir. Homojen nanofiber dispersiyonları farklı boyutlardaki kalıplara dökülerek -80°C’de 24 saat boyunca dondurulmuştur. Donma işlemi sonrasında kalıplar liyofilizatöre (Christ,

Almanya) yerleştirilmiş ve örnekler 48 saat boyunca kurutulmuştur. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretim aşamaları Şekil 3.2’de özetlenmiştir.



**Şekil 3.2.** Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretimine ait şematik gösterim.

### 3.4. Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Karakterizasyonu

Elde edilen yara örtü malzemelerinin doku mühendisliğinde kullanıma uygunluğunun incelenmesi amacıyla çeşitli karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlere ait detaylı bilgiler aşağıda sunulmuştur.

#### 3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

İki boyutlu nanofibröz matrislerin ve 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin morfolojik incelemeleri taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo 50, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri, ImageJ (Ulusal Sağlık Enstitüsü, A.B.D.) programına aktararak 2B ve 3B yapılarıdaki nanofiberlerin ortalama çap ve çap dağılımları hesaplanmış ve histogram grafikleri çizilmiştir. Ayrıca, ImageJ programı ile 2B ve 3B yapılarının gözenek çapları da ölçülmüştür.

#### 3.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin kimyasal yapıları Fourier Transform kızılötesi (Nicolet iS10, Thermo Scientific, A.B.D.) spektroskopisi kullanılarak 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında belirlenmiştir.

#### 3.4.3. Su Temas Açısı Ölçümü

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinde, damlatılan suyun makrogözenekli yapılar tarafından hemen emilmesi sebebi ile ölçüm yapılamamıştır. Bu sebeple, geleneksel elektroegirmeyle üretilen 2B nanofibröz matrislerin üzerine 10  $\mu\text{L}$  distile su



damlatılarak ıslatılabilirlikleri su temas açısı ölçüm cihazıyla (Attension Theta Flex, İsveç) belirlenmiştir.

#### 3.4.4. Su Alım Kapasitesinin Belirlenmesi

Hazırlanmış olan 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri, su alım kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla PBS içerisinde (37°C, pH=7,4) inkübe edilmiştir. Örnekler inkübasyon süresince; başlangıç anı 0 ve 30. dk arasında 5'er dakika arayla, sonrasında 1., 2., 3., 12., 18. ve 24. saat sonunda tampon çözeltisinden çıkarılmış, önce havlu kağıt ile nemi alındıktan sonra, herhangi bir kurutma işlemine tabi tutulmadan ıslak tartımları gerçekleştirilmiştir. Matrislerin % su içeriği, aşağıda verilen Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Denklemden  $W_{yaş}$  yaş ağırlığı,  $W_{kuru}$  ise kuru ağırlığı simgelemektedir.

$$\%_{Matris\ su\ içeriği} = \frac{W_{yaş} - W_{kuru}}{W_{kuru}} \times 100 \quad (3.1)$$

#### 3.4.5. *In Vitro* Biyobozunurluk Testi

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin biyobozunurluk davranışlarının belirlenmesi için her bir örnek 37°C'deki 10 mL fosfat tamponu içerisine (PBS, pH: 7,4) koyulmuştur. Çözelti içerisine mikroorganizma oluşumunu engellemek amacı ile %0,1 (kütle / çözücü hacmi) oranında sodyum azid eklenmiştir. Sonrasında 7., 14. ve 28. günlerde örnekler çözülden alınmıştır. Ayrıca, bozunurluk ortamı haftada bir yenisiyle değiştirilmiş ve malzemeler her bir örnekleme zamanı için dondurarak kurutma yöntemiyle 24 saat kurutulmuştur. Kurutulmuş örneklerin kütleleri bir hassas terazide ölçülmüş ve bozunma yüzdeleri aşağıda verilen Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır. Denklemden  $W_0$  örneğin başlangıç anındaki kütlelerini,  $W_t$  ise  $t$  anındaki kütlelerini simgelemektedir.

$$\%_{Bozunma} = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

#### 3.4.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin mekanik özellikleri basma testiyle (TA.XTPlus, Stable Microsystems, Birleşik Krallık) belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler, 10 mm çapında ve 8-9 cm yüksekliğinde üretilmiştir. Örnekler sonrasında 5 mm/dk hızla 50 N'luk bir kuvvet uygulanmıştır. Elde edilen gerilim-gerinim eğrilerinden

malzemelerin mekanik özellikleri belirlenmiştir. Ölçümler her örnek grubu için 3 paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.7. Bilgisayarlı Tomografi ( $\mu$ -BT) Görüntülemesi**

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin makrogözenekli yapısı ve gözeneklilik oranının belirlenmesi için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜNİTEK)  $\mu$ -BT yöntemiyle tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Üretilen malzemeler Skyscan (Bruker) marka 1272 model X-ışınları tomografisi kullanılarak görüntülenmiş ve ham X-ışınları tomografisi verileri NRecon (Skyscan) yazılımı ile yeniden oluşturulmuştur. Yeniden oluşturulan kesitler CTVOx, CTAn ve CTDataView adlı (Skyscan) yazılımları ile analiz edilmiştir.

## **3.5. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerine Kurkumin Yükleme ve Salım Çalışmaları**

### **3.5.1. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerine Yüklene Kurkumin Miktarının Belirlenmesi**

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerine yüklene kurkumin miktarının belirlenmesi için aynı çözücüler içerisinde hazırlanmış kurkumin çözeltilerinden kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Bunun için öncelikle 100  $\mu$ g/mL olacak şekilde kurkumin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti için 2 mL kloroform ve 2 mL dimetiksülfoksit (DMSO) cam tüplere konulmuştur. Bu cam tüpler ultrasonik banyo içerisinde 10 dk. soniklenmiştir. Sonrasında, aynı tüplere 16 mL asetonitril eklenerek 10 dk. daha sonikasyon devam ettirilmiştir. Bu çözeltiden seri seyreltmeler sonucunda 100 – 12,5  $\mu$ g/mL kurkumin kalibrasyon çözeltileri elde edilmiştir. Hazırlanan kurkumin çözeltilerinin 425 nm'de absorbansları ultraviyole (UV) spektrofotometre (Nanodrop 2000c, Thermo scientific, ABD) ile okunmuş ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemeleri içerisine yüklene kurkumin miktarı, kurkuminin nanofiberlerden ekstraksiyonu sonrasında absorbansının UV spektrofotometre ile ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bunun için, yaklaşık 10 mg PCL/Kit/Kur5 ve PCL/Kit/Kur10 örnekleri ayrı ayrı bir cam tüpe yerleştirilmiş ve tüplere yukarıda kurkumin kalibrasyon eğrisinin eldesi için kullanılan stok çözeltisi eklenerek malzemelerin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Sonikasyon sonrasında örnekleri içeren tüpler 2,500 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Kurkumin içeren çözeltiler 425 nm'de UV

spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Elde edilen absorban verileri, kalibrasyon eğrisindeki grafiğe yerleştirilerek nanofibröz matrisler içerisine yüklenen kurkumin miktarı hesaplanmıştır. Sonrasında örnekler için enkapsülasyon verimi (Eşitlik 3.4) ve ilaç yükleme kapasitesi (Eşitlik 3.5) hesaplanmıştır. Denklemlerde  $W_{Enkapsülasyon}$  örneklerde enkapsüle edilen kurkumin kütleini,  $W_{Yüklenen}$  başlangıçta örneklere yüklenen kurkumin miktarını,  $W_{kuru}$  ise kuru örnek kütleini simgelemektedir.

$$\%_{Enkapsülasyon\ Verimi} = \frac{W_{Enkapsülasyon}}{W_{Yüklenen}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\%_{İlaç\ Yükleme\ Kapasitesi} = \frac{W_{Enkapsülasyon}}{W_{Kuru}} \times 100 \quad (3.5)$$

### 3.5.2. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinden Salınan Kurkumin Miktarının Belirlenmesi

Kurkuminin sulu ortamlardaki düşük çözünürlüğünden dolayı *in vitro* salım çalışmaları kütlece %0,5 Tween 80 ve hacimce %10 etanol içeren PBS (pH: 7,4) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler 10 mL salım ortamı içeren kahverengi cam şişelere aktarılmış ve şişeler 37°C'de çalışan bir çalkalamalı inkübatöre (100 rpm) yerleştirilmiştir. Belirli zamanlarda (5., 15., 30., 60., 120., 180., 240., 300., 360., ve 480. dakikalar; 24., 55., 57., ve 72. saatler), örnekler üzerinden 1 mL ortam çekilmiş ve şişelere salım hacmini sabit tutmak için 1 mL taze salım ortamı eklenmiştir. Çekilen salım ortamının absorbanı 425 nm'de UV spektrofotometresi ile ölçülmüş, kümülatif salım miktarları hesaplanmış ve bu değerler zamana karşı % kümülatif salım değerleri olarak grafiğe dökülmüştür. Kümülatif kurkumin salım miktarları için yine yukarıda anlatılan yönteme benzer bir şekilde kurkumin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bunun için 9 mL %0,5 Tween 80 içeren PBS ve 1 mL etanol karıştırılmış, içerisine 1 mg kurkumin eklenerek 100 µg/mL derişimli kurkumin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden seri seyreltmeler sonucunda 100 – 12,5 µg/mL kurkumin kalibrasyon çözeltileri elde edilmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

### 3.5.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinde Kurkumin Salım Mekanizmasının Belirlenmesi

Polimer sistemlerden ilaç salım kinetiklerini modellemeyi amaçlayan çeşitli matematiksel modeller bulunmaktadır [120, 121]. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinden kurkuminin salım mekanizmasının belirlenmesi için elde edilen salım verileri sıfıncı derece (zero-order), birinci derece (first-order), Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine uygulanarak salıma en uygun model ve model parametreleri belirlenmiştir. Kullanılan kinetik modellere ait denklemler aşağıda verilmiştir.

Sıfıncı derece kinetik modelde,  $t$  anındaki ilaç salım miktarı şu şekilde temsil edilir:

$$M_t/M_\infty = k_0 t \quad (3.6)$$

Birinci derece kinetik modelde,  $t$  anındaki ilaç salım miktarı şu şekilde temsil edilir:

$$\log(100 - W) = \log 100 - k_1 t \quad (3.7)$$

Higuchi modelinde,  $t$  anındaki ilaç salım miktarı şu şekilde temsil edilir:

$$M_t/M_\infty = k_H t^{1/2} \quad (3.8)$$

Korsmeyer-Peppas modelinde,  $t$  anındaki ilaç salım miktarı ise şu şekilde temsil edilir:

$$M_t/M_\infty = k t^n \quad (3.9)$$

Bu denklemlerde  $M_t/M_\infty$   $t$  anında salınan ilaç oranını;  $W$   $t$  anında salınan ilaç yüzdesini;  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_H$  ve  $k$  de sırasıyla sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik sabitlerini simgelemektedir.

### 3.6. Antibakteriyel Testler

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin antibakteriyel etkinliğinin incelenebilmesi için CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartları doğrultusunda agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal testler için kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (gram pozitif) bakteri suşları Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Agar difüzyon yöntemi için Mueller–Hinton Agar (MHA, Merck) besiyerleri hazırlanarak otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dökülerek çalışma için hazır hale getirilmiştir. Agar difüzyon yönteminde kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşlarının 0,5 MacFarland yoğunluğundaki 24 saatlik kültürlerinden 100 µL petrilere aktarılmış ve yayma ekim tekniği ile MHA besiyerleri üzerine inoküle edilmiştir. Daha önce belirtildiği üzere, steril olarak hazırlanmış 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine steril koşullarda yerleştirilmiş ve örnekler statik etüvde (New Brunswick, A.B.D.) 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapları (mm) ölçülerek örneklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir.

### **3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları**

#### **3.7.1. *In Vitro* Sitotoksisite Testleri**

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 24 saatlik sitotoksisite testi, ISO 10993-5 standartlarına [122] uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

##### **3.7.1.1. Fare Fibroblast L929 Hücrelerinin Çoğaltılması**

ISO 10993-5 [122] standardına göre *in vitro* sitotoksisite testlerinde fare fibroblast kaynaklı L929 hücre hatları kullanılmıştır. Dondurulmuş bir halde – 80 °C’deki sıvı azottan alınan L929 hücreleri 37°C’de çözdürülmüş ve ardından hücreler normal kültür ortamı ( $\alpha$ -MEM içerisinde %10 (h/h) FBS, 4 mM glutamin ve %1 (h/h) penisilin-streptomisin) içerisinde 75 cm<sup>2</sup>’lik steril plastik kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler bu kültür kapları yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra *in vitro* sitotoksisite testlerine geçilmiştir.

##### **3.7.1.2. Hücre Canlılığının ve Morfolojilerinin Belirlenmesi**

Sitotoksisite testleri için PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinden alınan örnekler 15 mL’lik steril plastik Falcon tüpler içerisinde bulunan 2 mL normal kültür ortamına ( $\alpha$ -MEM içerisinde %10 (hacim/hacim) FBS, 4 mM glutamin ve %1 (h/h) penisilin-streptomisin) koyulmuş ve 1 gece boyunca 37°C, %5’lik CO<sub>2</sub> ve %95 nemlilik içeren CO<sub>2</sub> etüvünde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemin sonunda örnekler kültür ortamından alınmış ve deneylerde bu

ortam ekstraksiyon ortamı olarak kullanılmıştır. Ardından, ekstrakt ortamları 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Hücreler 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde normal kültür ortamında dağıtılmış ve her bir 96 göze 100 µL hücreli ortam eklenerek gözlerle 1x10<sup>4</sup> hücre sayısında ekim yapılmıştır. Hücreler sonrasında CO<sub>2</sub> etüvünde 24 saat kültüre edilmiş ve hücrelerin kültür kabı yüzeyini kaplaması sağlanmıştır. Kültür sonrası malzemelerin bekletildiği ekstraksiyon ortamlarının hacimce %100, %50, %25 oranındaki seri dilüsyonları normal kültür ortamıyla hazırlanmış ve bu ortamlar 96 gözlü kabı gözlerine eklenmiştir. Bu testte negatif kontrol grubu olarak 96 gözlerde çoğaltılmış hücreler üzerine taze normal kültür ortamı, pozitif kontrol grubu olarak hücreler üzerinde toksik etkisi bilinen hacimce %10'luk DMSO kullanılmıştır. Hücreler bu ekstraksiyon ortamlarıyla 24 saat kültüre edildikten sonra hücre canlılıkları ve morfolojileri MTT analizi ve kristal viyole boyamalarıyla incelenmiştir.

### 3.7.1.3. MTT Testi

Canlı hücrelerin mitokondrisi MTT yapısında bulunan tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri ölçülür. Ekstraksiyonların seri dilüsyonlarında bekletilmiş hücreler üzerindeki ortamlar, 24 saat kültürasyon sonrası alınmış ve her bir gözdeki hücreler üzerine 200 µL α-MEM çözeltisi ve 20 µL MTT çözeltisi karışımı eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 37°C'deki CO<sub>2</sub> etüvünde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra, hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 250 µL izopropanol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltinin optik yoğunluğu, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hücre canlılıkları aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$\%_{\text{Hücre Canlılığı}} = \frac{OD_{\text{örnek}}}{OD_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.10)$$

Bu eşitlikte  $OD_{\text{örnek}}$  %100, %50 ve %25 örnek ekstraksiyon ortamıyla muamele edilmiş hücrelerin ölçülen optik yoğunluğunu,  $OD_{\text{kontrol}}$  ise örneklerle aynı koşullarda bekletilmiş normal kültür ortamı (%0 ekstrakt ortamı) eklenen hücrelerin ölçülen optik yoğunluğudur. Hücre canlılığının %70'den az olması örneğin hücreler üzerinde toksik etkisinin olduğunu göstermektedir.

#### **3.7.1.4. Kristal Viyole Analizi**

Malzeme ekstraksiyonları ile muamele edilen hücrelerin morfolojileri, kristal viyole boyama ile belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle kültür kabında bulunan ekstraksiyon ortamları uzaklaştırılmış ve PBS ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelere hacimce 1:1 oranında aseton/metanol karışımı ile 4°C’de 20 dk fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Ardından %20’lik metanol çözeltisinde hazırlanan %0,5’lik kristal viyole çözeltisi hücrelerin üzerine konulmuş ve kültür kapları karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Son olarak boyanan yüzeyler akan suyun altında yıkanmış ve ışık mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında hücrelerin morfolojileri incelenmiştir.

#### **3.7.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin ve Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları**

İlk olarak 2B nanofibröz matrislerin biyouyumluluklarının ve malzeme-hücre etkileşimlerinin belirlenmesi için HDF hücreleri ile 14 günlük hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Daha sonrasında 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri ile de 14 günlük hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu nanofibröz malzemeler için 1 cm x 1 cm boyutlarında kesilmiş örnekler kullanılmış; 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri için ise çapları ~9 mm, yükseklikleri ~4mm olan örnekler kullanılmıştır. İki boyutlu ve 3B malzemelere aynı sayıda ve benzer şekilde hücre ekimi yapıldığı için deneysel çalışmalar aynı başlıklar altında anlatılmıştır. İki boyutlu nanofibröz matrisler ve 3B nanofibröz yara örtü malzemeleriyle hücre kültürü çalışmaları insan dermal fibroblast hücreleriyle gerçekleştirilmiştir.

##### **3.7.2.1. İnsan Dermal Fibroblast (HDF) Hücrelerinin Çoğaltılması**

Dondurulmuş bir halde sıvı azotta bulunan HDF hücreleri 37°C’de hızlı bir çözündürme işlemine maruz bırakılmış ve sonrasında hücreler normal kültür ortamı (Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı (DMEM) içerisinde %10 (hacim/hacim) FBS, %2 (hacim/hacim) glutamin ve %1 (hacim/hacim) penisilin-streptomisin) ile 75 cm<sup>2</sup>’lik steril plastik kültür kaplarına aktarılmıştır. Sonrasında kültür kapları %5 CO<sub>2</sub> içeren %95 nemlilikteki inkübatöre (37°C) yerleştirilmiştir. Hücreler kültür kabı yüzeylerini %90 kapladığı anda Tripsin/EDTA ile yüzeylerden kaldırılarak hücre ekimi için belirlenen sayıda normal kültür ortamında süspanse edilmiştir.

### **3.7.2.2. Nanofibröz Matrislere Hücre Ekimi**

Çalışmada kullanılan tüm malzemelerinin sterilizasyonu için, örnekler yüzeylerini kaplayacak şekilde %70'lik etanol içerisinde 30 dakika bekletilmiş ve örnekler sonrasında etanolün uzaklaştırılması için PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında örneklerin her bir yüzeyi ayrı ayrı 30 dakika UV sterilizasyonuna tabi tutulmuştur.

Steril 2B nanofibröz matrisler ve 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri, hücre ekimi öncesinde 2 saat şartlandırma ortamında (DMEM içerisinde %10 (hacim/hacim) FBS, 2 mM glutamin ve %1 (hacim/hacim) penisilin-streptomisin) bekletilerek serum içerisinde bulunan proteinlerin malzeme yüzeylerine adsorplanması sağlanmıştır. Hücre ekimi gerçekleştirilmeden önce, iskelelerdeki ortam pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. İnsan dermal fibroblast hücreleri, her bir örnek başına 250,000 hücre düşecek şekilde normal büyüme ortamında (DMEM içerisinde %10 (hacim/hacim) FBS, %2 (hacim/hacim) glutamin ve %1 (hacim/hacim) penisilin-streptomisin) süspanse edilmiştir. Hücreler, 20 µL büyüme ortamıyla örnekler üzerine ekilmiş ve örneklerin kurummasını engellemek için her bir iskeleye 30 dk. aralıklarla 20 µL taze kültür ortam eklenmiştir. Üç saatin sonunda 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL büyüme ortamı eklenerek hücre ekimi tamamlanmıştır. Tüm hücre kültürü çalışmaları laminar akışlı kabinde (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet, İtalya) gerçekleştirilmiş ve hücre ekilmiş örnekler ise 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren %95 nemlilikteki inkübatörde (Panasonic Instruments, Japonya) 3 günde bir ortamları tazelenerek 14 gün boyunca kültüre edilmişlerdir.

### **3.7.2.3. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi**

İki boyutlu nanofibröz matris ve 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri üzerinde çoğalan HDF hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri, kültür süresince farklı zamanlarda (2B nanofibröz matrisler; 1.,7. ve 14. gün ve 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri; 1., 4., 7. ve 14. gün), MTT ile kantitatif olarak belirlenmiştir. MTT testinde elde edilen absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için öncelikle malzemeler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve her bir örnek yeni bir 24 gözlü kültür kabına alınmıştır. Ardından, her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenmiş ve hücreler bu şekilde 37°C'deki etüvde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 µL izopropanol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözülden 200 µL alınarak 96 gözlü



kültür kaplarına aktarılmıştır. Çözeltinin optik yoğunluğu, 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

### **3.7.2.3. Hücre Morfolojilerinin Belirlenmesi**

İki boyutlu nanofibröz matrislere ve 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine ekilen hücrelerin morfolojileri, hücre-hücre ve hücre-nanofiber etkileşimleri, kültürün 1. ve 14. günleri sonrası SEM analizi ile incelenmiştir. Kültür ortamı, örneklerin bulunduğu gözlerden uzaklaştırılmış ve örnekler PBS ile iki defa yıkanmıştır. Daha sonra, hücreler 0,1 M Dulbecco PBS içerisinde hazırlanmış hacimce % 2,5’lik gluteraldehit ile fikslenmiştir. Analiz öncesi, örnekler, hacimce % 30, 50, 70, 90 ve 100’lük etanol serisi içerisinde 1’er dk bekletilerek susuzlaştırma işlemi yapılmıştır. Örnekler, bu işlemden sonra heksametildisilazan (HMDS) ile 5 dk. muamele edilmiş ve 1 gece boyunca çeker ocak içerisinde kurutulmuştur. Örnekler daha sonra ince bir altın tabakasıyla kaplanarak SEM (Tescan GAIA3, Çekya) analizi gerçekleştirilmiştir.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için IBM® SPSS© (IBM, ABD) programının 20. sürümü kullanılmıştır. Tüm analiz verileri, en az üç paralel örneğin ortalama±standart sapma değerleri olarak verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri Student’s t-test veya tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Çalışma %95’lik güven aralığında yapılmış ve p değerinin 0,05’ten küçük olduğu durumlarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu kabul edilmiştir (\*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001).

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, geleneksel elektroğirme ve dispersiyon şekillendirme yöntemleri kullanılarak kurkumin yüklü makrogözenekli 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması sonucunda elde edilen çıktılar bu bölümde tartışılmıştır.

Bu bölümde, geleneksel elektroğirme yöntemi ile elde edilen 2B nanofibröz matrislerin ve bu matrislerden elde edilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretim süreçleri ile bu süreçler sırasında elde edilen sonuçlar detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Üretilen malzemelerin morfolojik ve fiziksel özellikleri, kimyasal yapıları, biyobozunurlukları ve antibakteriyel özellikleri, yapılan testler ve analizler ile incelenmiş ve yine elde edilen sonuçlar bu bölümde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Ayrıca, kurkumin yüklü 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin enkapsülasyon verimliliği ve kurkumin salım profilleri de bu bölümde tartışılmıştır. Son olarak, hücre kültürü çalışmaları ile edilen SEM görüntüleri ve MTT analizi sonuçları verilmiştir.

Tez çalışması kapsamında ortaya çıkan tüm sonuçlar, literatürdeki bilgiler ışığında tartışılmış ve literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

### 4.1. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Üretimi

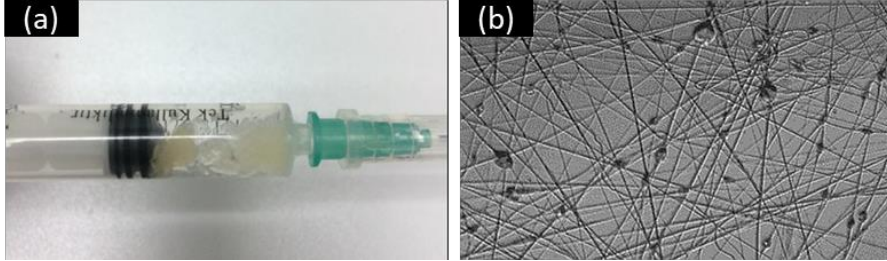
#### 4.1.1. Geleneksel Elektroğirme Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/kitosan (PCL-Kit) nanofiberlerin üretiminde kullanılan elektroğirme çözeltileri 3 farklı şekilde hazırlanmıştır.

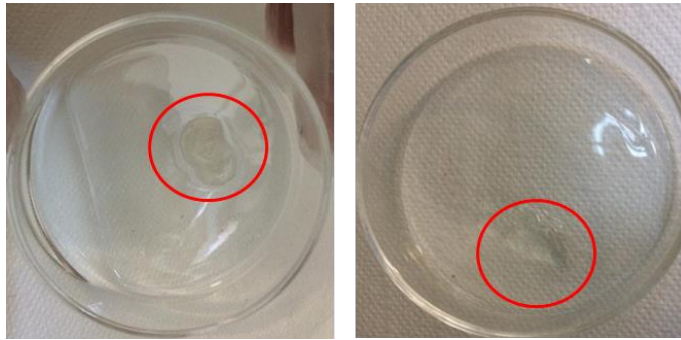
İlk olarak PCL-Kit için çözücü olarak DCM:DMF (75:25, hacim/hacim) karışımı denenmiştir [10]. Deneyin ilk aşamasında çözücü içerisine yalnızca %10 PCL (k/h) eklenmiş ve elde edilen çözeltiden geleneksel elektroğirme yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde nanofiber yapılar elde edilmiştir. DCM:DMF karışımının PCL için başarılı olduğu görüldükten sonra PCL-Kit grubu için de bu karışımın denenmesine karar verilmiştir. Bu adım için DCM:DMF karışımı içerisine kitosan eklenip homojenizasyonu sağlanmış ve sonrasında çözelti içerisine %10 PCL (k/h) eklenip bir gece manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Örnek gruplarından (toplam polimer kütlelerine göre kütlece %5, %10, ve %20 kitosan grupları) %20 kitosan grubunun çözücü içerisinde iyi bir şekilde çözünmediği ve karışım içerisinde kitosanın jelleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.1a). Yüzde 5 ve %10 kitosan içeren

gruplarda ise elektroğirme parametrelerinin denenmesi çalışmalarında, nanofiberlerdeki boncuklu yapı giderilememiştir (Şekil 4.1b). Yine bu gruplarda elektroğirme sonrasında şırıngada kalan çözelti incelendiğinde de jel halinde kitosan kalıntıları gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda DCM:DMF çözücü sisteminin kitosanı çözemediği ve bu sebeple ideal bir elektroğirme işlemi için bu karışımın kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.



**Şekil 4.1.** (a) DCM:DMF karışımı içerisinde çözünmeyen kitosana ait kamera ve (b) %5 kitosan grubunun elektroğirilmesi sonucunda elde edilen boncuklu nanofiber yapıya ait optik mikroskop görüntüleri.



**Şekil 4.2.** Kitosan çözeltisi (AA) ile PCL çözeltisinin (DCM:DMF) karıştırılması ile oluşan jelleşmiş yapıya ait görüntüler..

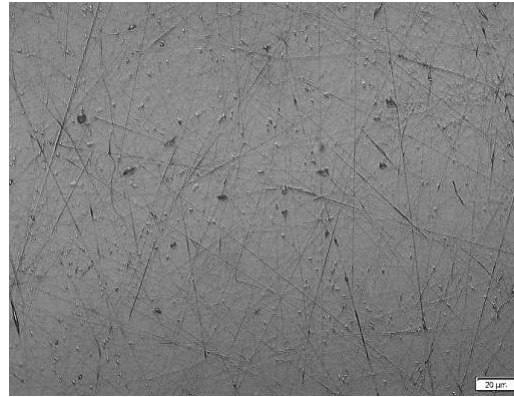
Literatürde, kitosan içeren elektroğirme çalışmaları incelendiğinde, asetik asitin başarılı bir çözücü olarak kullanıldığı görülmüştür [110-114]. Bu çalışmalar referans alınarak DCM:DMF karışımına asetik asit eklenmesi ile elde edilen çözücüde PCL ve kitosanın çözünürlüğü incelenmiştir. Bu amaçla yukarıda anlatılan yöntem benzer olarak DCM:DMF (3:1, hacim/hacim) karışımı hazırlanmış %10 PCL (kütle/hacim) eklenerek çözelti elde edilmiştir. Sonrasında saf su ile %80 ve %90 oranında seyreltilmiş asetik asit içerisine ve saf asetik asit içerisine ayrı ayrı kitosan (toplam polimer kütlelerine göre kütlece %5) eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda bir gece karıştırılmasının ardından kitosanın başarılı bir şekilde çözüldüğü görülmüştür. Ancak, AA çözeltileri ve DCM:DMF çözeltileri 1:3 oranında (hacim/hacim) karıştırıldığında jelleşme gözlenmiştir. Örnek olarak %80 ve %90 oranında seyreltilmiş asetik asit çözeltileri ile

DCM:DMF çözeltilerinin karıştırılması ile elde edilen jelleşmeler Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Oluşan bu yapının da elektroğirme için kullanılmayacağı değerlendirilmiştir.

PCL-Kit çözeltilerinin hazırlanmasında üçüncü bir yöntem olarak Liverani ve ark. tarafından yapılan bir çalışma referans alınmış ve çözücü olarak formik asit ve asetik asit karışımı kullanılmasına karar verilmiştir [115]. FA:AA (hacimce 7:3) karışımına %10 PCL (k/h) eklenip manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldıktan sonra toplam polimer kütlelerine göre kütlece %5, %10 ve %20 kitosan eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda tam olarak çözünene kadar karıştırılmıştır. Bu işlemler sonucunda tüm gruplarda PCL ve kitosanın, FA:AA (hacimce 7:3) karışımı içerisinde başarılı bir şekilde çözüldüğü görülmüştür.

#### **4.1.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerin Elektroğirilmesi ve Morfolojik İncelemeleri**

Geleneksel elektroğirme yöntemi ile ideal bir nanofibröz yapının elde edilebilmesi için uygun bir çözücünün kullanımı büyük önem taşımaktadır. Özellikle, çözelti yoğunluğunun çok düşük olması, yüzey geriliminin ve viskozitenin düşük olmasına sebep olacağından Taylor konisi elde edilemez ve bunun yerine polimerin sprey halinde püskürtülmesi görülebilir [52]. Yine çözelti yoğunluğunun düşük olması halinde elde edilen nanofiberlerde boncuklu yapıların oluşabileceği de belirtilmiştir [53, 54].



**Şekil 4.3.** Yüzde 10 derişimindeki PCL (k/h) gruplarından üretilen nanofiberlere ait optik mikroskop görüntüsü. Görüntüde boncuklu yapıların fazlalığı PCL derişiminin yeterli gelmediğini göstermektedir.

Bölüm 4.1.1’de anlatılan PCL/kit çözeltilerinden nanofibröz matrislerin eldesi için elektroğirme parametrelerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle, FA:AA

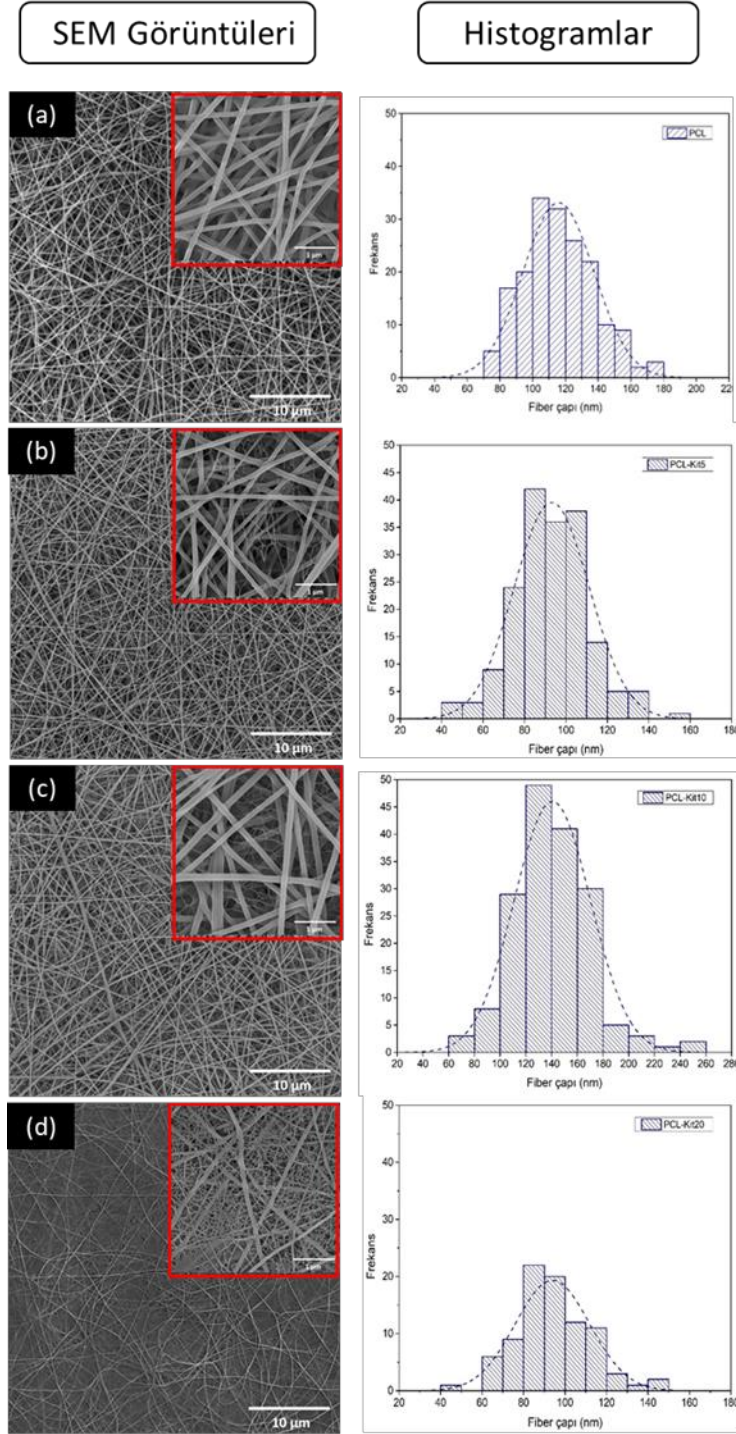
(hacimce 7:3) çözücü karışımı içerisinde hazırlanan %10 PCL (k/h) çözeltisi elektroğirildiğinde, şırınga ucunda düzenli jet oluşumunun gerçekleşmediği ve üretilen nanofiberlerde yüksek oranda boncuk olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Oluşan boncuklu yapının, çözelti yoğunluğunun düşük olması sebebiyle ortaya çıkabileceği göz önünde bulundurularak PCL derişiminin artırılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, PCL derişimi %12'ye (k/h) çıkartılmış ve tekrar elektroğirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yeni çözeltilerin elektroğirmeleri sonucunda genel olarak boncuksuz ve düzgün yapıda nanofiberler elde edilmiştir.

Tezin bu noktasından sonra PCL derişiminin %12 (k/h) olarak kullanılmasına karar verilmiş ve %12 derişimindeki PCL çözeltisi grupları (PCL12) yalnızca PCL olarak kısaltılmıştır. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton), PCL-Kit5, PCL-Kit10 ve PCL-Kit20 grupları için en uygun elektroğirme parametreleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Farklı örnek grupları için en uygun elektroğirme parametreleri.

Gruplar	Voltaj	Akış Hızı	Uzaklık
PCL	12 kV	0,4 mL/sa	10 cm
PCL-Kit5	22 kV	0,3 mL/sa	13 cm
PCL-Kit10	22 kV	0,3 mL/sa	10 cm
PCL-Kit20	24 kV	0,2 mL/sa	10 cm

Çizelge 4.1'de belirtilen parametreler ile elde edilen nanofibröz matrislerin morfolojik incelemesi için SEM analizi yapılmıştır. Taramalı elektron mikroskopu görüntüleri, sonrasında ImageJ (NIH, A.B.D.) programına aktarılarak elde edilen nanofiberlerin ortalama çap ve çap dağılımları belirlenmiştir. Elde edilen nanofiberlerin ortalama fiber çapları PCL grubu için  $116 \pm 22$  nm, PCL-Kit5 grubu için  $93 \pm 18$  nm, PCL-Kit10 grubu için  $141 \pm 30$  nm ve PCL-Kit20 grubu için ise  $170 \pm 37$  nm olarak ölçülmüştür. Bu gruplara ait SEM görüntüleri ile fiber çap dağılım histogramları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4). Tüm örnek grupları için boncuksuz yapıda ve düzgün morfolojide nanofiberlerin üretilebildiği şekilde görülmektedir.



**Şekil 4.4.** (a) PCL, (b) PCL-Kit5, (c) PCL-Kit10 ve (d) PCL-Kit20 nanofibröz matrislerin düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları.

Schueren ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada farklı oranlardaki PCL/Kit çözeltilerinden geleneksel elektroğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberler incelenmiştir. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) çözeltisine kitosan eklenmesi ile nanofiberlerin anlamlı derecede incelendiği bildirilmiştir. Bu durumun temel sebebi, kitosanın polikasyonik yapısı ve PCL çözeltisine eklendiğinde çözeltinin iletkenliğini anlamlı

derecede artırması olarak açıklanmıştır. Polimer jetindeki elektriksel yük miktarının artması sebebiyle polimer jeti elektroğirme sırasında daha yüksek kuvvetlere maruz kalmakta ve böylece daha ince nanofiberler elde edilmektedir. Çalışmada ayrıca, PCL oranı sabit tutulduğunda artan kitosan oranı ile nanofiberlerin kalınlığında artış gözlemlendiği de bildirilmiştir. Nanofiber çapındaki bu artış, çözeltiye daha fazla kitosan eklendiğinde viskozitedeki artışa bağlanmıştır. Viskozitedeki artış, jetin daha yüksek bir dirence sahip olmasına ve polimer jetinin daha hızlı katılaşmasına neden olacağından daha kalın fiber eldesine yol açmaktadır. Son olarak PCL/kitosan çözeltilerinde artan kitosan oranları ile nanofibröz matrislerde ağsı daha ince nanofiber yapıların oluştuğu da görülmüş ve bu durumun literatürdeki diğer kitosan çalışmaları ile de benzerlik gösterdiği bildirilmiştir [123].

Elektroğirmede kullanılan en uygun parametreler incelendiğinde kitosan oranı arttıkça voltaj değerinde artış ve akış hızında azalma olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) ile PCL-Kit5 grupları karşılaştırıldığında, çözeltiye kitosan eklenmesi ile nanofiber çaplarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. PCL-Kit5, PCL-Kit10 ve PCL-Kit20 grupları karşılaştırıldığında ise artan kitosan oranı ile nanofiber çaplarında da artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca artan kitosan oranı ile nanofibröz matrislerde ağsı ince fiber yapıların da oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.4d). Genel olarak, tez çalışması kapsamında elde edilen bu sonuçlar Schueren ve ark. tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir[123].

Elektroğirme sırasında PCL-Kit5 grubu için düzenli jet oluşumunun gerçekleşmediği ve şırınga ucundan çözeltinin aralıklarla damla damla aktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, PCL-Kit20 grubunda çözelti viskozitesinin yüksek olması sebebiyle şırınga ucunda tıkanıklıkların oluştuğu, düzenli jet oluşumunun gerçekleşmediği belirlenmiştir. PCL-Kit5 ve PCL-Kit20 gruplarında gözlenen bu problemler, PCL-Kit5 grubunun viskozitesinin düşük olması ve PCL-Kit20 grubunun ise viskozitesinin yüksek olması ile açıklanabilir. Artan kitosan oranı ile viskozitenin artış göstermesi beklenen bir sonuçtur.

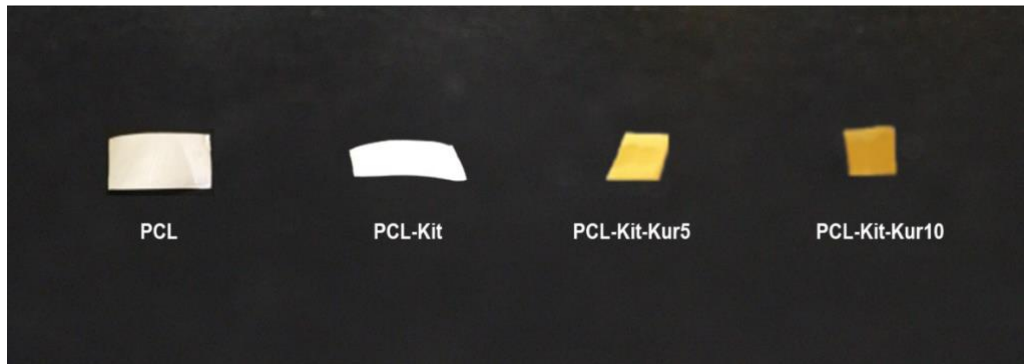
PCL-Kit5 ve PCL-Kit20 gruplarının üretiminde yaşanan bu güçlüklerden dolayı çalışmadan bu grupların çıkarılmasına ve çalışmalara PCL-Kit10 grubu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Tezin bu noktasından sonra Kit10 grubu yalnızca Kit olarak kısaltılmıştır.

Kurkumin yüklü nanofibröz matrislerin üretimi için PCL-Kit çözeltisine kütlece toplam polimer kütlesinin %5 (PCL-Kit-Kur5) ve %10'u (PCL-Kit-Kur10) olacak şekilde kurkumin eklenmiş ve bu çözeltiler manyetik karıştırıcıda 1 gece karıştırılmıştır. Elektroğirme parametreleri değiştirilerek kurkumin yüklü 2B nanofibröz matrisler üretilmiştir. PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için en uygun elektroğirme parametreleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kurkumin yüklü 2B nanofibröz matrisler için en uygun elektroğirme parametreleri.

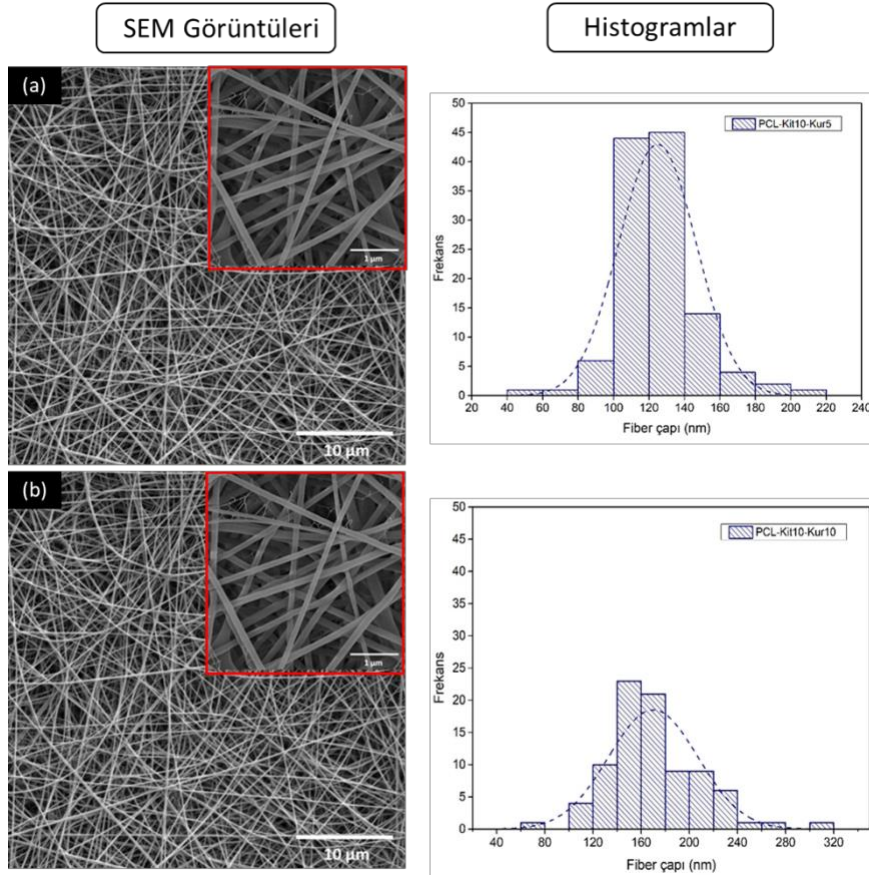
Gruplar	Voltaj	Akış Hızı	Uzaklık
PCL-Kit-Kur5	22 kV	0,3 mL/sa	10 cm
PCL-Kit-Kur10	23 kV	0,3 mL/sa	10 cm

Çizelge 4.2'de verilen parametreler ile elde edilen nanofibröz matrislerin makroskopik görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Ayrıca PCL, PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 2B nanofibröz matrislerin morfolojik incelemelerine ait SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Boncuksuz ve düzgün morfolojide elde edilen nanofiberlerin ortalama fiber çapları PCL-Kit-Kur5 grubu için  $125 \pm 22$  nm ve PCL-Kit-Kur10 grubu içinse  $170 \pm 37$  nm olarak hesaplanmıştır. SEM görüntüleri üzerinden ölçülen gözenek çapları PCL grubu için  $465 \pm 113$  nm, PCL-Kit grubu için  $433 \pm 99$  nm, PCL-Kit-Kur5 grubu için  $403 \pm 110$  nm, PCL-Kit-Kur10 grubu içinse  $456 \pm 89$  nm olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, tüm örnek grupları için belirlenen elektroğirme parametreleriyle 2B nanofibröz matrislerin başarılı bir şekilde üretilbildiği gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** İki boyutlu üretim sonucunda oluşan nanofibröz matrislerin makroskopik görüntüleri.





**Şekil 4.6.** (a) PCL-Kit-Kur5 ve (b) PCL-Kit-Kur10 nanofiber yapılarının düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları.

## 4.2. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

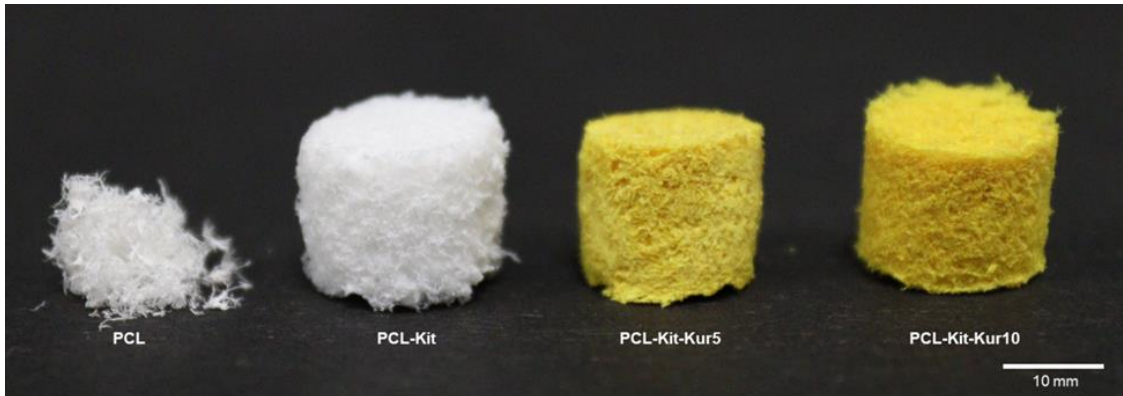
### 4.2.1. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinin Morfolojik İncelemeleri

Tez çalışmasında kullanılan üretim yöntemlerine benzer yöntemlerle ilgili detaylı bir literatür taraması yapılmış ve gerçekleştirilen çalışmalar aşağıdaki paragraflarda detaylandırılmıştır.

Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, elektroegirme ile üretilen jelatin/polilaktik asit (jelatin/PLA) nanofiber matlardan t-bütanol içerisinde homojenizatör kullanılarak dispersiyonlar elde edilmiş ve dondurarak kurutma işlemi sonrasında doğal ECM yapısına benzer bir 3B nanofibröz doku iskelesi üretilmiştir. Üretilen doku iskelesinin yüksek gözenekliliği ve nanofiber ağ yapısı SEM ile görüntülenmiştir. Ayrıca, üretilen 3B yapı 2B jelatin/PLA nanofibröz matrisler ile karşılaştırıldığında, su absorpsiyonu ve mekanik özellikler açısından çok daha üstün özellikler göstermiştir [71].

Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise ECM yapısına benzerliği yüksek elektroğirilmiş nanofiberlerden oluşan 3B doku iskeleleri üretilmiştir. Geleneksel elektroğirme yöntemi ile jelatin/PLA çözeltisinden üretilen nanofiberler küçük parçalara bölünmüş ve yüksek hızda t-bütanol çözeltisi içerisinde santrifüj edilmiştir. Elde edilen nanofiber dispersiyonu kalıplara dökülerek dondurarak kurutma yapılmış ve sonrasında ısı ile çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. İnsan umblikal ven endotel (HUVEC) hücre hattı ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, 3B yapıların 2B matlara göre hücre çoğalmasını, göçünü ve damarlanmayı artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca 3B yapıların anjiyogenezi ve kollajen/keratin birikimini hızlandırdığı da belirlenmiştir [124].

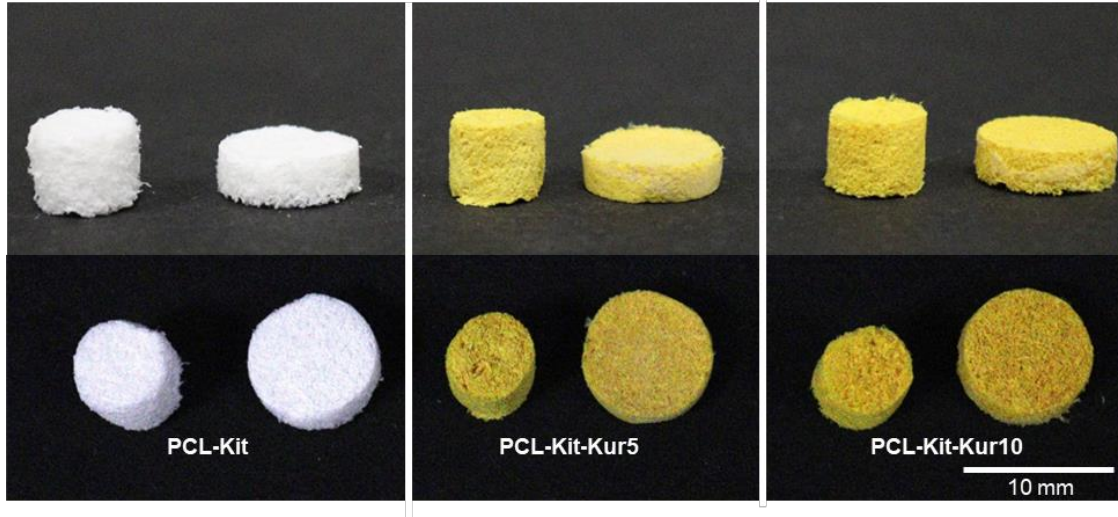
Ye ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kemik doku mühendisliği alanında kullanılmak üzere nano-Hap/PLLA/jelatin çözeltisinden elektroğirme ile nanofiberler elde edilmiştir. Sonrasında t-bütanol çözeltisi içerisinde homojenizasyon ile dispersiyonlar elde edilmiş ve dondurarak kurutma ile 3B nanofibröz doku iskeleleri hazırlanmıştır. Elde edilen 3B yapılara ısıl ve kimyasal işlemler uygulanarak çapraz bağlama yapılmıştır. Bu 3B doku iskelelerine polidopamin yardımı ile kemik morfogenetik protein-2 kaynaklı peptitler immobilize edilmiştir. Geliştirilen 3B nanofibröz doku iskelesinin *in vitro* ve *in vivo* deneylerle kemik rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir [125].



**Şekil 4.7.** Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin görüntüleri.

Tez çalışması kapsamında yukarıda belirtilen literatür örnek alınarak, PCL, PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için üretilen 2B nanofibröz matrislerden dispersiyon şekillendirme yöntemi ile 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri üretilmiştir. Üretim sonucu elde edilen yara örtü malzemelerine ait görüntüler Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere PCL grubunun 3B üretim sonrasında yapı bütünlüğünü sağlayamadığı görülmüştür. Bu sebeple PCL grubu çalışmadan çıkarılmıştır. PCL-Kit,

PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarında dispersiyon şekillendirme sonrasında 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin başarıyla üretilebildiği görülmektedir. Kullanılan yöntem ile farklı kalıplar kullanılarak uygulamaya göre istenilen çapta, yükseklikte ve geometride malzemeler de kolaylıkla üretilebilmektedir (Şekil 4.8). İstenilen boyutlarda 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin üretilebilmesi özellikle yara örtü malzemesi uygulamaları için büyük bir avantaj sağlamaktadır.

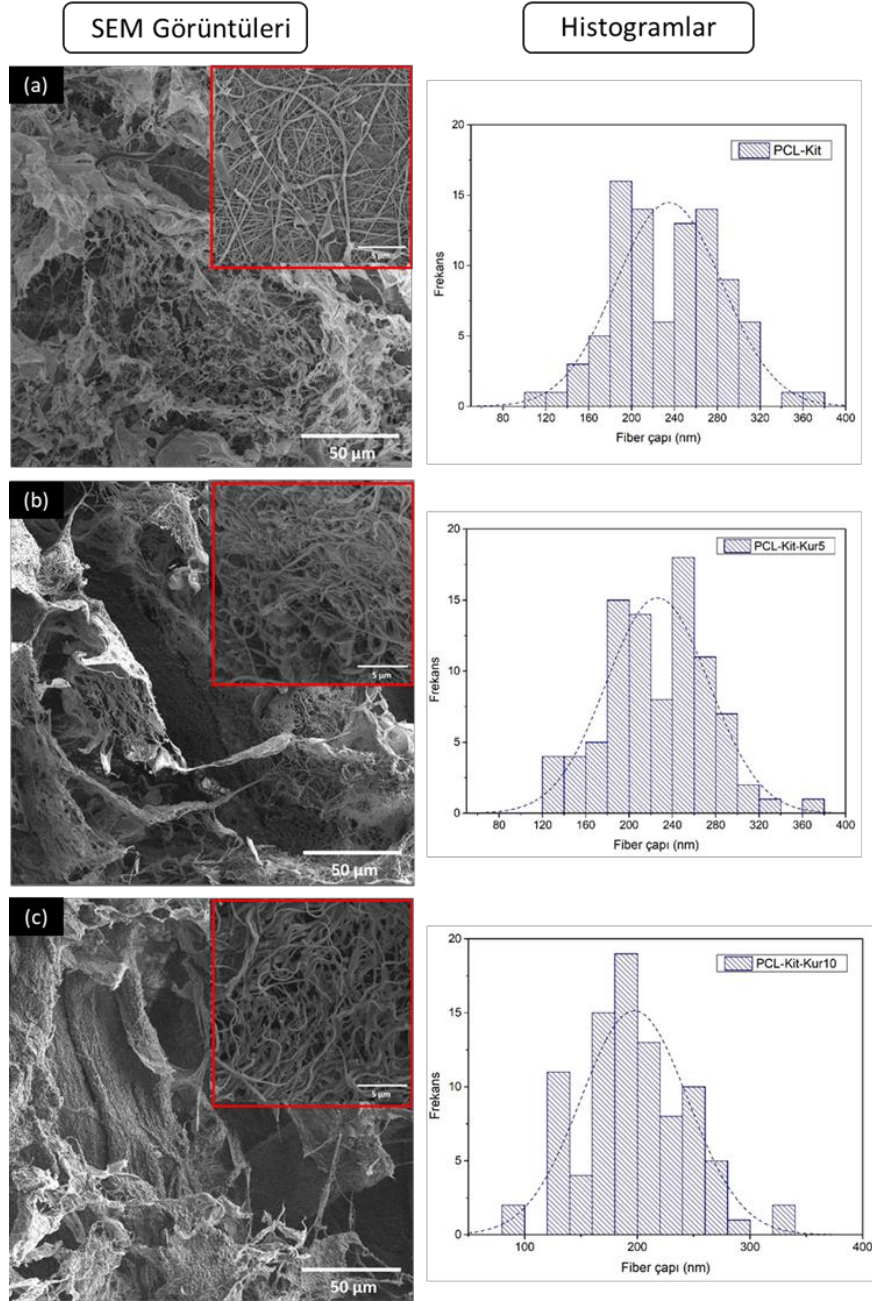


**Şekil 4.8.** Farklı çapta ve yükseklikte üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin görüntüleri.

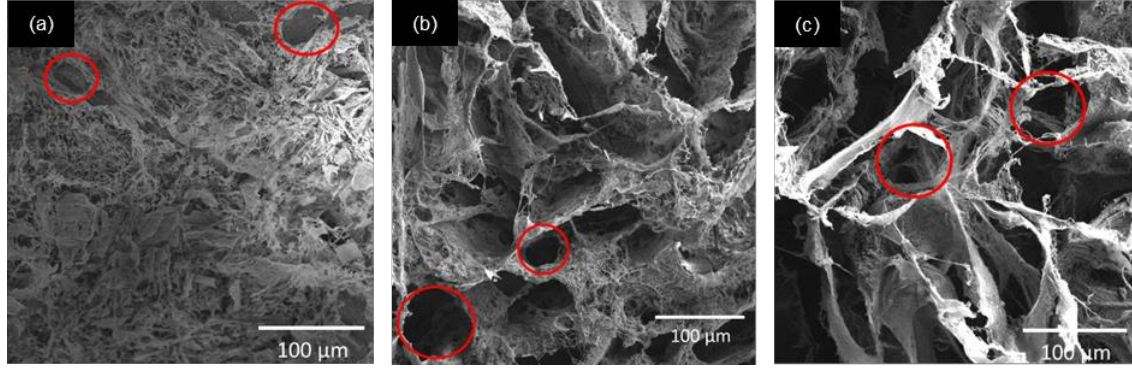
PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5, PCL-Kit-Kur10 grupları için 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin morfolojik incelemelerine ait SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları Şekil 4.9’da verilmiştir. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin ortalama fiber çapları PCL-Kit grubu için  $235 \pm 50$  nm, PCL-Kit-Kur5 grubu için  $226 \pm 47$  nm ve PCL-Kit-Kur10 grubu için  $197 \pm 47$  nm olarak hesaplanmıştır. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5, PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin düşük büyütmelelerdeki SEM görüntüleri de Şekil 4.10’da verilmiştir. Bu görüntüler üzerinden ölçülen gözenek çapları PCL-Kit grubu için  $16,2 \pm 4,6$   $\mu$ m, PCL-Kit-Kur5 grubu için  $33,0 \pm 11,7$   $\mu$ m, PCL-Kit-Kur10 grubu için  $32,0 \pm 9,9$   $\mu$ m olarak hesaplanmıştır.

Yara örtü malzemesi olarak kullanılacak ürünlerin, hücrelerin gelişimi için uygun bir ortam sunmaları önemlidir. Nanofiberlerin HDM’nin yapısı ile benzerlikleri ve bu benzerliğin yara örtü malzemeleri için avantajları Bölüm 2.4.8’de detaylı olarak anlatılmıştır. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinde, makrogözenekli bir yapı oluşturularak HDM’nin yapısının 2B nanofibröz matrislere göre daha iyi taklit edilmesi hedeflenmektedir. Ortalama bir hücre çapı 5-20  $\mu$ m arasında olduğu için, 2B yapılarıdaki

düşük gözenek çapları hücre göçünü büyük oranda engellemektedir. Üç boyutlu yapılarda ise makro-gözeneklilik sayesinde hücre göçü artırılarak yara iyileşme sürecinin hızlandırılması hedeflenmektedir. Üç boyutlu doku iskeleleri hücre dışı matrisin yapısını daha iyi taklit edebilmelerinden dolayı 2B nanofibröz matrislere göre hücre göçünü ve hayatta kalımını daha iyi desteklemektedir. [55, 68].



**Şekil 4.9.** (a) PCL-Kit, (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin düşük/yüksek büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım histogramları.



**Şekil 4.10.** (a) PCL-Kit (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine ait düşük büyütmeledeki SEM görüntüleri.

**Çizelge 4.3.** 2B nanofibröz matrisler ile 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine ait gözenek çapları.

Gruplar	2B	3B
PCL-Kit	433 ± 99 nm	16,2 ± 4,6 μm
PCL-Kit-Kur5	403 ± 110 nm	33,0 ± 11,7 μm
PCL-Kit-Kur10	456 ± 89 nm	32,0 ± 9,9 μm

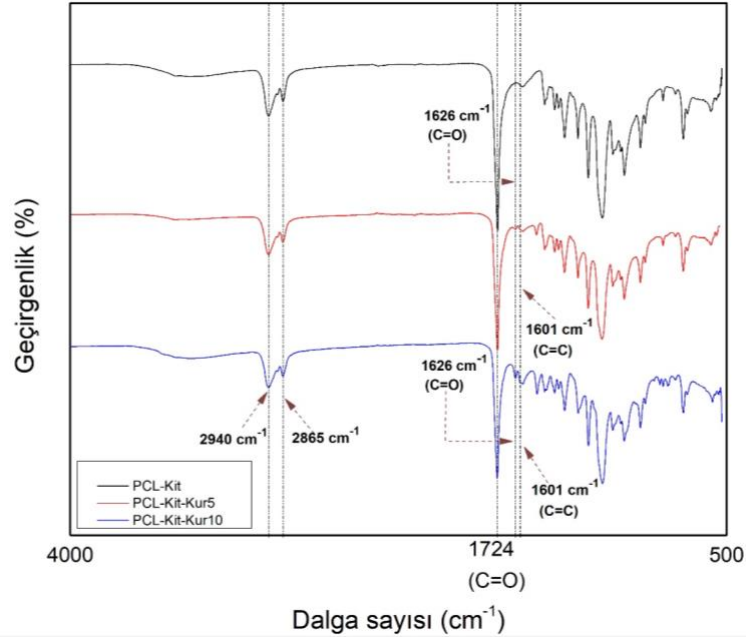
PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için 2B nanofibröz matrisler ile 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenek çapları Çizelge 4.3'te karşılaştırılmıştır. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenek çapları 2B nanofibröz matrislere göre büyük oranda (yaklaşık 35-90 kat) artırılabilmiştir. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenek çapları incelendiğinde kurkumin içeren grupların daha yüksek gözenekliliğe sahip oldukları da görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinde makrogözenekliliğin başarılı bir şekilde oluşturulduğu görülmektedir.

#### 4.2.2. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin kimyasal yapıları FTIR analizi ile incelenmiştir. FTIR analizi 525-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında yapılmıştır. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait FTIR analizlerinin sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir. Grupların kimyasal yapıları birbirleri ile benzer oldukları için FTIR analiz sonuçları gruplar arasında büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Analiz sonuçlarında önemli görülen karakteristik pik noktaları spektrumlar üzerinde kesikli çizgi ile belirtilmiştir. 1724  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen bant, PCL yapısındaki C=O karbonil

grubundaki gerilme ile;  $2940\text{ cm}^{-1}$ 'de ve  $2865\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bantlar ise yine PCL yapısındaki asimetrik ve simetrik  $\text{CH}_2$  bağlarındaki gerilmelere aittir. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)'a ilişkin bu bantlar literatürdeki bulgular ile uyumludur [126].



**Şekil 4.11.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait FTIR spektrumları.

PCL-Kit ile PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının FTIR analizlerindeki farklılıklar incelendiğinde özellikle  $1601\text{ cm}^{-1}$  ve  $1626\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bantlar dikkat çekmektedir. Literatürde, bu bantlar serbest kurkumin yapısında bulunan  $\text{C}=\text{O}$  titreşimi ve  $\text{C}=\text{C}$  aromatik gerilmesi ile ilişkilendirilmiştir [127]. Kurkumin oranı arttıkça bu bantların daha belirgin hale gelmesi de bu değerlerin kurkumin ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu sonuçlar, 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine kurkuminin başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermektedir.

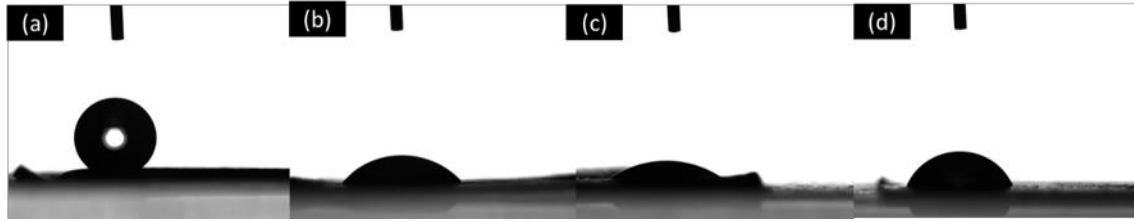
#### 4.2.3. Su Temas Açısı Ölçümü

Islatılabilirlik; hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi faktörleri doğrudan etkilediği için yara örtü malzemelerinin değerlendirilmesinde kullanılan önemli kriterlerden biridir [128]. Yüzey hidrofilitesi veya ıslatılabilirlik, protein adsorpsiyonu yoluyla hücre davranışını kontrol etmek için de etkili kriterler arasındadır [35]. Su temas açısı ölçümü, bir katı yüzeyin bir sıvı tarafından ıslatılabilirliğini ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemdir [35]. Düşük temas açısı değerleri sıvının yüzeyde iyi yayıldığını, yüksek temas açısı değerleri ise zayıf yayıldığını gösterir.

**Çizelge 4.4.** İki boyutlu nanofibröz matrislerin su temas açısı ölçüm değerleri.

Gruplar	Su Temas Açısı (°)
PCL	143 ± 3
PCL-Kit	54 ± 7
PCL-Kit-Kur5	51 ± 14
PCL-Kit-Kur10	57 ± 9

Tez çalışması kapsamında yapılan su temas açısı ölçümleri ile PCL, PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının hidrofilitesi belirlenmiştir. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarında birinci dakikanın sonunda su temas açısının 0° olduğu gözlemlenmiştir. Tüm gruplara ait 10. saniyedeki su temas açısı ölçüm sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir, ayrıca tüm grupların 10. saniyedeki su temas açısı görüntüleri de Şekil 4.12'de verilmiştir.



**Şekil 4.12.** (a) PCL, (b) PCL-Kit, (c) PCL-Kit-Kur5 ve (d) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 10. saniyedeki su temas açısı görüntüleri.

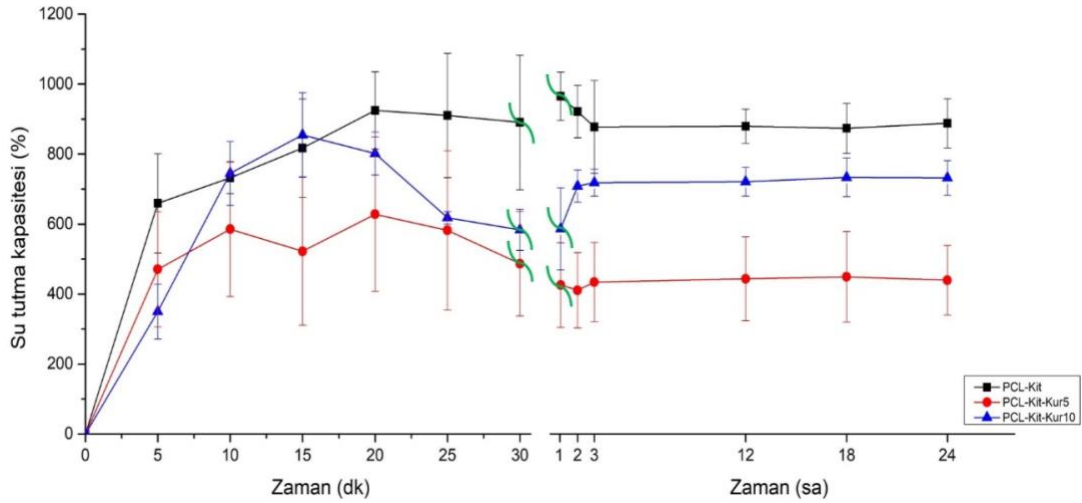
Gruplar arasında en yüksek hidrofobik davranışı PCL ( $143^\circ \pm 3^\circ$ ) göstermiştir; bu durum PCL'nin hidrofobik bir yapıya sahip olması ile açıklanabilir [129]. Yapısında bulunan -OH ve -NH<sub>2</sub> grupları sebebiyle hidrofilik bir karakteristiğe sahip olan kitosanın yapıya eklenmesiyle PCL-Kit ( $54^\circ \pm 7^\circ$ ) grubunda su temas açısı büyük oranda azalmıştır. PCL-Kit-Kur5 ( $51^\circ \pm 14^\circ$ ) ve PCL-Kit-Kur10 ( $57^\circ \pm 9^\circ$ ) gruplarının da PCL-Kit grubu ile benzer seviyelerde hidrofilik karaktere sahip oldukları görülmüştür. Sadeghi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, PCL ile PCL-Kit gruplarının su temas açıları da tez çalışması ile benzer şekilde sırasıyla ( $123^\circ \pm 2^\circ$ ) ve ( $41,4^\circ \pm 3,5^\circ$ ) olarak ölçülmüştür [130].

Doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan PCL'nin, hidrofobik bir yapıya sahip olması biyolojik uygulamalarda kullanılmasını engelleyen faktörlerin

başında gelmektedir [126]. Özellikle yara örtü malzemelerinde kullanılacak olan materyallerin hidrofilik bir yapıya sahip olmaları önemlidir. Su temas açısı ölçüm sonuçlarında görüldüğü üzere, PCL yapısına kitosan eklenmesi ile elde edilen malzemenin hidrofilik özellikleri başarılı bir şekilde artırılmıştır.

#### 4.2.4. Su Alım Kapasitesi

Yara çevresinde yüksek eksüda birikmesi, bakterilerin çoğalması için uygun bir ortam oluşmasına ve yaraların enfekte olmasına sebep olabileceğinden; iyi bir yara örtü malzemesinin eksüda emme kapasitesinin yüksek olması gerekmektedir. Ayrıca düşük eksüda emme kapasitesine sahip bir yara örtü malzemesi; yaranın sıvı kaybetmesine ve yara iyileşmesi için oldukça önemli olan besin ve oksijen kaybına da sebep olabilir [131].



Şekil 4.13. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait su tutma kapasitesi.

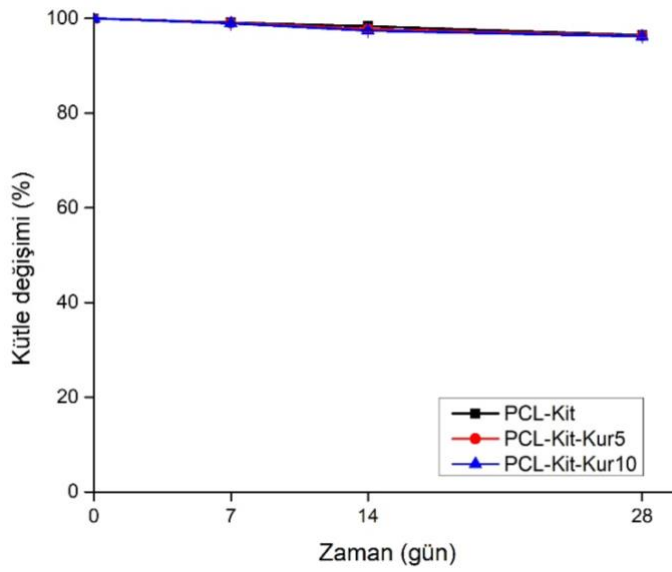
Su alım kapasitesi testi, yara örtü malzemelerinin eksüda emme kapasitelerini tespit etmek için uygun bir yöntemdir. Örnek gruplarına ait su tutma kapasitesi sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin denge durumundaki su alım kapasiteleri sırasıyla ~%890, ~%440 ve ~%730 olarak bulunmuştur. Tüm gruplarda ilk 1 saat içerisinde denge durumuna ulaşıldığı görülmektedir. Tüm grupların makrogözenekli ve hidrofilik yapısından dolayı yüksek su tutma kapasitesine sahip oldukları görülmektedir.

#### 4.2.5. *In Vitro* Biyobozunurluk Testi

Yara iyileşmesi sürecinde, örtü malzemesinin bozunma hızı ile doku oluşumu arasındaki denge, yapısal bütünlüğün korunması ve örtü malzemesinin oluşan yeni dokuya kılavuzluk yapması için önemlidir [132]. *In vitro* biyobozunurluk testi için PCL-Kit,



PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları karşılaştırılmıştır ve 28 gün boyunca yapılan ölçümlerde tüm gruplar için ~%3-4 arasında kütle kayıpları gerçekleşmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile de paralellik göstermektedir. Örneğin, Fahimirad ve ark. tarafından yapılan çalışmada, PCL-Kit ile PCL-Kit-Kur grupları 25 gün boyunca PBS ortamında bekletilmiştir. Yirmi beş günün sonunda iki grubunun da yaklaşık %3-3,5 kütle kaybına uğradığı, PCL-Kit-Kur grubunun bir miktar daha yüksek biyobozunurluk hızına sahip olduğu ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadığı belirtilmiştir [10].



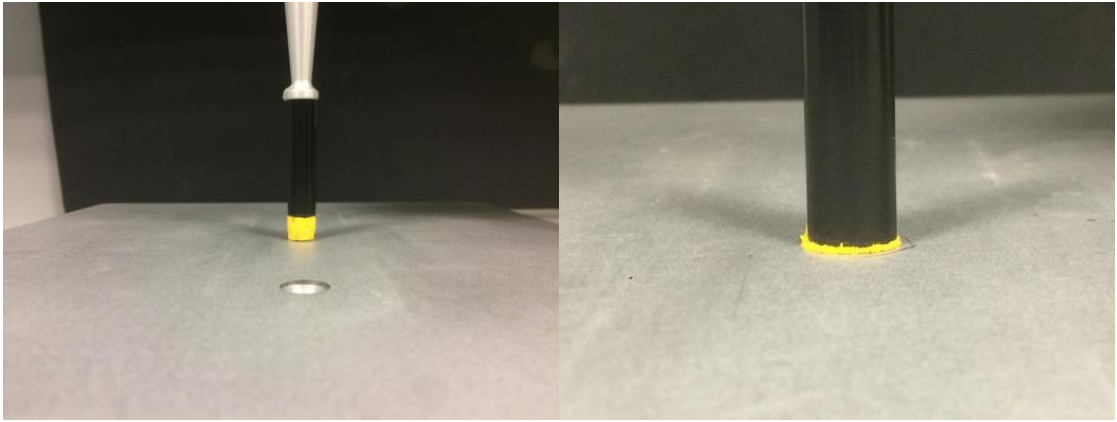
**Şekil 4.14.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait biyobozunurluk grafiği.

#### 4.2.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

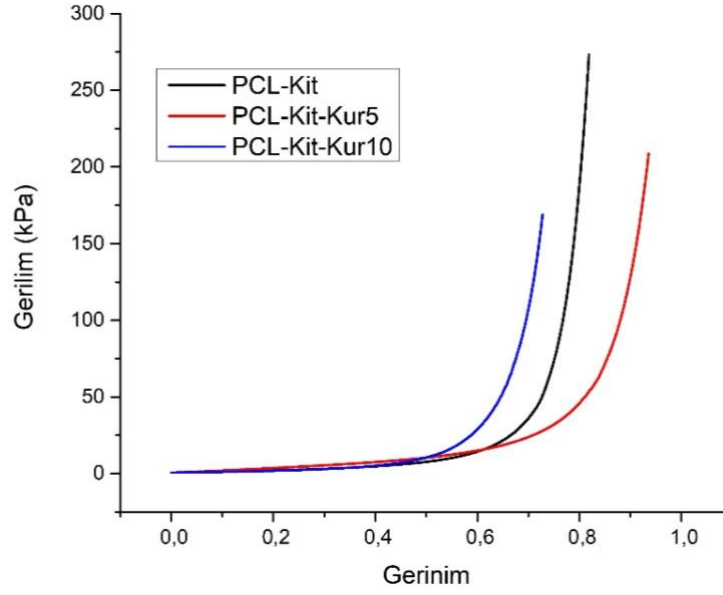
PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının mekanik analizlerine ait görüntüleri ve bu grupların gerilim-gerinim eğrileri Şekil 4.15 ve 4.16'da gösterilmiştir. Bu gruplar için elastik modülü sırasıyla  $7,6 \pm 1,2$  kPa,  $15,8 \pm 1,5$  kPa ve  $6,6 \pm 0,3$  kPa olarak hesaplanmıştır.

Üç boyutlu nanofiber doku iskelelerinin yara örtü malzemesi olarak kullanılabilmesi için yeterli mekanik özelliklere sahip olması gerekir. Üç boyutlu elektroçirime yöntemleri ile elde edilen yapılar genel olarak zayıf mekanik özelliklere sahip pamuk benzeri yapılardır. Dispersiyon şekillendirme yöntemiyle dondurarak kurutma ve çapraz bağlama adımları sonrası mekanik olarak dayanıklı yapıların üretimi ana hedeflerden biridir [71]. Literatürdeki benzer içerikli 2B yapılar ile karşılaştırıldığında üretilen 3B yapıların mekanik olarak daha dayanıksız oldukları görülmektedir [10, 133]. Bu durum, 3B

nanofibröz matrislerin makrogözenekli yapıları sebebiyle fiberlerin daha sık istiflendiği 2B nanofibröz matrislere göre düşük yoğunluklarından kaynaklanmaktadır. Si ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada poliakrilonitril/SiO<sub>2</sub> nanofiber dispersiyonlarının dondurarak kurutulması ile nanofiber aerogelleri elde edilmiş ve bu malzemelerin mekanik analizleri yapılmıştır. Yapılan basma testleri sonucunda elastik modülü başlangıçta ~21 kPa olarak, 1000 döngü sonrasında da ~16 kPa olarak bildirilmiştir [59]. Chen ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise jelatin/PLA nanofiberlerden tert-bütanol içerisinde homojenizatör kullanılarak dispersiyonlar elde edilmiş ve bu dispersiyonlardan dondurarak kurutma ile 3B nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Yapılan çalışmada ısıl çapraz bağlamanın mekanik özelliklere etkisi incelenmiş ve çapraz bağlama yapılmayan grupta elastik modülü 40 kPa olarak hesaplanırken çapraz bağlama yapılan gruplarda 50-120 kPa arasında değerler bildirilmiştir [134]. Bu tez çalışması kapsamında üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri, literatürde belirtilen değerler arasında bir elastik modülü değerine sahiptir. İlerleyen çalışmalarda ısıl çapraz bağlama ile geliştirdiğimiz bu malzemelerin mekanik dayanımlarının artırılacağı düşünülmektedir.



**Şekil 4.15.** Mekanik özelliklerin belirlenmesi için yapılan basma testine ait görüntü.



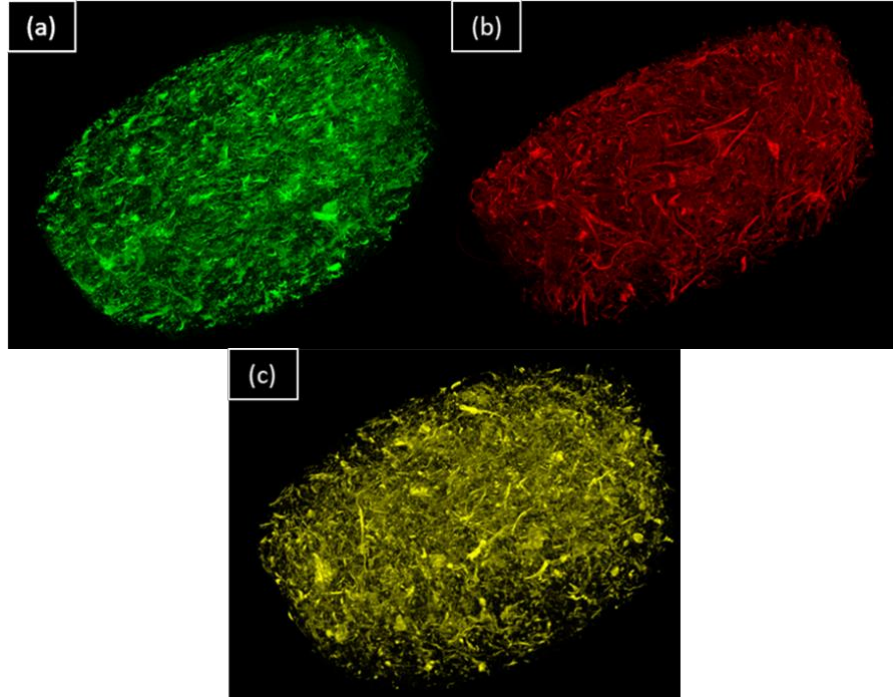
**Şekil 4.16.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait gerilim-gerinim eğrisi.

#### 4.2.7. Bilgisayarlı Tomografi ( $\mu$ -BT) Görüntülemesi

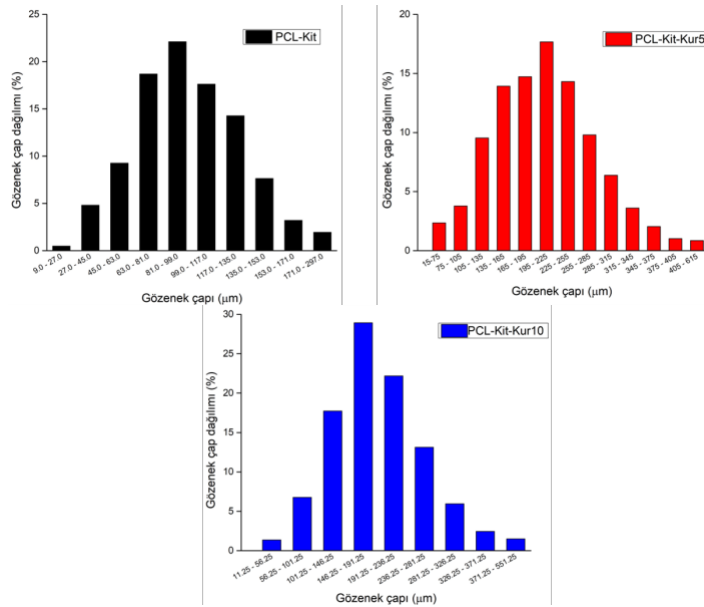
Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin yeni doku oluşumu etkinliğini artırmak için makrogözeneklerinin artırılması büyük önem taşımaktadır. Doku iskelelerinin makro ve mikro yapısı, hücre yapışmasını, göçünü ve proliferasyonunu önemli ölçüde etkilediği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir [135]. Hücre dışı matris yapısının 3B makro ve mikro mimarisi düşünüldüğünde, biyomalzeme yapısındaki makrogözenekler doğal HDM yapısını daha iyi taklit ederek hücre-hücre etkileşimlerinin malzeme derinliklerinde bile destekleyebilmektedir [103]. Makrogözenekliliğe sahip biyomalzemelerde hücre-matris ve hücre-hücre etkileşimlerinin çok daha etkin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [104, 135]. Literatürde, doku mühendisliği alanında, gözenek çapı 50  $\mu$ m'den büyük olan gözenekler, makrogözenek olarak sınıflandırılmıştır [136].

Üretilen PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenekliliğinin ve üç boyutlu yapılarının analizinde  $\mu$ -BT kullanılmıştır. Örneklerin liyofilizatörde kurutulması ve  $\mu$ -BT ile görüntülenmesi sonucunda 3B yapılarda nicel ölçümler yapılmış ve bu yapılar dijital olarak görselleştirilmiştir (Şekil 4.17). Bilgisayarlı tomografi analizleri sonucunda PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için toplam gözeneklilik sırasıyla %90, %91 ve %93 olarak hesaplanmıştır. Bu görüntüler detaylı incelendiğinde üretilen 3B yapılarda tüm gruplar için makrogözenekliliğin başarılı bir şekilde elde edildiği görülmektedir. Ayrıca

geleneksel elektroğirme ile üretilen yapılardaki sıkışık nanofiber düzeninin aksine, gözeneklerin ortogonal doğrultuda da devam ettiği görülmektedir.



**Şekil 4.17.** (a) PCL-Kit, (b) PCL-Kit-Kur5 ve (c) PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin  $\mu$ -BT görüntüleri.



**Şekil 4.18.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenek çap dağılım histogramları.

Şekil 4.18’de verilen gözenek çap histogramları incelendiğinde tüm gruplar için ortalama gözenek çaplarının 95  $\mu$ m’den büyük olduğu ve dondurarak-kurutma yöntemiyle

malzeme içerisinde makrogözeneklerin başarılı bir şekilde oluştuğu görülmektedir. PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarında gözenek çaplarının PCL-Kit grubuna göre daha yüksek olduğu da histogramlardan anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlar 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinde SEM analizi ile ölçülen gözenek çaplarının kurkumin içeren gruplarda daha yüksek bulunması ile de paralellik göstermektedir.

### 4.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemelerinde Kurkumin Salım Mekanizması

#### 4.3.1. Yüklenen Kurkumin Miktarının Belirlenmesi

Enkapsülasyon verimi, ilaç yüklü yara örtü malzemelerinde üretimin ilaç yükleme açısından ne kadar verimli olduğunu ölçen temel parametredir. Ayrıca, malzemelerden *in vitro* kurkumin salım mekanizmasının anlaşılması için de yara örtü malzemelerine yüklenen ilaç miktarının tespit edilmesi gereklidir.

**Çizelge 4.5.** Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinde enkapsülasyon verimliliği.

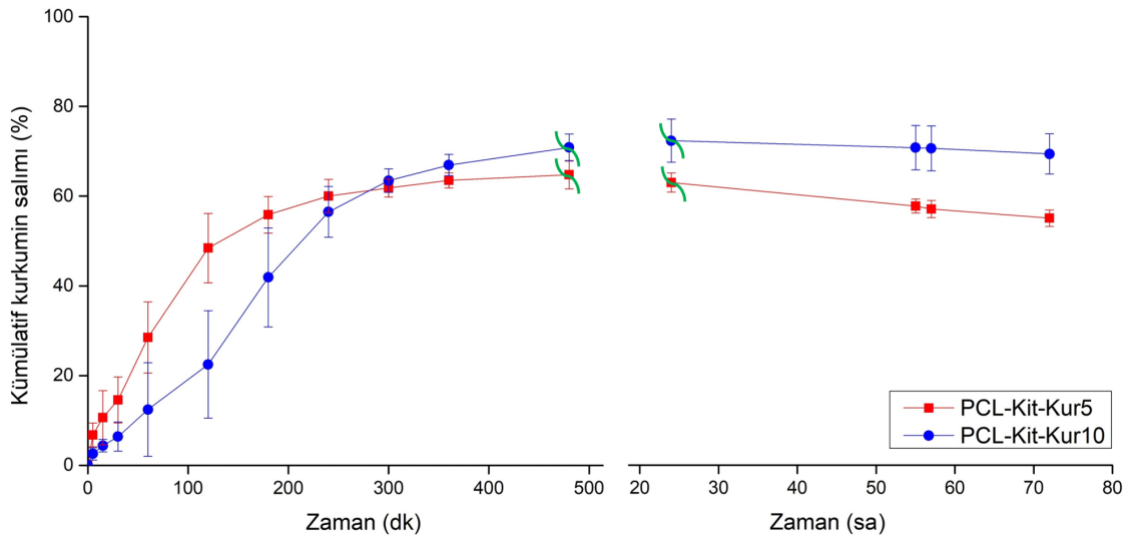
Gruplar	Enkapsülasyon Verimliliği (%)	İlaç Yükleme Kapasitesi (%)
PCL-Kit-Kur5	60,8 ± 2,5	3,0 ± 0,1
PCL-Kit-Kur10	72,5 ± 2,8	7,3 ± 0,3

Hazırlanan yara örtü malzemelerinden alınan 10 mg'lık örneklerin sonikasyonu ve santrifüjlenmesi sonrasında elde edilen çözeltilerin 425 nm'de UV spektrofotometre ile absorbans ölçümü sonrasında örneklere yüklenen kurkumin miktarları belirlenmiştir. Çözelti içerisindeki kurkumin miktarı belirlenirken Bölüm 3.5.1'de anlatılan yöntem ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Her grup için 3B nanofibröz matrislerden alınan üçer örnek ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için enkapsülasyon verimi (Eşitlik 3.4) ve ilaç yükleme kapasitesi (Eşitlik 3.5) hesaplanmıştır. PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için enkapsülasyon verimi sırasıyla %60,8 ve %72,5 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Bölüm 4.1.2'de de açıklandığı üzere, SEM görüntülerinden hesaplanan nanofiber çaplarına ve literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında, nanofiber çaplarının kurkumin eklenmesi ile arttığı görülmüştür. Eklenen kurkumin miktarına bağlı olarak artan nanofiber çaplarının, enkapsülasyon verimine de olumlu katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

#### 4.3.2. Kurkumin Salım Mekanizmasının Belirlenmesi

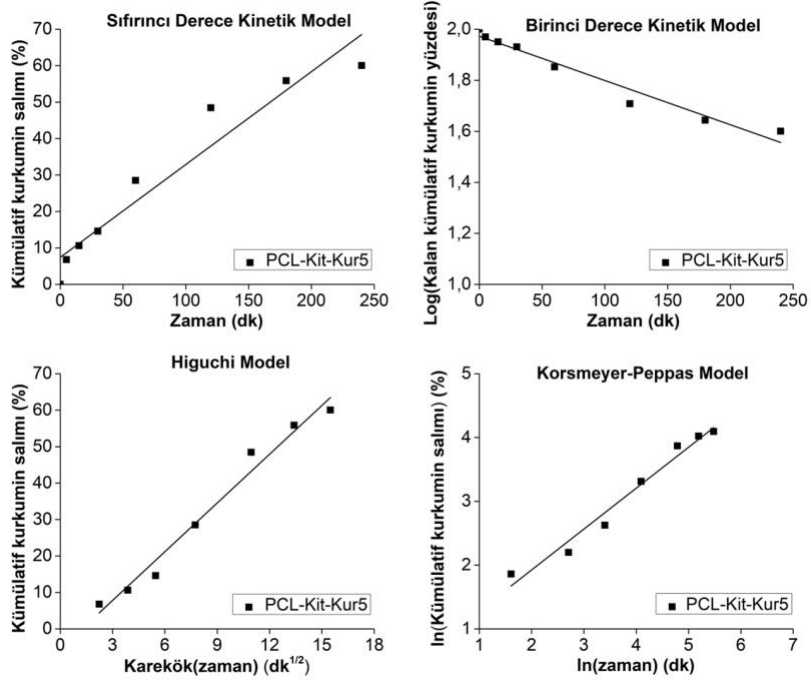
Biyoaktif ajanların yara örtü malzemelerinden kontrollü salımı ile daha etkin bir yara iyileşmesinin yanında etkilerinin uzun süreli olması ve hastanın gereğinden fazla ilaca maruz kalmaması da sağlanabilir [31]. Ayrıca, yüksek dozlarda toksik etkileri bulunan biyoaktif ajanların kontrollü salımı ile toksik etkileri azaltılabilir [73]. Özellikle uzun süreli tedavi gerektiren uygulamalarda kontrollü salımın önemi çok daha fazladır [31].

Nanofiberler, suda çözünen veya çözünmeyen çeşitli ilaçların ve biyoaktif proteinler gibi makromoleküllerin salımında yaygın olarak kullanılmaktadır [73]. İnce fiber yapıları, yüksek yüzey alanı ve yüksek gözeneklilikleri sayesinde; nanofiberler, ilaç partiküllerinin ortama verimli bir şekilde difüzyonunu sağlar. Bu özellikleri sayesinde nanofibröz matrisler çok çeşitli biyoaktif ajanların kontrollü salımı için uygun bir yapıya sahiptir [137].

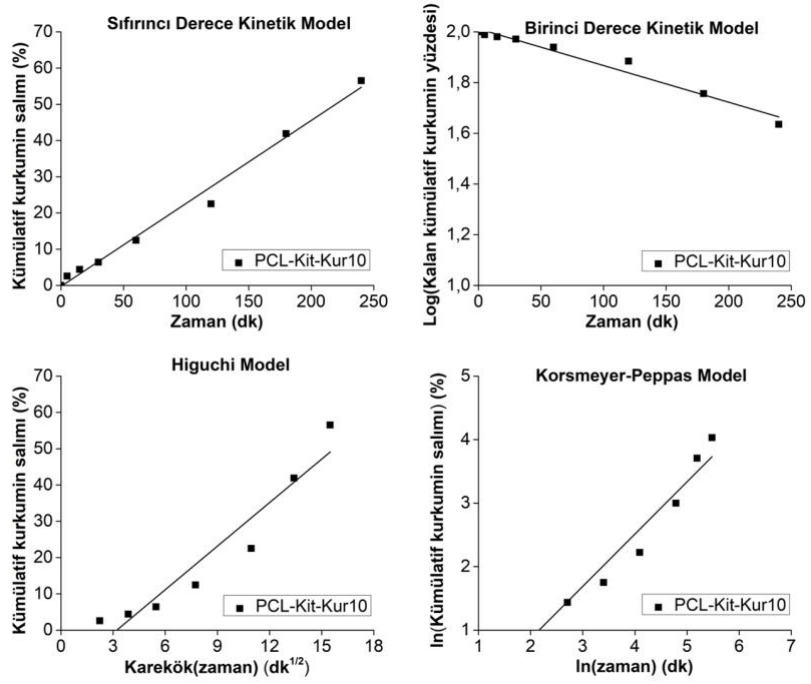


**Şekil 4.19.** PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için kümülatif kurkumin salım profilleri.

PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinden kümülatif kurkumin salım grafikleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Kurkumin salımları incelendiğinde iki grubun salım profillerinin birbirine benzer olduğu görülmektedir. PCL-Kit-Kur5'in ilk 3 saat boyunca PCL-Kit-Kur10'a göre daha hızlı ve yüksek oranda kurkumin saldığı (%55'e %45) ancak denge durumunda ulaşıldığında PCL-Kit-Kur10'un daha fazla kurkumin saldığı (%75'e %64) tespit edilmiştir. Denge durumundaki kümülatif kurkumin salım oranları PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için sırasıyla %64 ve %75 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. PCL-Kit-Kur5 grubu için kurkumün salım kinetiği modellerine ait grafikler.



Şekil 4.21. PCL-Kit-Kur10 grubu için kurkumün salım kinetiği modellerine ait grafikler.

Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinden kurkumün salım kinetiğini incelemek amacıyla, elde edilen kurkumün salım verileri sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine uygulanmıştır. PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için uygulanan kinetik modellerine grafikler sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de

verilmiştir. İki grup için elde edilen model parametreleri ( $k_0, k_1, k_H, k_P, n_P$ ) ve belirleme katsayısı ( $R^2$ ) değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları için kurkumin salım verilerinin kinetik modellere uygulanması ile elde edilen model parametreleri ve belirme katsayısı değerleri.

Gruplar	Sıfıncı Derece		Birinci Derece		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$k_0$	$R^2$	$k_1$	$R^2$	$k_H$	$R^2$	$k_P$	$n_P$	$R^2$
PCL-Kit-Kur5	0,2547	0,93	0,0017	0,96	<b>4,4561</b>	<b>0,98</b>	1,899	0,6411	0,97
PCL-Kit-Kur10	<b>0,2290</b>	<b>0,99</b>	0,0015	0,97	3,9995	0,92	0,4580	0,8232	0,95

Polimer matrislerden ilaç salım kinetiği; difüzyon, matris yapının yıkım hızı, yapının su alma hızı, yapının morfolojisi, faz değişimleri vb. gibi birçok parametreden etkilenen çok karmaşık bir süreçtir [138]. Salım kinetiği için kullanılan matematiksel modeller, ilaç salımı sırasında meydana gelen süreçlerin daha iyi anlaşılmasında ve ilaç dağılımının optimize edilmesinde kullanılmaktadır.

Sıfıncı derece kinetik model, salımın ilaç derişiminden bağımsız olarak yalnızca zamana bağılı bir şekilde salındığı temeline dayanır. Birinci derece kinetik model ise ilaç salımının derişimine bağılı olduğunu tanımlar. Higuchi modelinde ise matristeki ilk ilaç yoğunluğunun çok yüksek olduğu, ilaç difüzyonunun sadece bir boyutta gerçekleştiği, ilaç partiküllerinin sistem kalınlığından çok daha küçük olduğu, matris şişmesi ve çözünmesinin ihmal edilebilir olduğu ve ilaç difüzyonunun sabit olduğu varsayılmaktadır. Higuchi kinetik modeli esas olarak Fick yasasına dayanan difüzyon kontrollü ilaç salımını tanımlamak için kullanılmaktadır [139, 140].

Korsmeyer-Peppas modeli, Higuchi modelinden türetilen genelleştirilmiş bir formüldür ve ilaç salımı ile salım süresi arasında üstel bir ilişki olduğunu varsayar. Korsmeyer–Peppas modelinde salım üssü ( $n_P$ ) değeri salım mekanizmasını karakterize etmek için kullanılır [138]. Bu model, birden fazla salım mekanizmasının dahil olduğu ilaç salım kinetiklerini incelemek için faydalıdır. Modeldeki  $n_P$  değerinin 0,43’ten küçük olması ilaç salımının genel olarak Fickian difüzyonu mekanizması ile gerçekleştiğini, 0,43 ile 0,85 arasındaki değerler ise ilaç salımının Fickian olmayan (anormal) difüzyon mekanizması ile gerçekleştiğini göstermektedir [127].



$R^2$  değerleri incelendiğinde PCL-Kit-Kur5 için en yüksek korelasyon Higuchi kinetik modeli ile, PCL-Kit-Kur10 için ise en yüksek korelasyon sıfırncı derece kinetik model ile gerekleŖmiŖtir. Bu sonuçlar, PCL-Kit-Kur5'ten kurkumin salımının difüzyon kontrollü bir Ŗekilde gerekleŖtięini ancak PCL-Kit-Kur10 grubunda ise deriŖimden bağımsız olarak kurkuminin sadece zamana bağlı olarak salındığını göstermektedir.

#### 4.4.  Boyutlu Nanofibröz Yara rt Malzemelerinin Antibakteriyel Etkinliği

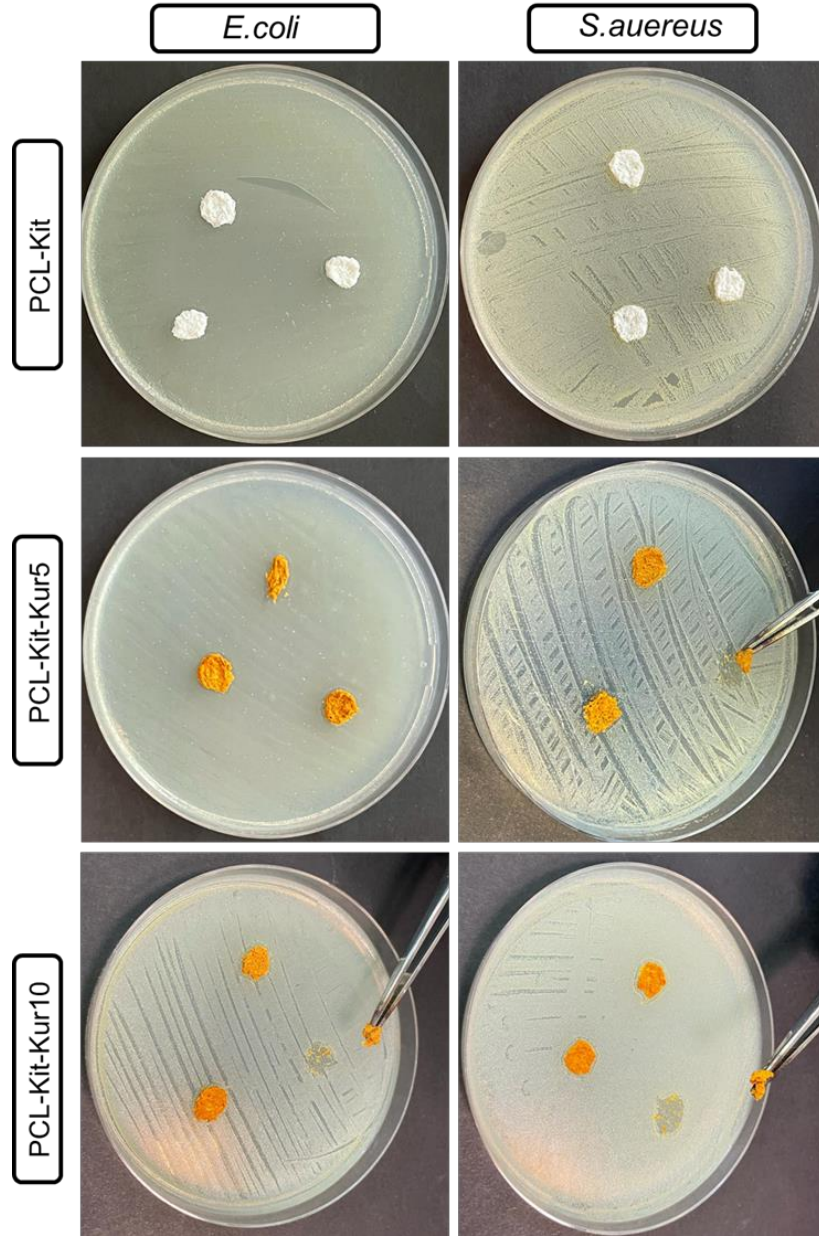
PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin antimikrobiyal etkileri *E.coli* ve *S.aureus* bakteri suŖları ile gerekleŖtirilen testler ile belirlenmiŖtir.

Katı ortamda antibakteriyel etkileri gözlemek için 8 mm çapında retilmiŖ olan 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri kullanılmıŖtır. Agar difüzyon yöntemi ile 24. saatin sonunda elde edilen inhibisyon zonu görüntüleri Ŗekil 4.22'de, inhibisyon zon çapları da izelge 4.7'de verilmiŖtir.

**Çizelge 4.7.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait agar difüzyon yöntemi ile 24. saatin sonunda elde edilen zon çapları (mm).

Gruplar	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
PCL-Kit	9,83 ± 0,29	10,67 ± 0,58
PCL-Kit-Kur5	8	10,5 ± 0,5
PCL-Kit-Kur10	8	8

Veriler incelendiğinde PCL-Kit-Kur10 grubunda *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri için, PCL-Kit-Kur5 grubunda ise yalnızca *E.coli* bakterileri için inhibisyon zonunun örneklerin altlarında kalan alanlarla sınırlı kaldığı grlmŖtir. Bu durumun sebebi olarak kurkuminin katı agar ortamında salımının dŖk olmasından kaynaklanabileceği dŖnlmektedir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, üretilen malzemeler için yüksek bir antibakteriyel etki gözlenmediği söylenebilir.



Şekil 4.22. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri için 24. saatteki inhibisyon zonları.

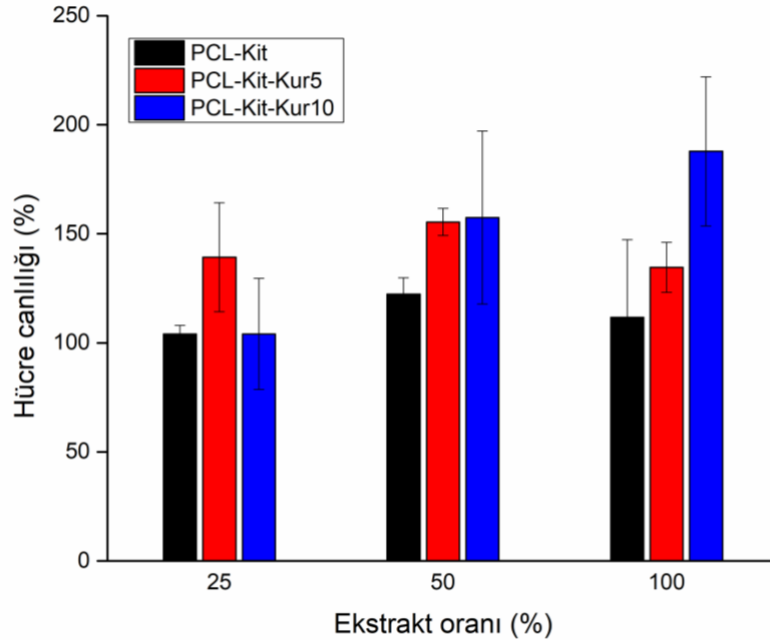
#### 4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

##### 4.5.1. Sitotoksosite Çalışmaları

###### 4.5.1.1. Hücre Canlılık Analizi – MTT Testi

Sitotoksosite çalışmalarında, PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının farklı dilüsyonlardaki ekstraktları ile muamele edilen fare fibroblast L929 hücrelerinin canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak üzerine herhangi bir ekstrakt eklenmemiş hücre grubu seçilmiştir. MTT testi sonucu elde edilen absorbans değerlerinin

kontrol grubuna göre karşılaştırması yapılarak üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Kontrol grubunun %100 canlılık gösterdiği varsayılmış ve farklı dilüsyonlardaki örneklerin hücre canlılığı kontrol grubuna göre oranlanmıştır. Elde edilen yüzde canlılık değerleri Şekil 4.23'te verilmiştir.



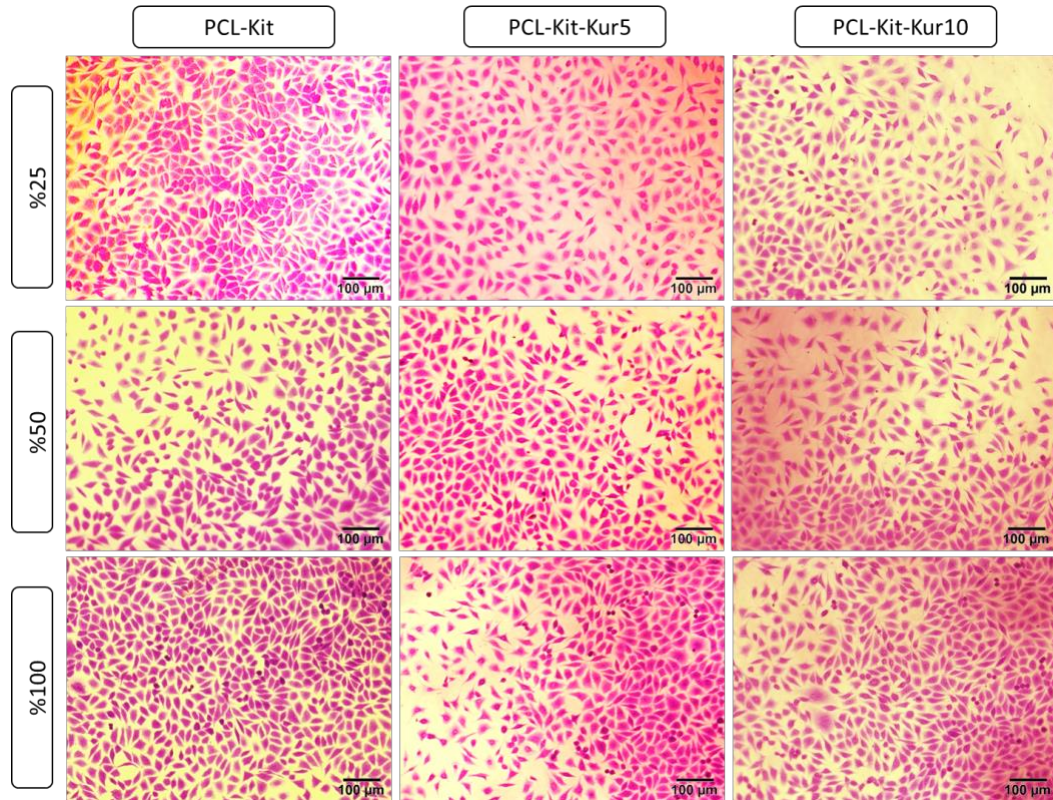
**Şekil 4.23.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait sitotoksosite testi sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları.

ISO 10993-5 standardına göre indirekt testlerde bir malzemenin sitotoksik etkisinin olduğunun göstergesi %70'in altındaki canlılık olarak belirtilmiştir [122]. Sitotoksosite sonuçlarına göre tüm gruplarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre %100'ün üzerinde bulunmuştur ve her bir farklı dilüsyon için hücre canlılığında benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.23). Her bir ekstrakt oranı için hücre canlılığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Merrell ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PCL nanofiberlere kurkumin yüklenmiş ve kurkuminin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada kurkumin yüklü tüm PCL gruplarında kurkumin yüklü olmayan PCL nanofiberlere kıyasla daha düşük hücre canlılığı gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca %3 ve %17 oranlarında kurkumin yüklenen gruplar karşılaştırılarak, artan kurkumin miktarı ile sitotoksitenin arttığı da gözlenmiştir [88]. Kurkuminin yüksek dozlarda hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediği ve kurkumin yüklü doku iskelelerinde kontrollü salımın gerçekleşmemesi halinde elde edilen iskelenin sitotoksik etkilere sahip olabileceği de literatürde belirtilmiştir [10]. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, tüm gruplar için, üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinde

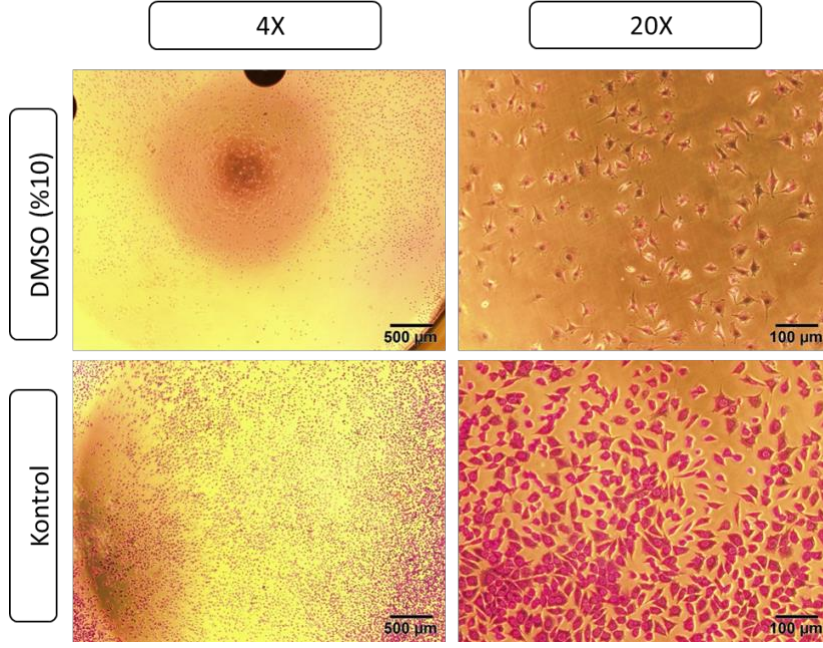
kullanılan kurkumin doz aralığının hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığını göstermektedir.

#### 4.5.1.2. Kristal Viyole Analizi

PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının %25, %50, %100 ekstraksiyonları ile kültüre edilen hücrelerin kristal viyole boyamaları Şekil 4.24'te verilmiştir. Deney kapsamında pozitif ve negatif kontrol gruplarına ait kristal viyole boyamaları da Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Hacimce %10 DMSO ile muamele edilen pozitif kontrol grubunda beklendiği şekilde ölüm oranının yüksek olduğu, hücrelerin yüzeyden ayrılarak küresel morfolojide kaldıkları görülmektedir. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarında hücre canlılığının tüm ekstrakt oranlarında taze kültür ortamıyla muamele edilmiş negatif kontrol grubuna benzer şekilde yüksek olduğu ve hücrelerin sağlıklı bir morfolojiye sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin hücreler üzerinde toksik etkilerinin bulunmadıkları sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile MTT sonuçları da paralellik göstermektedir.



**Şekil 4.24.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarının %25, %50, %100 oranda ekstraktlarıyla muamele edilen L929 hücrelerinin ışık mikroskobu ile alınan 20X büyütmedeki görüntüleri.



**Şekil 4.25.** Pozitif ve negatif kontrol grupları için L929 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki 4X ve 20X büyütmelelerdeki görüntüleri.

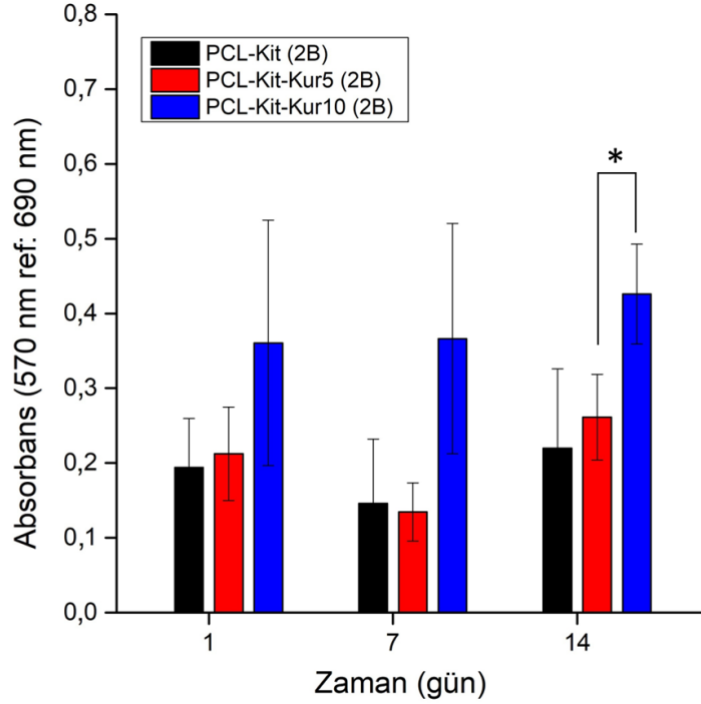
#### 4.5.2. İki Boyutlu Nanofibröz Matrislerle Hücre Kültürü Çalışmaları

PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 2B nanofibröz matrislerin hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen MTT analiz sonuçları ve SEM görüntüleri aşağıda verilmiştir.

##### 4.5.2.1. Hücre Proliferasyonu

Düşük ve yüksek derişimlerde kurkuminin hücre proliferasyonu ve hücre göçüne olan etkileri üzerine literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Mohammadi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kurkumin yüklü PCL/kitre sakızı doku iskelelerine fare embriyo fibroblast hücreleri ekilmiş ve hücre canlılığı ve morfolojileri MTT analizi ve SEM görüntülemesi ile incelenmiştir. Kurkumin içeren gruplarda hücre yapışmasının ve göçünün daha fazla olduğu ancak yüksek derişimde kurkumin (%5 kütle/hacim) içeren gruplarda proliferasyonun belirgin bir şekilde düşük olduğu belirtilmiştir [133]. Golchin ve ark. kurkumin yüklü PVA/kitosan nanofibröz doku iskelelerine bukkal yağ yastığı kökenli mezenkimal kök hücrelerini (BFP-MSK) ekerek 14 günlük süre boyunca kültüre etmiş ve 7. günden itibaren kurkumin içeren gruplarda, kontrol grubuna göre hücre canlılığının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [97]. Kim ve ark. ise farklı derişimlerdeki kurkuminin 3T3-L1 pre-adiposit (pre-adipocyte) hücrelerinin *in vitro* proliferasyon, göç ve apoptozu üzerine etkilerini incelemiş ve düşük derişimlerde (0,01 –

1  $\mu\text{M}$ ) kurkuminin hücre canlılığını artırıcı etkilerinin bulunduğunu ancak yüksek derişimlerde ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) hücre canlılığında azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, *in vitro* Transwell plakası ile hücre göçü deneylerinde kurkuminin hücre göçünü kontrol grubuna göre 2,5 kat artırdığı da gözlenmiştir [141].



**Şekil 4.26.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 2B nanofibröz matrislere ekilmiş hücrelerin 1., 7. ve 14. günlerdeki absorbans değerleri. Veriler, 3 örneğin ortalaması ve standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar ise şu sembolle gösterilmiştir; \*  $p < 0,05$ .

İki boyutlu PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarındaki hücre çoğalmasının analizi için 14 günlük inkübasyon sürecinin 1., 7. ve 14. günlerinde MTT testi yapılmıştır. MTT test sonuçları Şekil 4.26’da verilmiştir. MTT sonuçları incelendiğinde 1. günde yapılan ölçümlerde PCL-Kit-Kur10 grubundaki hücrelerin diğer gruplardakilere göre çok daha yüksek bir metabolik aktiviteye sahip olduğu görülmüş ve ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlam bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Yedinci gün sonuçları da 1. günle benzer bir davranış göstermiştir. Yine de ilk 7 gün için PCL-Kit-Kur10 matrislerden salınan kurkuminin hücrelerin metabolik aktivitelerini diğer gruplara göre daha fazla desteklediği söylenebilir. Yedinci ve 14. gündeki absorbans değerleri karşılaştırıldığında tüm gruplar için hücre metabolik aktiviteleri sabit kalmıştır. Genel olarak, kurkumin içeren gruplarda MTT absorbans değerlerinin 14 günlük süre boyunca

sabit kaldığı görülmüştür. Kültür süresi boyunca özellikle PCL-Kit-Kur10 grubundaki MTT değerlerinin diğer tüm gruplardan yüksek olduğu ancak sadece 14. Günde PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 arasındaki absorban değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ).

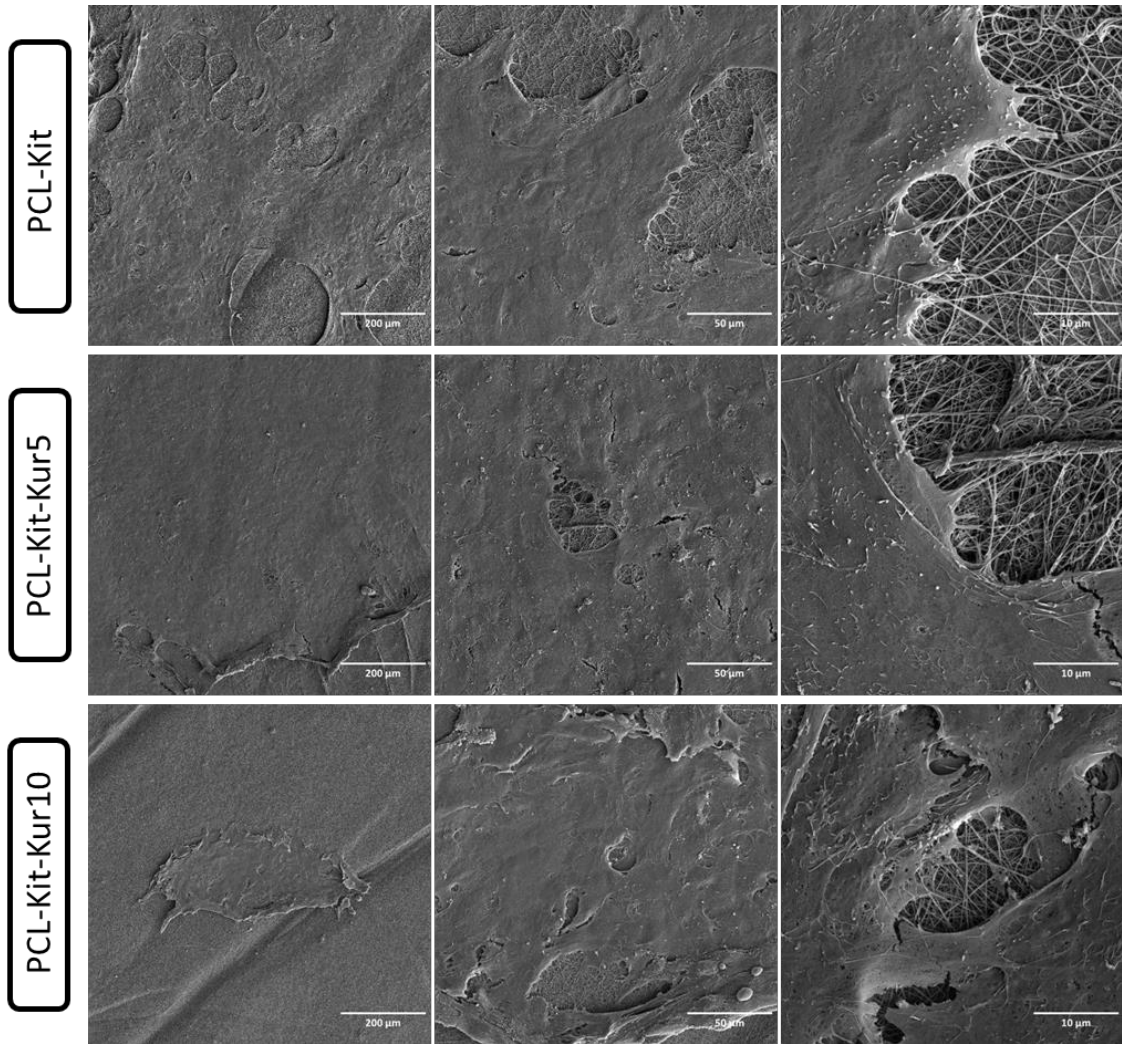
#### 4.5.2.2. Hücre Morfolojisi

Bölüm 2.4.3'te detaylıca anlatıldığı üzere, geleneksel elektroğirme ile üretilen nanofibröz matrislerde, nanofiberler sıkıca paketlenmiş bir yapıdadır ve bu matrislerde düzlemsel gözenekler derinlik ekseninde devam etmemektedir. Hücrelerin, derinlik eksenine göçünü engelleyen bu durum matris bütününde yeni doku oluşumunu sınırlamaktadır [50]. Ayrıca, ortalama bir hücre çapının 5-20  $\mu\text{m}$  arasında olması sebebiyle, nanofibröz matrislerdeki düşük gözenek boyutları hücrelerin malzeme derinliğine göçünü engellemektedir [68].

Doku mühendisliği uygulamalarında, kullanılan doku iskelesinin yüksek gözenekliliğe sahip olması hücre göçü, besin iletimi, atıkların uzaklaştırılması, damarlanmanın sağlanması gibi birçok faktör için önemlidir. Ancak, gözenekliliğin yanı sıra, gözeneklerin birbirleri ile bağlantılı olmaları ve hücresel uzantılara izin verebilmesi de gerekir. Örneğin, hücrelerin hayatta kalması için kan iletiminden en fazla 200  $\mu\text{m}$  kadar uzakta olmaları gerektiği bildirilmiştir [142]. Ayrıca, yara iyileşmesi sürecinde hücreler ve HDM proteinleri arasındaki etkileşim hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi hücresel aktiviteler üzerinde önemli rol oynamaktadır [15]. Hücre-matris etkileşimlerinin yanı sıra hücre-hücre etkileşimlerinin de doku morfogenezini ve hemostazı için yüksek önem taşıdığı da bildirilmiştir [143]. Tüm bu sebeplerden dolayı hücre göçüne ve hücresel bağlantılara izin vermeyen yara örtü malzemeleri hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini engelleyerek yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkiler.

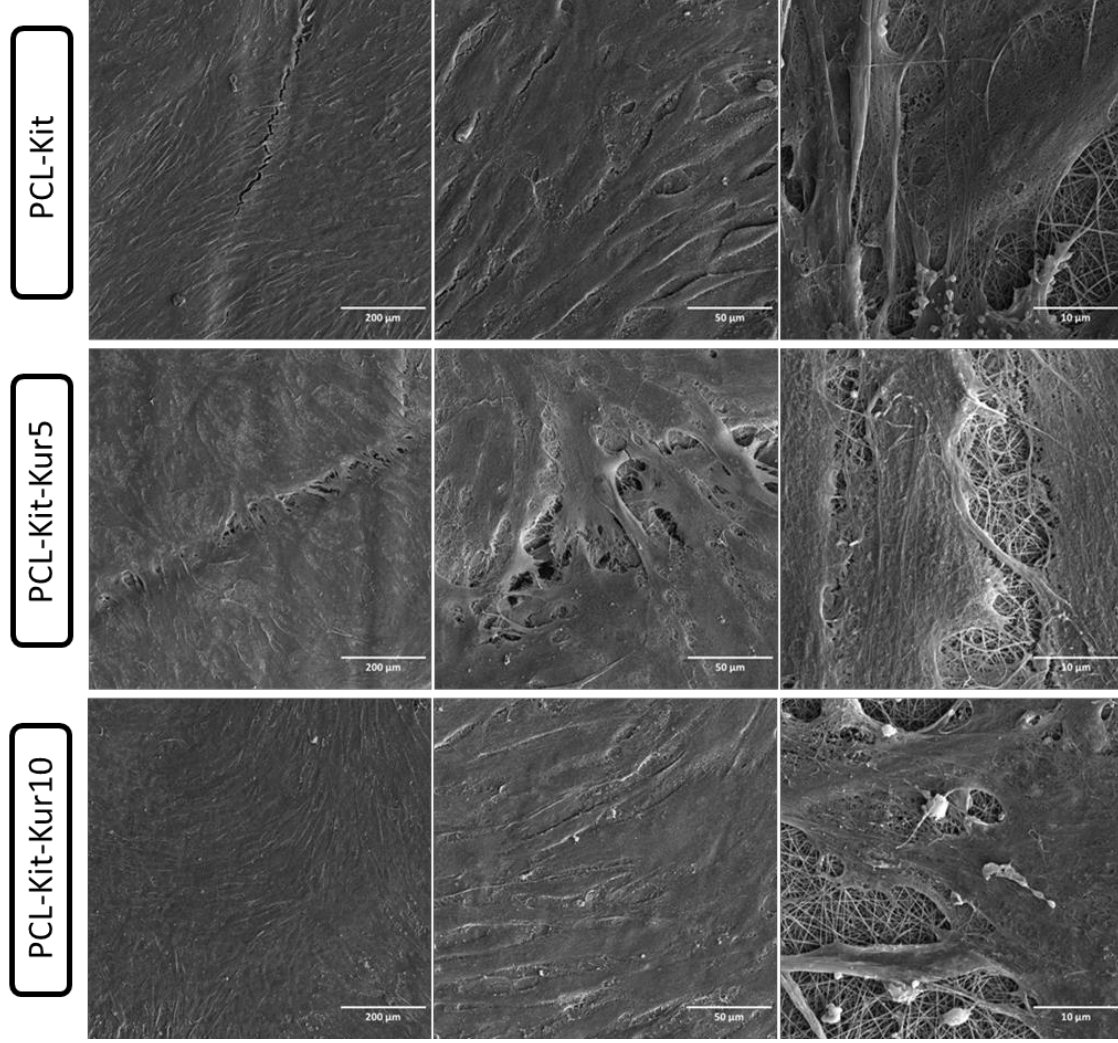
Hücre yapışması, çoğalması ve morfolojisini analiz etmek amacıyla 1. ve 14. günlerde hücreli 2B nanofibröz matrisler üzerindeki hücreler SEM ile görüntülenmiştir. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 2B nanofibröz matrislerin 1. ve 14. günlerdeki düşük ve yüksek büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de verilmiştir. İki boyutlu nanofibröz matrislere ait SEM görüntüleri incelendiğinde tüm gruplar için matrislerin yüzeyinde hücre yapışmasının gerçekleştiği ancak hücre yapışmasının yalnızca matrislerin yüzeyinde kaldığı ve nanofiberlerin sık yapılarından dolayı malzemelerin içerisine doğru hücre göçünün gerçekleşmediği görülmektedir.

Çalışmanın 14. gününde elde edilen görüntülerde de hücrelerin yalnızca matrislerin yüzeyleri boyunca gelişebildikleri görülmektedir. Tüm gruplar için 1. gün ve 14. güne ait görüntüler karşılaştırıldığında, yoğun bir HDM sentezi gerçekleşmiş, hücre-hücre ve hücre-nanofiber etkileşimleri çok daha yoğun bir şekilde kurulmuştur. Genel olarak elde edilen sonuçlar 2B nanofibröz matrislerin hücre gelişimine ve hayatta kalımına olanak sağladıklarını göstermektedir ve MTT testi ile elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Ancak, her ne kadar matrisler üzerinde yoğun bir hücre tabakası bulunsa da nanofiberlerin sıkı istiflenmelerine bağlı olarak düşük gözenek çapları nedeniyle hücrelerin yüzeyde kalarak malzeme derinliklerine göç edemedikleri de görülmüştür.



**Şekil 4.27.** İki boyutlu nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 matrislere ait 1. gündeki farklı büyütmelere ait SEM görüntüleri.





**Şekil 4.28.** 2B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 matrislerine ait 14. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

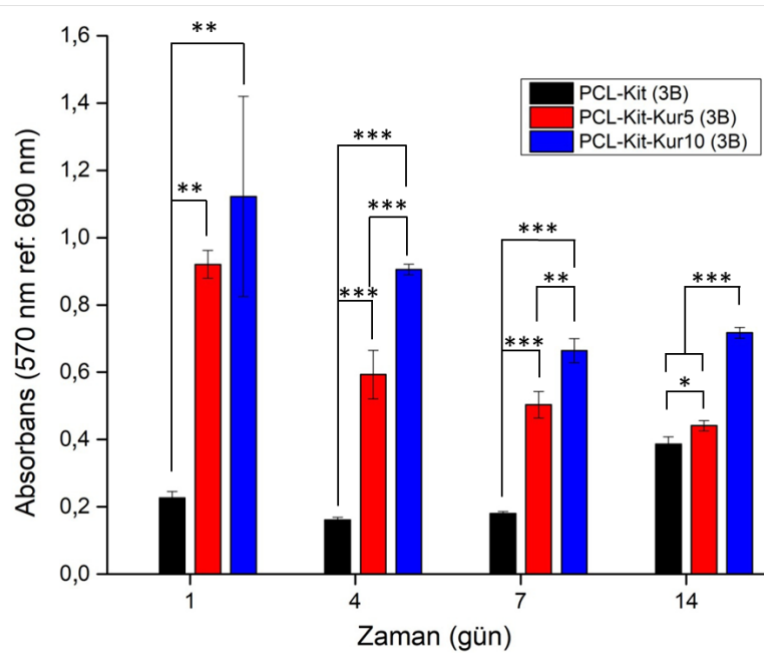
#### 4.5.3. Üç Boyutlu Nanofibröz Yara Örtü Malzemeleriyle Hücre Kültürü Çalışmaları

PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin hücre kültürü çalışmaları ile elde edilen MTT analiz sonuçları ve SEM görüntüleri aşağıda verilmiştir.

##### 4.5.3.1. Hücre Proliferasyonu

Üç boyutlu PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarındaki hücre çoğalmasının analizi için 14 günlük inkübasyon sürecinin 1., 4., 7. ve 14. günlerinde MTT testi yapılmıştır. MTT sonuçları Şekil 4.29'da verilmiştir. MTT sonuçları incelendiğinde 1. günde yapılan ölçümlerde kurkumin içeren gruplarda hücrelerin PCL-Kit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 4-5 kat daha yüksek metabolik aktiviteye sahip oldukları görülmektedir ( $p < 0.01$ ). Kurkumin içeren PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10

gruplarındaki ortalama gözenek çaplarının PCL-Kit grubuna göre daha yüksek olmasının da ekim sonrasında hücrelerin malzeme derinliklerinde bile iyi yapışıp çoğalabildiklerinin göstergesidir. Bu durum SEM analizleriyle de doğrulanmıştır. Kültürün 14. gününe kadar her bir analiz gününde kurkumin içeren gruplardaki hücrelerin metabolik aktiviteleri PCL-Kit grubuna göre anlamlı derecede yüksektir; ancak bu gruplardaki hücrelerin metabolik aktiviteleri 14 günlük kültür boyunca azalmaya devam etmiştir. Bölüm 4.3'te verildiği üzere 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinden kurkumin salımının 8-10 saat arasında tamamlandığı görülmüştür. MTT sonuçları incelendiğinde kurkumin içeren gruplarda 14 günlük süreç boyunca absorbans değerlerinde genel olarak düşüşün sebebi olarak metabolizmada oldukça düşük bir yarı ömre sahip olan kurkuminin salımının tamamlanması ve etkinliğini kaybetmesi gösterilebilir [144]. Genel olarak elde edilen sonuçlar, 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin hücrelerin ilk yapışmasını ve proliferasyonunu desteklediğini göstermektedir. Ayrıca, kurkumin yüklenmesi ile hücre canlılığının başarılı bir şekilde desteklendiği ancak ileride yapılacak çalışmalarda kurkuminin daha uzun süreli salımının sağlanarak olumlu etkilerinin artırılabilirliği de düşünülmektedir.



**Şekil 4.29.** PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin 1., 4., 7. ve 14. günlerdeki MTT absorbanslarına ait grafik. Veriler, 3 örneğin ortalaması ve standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar ise şu sembollerle gösterilmiştir; \*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\*  $p<0.001$ .

#### 4.5.3.2. Hücre Morfolojisi

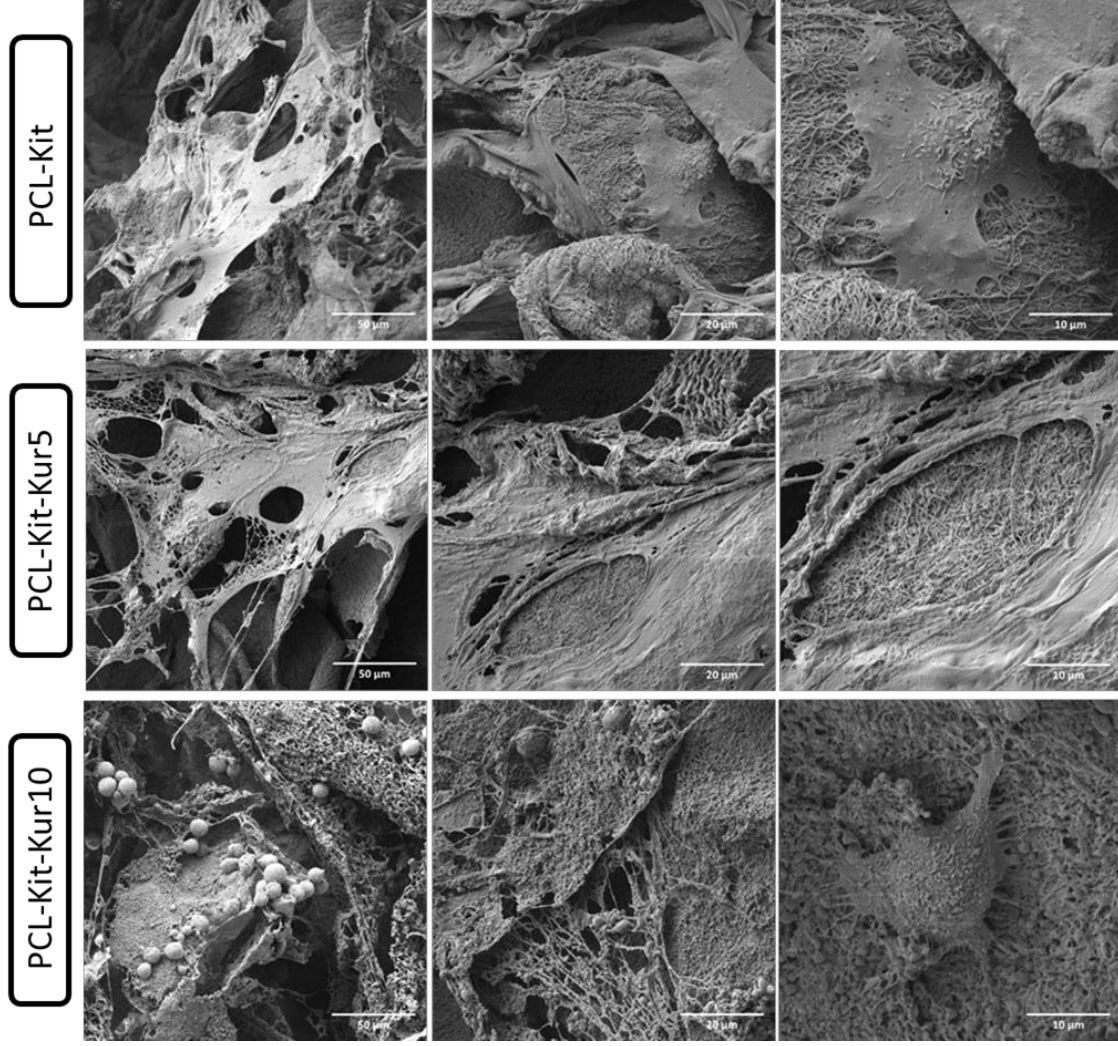
Hücrelerin ilk yapışması malzemenin morfolojik yapısı ile büyük oranda ilişkilidir. Özellikle fiber çaplarının 300 nm'den küçük olduğu nanofibröz malzemeler, fiberlerin HDM'deki kollajen fibrillerine olan benzerlikleri sayesinde hücrelerin doğal ortamlarını taklit etmede oldukça başarılıdır. Nanofiber malzemelerin morfolojik olarak HDM'ye olan bu benzerlikleri, hücre yapışması ve çoğalmasını artırır [104].

HDM'nin gözenekli yapısı bulunduğu dokuya göre de farklılık göstermektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında geliştirilen ve doğal doku HDM'sini iyi taklit etmeyi amaçlayan yapıların, kullanıldıkları dokuya göre üretilmeleri önemlidir. Deri HDM'sindeki kollajen fiberlerin sıklığına bağlı olarak gözenek boyutunda ve gözeneklilikte çeşitlilik bulunmaktadır [15]. Bu sebeple deri doku mühendisliğinde kullanılacak yara örtü malzemelerinin, makrogözeneklilik yanında mikrogözeneklere de sahip olmaları önemlidir. Bu sayede derinin doğal HDM'sinin sahip olduğu hiyerarşik gözenek yapısı (makro/mikrogözeneklilik) daha iyi taklit edilebilir. Ma ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada farklı gözenekliğe sahip yapıların hücre farklılaşması, canlılığı ve morfolojisi üzerine etkileri incelenmiştir. Yüksek gözenekliliğe sahip yapılarda fiberler arası mesafenin fazla olması sebebiyle hücrelerin yayılmalarının sınırlanabileceği ancak düşük gözenekli yapılarda da hücrelerin kümelenmelerinin güç olmasından dolayı farklılaşmanın sınırlanabileceği bildirilmiştir [145].

2B elektroğirme üretim yöntemleri ile yalnızca sıkışık düzene sahip, gözenekliliği düşük yapılar elde edilebildiği için, bu yapıların HDM'nin yapısındaki gözenekli yapıyı taklit etmesi tam olarak mümkün olamamaktadır. Tez çalışması kapsamında üretilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinde, makro ve mikrogözenekler bir arada bulunarak HDM'nin hiyerarşik gözenekli yapısı başarılı bir şekilde taklit edilebilmiştir. Bu durum, hücrelerin 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin derinliklerinde bile yoğun bir şekilde yapışıp çoğalmalarını sağlamıştır. Ayrıca, 2B yapılarda makrogözeneklerin bulunmaması da hücrelerin sadece malzeme yüzeyinde çoğalmalarına neden olmuştur. Üç boyutlu yapılarda gözenekliliğin enine kesitlerde ortogonal doğrultuda da devam etmesi, hücrelerin doku iskelesinin derinliklerine göçüne de olanak sağlamaktadır [50].

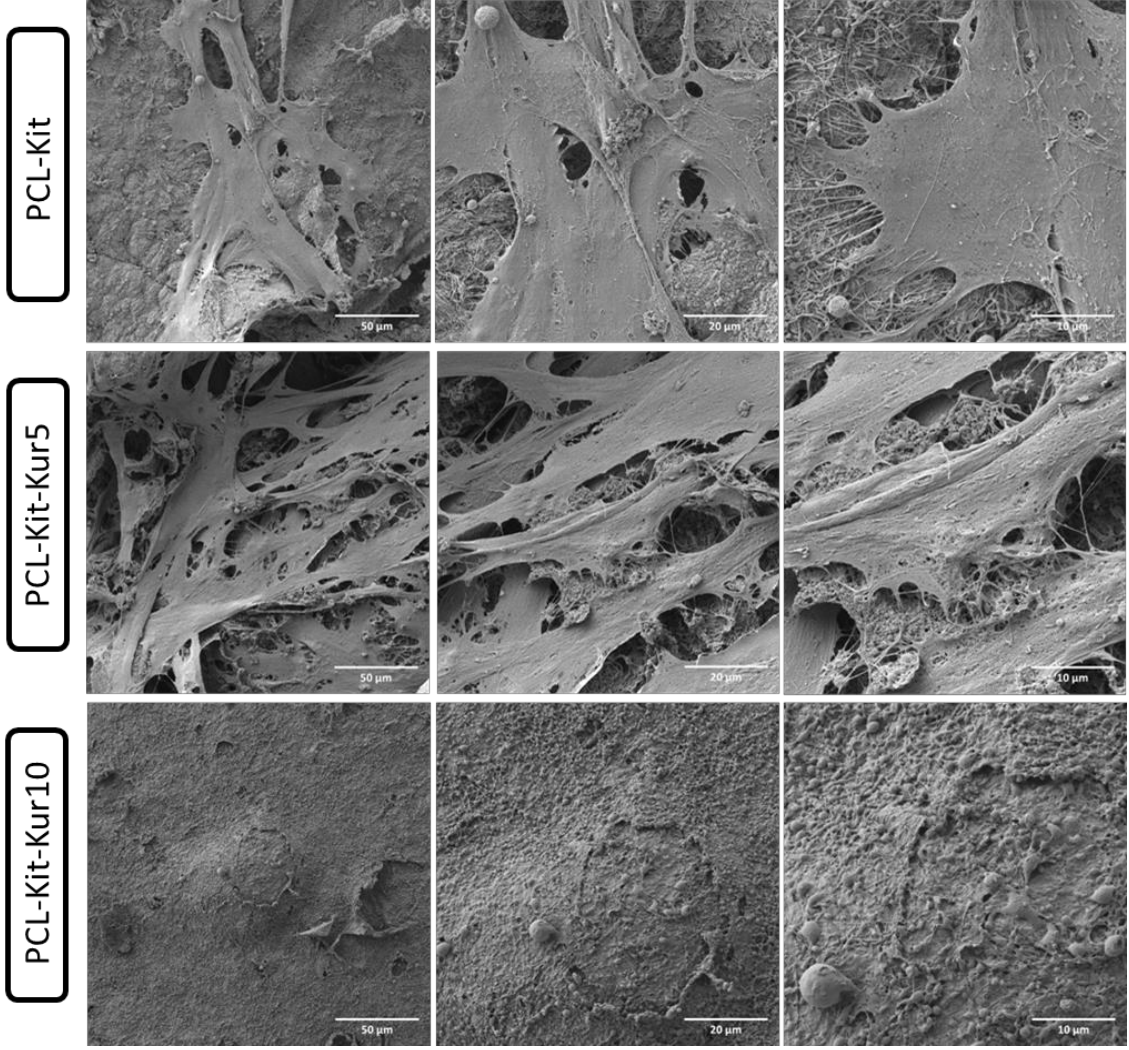
Literatürdeki birçok çalışma geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilen 2B nanofibröz matrislerin dezavantajlarını gidermek amacıyla 3B elektroğirme yöntemi ile üretilen malzemeleri incelemektedir. Chen ve ark. geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilen

jelatin/PLA nanofibröz matrisler ile bu matrislerden dispersiyon şekillendirme yöntemi ile üretilen 3B doku iskelelerini karşılaştırmıştır. *İn vitro* hücre kültürü çalışmalarında 3B yapıların yüksek gözenekli yapıları ile hücrelerin doğal üç boyutlu ortamını taklit ederek 2B yapılara göre hücre proliferasyonunu ve göçünü daha iyi destekledikleri belirtmişlerdir. Ayrıca, hücre ekiminin 6. gününden itibaren doku iskelelerinin derinliklerine de hücre göçünün gerçekleştiği görülmüş ve bu durum 3B yapıların makrogözenekli yapıları ile ilişkilendirilmiştir [71]. Benzer şekilde Li ve ark. dispersiyon şekillendirme yöntemi ile üretilen 3B jelatin/PLA doku iskelelerini incelemişlerdir. *İn vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda beklenildiği şekilde hücrelerin yalnızca 2B yapıların yüzeylerinde yapışıp çoğaldığı görülmüş ancak 3B yapılarda tüm doğrultularda hücre göçünün gerçekleştiği, hücrelerin 3B yapıların derinliklerine kadar yayıldıkları ve hücre proliferasyonunun 2B yapılara göre anlamlı derecede arttığı belirtilmiştir. Ayrıca *in vivo* çalışmalarda kronik diyabetik fare yaralarında 3B yapıların etkin doku oluşumu ve yara izinin engellenmesi için çok daha etkili oldukları belirtilmiştir [124]. Ye ve ark. tarafından üretilen 3B nano-Hap/PLLA/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ekilen kemik iliği kök hücrelerinin *in vitro* gen ekspresyonları incelenerek 3B yapıların hücre farklılaşmasını yüksek oranda destekledikleri belirtilmiştir. *İn vivo* çalışmalar ile de üretilen 3B yapıların yeni kemik dokusu oluşumunu anlamlı derecede destekledikleri bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, üretilen doku iskelelerinin yüksek gözenekli yapısının doğal hücre ortamını daha iyi taklit etmesi ve hücre göçü ile proliferasyonunu daha iyi desteklemesi ile ilişkilendirilmiştir [125]. Genel olarak literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, üretilen 3B'lu yapıların sahip oldukları yüksek gözenekli yapılarının hücre göçü ile proliferasyonu artırdığı ve doğal doku oluşumunu desteklediği görülmektedir.



**Şekil 4.30.** 3B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 yara örtü malzemelerine ait 1. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre çoğalması, yapışması, canlılığını ve morfolojisini analiz etmek amacıyla 1. ve 14. günlerde hücreli 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin SEM görüntüleri alınmıştır. PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin 1. ve 14. günlerdeki büyük ve küçük büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de verilmiştir.



**Şekil 4.31.** 3B nanofibröz PCL-Kit, PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 yara örtü malzemelerine ait 14. gündeki farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri.

Hücrelerin üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemelerinin gözenekleri etrafında yapışıp yayıldıkları ve hücresel uzantıların malzemeler ile bütünleşik bir yapıda oldukları görülmektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde tüm gruplarda 1. günden itibaren 3B yara örtü malzemelerinin derinlikler boyunca gözenek yüzeylerinde hücre tutunması ve yayılmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. PCL-Kit grubu ile kurkumin içeren PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 grupları karşılaştırıldığında, kurkumin içeren gruplarda hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinin çok daha fazla olduğu görülmektedir. Hücre kültürü çalışmasının 14. günündeki SEM görüntüleri incelendiğinde 1. güne göre özellikle PCL-Kit-Kur5 gruplarında hücre çoğalmasının arttığı ve hücresel uzantıların yara örtü malzemeleri boyunca yayıldıkları görülmektedir. Yine bu görüntülerde hücreler arası uzantıların oluştuğu ve böylece hücre-hücre etkileşimlerinin de başarılı bir şekilde sağlandığı görülmektedir. PCL-Kit-Kur10

grubunda, 14. güne ait görüntülerde bazı hücrelerin küresel morfolojide kaldıkları ve hücre ölümü gerçekleştiği de görülmektedir. Bu durum salınan kurkumin miktarının az da olsa hücre ölümüne yol açması ile açıklanabilir. Literatürde kurkuminin düşük derişimlerde hücre göçünü ve proliferasyonunu destekleyici ancak derişim yüksek olduğunda sitotoksik etki gösterebileceğini belirten çalışmalar ile paralellik göstermektedir [97, 133, 141]. PCL-Kit-Kur5 ve PCL-Kit-Kur10 gruplarına ait 3B yapı malzemelerinde daha fazla hücre yapışmasının gözlenmesi ve hücresel etkileşimlerin başarılı bir şekilde desteklenmesi, MTT analizi sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. Genel olarak 3B yapıların hücre göçünü ve proliferasyonunu desteklemesi literatürdeki çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

## 5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında kurkumin yüklü makrogözenekli 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri dispersiyon şekillendirme yöntemi ile üretilmiştir. Yara örtü malzemelerinin üretiminde PCL, kitosan ve kurkumin kullanılarak geleneksel elektroçirime yöntemi ile 2B nanofibröz matrisler üretilmiş ve bu matrislerden dispersiyonlar elde edilerek kalıplara dökülmüş, sonrasında dondurarak kurutma yöntemi ile 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri başarıyla elde edilmiştir.

Hücre dışı matrisin doğal yapısına fiziksel ve kimyasal olarak benzerliği yüksek, hücre proliferasyonunu ve göçünü destekleyici, yüksek eksüdalı yaralar için su emme kapasitesi yeterli yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi deri doku mühendisliği araştırmacılarının en önemli uğraşlarının başında gelmektedir. Tez çalışması kapsamında, deri doku mühendisliği özelinde literatürde daha önce örneği bulunmayan, kurkumin yüklü ve makrogözeneklere sahip üç boyutlu yara örtü malzemeleri başarılı bir şekilde üretilmiş ve detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir.

Kurkumin yüklü 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinden kurkumin salım kinetikleri analiz edilerek PCL-Kit-Kur5 grubunda kurkumin salım kinetiği için en yüksek korelasyon Higuchi modeli ile gözlenirken, PCL-Kit-Kur10 grubunda en yüksek korelasyon sıfırıncı derece kinetik modeli ile gözlenmiştir. Bu sonuçlar, PCL-Kit-Kur5'ten kurkumin salımının difüzyon kontrollü bir şekilde gerçekleştiğini ancak PCL-Kit-Kur10 grubunda ise derişimden bağımsız olarak kurkuminin sadece zamana bağlı olarak salındığını göstermektedir. Sitotoksisite ve hücre kültürü çalışmaları ile elde edilen sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, üretilen 3B yapılardan kurkuminin bu tez çalışmasında kullanılan doz aralığında kontrollü salımıyla hücreler üzerinde bir toksit etki göstermediği anlaşılmaktadır. Ancak, kurkumin salımının kısa sürede tamamlanması sebebiyle HDF hücrelerinin proliferasyonuna olumlu etkilerinin sınırlı kaldığı da düşünülmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalar ile kurkuminin daha uzun süreli salımının sağlanması ile kurkuminin olumlu etkilerinin sürekliliğinin sağlanabileceği de söylenebilir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen iki boyutlu nanofibröz matrislerin ortalama gözenek çapları sırasıyla 433 nm, 403 nm ve 456 nm olarak ölçülürken; aynı gruplara ait üç boyutlu yara örtü malzemelerinin ortalama gözenek çapları 16 µm, 33 µm ve 32 µm olarak ölçülmüştür. Ayrıca µ-BT analizleri sonucunda tüm gruplar için toplam



gözeneklilik ~%90 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, kullanılan üretim yöntemi ile makrogözenekliliğin başarılı bir şekilde sağlandığını göstermektedir. Üç boyutlu nanofibröz yara örtü malzemeleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarına ait SEM görüntüleri incelendiğinde, malzemeler üzerinde hücre-hücre ve hücre-malzeme etkileşimlerinin başarılı bir şekilde kurulduğu görülmüştür. Ayrıca, hücre kültürü çalışmasının ilerleyen günlerinde hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinin arttığı ve hücrelerin yara örtü malzemeleri ile sıkı bir etkileşim içerisinde oldukları görülmektedir. Hücrelerin malzeme derinliklerindeki gözenek yüzeylerinde bile yoğun bir şekilde bulunuyor olması da makrogözenekli yapının 2B matrislere göre hücre göçünü çok daha iyi desteklediğini ortaya koymaktadır. Yine MTT sonuçlarında kurkumin içeren malzeme gruplarında HDF metabolik aktivitelerinin kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu da SEM sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Bu sonuçlar, üretilen 3B yara örtü malzemelerinde oluşturulan makrogözenekliliğin hücre yapışması, göçü ve proliferasyonunun başarılı bir şekilde desteklediğini göstermektedir. Ayrıca geliştirilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin makrogözenekli ve hidrofilik yapıları sebebiyle yüksek su alım kapasitesine sahip oldukları da gösterilmiş ve bu malzemelerin yüksek eksüdaya sahip yaralar için uygun olabilecekleri düşünülmektedir.

Geliştirilen 3B nanofibröz yara örtü malzemelerine kurkumin yüklenmesiyle antibakteriyel etkilerin artırılması planlanmıştır. Ancak, yapılan deneylerde antibakteriyel etkinin artırıldığına dair bir sonuca ulaşamamıştır. Bu durum, deneyler sırasında kurkuminin katı agar ortamına yeterince salınmamasından kaynaklanabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalar ile kurkuminin antibakteriyel özelliklerini daha belirgin bir şekilde gösterebilecek 3B yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi hedeflenebilir. Ayrıca, üretilen yara örtü malzemelerinin literatürdeki benzer yöntemler ile elde edilmiş 3B yapılara kıyasla mekanik özelliklerinin daha düşük olduğu da görülmüştür. Tez çalışması kapsamında üretilen nanofibröz malzemelere ısıl veya kimyasal bir çapraz bağlama işlemi yapılmaması, bu durumun temel sebebini oluşturmaktadır. Gelecekte, üretim yönteminde çapraz bağlama kullanılarak 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin mekanik özellikleri iyileştirilebilir.

Sunulan tez çalışması ile kurkumin yüklü 3B nanofibröz yara örtü malzemeleri başarılı bir şekilde üretilmişlerdir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların, özellikle kurkumin yüklü 3B yara örtü malzemeleri için literatüre önemli bir katkı yapacağı düşünülmektedir. Üretilen yara örtü malzemeleri ile fonksiyonel deri doku oluşumu protein/gen ekspresyon

seviyeleri ve hücre göçü analizi gibi çok daha detaylı *in vitro* çalışmalarla ortaya konulduktan sonra klinik olarak kullanılabilirliği *in vivo* ortamda araştırılmalıdır. Yine de bu çalışmayla ulaşılan sonuçlar bize 3B nanofibröz yara örtü malzemelerinin deri doku mühendisliğinde yüksek kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] B. Hawthorne, J.K. Simmons, B. Stuart, R. Tung, D.S. Zamierowski, A.J. Mellott, Enhancing wound healing dressing development through interdisciplinary collaboration, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 109 (2021) 1967-1985.
- [2] S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini, Wound dressings - a review, *Biomedicine (Taipei)*, 5 (2015) 22.
- [3] P. Zahedi, I. Rezaeian, S.-O. Ranaei-Siadat, S.H. Jafari, P. Supaphol, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, *Polymers for Advanced Technologies*, 21 (2010) 77-95.
- [4] L. Zhou, L. Cai, H. Ruan, L. Zhang, J. Wang, H. Jiang, Y. Wu, S. Feng, J. Chen, Electrospun chitosan oligosaccharide/polycaprolactone nanofibers loaded with wound-healing compounds of Rutin and Quercetin as antibacterial dressings, *International Journal of Biological Macromolecules*, 183 (2021) 1145-1154.
- [5] S.-F. Chou, D. Carson, K.A. Woodrow, Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers, *Journal of Controlled Release*, 220 (2015) 584-591.
- [6] P.I. Siafaka, A.P. Zisi, M.K. Exindari, I.D. Karantas, D.N. Bikiaris, Porous dressings of modified chitosan with poly(2-hydroxyethyl acrylate) for topical wound delivery of levofloxacin, *Carbohydr Polym*, 143 (2016) 90-99.
- [7] M. Kulac, C. Aktas, F. Tulubas, R. Uygur, M. Kanter, M. Erboga, M. Ceber, B. Topcu, O.A. Ozen, The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats, *J Mol Histol*, 44 (2013) 83-90.
- [8] C. Mohanty, M. Das, S.K. Sahoo, Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model, *Mol Pharm*, 9 (2012) 2801-2811.
- [9] C.R. Ireson, D.J. Jones, S. Orr, M.W. Coughtrie, D.J. Boocock, M.L. Williams, P.B. Farmer, W.P. Steward, A.J. Gescher, Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11 (2002) 105-111.

- [10] S. Fahimirad, H. Abtahi, P. Satei, E. Ghaznavi-Rad, M. Moslehi, A. Ganji, Wound healing performance of PCL/chitosan based electrospun nanofiber electrospayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles, *Carbohydr Polym*, 259 (2021) 117640.
- [11] K.M.V.D.G.K.M. Van De Graaff, *Human anatomy*, sixth edition, McGraw-Hill, Boston, 2002.
- [12] C.L.R.J.R.A.S.R.R.S.T.D.T.P.S.R.R. VanPutte, *Seeley's anatomy & physiology*, McGraw-Hill, New York, NY, 2014.
- [13] J. Kanihakis, *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*, *Eur J Dermatol*, 12 (2002) 390-399; quiz 400-391.
- [14] S. MacNeil, *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*, *Nature*, 445 (2007) 874-880.
- [15] Q.L. Loh, C. Choong, *Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size*, *Tissue Eng Part B Rev*, 19 (2013) 485-502.
- [16] S. van Helvert, C. Storm, P. Friedl, *Mechanoreciprocity in cell migration*, *Nature Cell Biology*, 20 (2018) 8-20.
- [17] S. Schleifenbaum, T. Prietzel, G. Aust, A. Boldt, S. Fritsch, I. Keil, H. Koch, R. Möbius, H. Scheidt, M. Wagner, N. Hammer, *Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An In-Vitro Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues*, *PLoS ONE*, 11 (2016) e0151223.
- [18] I. Negut, G. Dorcioman, V. Grumezescu, *Scaffolds for Wound Healing Applications*, *Polymers*, 12 (2020) 2010.
- [19] S. Guo, L.A. Dipietro, *Factors affecting wound healing*, *J Dent Res*, 89 (2010) 219-229.
- [20] A. Bishop, *Role of oxygen in wound healing*, *J Wound Care*, 17 (2008) 399-402.
- [21] I. Younis, *Role of oxygen in wound healing*, *J Wound Care*, 29 (2020) S4-s10.
- [22] G. Broughton, 2nd, J.E. Janis, C.E. Attinger, *Wound healing: an overview*, *Plast Reconstr Surg*, 117 (2006) 1e-S-32e-S.

- [23] S.R. Gomes, G. Rodrigues, G.G. Martins, M.A. Roberto, M. Mafra, C.M.R. Henriques, J.C. Silva, In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study, *Materials Science and Engineering: C*, 46 (2015) 348-358.
- [24] S. Ellis, E.J. Lin, D. Tartar, Immunology of Wound Healing, *Curr Dermatol Rep*, 7 (2018) 350-358.
- [25] I. Negut, V. Grumezescu, A.M. Grumezescu, Treatment Strategies for Infected Wounds, *Molecules*, 23 (2018) 2392.
- [26] A.J. Singer, R.A. Clark, Cutaneous wound healing, *N Engl J Med*, 341 (1999) 738-746.
- [27] D. Akbik, M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanizadeh, Curcumin as a wound healing agent, *Life Sci*, 116 (2014) 1-7.
- [28] H. Adeli, M.T. Khorasani, M. Parvazinia, Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay, *International Journal of Biological Macromolecules*, 122 (2019) 238-254.
- [29] M.T. Khorasani, A. Joorabloo, A. Moghaddam, H. Shamsi, Z. MansooriMoghadam, Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114 (2018) 1203-1215.
- [30] V. Jones, J.E. Grey, K.G. Harding, Wound dressings, *Bmj*, 332 (2006) 777-780.
- [31] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J Pharm Sci*, 97 (2008) 2892-2923.
- [32] V. Brumberg, T. Astrelina, T. Malivanova, A. Samoilov, Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings, *Biomedicines*, 9 (2021).
- [33] K.C. Broussard, J.G. Powers, Wound dressings: selecting the most appropriate type, *Am J Clin Dermatol*, 14 (2013) 449-459.

- [34] F.K. Ko, Y. Wan, Introduction to nanofiber materials, Cambridge University Press 2014.
- [35] M. Ramalingam, S. Ramakrishna, Nanofiber composites for biomedical applications, Woodhead Publishing 2017.
- [36] S.P. Miguel, D.R. Figueira, D. Simões, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, P. Ferreira, I.J. Correia, Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review, Colloids Surf B Biointerfaces, 169 (2018) 60-71.
- [37] T. Zhao, J. Zhang, X. Gao, D. Yuan, Z. Gu, Y. Xu, Electrospun nanofibers for bone regeneration: from biomimetic composition, structure to function, J Mater Chem B, 10 (2022) 6078-6106.
- [38] E.-H. Lim, P. Sardinha, S. Myers, Nanotechnology Biomimetic Cartilage Regenerative Scaffolds, Archives of plastic surgery, 41 (2014) 231-240.
- [39] M. Badmus, J. Liu, N. Wang, N. Radacsi, Y. Zhao, Hierarchically electrospun nanofibers and their applications: A review, Nano Materials Science, 3 (2021) 213-232.
- [40] D. Li, Y. Xia, Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning, Nano Letters, 4 (2004) 933-938.
- [41] S. Nedjari, S. Eap, A. Hébraud, C.R. Wittmer, N. Benkirane-Jessel, G. Schlatter, Electrospun Honeycomb as Nests for Controlled Osteoblast Spatial Organization, Macromolecular Bioscience, 14 (2014) 1580-1589.
- [42] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays, Nano Letters, 3 (2003) 1167-1171.
- [43] A.R. Unnithan, R.S. Arathyram, C.S. Kim, Chapter 3 - Electrospinning of Polymers for Tissue Engineering, in: S. Thomas, Y. Grohens, N. Ninan (Eds.) Nanotechnology Applications for Tissue Engineering, William Andrew Publishing, Oxford, 2015, pp. 45-55.
- [44] A. Barhoum, M. Bechelany, A.S. Hamdy Makhoulouf, Handbook of Nanofibers, 2019.

- [45] R.R. Bresee, W.-C. Ko, Fiber Formation during Melt Blowing, *International Nonwovens Journal*, os-12 (2003) 1558925003os-1551200209.
- [46] A. Haider, S. Haider, I.-K. Kang, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry*, 11 (2018) 1165-1188.
- [47] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications, *Chemical reviews*, 119 (2019) 5298-5415.
- [48] G. Yan, H. Niu, T. Lin, Chapter 7 - Needle-less Electrospinning, in: B. Ding, X. Wang, J. Yu (Eds.) *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*, William Andrew Publishing 2019, pp. 219-247.
- [49] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, D. Pisignano, Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review, *Macromolecular Materials and Engineering*, 298 (2013) 504-520.
- [50] B.A. Blakeney, A. Tambralli, J.M. Anderson, A. Andukuri, D.J. Lim, D.R. Dean, H.W. Jun, Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold, *Biomaterials*, 32 (2011) 1583-1590.
- [51] A. Greiner, J.H. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angew Chem Int Ed Engl*, 46 (2007) 5670-5703.
- [52] J.M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.C. Beck Tan, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42 (2001) 261-272.
- [53] M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, Electrospinning of polyurethane fibers, *Polymer*, 43 (2002) 3303-3309.
- [54] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supaphol, Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205 (2004) 2327-2338.

- [55] A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, N. Radacsi, 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12 (2020) e1626.
- [56] S. Koç, S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, T.S. Ertekin, M. Çalış, M.M. Yılmaz, G. Akcan, S. Çaylı, Three dimensional nanofibrous and compressible poly(L-lactic acid) bone grafts loaded with platelet-rich plasma, *Biomedical Materials*, 16 (2021) 045012.
- [57] W. Leong, S.C. Wu, K. Ng, L.P. Tan, *Electrospun 3 D multi-scale fibrous scaffold for enhanced human dermal fibroblasts infiltration*, 2016.
- [58] W. Lin, M. Chen, T. Qu, J. Li, Y. Man, Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 108 (2020) 1311-1321.
- [59] Y. Si, J. Yu, X. Tang, J. Ge, B. Ding, Ultralight nanofibre-assembled cellular aerogels with superelasticity and multifunctionality, *Nature Communications*, 5 (2014) 5802.
- [60] I.K. Shim, W.H. Suh, S.Y. Lee, S.H. Lee, S.J. Heo, M.C. Lee, S.J. Lee, Chitosan nano-/microfibrous double-layered membrane with rolled-up three-dimensional structures for chondrocyte cultivation, *J Biomed Mater Res A*, 90 (2009) 595-602.
- [61] L.H. Leung, S. Fan, H.E. Naguib, Fabrication of 3D electrospun structures from poly(lactide-co-glycolide acid)–nano-hydroxyapatite composites, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50 (2012) 242-249.
- [62] I.K. Shim, W.H. Suh, S.Y. Lee, S.H. Lee, S.J. Heo, M.C. Lee, S.J. Lee, Chitosan nano-/microfibrous double-layered membrane with rolled-up three-dimensional structures for chondrocyte cultivation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90 (2009) 595-602.
- [63] I.K. Shim, M.R. Jung, K.H. Kim, Y.J. Seol, Y.J. Park, W.H. Park, S.J. Lee, Novel three-dimensional scaffolds of poly (L-lactic acid) microfibers using electrospinning and



mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 95 (2010) 150-160.

[64] M.L. Mejía Suaza, Y. Hurtado Henao, M.E. Moncada Acevedo, Electrospinning húmedo y sus aplicaciones: una revisión, *TecnoLógicas*, 25 (2022) e2223.

[65] S.H. Park, T.G. Kim, H.C. Kim, D.-Y. Yang, T.G. Park, Development of dual scale scaffolds via direct polymer melt deposition and electrospinning for applications in tissue regeneration, *Acta Biomaterialia*, 4 (2008) 1198-1207.

[66] L. Weng, S.K. Boda, H. Wang, M.J. Teusink, F.D. Shuler, J. Xie, Novel 3D Hybrid Nanofiber Aerogels Coupled with BMP-2 Peptides for Cranial Bone Regeneration, *Adv Healthc Mater*, 7 (2018) e1701415.

[67] A. Martins, S. Chung, A.J. Pedro, R.A. Sousa, A.P. Marques, R.L. Reis, N.M. Neves, Hierarchical starch-based fibrous scaffold for bone tissue engineering applications, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3 (2009) 37-42.

[68] B. Sun, Y.Z. Long, H.D. Zhang, M.M. Li, J.L. Duvail, X.Y. Jiang, H.L. Yin, Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning, *Progress in Polymer Science*, 39 (2014) 862-890.

[69] M.F. Leong, M.Z. Rasheed, T.C. Lim, K.S. Chian, In vitro cell infiltration and in vivo cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly(D,L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique, *J Biomed Mater Res A*, 91 (2009) 231-240.

[70] T. Ahmad, H.J. Shin, J. Lee, Y.M. Shin, S.K.M. Perikamana, S.Y. Park, H.S. Jung, H. Shin, Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells, *Acta Biomater*, 74 (2018) 464-477.

[71] W. Chen, J. Ma, L. Zhu, Y. Morsi, H. Ei-Hamshary, S.S. Al-Deyab, X. Mo, Superelastic, superabsorbent and 3D nanofiber-assembled scaffold for tissue engineering, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 142 (2016) 165-172.

- [72] T. Xu, J.M. Miszuk, Y. Zhao, H. Sun, H. Fong, Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering, *Adv Healthc Mater*, 4 (2015) 2238-2246.
- [73] T. Garg, G. Rath, A.K. Goyal, Biomaterials-based nanofiber scaffold: targeted and controlled carrier for cell and drug delivery, *J Drug Target*, 23 (2015) 202-221.
- [74] R.J. Wade, *Engineering extracellular matrix signals into fibrous hyaluronic acid hydrogels*, 2015.
- [75] L.C. Keong, A.S. Halim, In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management, *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (2009) 1300-1313.
- [76] V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan, Chitosan as a starting material for wound healing applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97 (2015) 417-426.
- [77] I. Wedmore, J.G. McManus, A.E. Pusateri, J.B. Holcomb, A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing: Experience in Current Combat Operations, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 60 (2006).
- [78] J.-P. Chen, G.-Y. Chang, J.-K. Chen, Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 313-314 (2008) 183-188.
- [79] Z.-X. Cai, X.-M. Mo, K.-H. Zhang, L.-P. Fan, A.-L. Yin, C.-L. He, H.-S. Wang, Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications, *International journal of molecular sciences*, 11 (2010) 3529-3539.
- [80] W.A. Sarhan, H.M.E. Azzazy, High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects, *Carbohydrate Polymers*, 122 (2015) 135-143.
- [81] Y. Fazli, Z. Shariatinia, I. Kohsari, A. Azadmehr, S.M. Pourmortazavi, A novel chitosan-polyethylene oxide nanofibrous mat designed for controlled co-release of hydrocortisone and imipenem/cilastatin drugs, *Int J Pharm*, 513 (2016) 636-647.

- [82] B. Lu, F. Lu, Y. Zou, J. Liu, B. Rong, Z. Li, F. Dai, D. Wu, G. Lan, In situ reduction of silver nanoparticles by chitosan-l-glutamic acid/hyaluronic acid: Enhancing antimicrobial and wound-healing activity, *Carbohydr Polym*, 173 (2017) 556-565.
- [83] G.S. El-Feky, S.S. Sharaf, A. El Shafei, A.A. Hegazy, Using chitosan nanoparticles as drug carriers for the development of a silver sulfadiazine wound dressing, *Carbohydr Polym*, 158 (2017) 11-19.
- [84] T.T. Yuan, A.M. DiGeorge Foushee, M.C. Johnson, A.R. Jockheck-Clark, J.M. Stahl, Development of Electrospun Chitosan-Polyethylene Oxide/Fibrinogen Biocomposite for Potential Wound Healing Applications, *Nanoscale Res Lett*, 13 (2018) 88.
- [85] M. Norouzi, I. Shabani, H.H. Ahvaz, M. Soleimani, PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103 (2015) 2225-2235.
- [86] Z. Xie, C.B. Paras, H. Weng, P. Punnakitikashem, L.-C. Su, K. Vu, L. Tang, J. Yang, K.T. Nguyen, Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing, *Acta biomaterialia*, 9 (2013) 9351-9359.
- [87] X. Sheng, L. Fan, C. He, K. Zhang, X. Mo, H. Wang, Vitamin E-loaded silk fibroin nanofibrous mats fabricated by green process for skin care application, *International journal of biological macromolecules*, 56 (2013) 49-56.
- [88] J.G. Merrell, S.W. McLaughlin, L. Tie, C.T. Laurencin, A.F. Chen, L.S. Nair, Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36 (2009) 1149-1156.
- [89] S.P. Miguel, D. Simões, A.F. Moreira, R.S. Sequeira, I.J. Correia, Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications, *International journal of biological macromolecules*, 121 (2019) 524-535.

- [90] J.I. Kim, H.R. Pant, H.-J. Sim, K.M. Lee, C.S. Kim, Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 44 (2014) 52-57.
- [91] S. Baghersad, S.H. Bahrami, M.R. Mohammadi, M.R.M. Mojtahedi, P.B. Milan, Development of biodegradable electrospun gelatin/aloe-vera/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) hybrid nanofibrous scaffold for application as skin substitutes, *Materials Science and Engineering: C*, 93 (2018) 367-379.
- [92] S. Torres-Giner, A. Martinez-Abad, J.V. Gimeno-Alcañiz, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, Controlled delivery of gentamicin antibiotic from bioactive electrospun polylactide-based ultrathin fibers, *Advanced Engineering Materials*, 14 (2012) B112-B122.
- [93] W. Ji, Y. Sun, F. Yang, J.J.J.P. van den Beucken, M. Fan, Z. Chen, J.A. Jansen, Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications, *Pharmaceutical Research*, 28 (2011) 1259-1272.
- [94] R. Zhao, H. Liang, E. Clarke, C. Jackson, M. Xue, Inflammation in Chronic Wounds, *Int J Mol Sci*, 17 (2016).
- [95] M.D. Hershcovitch, D.B. Hom, Update in wound healing in facial plastic surgery, *Arch Facial Plast Surg*, 14 (2012) 387-393.
- [96] N. Fereydouni, M. Darroudi, J. Movaffagh, A. Shahroodi, A.E. Butler, S. Ganjali, A. Sahebkar, Curcumin nanofibers for the purpose of wound healing, *J Cell Physiol*, 234 (2019) 5537-5554.
- [97] A. Golchin, S. Hosseinzadeh, M. Staji, M. Soleimani, A. Ardeshtirylajimi, A. Khojasteh, Biological behavior of the curcumin incorporated chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers for biomedical applications, *J Cell Biochem*, 120 (2019) 15410-15421.
- [98] L. Vollono, M. Falconi, R. Gaziano, F. Iacovelli, E. Dika, C. Terracciano, L. Bianchi, E. Campione, Potential of Curcumin in Skin Disorders, *Nutrients*, 11 (2019) 2169.
- [99] J. Dai, L. Gu, Y. Su, Q. Wang, Y. Zhao, X. Chen, H. Deng, W. Li, G. Wang, K. Li, Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via

oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, *Int Immunopharmacol*, 54 (2018) 177-187.

[100] Z. Hussain, H.E. Thu, M.W. Amjad, F. Hussain, T.A. Ahmed, S. Khan, Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 77 (2017) 1316-1326.

[101] S.M. Saeed, H. Mirzadeh, M. Zandi, J. Barzin, Designing and fabrication of curcumin loaded PCL/PVA multi-layer nanofibrous electrospun structures as active wound dressing, *Prog Biomater*, 6 (2017) 39-48.

[102] M. Tenenhaus, H.O. Rennekampff, Current Concepts in Tissue Engineering: Skin and Wound, *Plast Reconstr Surg*, 138 (2016) 42s-50s.

[103] M.S. Hu, Z.N. Maan, J.C. Wu, R.C. Rennert, W.X. Hong, T.S. Lai, A.T. Cheung, G.G. Walmsley, M.T. Chung, A. McArdle, M.T. Longaker, H.P. Lorenz, Tissue engineering and regenerative repair in wound healing, *Ann Biomed Eng*, 42 (2014) 1494-1507.

[104] S. Homaeigohar, A.R. Boccaccini, Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings, *Acta Biomater*, 107 (2020) 25-49.

[105] V. Andreu, G. Mendoza, M. Arruebo, S. Irusta, Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds, *Materials*, 8 (2015) 5154-5193.

[106] P. Khazaeli, M. Alaei, M. Khaksarihadad, M. Ranjbar, Preparation of PLA/chitosan nanoscaffolds containing cod liver oil and experimental diabetic wound healing in male rats study, *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (2020) 176.

[107] P. Vashisth, K. Nikhil, P. Roy, P.A. Pruthi, R.P. Singh, V. Pruthi, A novel gellan-PVA nanofibrous scaffold for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 136 (2016) 851-859.

[108] H.-J. Lai, C.-H. Kuan, H.-C. Wu, J.-C. Tsai, T.-M. Chen, D.-J. Hsieh, T.-W. Wang, Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple

angiogenic growth factors for chronic wound healing, *Acta Biomaterialia*, 10 (2014) 4156-4166.

[109] J. He, Y. Liang, M. Shi, B. Guo, Anti-oxidant electroactive and antibacterial nanofibrous wound dressings based on poly( $\epsilon$ -caprolactone)/quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing, *Chemical Engineering Journal*, 385 (2020) 123464.

[110] W. Yang, J. Fu, D. Wang, T. Wang, H. Wang, S. Jin, N. He, Study on chitosan/polycaprolactone blending vascular scaffolds by electrospinning, *J Biomed Nanotechnol*, 6 (2010) 254-259.

[111] N. Jirofti, M. Golandi, J. Movaffagh, F.S. Ahmadi, F. Kalalinia, Improvement of the Wound-Healing Process by Curcumin-Loaded Chitosan/Collagen Blend Electrospun Nanofibers: In Vitro and In Vivo Studies, *ACS Biomater Sci Eng*, 7 (2021) 3886-3897.

[112] S. Mengistu Lemma, F. Bossard, M. Rinaudo, Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly(ethylene oxide), *Int J Mol Sci*, 17 (2016).

[113] T. Gültan, Ş. Bektaş Tercan, D. Çetin Altındal, M. Gümüşderelioğlu, Synergistic effect of fabrication and stabilization methods on physicochemical and biological properties of chitosan scaffolds, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70 (2021) 371-382.

[114] M. Fadaie, E. Mirzaei, Z. Asvar, N. Azarpira, Stabilization of chitosan based electrospun nanofibers through a simple and safe method, *Materials Science and Engineering: C*, 98 (2019) 369-380.

[115] L. Liverani, J. Lacina, J.A. Roether, E. Boccardi, M.S. Killian, P. Schmuki, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents, *Bioactive Materials*, 3 (2018) 55-63.

[116] A. Ghaee, S. Bagheri-Khoulenjani, H. Amir Afshar, H. Bogheiri, Biomimetic nanocomposite scaffolds based on surface modified PCL-nanofibers containing curcumin embedded in chitosan/gelatin for skin regeneration, *Composites Part B: Engineering*, 177 (2019) 107339.

- [117] M. Hadizadeh, M. Naeimi, M. Rafienia, A. Karkhaneh, A bifunctional electrospun nanocomposite wound dressing containing surfactin and curcumin: In vitro and in vivo studies, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 129 (2021) 112362.
- [118] R. Cr, S. Ps, M. O, S. Pp, S. A, Nanochitosan enriched poly  $\epsilon$ -caprolactone electrospun wound dressing membranes: A fine tuning of physicochemical properties, hemocompatibility and curcumin release profile, *Int J Biol Macromol*, 108 (2018) 1261-1272.
- [119] M. Mader, V. Jérôme, R. Freitag, S. Agarwal, A. Greiner, Ultraporous, Compressible, Wetttable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering, *Biomacromolecules*, 19 (2018) 1663-1673.
- [120] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opin Drug Deliv*, 7 (2010) 429-444.
- [121] L.L. Lao, S.S. Venkatraman, N.A. Peppas, Modeling of drug release from biodegradable polymer blends, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (2008) 796-803.
- [122] I.O.f. Standardization, Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.
- [123] L. Van der Schueren, I. Steyaert, B. De Schoenmaker, K. De Clerck, Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system, *Carbohydrate Polymers*, 88 (2012) 1221-1226.
- [124] Y. Li, J. Wang, D. Qian, L. Chen, X. Mo, L. Wang, Y. Wang, W. Cui, Electrospun fibrous sponge via short fiber for mimicking 3D ECM, *Journal of Nanobiotechnology*, 19 (2021) 131.
- [125] K. Ye, D. Liu, H. Kuang, J. Cai, W. Chen, B. Sun, L. Xia, B. Fang, Y. Morsi, X. Mo, Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds displaying bone morphogenetic protein-2-derived peptides for the promotion of osteogenic differentiation of stem cells and bone regeneration, *J Colloid Interface Sci*, 534 (2019) 625-636.

- [126] M. Fadaie, E. Mirzaei, B. Geramizadeh, Z. Asvar, Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties, *Carbohydr Polym*, 199 (2018) 628-640.
- [127] F. Senturk, S. Cakmak, I.C. Kocum, M. Gumusderelioglu, G.G. Ozturk, GRGDS-conjugated and curcumin-loaded magnetic polymeric nanoparticles for the hyperthermia treatment of glioblastoma cells, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 622 (2021) 126648.
- [128] D. Liang, Z. Lu, H. Yang, J. Gao, R. Chen, Novel Asymmetric Wettable AgNPs/Chitosan Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation, *ACS Appl Mater Interfaces*, 8 (2016) 3958-3968.
- [129] Y. Huang, N. Dan, W. Dan, W. Zhao, Reinforcement of Polycaprolactone/Chitosan with Nanoclay and Controlled Release of Curcumin for Wound Dressing, *ACS Omega*, 4 (2019) 22292-22301.
- [130] A. Sadeghi, F. Moztaizadeh, J. Aghazadeh Mohandesi, Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121 (2019) 625-632.
- [131] I.M. Adel, M.F. ElMeligy, A.A. Abdelkhalek, N.A. Elkasabgy, Design and characterization of highly porous curcumin loaded freeze-dried wafers for wound healing, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 164 (2021) 105888.
- [132] A.S. Çakmak, Investigation of Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with Scaffolds Supported by Biophysical and Biochemical Stimulants, Department of Bioengineering, Hacettepe University, 2014, pp. 189.
- [133] M. Ranjbar-Mohammadi, S.H. Bahrami, Electrospun curcumin loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gum tragacanth nanofibers for biomedical application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84 (2016) 448-456.
- [134] W. Chen, S. Chen, Y. Morsi, H. El-Hamshary, M. El-Newhy, C. Fan, X. Mo, Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8 (2016) 24415-24425.



- [135] S. Bertoldi, S. Farè, M.C. Tanzi, Assessment of Scaffold Porosity: The New Route of Micro-CT, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 9 (2011) 165-175.
- [136] P. Kazimierczak, K. Palka, A. Przekora, Development and Optimization of the Novel Fabrication Method of Highly Macroporous Chitosan/Agarose/Nanohydroxyapatite Bone Scaffold for Potential Regenerative Medicine Applications, *Biomolecules*, 9 (2019).
- [137] A.A. Chaudhari, K. Vig, D.R. Baganizi, R. Sahu, S. Dixit, V. Dennis, S.R. Singh, S.R. Pillai, Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2016) 1974.
- [138] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 328-343.
- [139] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol Pharm*, 67 (2010) 217-223.
- [140] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52 (1963) 1145-1149.
- [141] J.H. Kim, S.H. Park, S.W. Nam, H.J. Kwon, B.W. Kim, W.J. Kim, Y.H. Choi, Curcumin stimulates proliferation, stemness acting signals and migration of 3T3-L1 preadipocytes, *Int J Mol Med*, 28 (2011) 429-435.
- [142] The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Engineering*, 7 (2001) 679-689.
- [143] V. Vasioukhin, E. Fuchs, Actin dynamics and cell–cell adhesion in epithelia, *Current Opinion in Cell Biology*, 13 (2001) 76-84.
- [144] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal, Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises, *Molecular Pharmaceutics*, 4 (2007) 807-818.
- [145] T. Ma, Y. Li, S.-T. Yang, D.A. Kniss, Effects of pore size in 3-D fibrous matrix on human trophoblast tissue development, *Biotechnology and Bioengineering*, 70 (2000) 606-618.