

**KONTROLLÜ BOR SALAN BİYOBOZUNUR YARA
ÖRTÜLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
DERMAL/MUKOZAL REJENERASYONDA
KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

**DEVELOPMENT OF CONTROLLED BORON
RELEASING BIODEGRADABLE WOUND DRESSINGS
AND INVESTIGATION OF THEIR USAGES IN
DERMAL/MUCOSAL REGENERATION**

ÖZGE EKİN AKDERE

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

KONTROLLÜ BOR SALAN BİYOBOZUNUR YARA ÖRTÜLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE DERMAL/MUKOZAL REJENERASYONDA KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Özge Ekin AKDERE

Doktora, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Aralık 2022, 144 sayfa

Sunulan tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından TSA-2017-12857 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, oral mukoza yaralarının en yaygını olan oral mukozitlerin ve deri yaralarının en yaygını olan ayak ülserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere, yara iyileşmesinde terapötik etkilere sahip bor (B) ve nanokil olarak montmorillonit (MMT) içeren fiber matrikslerin geliştirilmesi ve yara iyileşme basamaklarında görev alan keratinosit ve fibroblast hücreleriyle etkileşiminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, terapötik iyonlar arasında yer alan borun farklı derişimlerinin, hücre kültür kaplarında kültüre edilen insan endotel, keratinosit ve fibroblast hücrelerinin davranışları üzerindeki etkileri, yara iyileşmesi açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 10 ve 20 µg/mL B derişimlerinde endotel hücrelerinin damar oluşturma kapasitelerinin arttığını, keratinosit ve fibroblast hücre göçünün bir miktar hızlandığını göstermiştir. Aynı zamanda bu bor miktarı, fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu da desteklemiştir. Hücre kültür ortamlarına 20 µg/mL'ye kadar eklenen

borun, keratinosit ve fibroblast hücrelerinin morfolojisi ve canlılığı üzerine belirgin bir etkisi bulunmamıştır.

Çalışmanın 2. aşamasında montmorillonitlere bor adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Adsorplanan ortalama B miktarı 2847 µg/g MMT olarak hesaplanmış ve ilk 24 saatte borun yaklaşık %87'sinin salındığı tespit edilmiştir.

Üçüncü aşamada, MMT ve B taşıyan MMT (B-MMT) içeren PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit)) fiber matrikslerin elektroçirme ile üretimi gerçekleştirilmiş ve keratinosit hücrelerinin kültürasyonu yapılmıştır. Fiber matrikslere MMT katkısının gerçekleştirildiği XRD analizi ile gösterilmiştir. Yüzde 20 oranında B-MMT ile katkılanmış PLGA fiber matrikslerin 9 gün boyunca bor salımına devam ettikleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, PLGA bazlı fiber matrikslerde ortaya çıkan büzüşme problemi gözenekliliğin azalmasına ve yapının rijit bir hale dönüşmesine yol açarak hücre kültürünün başarısını olumsuz yönde etkilemiştir.

Çalışmanın son aşamasında, MMT ve B-MMT katkılı PLA (poli(laktik asit)) bazlı fiber matriksler üretilmiş, karakterizasyon ve hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Farklı miktarlarda B-MMT katkısının fiber matrikslerin morfolojisi, bozunma davranışı ve kimyasal/fiziksel özelliklerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Antibakteriyel testler, %10 oranında B-MMT katkılı PLA matrikslerin, gram pozitif bakteri *S.aureus* suşunda bakterisidal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Mukoadezyon testi ile, %10 oranında B-MMT içeren PLA fiber matriksin diğer gruplara göre daha mukoadeziv olduğu belirlenmiştir. Keratinosit ve fibroblast hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarında, keratinositlerin proliferasyonunun PLA grubunda en yüksek olduğu bulunmuştur. Fibroblast hücrelerinde ise %10 oranında MMT ve B-MMT içeren PLA bazlı fiber matrikslerde en yüksek proliferasyon değerlerine ulaşılmıştır. Canlı/ölü boyama analizleri, her iki hücre tipi için de PLA grubunda ölü hücrelerin daha yoğun olduğunu ortaya koymuştur. Yara iyileşmesi için önemli genlerin ifadeleri RT-PCR ile incelenmiştir. B-MMT katkılı PLA fiber matrikslerde keratinositlerin damarlanma ile ilişkili büyüme faktörlerine ait gen ifadelerinin arttığı, aynı zamanda hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin korunduğu belirlenmiştir. B-MMT katkılı PLA fiber matrikslerin fibroblastlar üzerindeki en belirgin etkisi ise, hücre dışı matriks üretimi ile ilişkili genlerin ifadesindeki artış ile ortaya konmuştur. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak, B-MMT katkılı PLA fiber matrikslerin yara iyileşme yanıtını olumlu yönde

etkilediği, böylelikle hem deri hem de oral mukoza rejenerasyonu için terapötik işleve sahip biyoaktif bir yara örtüsü olabileceği değeriendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bor, nanokil, yara örtüsü, deri doku mühendisliği, oral mukozit, oral mukoza doku mühendisliği.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CONTROLLED BORON RELEASING BIODEGRADABLE WOUND DRESSINGS AND INVESTIGATION OF THEIR USAGES IN DERMAL/MUCOSAL REGENERATION

Özge Ekin AKDERE

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

December 2022, 144 pages

This thesis study has been financially supported by Hacettepe University Research Fund (Project No: TSA-2017-12857).

The following thesis presents the development of fiber matrices containing boron (B), which has therapeutic effects in wound healing, and montmorillonite (MMT) as nanoclay. These are specifically used in the treatment of oral mucositis and foot ulcers, which are the most common of oral mucosal and skin wounds, respectively. This study aimed to evaluate the interaction of fiber matrices containing B and MMT with keratinocyte and fibroblast cells which are involved in wound healing process.

In the first phase of the thesis study, the effects of different concentrations of boron (a therapeutic ion) were evaluated in human endothelial, keratinocyte and fibroblast cells on cell culture dishes for their wound healing potential. The results showed that the vascular-forming capacity of endothelial cells increased at 10 and 20 µg/mL B concentrations, and keratinocyte and fibroblast cell migration was somewhat accelerated. At the same time, this amount of boron supported the proliferation of fibroblast cells. An

addition of up to 20 µg/mL of boron to cell culture media had no significant effect on the morphology and viability of keratinocytes and fibroblasts.

In the second stage of the study, boron adsorption was carried out on montmorillonites. On average, 2847 µg/g MMT of B was adsorbed and it was determined that approximately 87% of the boron was released in the first 24 hours.

In the third step, PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) fiber matrices containing MMT and B-doped MMT (B-MMT) were produced by electrospinning and cultured keratinocyte cells. XRD analysis ensured MMT contribution to the fiber matrices. It was determined that PLGA fiber matrices doped with 20 percent B-MMT continued to release boron for 9 days. However, the shrinkage behaviour of PLGA-based fiber matrices caused a decrease in porosity and a rigid structure, negatively affecting the success of cell cultures.

In the last stage of the study, PLA (poly(lactic acid)) based fiber matrices with doped MMT and B-MMT were produced, characterized and cell culture studies were conducted. The effects of different amounts of B-MMT additives on the morphology, degradation behavior and chemical/physical properties of fiber matrices were evaluated. Antibacterial tests have shown that 10% B-MMT added PLA matrices have a bactericidal effect on gram-positive bacteria *S.aureus* strains. It was determined by a mucoadhesion test that PLA fiber matrices containing 10% B-MMT were more mucoadhesive than the other groups. In cell culture studies with keratinocytes and fibroblast cells, the proliferation of keratinocytes was highest in the PLA group. In fibroblast cells, the highest proliferation values were achieved in PLA-based fiber matrices containing 10% MMT and B-MMT. Live/dead staining analyses revealed that dead cells were more intense in the PLA group for both cell types. Expressions of genes important for wound healing were examined by RT-PCR. It was determined that gene expressions of vascularization-related growth factors of keratinocytes increased in B-MMT doped PLA fiber matrices, and simultaneously, the proliferation capacity of the cells was preserved. The increase in the expression of genes associated with extracellular matrix production particularly demonstrated the most significant effect of B-MMT doped PLA fiber matrices on fibroblasts. In light of the findings, the study suggests that B-MMT doped PLA fiber matrices positively affected the wound healing response. Thus, B-MMT doped PLA fiber

matrices might has potential as a bioactive wound dressing with potential therapeutic function for both skin and oral mucosa regeneration.

Keywords: Boron, nanoclay, wound dressing, skin tissue engineering, oral mucositis, oral mucosa tissue engineering.



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmasının yürütülmesinde **TSA-2017-12857** numaralı Kapsamlı Araştırma Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne ve doktora sürecimde bana **2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı** kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK**'a teşekkür ederim.

Hayatımın büyük bir bölümünü oluşturan bilimsel yolculuğumun ilk gününden bu yana danışmanlığımı üstlenen, desteği ve bilgisiyle çalışmamı taçlandıran, düşünürken kendi sınırlarımı aşmamı sağlayan, beni her zaman yüreklendiren ve en önemli öğrencisi olmanın bana kattıklarının yanında sohbetleriyle de hayatıma dokunan çok değerli hocam **Prof.Dr. Menemşe Gümüşderelioglu**'na sonsuz saygı, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının konu seçiminde beni yönlendiren, güçlü ve ilkel akademik duruşunun yanı sıra naif kişiliğiyle örnek aldığım, değerli hocam **Prof.Dr. Arlin S. Kiremitçi**'ye, tez çalışması boyunca her zaman ılımlı ve anlayışlı yaklaşımlarıyla değerli önerilerini sunan tez izleme komitesi üyeleri hocalarım **Prof.Dr. Mehlika Pulat** ve **Prof.Dr. Mustafa Türk**'e, tez çalışmamda yer alan hücre kaynaklarına ulaşmamda desteklerini esirgemeyen, **Prof.Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan**'a, **Prof.Dr. Mehtap Kılıç Eren**'e, **Doç.Dr. Betül Çelebi Saltık**'a, mukoadezyon analizi konusundaki bilgi ve olanaklarını büyük bir samimiyetle paylaşan değerli **Prof.Dr. Füsün Acartürk**'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel yolculuğumun en kıymetli hediyeleri olan, sevgili dostlarım ve aynı zamanda fahri danışmanlarım; **Dr. Anıl Sera Çakmak**'a her aşamada sağladığı içten desteği için, **Dr. Soner Çakmak**'a bakış açımı değiştiren yorumları ve katkıları için, **Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e tezimin kilit noktasına ışık tuttuğu için, **Dr. Merve Çapkın Yurtsever**'e doktora tez defterimi hediye etmesiyle başlayan katkısına hiç ara vermeden devam ettiği için, **Dr. Murat Şimşek**'e bana hem elektroegirme konusundaki deneyimlerini aktardığı hem de bana abi olduğu için ve **Dr. Damla Çetin Altındal**'a hesaplamalarımın en güvenilir doğrulayıcısı olduğu için, kısacası herşey için, hayatımda hep olmaları umuduyla yüreğimden sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans serüvenimden bugüne yoldaşlık ettiğim canım arkadaşım **Dr. Gökçe Kaynak Bayrak**'a ve farklılıklarımızın uyumundan beslenen arkadaşlığımız için **Dr. Burcu Sarıkaya**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmaların yükünü kaldırmadığım her an yardımına seve seve koşan benim güzel yürekli oda arkadaşım, kardeşim **Sena Koç**'a, "yapamıyorum" dediğimde "yapacağız" diyerek birden çözümleri hazırlamaya başlayan ve dokunduğu deneylerime enerjisiyle can veren canım **Elvan Konuk**'a, yolculuğumun sonlarında tanıştığım ama sanki yıllardır hayatımda olduğunu hissettiğim canım **Begüm Sargon**'a, tezimin antibakteriyel çalışmalarının tamamlanmasında beni içtenlikle destekleyen **Demet Çakır** ve **Tülay Selin Erkut**'a, ihtiyacım olduğunda koşma yardım eden **Tuğçe Gültan**'a, doktora çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım **Prof.Dr. Fatma Yülek**'e, **Doç.Dr. Gamze Dereli Can**'a, **Dr. Betül Seher Uysal**'a ve isimlerini sayamadığım tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu** üyesi arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her ihtiyacım olduğunda yanımda olan ve sıcacık yuvalarına ne zaman gitsem huzur bulduğum, canım **Müjgan Teyzem, Ekber Amcam** ve bir "abla" demesi bile yüreğimi ısıtan güzel gözlü kardeşim **Erdem**'ciğime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana asla pes etmemeyi ve nerede, nasıl, ne zaman ve hangi soruları soracağımı öğreterek bilimsel bakış açımın temellerini atmamı sağlayan, hayallerimin peşinden benimle koşan canım **Annem** ve **Babam**'a, sadece kendisi değil dünyaya getirdiği güzel kızı, benim göz bebeğim **Lenam**'la ve doğmasını heyecanla beklediğimiz oğluyla hayatıma anlam katan olmazsa olmazım **Ablam**'a her zaman ve sonsuz destekleri için minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatta mucizelere yeniden inanmamı sağlayan hem kendime hem dünyaya bakış açımı değiştiren, belki de tez sürecinde en büyük sabrı göstererek evliliğimizin ardından beni 5 yıl boyunca hiç üzmeden, incitmeden ve büyük bir aşkla bekleyen canım eşim, yol arkadaşım, **Musa Akdere**'ye tüm zamanlarımda yanımda olduğu ve elimi hiç bırakmadığı için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Deri ve Oral Mukoza.....	5
2.1.1. Deri Dokusunun Histolojisi	6
2.1.2. Oral Mukoza Dokusunun Histolojisi	7
2.2. Deri ve Oral Mukoza Dokusunda Yara İyileşmesi.....	8
2.3. Deri ve Oral Mukoza Hasarları	10
2.3.1. Deri Kayıpları	10
2.3.2. Oral Mukozitler.....	10
2.4. Deri ve Oral Mukoza Hasarlarında Geleneksel Tedavi Yaklaşımları	12
2.4.1. Deri Dokusu Hasarları/Kayıplarında Tedaviler	13
2.4.2. Oral Mukoza Hasarında Tedaviler.....	14
2.5. Deri ve Oral Mukoza Doku Mühendisliği.....	15
2.5.1. Deri Doku Mühendisliği	15
2.5.2. Oral Mukoza Doku Mühendisliği	19
2.5.3. Yara Örtüsü Üretiminde Polimerler ve Fabrikasyon Yöntemleri	20
2.5.4. Doku Mühendisliğinde Bor Kullanımı	24
2.5.5. Doku Mühendisliğinde Nanokillerin Önemi.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Malzemeler	29

3.2. Borun İnsan Endotel, Dermal Keratinosit ve Dermal Fibroblast Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi İçin Yapılan <i>İn vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	32
3.2.1. HUVEC'ler ile Bor'un <i>İn vitro</i> Tübül Oluşumuna Etkisi	32
3.2.2. HS2'ler ile <i>İn-vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	33
3.2.3. BJ'ler ile <i>İn vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	38
3.3. Nanokillere Bor Adsorpsiyonu	39
3.3.1. Bor Adsorpsiyonunda Etken Faktörlerin Belirlenmesi	40
3.3.2. Kilin Katyon Değişim Kapasitesinin Belirlenmesi ile Yapılan Adsorpsiyon Çalışmaları.....	42
3.4. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları	44
3.4.1. Elektroegirme ile PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi.....	44
3.4.2. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Karakterizasyonu	45
3.4.3. HS2 Hücrelerinin PLGA Bazlı Fiber Matrisler Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi	47
3.5. PLA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları	48
3.5.1. Elektroegirme ile PLA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi.....	48
3.5.2. PLA Bazlı Fiber Matrislerin Karakterizasyonu	48
3.5.3. HS2 ve İDF Hücrelerinin PLA Bazlı Fiber Matrisler Üzerindeki Davranışlarının incelenmesi	51
3.6. İstatistiksel Analiz.....	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. Borun İnsan Endotel, Dermal Keratinosit ve Dermal Fibroblast Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi İçin Yapılan <i>İn vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	55
4.1.1. HUVEC'ler ile Bor'un <i>İn vitro</i> Tübül Oluşumuna Etkisi	55
4.1.2. HS2 ve BJ'ler ile <i>İn vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	58
4.2. Nanokillere Bor Adsorpsiyonu	69
4.2.1. Bor Adsorpsiyonunda Etken Faktörlerin Belirlenmesi	69
4.2.2. KDK'nın Belirlenmesi ve Yüksek Derişimlerde Yapılan Adsorpsiyon Çalışmaları.....	72
4.3. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları	73
4.3.1. Elektroegirme ile PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Karakterizasyonu	74

4.3.2. HS2 Hücrelerinin PLGA Bazlı Fiber Matrisler Üzerindeki Davranışının İncelenmesi	82
4.4. PLA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları.....	85
4.4.1. Elektroegirme ile PLA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi	85
4.4.2. PLA Bazlı Fiber Matrislerin Karakterizasyonu	86
4.4.3. HS2 ve İDF Hücrelerinin PLA Bazlı Fiber Matrisler Üzerindeki Davranışlarının incelenmesi.....	100
5. YORUM.....	121
6. KAYNAKLAR.....	127
EKLER.....	138
EK 1: Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama	138
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	140
ÖZGEÇMİŞ.....	141

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Deri ve oral mukozanın yapısal ve işlevsel farklarının şematik gösterimi ([20]'den değiştirilerek).	6
Şekil 2.2.	Deri ve oral mukozada yara iyileşmesinin karşılaştırılması ([24]'den değiştirilerek).	9
Şekil 2.3.	Oral mukozit patobiyolojisi: (a) Kemo ve radyoterapiye bağlı hasarlar DNA çift sarmalında kırılmalara neden olur, hücrel apoptoz tetiklenir ve hasarla ilişkili moleküler yapılar (DAMPs) salınır. Sitokinlerin NF- κ B aracılı transkripsiyonu desteklenir (b) hasar sinyalinin artmasıyla salınan TNF- α , MAPK yolağının aktivasyonuna neden olur (c) sub-mukozada bütünlüğün bozulmasıyla mikroorganizma istilası başlar, inflamasyon ve ülser ortaya çıkar (d) çeşitli kemoterapi ilaçlarıyla tetiklenen mukozit görüntüleri ([33]'den değiştirilerek).	12
Şekil 2.4.	Oral mukozitlerin tedavisinde kullanılan klinik yaklaşımlar (BioRender.com ile oluşturuldu).	15
Şekil 2.5.	Elektroegirme yönteminde önemli sistem parametreleri ve fiber yara örtülerinin istenilen özellikleri ([42, 55]'den değiştirilerek).	21
Şekil 2.6.	Kil tabakalarının şematik gösterimi, sınıflandırılması ve biyomedikal alanda kullanımları ([78]'den değiştirilerek BioRender.com ile oluşturuldu).	26
Şekil 3.1.	ANSI/ASTM C837-76 standardına göre yapılan metilen mavisi deneyi. ...	43
Şekil 3.2.	Tekstür analiz cihazı ile yapılan mukoadesyon test düzeneği.	50
Şekil 4.1.	Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında kültüre edilen HUVEC'ler ile yapılan <i>in vitro</i> tübül oluşumu çalışmasına ait optik mikroskop görüntüleri ve Wimasis yazılımı ile yapılan analizler sonucu elde edilen grafikler (İstatistiksel anlamlı farklılık, n=3: kontrol grubuna göre $\bullet p \leq 0,05$, $\bullet\bullet p \leq 0,01$; gruplar arasında $*p \leq 0,05$).	57
Şekil 4.2.	Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile 14 gün boyunca kültüre edilen (a) HS2 ve (b) BJ hücrelerinin MTT analizine ait grafikler (İstatistiksel anlamlı farklılık, n=4: aynı gün farklı gruplar arasında, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).	59

- Şekil 4.3.** Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile kültüre edilen HS2 ve BJ hücrelerinin canlı/ölü ve Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI floresan boyama görüntüleri. Canlı/ölü boyamada kırmızı renk ölü, yeşil renk canlı hücreleri göstermektedir. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyamada ise, yeşil renk F-aktin filamentlerini, mavi renk ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir. ...61
- Şekil 4.4.** Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında HS2 ve BJ hücrelerinin göç davranışlarının *in vitro* yara modeli ile incelenmesi. Hücreler belirlenen zamanlarda fikse edildikten sonra Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI ile boyanmıştır. Yeşil renk F-aktin filamentleri, mavi renk ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir (sol). Elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı ile analiz edilerek, oluşturulan yara bölgesine göç eden hücrelerin kapladığı alanın yüzde cinsinden grafikleri (sağ). 63
- Şekil 4.5.** Farklı derişimlerdeki borun HS2 ve BJ hücre kültürlerinde hücre içi ROS aktivitesi ve senesens üzerine etkisinin sırasıyla, DCF-DA floresan işaretleme ve senesens boyama kiti ile analizi (sol). DCF-DA floresan işaretleme sonrası floresan şiddetinin kantitatif analizine ait grafikler (n=3, istatistiksel anlamlı farklılık: * $p \leq 0,05$).....65
- Şekil 4.6.** Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında gerçekleştirilen HS2 kültürasyonunun 7. ve 14. gününde *KRT14*, *FGF2*, *VEGF* ve *PDGF* gen ifadelerinin RT-PCR analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmesine ait grafikler (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin kontrol grubuna göre kat farkını göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, aynı grup farklı günlerde $\bullet p \leq 0,05$, $\bullet\bullet p \leq 0,01$; aynı gün farklı gruplar arasında * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). 67
- Şekil 4.7.** Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında gerçekleştirilen BJ kültürasyonunun 7. ve 14. gününde *COL1A1*, *LAMA5*, *COL4*, *VEGF*, *FGF2* ve *PDGF* gen ifadelerinin RT-PCR analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmesine ait grafikler (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin kontrol grubuna göre kat farkını göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, aynı grup farklı günlerde $\bullet p \leq 0,05$, $\bullet\bullet p \leq 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p \leq 0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p \leq 0,0001$; aynı gün farklı gruplar arasında * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$). 68

Şekil 4.8. Ultra saf suda çözünen borik asitin oda sıcaklığında azometin-H ile reaksiyonu sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.	70
Şekil 4.9. MMT ile yapılan bor adsorpsiyon çalışmalarında adsorplanan bor miktarını etkileyen değişkenlere ait grafikler (a) çözeltideki bor konsantrasyonu, (b, d ve e) adsorpsiyon süresi, (c) çözeltinin kile oranı ve (d) kilin kalsiyum ile modifiye edilmesi.....	72
Şekil 4.10. Elektroeğirme ile üretilen PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrikslere ait SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım grafikleri.....	75
Şekil 4.11. PLGA ve PLGA/MMT fiber kimyasal ve kristalografik karakterizasyon sonuçları a) ATR-FTIR spektrumu, b) XRD spektrumu (∇, karakteristik MMT piki; ●, amorf PLGA piki) ve c) su temas açısı ölçümleri.	76
Şekil 4.12. PLGA/20 B-MMT fiber matrikslerden borun salım kinetiği.....	79
Şekil 4.13. Sterilizasyon işlemi sırasında büzüşen PLGA fiber matriksler (sol) ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin büzüşme öncesi ve yapılan 3 farklı muamele sonrası SEM görüntüleri (sağ).....	80
Şekil 4.14. Hiçbir muamele yapılmayan ve Pluronic F127 uygulaması (50°C 2 sa + Pluronic F127'de 70°C 3 sa) yapılan PLGA ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin sterilizasyon sonrasında değişen fiber morfolojilerini gösteren SEM analizi.....	82
Şekil 4.15. PLGA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin 14 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3, aynı gün farklı gruplar arasında * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$; aynı günde PLGA grubu kontrol olarak kabul edildiğinde ● $p \leq 0,05$, ●● $p \leq 0,01$, ●●● $p \leq 0,001$, ●●●● $p \leq 0,0001$).	83
Şekil 4.16. PLGA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 1. ve 7. gününde SEM analiz görüntüleri.	84
Şekil 4.17. PLGA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 7. ve 14. gününde hücre iskeleti/çekirdek boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi renkle boyanmıştır).....	85
Şekil 4.18. Yüzde 8 (w/v)'lik PLA çözeltisi kullanılarak hazırlanan PLA bazlı fiber matrikslerin SEM analizi. Boncuk yapıları beyaz çizgiler ile daire içine alınarak gösterilmiştir.	86

Şekil 4.19. Yüzde 10 (w/v)'luk PLA çözeltisi kullanılarak hazırlanan PLA bazlı fiber matrikslerin SEM analizi. Yeşil oklar ile fiberler içerisindeki MMT ya da B-MMT'ler işaret edilmektedir.	87
Şekil 4.20. PLA bazlı fiber matrikslerin ortalama çapları ve çap dağılım grafikleri.	88
Şekil 4.21. PLA bazlı fiber matrikslerin fiber çaplarının karşılaştırılması.....	89
Şekil 4.22. PLA bazlı fiber matrikslere ait (a) ATR-FTIR ve (b) XRD spektrumu.	90
Şekil 4.23. PLA bazlı fiber matrikslerin 21 günlük <i>in vitro</i> hidrolitik ve enzimatik bozunma analizi sonundaki fotoğrafları ve SEM görüntüleri.	95
Şekil 4.24. PLA fiber matriksler ile koyun bukkal mukozası kullanılarak gerçekleştirilen <i>in vitro</i> mukoadezyon testi (a) Tekstür analizi ile elde edilen güç-zaman grafiği ve analiz parametreleri (b) yapay tükürük sıvısında ve (c) fosfat tampon çözeltisinde mukoadezyon test sonucuna ait grafikler (İstatistiksel anlamlılık; n=3, kontrol grubu PLA olarak alındığında, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).	98
Şekil 4.25. <i>E.coli</i> ve <i>S.aureus</i> bakteri suşlarına karşı PLA fiber matrikslerin antibakteriyel aktivite grafikleri (n=3).	100
Şekil 4.26. PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrikslere ekilen BJ hücrelerinin MTT analizi ve SEM görüntüleri.....	101
Şekil 4.27. PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrikslerdeki ve fiber matrikslerin kaldırıldığı TCPS yüzeylerdeki BJ ve HS2 hücrelerinin MTT analizi.	102
Şekil 4.28. PLA, PLA/10 MMT, PLA/10 B-MMT, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT fiber matrikslerde kültüre edilen BJ ve HS2 hücrelerinin MTT analizi.....	102
Şekil 4.29. Yüzde 10 (w/v) dekstran içeren besi ortamının BJ hücrelerinin tutunma davranışına olan etkisinin optik mikroskop ve MTT analizi ile değerlendirilmesi.	104
Şekil 4.30. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin 21 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3, aynı gün farklı gruplar arasında * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).	106
Şekil 4.31. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde SEM analiz görüntüleri.....	107

Şekil 4.32. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7. ve 14. gününde Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi boyanmıştır).	108
Şekil 4.33. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır).	110
Şekil 4.34. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır).	111
Şekil 4.35. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 21. gününde Hematoksilen & Eozin boyama görüntüleri (Hematoksilen boyası hücre çekirdeğini morumsu mavi renkte boyarken, eozin, ECM ve sitoplazmayı pembe renkte boyamaktadır).	112
Şekil 4.36. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen İDF hücreleri tarafından sentezlenen COL1A1 ve FN yapılarının kültürasyonların 21. gününde immunohistokimyasal boyamalarla gösterilmesi.....	114
Şekil 4.37. HS2 hücrelerinin PLA bazlı fiber matrikslerde kültürasyonunun 7. ve 21. gününde gen ifadelerinin RT-PCR ile kantitatif olarak değerlendirilmesi (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin PLA grubuna göre kat farkını göstermektedir (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).	119
Şekil 4.38. İDF hücrelerinin PLA bazlı fiber matrikslerde kültürasyonunun 7. ve 21. gününde gen ifadelerinin RT-PCR ile kantitatif olarak değerlendirilmesi (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin PLA grubuna göre kat farkını göstermektedir (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).	120

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yara örtülerinin sınıflandırılması ([42]'den değiştirilerek).	17
Çizelge 2.2. Ticari olarak ulaşılabilen insan deri eşleniklerinden bazı örnekler.	19
Çizelge 2.3. Deri ve oral mukoza mühendisliği prensipleri ile hazırlanan biyoaktif yara örtülerinden bazıları.	23
Çizelge 2.4. Nanokil katkılı polimerik doku iskeleleri.	28
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler.	30
Çizelge 3.2. HS2 hücrelerinin RT-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.	37
Çizelge 3.3. BJ hücrelerinin RT-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.	39
Çizelge 3.4. Adsorpsiyon deneylerine ait parametreler.	42
Çizelge 4.1. MMT'ye bor adsorpsiyon ve salımının ICP-MS analizi sonuçları.	73
Çizelge 4.2. PLGA bazlı fiber matrikslerin elektroğirme koşulları.	74
Çizelge 4.3. PLGA bazlı fiber matrikslerin camsı geçiş sıcaklıkları ve bozunma yüzdeleri.	78
Çizelge 4.4. Fiber matrikslerin büzüşme yüzdeleri.	81
Çizelge 4.5. PLA bazlı fiber matrikslere ait DSC ve TG analiz sonuçları.	91
Çizelge 4.6. Hücre kültüründe kullanılan PLA/B-MMT fiber matrikslerinin iki farklı yöntemle hesaplanan bor miktarları.	92
Çizelge 4.7. PLA bazlı membranların su temas açıları.	92
Çizelge 4.8. PLA bazlı fiber matrikslere ait gerilme-gerinim eğrilerinden elde edilen çekme dayanımı, kopma noktasındaki uzama ve elastik modül değerleri.	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ag^+	Gümüş iyonu
Al^{3+}	Aluminyum iyonu
B^{3+}	Bor iyonu
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu
Co^{2+}	Kobalt iyonu
Cu^+, Cu^{2+}	Bakır iyonu
Fe^{2+}, Fe^{3+}	Demir iyonu
Li^+	Lityum iyonu
Mg^{2+}	Magnezyum iyonu
Si^{4+}	Silisyum iyonu
Sr^{2+}	Stronsiyum iyonu
Zn^{2+}	Çinko iyonu
BO_3^{3-}	Borat anyonu
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
H_3BO_3	Borik asit
KCl	Potasyum klorür
$Si(OH)_4$	Silisyum oksit
SiO_4^{4-}	Silikat anyonu
C_e	Denge bor derişimi
C_i	Başlangıç bor derişimi
q	Kilin adsorpsiyon kapasitesi
Z_i	İyon yükü
®	Telif hakkı alınmış

TM	Ticari marka
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Ağırlık/hacim oranı
w/w	Ağırlık/ağırlık oranı
α	Alfa
β	Beta
ε	Epsilon
θ	Teta
κ	Kappa

Kısaltmalar

B	Bor
BJ	İnsan dermal fibroblast hücre hattı
BSA	Sığır serum albumin
COL1A1	Kollajen Tip 1A1
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medium/besin karışımı F12
DMEM-HG	Yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medium
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorit
EthD-1	Etidyum homodimer-1
EtOH	Etil alkol
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2
FN	Fibronectin
FT-IR	Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometre
HMDS	Hekzametildisilazan
HS2	İnsan dermal keratinosit

HUVEC	İnsan göbek kordonu toplar damar endoteli
İDF	İnsan dermal fibroblast
KDK	Katyon değişim kapasitesi
KRT-14	Keratin-14
LAMA-5	Laminin-5
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMT	Montmorillonit
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür
NHS	N-hidroksisülfosüksinimit
OM	Oral mukozit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PBS+	Ca ²⁺ ve Mg ²⁺ içeren PBS
PBS-A	%1 (w/v) BSA içeren PBS
PCL	Poli(ε-kaprolakton)
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVC	Poli(vinil klorür)
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TP63	Tümör protein 63
UV	Mor ötesi ışık
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
XRD	X-ışını kırınımı

1. GİRİŞ

Deri ve mukoza, vücudumuzu dışarıdan ve içeriden sararak hayati organlarımızı korumak üzere özelleşmiş en büyük organlarımızdır. Temel olarak benzer embriyonik tabakalardan köken alan deri ve mukoza, yapısal ve işlevsel olarak bazı farklılıklara sahip olsalar da homeostazın sağlanması ve sürdürülmesi görevini birlikte üstlenirler. Dış ortam ile aramızda bir bariyer görevi bulunan bu dokular, yumuşak ve elastik özellikleri nedeniyle, fiziksel, kimyasal ya/ya da termal hasarlara karşı oldukça hassastırlar. Deri ve mukoza dokusunun çeşitli nedenlerle bütünlüğünün bozulması durumu “yara” olarak tanımlanır. Yaralar, iyileşme sürecine bağlı olarak “akut” ya da “kronik” olmak üzere ikiye ayrılır. Akut yaralar, bir kaza ya da cerrahi işlem sonrasında oluşan, derinliğine göre değişmekle birlikte iyileşme süresi tahmin edilebilen (8-12 hafta) yaralardır. Kronik yaralar ise, yara iyileşme mekanizmasının bozulduğu, diyabet gibi sistemik hastalıklar ya da kanser gibi tedavisinde kemoterapötik ilaçların kullanımını gerektiren durumlarda ortaya çıkar. Artan dünya nüfusu ile birlikte diyabetin 2045 yılına kadar 700 milyon insanı etkileyeceği ve buna bağlı kronik ayak ülserlerinin görülme sıklığında artış olacağı bildirilmiştir. Kronik yaralar hem hastanın yaşam kalitesini etkileyen hem de ülke ekonomilerini tehdit eden sessiz bir salgın niteliğindedir [1-3].

“Oral mukozit” tanımı, ilk olarak 1980’li yılların sonlarına doğru, radyasyon, kemoterapi ve kemik iliği nakli sonrasında hastalarda görülen yan etkilerden biri olan “oral mukoza ülserlerini” tanımlamak için kullanılmıştır. Kemoterapötik ajanlar, hızlı ve kontrolsüz büyüyen hücrelerin yok edilmesini amaçlarken, oral mukoza epiteli gibi sürekli mekanik stres altında olmaları nedeniyle hızlı çoğalma yeteneğine sahip sağlıklı hücrelerin de çoğalma hızlarının yavaşlamasına/ölmesine yol açarlar. Ağrı, eritem ve ülser ile karakterize olan oral mukozitler, hastalarda tedavinin kesilmesinin yanı sıra, yetersiz beslenme ve enfeksiyon gibi ikincil risklerin doğmasına da neden olurlar [4].

Normal iyileşme basamaklarının görülmediği yaralarda, mikroorganizma invazyonunun engellenmesi için alınan ilk önlem, yara bölgesinin kapatılmasıdır. Eski çağlardan günümüze, özellikle deri dokusu yaralanmalarında bu ihtiyacı karşılamak için doğal ya da sentetik birçok malzemeden yararlanılmıştır. Yara örtüsü olarak, hayvansal yağlar, bal, süt ve bitkilerin kullanılması ile başlayan, sargı bezi, polimerik filmler, köpükler ve jellerin kullanılmasıyla devam eden bu süreç, “doku mühendisliği” yaklaşımlarının ortaya

çıkmasıyla farklı bir yön ve ivme kazanmıştır. Doku mühendisliğinin yara iyileşmesindeki hedefi, yalnızca yaranın kapatılmasından öte, bu süreçte yer alan hücrelere ve yara yatağına gerekli desteği vererek, rejenerasyonu sağlamaktır. Yara dokusunun rejenerasyonu, organize olamayan hücre dışı matriksin (ECM) skar dokusu ile sonuçlanan iyileşmesini değil, eski mekanik ve fiziksel özelliklerine sahip dokunun yeniden oluştuğu bir iyileşmeyi ifade eder [5]. Yara bölgesinin ihtiyaçları doğrultusunda tasarlanan biyoaktif yara örtüleri (doku eşlenikleri ya da polimer bazlı yara örtüleri), iyileşmeyi hızlandırma ve rejenerasyonu destekleme potansiyeline sahiptir. Yara örtülerinden temel olarak; (i) nemliliği koruma ya da sağlama, (ii) hücresel göçü hızlandırma, (iii) gaz değişimine izin verme, (iv) yara yatağının sıcaklığını koruma ve (v) mikrobiyal invazyonu engelleme özelliklerini taşıması beklenir. Bu beklentileri karşılamak üzere sentetik ya da doğal polimerler kullanılarak tasarlanan biyoaktif yara örtüleri, deri doku mühendisliğinde geniş bir araştırma alanına sahipken, oral mukoza doku mühendisliğinde hala kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır [6-9].

Dış ortam ile yara yatağı arasında bir bariyer görevi yapan ve yara iyileşmesinde etkili vitamin, mineral, enzim, büyüme faktörleri ya/ya da ilaçlar gibi çeşitli ajanların salımını gerçekleştiren biyoaktif yara örtüleri üzerine çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini hızlandırdığı ancak kanser gibi çeşitli yan etkilere neden olabilecekleri bildirilmiştir. Diğer dezavantajları ise, düşük kararlılıkları, kısa yarı-ömürleri ve immün yanıt oluşturma riskleridir [10, 11].

Nanokiller, silika tetrahedral ve alümina oktohedral tabakalardan oluşan, doğal, düşük maliyetli ve çevre dostu minerallerdir. Yapısal katmanları, Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetleri içeren moleküller arası etkileşimler yoluyla istiflenmektedir. Bu katmanlar arasına, su, metal iyonları ve polar organik sıvıların girmesi genişlemeye neden olur. Montmorillonitler (MMT), bir oktohedral tabakanın iki tetrahedral tabakaya bağlanması ile oluşan ve geniş yüzey alanına sahip biyouyumlu malzemelerdir. Hidrofilik molekülleri ve suyu tutma kapasitelerinden dolayı, biyoaktif doku iskelesi üretiminde dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, MMT katkısı sayesinde polimerlerin bozunma davranışı ve mekanik özellikleri değiştirilebilmektedir. MMT'ler bu özellikleri nedeniyle, kemik doku mühendisliği, ilaç salımı ve yara iyileşmesi uygulamalarında tercih edilmektedirler [12, 13]. Doku mühendisliği uygulamalarında terapötik iyonlar olan Sr^{2+} ve Zn^{2+} taşıyan MMT'lerin

kullanıldığı çalışmalar bulunmakla birlikte, özellikle kemik doku ve yara iyileşmesinde etkileri olduğu bilinen bor (B) ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır [14, 15]. Oysa ki, MMT'lerin sulardan fazla borik asitin uzaklaştırılması için kullanımları oldukça etkili bir arındırma yöntemi olarak literatürde yerini almıştır [16, 17]. Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında yara iyileşmesinde hücre göçünü, proliferasyonunu ve damarlanmayı arttırarak olumlu katkıları bulunan borun, MMT taşıyıcılarla birlikte biyoaktif yara örtüsü tasarımıyla kullanımı uygun bulunmuştur.

Elektroeğirme yöntemi, ECM'yi taklit edebilen, geniş yüzey alanı ve yüksek gözenekliliğe sahip nanofiber matrikslerin üretilmesine olanak sağlayan ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle hem deri hem de oral mukoza doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmektedir. Biyobozunur özelliğe sahip poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(laktik asit) (PLA) ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) gibi poliester'ler FDA onayına sahip olmaları nedeniyle günümüzde medikal uygulamalarda en çok ticari ürünü bulunan sentetik polimerlerdir [6, 18, 19].

Sunulan tez çalışması, hem deri dokusu hem de oral mukoza hasarlarının ortak ihtiyaçlarını karşılayabilecek, birden fazla olumlu etkiye sahip, biyoaktif bir yara örtüsü tasarlamayı hedeflemiştir. Bu amaçla yapılan çalışmaların temelini iki hipotez oluşturmaktadır:

(1) Endotel, keratinosit ve fibroblast hücreleri, bor katkılı hücre kültür ortamlarında, yara iyileşmesini hızlandırabilecek hücresel cevaplar verirler.

(2) Bor-MMT katkılı fiber matriksler sadece MMT içeren ya da her ikisini de içermeyen fiber matrikslerden daha üstün özelliklere sahip bir yara örtüsü olma potansiyeline sahiptir.

Bu hipotezlerin doğrulanmasına yönelik çalışmalar temel olarak 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, insan endotel, keratinosit ve fibroblast hücreleri farklı bor derişimlerdeki besi ortamları ile hücre kültür kaplarında kültüre edilmiştir. Bor içeren ortamların anjiyogenez üzerindeki etkisi, endotel hücreleriyle, hücre göçü, morfolojisi, reaktif oksijen türleri, senesens ve yara ile ilişkili gen ifadeleri üzerine etkisi ise, keratinosit ve fibroblast hücreleri ile yapılan çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Ardından, MMT'lere bor adsorpsiyonunun gerçekleştiği en uygun koşullar belirlenmiş ve bor adsorplanan MMT'lerin (B-MMT) karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Daha

sonra, elektroğirme yöntemi ile üretilen B-MMT katkılı PLGA ve/veya PLA fiber matriksler çeşitli karakterizasyon testleri ile incelenmiş ve keratinosit ve/veya fibroblastlar ile olan etkileşimleri biyoaktif yara örtüsü olarak kullanımları açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, istatistiksel verilere dayanarak, literatürle karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

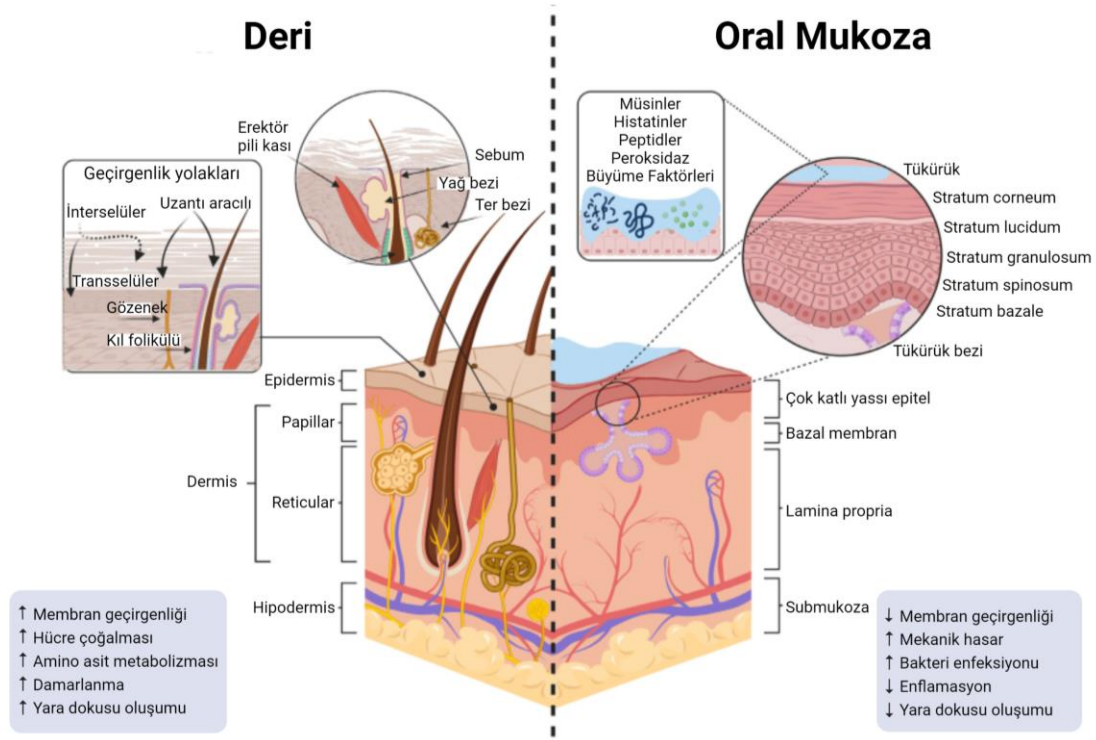
Sunulan tez çalışmasının ilk özgün yönü, yara iyileşmesinde önemli görevleri olan üç farklı hücrenin (endotel, keratinosit ve fibroblast) aynı derişimlerde B içeren besi ortamlardaki hücresel cevaplarının yara iyileşmesi açısından değerlendirilmesi ve böylece etkili B derişiminin belirlenmesidir. Diğer bir özgün yönü ise, B-MMT'nin doku mühendisliği çalışmalarında ilk kez araştırılmasıdır. Ayrıca, B-MMT katkılı fiber matrikslerin, deri ve oral mukoza hasarlarında yara örtüsü olarak kullanılabilme potansiyelinin hem keratinositler hem de fibroblast hücreleri ile incelendiği ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, tez çalışması ile ilgili konular güncel literatür bilgisiyle sunulmuştur. İlk olarak, deri ve oral mukoza dokularının histolojisi hakkında bilgi verilmiş, ardından dokuların yara iyileşme mekanizmasındaki benzerlik ve farklılıklardan bahsedilmiştir. Daha sonra, deri ve oral mukoza dokusunda en çok karşılaşılan hasarlar ve nedenleri açıklanmıştır. Bu hasarlara yönelik güncel tedavi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarından bahsedilerek, yeni yaklaşımlarla üretilen yara örtüleri hakkında bilgiler verilmiştir. Ardından, sunulan tez çalışmasının hipotezini oluşturan bor mineralinin ve nanokillerin doku mühendisliğindeki önemi vurgulanmıştır.

2.1. Deri ve Oral Mukoza

Deri ve mukoz membranlar, dış çevre ile bir ara yüzey oluşturmak için özelleşmiş ve çoklu fonksiyonları olan en büyük organlarımızdır. Deri ve derinin vücudumuzun iç kısımlarındaki devamı niteliğinde olan mukoz membranlar, genel özellikleri açısından birbirlerine benzer olsalar da bazı yapısal ve işlevsel farklılıklara sahiptirler. Ancak her ikisinin de bütünlüğünün korunması, yaşamsal bir gereklilik olan homeostazın sağlanması ve sürdürülmesinde oldukça önemlidir [20]. Bu bölümde, deri ve oral mukoza dokusunun histoloji ve fizyolojisi karşılaştırılarak detaylı olarak anlatılmıştır. Deri ve oral mukozanın histolojik yapısı ve temel işlevsel farklılıkları Şekil 2.1’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Deri ve oral mukozanın yapısal ve işlevsel farklarının şematik gösterimi ([20]'den değiştirilerek).

2.1.1. Deri Dokusunun Histolojisi

Deri, vücut ağırlığının yaklaşık olarak %8'ini oluşturan ve yüzey alanı, bireyin vücut ağırlığına ve boyuna göre farklılık gösteren ilk savunma alanımızdır. Zararlı mikroorganizmalara karşı etkili bir bariyer olmasının yanı sıra, duyuların algılanması, su-elektrolit dengesinin sağlanması, vücudun termal, kimyasal ve mekanik hasarlara karşı korunması gibi önemli görevleri üstlenmiştir [21]. İnsan derisi, farklı özelliklere sahip 3 tabakadan oluşmaktadır: epidermis, dermis ve hipodermis. En dışta bulunan epidermis embriyonik ektoderm tabakasından köken alan, ince (100-150 μm), ancak yüksek hücre içeriğine sahip damarsız bir tabakadır. Ana hücre popülasyonunu keratinositler başta olmak üzere, melanositler ve Langerhans hücreleri oluşturmaktadır. Epidermis, en altında bulunan bazal lamina ile derinin bağ dokusu olarak bilinen dermis tabakasından ayrılmaktadır. Yaklaşık 1200 μm kalınlığa sahip olan dermis, kollajen lifler (özellikle tip 1 ve 3) açısından zengindir ve bu lifler dıştan içe doğru yoğunlaşmaktadır. Dermisin kollajen lifler açısından az yoğun ve epidermise yakın olan bölgesi papillar, kollajen lifler açısından zengin ve hipodermise yakın olan bölgesi ise retriküler tabaka adını almaktadır. Temel hücre bileşeni olan fibroblastların yanı sıra makrofajlar, mast hücreleri, T ve B

hücrelerine de ev sahipliği yapan dermis, kan damarları ve sinirleri de içermektedir [22]. Derinin en alt tabakası olan hipodermis ise, yağ yığınının oluşması nedeniyle vücut sıcaklığının düzenlenmesini sağlayan bir enerji haznesidir. Tıpkı bir hava yastığı gibi davranarak, deri ve derinin bağlı bulunduğu kemikleri mekanik darbelerden korumaktadır [23].

2.1.2. Oral Mukoza Dokusunun Histolojisi

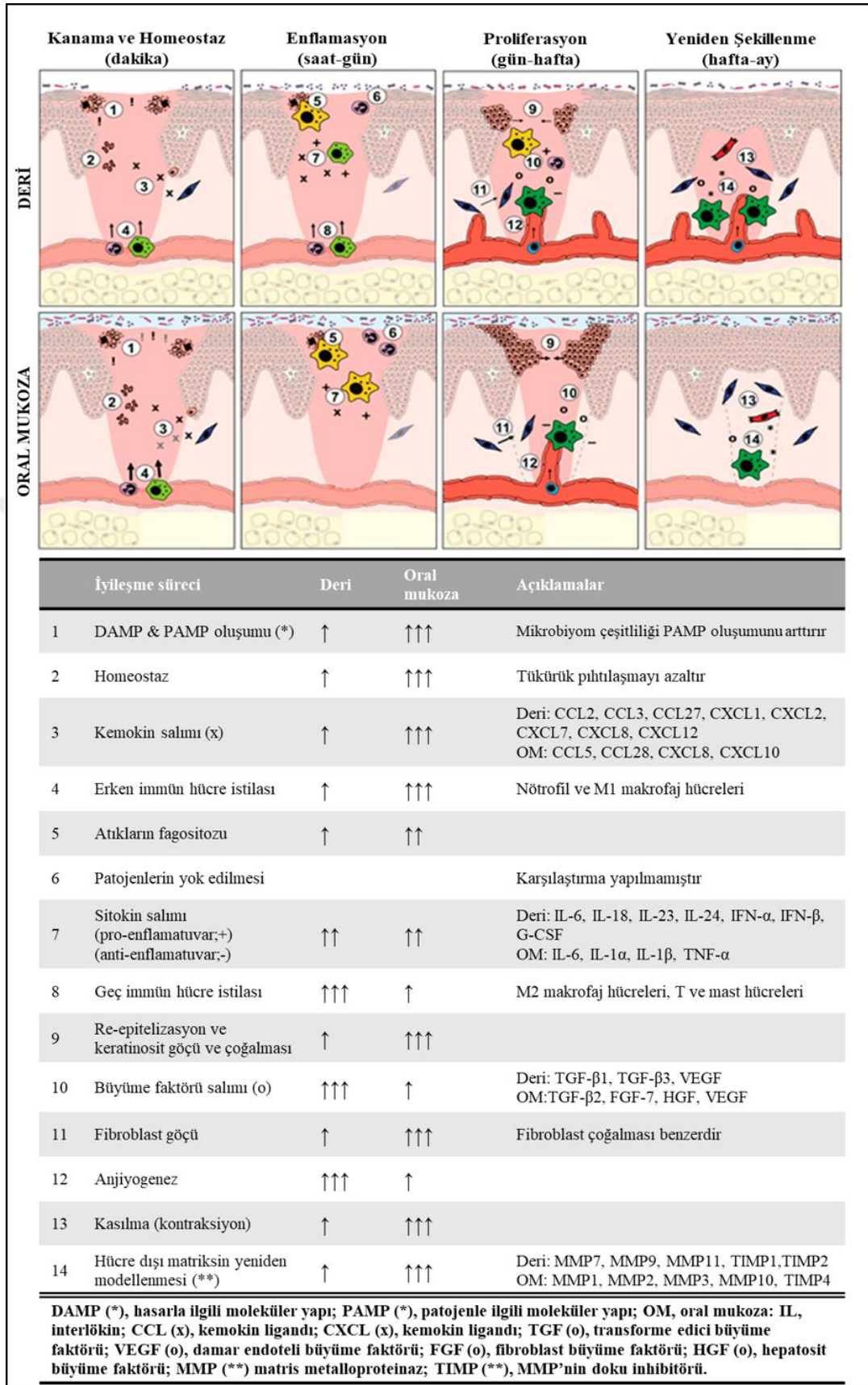
Derinin yüzey alanı insanda ortalama 2 m² iken, boşluklu organların iç yüzeyini döşeyen mukoz membranların toplam yüzey alanının yaklaşık 400 m² olduğu bilinmektedir. Mukoz membranlar, sindirim, solunum ve üreme sistemlerimizdeki organ ve dokuların iç tarafını kaplayan ıslak yapıda membranlardır. Sindirim sisteminin dışa açılan ilk boşluğu olan ağızın içini döşeyen oral mukoza, deri ile aynı embriyonik kökene sahiptir ve deri ile morfolojik ve işlevsel açıdan benzer katmanlara sahip olduğu bilinmektedir. Çok katlı yassı epitel (oral epitelyum) ve altındaki areolar bağ dokusu birlikte “oral mukoza” adını alır. Oral epitelyum, derinin epidermis tabakası gibi ektodermden köken alır ve bazal membrandan oral epitelin en üst tabakasına doğru farklılaşmış olan keratinosit hücrelerini içermektedir. Ancak, deride olduğu gibi tamamıyla keratinize bir üst epitel tabakası yerine, sadece mekanik stresin daha çok olduğu damak ve gingival bölgeler gibi çiğneme alanlarında keratinize epitel tabakasına rastlanmaktadır. Yanak içinde bulunan bukkal doku ise, daha az fiziksel strese maruz kaldığı için keratinize olmayan epitel tabakası ile kaplıdır. Oral mukoza epitel tabakası, genel olarak derinin epitel tabakasından 20-30 kat daha kalındır ve bazal laminada bulunan hücrelerin çoğalma kapasiteleri daha yüksektir. Yaklaşık olarak, 14-21 günde bir bölünürler. Oral epitelyum tabakasında keratinositler dışında, melanosit, Langerhans ve Merkel hücreleri de bulunur. Epidermin altında bulunan mezoderm kökenli areolar bağ dokusu ise, dermisin bir bölümünü oluşturan papillar tabakaya benzer ve lamina propria adını almaktadır. Kan damarları, sinirler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve inflamatuvar hücreler bu tabakada bulunur. Oral mukozanın en alt tabakası, tıpkı dermisin retiküler tabakası gibi daha yoğun ve düzensiz bir bağ dokudan oluşmaktadır. Yine mezoderm kökenli olan bu tabaka sub-mukoza olarak adlandırılmaktadır. Kan damarları ve sinirleri içermesinin yanı sıra, bulunduğu bölgeye bağlı olarak, yağ dokusu, minör tükürük bezleri, lenf doku ve kas dokusunu içerebilir. Sub-mukoza, gingiva ve sert damak doku dışındaki tüm ağız boşluğunda bulunur. Gingiva ve sert damak dokularında, lamina propria doğrudan kemiğe tutunur ve mukoperiosteum dokusunu oluşturur [20, 24].

2.2. Deri ve Oral Mukoza Dokusunda Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, hücresel ve moleküler düzeyde birçok olayın birbiri ardına gerçekleşmesi ile tamamlanan dinamik bir süreçtir. İyileşme basamakları iç içe geçmiş süreçlerin muhteşem bir denge ile düzenlendiği 4 temel başlık altında incelenmektedir: (i) kanama ve homeostaz, (ii) inflamasyon, (iii) proliferasyon ve (iv) yeniden şekillenme [25].

Herhangi bir organ ya da dokuda oluşan bir hasar/kayıp sonrasında, vücudun öncelikli amacı doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasıdır. Bu ihtiyaç, özellikle dış dünya ile aramızda bir bariyer olan deride, patojen mikroorganizmaların istilasından korunmak için kazanılmış yaşamsal bir adaptasyondur. Yara iyileşmesi sırasında eskisi gibi organize olamayan hücre ve ECM elemanları, yara dokusu olarak bilinen “skar” oluşumuna neden olur. Skar oluşumu, kırık bir pencere camının, tahta parçaları ile hızlıca tamir edilmesi gibi betimlenebilir. Yeniden şekillenme basamağında bu doku ortadan kalkmamış ise kalıcı hale gelir ve bu da dokuda tam bir iyileşme olmadığını gösterir. Kısacası, doku bütünlüğünün sağlanması her zaman gerçek “doku rejenerasyonu”nun gerçekleştiği anlamına gelmemektedir. Doku rejenerasyonundan beklenen, normal dokunun yapısal ve işlevsel olarak bütünüyle geri kazanılmasıdır [26].

Deri ve oral mukoza dokusunda yara iyileşme basamakları temel olarak aynı olsa da deri ile karşılaştırıldığında, mukozal yaralarda skar oluşumu minimal düzeydedir. Özellikle, deri yanıklarından sonra ortaya çıkan, kırmızı görünümlü, kaşıntı ve ağrıya neden olan hipertrofik skar oluşumuna oral mukozada nadiren rastlanır [27]. Hipertrofik skar oluşumu, genellikle gecikmiş inflamatuvar cevap ve düzensiz anjiyogenezin sonucudur. Ancak, oral mukoza yara iyileşmesindeki avantajın nedenlerini, sadece hücrelerin yer aldığı süreçleri göz önüne alarak açıklamak mümkün değildir. Oral mikrobiyom ve tükürük gibi çevresel etkenler de yara iyileşme sürecinde önemli rol oynarlar [24]. Deri ve oral mukoza yaralarının iyileşmesindeki bu farka neden olan etkenler ve hangi süreçlerde etkili oldukları Şekil 2.2’de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Deri ve oral mukozada yara iyileşmesinin karşılaştırılması ([24]'den değiştirilerek).

2.3. Deri ve Oral Mukoza Hasarları

2.3.1. Deri Kayıpları

Günümüzde neredeyse kalıplaşmış bir cümle olan “deri vücudumuzun en büyük organıdır” tanımlaması, aslında aynı zamanda bütünlüğünün korunmasının ne kadar önemli olduğunu da ifade eder. Çeşitli mekanik etkiler, cerrahi girişimler, yanıklar, kimyasal yaralanmalar ve kronik hastalıkların neden olduğu ülserler sonucunda deri dokusu hasar görür. Klinikte bu hasarın derinliğine göre çeşitli derecelendirmeler yapılır. Yara dokusu, belirli bir dereceye kadar kendiliğinden iyileşebilse de mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar bu süreci etkileyebilmektedir [28].

Yaralar, genellikle “akut” ve “kronik” olmak üzere ikiye ayrılır. Akut yaralar, mekanik/kimyasal yaralanmalar, cerrahi girişimler ve yanıklar nedeniyle ortaya çıkar. Bu durumda, yara iyileşmesi süreci normal olarak ilerler. Ancak, bir aydan daha uzun süre kapanmayan ve normal iyileşme süreci göstermeyen yaralar, kronik yara olarak tanımlanır. Kronik yaraların temel nedeni, diyabet gibi bazı sistemik hastalıklardır. Uzun süre kapanmayan yaralarda enfeksiyon riskinin artması ve dolayısıyla ülser görülme sıklığı oldukça fazladır [28]. Özellikle derin ayak ülserleri deri dokusunun yanı sıra, kas, tendon ve kemik dahil olmak üzere birçok dokuyu etkilemektedir. Dünyada ayak ülserlerinin görülme sıklığı yıllık olarak 9,1-26,1 milyon arasındadır. Kronik yaralarda tedavi süresinin ve maliyetinin fazla olması, tüm dünya genelinde hem hastalara ve hem de sağlık sistemine kayda değer bir yük oluşturmaktadır [29].

2.3.2. Oral Mukozitler

Oral mukoza, günlük yaşamda sürekli olarak mekanik, kimyasal ve biyolojik uyarılara maruz kalmaktadır. Bu nedenle, sağlıklı oral mukozada yüzey epiteli dökülerek mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaşmasını sağlar ve aynı zamanda kimyasal bir bariyer oluşturarak epitel içerisine penetrasyonun önlenmesine destek olur.

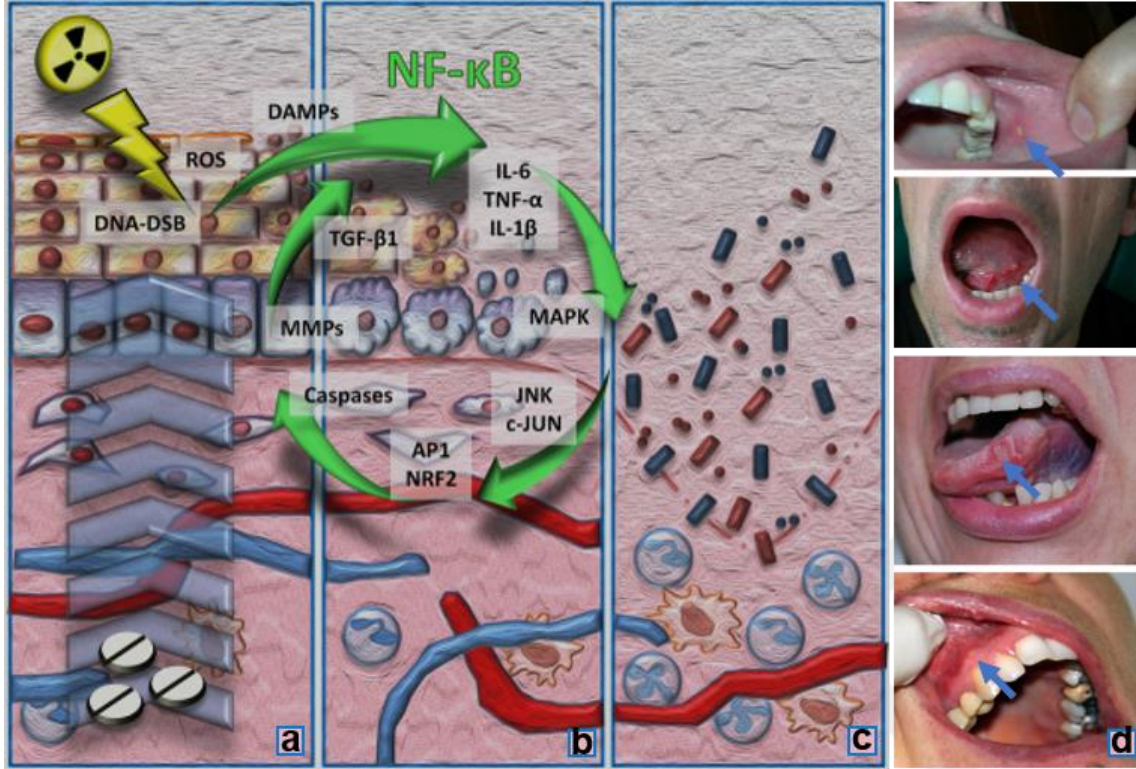
Oral mukoza ülserleri (oral mukozitler), stres, travma, yiyecekler, yetersiz beslenme, hormon değişiklikleri, vitamin eksiklikleri ve ilaçlar gibi birçok nedenle ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanı sıra, çeşitli sistemik hastalıklar, genetik nedenler, immün yetersizlik ve mikroorganizmalar da oral mukoza ülserlerinin nedenlerindendir [30]. Oral eritem, ülser ve ağrı ile karakterize olan oral mukozitler (OM), oral mukozanın hem keratinize hem de keratinize olmayan bölgelerinde görülebilir. Dünya Sağlık Örgütü

(WHO) tarafından 1979 yılında OM'ler için yapılan klinik tanımlama kriterleri şu şekildedir: 1. derece, ağrı/eritem gözlenir; 2. derece, eritem/ülser gözlenir ancak hasta katı ile beslenebilmektedir; 3. derece, ülser oluşmuştur ancak hasta sıvı ile beslenebilmektedir; 4. derece, hasta sıvı ya da katı olarak beslenememektedir [31].

OM'ler, kanser ya da hematopoetik kök hücre nakli hastalarında tedavi amacıyla uygulanan radyoterapi ve kemoterapi nedeniyle ortaya çıkan, yaygın bir komplikasyondur. Tedavinin çeşidine, dozuna ve uygulanma sıklığına göre değişmekle birlikte, genellikle kemoterapiyi takiben 5-10 gün içinde görülür. Radyoterapide ise, belirli bir doz birikiminin ardından ortaya çıkar. Kanser tedavisinin göz ardı edilemeyecek yan etkilerinden biri olan OM'ler, hastalarda çiğneme, yutma ve konuşma güçlüğüne yol açar. Yaşam kalitesinin düştüğü hasta bireylerde aneroxiya, kaşeksi, dehidrasyon ve malnütrasyonun gelişmesi, hastaların hastanede yatış sürelerinin ve hastane maliyetlerinin artmasına neden olur. OM'ler, kemoterapi alan hastaların yaklaşık %30-40'ında ortaya çıkarken, hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda bu oran %60-85'e çıkmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapinin birlikte uygulandığı baş ve boyun kanserli hastalarda ise neredeyse %90 oranında görülür. OM'ler oldukça ciddi yan etkileri nedeniyle, hastaların radyoterapi/kemoterapi dozunun azaltılmasına hatta tedavilerinin sonlandırılmasına neden olabilir [32, 33]. Farklı yaş ve cinsiyet gruplarında hastalar için klinik sorunlar bilinmesine rağmen, mukozit patogenezinin altında yatan karmaşık mekanizma ile ilgili en çok kabul gören teori 2004 yılında Sonis [34] tarafından açıklanmıştır. Şekil 2.3'te OM'nin patobiyolojisindeki aşamalar gösterilmiştir.

Özetle, sub-mukoza ve bazal epitelyal hücrelerde, DNA hasarları ve diğer hücresel hasarlar ortaya çıkar ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Klinik olarak sessiz olan bu dönem, “başlangıç fazı” olarak tanımlanır. Ardından, sitokinlerin transkripsiyonunu destekleyen NF- κ B (nükleer faktör kappa B) gibi transdüksiyon yolları aktive olur. NF- κ B aktivasyonu, mukozal toksisite üzerinde etkili 200'den fazla genin ifadesine neden olur. TNF- α 'nın da aralarında bulunduğu bir dizi pro-inflamatuvar sitokinlerin salımı ve birikmesiyle “sinyal çoğalması” olarak bilinen ikinci faz başlar. Özellikle TNF- α , NF- κ B yolağı için pozitif geri bildirim yapan bir aktivatör rolündedir. Bununla birlikte, hücre ölümü ve kaspaz aktivitesine neden olan MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) sinyalini de başlatır. Hastalarda eritremin görüldüğü bu aşamada, doku hasarına neden olan MMP'lerde (matris metalloproteinazlar) süreçte yer alır. Hastalarda şiddetli ağrı ve beslenme kısıtlamalarına neden olan “ülserasyon” fazında ise,

mikroorganizmaların istilası söz konusudur. Kanser tedavisi sırasında ortaya çıkan bu akut olaylar dizisi genellikle tedavinin kesilmesi ile son bulur ve iyileşme başlar [34].



Şekil 2.3. Oral mukozit patobiyolojisi: (a) Kemo ve radyoterapiye bağlı hasarlar DNA çift sarmalında kırılmalara neden olur, hücrel apoptoz tetiklenir ve hasarla ilişkili moleküler yapılar (DAMPs) salınır. Sitokinlerin NF-κB aracılı transkripsiyonu desteklenir (b) hasar sinyalinin artmasıyla salınan TNF-α, MAPK yolağının aktivasyonuna neden olur (c) sub-mukozada bütünlüğün bozulmasıyla mikroorganizma istilası başlar, inflamasyon ve ülser ortaya çıkar (d) çeşitli kemoterapi ilaçlarıyla tetiklenen mukozit görüntüleri ([33]'den değiştirilerek).

2.4. Deri ve Oral Mukoza Hasarlarında Geleneksel Tedavi Yaklaşımları

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, deri ve oral mukoza hasarlarında yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemlerinden bahsedilmiştir. Deri hasarlarında otogref, allogreft ve zenogreft uygulamaları açıklanmıştır. Ardından, OM'lerin önlenmesi ve tedavisinde sıklıkla uygulanan geleneksel yöntemlere yer verilmiştir.

2.4.1. Deri Dokusu Hasarları/Kayıplarında Tedaviler

Yara tedavilerinde ilk olarak yaranın örtülerek dış ortamdan izole edilmesi gereklidir. Bunun için, en ideal malzeme “altın standart” olarak adlandırılan otogreftlerdir. Hastanın kendisinden alınan sağlıklı dokunun, hasarlı bölgeye nakil edilmesiyle gerçekleştirilen bu yöntemin bilinen ilk uygulaması 1872 yılında Ollier tarafından yapılmıştır. Epidermis tabakasının tamamını ve dermis tabakasının bir kısmını içermesi nedeniyle “kısmi kat deri grefti” uygulaması olarak literatürde yerini almıştır. Epidermis ve dermis tabakasının tamamının kullanıldığı “tam kat deri greftlerinin” ilk uygulaması ise 1875 yılında Wolfe tarafından sunulmuştur. Bu uygulama, acil yanık tedavileri dışında pek tercih edilmemektedir. Günümüzde dahi, estetik ve işlevsel açıdan en iyi sonuçlara otogreftler sayesinde ulaşılmasına rağmen, verici alanda neden olduğu problemler ve yeterli sağlıklı doku bulunamaması nedenleriyle yeni çözüm yolları arayışları devam etmektedir [35].

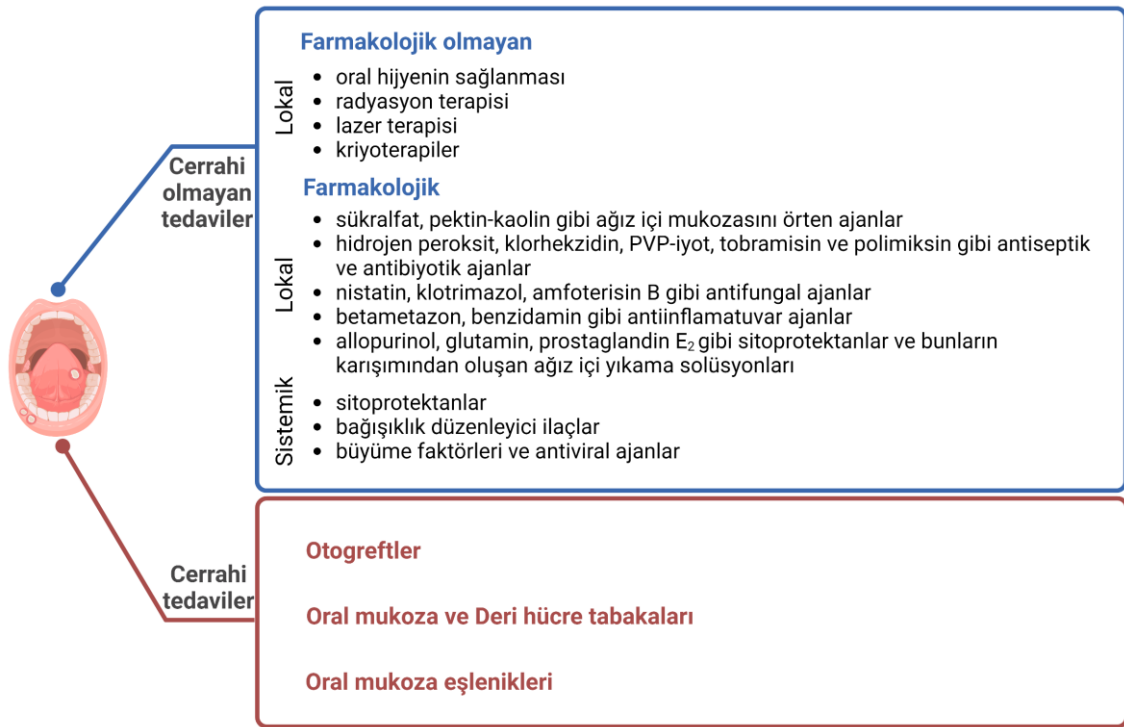
Başka bir insan derisinin (allogreft) ya da çeşitli hayvan derilerinin (zenogreft) kullanılmasında yapılan ilk denemeler ise yine 19uncu yy.’ı işaret etse de 20nci yy.’ın ortalarına kadar başarılı bir uygulama gerçekleştirilemediği bilinmektedir. Bu uygulamalarda en çok kadavralardan elde edilen allogreftler ve domuzdan elde edilen zenogreftler tercih edilmiştir. Ancak bu uygulamalar geçici olarak yaranın kapatılması için kullanılmış ve iki hafta sonrasında bağışıklık reddi nedeniyle yara bölgesinden uzaklaştırılmıştır. Günümüzde allogreft ya da zenogreft uygulamaları, geliştirilen saklama yöntemleriyle daha kolay hale gelmiştir. Dondurarak ya da gliserol içinde saklanan bu greftlerin antijenik özelliği azalmakta ve uzun süre canlı kaldığı bilinmektedir. 1960’lardan günümüze en çok kullanılan domuz deri greftlerine alternatif olarak sunulan en yenilikçi yaklaşım ise balık deri greftleridir. Klinik çalışmaların sonuçları oldukça umut verici olmasına rağmen, hastanelerde kullanılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır [35]. Klinikte kullanımı süre gelen bir diğer doğal allojenik greft ise plasentanın iç kısmını oluşturan ve fetüs ile doğrudan temas halinde olan amniyotik membrandır. Bu membran, içeriden dışarıya doğru, epitel, bazal membran ve stroma olmak üzere üç tabakadan oluşur. 1900’lü yıllardan bu yana, amniyotik membranın medikal alanda kullanımı genişleyerek devam etmektedir. Çeşitli hazırlama ve sterilizasyon yöntemleri ile hazırlanabilen amniyotik membranlar, deri yanıklarında skar oluşumunu azaltmakta ve rejenerasyonu desteklemektedir [36]. Buna rağmen, biyolojik kökenli bir malzeme olması nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının taşınması ihtimali açısından kullanımında bazı kısıtlamalar söz konusudur. Deri yara ve yanıklarında

kullanılmak üzere doku mühendisliği yaklaşımlarıyla geliştirilen ve klinikte kullanım alanına sahip yapay deri eşleniklerine sonraki bölümde değinilmiştir.

2.4.2. Oral Mukoza Hasarında Tedaviler

OM'lerde uygulanan geleneksel tedavilerin öncelikli amacı ağrıyı azaltmak ve iyileşme süresini hızlandırmaktır. Şekil 2.4'te OM'lerin tedavisinde kullanılan klinik yaklaşımlar özet olarak sunulmuştur. Farmakolojik olmayan lokal önleyici tedaviler arasında en önemlisi, kanser tedavisi başlamadan önce ve tedavi sırasında oral hijyenin sağlanmasıdır. Kemoterapide kullanılan ilaçların etkilerine bağlı olarak, radyasyon/lazer (düşük seviyeli) terapisi ve kriyoterapiler de hem tedavi edici hem de önleyici uygulamalar arasındadır [37]. Farmakolojik lokal tedavilerde ise, sükralfat, pektin-kaolin gibi *ağız içi mukozasını örten ajanlar*, hidrojen peroksit, klorheksidin, PVP (poli(vinilprolidon))-iyot, tobramisin ve polimiksin gibi *antiseptik ve antibiyotik ajanlar*, nistatin, klotrimazol, amfoterisin B gibi *antifungal ajanlar*, betametazon, benzydamin gibi *antiinflamatuvar ajanlar*, allopurinol, glutamin, prostaglandin E2 gibi *sitoprotektanlar* ve bunların karışımından oluşan ağız içi yıkama solüsyonları sıklıkla tercih edilir [38]. Dinamik bir ortam olan ağız içinde epitel hücrelerinin sürekli olarak yenilenmesi ve çoğalması oldukça önemlidir. Kanser tedavisi nedeniyle, çoğunlukla hücrelerin bölünmeleri yavaşlar. Bu nedenle, hücre çoğalmasını destekleyen büyüme faktörlerinden de faydalanılmaktadır. Palifermin (keratinosit büyüme faktörü-1) oral mukozit tedavisinde onaylanmış bir rekombinant büyüme faktörüdür [39].

Sistemik olarak yapılan farmakolojik tedavilerde ise öne çıkanlar sitoprotektanlar, bağışıklık düzenleyici ilaçlar, büyüme faktörleri ve antiviral ajanlardır [40]. GM-CSF (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) ve G-CSF (granülosit koloni uyarıcı faktör) gibi hematopoetik büyüme faktörleri ise ağız içine nötrofil göçünü arttırarak etki gösterir [41]. Cerrahi yöntemler içinde her ne kadar otogreftler ideal greft malzemesi olarak kabul edilse de çok kısıtlı bir verici alan olması nedeniyle uygulanması oldukça sınırlıdır. Doku mühendisliği yaklaşımları ile otolog ya da allojenik hücrelerden elde edilen hücre tabakaları ve mukozal deri eşleniklerine sonraki bölümde değinilmiştir. OM'lerin tanımlanması ve tedavisi için farklı öneriler olsa da henüz standart bir tedavi protokolü üzerinde bir fikir birliğine varılamamıştır.



Şekil 2.4. Oral mukozitlerin tedavisinde kullanılan klinik yaklaşımlar (BioRender.com ile oluşturuldu).

2.5. Deri ve Oral Mukoza Doku Mühendisliği

2.5.1. Deri Doku Mühendisliği

Günümüzde kalıcı ya da geçici olarak kullanılabilen çok sayıda yara örtüsü bulunmaktadır. Genel olarak kullanılan yara örtüleri (i) pasif, (ii) interaktif, (iii) gelişmiş ve (iv) biyoaktif olmak üzere sınıflandırılabilir. Çizelge 2.1’de geleneksel yara örtülerinden modern yara örtülerine kadar sınıflandırılmaları yapılmış ve genel özellikleri verilmiştir. Pasif ya da interaktif yara örtüleri, büyük ölçüde deri kaybı olan ya da kronik yaralara sahip hastalarda yeterli desteği sağlayamamakta ve rejenerasyonu desteklememektedir [42, 43]. En genel tanımı ile doku mühendisliği, başta biyoloji olmak üzere temel yaşam bilimleri ve mühendislik prensiplerinin bir araya getirilmesiyle, mevcut klinik sorunlara çözüm bulmayı hedefler. Doku mühendisliği alanında yaklaşık olarak 30 yıla yakın bir geçmişe sahip ve klinikte hali hazırda kullanılmakta olan ürünleri bulunan deri doku mühendisliği, yara tedavilerine önemli ölçüde katkıda bulunmuş ve hala da bulunmaya devam etmektedir. Gelişmiş ve biyoaktif yara örtüleri, biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan özellikleri sayesinde yara iyileşmesine destek olurken, aynı zamanda büyüme faktörleri, peptitler, ilaçlar, vitaminler ve/veya antibiyotikler gibi

çeşitli ajanlarla birlikte ideal bir rejenerasyonun sağlanmasında da etkilidirler. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilecek ideal bir yara örtüsünün özellikleri şu şekilde sıralanabilir: (i) yaranın aşırı sızıntısını absorplamalı, (ii) yara yatağının nemliliğini kontrol etmeli, (iii) mekanik olarak kararlı olmalı, (iv) gaz geçirgenliğini sağlamalı, (v) mikroorganizma koloni oluşumunu ve enfeksiyonları önlemeli, (vi) toksik olmamalı, biyouyumlu ve biyobozunur olmalı (vii) yara yatağına yapışmadan kolay ve ağrısız çıkartılabilmeli, (viii) kolaylıkla ulaşılabilir şekilde ucuz olmalıdır [43].

Çizelge 2.2’de ticari olarak ulaşılabilen ve yara iyileşmesinde kullanılan deri eşleniklerinden bazıları verilmiştir. Bunun yanı sıra, deri doku mühendisliği yaklaşımlarıyla, hayvan deneylerine alternatif olarak toksisite ve geçirgenlik testlerinin yapılmasına olanak sağlayan deri modellerinin de geliştirilmesi mümkün olmuştur. SkinEthic Rhe, Episkin, Epiderm, EpidermFT, StrataTest, Epidermal Skin Test 1000 ve Advanced Skin Test 2000 bunlardan bazılarıdır [44].

Çizelge 2.1. Yara örtülerinin sınıflandırılması ([42]'den değiştirilerek).

Yara örtüleri	Türü	Tanımı	Yara tipi	Avantajları	Dezavantajları
Pasif	Sargı bezi	Pamuk, polyester ve karışımlarından yapılır	Temiz ve kuru yaralarda	Ucuz ve kolay ulaşılabilir	Düzenli olarak değiştirilmesi gerekir
	Tül	Petrol türevlerinden elde edilir	Yüzeysel, temiz ve sızıntısı az olan yaralarda	Yara yatağına yapışmaz	Düzenli olarak değiştirilmesi gerekir
	Bandaj	Pamuk, selüloz ve poliamitten yapılır	Genellikle diğer yara örtülerini desteklemek için	Ucuz ve kolay ulaşılabilir	-
İnteraktif	Yarı geçirgen filmler	Hipoalerjenik akrilik yapıştırıcı kaplı poliüretandan yapılmıştır	Hafif/orta sızıntılı düz ve derin olmayan eklem bölgesi yaralarında	Gazı geçirir, elastik, esnek ve şeffaftır Deriye kolay yapışır	Sızıntıyı absorplama kapasitesi düşük
	Yarı geçirgen köpükler	Poliüretan veya silikon köpükten yapılmıştır	Orta/yoğun sızıntılı düz ve derin olmayan yaralarda	Yüksek gaz geçirgenliğine sahiptir	.
	Yarı geçirgen hidrojel	Bozunur olmayan hidrofilik polimerlerden jel veya film şeklinde üretilir	Kuru yaralarda	Nem kaybını önler, gaz geçirgendir	Yara örtüsünde biriken sızıntı bakterilerin çoğalmasına neden olur
Gelişmiş	Hidrokolloidler	Elastomer veya adeziv malzemelerin bir araya getirilmesiyle ince filmler şeklinde üretilir	Hafif/orta sızıntılı yaralarda	Nemli ortam sağlar, gazı geçirir, pH'ı düşürerek bakteri çoğalmasını azaltır	Enfekte ve ağır sızıntılı yaralarda kullanılmaz
	Aljinatlar	Aljinik asitin kalsiyum ve sodyum tuzlarından yapılmıştır, dondurularak kurutulmuş tabakalar ve ince filmler halinde bulunur	Orta/yoğun sızıntılı ve kanamalı yaralarda	Yaranın nemli tutulmasını sağlar, pıhtılaşma mekanizmasını aktive eder	Kuru veya nekrotik yaralar için uygun değildir
	Hidrofiberler	Sodyum karboksimetil selüloz fiberlerden oluşur	Enfekte, orta/yoğun sızıntılı yaralarda	Yarayı nemli tutar, sızıntıları emer, pH'ı düşürerek bakteri çoğalmasını azaltır	Kuru veya hafif sızıntılı yaralar için uygun değildir

Çizelge 2.1. Devamı.

	Dekstranomerler	Toz ya da macun formunda hidrofilik polisakkarit granüllerinden oluşur	Enfekte, orta/yoğun sızıntılı yaralarda	Yüksek emici özelliktedir ve yara yatağını nemli tutar	.
Biyoaktif	İlaç salımı yapabilen örtüler	Antibiyotik salımı yapan interaktif ya da biyolojik örtüler	Yaranın ihtiyacına göre uygun ilacı içerebilir	İlaç salım profilleri optimize edilmiştir	Yara enfekte olmasa da antibiyotik salımı yapar
	Biyolojik örtüler	Doğal ya/ya da sentetik malzemelerden üretilir		Fibroblast çoğalmasını ve endotel hücre göçünü uyarır	Doğal polimerler bağışıklık cevabına neden olabilir
	Deri eşlenikleri	Allojenik ya da otolog hücrelerin laboratuvarda kültüre edilmesiyle üretilmiş hücre tabakaları ya da bu hücrelerin doğal ya/ya da sentetik polimerler üzerinde kültüre edilmesiyle hazırlanan matrikslerdir	Ciddi yanıklar ve kronik yaralarda deri kaybının olduğu durumlarda, genellikle enfekte ve nekrotik olmayan yaralarda kullanılır	Hücre çoğalmasını destekler	Uzun süre saklanamamaları ve kişiye özel hazırlanmaları

Çizelge 2.2. Ticari olarak ulaşılabilen insan deri eşleniklerinden bazı örnekler.

Ürün	Ürün tanımı	FDA onayı	Kullanımı	Türü
Epicel®	Otolog keratinosit hücresi	2007	Kalıcı	Epidermal
Bioseed-S®	Fibrin yapıştırıcı ile birlikte otolog keratinosit hücresi	-	Kalıcı	Epidermal
Transcyte®/Dermagraft®	Dondurularak saklanan dermal eşlenik: polimer ağ üzerinde kültüre edilmiş insan fibroblast hücreleri	1997/2001	Geçici	Dermal
Alloderm®/Strattice®	Hücretsiz kadavra derisi matrisi	2004	Kalıcı	Dermal
Apligraf®	Fibroblast ve sıgır kollajeninden oluşan dermal tabakanın üzerine keratinositlerin ekilmesiyle oluşturulur	1998	Geçici	Epidermal/Dermal
Orcel®	Tip 1 sıgır kollajeni üzerinde ayrı ayrı kültüre edilen insan epidermal keratinosit ve dermal fibroblast hücreleri	2001/2008	Geçici	Epidermal/Dermal

2.5.2. Oral Mukoza Doku Mühendisliği

Deri doku mühendisliği oldukça eski bir geçmişe sahip olmasına rağmen, oral mukoza tükürük bezi ve periodontal ligament gibi yumuşak rejenerasyonuna yönelik oral doku mühendisliği çalışmaları, 1990'lı yıllarda temporomandibular eklem rejenerasyonu ile ilgili yayınlanan çalışmadan sonra başlamıştır. Oral mukoza rejenerasyonu için ilk olarak oral keratinosit hücrelerinin *in vitro* kültürü yapılmıştır [45]. Oral mukozitlerin tedavisinde, hücresel terapilerin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla insan gingiva, kemik iliği ve yağ doku kökenli mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. *In vivo* çalışmaların sonucunda, inflamatuvar sitokinlerin ve inflamatuvar hücre göçünün azaldığı, yeniden epitelizasyonun hızlandığı gösterilmiştir [46-48]. Bununla birlikte hücre terapileri, yara bölgesinin izolasyonunun sağlanması ihtiyacını karşılamamaktadır.

Deri doku mühendisliğinde ticari ürünleri bulunan deri eşlenikleri gibi, oral mukoza eşleniklerinin geliştirilmesi için kadavradan elde edilen dermal matris (AlloDerm®) ve oral keratinosit hücreleri bir araya getirilerek oral mukoza eşlenikleri hazırlanmıştır [49]. Otolog olarak elde edilen keratinositler ve AlloDerm® ile hazırlanan biyolojik doku iskeleleri ile 15 hasta üzerinde yapılan çalışmaların sonucu histolojik olarak değerlendirilmiştir. Oral mukoza ve deri rejenerasyonunun sağlanması amacıyla

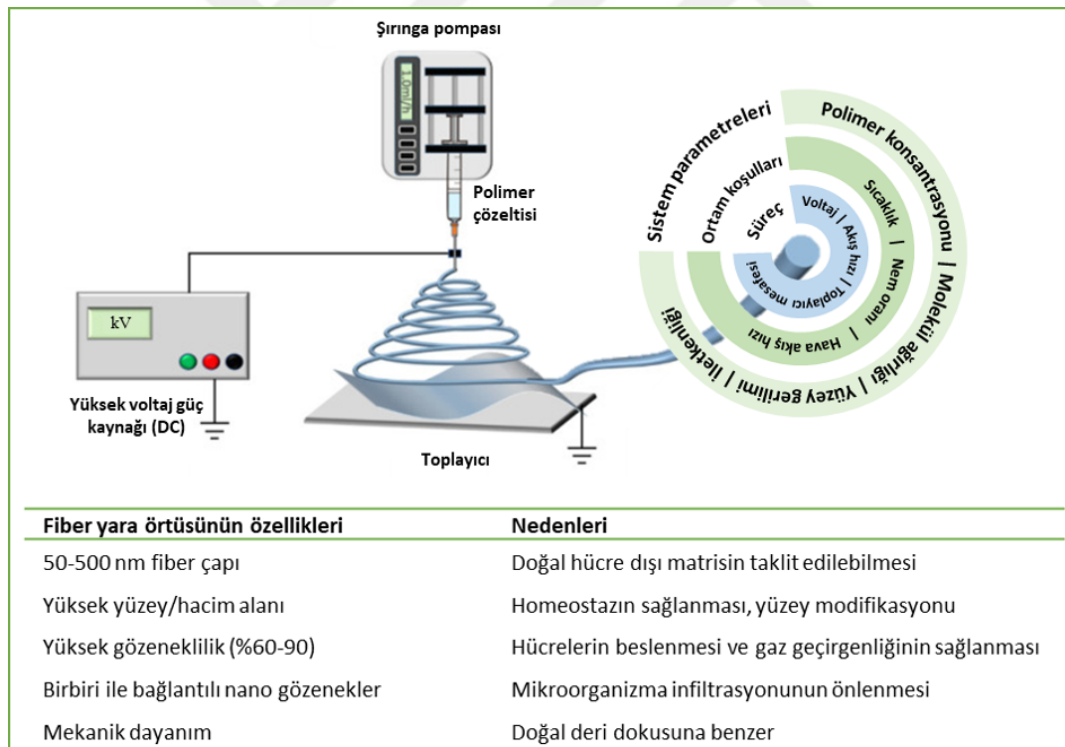
kullanılabileceği önerilen keratinosit bazlı oral mukoza eşleniğinin iyileşmeyi desteklediği gösterilmekle birlikte, AlloDerm®'in klinikte kullanımının henüz tüm dünyada kabul görmemesi en büyük dezavantaj olarak belirtilmiştir [50]. Ticari olarak ulaşılabilen bir ürün olan kollajen bazlı Mucograft® oral boşluktaki rejenerasyonu desteklemek için geliştirilmiş biyolojik bir doku iskelesidir. Klinik çalışmalar ile Mucograft®'ın oral mukozada yara kapanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir [51]. Deri yanıklarının tedavisinde kullanılan bir başka biyolojik doku iskelesi olan amniyotik membranların oral mukozitlerin tedavisindeki etkinliği *in vivo* olarak değerlendirildiğinde, hücre çoğalmasını ve damarlanmayı artırması nedeniyle etkili bulunmuştur [6]. Ancak, allojenik kaynaklı olması kullanımını kısıtlamaktadır. Hücreli ya da hücresiz biyolojik kaynaklı doku iskeleleri biyouyumluluk açısından yeterli özelliklere sahip olmasına rağmen, mekanik özellikleri açısından oldukça zayıf malzemelerdir [51]. Ağız içindeki dinamik ortam ve maruz kaldığı etkiler düşünüldüğünde daha dayanıklı yara örtülerine ihtiyaç duyulması kaçınılmazdır.

2.5.3. Yara Örtüsü Üretiminde Polimerler ve Fabrikasyon Yöntemleri

Doku mühendisliğinde, rejenerasyonun sağlanması amacıyla sentetik ya da doğal polimerler, hücreler, biyomoleküller ve nanopartiküller gibi bileşenler ile birlikte ya da tek başlarına kullanılabilmektedir. Sentetik polimerler ile doğal polimerler karşılaştırıldığında, kolay ulaşılabilmeleri, istenilen özellikte tasarlanabilmeleri ve kararlı yapıları açısından sentetik polimerler avantajlıdır. Doğal polimerler ise, biyolojik kökenli biyomalzemeler gibi yüksek biyouyumlulukta olmalarına rağmen hızlı bozunmaları ve zayıf mekanik özellikleri nedeniyle dezavantajlıdır. Genel olarak yara örtülerinde tercih edilen doğal ve sentetik polimerler, kitosan, poli(vinil alkol), sodyum karboksimetil selüloz, poli(etilen glikol) (PEG), ipek fibroin, kollajen, PCL, PLA ve PLGA gibi sentetik, doğal polimerler ve bunların kompozitleridir [42, 52-54]. Deri ve oral mukoza yara örtülerinde kullanılan polimerlerde aranan özellikler genellikle benzerdir. Bununla birlikte, oral mukoza doku mühendisliğinde, ağız ortamının dinamik yapısına uygun mekanik özellikte ve adeziv polimerlerin seçimi önemlidir. Oral mukozal adezyon özelliği bulunan doğal polimerler, kitosan, hidrofilik selüloz türevleri, kitre ağacı zambkı, hiyaluronik asit, anyonik polisakkaritler ve jelatin; sentetik polimerler ise sodyum karboksimetilselüloz, Carbapol®, PEG ve poli(etilen oksit) (PEO)'tir [55]. Mekanik özellikleri ve degradasyon sürelerinin ayarlanabilmesi gibi özellikler dikkate alındığında ise, PLA, PLGA ve PCL gibi alifatik poliesterler olan sentetik polimerler öne çıkmaktadır

[56]. Sentetik polimerler oral mukoza yara örtüleri için uygun adaylar olmalarına rağmen, hidrofobik yapıları nedeniyle tek başlarına kullanıldıklarında oral mukozaya yapışma özelliğinde değildirler [55]. Ancak, polimerlere mukoadesiv özelliklere sahip olmalarını sağlayacak katkıları eklenerek kompozit yapılar hazırlanabilmektedir [57]. Konunun detaylarına Bölüm 2.5.5’te değinilmiştir.

Elektroeğirme, iki ve üç boyutlu makro/nano fiber biyomalzemelerin hazırlanmasına olanak sağlaması nedeniyle doku mühendisliğinde tercih edilen bir fabrikasyon yöntemidir [58, 59]. Elektroeğirme yönteminde önemli sistem parametreleri ve fiber yara örtülerinin istenilen özellikleri Şekil 2.5’te gösterilmiştir. Temel olarak, şırınga pompası yardımıyla iğne ucuna gönderilen polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulandığında, iğne ucundaki damlacıkta yüklü parçacıklar artar ve Taylor konisi oluşur. Taylor konisinin yüzeyindeki elektrik alan kuvveti yüzey geriliminden daha fazla olduğunda, fiber jet oluşur. Polimer damlacıklarının hareketi sırasında çözücü hızla uzaklaşır ve böylece fiberler toplayıcı üzerinde birikmeye başlar [60].



Şekil 2.5. Elektroeğirme yönteminde önemli sistem parametreleri ve fiber yara örtülerinin istenilen özellikleri ([42, 55]’den değiştirilerek).

Yara örtüsü olarak kullanılacak biyomalzemelerin fiber yapıda olması, yara bölgesinde homeostaz, sızıntı absorpsiyonu ve gaz geçirgenliğini mümkün kılarak onları avantajlı hale

getirir. Aynı zamanda, rejenerasyon için kullanılacak ilaçlar, büyüme faktörleri, vitaminler, anestezikler, iyonlar ve diğer katkılarla birlikte elde edilen fiber matriksler, geleneksel yara örtülerinin aksine aktif destek sağlayan ideal bir yara örtüsüne dönüşür [61, 62]. Rivelin® oral mukoza rejenerasyonunda kullanılmak üzere elektroğirme yöntemiyle üretilen ve klinik deneyleri yapılan mukoadesiv matiktir. İki katlı yapıya sahip olan ürünün bir yüzeyi PVP ve Eudragit RS100 nanofiberlerden, diğer yüzeyi ise PCL nanofiberlerden oluşur [42]. Hem oral mukoza hem de deri yaralarında kullanılmak üzere hazırlanan yara örtülerinin geliştirilmesine yönelik bazı çalışmalara Çizelge 2.3'te özet olarak yer verilmiştir.



Çizelge 2.3. Deri ve oral mukoza mühendisliği prensipleri ile hazırlanan biyoaktif yara örtülerinden bazıları.

	Biyomalzeme	Biyomalzemenin bileşenleri	Hücre	Özellikleri ve Avantajları	Referans
Deri doku mühendisliğinde yara örtüleri	Fiber matriks	PCL, kollajen, EGF	<i>İn vitro</i> -HS2	Hücrelerin çoğalmasını destekler	[61]
	Fiber matriks	Kitosan, PET, bal	<i>İn vitro</i> -L929	Sızıntıyı absorplar, toksik değil	[62]
	Fiber matriks	PLA, kurkumin	<i>İn vitro</i> -İDF	Hücre tutunma ve çoğalmasını destekler, antioksidan	[63]
	Nanokompozit	PCL, kurkumin, montmorillonit	<i>İn vitro</i> -L929	Antibakteriyel	[64]
	Fiber matriks	PLGA, poli(dopamin), bFGF, ponerisin G1	<i>İn vitro</i> -BALB/C 3T3	Hücrelerin çoğalmasını destekler, anti-bakteriyel	[65]
Oral mukoza doku mühendisliğinde yara örtüleri	Nanofiber matriks	İpek, poli(dopamin), leptin, amin-lipozom,	<i>İn vitro</i> -HUVEC	Damarlanmayı ve rejenerasyonu tetikler	[66]
	Fiber matriks	PLGA	-	Degradasyon testi yapay tükürük sıvısında yapıldı	[56]
	Fiber matriks	PCL, acyclovir, omega-3,	<i>İn vitro</i> -HaCaT	Acyclovirin kontrollü salımı, yüksek gözeneklilik	[67]
	İki katmanlı fiber matriks	PLA, kurkumin, diklofenak sodyum, PEO, HPMC	<i>İn vitro</i> -AdMSC	Mukoadeziv, antibakteriyel, antioksidan	[68]
	Fiber matriks	Kitosan, hGH, Eudragit	<i>İn vivo</i> -Köpek (Beagles)	hGH salımı ve hücre çoğalması	[6]

PCL, poli(ε-kaprolakton), PLA, poli(laktik asit); poli(etilen oksit);PLGA, poli(laktik-ko-glikolik asit); PET, poli(etilen tetratitalat); HPMC, hidroksipropil metil selüloz; EGF,epidermal büyüme faktörü; hGH,insan büyüme hormonu; bFGF, fibroblast büyüme faktörü; HS2 ve HaCaT, insan dermal keratinosit hücre hatları; L929, fare fibroblast hücre hattı; İDF, insan dermal fibroblast; BALB/C 3T3, fare embriyonik fibroblast hücresi; HUVEC, insan göbek kordon damarı endotel hücre hattı; AdMSC, yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre.

2.5.4. Doku Mühendisliğinde Bor Kullanımı

Doku mühendisliği biyomalzemeleri tasarımında, rejenerasyonu en iyi şekilde desteklemek için çok çeşitli ajanlardan (vitaminler, büyüme faktörleri, ilaçlar vb.) yararlanılmaktadır. Çoğu zaman başarılı uygulamaları olsa dahi, bu ajanların çeşitli dezavantajları söz konusudur. Özellikle büyüme faktörleri ve vitaminler, büyük molekül ağırlıkları nedeniyle genellikle kısa salım profiline sahiptirler, ya da yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle kararlı kalamazlar. Diğer bir dezavantajları ise, çoğu zaman biyolojik kaynaklardan elde edildiklerinden, güvenli olarak kullanımlarına dair şüphelerin olmasıdır. Bu durumda, inorganik metal iyonlarının kullanımları yüksek stabiliteleri, düşük riskleri ve terapötik özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekicidir. Rejenerasyonu hedeflenen dokunun ihtiyaçlarına yönelik olarak seçilen terapötik metal iyonu/iyonları sert ve yumuşak doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılmaktadır. Uygun bir taşıyıcı varlığında biyomalzemelerin yapısına katılarak hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi uyandırabilir, bunun yanı sıra antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkiler gösterebilirler [69]. Araştırmalar terapötik metal iyonlarının, kök hücrelerin farklılaşmasında rehber görevi üstlenebildiğini de göstermektedir. Bu etkilerinin nedenleri, çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak, hücresel metabolizmada, sinyal yollarında, iyonik kanallarda ve diğer biyolojik süreçlerde sahip oldukları rollerdir [70]. Hücre çoğalmasında ve dokunun yeniden yapılanmasında görev alan temel iyonlar, Sr^{2+} , Si^{4+} ve Ca^{2+} iyonlarıdır. Cu^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , B^{3+} , Zn^{2+} iyonları damarlanmayı teşvik ederken, Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Ga^{3+} ve Zn^{2+} iyonları pH'ı ve ROS üretimini arttırarak antibakteriyel etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar [69]. Hem grubumuz hem de diğer araştırmacılar tarafından, *in vitro* iki boyutlu hücre kültürlerinde besi ortamlarına eklenen borun ve bor katkılı biyomalzemelerin kemik rejenerasyonunu desteklediğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Kitosan nanopartiküller ya da hidroksiapatit taşıyıcıların varlığında bor ile katılandırılan doku iskelelerinin osteoindüktif/osteokondüktif özellikte oldukları gösterilmiştir [71-74]. Bor tarafından uyarılan osteogenezin Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonu ile regüle olan bir transkripsiyon faktörü tarafından teşvik edildiği gösterilmiştir [75].

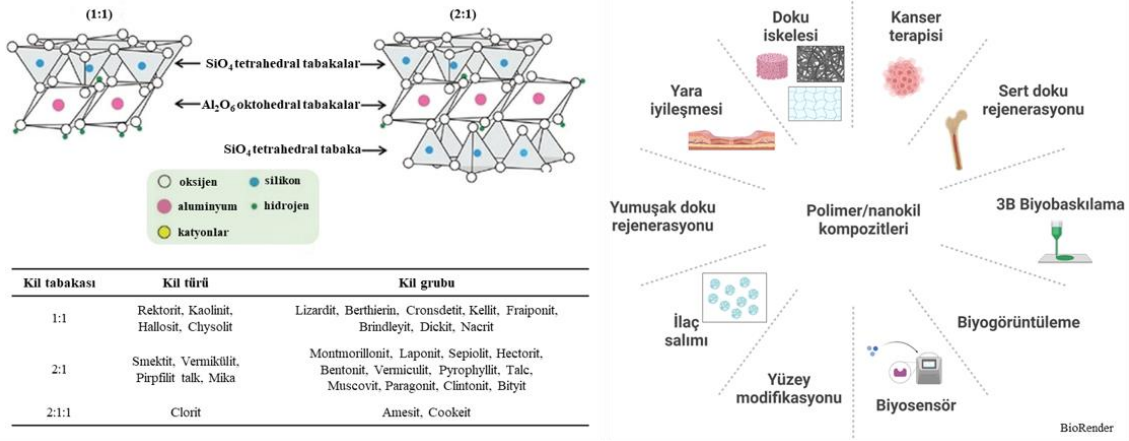
Terapötik metal iyonlarının, kemik rejenerasyonuna katkıda bulunmasının yanı sıra, yara iyileşmesinin çeşitli basamaklarında da etkili oldukları bilinmektedir. Borik asitin suda iyonlaşması sonucu oluşan BO_3^{3-} anyonu, VEGF gen ifadesini arttırarak damarlanmaya, TNF- α gen ifadesini arttırarak inflamasyonun azaltılmasına yardımcı olmaktadır [76].

Bor, aynı zamanda antioksidan ajanı olan glutasyon ya da analoglarının seviyesini arttırarak oksidatif stresin azalmasında da etkilidir [77]. Borun yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri incelendiğinde, deri ve oral mukoza yaralarında kullanılmak üzere geliştirilen biyoaktif yara örtüsü için uygun bir terapötik ajan olduğuna karar verilmiştir.

2.5.5. Doku Mühendisliğinde Nanokillerin Önemi

2.5.5.1. Nanokillerin Yapısı ve Çeşitleri

Killer doğada çok tabakalı yapılar halinde bulunurlar. Bu tabakaların kristal yapıları tetrahedral ve oktahedral olmak üzere iki temel bileşenden oluşur. Tetrahedral birim, merkezinde bir silisyum atomu bulunan ve bu atomun dört oksijen atomuyla çevrilmesiyle oluşmuş düzgün dörtyüzlü şeklindedir. Burada oluşan SiO_4^{4-} anyonu, alkali ve toprak alkali iyonlarıyla etkileşime açıktır. Oktahedral birim, merkezinde bir alüminyum atomu bulunan ve bu atomun dört ya da altı oksijen atomuyla çevrilmesiyle oluşmuş düzgün sekizyüzlü şeklindedir. Oktohedral ve tetrahedral tabakaların birleşmesiyle çok sayıda katmanlar oluştururlar ve böylece kil tanecikleri oluşur. Şekil 2.6'da killerin yapısı ve kullanım alanları şematik olarak gösterilmiştir. Farklı özelliklerine göre değişik sınıflandırmalar yapılan killer, yapısal özelliklerine göre kaolin, ilit ve smektit olmak üzere 3 farklı türe ayrılmıştır. Yüzey yüklerine göre ise, anyonik ve katyonik killer olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Günümüze kadar farklı alanlarda uygulamaları olan killer arasında en fazla tercih edilenler, MMT, bentonit, sepiyolit, laponit gibi katyonik ve LDH (tabakalı çift hidroksit) olarak bilinen anyonik killerdir [78]. MMT'ler, Na, Ca, Mg, Fe ve Li-Al silikatlarını içeren smektit grubuna dahildir. Genel anlamda, alümina oktohedral tabakaların silika tabakaları ile 1:2 oranında paketlenmesiyle oluşan çok katmanlı bir mikro yapısı sergilerler. Her bir tabaka yaklaşık 1 nm kalınlığa sahiptir. Bu tabakaların oluşturduğu çok katmanlı yapı ise 80 ila 300 nm çapındadır. Kristal kil yapısını oluşturan katmanların bir arada kalmasında, ara tabaka katyonları, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir.



Şekil 2.6. Kıl tabakalarının şematik gösterimi, sınıflandırılması ve biyomedikal alanda kullanımları ([78]' değiştirilerek BioRender.com ile oluşturuldu).

Killer yapısındaki katyonların yer değiştirmesiyle elektriksel olarak dengede kalırlar. Tetrahedral düzlemdeki Si^{4+} ve Al^{3+} yer değiştirdiği sırada, oktahedral düzleme Al^{4+} katyonu yerine Mg^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları gibi katyonlar bağlanabilir. Katyon değişim kapasitesi (meq/100 g), kilde bulunan toplam değişebilir katyonların sayısını ifade eder. MMT nanokillerin katyon değişim kapasitesi 80-150 arasındadır [78, 79]. MMT'ler katmanları arasına polar moleküllerin ya da suyun girmesiyle ile kolaylıkla genişleyebildikleri için yüksek şişme özelliği gösterirler. MMT'ler oldukça reaktif ve geniş yüzey alanları nedeniyle polimer zincirleriyle güçlü nanokompozitler oluşturabilirler. Aynı zamanda, çeşitli ilaçlar ve moleküller için taşıyıcı sistemler geliştirilmesine de olanak sağlamaktadırlar [80].

2.5.5.2. Nanokil Katkılı Dokü İskeleleri

Kil mineralleri insanlık tarihi boyunca biyolojik ajan olarak kullanılmıştır. Eski kaynaklarda, yara iyileşmesini sağladığı ve kanamayı durdurduğuna dair kanıtlar bulunmuştur [79]. Günümüzde hala, killer ve kil bazlı malzemeler endüstri, beslenme, kozmetik, sağlık ve biyomedikal başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Malzeme bilminde killerin kullanımını çekici kılan en önemli özellikleri, doğal ve kolay ulaşılabilir olmalarıdır. Bunun yanı sıra, biyoyumlu yapıları ve geniş yüzey alanına sahip olmaları özellikle dokü mühendisliği uygulamalarında tercih edilmelerine neden olmaktadır [80]. Biyoyumluluk dokü mühendisliği için anahtar bir özelliktir. Dokü mühendisliğinde diğer birçok inorganik katkı maddesinin aksine, kemik dokü mühendisliği, yara iyileşmesi, ilaç salım sistemleri ve enzim immobilizasyonu gibi birçok uygulama için kullanılmışlardır. Çizelge 2.4'te dokü mühendisliğinde farklı kullanım

alanlarına ait çalışmalardan örnekler verilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, nanokillerin yapısında bulunan hidrofilik grupların (Si-OH ve Al-OH) hücre tutunma ve çoğalmasını desteklediğini vurgulamıştır. Aynı zamanda, nanokil yüzeylerinde yer değiştirme reaksiyonlarına katılan iki değerlikli katyonlar aracılığıyla aktive olan integrin proteinlerinin hücre tutunmasının nedeni olduğu belirtilmektedir [79].

Yara iyileşme süreci, tercih edilen yara örtüsünün biyobozunurluğu, mikroorganizma invazyonunu engellemesi, uygun nemliliği sağlaması ve hücre tutunmasını desteklemesi gibi özelliklerinden etkilenmektedir. Geç iyileşen kronik yaralarda yara yatağı genellikle asidiktir. Yara örtülerinde bulunan killer sızıntıyı adsorpladığında asidik ortamın etkisiyle yer değiştirme reaksiyonları tetiklenir ve Li^+ , Mg^{2+} , $\text{Si}(\text{OH})_4$ gibi iyonlar salınır. Mg^{2+} yarada inflamatuvar cevabı hızlandırarak ve hücre çoğalmasını tetikleyerek yara iyileşmesine katkıda bulunur. Yara yüzeyleri tipik olarak düzensiz morfolojiye sahiptir. Bu nedenle yara örtülerinin adeziv özellik taşıması kullanımlarını kolaylaştırır. Yüksek şişme kapasitesi sayesinde nanokiller yara örtüsüne mukoadesiv özellik kazandırır. Montmorillonitin de aralarında bulunduğu katyonik killer, kanamayı durdurucu özellik gösterirler. Smektit içerikli WounStat® ilk yardımda kullanılabilecek bir kanama durdurucu ajan olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Diğer bir ürün ise Combat Gauze™ adıyla bilinen kaolin emdirilmiş sargı bezidir ve kanamayı durdurucu özelliktedir [81]. Nanokiller sayesinde, adeziv özellikte, sızıntıyı adsorplayabilen ve terapötik ajanların salımını yapabilen biyomalzemelerin tasarlanabilmesi söz konusudur.

Çizelge 2.4. Nanokil katkılı polimerik doku iskeleleri.

Nanokil	Katki	Polimer	Fabrikasyon	Hücre	Amacı	Referans
Laponit	-	PEGDA-Aljinat, Jelatin	3B Biyobaskılama	NIH 3T3 fare fibroblast	-	[82]
	Amoksisilin	PLGA	Elektroeğirme	-	Antibakteriyel	[83]
Hallosit	-	PLA	Elektroeğirme	-	-	[84]
Montmorillonit	-	PCL	Elektroeğirme	İnsan mezenkimal kök hücresi	Kemik rejenerasyonu	[85]
	Venlafaksin HCl	PLGA, Pluronik-F68	İki aşamalı emülsifikasyon	-	Depresyon için oral ilaç salımı	[7]
	Stronsiyum	Kitosan	Dondurarak kurutma	İnsan primer osteoblast	Kemik rejenerasyonu	[14]
	5-aminovaleik asit, hidroksiapatit	PCL	Çözelti döküm, dondurarak kurutma	İnsan mezenkimal kök hücresi	Kemik rejenerasyonu	[86]
	Kurkumin	PCL	Elektroeğirme	Fare dermal fibroblast hücresi	Yara örtüsü	[64]
	Paclitaxel	PLGA	İki aşamalı emülsifikasyon	Caco-2 ve HT-29, insan kalın bağırsak kök hücre hatları	Kanser tedavisi için oral ilaç salımı	[57]
Aniyonik kil	Doksorubisin, 5-fluorourasil, sodyum fusidat, antisens oligonükleotid	PLGA	Çözelti döküm	-	-	[87]
	-	PCL, Jelatin	Elektroeğirme	SH-SY5Y	Sinir rejenerasyonu	[88]

PEGDA, poli(etilen glikol)diakrilat

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez süresince kullanılan malzemeler ve yapılan deneysel çalışmaların yöntemleri açıklanmıştır. Çalışmalar temel olarak dört ana başlıkta sunulmuştur. İlk bölümde, farklı derişimlerdeki serbest borun, HUVEC (insan göbek kordonu endotel), HS2 (insan dermal keratinosit) ve BJ (insan dermal fibroblast) hücreleri üzerindeki etkisinin, yara iyileşmesi açısından, *in vitro* kültür çalışmaları ile incelenmesine yer verilmiştir.

İkinci bölümde, bor taşıyıcısı olarak kullanılan MMT'lere bor yüklemek amacıyla, farklı koşullarda yapılan adsorpsiyon çalışmaları anlatılmış ve karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Aynı zamanda, azometin-H ile bor tayinin hassas olarak yapılabilmesi için denenen koşullar açıklanmıştır.

Üçüncü bölümde, deri ve oral mukoza hasarlarında yara örtüsü olarak kullanılmak üzere hazırlanan, PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit)), PLGA/MMT (poli(laktik-ko-glikolik asit)/montmorillonit) ve PLGA/B-MMT (poli(laktik-ko-glikolik asit)/bor-montmorillonit) nanofibröz matrikslerin elektroğirme yöntemiyle üretimi anlatılmıştır. Nanofibröz matrikslerin yapısal karakterizasyon çalışmalarının ardından, HS2 hücrelerinin nanofibröz matrikslere tutunma ve çoğalma davranışlarının incelendiği *in vitro* çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir.

Son bölümde ise, PLA (poli(laktik asit)), PLA/MMT (poli(laktik asit)/montmorillonit) ve PLA/B-MMT (poli(laktik asit)/bor-montmorillonit) nanofibröz matrikslerin elektroğirme yöntemiyle üretimi ve yapısal karakterizasyonu anlatılmıştır. Daha sonra, üretilen nanofibröz matrikslerin, İDF (insan dermal fibroblast) ve HS2 hücreleri ile yara iyileşmesi açısından değerlendirilmesine ilişkin çalışmaların yöntemleri detaylandırılmıştır.

3.1. Malzemeler

Deneysel çalışmalar için kullanılan tüm kimyasallara ait detaylara Çizelge 3.1'de alfabetik sıra ile yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler.

Malzeme	Kod	Firma	Ülke
Alexa Fluor® 488 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor	A11008	Thermo Fisher	A.B.D.
Alexa Fluor® 488 konjuge phalloidin	CST 8878S	Cell Signaling	A.B.D.
Alexa Fluor® 555 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor	4413	Cell Signaling	A.B.D.
Amonyum asetat	1.01116	Merck	Almanya
Azometin-H monosodyum tuz hidrat	11635	Sigma-Aldrich	Almanya
Borik asit	10043-35-3	Merck	Almanya
cDNA reverse transkripsiyon kiti	4368814	Applied Biosystem	A.B.D.
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	D-1306	Invitrogen	A.B.D.
DCF-DA (2,7'-dikolorofloresin diasetat)	D6883	Sigma-Aldrich	Almanya
Dekstran	D4751	Sigma-Aldrich	Almanya
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1.06580	Merck	Almanya
DMEM-F12	319-085 CL	Wisent	Kanada
DMEM-HG	DMEM-HPXA	Capricorn Scientific	Almanya
DMEM-LG	DMEM-LPXA	Capricorn Scientific	Almanya
DMSO	A3672	Applchem	Almanya
Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi (D-PBS)	PBS-1A	Capricorn Scientific	Almanya
EDTA disodyum tuzu	EDT001	BioShop	Kanada
Eosin Y	HX61092539	Merck	Almanya
Etidyum homodimer-1	46043	Sigma-Aldrich	A.B.D.
Etil alkol	1.50318E+11	Teksoll	Türkiye
EvaGreen®	08-25-00001	Solis Biotec	Estonya
Fetal sığır serumu (FBS)	FBS-HI-11A	Capricorn Scientific	Almanya
Fibronektin birincil antikor	26836	Cell Signaling	A.B.D.
Glasiyal asetik asit	1.00056	Merck	Almanya
Glutaraldehit	G-6257	Sigma-Aldrich	Almanya
Hekzametildisilazan (HMDS)	440191	Sigma-Aldrich	Almanya
Hematoksilen	HX84908574	Merck	Almanya

Çizelge 3.1. Devamı.

HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)	105228	Sigma-Aldrich	Almanya
Hidroklorik asit (HCl)	07102	Sigma-Aldrich	Almanya
Human VEGF 165	4363-10	BioVision	A.B.D.
İzopropanol	1.09634.2511	Merck	Almanya
Kalsein asetoksimetil (Kalsein AM)	56496	Sigma-Aldrich	Almanya
Kalsiyum klorür (CaCl₂)	1.02378	Merck	Almanya
Keçi serumu	G-9023	Sigma-Aldrich	Almanya
Kloroform	1.02445	Merck	Almanya
Kollajen 1A1 birincil antikor	72026	Cell Signaling	A.B.D-
Ksilen	16446	Sigma-Aldrich	Almanya
L-askorbik asit	A7506	Sigma-Aldrich	Almanya
L-glutamin	GLN-B	Capricorn Scientific	Almanya
Matrijel matriks	354230	Corning	A.B.D.
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür)	A2231	Appllichem	Almanya
Nanomer PGV (Bentonit)	682659	Sigma-Aldrich	Almanya
Paraformaldehit	P6148	Sigma-Aldrich	Almanya
Penisilin-Streptomisin	PS-B	Capricorn Scientific	Almanya
Pluronic F127	P2443	Sigma-Aldrich	Almanya
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	PDLG 5010	Corbion Purac	Hollanda
Poli(L-laktik asit) (PLA)	PL18	Corbion Purac	Hollanda
Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄)	1.04871	Merck	Almanya
Potasyum klorür (KCl)	1.04936	Merck	Almanya
Ribonükleaz (RNaz) inhibitörü	1832151	Applied Biosystem	A.B.D.
RNA izolasyon kiti	74004	Qiagen	Almanya
RPMI	RPMI-HXA	Capricorn Scientific	Almanya
Senesens detection kit	ab65351	Abcam	İngiltere
Sığır serum albümin (BSA)	A2153	Sigma-Aldrich	Almanya
Sitrik asit anhidröz	1.06488.1000	Merck	Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	1927280	Merck	Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	S9888	Sigma	Almanya

Çizelge 3.1. Devamı.

Sodyum sitrat	8.18707.1000	Merck	Almanya
Tripsin	TRY-3B	Capricorn Scientific	Almanya
Triton X-100	215682500	Acros Organics	Almanya
Trizol	79306	Qiagen	Almanya

3.2. Borun İnsan Endotel, Dermal Keratinosit ve Dermal Fibroblast Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi İçin Yapılan *İn vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışmasının bu aşamasında, yara iyileşme sürecinde serbest borun (B) dermal hücreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan tüm proliferasyon ortamlarının bor ile katkılandırılması için, 0,23 g borik asit (H_3BO_3) 20 mL steril ultra saf su içerisinde çözülerek stok (2,0 mg/mL) çözelti hazırlanmış ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Bu ilk stoktan ultra saf su ile 1,0 mg/mL ve 0,1 mg/mL derişimde 2 seyreltik çözelti hazırlanmış ve çözeltilerin pH'ı 2 M NaOH kullanılarak 7,4'e ayarlanmış ve tekrar 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Böylece proliferasyon ortamlarına %1 (v/v) oranında eklendiğinde 1, 10 ve 20 µg/mL bor içeren besi ortamları elde edilmiştir.

3.2.1. HUVEC'ler ile Bor'un *İn vitro* Tübül Oluşumuna Etkisi

Hücre besi ortamında bulunan serbest bor'un *in vitro* tübül oluşumuna etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, *in vitro* tübül oluşturma yeteneği olduğu bilinen insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besi ortamında (proliferasyon ortamı) çoğaltılmıştır.

Matrijel kaplamanın yapılması

İstenilen hücre sayısına ulaşıldıktan sonra, çalışmanın yürütüleceği 96 kuyucuklu hücre kültür kabı Matrijel ile kaplanmıştır. Matrijel, saklama koşulu olan -20°C'de donmuş haldedir. Bu nedenle, hücre ekiminden bir gün önce +4°C'de bekletilerek sıvılaşması sağlanmıştır. Ayrıca, yaklaşık 10-22°C arasında jelleştiğinden, yüzeylerin homojen bir şekilde kaplanması için, filtreli pipet uçları ve 96 gözlü hücre kültür kabı da önceden soğutulmuştur. Sıvı halde bulunan Matrijel, soğuk 96 gözlü kültür kabının ekim yapılacak

her bir gözüne 50 µL olacak şekilde eklenmiş ve 37°C'deki inkübatöre yerleştirilerek jelleşmesi için beklenmiştir [89].

Bor içeren ortamların hazırlanması

Hücre ekiminde kullanılmak üzere, kontrol (0 µg/mL), 1, 10 ve 20 µg/mL bor içeren proliferasyon ortamları, 10 µg/mL vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) içerecek ve içermeyecek şekilde hazırlanmıştır.

Hücre ekimi

Pasaj 14 HUVEC'ler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılarak 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan farklı ortamlarla (100 µL'de) Matrijel kaplı yüzeylere ekilmiş ve 6 sa boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren hücre kültürü inkübatöründe bekletilmiştir. VEGF içeren ya da içermeyen borlu proliferasyon ortamları ile ekilen hücreler 4üncü ve 6ncı saatlerde optik mikroskop (Olympus, A.B.D.) ile görüntülenmiştir. VEGF içermeyen borlu ortamlarda kültüre edilen hücrelerin 6 sa sonra elde edilen optik mikroskop görüntülerinin analizi Wimasis (<http://www.wimasis.com>) ile yapılmıştır. Elde edilen verilerle farklı besi ortamlarının tübül oluşumlarına etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.2. HS2'ler ile *In-vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

İnsan dermal keratinosit hücre hattı olan HS2 hücrelerinin bor içeren besi ortamlarındaki davranışlarının yara iyileşmesi açısından değerlendirilmesi amacıyla iki boyutlu *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. HS2 hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın laboratuvarından temin edilmiştir. Hücreler, %5 (v/v) FBS (fetal sıgır serumu), %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi ortamında (proliferasyon ortamı) çoğaltılmıştır. Yeterli hücre sayısına ulaşılmasının ardından, analize göre 24, 48 ya da 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5×10^3 hücre/cm² yoğunlukta ekim yapılmıştır. Hücrelerin bir gece kültüre edilmesinin ardından ortamları gruplara göre, kontrol (0 µg/mL), 1, 10 ve 20 µg/mL bor içeren proliferasyon ortamları ile değiştirilerek belirlenen günlerde analizler yapılmıştır.

3.2.2.1. MTT Analizi

Farklı miktarlarda bor içeren proliferasyon ortamlarında hücre canlılığının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kültürün 1, 3, 7, 10, 12 ve 14. günlerinde her bir kuyucuğa %10 (v/v) MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) içeren serumsuz besi ortamı eklenmiş ve 3 sa boyunca 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında, canlı hücrelerin NAD(P)H-bağımlı oksiredüktaz enzimleri sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT boyasını indirgeyerek suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir. Süre sonunda, ortamlar kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 400 µL izopropanol (0,04 M HCl içeren) eklenerek mor formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden alınan 200’er µL örnek, 96 gözlü kültür kabına aktarılarak 690 nm referans olmak üzere 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) ölçüm sonucu optik yoğunluk belirlenmiştir. Bütün gruplarda MTT analizleri 3 paralel örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kontrol grubu hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer grup hücrelerin canlılığının bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenmesi ile verilmiştir.

3.2.2.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre canlılığının kalitatif olarak değerlendirilmesi için kültürün 3 ve 7. günlerinde canlı/ölü boyama analizi yapılmıştır. Canlı hücrelerin işaretlenmesi için kullanılan kalesin AM hücre içine alınmasının ardından hücre içi esteraz aktivitesi nedeniyle yeşil floresan ışıma (ex/em 494/517 nm) yapan kalseine dönüşmektedir. Ölü hücrelerin görüntülenmesi için ise, sadece hasarlı hücre membranından geçebilen ve nükleik asitlere bağlanarak kırmızı floresan ışıma (ex/em 528/617) yapan etidyum homodimer-1 (EthD-1) kullanılmıştır. Tüm gruplarda örnek üzerindeki ortam uzaklaştırılarak, kuyucuklar Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren PBS (PBS+) ile 2 kere yıkanmıştır. Ardından, PBS+ içerisinde 1 mM Kalsein AM ve 1 mM EthD-1 olacak şekilde hazırlanan boya çözeltisinden her bir kuyucuğa 250 µL eklenerek oda sıcaklığında ışıksız ortamda 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerindeki boya çözeltisi uzaklaştırılmış ve PBS+ ile 2 defa yıkama yapılarak kuyucuklar hızlıca floresan mikroskop (Olympus, A.B.D.) ile incelenmiştir. Görüntüler her bir grup için 2 paralel örnekten elde edilmiştir.

3.2.2.3. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI Boyama

Tüm gruplarda hücre morfolojisinin analiz edilebilmesi için kültürün 3 ve 7. günlerinde Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyama yapılarak hücre iskeleti ve çekirdeği görüntülenmiştir. Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklar 2 defa 5 dk olacak şekilde PBS ile yıkanmıştır. Hücreler %4 (w/v) soğuk paraformaldehit

çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dk fikse edilmiştir. Ardından, 2 kez PBS ile yıkanan hücrelerin membran geçirgenliğini sağlamak için 250 µL %0,01 (v/v) TritonX-100 çözeltisi (PBS içerisinde) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk daha inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklar 3 defa 5 dk PBS ile yıkandıktan sonra, 1:100 Alexa Fluor® 488 Phalloidin ve 1:1000 DAPI içeren PBS-A (%1 (w/v) BSA (sığır serum albümin) içeren PBS) ile 30 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBS-A ile 3 kere 5 dk olacak şekilde yıkama yapılmış ve floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Hücre iskeleti yeşil, hücre çekirdeği ise mavi olarak görülmektedir. Tüm gruplarda incelemeler 2 paralel örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4. Hücre Göçü Analizi (Scratch Assay)

Farklı derişimlerde bor içeren proliferasyon ortamlarının yara iyileşmesinde büyük önemi olan hücre göçüne etkisinin belirlenebilmesi için çalışmalar 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarında yürütülmüştür. HS2 hücreleri $7,5 \times 10^3$ hücre/cm² olacak şekilde proliferasyon ortamı ile ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %80-90 doyunluğa ulaştığında üzerlerindeki ortam uzaklaştırılmış ve 200 µL'lik steril pipet ucu kullanılarak yara iyileşmesi modelleri oluşturulmuştur. Bütün kuyucuklar, mekanik etki ile kaldırılan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 2 kere steril D-PBS ile yıkanmıştır. Ardından, gruplara bor içeren proliferasyon ortamları eklenerek 48 sa boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Her grup için 3 paralel örnek ile çalışılmış, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde optik mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Görüntülerin ImageJ (NIH, A.B.D.) programı ile analizi yapılarak, hücre göçünün kantitatif olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır.

3.2.2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu belirlemek için, kültürün 7. ve 14. günlerinde tüm gruplar DCF-DA (2',7'-Diklorofloresin diasetat) ile boyanmıştır. Floresan özelliği bulunmayan DCF-DA hücre membranından geçebilmekte ve sitoplazmada esterazlar ile DCF'ye dönüşmektedir. DCF'nin ROS varlığında okside olması sonucunda ortaya çıkan floresan ışımaya kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. DCF-DA stok çözeltisi 1 mM derişimde olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüş ve -20°C'de saklanmıştır. Kültürün belirlenen günlerinde, tüm gruplarda kuyucuklardaki ortam uzaklaştırılmıştır. Yüzde 1 (v/v) DCF-DA stok çözeltisi ve %1 (v/v) L-glutamin içeren PBS+ eklenerek 30 dk 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, tüm kuyucuklar 1 kere PBS+ ile yıkanmış ve kuyucuklara PBS+ eklenerek Spectramax cihazında (ex/em 485/535 nm) floresan şiddetleri ölçülmüştür. Daha sonra hızlıca floresan mikroskop ile görüntülemeleri yapılmıştır. Değerlendirmeler 3 paralel örnek üzerinden yapılmıştır.

3.2.2.6. Hücrelerin “Senesens” Özelliklerinin Belirlenmesi

Bor katkılı hücre kültür ortamlarında hücrelerin senesens (yaşlanma) özelliklerinin belirlenmesi için kültürün 10. gününde senesens kiti kullanılarak boyama yapılmıştır. Hücrelere verilen X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) substratının, SA-β-gal (senesens ilişkili β-galaktozidaz) enzimi ile parçalanması ile yaşlanan hücreler tespit edilmiştir. Kısaca; hücreler üzerindeki ortamlar çekilerek 1 defa PBS ile yıkanmıştır. Kit içindeki fiksasyon çözeltisi ile 10-15 dk fiksasyon yapılmıştır. Boyama karışımı taze olarak hazırlanarak her bir göze 250 µL (235 µL boyama çözeltisi + 2,5 µL boyama takviyesi + 12,5 µL X-gal (20 mg/mL)) eklenmiştir. Ardından hücre kültür kabının etrafı CO₂ almayacak şekilde sıkıca Parafilm ile sarılarak 1 gece 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda optik mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Senesense giren hücrelerdeki artan β-galaktozidaz aktivitesi nedeniyle, yeşil-mavi renkte hücre boyamaları elde edilmiştir. Görüntüler 2 paralel örnek üzerinden alınarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.7. Yara İyileşmesinin RT-PCR ile Değerlendirilmesi

Besi ortamlarında bor katkısı bulunan HS2 hücrelerinin yara iyileşmesi ve damarlanma ile ilişkili genlerinin ifade düzeylerinin ölçümü kültürün 7. ve 14. günlerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla, kültür yüzeyinden tripsin yardımıyla kaldırılan hücreler 2 kere D-PBS ile yıkanmış ve analiz gününe kadar Eppendorf tüpler içerisinde hücre pelleti şeklinde -80°C’de saklanmıştır. Analizin ilk basamağı olan total RNA izolasyonu için hücrelerin bulunduğu Eppendorf tüplerin her birine 500 µL Qiazol (trizol) eklenmiş, 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda 100 µL kloroform eklenerek çalkalanan tüpler 5 dk daha inkübe edildikten sonra, 13.000 rpm’de 15 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Tüplerde faz ayrımının gerçekleşmesinin ardından, en üstteki sulu fazda toplanan RNA’lar yeni tüplere aktarılarak, eşit hacimde olacak şekilde %70 (v/v, RNaz içermeyen suda) etil alkol (EtOH) çözeltisi eklenerek yıkanmıştır. Bu asamadan sonra RNA’nın saflaştırılması için RNeasy® Mini Kit (Qiagen, UK) kullanılmış ve kit protokolü

uygulanmıştır. Total RNA'lar 30 µL RNaz içermeyen su içerisinde toplanmıştır. RNA'nın derişimi ve kalitesi Nanodrop (Thermo Scientific 2000c, A.B.D.) cihazı ile ölçülmüştür. İkinci basamakta RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bütün örneklerde eşit miktarda RNA kullanılarak, High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kit (Thermo Fischer, A.B.D.) protokolü uygulanmıştır. cDNA sentezi Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, A.B.D.) cihazında, 25°C'de 10 dk, 40°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk reaksiyon programıyla gerçekleştirilmiştir. RT-PCR için gerekli olan cDNA'ların eldesinin ardından, 5X HotFire Pol® Eva Green® qPCRMix Plus (SolisBioDyne, Estonya) ve primerler kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımı tüplere eklenmiş ve LightCycler® Nano Instrument (Roche, İsviçre) cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Son aşamada Çizelge 3.2'de baz dizileri verilen primerler ile RT-PCR yapılmıştır. Cihaz, denatürasyon basamağı 95°C'de 900 s, uzama basamağı 95°C'de 15 s, primerin yapışma sıcaklığında (T_{annealing}) 20 s ve 72°C'de 20 s olacak şekilde 45 döngü ve son olarak ayrılma basamağı 60°C'de 20 s ve 95°C'de 20 s olacak şekilde programlanmıştır. Her bir gen için ifade değerinin referans gen olarak seçilen insan β-aktin geninin ifade değerine oranı 2^{-ΔΔCt} metodu kullanılarak hesaplanmış ve bor içermeyen grubun 7. gün değerleri kontrol olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Her bir grup için 4 paralel örnek ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.2. HS2 hücrelerinin RT-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.

Primer	Kısaltma	Baz dizisi (5'-3')
Keratin14	<i>KRT14</i>	F TGCCGAGGAATGGTTCTTCACC
		R GCAGCTCAATCTCCAGGTTCTG
Fibroblast büyüme faktörü2	<i>FGF2</i>	F AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG
		R CCTTTGATAGACACAACCTCCTCTC
Damar endoteli büyüme faktörü	<i>VEGF</i>	F TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA
		R GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA
Trombosit kökenli büyüme faktörü	<i>PDGF</i>	F CAGCGACTCCTGGAGATAGACT
		R CGATGCTTCTCTTCTCCGAATG
β-aktin	<i>β-aktin</i>	F CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
		R AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3.2.3. BJ'ler ile *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

İnsan dermal fibroblast hücre hattı olan BJ hücreleri, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Mehtap Kılıç Eren'in laboratuvarından temin edilmiştir. BJ hücrelerinin bor içeren besi ortamlarındaki davranışlarının yara iyileşmesi açısından değerlendirilmesi amacıyla iki boyutlu *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM-HG besi ortamında (proliferasyon ortamı) çoğaltılmıştır. Yeterli hücre sayısına ulaşılmasının ardından, analize göre 24, 48 ya da 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına $5-8 \times 10^3$ hücre/cm² yoğunlukta ekim yapılmıştır. Hücrelerin bir gece kültüre edilmesinin ardından ortamları gruplara göre, kontrol (0 µg/mL), 1, 10 ve 20 µg/mL bor içeren proliferasyon ortamları ile değiştirilerek belirlenen günlerde aşağıda belirtilen analizler yapılmıştır.

- MTT Analizi
- Canlı/Ölü Hücre Boyama
- Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI Boyama
- Hücre Göçü Analizi (Scratch Assay)
- Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi
- Hücrelerin “Senesens” Özelliklerinin Belirlenmesi
- Yara İyileşmesinin RT-PCR ile Değerlendirilmesi

Kısacası, HS2 hücreleri için yapılan tüm analizler BJ hücreleri için de aynı yöntemlerle yapılmıştır ve detaylarına Bölüm 3.2.2.1-7 arasında yer verilmiştir.

BJ hücreleri için RT-PCR analizinde incelenen belirteçler ve baz dizileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. BJ hücrelerinin RT-PCR analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.

Primer	Kısaltma		Baz dizisi (5'-3')
Kollajen tip I alfa 1 zinciri	<i>COL1A1</i>	F	GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC
		R	AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA
Fibronektin	<i>FN</i>	F	ACAACACCGAGGTGACTGAGAC
		R	GGACACAACGATGCTTCCTGAG
Laminin altünite alfa-5	<i>LAMA5</i>	F	GTCACAGAGCAGGAGGTGGCT
		R	GCTTCTGTCAAGACTCTCCAGG
Fibroblast büyüme faktörü2	<i>FGF2</i>	F	AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG
		R	CCTTTGATAGACACAACCTCCTCTC
Damar endoteli büyüme faktörü	<i>VEGF</i>	F	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA
		R	GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA
Trombosit kökenli büyüme faktörü	<i>PDGF</i>	F	CAGCGACTCCTGGAGATAGACT
		R	CGATGCTTCTCTTCCTCCGAATG
β -aktin	<i>β-aktin</i>	F	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
		R	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3.3. Nanokillere Bor Adsorpsiyonu

Tez çalışmasında, hidrofilik özellikteki bentonit grubuna ait nanokillere (MMT) bor adsorpsiyonu iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Her çalışma öncesinde, MMT'ler 105°C vakum etüvünde 2 sa süreyle kurutulmuştur. İlk adsorpsiyon çalışmalarında, düşük bor derişimleri ile denemeler yapılarak adsorpsiyonun dengeye ulaştığı koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bor adsorpsiyonunda etken olan faktörleri belirlemek için yapılan bu ön çalışmalarda, adsorpsiyon sonrasında süpernatanda kalan bor, kolorimetrik olarak azometin-H yöntemi ile analiz edilerek, kilin adsorpladığı bor miktarı indirekt olarak hesaplanmıştır. Daha sonra ise, nanokilin katyon değişim kapasitesi hesaplanarak, daha yüksek derişimlerde bor ile adsorpsiyon çalışmaları yapılmış ve hem süpernatandaki hem de nanokillerdeki borun tayini endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Bor Adsorpsiyonunda Etken Faktörlerin Belirlenmesi

Adsorpsiyon çalışmalarında yapılan ilk denemelerin koşulları bu bölümde özetlenmiştir. Denge çalışmalarında kullanılan stok bor çözeltisi, H_3BO_3 'ün ultra saf suda çözünmesiyle 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı 10 M NaOH çözeltisi yardımıyla 9,0-9,5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm çalışmalarda pH ve sıcaklık sabit tutulmuştur. Bu bölümde yapılan tüm deneyler için, adsorpsiyon sonrası süpernatandaki bor tayini azometin-H yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve MMT'nin adsorpladığı bor miktarı Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır. Burada q kilin bor adsorpsiyon kapasitesini (mg B/g kil), C_i başlangıç bor derişiminin (mg/L), C_e denge bor derişimini (mg/L), V toplam çözelti hacmini (L), m ise MMT ağırlığını (g) tanımlar.

$$q = \frac{(C_i - C_e)V}{m} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

3.3.1.1. Azometin-H Yöntemi

Spektrofotometrik bor tayini için bor-azometin-H bileşiğinin oluşumuna dayanan azometin-H yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak, oluşan bileşiğin adsorpsiyon spektrumu UV-Vis spektrofotometre cihazıyla (Thermo Scientific GENESYS 10, A.B.D.) elde edilmiştir. Analitik yöntemin geliştirilmesi için, farklı bileşimlerdeki reaktif ve tampon çözeltilerinden yararlanılmıştır. Denemelerde kullanılan farklı çözeltilerin hazırlanmasına ilişkin detaylar aşağıda açıklanmıştır.

Stok bor çözeltisi: 1000 $\mu\text{g/mL}$ stok bor çözeltisinin hazırlanması için 0,23 g H_3BO_3 tartılarak 40 mL ultra saf suda çözülmüştür. Alt stok olarak 100 $\mu\text{g/mL}$ bor çözeltisi hazırlanmış, pH'ı 9,0-9,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bor derişimine karşılık gelen absorbans değerini gösteren kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi için, en yüksek derişimden başlanarak yarı yarıya seyreltme yapılmış ve kör çözelti de dahil olmak üzere 8 farklı bor derişimi için analiz gerçekleştirilmiştir.

Azometin-H çözeltileri:

- Azo-H/A: 0,1g azometin-H sodyum tuzu ve 0,3 g L-askorbik asit 10 mL ultra saf suda çözülmüştür.
- Azo-H/B: 0,1g azometin-H sodyum tuzu ve 0,2 g L-askorbik asit 10 mL ultra saf suda çözülmüştür.

Tampon çözeltiler:

- Tampon çözelti 1: 28,88 mL 0,002 M sitrik asit ve 19,41 mL 0,001 M sodyum sitrat karıştırılarak ultra saf suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Tampon çözelti 2: 0,002 M sitrik asit ve 0,001 M sodyum sitrat içeren 100 mL çözelti hazırlanmıştır.
- Tampon çözelti 3: 20 g amonyum asetat tuzu 40 mL ultra saf suda çözüldükten sonra, 10 mL glasiyal asetik asit ve 0,56 g EDTA disodyum tuzu eklenerek hazırlanmıştır.

Reaktif çözelti: Azometin-H ve tampon çözeltilerinin reaksiyon öncesinde eşit hacimlerde (1:1) karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Analizler 96 kuyucuklu kültür kaplarında yapılmıştır. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde, 1:1 ve 1:3 olmak üzere, iki farklı reaktif:örnek oranları denenmiştir. Bütün denemelerde azometin-H bor kompleksi oluşması için ortam sıcaklığı 23°C, bağlanma süresi 30 dk, çalkalama hızı 150 rpm olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen çözeltilerin optik yoğunluğu 420 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.3.1.2. Düşük Derişimlerde Bor Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon ortamı olarak çalışmalar boyunca ultra saf su ya/ya da 0,01 M CaCl₂ çözeltisi kullanılmıştır. Kalsiyum klorür çözeltisinin iyon şiddeti (µ) Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır. Burada Z_i iyon yükünü, C_i ise iyonun derişimini tanımlar.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 C_i \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Bor adsorpsiyonunda, iyon şiddetinin, sürenin ve adsorpsiyon ortam hacminin etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan tüm çalışmalarda çözelti pH'ları 9,0-9,5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyler daha önce kurutulan 1 g MMT'ler ile 23°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.4'te deneylere ait parametreler açıklanmıştır. Adsorpsiyon çalışmalarının sonunda karışımların 4.500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatandan azometin-H yöntemi ile bor tayini yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Adsorpsiyon deneylerine ait parametreler.

	Bor derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	Adsorpsiyon ortamı	Adsorpsiyon ortamının hacmi (mL)	Süre (sa)
İyon şiddeti ve bor derişiminin etkisi	0-100	ultra saf su ya da 0,01 M CaCl_2	10	2
Sürenin etkisi	10	ultra saf su ya da 0,01 M CaCl_2	10	0-24
	5	0,01 M CaCl_2	5	0-24
	25	0,01 M CaCl_2	5	0-2
Adsorpsiyon ortam hacminin etkisi	5	0,01 M CaCl_2	5-10-25	2

3.3.2. Kilin Katyon Değişim Kapasitesinin Belirlenmesi ile Yapılan Adsorpsiyon Çalışmaları

3.3.2.1. Katyon Değişim Kapasitesinin Hesaplanması

Nanokilin katyon değişim kapasitesi (KDK) ANSI/ASTM C837-76 standardına göre belirlenmiştir. Bu yöntem, belirli pH ve derişimde hazırlanan metilen mavisi çözeltisinin kil tarafından adsorpsiyonuna dayanır. Bu standarda göre şu işlemler yapılmıştır.

- 0,01 N metilen mavisi çözeltisi hazırlanır.
- 2 g kil 300 mL ultra saf su ile homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılır ve pH'ı 2,5-3,8 arası olacak şekilde sülfürik asitle ayarlanır.
- 0,01 N'lık metilen mavisi çözeltisinden 5 mL karışıma eklenir ve manyetik karıştırıcıda 1-2 dk karışması beklenir.
- Cam baget yardımıyla karışımdan alınan damla filtre kağıdına damlatılır ve rengi gözlemlenir.
- Standartta belirtilen renge ulaşılan kadar işlem tekrarlanır.

Deneyde ilk olarak çevresinde renksiz bir su halkası bulunan mavi damlalar elde edilmiştir (Şekil 3.1). Zamanla kilin adsorpladığı metilen mavisi arttıkından, açık mavi renk koyu mavi olarak gözlemlenmiştir. Koyu mavi damla dışında açık mavi renkli halka görülene kadar deneye devam edilmiştir. Bu noktaya ulaşıldıktan sonra deney

sonlandırılarak harcanan metilen mavisi miktarından Eşitlik 3.3 yardımıyla kilin KDK'sı (meq/100 g kil) hesaplanmıştır. Burada, E metilen mavisi çözeltisinin derişimi (mmol/mL), V kullanılan metilen mavisi çözeltisinin toplam miktarını (mL), W ise kilin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

$$KDK = \left(E \times \frac{V}{W} \right) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$



Şekil 3.1. ANSI/ASTM C837-76 standardına göre yapılan metilen mavisi deneyi.

3.3.2.2. Yüksek Derişimlerde Bor Adsorpsiyonu

Bor adsorpsiyon çalışmasının bu bölümünde, katyon değişim kapasitesinin 2 ya da 5 katına eődeęer olacak şekilde bor çözeltileri sırasıyla 2,50 mmol (2x) ve 6,25 mmol (5x) bor derişiminde hazırlanmıştır. Bu amaçla, 1,24 g ve 3,10 g H₃BO₃ 80 er mL ultra saf su içinde çözülerek pH'ları 9,0-9,5 arasında ayarlanmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları, her iki derişimdeki çözelti için de 1 g MMT ile 23°C'de karıştırmalı ortamda 24 sa süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda örnekler 4.500 rpm de 10 dk santrifüjlenerek süpernatantlar toplanmıştır. Tekrar santrifüj yardımıyla MMT'ler 3 defa ultra saf su ile yıkanmış ve dondurarak kurutma (Christ, Almanya) yöntemiyle kurutulmuştur. Bu aşamada toplanan süpernatantlar ve B-MMT örnekleri adsorpsiyon miktarının hesaplanması için ICP-MS ile analiz edilmiştir. Kurutulan B-MMT örneklerinin bir kısmı ile bor salım çalışmaları yapılmıştır. Salım çalışması için, 2x ya da 5x B-MMT'den 1 g tartılarak 10 mL ultra saf su içine eklenmiş ve 37°C çalkalamalı ortamda 24 sa süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda örnekler 4.500 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatantlar toplanmıştır. Tekrar santrifüj yardımıyla B-MMT'ler 3 defa ultra saf su ile

yıkanmış ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Süpernatantlar ve salım sonrası B-MMT örnekleri bor salım miktarının hesaplanması için ICP-MS (Perkin Elmer DRC II, A.B.D.) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, MMT ve 5xB-MMT'lerin kimyasal yapıları Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi (Thermo Scientific, A.B.D.) ile 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında belirlenmiştir.

3.4. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, PLGA, PLGA/MMT ve PLGA/B-MMT fiber matrislerin elde edilmesine ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Hazırlanan fiber matrislerin, fizyolojik koşullarda gösterdiği büzüşme probleminin çözümüne yönelik yapılan denemeler açıklanmıştır. Ayrıca, farklı oranlarda MMT ve B-MTT kullanılarak hazırlanan fiber matrislerin, HS2 hücrelerinin canlılık ve morfolojisine etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalar açıklanmıştır.

3.4.1. Elektroegirme ile PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi

Nanokil içermeyen PLGA fiber matrislerin elde edilmesi amacıyla, Corbion Purac (Hollanda) firmasından temin edilen PLGA polimeri, derişimi %7 (w/v) olacak şekilde HFIP içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla bir gece karıştırılarak çözündürülmüştür. PLGA/B-MTT fiber matrislerin eldesinde ise, ilk olarak HFIP içerisinde polimere göre değişen farklı oranlarda (10, 20, 40 (% w/v)) 5xB-MMT eklenerek 30 dk süreyle ultrasonik banyoda (Sonorex Super 10 P, Bandelin, Almanya) tutulmuş ve homojen olarak dağılmalarının ardından derişimi %7 (w/v) olacak şekilde PLGA eklenmiştir. Karışımlar bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda çözünmeye bırakılmıştır.

Bor katkılı fiber matrislerin hazırlanmasında 5xB-MMT kullanılmıştır. PLGA/MMT çözeltileri de PLGA/B-MMT ile aynı şekilde üretilmiş sadece 5xB-MMT yerine herhangi bir muamele yapılmayan MMT kullanılmıştır. Tüm çözeltiler, plastik şırıngalara alınarak, şırınga pompasına (New Era Systems, A.B.D.) yerleştirilmiştir. Belirli bir akış hızı ile polimer akıtılırken, şırınga iğnesinin ucuna yüksek voltaj güç kaynağı (Gamma High Voltage Research, A.B.D.) aracılığıyla elektrik akımı uygulanmış ve nanofibröz formda matrisler düz bir toplayıcıda biriktirilmiştir. Elektroegirme parametreleri; uygulanan voltaj 20-22 kV, akışı hızı 1,0-1,5 mL/sa, şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 10-15 cm olacak şekilde değiştirilmiş ve fiberlerde boncuk oluşumunun gözlenmediği uygun üretim koşulları belirlenmiştir.

3.4.2. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Karakterizasyonu

Bu bölümde, yaklaşık 7 sa süreyle elektroğirme ile elde edilen ve ortalama 80 µm kalınlıkta olan fiber matrislere ait karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Genel olarak, farklı oranlardaki MMT katkılarının fiber matlar üzerindeki etkisinin anlaşılması amaçlanmıştır. Bu nedenle analizlerde farklı gruplar kullanılmış ve bir ön değerlendirme yapılmıştır.

3.4.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrislerin morfolojilerinin incelenmesinde SEM (GAIA3, Tescan, Çek Cumhuriyeti) analizi kullanılmıştır. Örnekler analiz öncesi altın-paladyum ile kaplanmış ve farklı büyütme oranlarında görüntüler elde edilmiştir. Fiber çapları ve çap dağılımlarının belirlenmesi için, her bir örnekten en az 100 tane fiber çapı, Image J programı (NIH, A.B.D.) ölçülmüştür.

3.4.2.2. Kimyasal ve Kristalografik Karakterizasyon

PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrislerin kimyasal yapıları, ATR tekniği kullanılarak Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi (Thermo Scientific, A.B.D.) ile 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında belirlenmiştir.

Fiber matrislerin ve MMT'nin kristal yapıları, X-ışını kristalografisi (Wide angle XRD) analizi (Ultima IV, Rigaku, Japonya) ile incelenmiştir. Analiz, 2°-70° tarama aralığında ve 2°/dk hızında gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.3. Su Temas Açısı Analizi

Hidrofilik özellikte olan MMT'nin, üretilen fiber matrislerin ıslatılabilirlik özelliklerine olan etkisi, elektroğirme çözeltilerinin, Teflon Petri kaplarına dökülmesiyle elde edilen membranlar ile incelenmiştir. Bunun nedeni ise, fiber matrislerde bulunan gözeneklilik ve hava etkisinin dışlanarak, sadece MMT'nin neden olduğu ıslatılabilirlik farkının değerlendirilebilmesidir. PLGA, PLGA/20 MMT ve PLGA/40 MMT membranların su temas açısı ölçümleri Krüss DSA 100 (Almanya) cihazıyla yapılmıştır.

3.4.2.4. Termal Karakterizasyon

Bor katkısının malzemelerin termal özelliklerine etkisi olabileceği düşüncesiyle, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Termogravimetri (TG) analizlerinde, MMT katkılı fiber matrislerin yanı sıra, çeşitli oranlarda B-MTT katkısına sahip fiber

matrikslerin incelenmesine de yer verilmiştir. Ayrıca, PLGA reçine, MMT ve B-MMT örnekleri de analiz edilmiştir.

DSC analizi (Diamond DSC, Perkin Elmer Inc., A.B.D.) oda sıcaklığından 400°C'ye kadar 5°C/dk hızında gerçekleştirilmiştir. Termal kütle kayıplarının belirlendiği TG analizi (EXSTAR 6000, SII Nanotechnology Inc., Japonya) ise oda sıcaklığından 600°C'ye kadar 5°C/dk hızında yapılmıştır.

3.4.2.5. PLGA/20 B-MMT Fiber Matrikslerden Bor Salım Çalışması

Fiber matrikslerden bor salım profilinin belirlenmesi için PLGA/20 B-MMT örneklerinden yararlanılmıştır. Eşit ağırlığa sahip 5'er adet fiber matriks kesilerek hazırlanmış ve 5'er mL PBS içeren iki adet cam şişeye yerleştirilmiştir. Şişeler 37°C'de 9 gün süreyle, çalkalamalı ortamda inkübe edilerek, farklı zaman aralıklarında alınan örneklerden bor tayini azometin-H yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.6. Fiber Matrikslerin Büzüşme Probleminin Önlenmesine Yönelik Çalışmalar

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, karakterizasyon ve hücre kültür çalışmaları öncesinde yapılan sterilizasyon sırasında ortaya çıkan matrikslerin büzüşme probleminin önlenmesine yönelik denemelere yer verilmiştir. Elektroeğirme sonrasında hazırlanmış olan fiber matrikslerin fizyolojik ortamda boyutunun değişmesi nedeniyle, PLGA/20 MMT örnekleri model olarak belirlenmiş ve 3 farklı modifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Uygulamalar, fiber matriksler alüminyum folyo üzerinden kaldırılmadan gerçekleştirilmiştir. Yapılan uygulamalar şu şekildedir: (1) 70°C'de 3 sa inkübasyon, (2) 50°C'de 2 sa inkübasyon + %75 (v/v) EtOH ile muamele, (3) 40 mM EDC/20 mM NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorit/N-hidroksisülfosüksinimit) ile çapraz bağlama. Fiber matrikslerin uygulama öncesi ve sonrası morfolojik incelemesi SEM görüntülemesi ile yapılmıştır. Bu yöntemlerin sonuçları incelendiğinde, fiber morfolojisindeki değişimin önlenmesinde etkili olmadıkları belirlenmiştir. Bu nedenle, fiber matrikslerin sıcaklık kontrollü bir ısıtıcı sistem tasarlanarak, PVC (poli(vinil klorür)) laminasyon kağıtlarına sabitlendiği çalışmalar yapılmıştır. Ancak, büzüşme problemi yine önlenememiştir. Son olarak, fiber matriksler alüminyum folyodan kaldırılmadan 50°C'de 2 sa inkübe edilmiş ve ardından uygun boyutlarda kesilerek, sol-jel özelliğe sahip Pluronik F127 (%55, w/v) jel içerisinde tekrar 70°C'de 3 sa bekletilmiştir. Pluronik F127'nin uzaklaştırılması için fiber matriksler ultra saf su kullanılarak yıkanmıştır.

3.4.3. HS2 Hücrelerinin PLGA Bazlı Fiber Matriksler Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi

3.4.3.1. Hücre Ekimi

Hücre kültürü çalışmaları, laminar akışlı kabinde (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda, detaylarına Bölüm 3.2.2’de yer verilen HS2 keratinosit dermal hücre hattı kullanılmıştır. Bu bölümde yapılan tüm çalışmalarda, Pluronik F127 muamelesi yapılan (Bölüm 3.4.2.6) fiber matriksler kullanılmıştır. Hücre kültürü öncesi 1x1 cm kesilen fiber matrikslerin sterilizasyonları EtOH-UV uygulamasıyla yapılmıştır. Bu amaçla, fiber matriksler %70 (v/v) EtOH çözeltisinde çöktürülmüş ve 1 sa bekletilmiştir. Ardından, laminar akışlı kabin içerisine alınan matriksler 2 kez D-PBS ile yıkanmış ve her bir yüzü 30 dk UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan fiber matriksler, 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına alınmıştır.

Hücreler her bir fiber matriks üzerine 1×10^5 hücre olacak şekilde 20 µL proliferasyon ortamı ile ekilmiştir. Hücre ekiminden 2 sa sonra kültür ortamı 1 mL’ye tamamlanmıştır. Kültüre 14 süreyle devam edilmiş ve 2 günde bir kültür ortamı tazelenmiştir. Çalışmada kullanılan gruplar şu şekildedir: (1) PLGA, (2) PLGA/20 MMT, (3) PLGA/20 B-MMT, (4) PLGA/40 MMT, (5) PLGA/40 B-MMT.

3.4.3.2. Hücre Kültüründe Yapılan Analizler

MTT Analizi

Farklı özelliklere sahip fiber matrikslerin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi için, kültür süresinin farklı zamanlarında MTT analizi yapılmıştır. Bu analiz için matriksler üzerindeki proliferasyon ortamı uzaklaştırılarak, her bir örnek yeni bir 24 kuyucuklu kültür kabına aktarılmıştır. Ardından, kültür kabının her bir gözüne 660 µL %10 (v/v) MTT çözeltisi (2,5 mg/mL, PBS içerisinde) içeren serumsuz besi ortamı eklenmiş ve hücreler 37°C’de 3 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, fiber matriksler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve formazan kristalleri 400 µL izopropanol ile (0,04 M HCl içeren) çözülmüştür. Her bir kuyucuktan 200 µL örnek alınarak, 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış ve çözeltinin optik yoğunluğu 690 nm referans olmak üzere 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Asys UVM 340, Avusturya) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

SEM Analizi

Kültürün 1. ve 7. günlerinde fiber matriksler üzerindeki hücre morfolojisini görüntülemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, Bölüm 3.5.3.2’de detaylı olarak açıklandığı gibi, örneklerle sırasıyla fiksasyon, susuzlaştırma ve kurutma işlemleri uygulanmış ve altın-paladyumla kaplanarak görüntüleme yapılmıştır.

Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI Boyama

Hücre kültürün 7. ve 14. günlerinde kültür ortamları uzaklaştırılarak örnekler D-PBS ile yıkanmış ve 30 dk fikse edilmiştir. Analizin diğer detaylarına Bölüm 3.2.2.3’te yer verilmiştir.

3.5. PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, PLA, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matrikslerin elde edilmesine, karakterizasyonuna ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Ayrıca, farklı oranlarda MMT ve B-MTT kullanılarak hazırlanan fiber matrikslerin, HS2 ve İDF hücrelerinin canlılık ve morfolojisine etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalar detaylı olarak açıklanmıştır.

3.5.1. Elektroegirme ile PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Üretimi

PLA fiber matrikslerin elde edilmesi amacıyla, Corbion Purac (Hollanda) firmasından temin edilen PLA polimeri, derişimi %8 ve 10 (w/v) olacak şekilde HFIP içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla bir gece karıştırılarak çözündürülmüştür. Bölüm 3.4.1’de PLGA/B-MTT fiber matrikslerin hazırlanması için yapılan işlemler PLA/B-MMT matriksler için de uygulanmıştır. Elektroegirme parametreleri; uygulanan voltaj 15-20 kV, akış hızı 1,0-1,5 mL/sa, şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 20-25 cm olacak şekilde değiştirilmiş ve fiberlerde boncuk oluşumunun gözlenmediği uygun üretim koşulları belirlenmiştir.

3.5.2. PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Karakterizasyonu

3.5.2.1. SEM Analizi

PLA, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matrikslerin morfolojilerinin incelenmesinde SEM analizi kullanılmıştır. Analiz detaylarına Bölüm 3.4.2.1’de yer verilmiştir.

3.5.2.2. Kimyasal ve Kristalografik Karakterizasyon

PLA, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matrikslerin kimyasal ve kristal yapıları sırasıyla ATR-FTIR ve XRD analizleri ile incelenmiştir. Analizlerin detaylarına Bölüm 3.4.2.2’te yer verilmiştir.

3.5.2.3. Su Temas Açısı Analizi

Hidrofilik özellikte olan MMT’nin üretilen PLA bazlı fiber matrikslerin ıslatılabilirlik özelliklerine olan etkisi, elektroegirme çözeltilerinin Teflon Petri kaplarına dökülmesiyle elde edilen membranlar kullanılarak incelenmiştir. Analiz detaylarına Bölüm 3.4.2.3’de yer verilmiştir.

3.5.2.4. Termal Karakterizasyon

PLA, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matrikslerin termal özellikleri, DSC ve TG analizleri ile incelenmiştir. Bölüm 3.4.2.4’de analiz detayları açıklanmıştır.

3.5.2.5. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi

PLA, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matrikslerin bozunma davranışlarının incelenmesi amacıyla, hidrolitik ve enzimatik ortamlar hazırlanmıştır. Enzim olarak, lipaz ve lizozim kullanılmıştır. Elli mg lipaz ya da lizozim enzimi, 100 mL PBS içerisinde çözdürülmüş ve çözeltilere %0,1 (w/v) oranında sodyum azid eklenmiştir. Ayrıca, fiber matrikslerin enzim içermeyen PBS ortamında inkübe edilmesiyle hidrolitik bozunma davranışları da incelenmiştir. Örneklerin bozunma ortamları haftada bir yenilenmiştir. Örnekler çalkalamalı etüvde ve 37°C’de 21 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bozunurluğun belirlenmesi için, test süresince örneklerin morfolojilerindeki değişimler SEM görüntüleri ile incelenmiştir.

3.5.2.6. Mekanik Analiz

Fiber matrikslerin mekanik özellikleri Tekstür Analiz (TA.XTPlus, Stable Microsystems, İngiltere) cihazında çekme testi ile incelenmiştir. ASTM standartlarına uygun olarak 10 mm x 100 mm x 80 µm boyutlarındaki örnekler analiz öncesi bir gece boyunca 37°C’de PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Islak numuneler, çekme çenelerinin arasına yerleştirilmiş ve 5 N yük hücresi kullanılarak, 0,05 mm/s hızla tek-yönlü çekme testine tabi tutulmuştur. Her bir örnekten 3 tekrar yapılmıştır.

3.5.2.7. Mukoadezyon Testi

Yara örtüsü olarak kullanılması öngörülen fiber matrikslerin yapışma özelliklerinin incelenmesi amacıyla, Tekstür Analiz cihazı ile yapılan çalışmalarda ilk olarak fiber matrikslerden 1 cm çapında kesilmiş ve örnekler cihazın üst probuna çift taraflı bant yardımıyla sabitlenmiştir. Alt kısmına mukoadezyon test halkası kullanılarak koyun ağız içinden alınan bukkal mukoza dokusu yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). İşlem parametreleri, prob hızı 1,0 mm/sn, probun uyguladığı kuvvet 0,2 N, örnek ile temas süresi 300 s olacak şekilde belirlenmiştir [90]. Temas süresi sonunda üst probun dokudan ayrılırken oluşturduğu grafik yardımıyla “biyoadezyon işi” değeri yazılım tarafından hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Tekstür analiz cihazı ile yapılan mukoadezyon test düzeneği.

3.5.2.8. Antibakteriyel Özelliklerin Belirlenmesi

Konvansiyonel yöntem olan EtOH-UV ile sterilize edilen fiber matrikslerin antibakteriyel özelliği, *Escherichia coli* (gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) model bakterileri kullanılarak optik yoğunluk metodu ile incelenmiştir [91]. Bu yöntemde, fiber matriksler 0,005 g/mL derişimde olacak şekilde tartılmış ve sterilize edilerek 2 mL Mueller-Hinton sıvı besi yeri içeren tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 0,5 McFarland (~10 kob) ölçeğinde 2 µL bakteri suşu inoküle edilerek, örnekler çalkalamalı etüvde 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (0., 3., 6., 9., 12. ve 24. sa) örnekler alınarak 5 kat PBS çözeltisi ile seyreltilmiş ve 610 nm dalga boyunda UV

spektrofotometrede absorbands değerleri ölçölmüştür. Kontrol grubu olarak aynı derişimde sadece bakteri suşu içeren örneklerle çalışılmıştır.

3.5.3. HS2 ve İDF Hücrelerinin PLA Bazlı Fiber Matriksler Üzerindeki Davranışlarının incelenmesi

3.5.3.1. Hücre Ekimi

Hücre kültür çalışmalarında, insan dermal keratinosit hücre hattı (HS2) ve insan dermal fibroblast hücreleri (İDF) kullanılmıştır. Fiber matriksler, konvansiyonel sterilizasyon işleminin ardından, hücreye uygun besi ortamı ile bir gece boyunca şartlanmıştır. Hücre ekim verimini arttırmak için, şartlama sonrası örnekler otoklav ile sterillenmiş filtre kağıtlarına yerleştirilerek hafifçe kurutulması sağlanmıştır. HS2 ve İDF hücreleri ile ayrı ayrı gerçekleştirilen 21 günlük kültür çalışmalarında, bir sonraki paragrafta detaylarına yer verilen dekstran yöntemi ile hücre ekimi yapılmıştır. MTT, SEM ve RT-PCR analizleri için her bir örneğe 2×10^4 hücre ekilirken, boyamaları içeren diğer analizler için her bir örneğe 4×10^4 hücre ekilmiştir. HS2 hücreleri için %5 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi ortamında kullanılmıştır. İDF hücreleri için ise, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi ortamı kullanılmıştır.

Yukarıda bahsedilen ana çalışmalardan önce, statik hücre ekiminin en verimli şekilde yapılması için bazı ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda HS2 ve BJ hücreleri kullanılmıştır. İlk olarak, PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrikslerden oluşan iki deney seti hazırlanmış ve birine HS2, diğerine ise BJ hücreleri aynı yoğunlukta (2×10^4 hücre 20 μ L proliferasyon ortamıyla) ekilmiştir. Kültüre 7 gün devam edilmiş ve kültür süresince belirlenen günlerde hem fiber matrikslere hem de fiber matrikslerin alındığı TCPS (doku kültürü polistiren) yüzeylere MTT analizi uygulanmıştır. İkinci çalışmada, yine aynı fiber matriksler kullanılarak hücre ekim yoğunluğu 1×10^5 olacak şekilde BJ hücreleri 20 μ L proliferasyon ortamı ile ekilmiş ve kültüre 14 gün boyunca devam edilmiştir. Belirlenen günlerde MTT ve SEM analizleri yapılarak, hücre davranışları incelenmiştir. PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrikslerde hücresel canlılığın düşük bulunması nedeniyle, çalışmalara daha düşük oranlarda MMT ya da B-MMT içeren fiber matriksler ile devam edilmiştir. Seçilen fiber matrikslere ve TCPS yüzeylere, proliferasyon ortamı veya dekstran içeren (%10, w/v)

proliferasyon ortamı ile 1×10^4 yoğunlukta BJ hücreleri ekilip, sonuçlar karşılaştırılarak uygun ekim yöntemi belirlenmiştir.

3.5.3.2. Hücre Kültüründe Yapılan Analizler

MTT Analizi

Hücre kültürünün 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerinde yapılmıştır. Analizin detaylarına Bölüm 3.2.2.1’de yer verilmiştir.

SEM Analizi

Hücre kültür çalışmalarının 7, 14 ve 21. günlerinde alınan örnekler üzerinde hücrelerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla, fiber matrikslerin ortamı uzaklaştırılarak 2 defa D-PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu PBS içinde hazırlanan %2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından, analiz gününe kadar örnekler %1 (v/v) P/S içeren PBS ortamında +4°C’de saklanmıştır. Analiz öncesinde susuzlaştırma için EtOH serilerinden (sırayla %30 - %50 - %70 - %90 - %100, v/v) geçirilmiştir. Her bir basamakta 2 dk tutulan örnekler, son olarak 5 dk süreyle HMDS ile muamele edilmiş ve süre sonunda HDMS uzaklaştırılarak, çeker ocakta kurumaları sağlanmıştır. Analiz öncesinde altın-paladyum ile kaplanan örnekler farklı büyütme altlarında incelenmiştir.

Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI Boyama

Hücre kültürünün 7 ve 14. günlerinde yapılmıştır. Analizin detaylarına Bölüm 3.2.2.3’de yer verilmiştir.

Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre kültürünün 7, 14 ve 21. günlerinde yapılmıştır. Analizin detaylarına Bölüm 3.2.2.2’de yer verilmiştir.

Hematoksilen&Eozin Boyama

Fiber matrikslerin kültür sonrası histolojik açıdan incelenmesi amacıyla, Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama yapılmıştır. Bu amaçla, örnekler %10 (v/v) formalin ile fikslenerek, susuzlaştırmak amacıyla ksilen ve EtOH serilerinden geçirilmiş ve boyamalar gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

İmmunohistokimyasal Boyama

Bu analiz sadece İDF hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmasında gerçekleştirilmiştir. Kültürün 21. gününde fiber matrikslerdeki ECM'nin incelenmesi için, örnekler yeni bir kültür kabına aktararak 3 defa D-PBS ile yıkanmış ve %4'lük soğuk paraformaldehit ile 20 dk fiksasyon yapılmıştır. Süre sonunda fiksasyon çözeltisi uzaklaştırılarak, 3 defa daha D-PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra, örnekler 60 dk bloklama serumu (%5 (v/v) keçi serumu ve %0,3 (v/v) Triton-X 100 içeren PBS) ile inkübe edilmiştir. Ardından, bloklama serumu uzaklaştırılarak, antikor seyreltme çözeltisi (%1 (w/v) BSA ve %0,3 (v/v) Triton-X 100 içeren PBS) içerisinde hazırlanan primer antikor (Fibronektin, 1:100 ya da Kollajen 1A1, 1:200) ile bir gece +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 3 defa D-PBS ile yıkandıktan sonra, antikor seyreltme çözeltisi içerisinde hazırlanan ikincil antikor (Alexa Fluor® 555 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor, 1:500 ya da Alexa Fluor® 488 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor 488, 1:500) çözeltisi eklenmiş ve 2 sa karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Çekirdek boyaması için ise, 3 defa daha D-PBS ile yıkanan örnekler, DAPI çözeltisi (1:1000) eklenerek 5 dk daha inkübasyona bırakılmıştır. Son yıkamaları D-PBS ile yapılan örnekler, *mounting medium* ile kapatılarak floresan mikroskop altında incelenmiştir.

RT-PCR Analizi

Fiber matriksler üzerinde kültüre edilen HS2 ve İDF hücrelerinin yara iyileşmesi açısından değerlendirilmesi, RT-PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Kültürün 7 ve 21. günlerinde alınan örnekler 3 kere D-PBS ile yıkanmış ve analiz gününe kadar Eppendorf tüpler içinde -80°C'de saklanmıştır. RT-PCR analizi için ilk olarak HS2 ve İDF hücrelerdeki mRNA izole edilmiş, ikinci aşamada elde edilen mRNA içeriği cDNA'ya çevrilmiş ve üçüncü aşamada ise RT-PCR yapılmıştır. Analizin detaylarına Bölüm 3.2.2.7'de yer verilmiştir. İDF hücrelerinin analizinde kullanılan primerlerin dizileri Çizelge 3.3'te verilmiştir. HS2 hücrelerinin analizinde ise, Çizelge 3.2'de verilen primerlere ek olarak *LAMA5* ve Tümor protein 63 (*TP63*) primerleri kullanılmıştır. *TP63* primerinin baz dizisi: F; 5'-GAAACCAGAGATGGGCAAGT-3', R; 5'-ATGCTATCTTCATCCGCCTTC-3' şeklindedir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, A.B.D.) programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Her bir deney için veriler ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için tek ya da iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi Tukey-Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p değerinin 0,05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde yapılan deneysel çalışmaların sonuçları 4 ana başlıkta sunulmuştur. Öncelikle, besi ortamlarına eklenen farklı derişimlerdeki borun, HUVEC, HS2 ve BJ hücrelerinin davranışlarına olan etkisi yara iyileşmesi açısından incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Daha sonra, nanokile bor adsorpsiyonunda uygun koşulların belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçlarına değinilmiştir. Ardından, bor adsorplanan nanokiller ile katkılanırılan PLGA bazlı fiber matrikslerin üretimi, karakterizasyonu ve hücre kültür çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir. Son olarak, bor adsorplanan nanokiller ile katkılanırılan PLA bazlı fiber matrikslerin üretimi, karakterizasyonu ve hücre kültür çalışmalarının sonuçları verilmiş ve elde edilen veriler literatür bilgileri ışığında yorumlanmıştır.

4.1. Borun İnsan Endotel, Dermal Keratinosit ve Dermal Fibroblast Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi İçin Yapılan *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

4.1.1. HUVEC’ler ile Bor’un *In vitro* Tübül Oluşumuna Etkisi

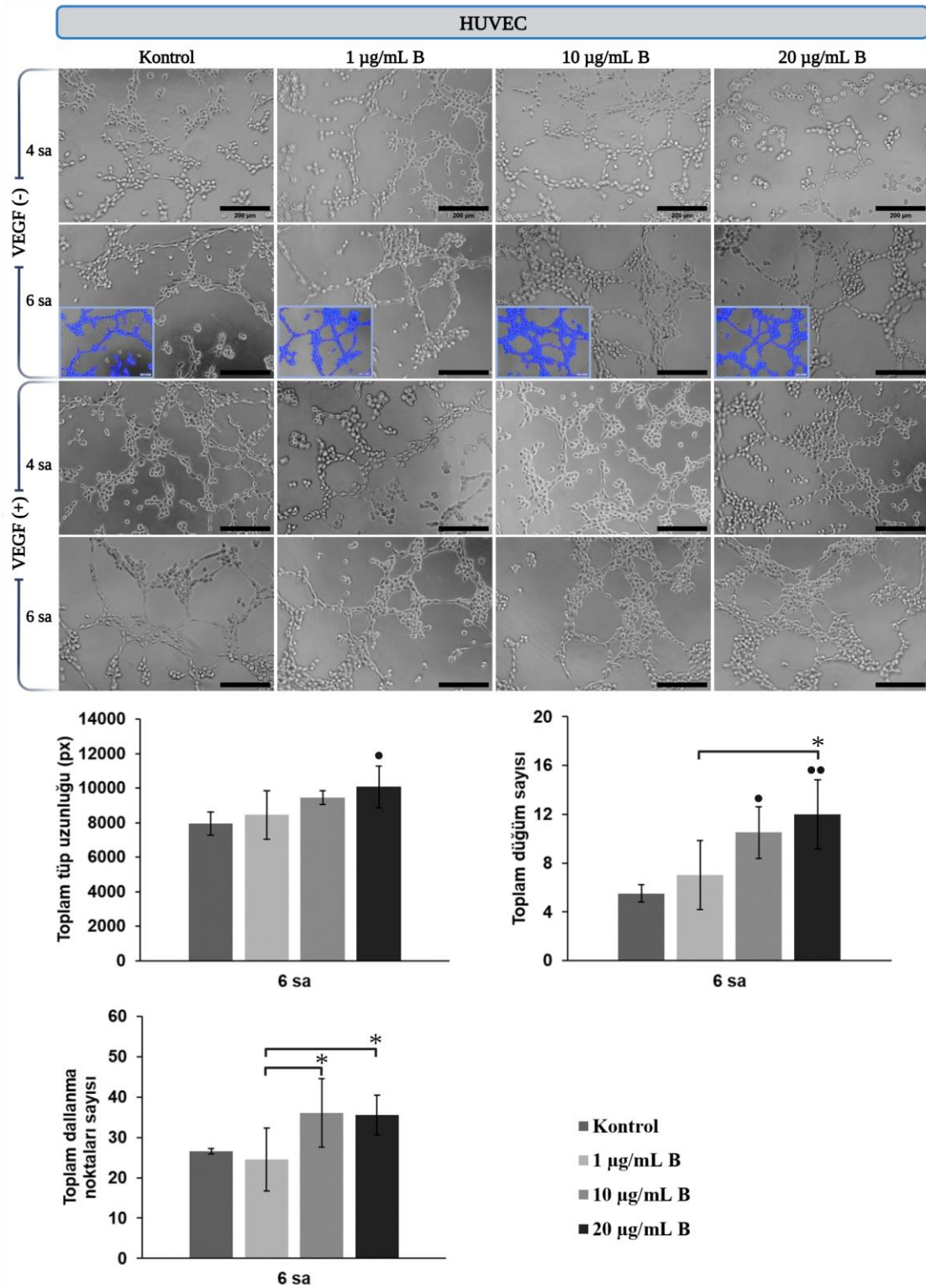
Yara iyileşmesinin inflamasyon basamağında en önemli olaylardan biri, yeni damar filizlerinin oluşması anlamına gelen “anjyogenez”dir. Kronik yaraların tedavisinde anjyogenezin uyarılması, dokunun daha iyi beslenmesini, oksijen doygunluğunun artmasını ve atıkların uzaklaşmasını sağlayarak iyileşmeye katkıda bulunur [92]. Endotel hücreleri kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen ve kan ile damar duvarı arasında ayırıcı bir yüzey oluşturan hücrelerdir. İnsan göbek kordonu toplar damarından elde edilen endotel hücreleri (HUVEC), kolay ulaşılabilir olmalarının yanı sıra, vücutta bulunan endotel hücrelerinin temel özelliklerine sahip olmaları nedeniyle *in vivo* endotel tabakasının taklit edilebilmesi için kullanılan uygun bir model hücredir [93].

Sunulan tez çalışmasında, besi ortamlarına eklenen farklı derişimlerdeki borun *in vitro* tübül oluşumuna etkisi Matrijel üzerinde kültüre edilen HUVEC’ler ile değerlendirilmiştir. Endotel hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve tübül oluşturmalarını destekleyerek anjyogenezi uyardığı bilinen büyüme faktörü VEGF’i içeren ve içermeyen bor katkılı besi ortamlarında kültüre edilen hücrelerin optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

VEGF içeren kültür ortamları, pozitif kontrol grupları olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde bu grubun tamamında, 4 sa sonunda tübül oluşumunun başladığı

gözlendi. Altıncı saat sonunda elde edilen görüntüler ise VEGF ile birlikte bor da içeren kültür ortamlarında oluşan tübül yapılarının daha fazla endotel tabakasından oluştuğunu göstermiştir. Besi ortamında VEGF bulunmayan gruplarda, kültürün 6. saatinde elde edilen görüntüler Wimasis yazılımı ile değerlendirilmiş (mavi renkli hücre görüntüleri) ve borun yeni damar oluşumuna etkisi kantitatif olarak sunulmuştur. Anjiyogenezin erken belirteci olan tübül oluşturma, dallanma noktaları ve düğüm sayıları karşılaştırıldığında, 10 ve 20 µg/mL B içeren ortamlarda anjiyogenik aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Toplam tüp uzunluğu, 20 µg/mL B grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p \leq 0,05$). Toplam düğüm sayısı, kontrol grubuna göre 10 µg/mL ($p \leq 0,05$) ve 20 µg/mL ($p \leq 0,01$) gruplarında anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Toplam dallanma noktaları sayısı karşılaştırıldığında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmazken, 1 µg/mL bor içeren gruba göre hem 10 hem de 20 µg/mL B içeren grubun anlamlı olarak daha yüksek olduğu ($p \leq 0,05$) belirlenmiştir. Özellikle, 10 ve 20 µg/mL derişimlerde bor içeren besi ortamlarında kültüre edilen hücrelerin tübül oluşturma yetenekleri artmıştır. Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, besi ortamlarında, pro-anjiyogenik büyüme faktörü VEGF bulunmadığı halde, borun tek başına anjiyogenezi destekleyebilen bir terapötik iyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Durand ve ark yaptıkları *in vitro* [94] ve *in vivo* [95] çalışmalarda borat iyonları içeren tampon çözeltilerin pro-anjiyogenik özellikte olduğunu göstermişlerdir. Bu etkinin borat iyonlarının, endotel hücrelerin anjiyogenez ile ilişkili sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salımını arttırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



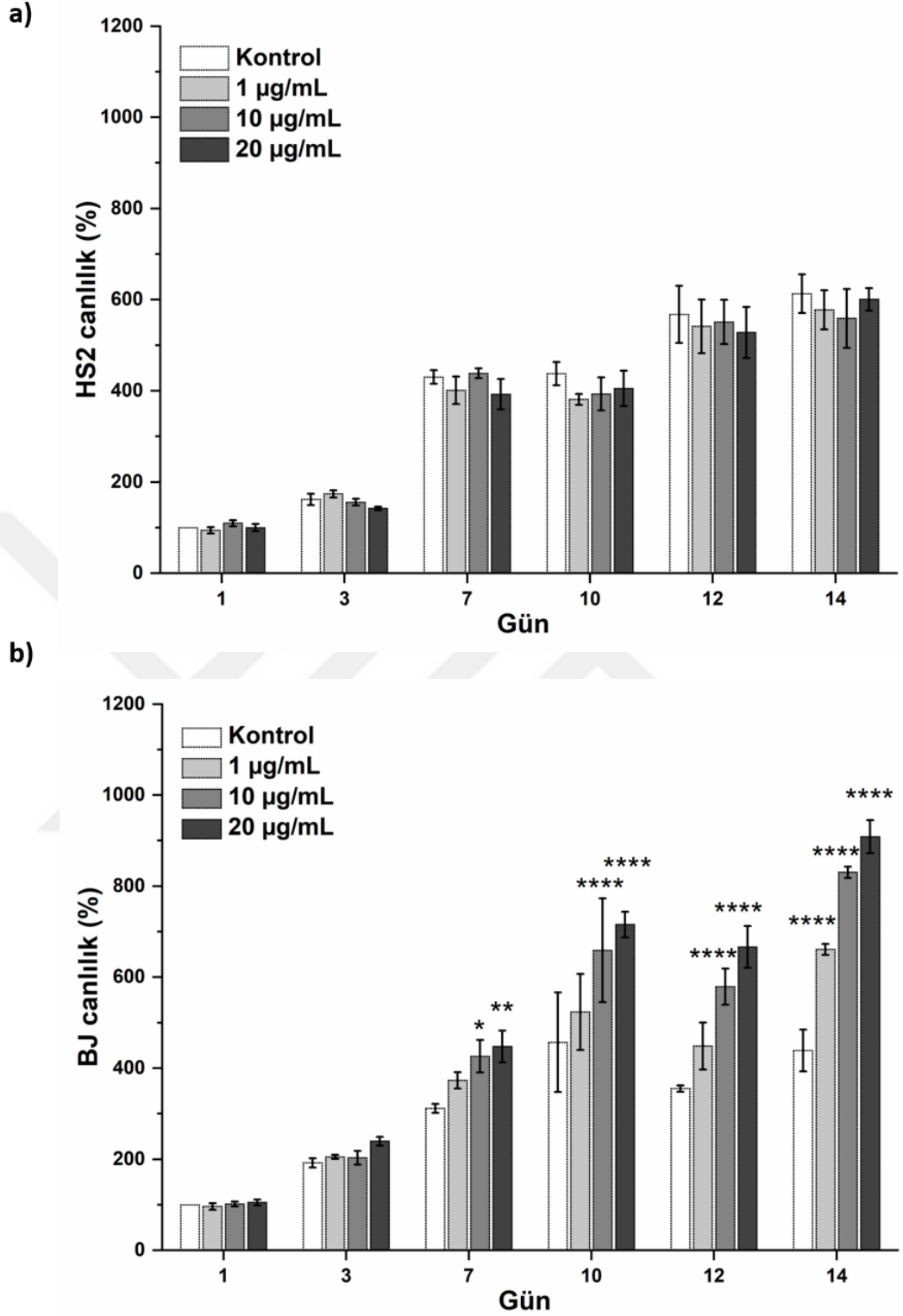
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında kültüre edilen HUVEC'ler ile yapılan *in vitro* tübül oluşumu çalışmasına ait optik mikroskop görüntüleri ve Wimasis yazılımı ile yapılan analizler sonucu elde edilen grafikler (İstatistiksel anlamlı farklılık, n=3: kontrol grubuna göre ● $p \leq 0,05$, ●● $p \leq 0,01$; gruplar arasında * $p \leq 0,05$).

4.1.2. HS2 ve BJ'ler ile *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

4.1.2.1. MTT Analizi

Keratinositler ve fibroblastlar deri yara iyileşmesindeki inflamasyon fazına yanıt veren ana hücrelerdir. İnflamatuvar sinyaller aracılığı ile aktive olan hücre çoğalması ve farklılaşması yara iyileşmesinin rejenerasyon süreci için oldukça önemlidir [96]. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile hücre kültür kaplarında ayrı ayrı kültüre edilen HS2 ve BJ hücrelerinin metabolik aktiviteleri MTT analizleri ile ölçülerek, hücre canlılıkları (kontrol grubuna göre) belirlenmiştir (Şekil 4.2). HS2 hücrelerinin canlılıkları kültür süresince bütün gruplarda artmış olmasına rağmen, gruplar karşılaştırıldığında, bor katkılı besi ortamlarının HS2 proliferasyonuna olumlu ya da olumsuz yönde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.2a). BJ hücrelerinde ise, özellikle 20 µg/mL bor içeren besi ortamının hücre canlılığını arttırıcı etkisi, kültürün 3. gününden itibaren belirgin bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.2b). Onuncu günden itibaren hücre canlılığı bor içeren gruplarda %500'ün üzerindedir. Özellikle 14. günde kontrol grubuna kıyasla bor uygulanan hücrelerde hücre canlılığının oldukça anlamlı şekilde artmış olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,0001$).

Literatürde yer alan çalışmalarda, besi ortamına eklenen bor bileşiklerinin hücre çoğalmasındaki etkileri ile ilgili farklı sonuçlara ulaşılmıştır. L929 fare fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada yaklaşık olarak 33 µg/mL üzeri derişimlerdeki bor, hücre çoğalmasına olumsuz etki gösterirken [97], transforme insan fibroblastları (46BR-IGI) ile yapılan bir çalışmada bu olumsuz etki yaklaşık 950 µg/mL bor varlığında görülmüştür [98]. Ayrıca, bu çalışmalarda bor bileşiklerinin hücre proliferasyonuna olumlu bir etkisinin olduğundan bahsedilmemektedir. Bununla birlikte, Park ve ark. [99] tarafından yapılan çalışmada, 6 µg/mL ve daha az bor içeren ortamlar ile kültüre edilen HeLa hücrelerinin proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunun artmasının, NaBC1 adı verilen borat reseptörü aracılığıyla aktive olan MAPK sinyal yolağı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [100]. Bor bileşiklerinin hücrelere etkisinin incelendiği bu çalışmalarda farklı bor türevleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalar arasında, uygulama yapılan hücre türleri, sayıları ve uygulamanın hücre mitogenezinin hangi evresinde yapıldığına dair farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı fibroblast proliferasyonunda etkili bor derişimi hakkında kesin bir fikir birliği bulunmamakla birlikte, sunulan tez çalışmasında bor uygulamasının BJ hücrelerinin proliferasyonuna olan olumlu etkisi açıkça ortaya konmuştur.

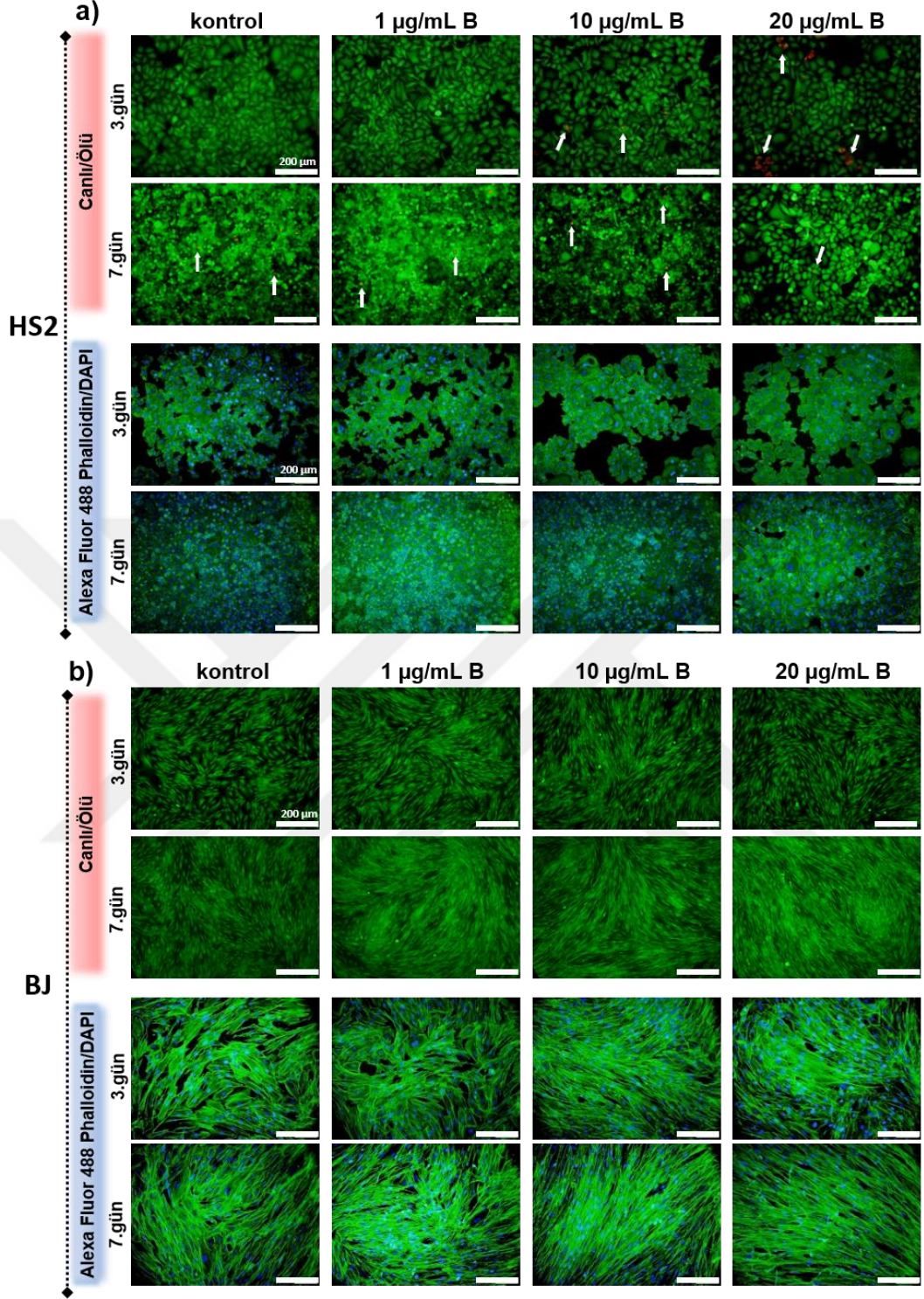


Şekil 4.2. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile 14 gün boyunca kültüre edilen (a) HS2 ve (b) BJ hücrelerinin MTT analizine ait grafikler (İstatistiksel anlamlı farklılık, n=4: aynı gün farklı gruplar arasında, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

4.1.2.2. Canlı/Ölü ve Alexa Fluor® 488/DAPI Boyama

Bir, 10 ve 20 µg/mL derişimlerde bor içeren besi ortamlarıyla kültüre edilen HS2 ve BJ hücrelerinin canlılıkları ve morfolojileri belirlenen günlerde floresan boyamalar ile incelenmiştir (Şekil 4.3). HS2 hücrelerinin kültürün 3. gününde gerçekleştirilen canlı/ölü boyama analizleri incelendiğinde, özellikle 20 µg/mL B grubunda canlı (yeşil) hücre sayısının diğer gruplara göre azaldığı ve ölü hücre sayısının (kırmızı) arttığı görülmüştür. Kültürün 7. gününde ise 10 ve 20 µg/mL bor uygulanan gruplarda hücrelerin canlılıklarını koruduğu, ancak hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir. HS2 hücreleri bütün gruplarda keratinositlere özgü kaldırım taşı morfolojiyi sergilemişlerdir [101]. Sağlıklı keratinositlere özgü diğer bir işaret olan koloniler halinde büyüme davranışı ise, Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyamanın 3. gününde elde edilen görüntüler ile gösterilmiştir.

BJ hücrelerinin canlı/ölü boyama görüntüleri incelendiğinde, gruplar arasında hücre canlılığı açısından belirgin bir farka rastlanmamıştır. Bütün gruplarda, hücre canlılığının 7 gün boyunca oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyaması ile yapılan morfolojik incelemede ise, BJ hücrelerinin kültürün 3. gününden itibaren bütün gruplarda karakteristik iğsi morfolojiye sahip oldukları ve sağlıklı bir fibroblast kültürünün göstergesi olan sarmal şekilde çoğalma davranışı sergiledikleri belirlenmiştir [101]. Bor uygulamasının fibroblastların hücre iskeleti ve çekirdek morfolojisi üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile kültüre edilen HS2 ve BJ hücrelerinin canlı/ölü ve Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI floresan boyama görüntüleri. Canlı/ölü boyamada kırmızı renk ölü, yeşil renk canlı hücreleri göstermektedir. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyamada ise, yeşil renk F-aktin filamentlerini, mavi renk ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir.

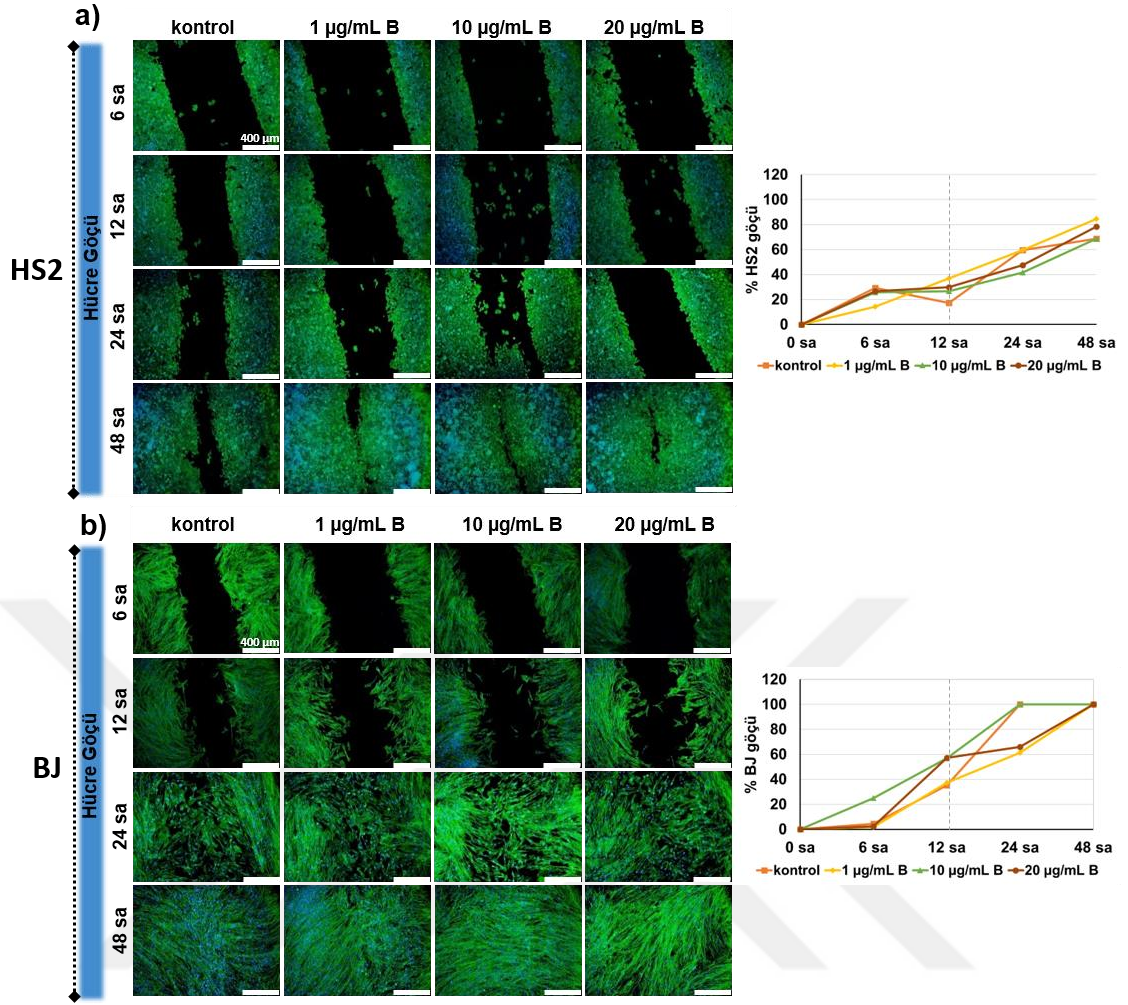
4.1.2.3. Hücre Göçü Analizi (Scratch Assay)

Bor içeren besi ortamlarında HS2 ve BJ hücrelerinin göç davranışları *in vitro* yara iyileşme modelinde çalışılmıştır. Yara modeli oluşturulduktan 6, 12, 24 ve 48 sa sonra hücreler fikse edilerek Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyama yapılmış ve elde edilen görüntüler Şekil 4.4'te verilmiştir. Aynı zamanda, hücre göçü kantitatif olarak değerlendirilerek yara kapanması incelenmiştir (Şekil 4.4).

Yara iyileşme sürecinde hem bireysel hem de toplu olarak yapılan hücre göçü oldukça önemlidir. Oluşan hasarın ardından, çeşitli fiziksel ve kimyasal uyaranların etkisiyle kanla birlikte çevresel bağ doku ve epitel hücreleri hızlıca yara bölgesine göç ederler. Hücresel göç yara iyileşmesinin bütün aşamalarında gereklidir ve iyileşmenin hızını etkiler. Örneğin, keratinosit hücrelerinin hızlı bir şekilde göç etmesi yara bölgesine yabancı maddelerin girmesini ve mikroorganizmaların invazyonunu engelleyerek iyileşme sürecine önemli ölçüde katkıda bulunur [102].

HS2 hücrelerine ait boyamaların 12 sa sonunda elde edilen görüntüleri incelendiğinde, en hızlı bireysel hücre göçünün 10 µg/mL bor uygulanan grupta, en hızlı toplu hücre göçünün ise 1 µg/mL bor uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir. Kırk sekizinci sa sonunda yapılan kantitatif incelemede, 10 ve 20 µg/mL bor uygulanan gruplarda yara kapanmasının sırasıyla %85 ve %80 seviyelerine ulaştığı halde kontrol grubunda ve 1 µg/mL bor uygulanan gruplarda %70 seviyelerinde kaldığı belirlenmiştir. Keratinosit hücrelerinin göçü, yara oluşumundan 6-24 sa sonra, keratin gen ifadelerinin değişmesiyle birlikte başlamaktadır. Besi ortamlarında bor içeren gruplarda, 12 sa sonunda kontrol grubuna göre daha hızlı bir yara kapanması olduğu görülmüştür. Chebassier ve ark. [103] yaptıkları çalışmada bor ve manganez tuzlarının keratinosit hücre göçünü hızlandırdığını ve özellikle 5 µg/mL bor uygulanan grupta yara kapanmasının 24 sa sonunda tamamlandığını ortaya koymuşlardır.

BJ hücrelerinin göç davranışları incelendiğinde, 10 µg/mL bor uygulanan grupta 6 sa sonunda hücre göçünün diğer gruplara göre daha hızlı olduğu, 12 sa sonunda belirgin olarak hücrelerin F-aktin filamentlerinin yara bölgesine göç etmek üzere yönlendikleri görülmüştür. Ayrıca, yara bölgesinin 10 ve 20 µg/mL bor uygulanan gruplarda 12 sa sonunda %50'nin üzerinde kapandığı, ancak diğer gruplarda bu oranın %40'ın altında kaldığı Şekil 4.4'teki BJ hücre göçü grafiğinde gösterilmiştir. Kırk sekiz sa sonunda ise gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında HS2 ve BJ hücrelerinin göç davranışlarının *in vitro* yara modeli ile incelenmesi. Hücreler belirlenen zamanlarda fikse edildikten sonra Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI ile boyanmıştır. Yeşil renk F-aktin filamentleri, mavi renk ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir (sol). Elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı ile analiz edilerek, oluşturulan yara bölgesine göç eden hücrelerin kapladığı alanın yüzde cinsinden grafikleri (sağ).

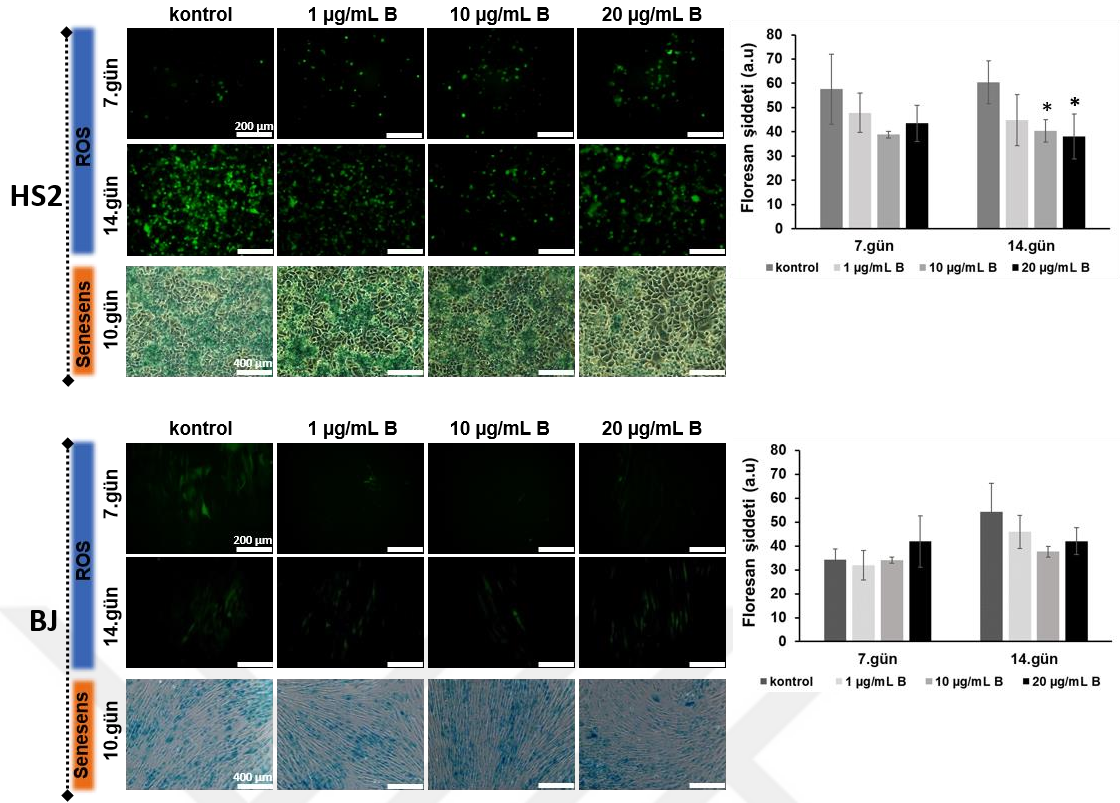
4.1.2.4. ROS ve Senesens Analizi

Oksijen içeren reaktif türler genel olarak “ROS” şeklinde tanımlanır. Bu türlerden bazıları, hidrojen peroksit, süperoksit anyonu, lipit hidroperoksit ve hidroksil iyonu/radikali'dir. Hücre içi ROS üretiminde mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum santral noktalardır. Bir yandan üstelendikleri görevler nedeniyle ROS üretimi yapan bu organeller, aşırı birikiminin hücreye vereceği zararları önlemek ve homeostazı sağlamak için kendi antioksidan mekanizmalarını da devrede tutarlar. Örneğin, süper

oksit dismutaz ve glutatyon, mitokondri tarafından üretilen antioksidanlardır. İnsan hücrelerinde oksijen ve hidrojen peroksit üretimine neden olan 41 adet, hipokloröz asit ve lipid hidroperoksidaz üretimine neden olan 50'den fazla enzim tanımlanmıştır [104]. Hücreler tarafından üretilen ROS yara iyileşmesinde kritik bir öneme sahiptir. Düşük seviyelerdeki ROS üretimi yara iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunurken, yüksek miktarlardaki ROS üretimi oksidatif strese neden olarak iyileşmeyi geciktirir [105, 106].

Farklı bor derişimlerinin HS2 ve BJ hücrelerinin, ROS ve senesens aktiviteleri üzerindeki etkileri sırasıyla, hücre içi ROS türevlerinin floresan işaretlenmesi ve β -galaktosidaz aktivitesinin boyanması (mavi-yeşil) ile incelenmiştir (Şekil 4.5). HS2 hücrelerinin ROS analizine ait 7. gün görüntüleri ve floresan ışımının kantitatif ölçüm sonuçları incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kültürün 14. gününde elde edilen veriler ise, 10 ve 20 $\mu\text{g/mL}$ B uygulanan gruplarda ROS aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermektedir ($p \leq 0,05$). BJ hücrelerinde yapılan incelemede ise kültürün 14. gününde elde edilen grafik, istatistiksel olarak anlamlı bir farka işaret etmese de HS2 hücrelerindeki benzer bir profil tespit edilmiştir. Bor bileşikleri hücrelerdeki ROS seviyesini, antioksidan mekanizmayı aktive ederek düşürmektedir. Demirci ve ark. [107] primer dermal fibroblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada, 200 $\mu\text{g/mL}$ borik asit ($\sim 35 \mu\text{g/mL}$ bor) uygulamasının nitrik oksit seviyesinin azalmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Akciğer fibroblast hücre hattı ile yapılan diğer bir çalışmada ise, 0,05-2 $\mu\text{g/mL}$ bor uygulamasının hidrojen peroksit seviyesini azalttığı gösterilmiştir [108].

Senesens, hücrenin çeşidine, yoğunluğuna ve stresin kaynağına bağlı olarak verilen hücresel cevaplardan biridir. Hücre dışı ya da içi birçok neden ile ortaya çıkan bu hücresel cevap, gen ifadelerini etkileyebilmektedir. Venöz bacak ülserli hastalardan alınan fibroblastların üreme hızlarının düşük olduğu ve senesens özelliği gösterdikleri bildirilmiştir [109]. Bor uygulamasının senesens üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla kültürün 10. gününde gerçekleştirilen senesens boyamaları incelendiğinde, gruplar arasında belirgin bir fark olmamakla birlikte hem HS2 hem de BJ hücrelerinde, 20 $\mu\text{g/mL}$ bor uygulanan gruplarda mavi boyama yoğunluğunun daha az olduğu yorumu yapılabilir (Şekil 4.5). Yaygın olarak tüm gruplarda görülen yoğun boyanma, kullanılan hücre hatlarının pasaj numaraları ve kültür süresinin uzunluğu ile açıklanabilir.



Şekil 4.5. Farklı derişimlerdeki borun HS2 ve BJ hücre kültürlerinde hücre içi ROS aktivitesi ve senesens üzerine etkisinin sırasıyla, DCF-DA floresan işaretleme ve senesens boyama kiti ile analizi (sol). DCF-DA floresan işaretleme sonrası floresan şiddetinin kantitatif analizine ait grafikler (n=3, istatistiksel anlamlı farklılık: * $p \leq 0,05$).

4.1.2.5. RT-PCR Analizi

Besi ortamlarına eklenen serbest borun HS2 ve BJ hücrelerinin yara iyileşmesi ve damarlanma ile ilişkili genlerinin ifade düzeylerinin ölçümü kültürün 7. ve 14. günlerinde RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar referans gen olarak seçilen β -aktin gen ifadesine göre normalize edilmiştir. Tüm grupların gen ifadeleri besi ortamında bor içermeyen kontrol grubunun 7.gün sonuçlarının kat farkı şeklinde sunulmuştur.

Besi ortamlarında bor katkısı bulunan HS2 hücrelerine ait RT-PCR grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Kültürün 7. gününde *KRT14* gen ifadeleri için gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamış, ancak 14. günde 1 µg/mL B grubunda, kontrol ($p \leq 0,05$) ve 20 µg/mL bor ($p \leq 0,01$) grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Kontrol ($p \leq 0,01$) ve 20 µg/mL B ($p \leq 0,05$) grubunun kültürün ilerleyen günlerinde *KRT14* gen ifadesinin

anlamli ölçüde arttiğı görölürken, 1 ve 10 µg/mL B gruplarında anlamli bir değişiklik olmamıştır.

VEGF gen ifadeleri incelendiğinde, her iki günde de gruplar arasında anlamli bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.6). Kontrol, 1 ve 20 µg/mL B gruplarında 7. günden 14. güne gelindiğinde artış tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

HS2 hücrelerinde *FGF2* gen ifadesi zamana bağı olarak tüm gruplarda artış göstermiştir (Şekil 4.6). Bu artış, kontrol grubu ($p \leq 0,05$) ile kıyaslandığında diğ er gruplarda ($p \leq 0,01$) daha anlamlidir. Gruplar arasındaki *FGF2* gen ifadesi değerlendirildiğinde, 7.günde 20 µg/mL B grubu kontrol grubundan daha fazladır ($p \leq 0,05$). Kültürün 14. gününde gen ifadesi diğ er bor içeren gruplara göre 20 µg/mL B grubunda anlamli olarak artmıştır.

PDGF gen ifadesinde hem 7. hem de 14. günde gruplar arasında bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.6). Hatta kültürün ilerleyen günlerinde de 20 µg/mL B ($p \leq 0,01$) grubunda görülen azalma haricinde anlamli bir değişiklik olmamıştır.

Besi ortamlarında bor katkısı bulunan BJ hücrelerine ait RT-PCR grafikleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Farklı bor derişimlerinin BJ hücrelerinin ECM üretimlerine olan etkisinin değerlendirilmesi için *COL1A1*, *LAMA5* ve *COL4* gen ifadeleri, damarlanmaya olan etkisinin değerlendirilmesi için ise *VEGF*, *FGF2* ve *PDGF* gen ifadeleri incelenmiştir.

COL1A1, *LAMA5* ve *COL4* gen ifadeleri kültürün 7. gününde en fazla 20 µg/mL ($p \leq 0,05$ ya da daha üstünde anlamli) grubunda tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bu genlerin ifade düzeylerinde zamana bağı bir değişim belirlenmemiştir. Ayrıca, *LAMA5* gen ifadesi, kültürün 14. gününde de en yüksek 20 µg/mL B grubunda görölmüştür.

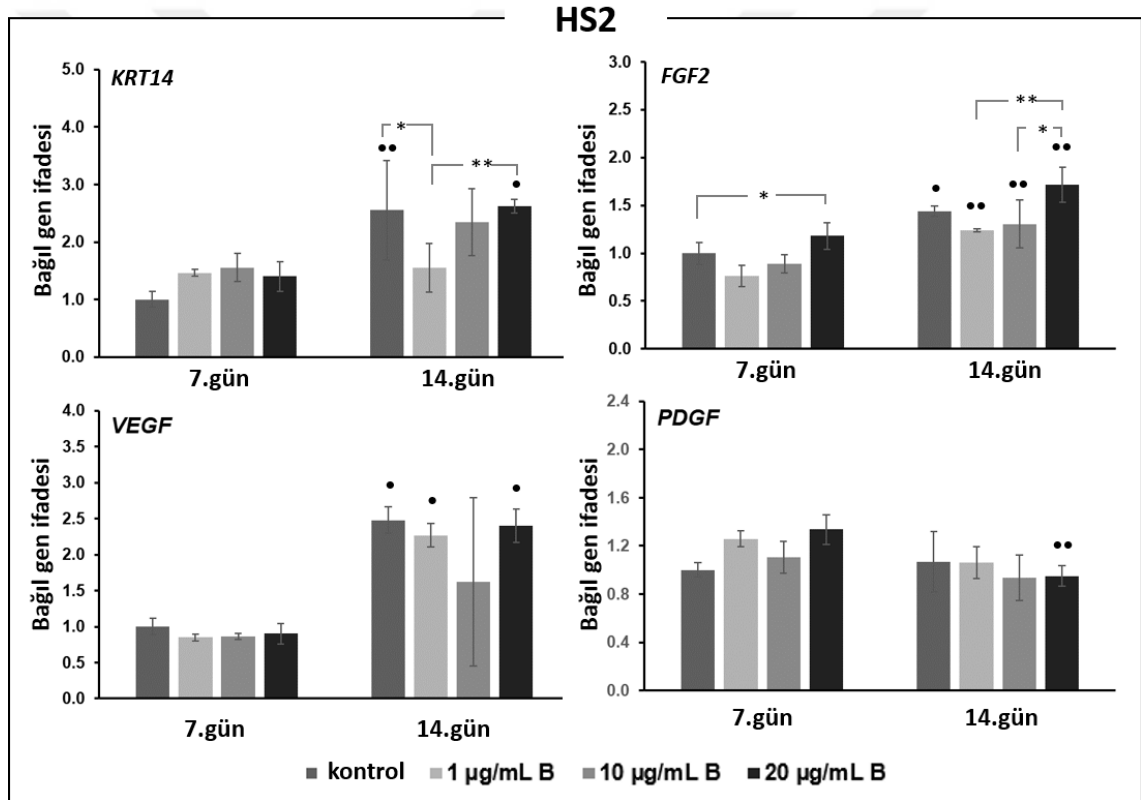
BJ hücrelerinde damarlanma ile ilişkili genlerden biri olan *VEGF* gen ifadeleri incelendiğinde, diğ er gruplara kıyasla, 20 µg/mL B grubunda kültürün 7 ve 14. günlerinde anlamli dercede yüksek olduğı görölmektedir ($p \leq 0,001$ ya da daha üstünde anlamlilik). Kültürün ilerleyen günlerinde, hiçbir grupta *VEGF* gen ifadesinde bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.7).

FGF2 gen ifadesi ise diğ er genler kadar çarpıcı olmasa da kültürün 7. gününde, kontrol ($p \leq 0,05$) ve 10 µg/mL B ($p \leq 0,01$) grubuna kıyasla 20 µg/mL B grubunda daha yüksektir (Şekil 4.7). Bu genin ifadesinde zamana bağı bir değişim saptanmamıştır.

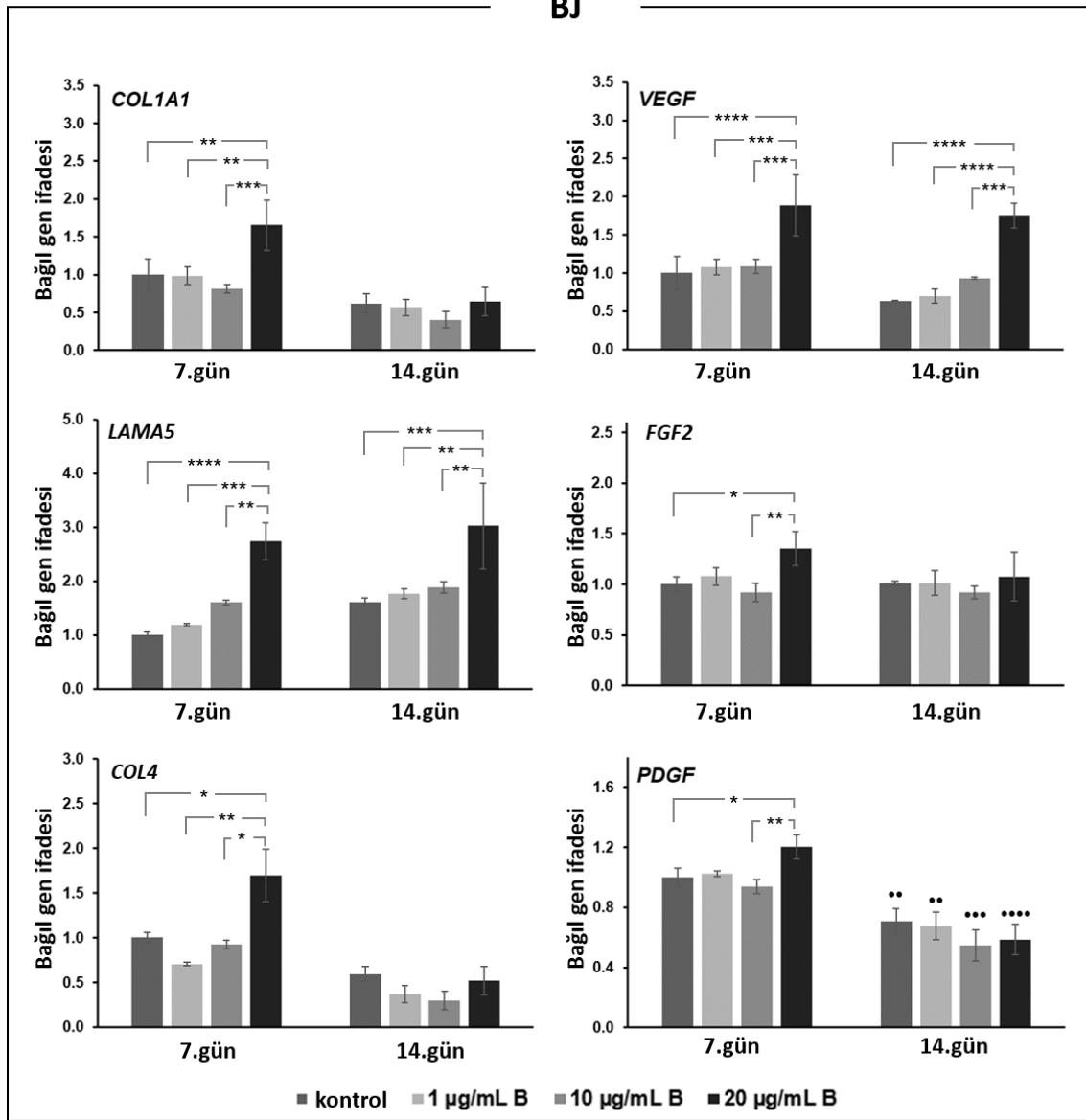
HS2 hücrelerinin aksine, BJ hücrelerinin *PDGF* gen ifadesinde gruplar arasında anlamli farklara rastlanmıştır (Şekil 4.7). *FGF* gen ifadesine benzer şekilde, kültürün 7. gününde,

kontrol ($p \leq 0,05$) ve 10 $\mu\text{g/mL}$ B ($p \leq 0,01$) grubuna kıyasla 20 $\mu\text{g/mL}$ B grubunda *PDGF* gen ifadesi daha fazladır. Kültürün ilerleyen zamanlarında, tüm gruplarda bir düşüş profili saptanmıştır.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, farklı derişimlerde bor içeren besi ortamları ile kültüre edilen HS2 ve BJ hücrelerinin gen ifadelerinde değışiklikler ortaya çıkmıştır. RT-PCR analiz sonuçları, yara iyileşmesinde oldukça önemli ECM üretimi ve damarlanmanın bor sayesinde indüklenebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, TCPS yüzeylerde kültüre edilen hücreler, otokrin ve parakrin etkilerin olduğu gerçek bir mikroçevrede olmadıklarından, tespit edilen gen ifadeleri, borun olası etkilerinin bir ön değerlendirmesi niteliğindedir.



Şekil 4.6. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında gerçekleştirilen HS2 kültürasyonunun 7. ve 14. gününde *KRT14*, *FGF2*, *VEGF* ve *PDGF* gen ifadelerinin RT-PCR analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmesine ait grafikler (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin kontrol grubuna göre kat farkını göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=4$, aynı grup farklı günlerde $\bullet p \leq 0,05$, $\bullet\bullet p \leq 0,01$; aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$).



Şekil 4.7. Farklı derişimlerde bor içeren besi ortamlarında gerçekleştirilen BJ kültürasyonunun 7. ve 14. gününde *COL1A1*, *LAMA5*, *COL4*, *VEGF*, *FGF2* ve *PDGF* gen ifadelerinin RT-PCR analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmesine ait grafikler (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin kontrol grubuna göre kat farkını göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, aynı grup farklı günlerde • $p \leq 0,05$, •• $p \leq 0,01$, ••• $p \leq 0,001$, •••• $p \leq 0,0001$; aynı gün farklı gruplar arasında * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

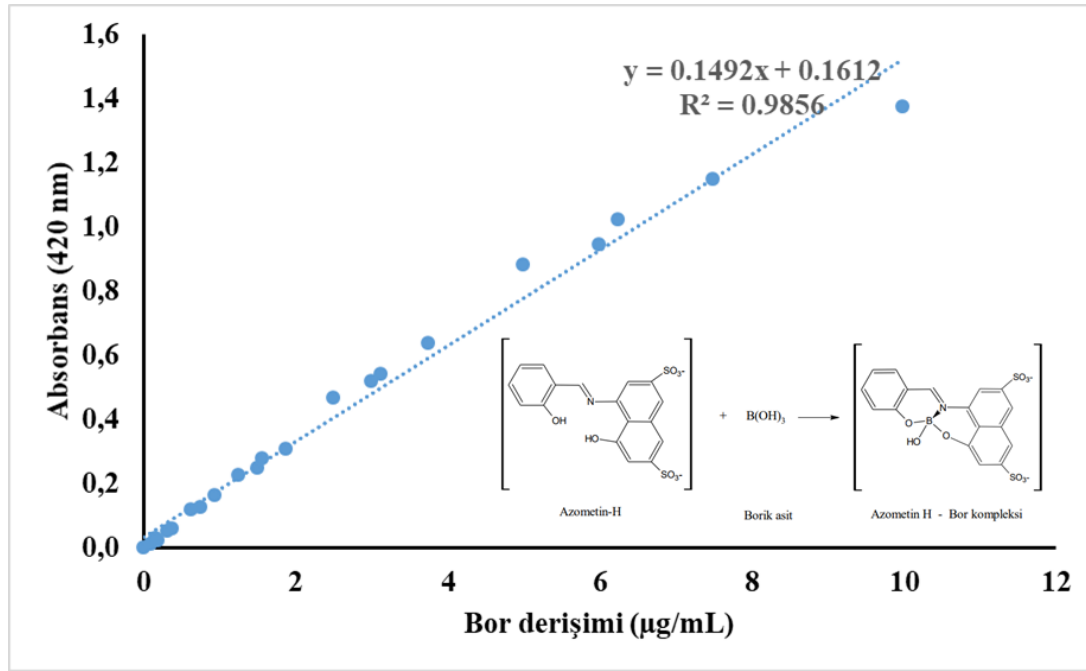
4.2. Nanokillere Bor Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon olayı en genel tanımıyla adsorbat molekülün, sabit sıcaklık ve sabit basınçta adsorban malzemenin yüzeyinde tutunmasıdır. Çeşitli adsorpsiyon mekanizmaları arasında en yaygın olarak kullanılan ve kabul edilen mekanizmalar, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermeleridir [110]. Killer ile bor arasındaki adsorpsiyon mekanizması, genellikle Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermeleri ile açıklanmıştır [111]. Ancak sunulan tez çalışmasında, denge bor derişimi saptanamadığı için, herhangi bir izoterm işaret edilememiştir. Stronsiyum veya çinko iyonlarının adsorplandığı killerin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmaları incelendiğinde, adsorpsiyonda kullanılacak iyon derişimine kılın KDK değerine göre karar verildiği görülmüştür [14, 15]. Bu nedenle, yüksek derişimlerde bor ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarına bu bakış açısıyla devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.1. Bor Adsorpsiyonunda Etken Faktörlerin Belirlenmesi

4.2.1.1. Azometin-H Yöntemi ile Bor Tayini

Bor analizi için sıklıkla, azometin-H, kurkumin ya da karmin gibi kimyasallar ile bor arasındaki kolorimetrik tepkimelere dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır [112]. Sunulan tez çalışmasında, düşük derişimlerde bor ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarındaki değerlendirmeler için, kolay uygulanabilir, hızlı, ucuz ve hassas bir yöntem olması nedeniyle azometin-H yöntemi tercih edilmiştir. Bununla birlikte, azometin-H yönteminin iyileştirilmesi için farklı tampon çözeltiler ve reaktif:örnek oranları denenmiştir. Ancak, azometin-H çözeltisi olarak Azo-H/A ve tampon çözelti olarak da tampon çözelti 3 dışındaki çözeltiler kullanıldığında doğrusal bir grafik elde edilememiştir. Reaktif:örnek oranının 1:3 olarak kullanıldığı durumlarda analiz hassasiyetinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Seçilen bu koşullar ile elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.8’de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Ultra saf suda çözünen borik asitin oda sıcaklığında azometin-H ile reaksiyonu sonucu elde edilen kalibrasyon grafiğı.

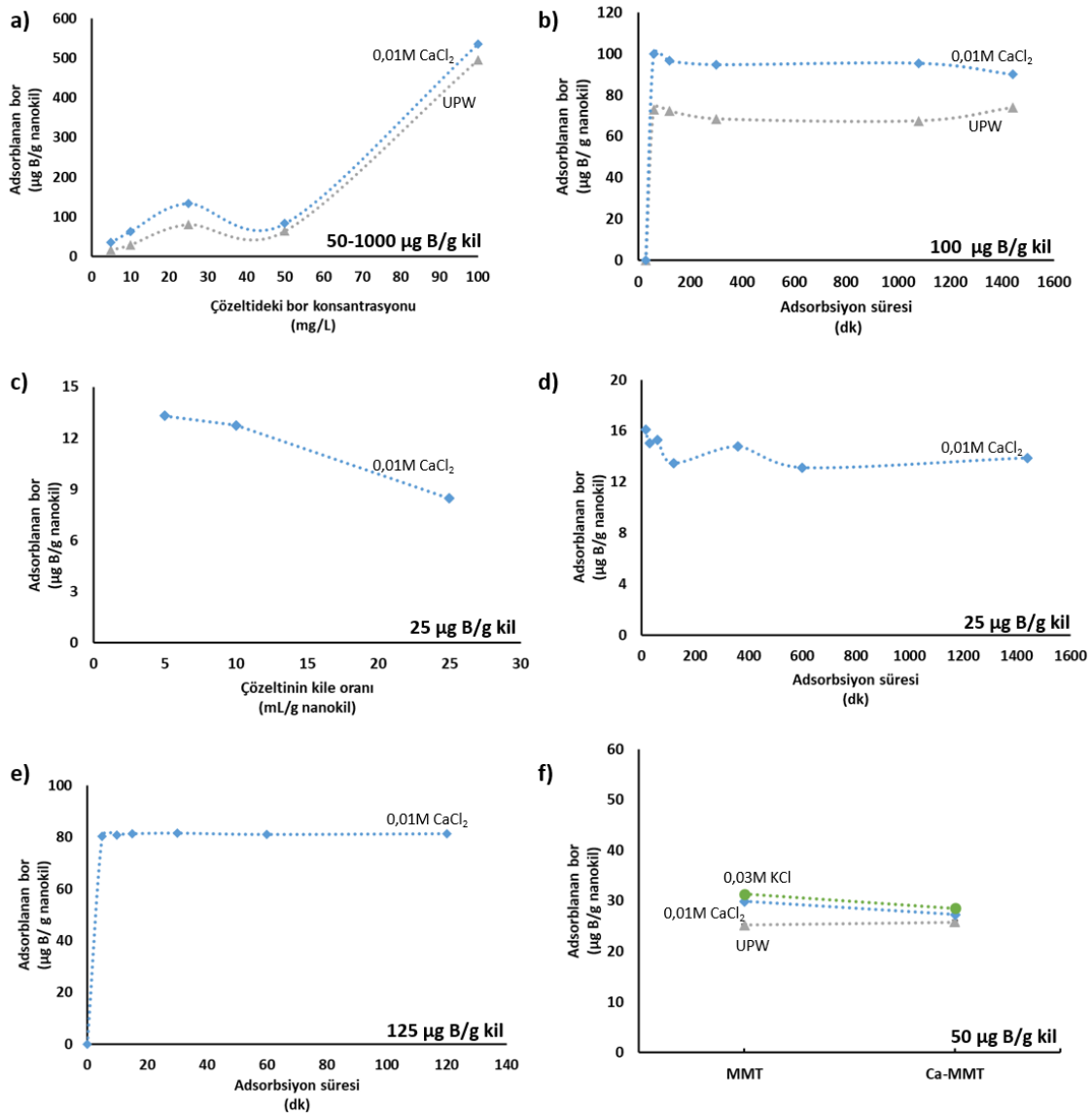
Tez çalışması kapsamında, azometin-H yönteminde yapılan iyileştirmeler ile 10 µg/mL bor derişimine kadar doğrusal bir kalibrasyon grafiğı elde edilmesi sağlanmıştır. Kalibrasyon grafiğinin regresyon analizleri yapılmış ve bor için en düşük tayin limiti 0,30 µg/mL olarak bulunmuştur. Lopez ve ark [113] doğrusal kalibrasyon eğrisini 5 µg/mL bor derişimine kadar elde etmişler ve en düşük tayin limitini 0,02 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, azometin-H yönteminin, bor analizinde kullanılan karmin ve kurkumin gibi diğer spektroskopik yöntemlere göre daha seçici ve hassas olduğunu belirtmişlerdir [113].

4.2.1.2. Düşük Derişimlerde Bor Adsorpsiyonu

Düşük bor derişimleri ile gerçekleştirilen çalışmaların amacı, denge bor derişimini belirlemenin yanı sıra, ideal adsorpsiyon ortamı ve süresine karar vermektir. Çalışmalarda pH 9,0-9,5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunu nedeni, en yüksek adsorpsiyonun çözelti pH'ı 8-10 iken gerçekleştiğinin literatürde açıkça belirtilmiş olmasıdır [114, 115]. Farklı adsorpsiyon ortamlarının tercih edilmesinin nedeni, bor adsorpsiyonunda iyon şiddetinin etkisinin değerlendirilmesidir. Bor çözeltisi, ultra saf su dışında 0,01 M $CaCl_2$ ve 0,03 M KCl çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır ve iyon şiddetleri aynı olup, 0,03M olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.9a’da 2 sa sonunda, artan bor derişimine karşı adsorplanan bor miktarına ait grafik sunulmuştur. Adsorpsiyon ortamı olarak, 10 mL 0,01 M CaCl_2 ve/veya ultra saf su (UPW) kullanılmış, ancak her iki ortamda da denge bor derişimi saptanamamıştır. Adsorplanan bor miktarı, UPW ve 0,01M CaCl_2 ortamlarında benzer profillere sahip olmakla birlikte, görece 0,01 M CaCl_2 ortamında daha yüksek bulunmuştur. Uygun sürenin belirlenmesi için, adsorplanan bor miktarının zamanla değişim grafiğı elde edilmiştir (Şekil 4.9b). Bu grafikten anlaşıldığı gibi, adsorpsiyon 2 sa’ten daha az sürede gerçekleşmiş ve zamana bağılı herhangi bir değişiklik olmamıştır. Şekil 4.10a ve b incelendiğinde, 0,01M CaCl_2 ortamında yürütölen çalışmalarda adsorplanan bor miktarının daha yüksek olduğı tespit edilmiştir. Şekil 4.9c ve d’ de sunulan grafiklerde, adsorpsiyon miktarının sırasıyla, çözelti/kil oranıyla ve zamanla değişimi gösterilmektedir. Bir gram kil için 5 mL adsorpsiyon ortamı kullanıldığında adsorplanan bor miktarı daha yüksek olmuştur (Şekil 4.9c). Bununla birlikte, yüksek miktarda adsorpsiyon gerçekleşen bu koşullarda, sürenin, adsorplanan bor miktarına etkisi belirlenememiştir (Şekil 4.9d). Daha sonra, görece yüksek bor derişiminde, adsorplanan bor miktarının zamanla değişim grafiğı (Şekil 4.9e) incelenmiş, fakat denge zamanının tespit edilmesi mümkün olmamıştır. Son olarak, Şekil 4.9f’de kalsiyum ile modifiye edilen MMT (Ca-MMT) ile MMT karşılaştırılmış, aralarında adsorpladıkları bor miktarı açısından belirgin bir fark bulunmamıştır.

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde en önemli kısıtlayıcı faktör, analizlerin azometin-H yöntemi ile yapılması olmuştur. Süpernatant ile indirekt olarak yapılan bor tayini literatürde yaygın olarak tercih edilmesine ve hesaplamalar doğrusal bir kalibrasyon grafiğı kullanılarak yapılmasına rağmen, denge grafikleri elde edilememiştir. Şekil 4.9’da sunulan grafiklerin tamamı değerlendirildiğinde, neredeyse tüm koşullarda (Şekil 4.9d hariç) 1 g kil için ortama eklenen borun tamamının kil tarafından adsorplandığı sonucuna varılmaktadır. Bu durumda, denge bor derişiminin belirlenmesi için daha yüksek derişimlerde bor ile yapılacak izoterm çalışmalarına ihtiyaç duyulmuştur. Ancak, elde edilen kalibrasyon grafiğinde, 10 $\mu\text{g/mL}$ B’un 420 nm’deki absorbansının 2,0’ye yakın olması, yüksek bor derişimlerinde seyreltmeler yapılmasını gerektirdiğinden, oluşabilecek sapmalar göz önüne alınarak adsorpsiyon izoterm çalışmalarına devam edilmemiştir. MMT killerin kullanıldığı bir çalışmada, denge bor adsorpsiyonunun 20 $\mu\text{g/mL}$ bor derişiminde, 30 dk’da ve 1 g kil kullanıldığı durumda gerçekleştiğı gösterilmiştir [111].



Şekil 4.9. MMT ile yapılan bor adsorpsiyon çalışmalarında adsorplanan bor miktarını etkileyen değişkenlere ait grafikler (a) çözeltideki bor konsantrasyonu, (b, d ve e) adsorpsiyon süresi, (c) çözeltinin kile oranı ve (d) kilin kalsiyum ile modifiye edilmesi.

4.2.2. KDK'nın Belirlenmesi ve Yüksek Derişimlerde Yapılan Adsorpsiyon Çalışmaları

Metilen mavisi yöntemiyle, MMT'nin KDK değeri 125 meq/100 g kil (1,25 mmol/g kil) olarak bulunmuştur. Yaghoobi-Rahni ve ark. [116] tarafından yapılan çalışmada da MMT için KDK değeri 118 meq/100 g kil olarak tespit edilmiştir ve böylece çalışma kapsamında yapılan analiz ile elde edilen KDK değerinin literatür ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Adsorpsiyon ve salım çalışmalarında, kilin KDK değerinin 2 ve 5 katına

denk gelen (2,50 ve 6,25 mmol bor) miktarlarda bor çözeltilerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Düşük derişimlerde bor ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar her ne kadar iyonik gücün adsorpsiyonu arttırdığını gösterse de belirlenen bor miktarları 0,01 M CaCl₂ ortamında çözünememiştir. Bununla birlikte, çalışmalar sonucunda adsorpsiyonun 30 dk'dan daha kısa sürelerde tamamlandığı düşünülmüş, ancak adsorpsiyon ve salım çalışmaları 24 sa sürede yapılmıştır. ICP-MS analizi sonuçlarına göre yapılan hesaplamalar ile elde edilen veriler Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, kilin KDK değerinin 2 ya da 5 katı derişimde bor ile yapılan adsorpsiyonun, adsorplanan bor miktarı üzerinde anlamlı bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir. Salım sonuçları ise, MMT'nin adsorpladığı borun, başlangıçta 2,50 mmol B/g kil kullanılan grupta ~%88'ini, 6,25 mmol B/g kil kullanılan grupta ise ~%87'sini ilk 24 sa'te saldığını göstermiştir. Çalışmalara, anlamlı olmamakla birlikte daha yüksek adsorpsiyonun elde edildiği 6,25 mmol B/g kil kullanılarak hazırlanan B-MMT'ler ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. MMT'ye bor adsorpsiyon ve salımının ICP-MS analizi sonuçları.

	<i>Adsorpsiyon ortamına eklenen bor miktarı</i>	
	2,50 mmol B/g kil (~27000 µg B/g kil)	6,25 mmol B/g kil (~67500 µg B/g kil)
Adsorplanan bor (µg B/g kil)	2123,34±445,05	2847,30±936,36
Adsorplanan bor (%)	~8	~5
Salınan bor (µg B/g kil)	1881,37±64,47	2485,60±39,64

4.3. PLGA Bazlı Fiber Matrislerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, PLGA, PLGA/MMT ve PLGA/B-MMT fiber matrislerin elektroğirme yöntemi ile hazırlanabilmesi için belirlenen parametreler ve ideal bir yara örtüsünün sahip olması gereken özellikler göz önüne alınarak yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Ardından, fiber matrislerin, fizyolojik koşullardaki büzüşme probleminin çözümüne yönelik olarak yapılan denemelerin sonuçları sunulmuştur. Sonrasında farklı oranlarda MMT ve B-MMT içeren fiber matrisler ile yapılan hücre kültür çalışmalarının sonuçlarına değinilmiştir.

4.3.1. Elektroeğirme ile PLGA Bazlı Fiber Matrikslerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Gelişmiş bir biyoaktif yara örtüsü, çeşitli terapötik ajanların salımını yaparak, yara iyileşmesini ve rejenerasyonunu en iyi şekilde desteklemek üzere tasarlanmalıdır. Biyouyumlu polimerler kullanılarak, nano ve mikro fiberlerin üretimine izin veren elektroeğirme yöntemi bu tasarımın ihtiyaçları olan yüksek yüzey alanı ve bağlantılı gözeneklerin elde edilmesinde oldukça başarılıdır. Fiber matriksler gibi daha ince yara örtülerinin yanı sıra, geniş ve derin hasarların tedavisinde kullanılabilecek üç boyutlu yara örtülerinin hazırlanması için de gerekli potansiyele sahip bir üretim yöntemidir [117]. Günümüze kadar elektroeğirme ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, biyoaktif yara örtülerinin hazırlanmasında çeşitli doğal ve sentetik polimerlerin kullanıldığı görülmüştür. Sentetik bir polimer olan PLGA yara iyileşmesi de dahil birçok biyomedikal uygulamada kullanılmıştır. Sunulan tez çalışmasında, yüksek mekanik özelliği, biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve aynı zamanda FDA onayına sahip bir polimer olması nedenleriyle PLGA tercih edilmiştir. PLGA, oral mukoza ve deri hasarları için gelişmiş biyoaktif bir yara örtüsü elde etmek amacıyla MMT ve B-MMT ile katkılandırılmıştır.

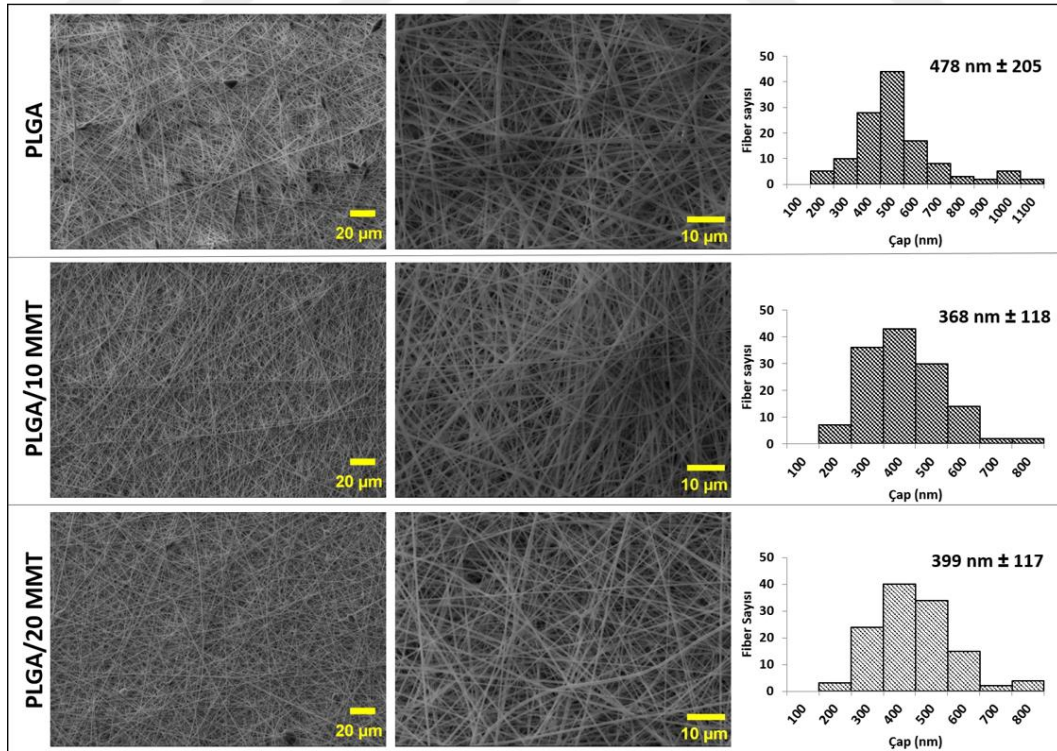
Düzgün ve homojen PLGA bazlı fiberlerin elde edildiği koşullar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Polimer çözeltisine eklenen MMT ya da B-MMT katkısının elektroeğirme parametrelerini değiştirmedeği görülmüştür. Bütün gruplarda, elektroeğirme sürecinde gerekli olan Tylor konisi gözlemlenmiş ve fiberler düz bir toplayıcıda biriktirilerek fiber matriksler elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. PLGA bazlı fiber matrikslerin elektroeğirme koşulları.

	Polimer (%w/v)	MMT (%w/w)	Voltaj (kV)	Toplayıcı mesafesi (cm)	Akış hızı (mL/sa)
PLGA	7	-	22	14	1,0
PLGA/MMT	7	10 ve 20	22	14	1,0
PLGA/B-MMT	7	10 ve 20	22	14	1,0

4.3.1.1. SEM Analizi

Elektroegirme yöntemiyle fabrikasyonu tamamlanan PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerdeki fiber morfolojisinin incelenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Her üç gruba ait farklı büyütmelerdeki görüntüler incelendiğinde, rastgele toplanan fiberlerin dallanma göstermedikleri ve düzgün ve morfolojiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). PLGA fiber matrikslerde ihmal edilebilir düzeyde görülen boncuk oluşumuna, MMT katkılı fiber matrikslerde rastlanmamıştır. Bunun nedeninin, MMT katkısı ile artan çözelti vizkositesiyle ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır. Herhangi bir muamele yapılmayan MMT'lerin bulunduğu çözeltilerde, elektroegirme sürecince nerdeyse hiçbir çökme gözlenmemiş ve çözelti homojenliği korunmuştur. Buna bağlı olarak, MMT'lerin fiber içerisindeki dağılımının da homojen olduğu sonucuna varılmıştır. SEM görüntülerinde MMT yığınlarına rastlanmaması da bu sonuçla uyumludur. SEM analizinde elde edilen görüntülerin ImageJ programı ile yapılan analizleri sonucunda PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin ortalama çapları sırasıyla, $478 \text{ nm} \pm 205$, $368 \text{ nm} \pm 118$ ve $399 \text{ nm} \pm 117$ olarak hesaplanmıştır. Fiber çap dağılım grafikleri incelendiğinde, MMT katkısının fiber çap dağılımını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

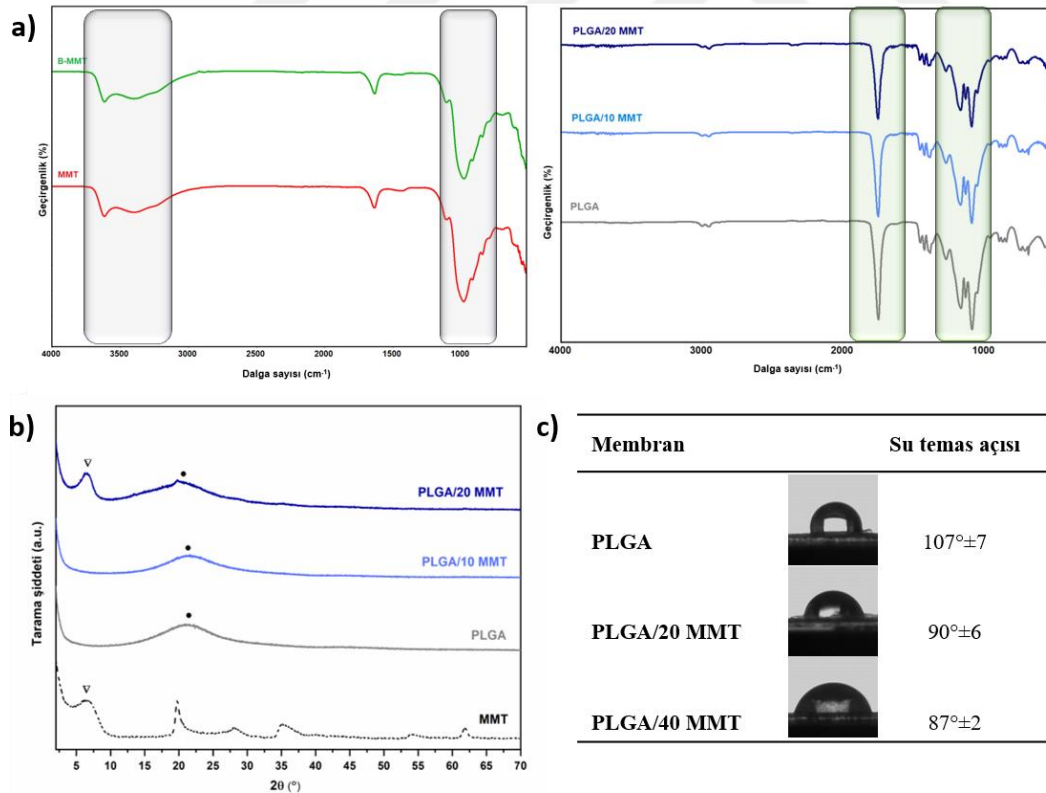


Şekil 4.10. Elektroegirme ile üretilen PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrikslere ait SEM görüntüleri ve fiber çap dağılım grafikleri.

4.3.1.2. Kimyasal ve Kristalografik Karakterizasyon

Bor adsoplanan MMT'lerin kimyasal yapındaki değişikliğin belirlenmesi amacıyla ATR-FTIR analizi yapılmıştır (Şekil 4.11a). Yaklaşık olarak 1040 cm^{-1} dalga boyunda Si-O gerilimine ait karakteristik pik, MMT ve B-MMT örneklerinin her ikisinde de görülmüştür. Spektrumda görülmesi beklenen, $3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu arasındaki O-H gerilim ve 1600 cm^{-1} dalga boyu civarındaki H-O-H bükülmesi pikleri de tespit edilebilmiştir [116]. İki spektrum karşılaştırıldığında, bor adsorpsiyonundan sonra MMT'nin kimyasal yapısının değişmediği görülmüş, böylece, bor ve MTT arasındaki etkileşimin fiziksel olduğu çıkarımı yapılmıştır.

Şekil 4.11a'da PLGA, PLGA/10 MMT ve PLGA/20 MMT fiber matrikslere ait ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Fiber matrikslere ait spektrumlarda, ester gruplarının varlığını işaret eden, 1746 cm^{-1} 'de karbonil gerilmesi (C=O) ve $1093\text{-}1452\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki C-O gerilmelerine ait pikler belirgin bir şekilde görülmektedir [118]. Fiber matrikslerde MMT ve PLGA'nın karakteristik pikleri ile çakıştığı için spektrumlar incelendiğinde, gruplar arasında arasında bir farka rastlanmamıştır.



Şekil 4.11. PLGA ve PLGA/MMT fiber kimyasal ve kristalografik karakterizasyon sonuçları a) ATR-FTIR spektrumu, b) XRD spektrumu (∇ , karakteristik MMT piki; $\bullet$, amorf PLGA piki) ve c) su temas açısı ölçümleri.

Fiber matrikslerdeki MMT'nin varlığı XRD analizi ile gösterilmiştir (Şekil 4.11b). PLGA/20 MMT'de $2\theta=7^\circ$ civarında görülen yeni pik, MMT için karakteristik olan ve $2,5^\circ-7,5^\circ$ arasında gözlenen pike aittir [119]. XRD spektrumunda $10-25^\circ$ arasında görülen geniş pik ise PLGA kopolimerin amorf yapısının bir göstergesidir [120]. Fiber matrikslerde $21,2^\circ$ 'de görülen geniş pik çalışma kapsamında kullanılan PLGA'nın amorf yapısını doğrulamaktadır. MMT katkısı PLGA'nın kristalinitesini değiştirmemiştir.

4.3.1.3. Su Temas Açısı Analizi

Hidrofilik özellikte olduğu bilinen MMT'lerin, fiber matrikslerin ıslatılabilirlik özelliklerine olan etkisinin belirlenmesi için gözeneksiz olarak üretilen membranların su temas açıları ölçülmüştür (Şekil 4.11c). Böylece fiber matrikslerde gözeneklilik nedeniyle matriks içindeki havanın su temas açısı üzerindeki etkisi dışlanmıştır. PLGA membranın su temas açısı $107^\circ \pm 7$ olarak bulunurken ağırlıkça %20 ve %40 oranlarında MMT içeren membranların su temas açıları sırasıyla, $90^\circ \pm 6$ ve $87^\circ \pm 2$ derece olarak ölçülmüştür. Bu da hidrofilik karakteri nedeniyle MMT'nin fiber matrikslerin hidrofobitesini azalttığını göstermektedir.

4.3.1.4. Termal Karakterizasyon

Biyomalzemelerin sterilizasyon yöntemlerinin belirlenmesi ve fizyolojik ortamdaki davranışlarının öngörülebilmesi için termal karakterizasyon analizlerinin yapılması önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan DSC ve TG analizlerinin sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir. TG analizine göre, fiber matrikslerin maksimum bozunma sıcaklıkları otoklav ile sterillenebilme koşulu olan 121°C 'nin üzerinde bulunmuştur, ancak polimerde kütle kaybı olmamasına rağmen morfoloji tamamen bozulmuştur. Bu nedenle, otoklav ile sterilizasyon yöntemi fiber matriksler için uygun bulunmamıştır. Bozunma yüzdeleri incelendiğinde, PLGA reçine ve PLGA fiber matrikslerin neredeyse 600°C 'de tamamının bozunduğu, yapısında MMT bulunan fiber matrikslerde ise inorganik yapıdaki MTT'nin bozunmadan kaldığı tespit edilmiştir. TG analizi sonuçları fiber matrikslerde MMT varlığını göstermektedir. PLGA fiber matrikslerde kalan kütle yüzdeleri incelendiğinde, artan kil oranları ile bozunma sonrası kalan kütle kısmen uyumlu bulunmuştur. Teorik olarak polimere göre ağırlıkça eklenen MMT miktarlarının kalan kütle ile doğrusal bir ilişkisinin olmamasının nedeni, elektroeğirme süresine bağlı olarak özellikle B-MMT içeren çözeltideki kilin çökmesi ile açıklanabilir.

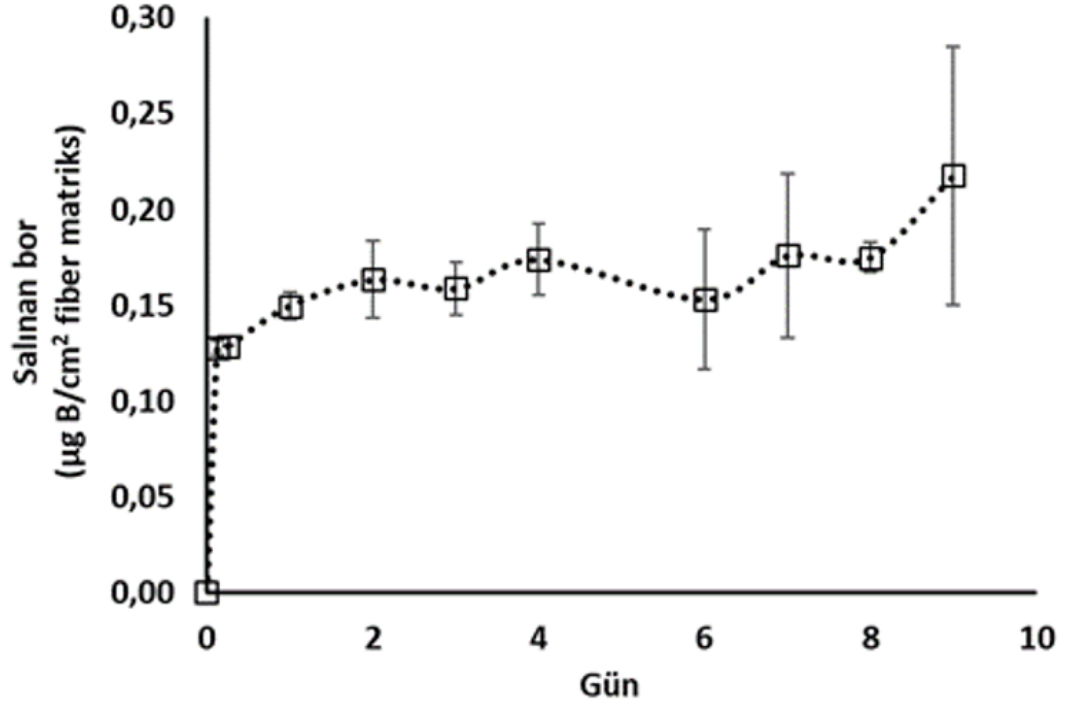
DSC analizi ile belirlenen camsı geçiş sıcaklıkları Çizelge 4.3'te sunulmuştur. PLGA reçinesinin camsı geçiş sıcaklığı 49,31°C olarak tespit edilirken, PLGA ve PLGA/MMT ve PLGA/B-MMT (PLGA/40 B-MMT hariç) fiber matrikslerin camsı geçiş sıcaklıkları daha düşük bulunmuştur. Bu farklılığın, fiber matrikslerdeki geniş yüzey/hacim oranının yanı sıra, elektroğirme nedeniyle molekül zincirlerinin düzenlenmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda, fiber morfolojisindeki polimerlerin, reçine formuna göre daha düşük kristaliniteye sahip olması beklenmektedir. Başka bir deyişle, reçinedeki molekül zincirleri fiber morfolojisinde olduklarında molekül zincirleri çok daha dolanmış haldedir. Elde edilen sonuçlar ilgili literatür ile uyumludur [118].

Çizelge 4.3. PLGA bazlı fiber matrikslerin camsı geçiş sıcaklıkları ve bozunma yüzdeleri.

	DSC	TGA
	T _g (°C)	Kalan kütle (%) (600°C)
PLGA reçine	49,31	1,55
PLGA	33,60	2,44
PLGA/10 MMT	29,05	5,52
PLGA/10 B-MMT	26,54	6,33
PLGA/20 MMT	36,11	6,77
PLGA/20 B-MMT	33,73	7,12
PLGA/40 MMT	47,34	21,02
PLGA/40 B-MMT	31,01	12,42
MMT	-	87,40
B-MMT	-	87,20

4.3.1.5. PLGA/20 B-MMT Fiber Matrikslerden Bor Salım Çalışması

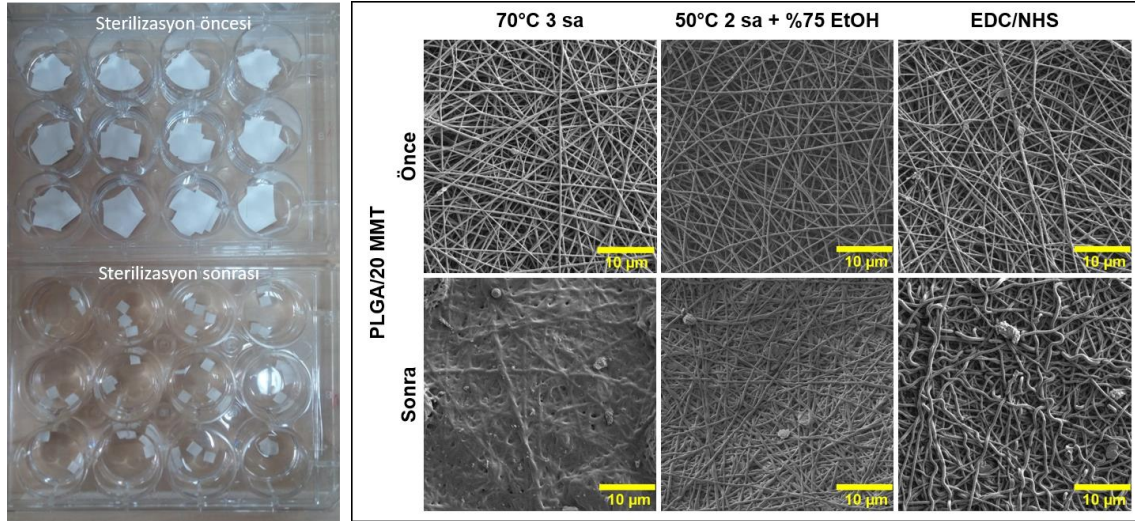
Sunulan tez çalışması kapsamında, fiber matrikslerden bor salım çalışmaları için model olarak PLGA/20 B-MMT seçilmiştir. Salım çalışmalarının sonuçları azometin-H yöntemi ile indirekt olarak tespit edilmiştir. Doğrudan MMT'lerden yapılan ve ICP-MS ile tayin edilen bor salım sonuçları ile karşılaştırıldığında (Çizelge 4.1), PLGA/20 B-MMT'den salınan bor miktarının çok düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.12). Ancak hem analizlerin farklılığı hem de MMT'nin serbest halde değil fiberler içerisinde olduğu düşünüldüğünde elde edilen sonuçların farklı olması anlaşılır olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.12. PLGA/20 B-MMT fiber matrikslerden borun salım kinetiği.

4.3.1.6. Fiber Matrikslerin Büzüşme Probleminin Önlenmesine Yönelik Çalışmalar

Sunulan tez çalışmasının son aşamasına gelindiği düşünülürken karşılaşılan en önemli problem, Şekil 4.13'teki fotoğraftan açıkça görüldüğü üzere PLGA fiber matrikslerin sterilizasyon (%70 (v/v) EtOH/UV) işlemi sırasında aniden büzüşmesi olmuştur. Fiber matrikslerin boyutları tamamen değişmiş aynı zamanda gözenekliliğin kaybolması nedeniyle oldukça rijit bir hale dönüşmüşlerdir. Bu problemin nedenlerine yönelik literatür taraması yapıldığında, elektroegirme yönteminin elektrik alanın etkisiyle polimer zincirlerinde bir açılmaya neden olduğu ve fiber halindeki polimer zincirlerinin camsı geçiş sıcaklıklarının üstünde bir sıcaklık ile karşılaşana kadar oldukları durumları koruduğu bilgisine ulaşılmıştır [121, 122]. DSC analiz sonuçları, elektrik alan etkisiyle fiber matrikslerin camsı geçiş sıcaklıklarının fizyolojik sıcaklık olan 37°C'nin altına düştüğünü göstermiştir. Kısacası, elektrik alan etkisiyle rahatlayan polimer zincirleri camsı geçiş sıcaklığının üstünde bir sıcaklıkla karşılaştığında tekrar eski haline dönmekte ve bu durum fiber matrikslerin büzüşmesiyle sonuçlanmaktadır. Aynı davranış etanol muamelesi sonrasında da görülmektedir.



Şekil 4.13. Sterilizasyon işlemi sırasında büzüşen PLGA fiber matriksler (sol) ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin büzüşme öncesi ve yapılan 3 farklı muamele sonrası SEM görüntüleri (sağ).

Büzüşmenin önlenmesine yönelik, PLGA/20 MMT fiber matrikslere 3 farklı modifikasyon yapılmış [123, 124] ve SEM analizi görüntülerine Şekil 4.13'te yer verilmiştir. Üretilen fiber matrikler alüminyum folyodan kaldırılmadan önce 70°C'de 3 sa inkübe edildiğinde fiber morfolojisinin ve gözenekli yapının bozulduğu tespit edilmiştir. Diğer modifikasyon ise, yine alüminyum folyodan kaldırılmadan önce 50°C'de 2 sa inkübe edilen fiber matriksin daha sonra %75 EtOH çözeltisinde bekletilmesiyle yapılmıştır. Bu modifikasyon sonrasında, fiber morfolojisinde belirgin bir bozulma görülmemiş ancak gözenekli yapı kaybolmuştur. Bir sa süreyle 40 mM EDC/20 mM NHS çözeltisinde (saf EtOH içinde) modifiye edilen örneklerin SEM görüntüleri incelendiğinde ise, fiber morfolojisinin tamamen değiştiği ve yine gözenekliliğin kaybolduğu belirlenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri, bozulan fiber morfolojileri ve gözeneklilik nedeniyle, her 3 yöntemin de başarısız olduğunu göstermiştir. Ru ve ark. [125] tarafından yapılan bir çalışmadan esinlenerek PLGA fiber matrikslerin sıcaklık uygulamasıyla laminasyon kağıtlarına sabitlendiği çalışmalarda da %70 (v/v) EtOH içerisine yerleştirilen örnekler ilk 30 dk'da morfolojilerini korusalar da 60 dk sonunda polimer zincirlerinin konformasyon değişimi güçlü bir etkiyle büzüşmeye ve laminasyon kağıtlarından ayrılmalara neden olmuştur.

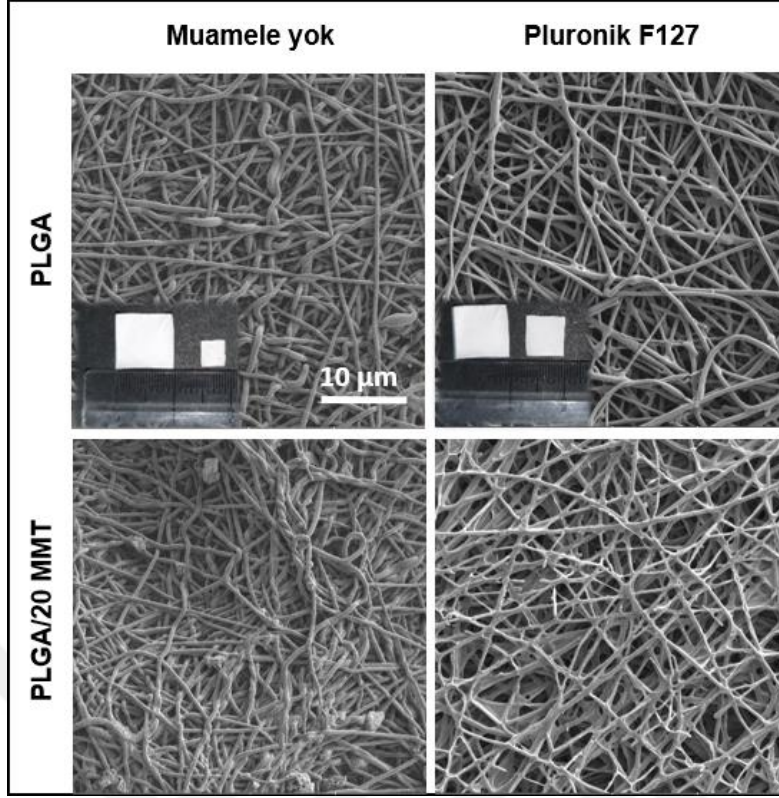
Tseng ve ark. [126] amorf polimerlerden elektroegirme yöntemiyle elde edilen fiber matrikslerde ortaya çıkan boyut değişiminin, fiber matrikslerin ısıl-tersinir bir jel olan Pluronic F127 hidrojelinde (%55-60 (w/v)) 70°C'de 3 sa inkübe edilmesiyle

önlenebildiğini ifade etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, fiber matriksler önce alüminyum folyadan kaldırılmadan 50°C’de 2 sa bekletilmiş ve sulu çözeltisi +4°C’de sıvı halde bulunan Pluronik F127 içine yerleştirilerek 70°C’de 3 sa daha inkübe edilmiştir. Hiçbir muamele yapılmayan ve Pluronik F127 içinde sıcaklık uygulaması yapılan fiber matrikslerin sterilizasyon sonrası büzüşme yüzdeleri hesaplanmış, sonuçlar Çizelge 4.4’te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Fiber matrikslerin büzüşme yüzdeleri.

	Muamele yok	50°C 2 sa	50°C 2 sa + Pluronik F127’de 70°C 3 sa
PLGA	%80,8±4,6	%64,2±6,0	%38,7±7,1
PLGA/20 MMT	%91,8±3,2	%75,8±1,4	%51,3±7,3
PLGA/20 B-MMT	%86,0±2,8	%74,4±3,3	%35,2±6,9
PLGA/40 MMT	%93,5±3,5	%88,0±2,3	%70,3±5,7
PLGA/40 B-MMT	%88,0±0,0	%76,8±1,8	%65,8±3,6

Hiçbir muamele yapılmayan ve Pluronik F127 uygulaması (50°C 2 sa + Pluronik F127’de 70°C 3 sa) yapılan PLGA ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin sterilizasyon sonrasında değişen fiber morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.14’te verilmiştir. Bu uygulama görece başarılı bulunarak, HS2 ile yapılacak olan hücre kültür çalışmalarında kullanılabileceklerine karar verilmiştir.



Şekil 4.14. Hiçbir muamele yapılmayan ve Pluronik F127 uygulaması (50°C 2 sa + Pluronik F127’de 70°C 3 sa) yapılan PLGA ve PLGA/20 MMT fiber matrikslerin sterilizasyon sonrasında değişen fiber morfolojilerini gösteren SEM analizi.

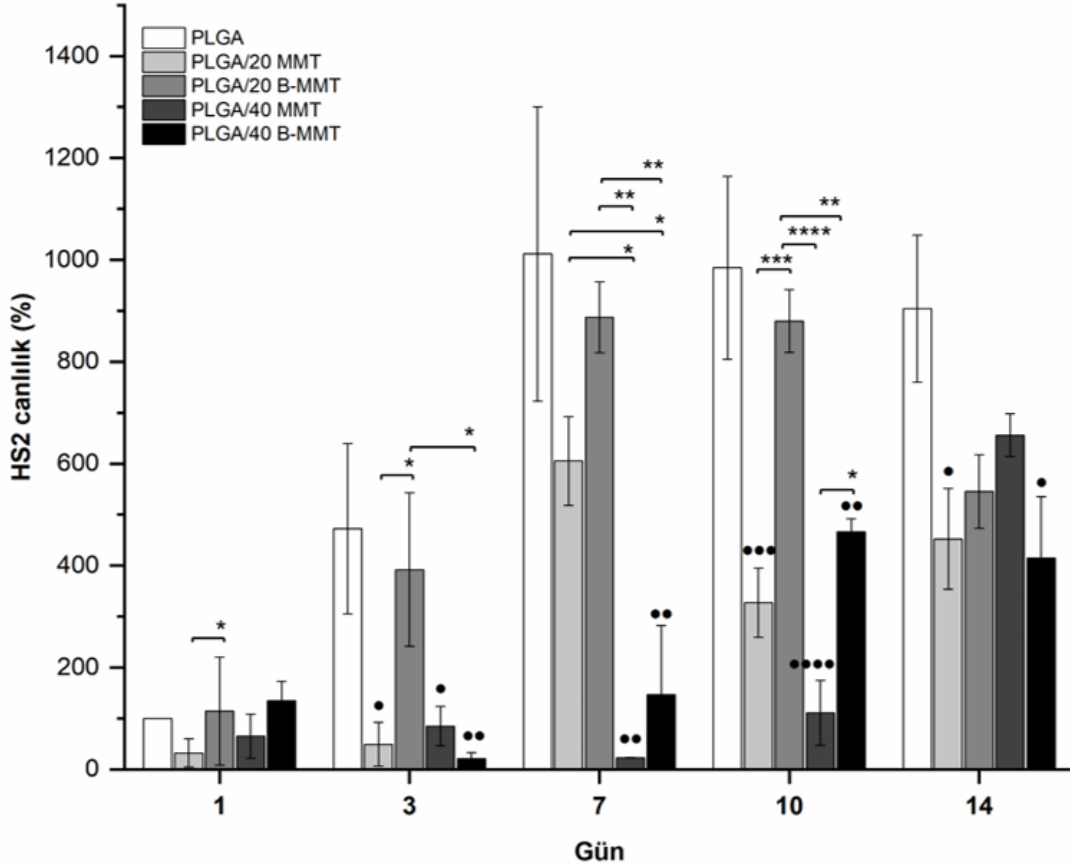
4.3.2. HS2 Hücrelerinin PLGA Bazlı Fiber Matriksler Üzerindeki Davranışının İncelenmesi

Pluronik F127 muamelesi (50°C 2 sa + Pluronik F127’de 70°C 3 sa) yapılan PLGA bazlı fiber matrikslerin, HS2 hücrelerinin tutunma ve çoğalma davranışlarına etkisinin incelenmesi amacıyla, 14 günlük hücre kültür çalışması yapılmıştır.

MTT analizi

Hücrelerin çoğalma davranışlarını gösteren MTT analizinin sonuçları Şekil 4.15’te verilmiştir. PLGA fiber matriksin 1. gün hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kültürün 10. gününe kadar PLGA ve PLGA/20 B-MMT grubunun benzer profile sahip oldukları tespit edilmiştir. Her iki grupta da hücre canlılığı diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksektir. Bununla birlikte, analiz sonuçları MMT ve B-MMT içeren fiber matrikslerde hücre canlılığının PLGA fiber matrikslere göre oldukça düşük olduğunu ifade etmektedir. Daha önce Çizelge 4.4’te verilen büzüşme yüzdeleri

incelendiğinde hücre canlılığı daha yüksek bulunan PLGA ve PLGA/20 B-MMT fiber matrikslerdeki küçülmenin %35 civarlarında olduğu, diğer gruplarda ise bu oranın %50'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Fiber matrikslerin boyutlarında görülen değişim her ne kadar Pluronic F127 uygulaması ile azaltılmış olsa da fiber morfolojisi ve gözenekliliğin olumsuz olarak etkilendiği MTT sonuçlarından açıkça anlaşılmıştır.

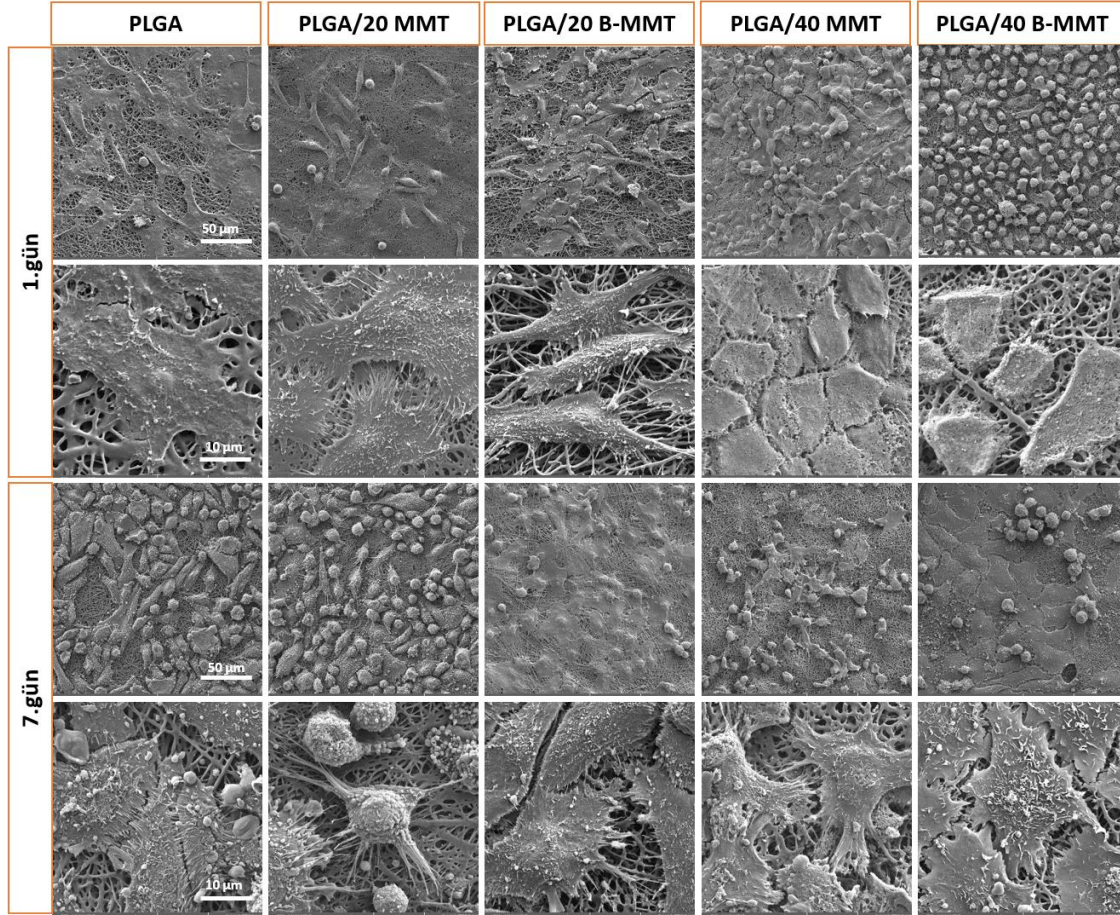


Şekil 4.15. PLGA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin 14 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$; aynı günde PLGA grubu kontrol olarak kabul edildiğinde $\bullet p \leq 0,05$, $\bullet\bullet p \leq 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p \leq 0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p \leq 0,0001$).

SEM Analizi

PLGA bazlı fiber matrikslerin üzerinde kültüre edilen HS2 hücrelerinin morfolojileri ve hücre-fiber etkileşimleri, kültürün 1 ve 7. günlerinde SEM analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.16). Birinci gün sonuçları incelendiğinde, bütün gruplarda hücrelerin fiberlere tutundukları tespit edilmiştir. Ancak, PLGA/40 MMT ve PLGA/40 B-MMT gruplarında

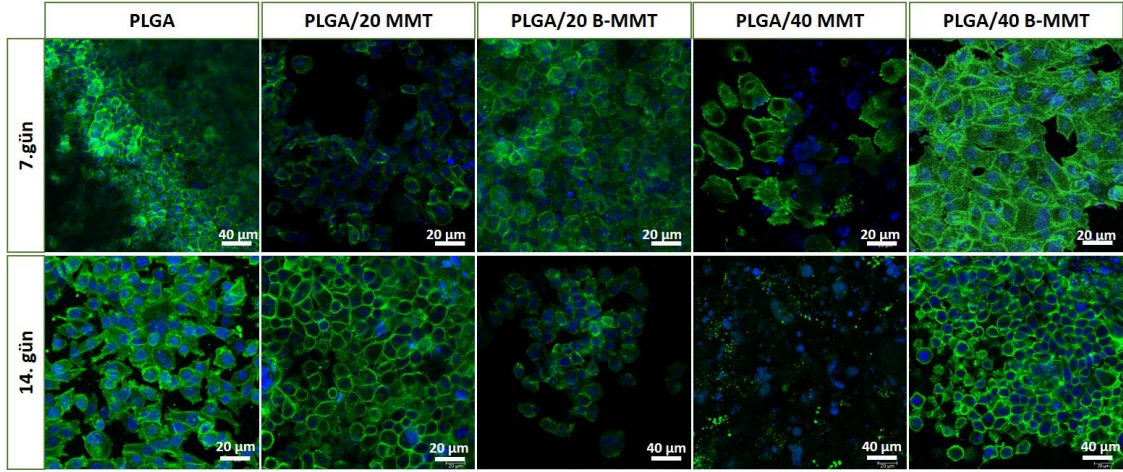
hücre membranlarının ve morfolojilerinin sağlıklı olmadığı bölgelere rastlanmıştır. Kültürün 7. gününde ise tam olarak tespit edilememekle birlikte, PLGA/40 MMT ve PLGA/40 B-MMT gruplarında diğer gruplara göre hücre yoğunluğunun daha az olduğu dikkati çekmiştir. Sağlıklı keratinositlerin gösterdikleri sıkı hücre bağlantılarına ait görüntüye en çok PLGA fiber matrislerin 7. gününde rastlanmıştır.



Şekil 4.16. PLGA bazlı fiber matrislere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 1. ve 7. gününde SEM analiz görüntüleri.

Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI Boyama

Fiber matrislere ekilen HS2 hücrelerinin morfolojileri kültürasyonlarının 7. ve 14. günlerinde, Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyaması yapılarak incelenmiştir (Şekil 4.17). Fiber matrislerin genel görüntüsü değerlendirildiğinde, en fazla hücre yoğunluğu her iki gün için de sırasıyla en çok PLGA ve PLGA/40 B-MMT gruplarında görülmüştür. Fiber matrislerin küçülmesi nedeni ile elde edildiği düşünülen bu farklı sonuçlar, değişen MMT katkısının ve B-MMT'nin gerçek etkisi hakkında tam bir çıkarım yapılamamasına neden olmuştur.



Şekil 4.17. PLGA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 7. ve 14. gününde hücre iskeleti/çekirdek boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi renkle boyanmıştır).

Hücre kültür çalışmalarının sonuçları, EtOH ve/veya sıcaklık nedeniyle fiberlerin boyutlarındaki değişimin, hücre çoğalması ve morfolojisi üzerindeki olumsuz etkisini ortaya koymuştur. Fiber morfolojisindeki değişim, aynı zamanda fiber matrikslerin sertliklerinin artması ve gözenekliliğin azalması gibi problemleri de beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, bor ve MMT katkısının yara iyileşmesi üzerindeki olası etkilerinin incelendiği tez çalışmasında, camsı geçiş sıcaklığı daha yüksek olduğu bilinen PLA polimeri ile yapılan çalışmalarla devam edilmiştir.

4.4. PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Üretimi ve Hücre Kültür Çalışmaları

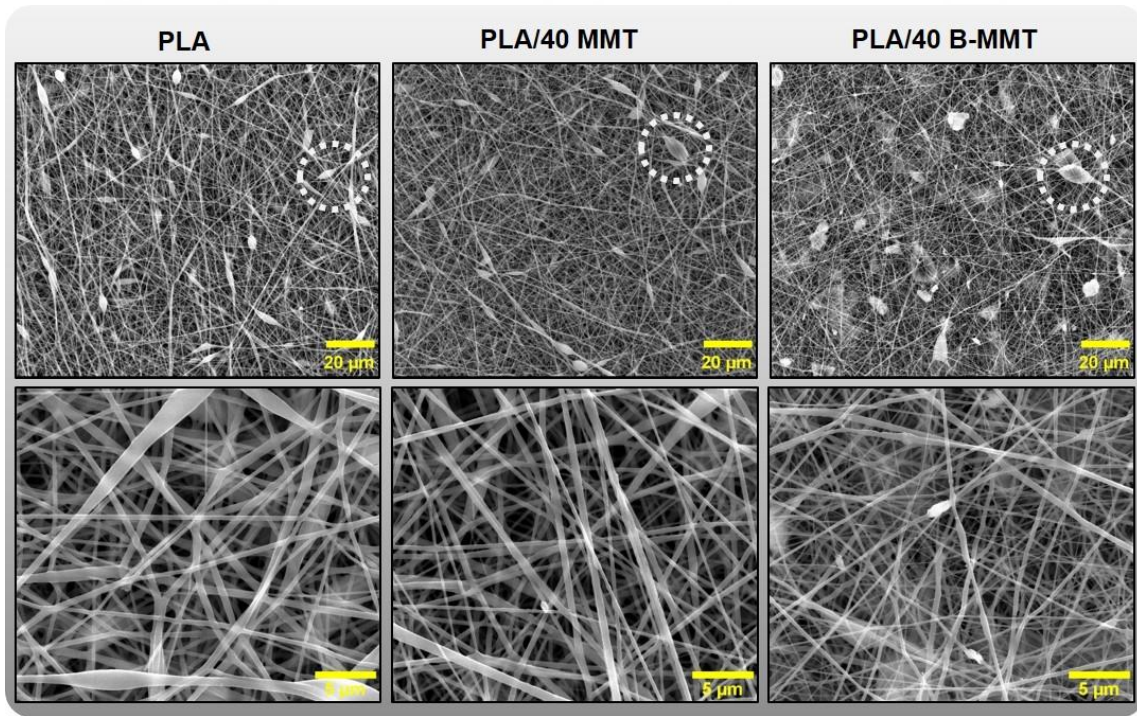
4.4.1. Elektroegirme ile PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Üretimi

PLA, biyobozunur ve biyoyumlu olması sayesinde rejeneratif tıp, gen transferi, ilaç salımı ve doku mühendisliği alanlarında sıklıkla tercih edilen, hidrofobik ve yarı kristalin bir polimerdir [127]. Sunulan tez çalışmasında, PLGA yerine PLA polimerinin kullanılmasına karar verilmesinin ardından, fiber matriks üretiminde uygun elektroegirme parametrelerinin belirlenmesi için %8 (w/v)'lik ve %10 (w/v)'luk PLA çözeltileri ile çalışılmıştır. Yüzde 8'lik PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matriksler, akış hızı 1,2 mL/sa, voltaj 20 kV ve şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 25 cm olacak şekilde üretilmiştir. Yüzde 10'luk PLA fiber matriksler için kullanılan parametreler, akış hızı 1,2 mL/sa, voltaj 20 kV ve şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 25 cm iken, PLA/MMT ve PLA/B-MMT fiber matriksler için bu koşullar 1,0 mL/sa, voltaj 17 kV ve şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı 25 cm olarak belirlenmiştir.

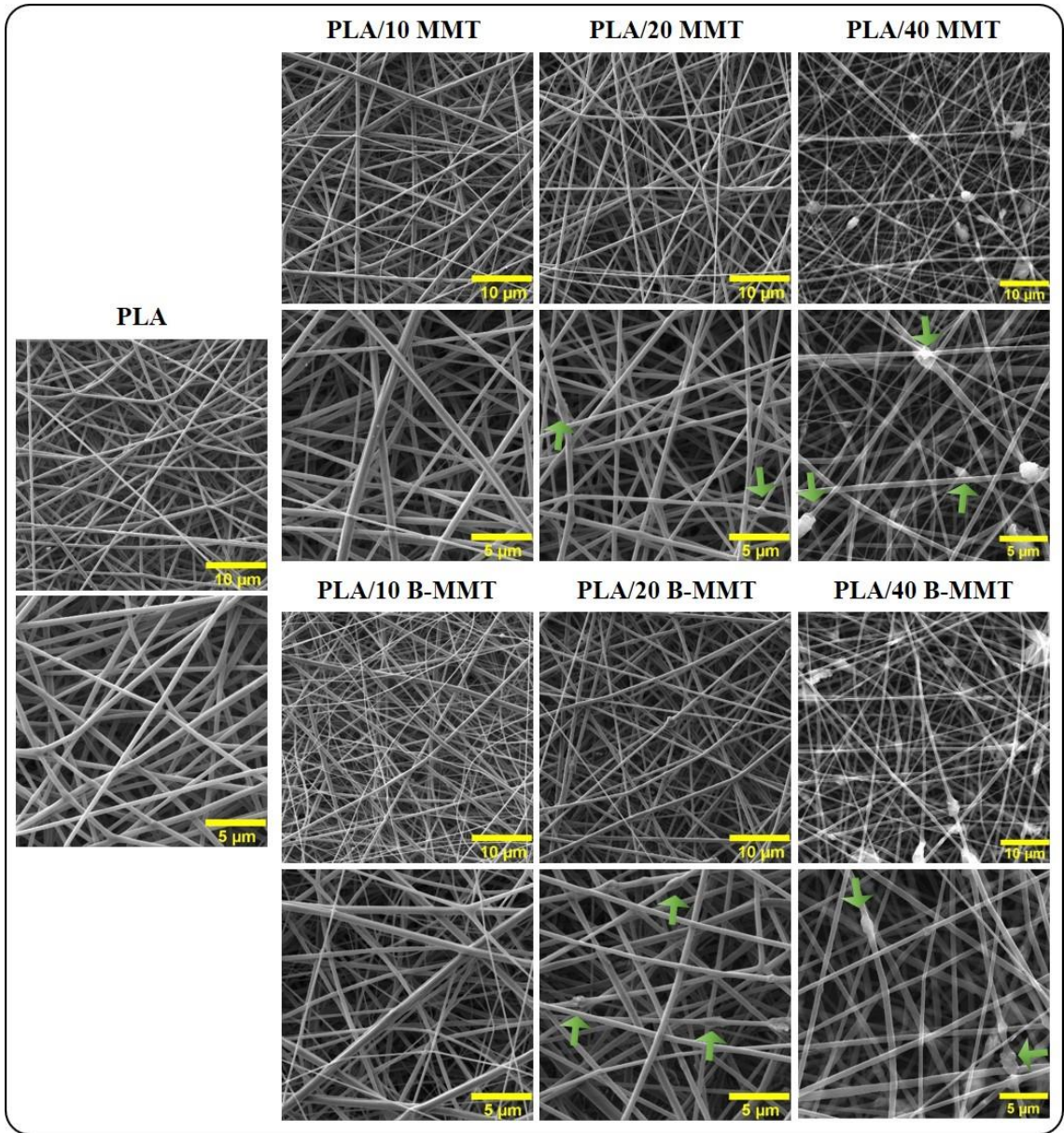
4.4.2. PLA Bazlı Fiber Matrikslerin Karakterizasyonu

4.4.2.1. SEM Analizi

Yüzde 8 (w/v)'lik PLA çözeltisi kullanılarak hazırlanan fiber matrikslerin optik mikroskop ile yapılan ilk incelemelerinde fark edilemeyen boncuk oluşumu, SEM analizi görüntülerinden tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Boncuk oluşumunun en önemli nedeni çözelti vizkositesinin düşük olmasıdır. Çözeltide polimer derişimi arttığında vizkozite artar, buna bağlı olarak artan yüzey gerilimi, boncuk oluşumunun azalmasına neden olur [128]. Bu bilgiler ışığında, PLA çözeltisinin derişimi %10 (w/v)'a çıkarılmıştır. Şekil 4.20'de bundan sonraki çalışmalarda kullanılmış olan PLA bazlı fiber matrikslere ait SEM görüntülerine yer verilmiştir.

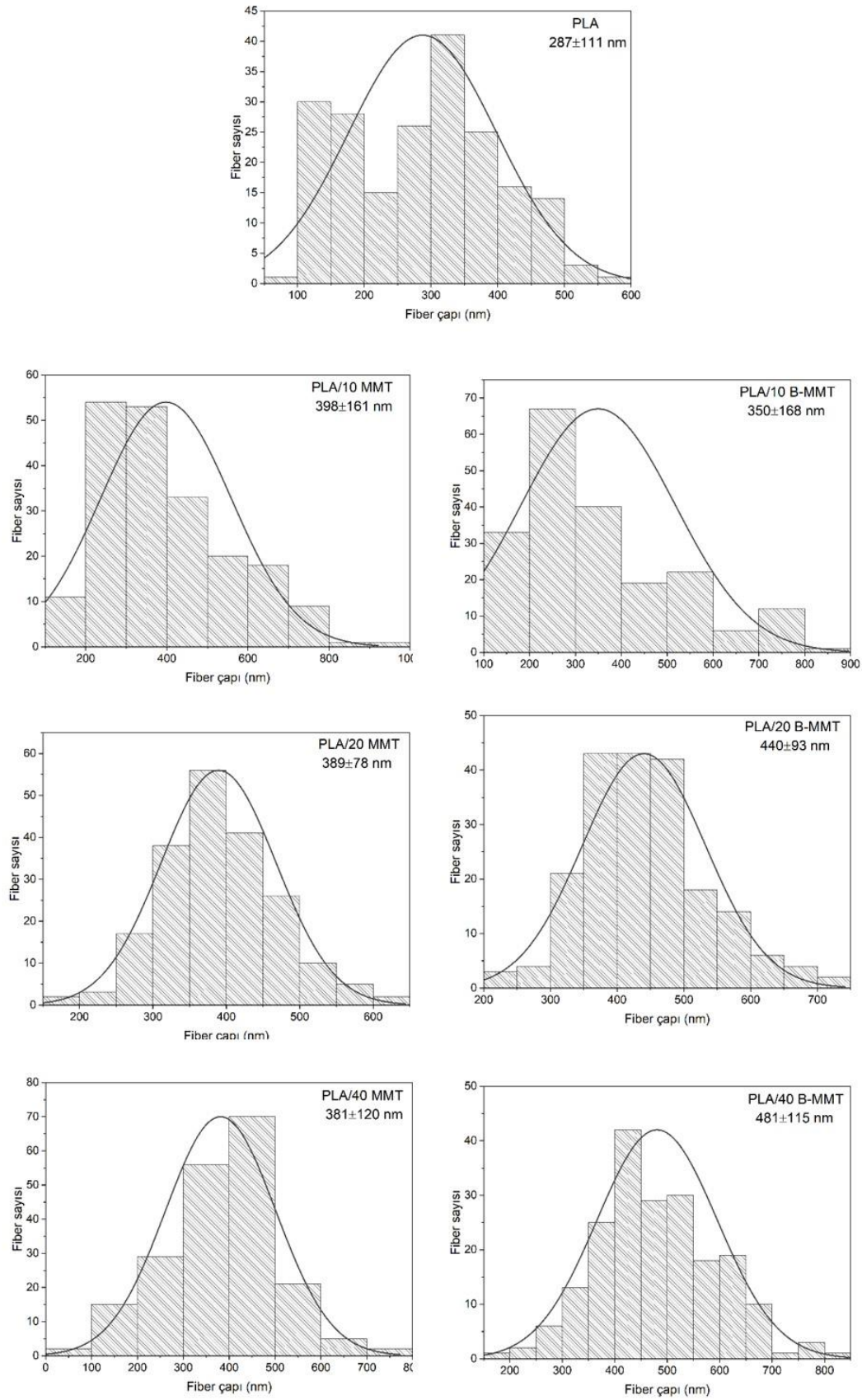


Şekil 4.18. Yüzde 8 (w/v)'lik PLA çözeltisi kullanılarak hazırlanan PLA bazlı fiber matrikslerin SEM analizi. Boncuk yapıları beyaz çizgiler ile daire içine alınarak gösterilmiştir.



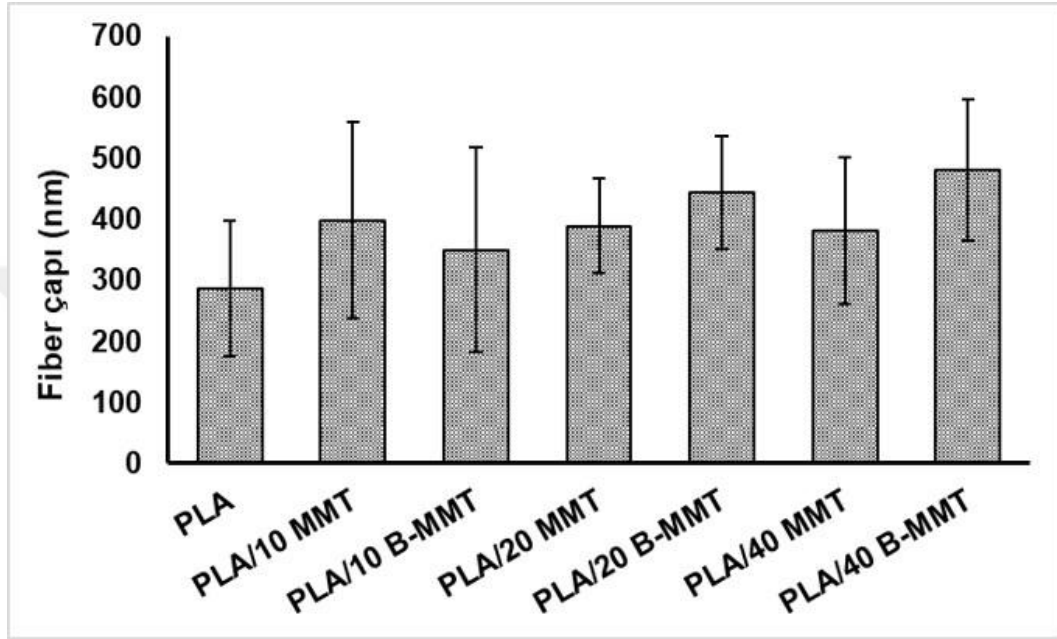
Şekil 4.19. Yüzde 10 (w/v)'luk PLA çözeltisi kullanılarak hazırlanan PLA bazlı fiber matrikslerin SEM analizi. Yeşil oklar ile fiberler içerisindeki MMT ya da B-MMT'ler işaret edilmektedir.

Şekil 4.19'da verilen SEM analizleri, düzensiz olarak toplanan fiberlerin düzgün morfolojide boncuk içermeyen yapıya sahip olduklarını göstermektedir. PLA/10 MMT ve PLA/10 B-MMT gruplarında görece az olan MMT'lere SEM görüntülerinde rastlanmamıştır. Yüzde 20 ve daha üstünde MMT ya da B-MMT içeren gruplarda ise fiber yapısına katılan nanokillerin varlığı tespit edilmiştir. MMT ya B-MMT katkısı fiber morfolojisinde önemli bir değişikliğe neden olmamakla birlikte, fiberlerin sürekliliğinin bozulmasının mekanik özellikleri etkileyebileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.20. PLA bazlı fiber matrikslerin ortalama çapları ve çap dağılım grafikleri.

SEM görüntüleri, fiber çap dağılımının belirlenmesi amacıyla ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.20). Ortalama fiber çapı en düşük grup PLA (287 nm $\pm$ 111), en yüksek olan ise PLA/40 B-MMT grubudur (481 nm $\pm$ 115). Bununla birlikte, fiber çapları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.21). Kısacası, MMT ya da B-MMT katkısı ortalama fiber çaplarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

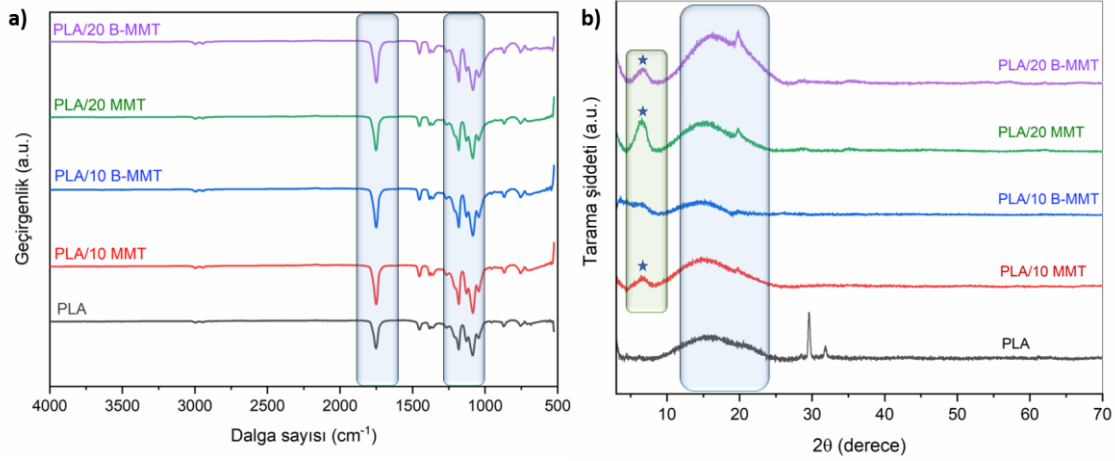


Şekil 4.21. PLA bazlı fiber matrikslerin fiber çaplarının karşılaştırılması.

4.4.2.2. Kimyasal ve Kristalografik Karakterizasyon

PLA bazlı fiber matrikslerdeki MMT katkısının kimyasal yapıya etkisi ATR tekniği kullanılarak FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde, matrikslerin kimyasal yapılarında bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.22a). Bütün gruplarda 1710-1770 cm⁻¹ dalga sayısında ester bağlarının yapısındaki karbonil grubuna ait pik saptanmıştır. PLA ana zincirindeki ester gruplarına ait karakteristik pikler de (1178, 1128 ve 1083 cm⁻¹) belirgin şekilde görülmektedir [129]. MMT grubuna ait piklerin görülmemesinin nedeni polimer ve MMT arasında kimyasal bir etkileşimin olmaması şeklinde yorumlanmıştır. MMT'ler polimer içerisinde bor taşıyan bir katkı malzemesi olarak görev yapmıştır.

XRD spektrumları incelendiğinde, PLA'ya ait amorf pikin yanı sıra, MMT'ye ait karakteristik pikin ($2\theta=7^\circ$) varlığı, elektroegirme yöntemiyle PLA bazlı MMT ve B-MMT fiber matrikslerin başarılı bir şekilde hazırlanabildiğini göstermiştir (Şekil 4.22b).



Şekil 4.22. PLA bazlı fiber matrikslere ait (a) ATR-FTIR ve (b) XRD spektrumu.

4.4.2.3. Termal Karakterizasyon

MMT ve B-MMT'nin değişen oranlardaki katkısının PLA'nın termal davranışlarına olan etkisi DSC ve TG analizleri ile değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). PLA bazlı fiber matrikslerin erime sıcaklıkları 175-178°C arasında bulunmuştur ve sonuç literatürde belirtilen 174-184°C değeri ile uyumludur [130]. PLGA fiber matrikslerde karşılaşılan büzüşme probleminin, PLA fiber matrikslerde görülmemesinin nedeni T_g sıcaklığının elektroegirme yöntemine rağmen fizyolojik sıcaklık olan 37°C'den oldukça yüksek olmasıdır. Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen PLA fiber matriksin T_g değeri 60,9°C olarak kaydedilmiştir. Bu sonuç, literatürdeki 59,8 ve 62,6°C sonuçları ile uyumludur [129, 131]. MMT ve B-MMT katkılı PLA fiber matrikslere ait T_g değerleri ise PLA grubuna göre bir miktar daha yüksek bulunmuştur. Literatürde, MMT katkısının T_g değerini arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [129]. TG analizi, fiber matrikslerde dekompozisyon sıcaklığından sonra kalan kütlenin, yapıya katılan MMT ile ilişkili olduğunu göstermektedir [15]. Teorik olarak %10, %20 ve %40 MMT ya da B-MMT içeren fiber matrikslerin 600°C'de kalan kütlesi incelendiğinde, killerin başarılı bir şekilde yapıya katıldığı çıkarımı yapılmıştır.

Çizelge 4.5. PLA bazlı fiber matrikslere ait DSC ve TG analiz sonuçları.

	DSC	TG
	T _g (°C)	Kalan kütle (%) (600°C)
PLA reçine	-	2,5 ± 0,6
PLA	60,9	5,1 ± 0,6
PLA/10 MMT	64,1	9,0 ± 1,1
PLA/10 B-MMT	63,3	11,8 ± 1,0
PLA/20 MMT	62,4	14,3 ± 2,5
PLA/20 B-MMT	62,3	16,5 ± 0,2
PLA/40 MMT	-	27,3 ± 2,9
PLA/40 B-MMT	-	22,2 ± 1,3

Sunulan tez çalışmasında, yara iyileşmesinde etkili olan bor derişiminin tespit edilmesi için TCPS yüzeylere ekilen HUVEC, HS2 ve BJ hücreleriyle yapılan çalışmalarda, besi ortamlarında doğrudan borun etkileri Bölüm 4.1’de detaylı olarak tartışılmıştır. Sonuçlar, 20 µg/mL bor derişiminin dahi olumsuz bir etkisinin olmadığını ve özellikle bor içeren besi ortamında kültüre edilen BJ hücrelerinin proliferasyonlarının arttığını göstermiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan PLA/10 B-MMT ve PLA/20 B-MMT fiber matrikslerin nanokil içerikleri, teorik olarak %10 ve %20 (w/w) olsa da elektroeğirme sırasında oluşan çökme ile oluşan kayıp ve fiber matrikslerdeki dağılımın ne kadar homojen olduğunun tam olarak bilinmesi mümkün değildir. B-MMT katkısından dolayı, TG analizindeki kalan kütle ve gravimetrik analiz verilerinden yola çıkılarak 1 cm² fiber matrikslerde bulunan kil miktarı hesaplanmıştır. Adsorpsiyon sonuçları ile her bir fiber matriksteki nanokil miktarına karşılık gelen bor miktarının hesaplanması mümkün olmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.6’da verilmiştir. Bu iki yaklaşım ile yapılan hesaplamalara göre PLA/10 B-MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarının ortalama bor miktarları sırasıyla, 2,8 ve 5,8 µg B/cm² fiber matriks olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Hücre kültüründe kullanılan PLA/B-MMT fiber matrikslerinin iki farklı yöntemle hesaplanan bor miktarları.

	PLA/10 B-MMT	PLA/20 B-MMT
Ağırlık hesabına göre ($\mu\text{g B/cm}^2$ fiber matriks)	~3,4	~7,5
TGA sonucuna göre ($\mu\text{g B/cm}^2$ fiber matriks)	~2,2	~4,2
Ortalama	~2,8	~5,8

4.4.2.4. Su Temas Açısı Analizi

Biyomalzemelerin hidrofilisitesi, hücre tutunmasını ve çoğalmasını etkileyen anahtar faktörlerden biridir. Ayrıca biyobozunur poliestерlerin hidrofilisitesi degradasyon hızının artmasına da neden olmaktadır [132]. Ancak, PLA yapısındaki metil grupları nedeniyle hidrofobik özellik göstermektedir [130]. Fiber matrikslerin hidrofilisitesinin artırılması amacıyla MMT'lerden faydalanılmıştır. Su temas açısı ölçümleri sonuçları incelendiğinde, MMT varlığından beklenen hidrofilisite artışı tespit edilememiştir (Çizelge 4.7). Su temas açısı ölçümleri, su damlasının malzemeye temas etmesinden 20 s sonra yapılmıştır.

Çizelge 4.7. PLA bazlı membranların su temas açıları.

Membran	Su temas açısı($^{\circ}$)
PLA	$72,4 \pm 4,1$
PLA/40 MMT	$70,1 \pm 3,0$
PLA/40 B-MMT	$74,3 \pm 2,9$

4.4.2.5. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışının İncelenmesi

Biyobozunur özellikte olan polimerlerin degradasyon davranışı birçok etken tarafından kontrol edilmektedir. Molekül ağırlığı, kimyasal ve stereo izometrik bileşim, kristalinite ve yüzey yükü gibi doğrudan polimerle ilişkili etkenlerin yanı sıra, morfoloji, yüzey pürüzlülüğü, gözeneklilik gibi fabrikasyon yöntemi ile ilişkili etkenler de bozunma süresini etkilemektedir. PLA'nın bozunma süresi, 6 ay ile 2 yıl içerisinde gerçekleşmektedir. Ancak bu süre, biyomalzemenin hazırlanmasında polimere eklenen katkıları ya da vücutta implante edildiği bölgeye bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

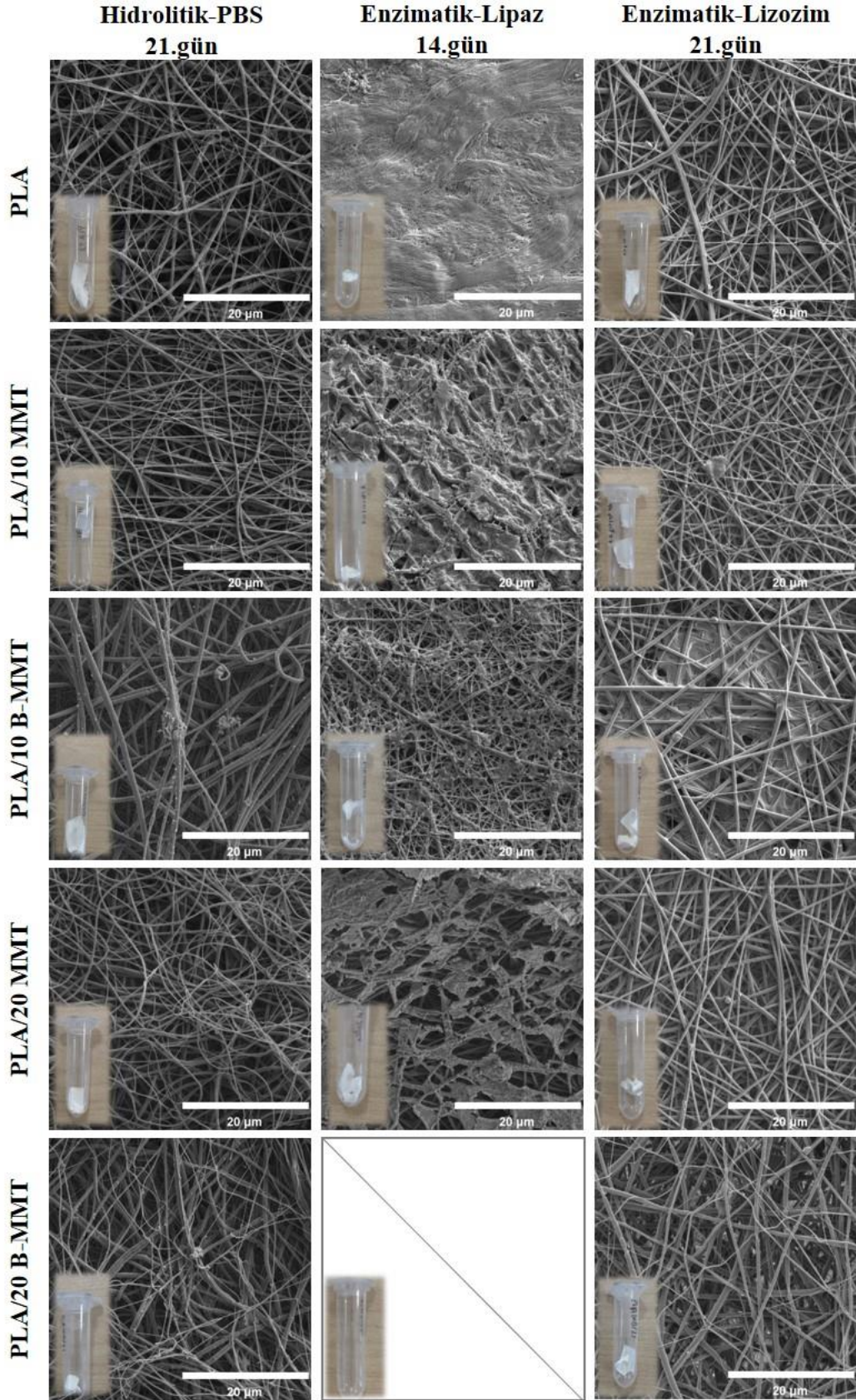
Laponit nanokil katkısının, nanohibrit hidrojenlerin degradasyon süresini azalttığı bildirilmiştir [133]. Ayrıca, PCL, PHBV (poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivaleat) ve PLA polimerlerine eklenen organo-modifiye MMT (O-MMT)'nin polimerlerin degradasyon süresini azalttığı rapor edilmiştir [134].

PLA hidrolitik bozunma davranışı gösteren polimerler arasındadır. Hidrolitik bozunma, ilk olarak su moleküllerinin kolaylıkla içeriye nüfuz edebildikleri amorf bölgelerden başlar. Henüz mekanik özelliklerde bir kayıp olmasa da bu aşamada molekül ağırlığında bir azalma meydana gelir. Amorf bölgenin tamamen bozunmasının ardından kristal bölgelerde başlayan hidroliz, kütle kaybıyla sonuçlanır. Bu nedenle tamamen amorf olan malzemeler kristal malzemelere göre daha hızlı bozunurlar [130]. Poliesterlerin degradasyonunda enzimler iki farklı şekilde etki göstermektedir. Enzimler, polimerin yüzeyindeki zincirleri rastgele olacak şekilde kesebilir ya da içine girerek zincirlerin uç noktalarına bağlanabilirler [135]. PLA'nın enzimatik degradasyonu lipaz, esteraz ve alkalaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Ancak, literatürde PLA'nın enzimatik degradasyonunun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda proteinaz K ve kitinaz-tipi enzimlere de rastlanmaktadır. Lizozim, gözyaşı, tükürük ve ter gibi vücut sıvılarında bulunan protein yapılı glikozit hidrolaz türü bir enzimdir. Lipaz ise, lipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen esterazların bir alt türüdür. Poliesterler, ester bağları nedeniyle lipaz ile degrade olabilirler [136].

Sunulan tez çalışmasında, yara iyileşmesini desteklemek üzere geliştirilen biyoaktif yara örtülerinin bozunma davranışları, 21 günlük *in vitro* biyobozunurluk testleriyle incelenmiştir. Fiber matrislerin hidrolitik ve enzimatik bozunma ortamlarındaki morfolojik değişimler, Şekil 4.23'de verilen SEM görüntüleri değerlendirilmiştir. *In vivo* degradasyonun ilk aşamasını hidrolitik degradasyon oluşturmaktadır. Ardından, hidrolitik olarak bölünmüş ve düşük molekül ağırlığına sahip PLA'nın enzimatik degradasyonunu içeren ikinci aşama başlar. Fiber matrislerin hidrolitik ortamda 21 gün sonunda elde edilen SEM görüntülerinde, fiber morfolojilerinin değişmeye başladığı, en fazla değişimin ise PLA/20 B-MMT grubunda olduğu görülmüştür. 0,5 mg/mL lipaz içeren enzimatik ortamda ise, 21 gün sonunda fiber matrisler tamamen bozunmuş olduğundan, 14 gün sonundaki görüntülerine yer verilmiştir. On dördüncü günde, PLA/20 MMT fiberlerin morfolojisinde belirgin bir deformasyon olduğu saptanmıştır. PLGA/20 B-MMT grubunda ise, 14 gün sonunda analiz yapılabilecek bir örnek kalmadığı tespit edilmiştir. Yani, örnek 14 günden önce tamamen bozunmuştur. 0,5 mg/mL lipaz içeren

enzimatik ortamda ise 21 gün sonunda fiber yapısı en çok değişen yine PLA/20 B-MMT grubu olmuştur. Elde edilen sonuçlar, MMT ve B-MMT katkısının PLA'nın biyobozunurluğunu arttırdığını ortaya koymuştur. Geliştirilen biyoaktif yara örtüsünün, yara iyileşmesini destekleyebilecek uygun biyobozunurluk süresine sahip olduğu çıkarımı yapılmıştır.





Şekil 4.23. PLA bazlı fiber matrikslerin 21 günlük *in vitro* hidrolitik ve enzimatik bozunma analizi sonundaki fotoğrafları ve SEM görüntüleri.

4.4.2.6. Mekanik Analiz

Yara örtülerinin ve diğer deri doku mühendisliği ürünlerinin sahip olması gereken ideal çekme dayanımı 0,8-18,0 MPa arasındadır [137]. Sunulan tez çalışmasında üretilen PLA bazlı fiber matrikslerin çekme dayanımları 0,9-3,2 MPa arasında bulunmuştur ve bu özellik açısından uygun bir yara örtüsü adayıdır. MMT ve B-MMT katkılı PLA fiber matrikslerin kopma noktasındaki uzaması ve elastik modül değerleri (PLA/10 MMT grubu hariç) PLA fiber matrikslere göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bu durumda fiber matriksler görece daha sert ve daha az esnektir. Fiberlerin yapısına katılan nanokiller, fiberlerde bir miktar deformasyona neden olmaktadır. Özellikle yüksek miktarda MMT ile katkılanan PLA/40 MMT ve B-MMT gruplarının elastik modül değerlerinin oldukça düşük olduğu dikkati çekmiştir. Bu fiber matriksler HS2 ve İDF hücreleri ile yapılan kültür çalışmalarında kullanılmamıştır.

Çizelge 4.8. PLA bazlı fiber matrikslere ait gerilme-gerinim eğrilerinden elde edilen çekme dayanımı, kopma noktasındaki uzama ve elastik modül değerleri.

	Çekme dayanımı (MPa)	Kopma noktasındaki uzama (%)	Elastik modül (MPa)
PLA	3,0 ± 0,1	70,5 ± 1,9	91,4 ± 35,5
PLA/10 MMT	3,2 ± 0,2	59,1 ± 7,9	140,6 ± 5,1
PLA/10 B-MMT	1,5 ± 0,0	47,8 ± 5,6	70,6 ± 13,5
PLA/20 MMT	1,4 ± 0,3	31,6 ± 10,8	66,9 ± 12,7
PLA/20 B-MMT	1,6 ± 0,5	31,7 ± 12,4	77,5 ± 26,3
PLA/40 MMT	1,5 ± 0,2	52,1 ± 12,6	13,5 ± 4,0
PLA/40 B-MMT	0,9 ± 0,4	50,8 ± 4,6	22,3 ± 1,1

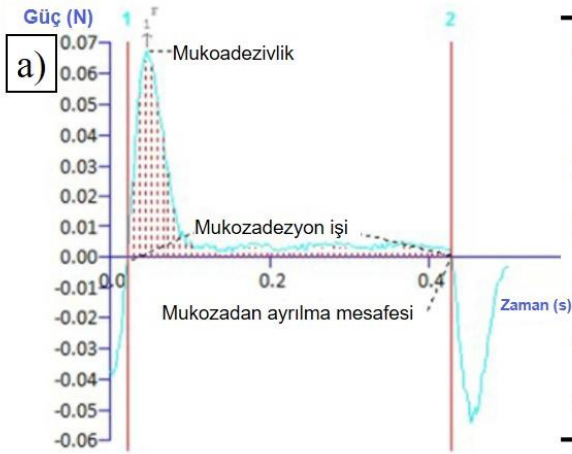
4.4.2.7. Mukoadezyon Testi

Biyoadesyon, en az biri biyolojik olan iki substrat yüzeyin, yüzey güçleri aracılığı ile uzun süre bir arada tutunması olarak tanımlanır. Adeziv bağlanma, mukus membrana ya da epitel mukozaya olduğunda bu tanım **mukoadezyon** adını almaktadır. Mukoadeziv malzemenin yüzeyi, mukozanın üst tabakası ve mukoza ile malzeme arasındaki mukus ara yüzeyi adeziv bağların oluşmasında görev alır. Mukus tabakasında, en çok glikozillenmiş glikoproteinler olan “müsinler” bulunur ve mukus tabakasının negatif yüklü olmasını sağlar. Mukoadezyon mekanizmasını açıklayan teoriler şunlardır;

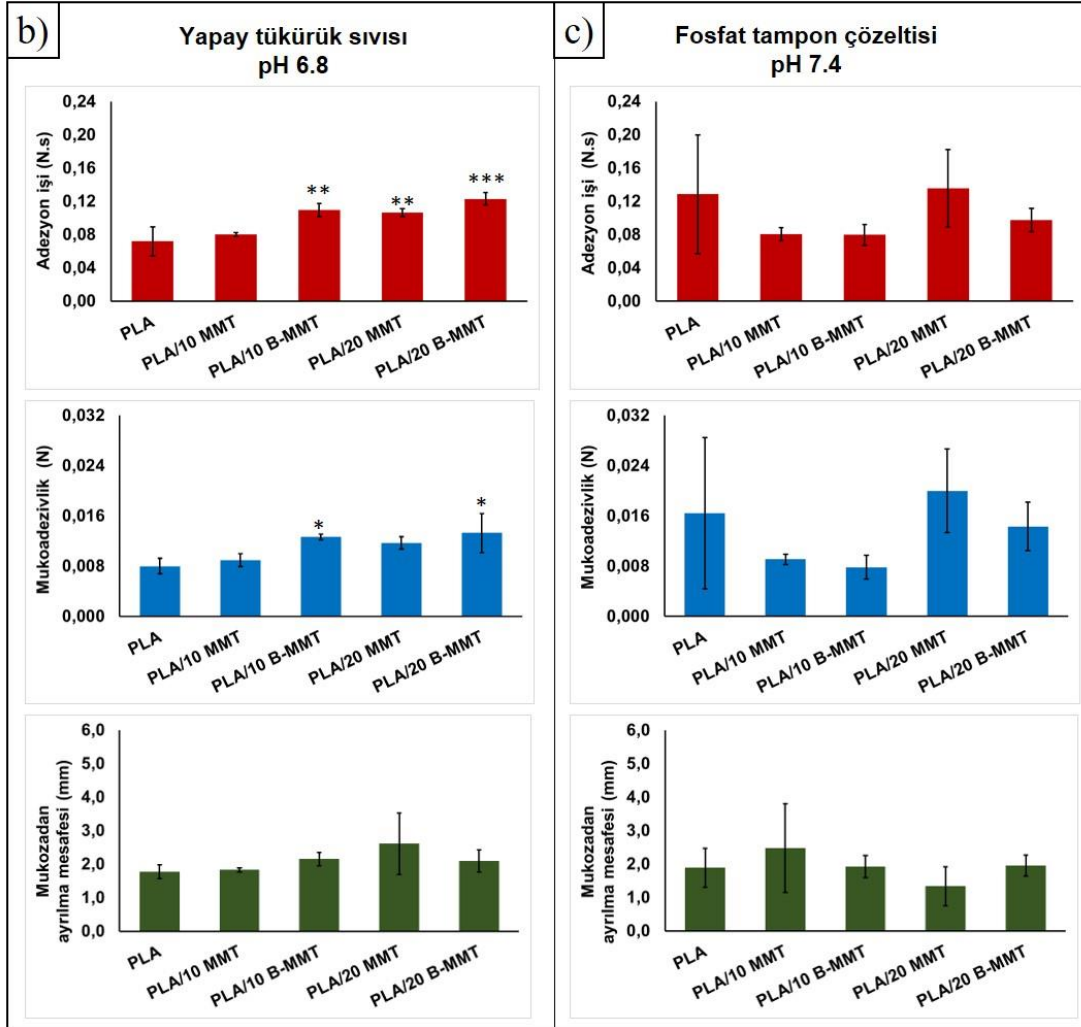
(i) ıslanma teorisi, (ii) difüzyon teorisi, (iii) elektron transferi teorisi, (iv) adsorpsiyon teorisi, (v) kopma teorisi. Mukoadezyonda fiziksel ve mekanik etkileşimlerin (polimer yüzeyinin pürüzlülüğü gibi) yanı sıra kimyasal etkileşimler de (kovalent ve iyonik bağlar, Van der Waals bağları, elektrostatik etkileşimler, disülfid bağları) rol oynar. Polimer ile mukoza arasındaki mukoadezyonun kararlılığı ya da gücü bu etkileşimlere bağlıdır [138].

Sunulan tez çalışmasında, adezyon işi, adezivlik ve mukozadan ayrılma mesafelerinin belirlendiği analizler, Tekstür analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24a'da analiz sonucu elde edilen güç-zaman grafiğine ait bir örnek sunulmuş ve kullanılan parametreler verilmiştir. Koyun bukkal mukozasının analiz süresince kurumasını önlemek amacıyla yapay tükürük sıvısı ya da fosfat tampon çözeltisiyle ıslatılması ile elde edilen mukoadezyon test sonuçlarına ise sırasıyla Şekil 4.24b ve c'de yer verilmiştir.

Adezyon işi, iki yüzeyin birbirinden ayrılması için yapılması gereken iş olarak tanımlanır. Adezivlik ise iş yapılırken gereken en yüksek kuvvet değeridir. İki yüzeyin arasındaki etkileşimin tamamen bittiği anda ölçülen mesafe ise mukozadan ayrılma mesafesi olarak belirtilmiştir (Şekil 4.24a). Şekil 4.24b'de sunulan grafikte, PLA ile karşılaştırıldığında PLA/10 B-MMT ($p \leq 0,01$), PLA/20 MMT ($p \leq 0,01$) ve PLA/20 B-MMT ($p \leq 0,001$) fiber matrikslerin adeziv özelliklerinin anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür. Mukoadezivlik karşılaştırıldığında ise PLA/10 B-MMT ($p \leq 0,05$) ve PLA/20 B-MMT ($p \leq 0,05$) fiber matrikslere göre anlamlı olarak yüksek bulunması, adezyon işi grafiklerinden elde edilen sonucu kısmen doğrulamaktadır. Çalışmada, mukozadan ayrılma mesafeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. PLA hidrofobik ve mukoadeziv özelliğe sahip olmayan bir polimerdir. Mukoadezyonda yüzey pürüzlülüğünün etkili olduğu düşünüldüğünde, yapıya katılan MMT'lerin PLA fiber matrikslere kazandırdığı topografinin bu artışta etkili olduğu yorumu yapılabilir. Yüksek yüzey alanları ve yüzeylerindeki doymamış kimyasal bağlar nedeniyle nanokillerin polimerlerin adeziv özelliğini arttırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [139].



Pre-test hızı	0,50 mm/s
Test hızı	1,00 mm/s
Post-test hızı	0,10 mm/s
Uygulanan güç	0,200 N
Geri dönme mesafesi	15 mm
Temas süresi	60 s
Tetik gücü	0,029 N

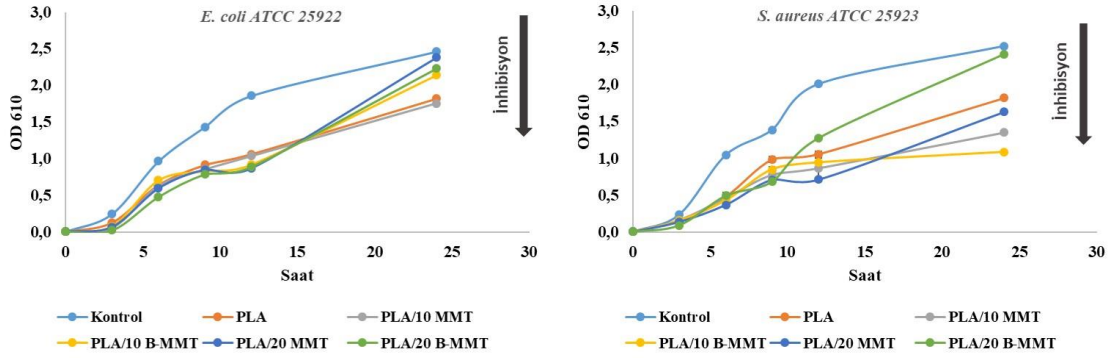


Şekil 4.24. PLA fiber matrisler ile koyun bukkal mukozası kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* mukoadezyon testi (a) Tekstür analizi ile elde edilen güç-zaman grafiği ve analiz parametreleri (b) yapay tükürük sıvısında ve (c) fosfat tampon çözeltisinde mukoadezyon test sonucuna ait grafikler (İstatistiksel anlamlılık; $n=3$, kontrol grubu PLA olarak alındığında, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$).

4.4.2.8. Antibakteriyel Özelliklerin Belirlenmesi

Antibakteriyel etkiye sahip olan antibiyotiklerin ve bileşiklerin bu etkisi iki farklı şekilde görülmektedir. “Bakteriyostatik etki” bakterilerin çoğalmasını durduran, “bakterisidal etki” ise bakterilerin ölümüne neden olan etkiyi ifade eder [140]. Bor bileşiklerinin, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı bakterisidal aktivite ve antibiyofilm özellikleri olduğu bilinmektedir. Bakterisidal etki mekanizmaları tam anlaşılmamış olmasına rağmen özgün olmayan bir etkiye sahip oldukları düşünülmektedir. Bor bileşikleri, bakterilerin hücre duvarında bulunan fosfolipitler, liposakkaritler ve glikoproteinler ile etkileşerek işlevsel özelliklerinin değişmesine neden olur. Ayrıca, özellikle borik asit, mikrobiyal membranı geçerek metabolik yollarda görev alan enzimleri inhibe edebilir. Bor içeren titanyum oksit kaplı yüzeylerin *S.aureus* suşuna karşı bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir [141]. Nanokillerin sahip olduğu antibakteriyel etkinin mekanizması da tam olarak tespit edilmemiştir. Ancak, alümina tabakasının pozitif yüklü olmasının bakterilerin hücre duvarına zarar verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, bakterilerin hücre duvarında bulunan liposakkaritler ve nanokiller arasındaki elektron değişimi, liposakkaritlerin fosforil gruplarının ayrılmasına neden olur [142].

Farklı oranlarda MMT ve B-MMT içeren PLA bazlı fiber matrikslerin antibakteriyel özellikleri *Escherichia coli* (gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) model bakterileri kullanılarak optik yoğunluk metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, PLA bazlı fiber matriksler bakteri içeren sıvı besi yerinde inkübe edilmiş ve belirli saatlerde alınan örnekler aynı başlangıç konsantrasyonuna sahip bakteri popülasyonu ile karşılaştırılarak inhibisyon varlığı incelenmiştir. Yirmi dört saat boyunca gerçekleştirilen çalışmalarda, belirgin bir inhibisyon görülmemiştir (Şekil 4.25). Sadece PLA/10 B-MMT grubunda *S.aureus* için optik yoğunluk 9. saatten itibaren $0,85 \pm 0,04$ değeri ile görece sabit kalmıştır. PLA/10 B-MMT grubunda görülen bu inhibisyon, fiber matriksin antibakteriyel etkisinin bakterisidal bir etki olduğunu göstermiştir. Gruplar arasında değişen oranlarda bulunan MMT’lerin fiber matrikslerin antibakteriyel özelliğinde bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Fiber matrikslerin yapısında bulunan MMT’ler, fiberlerin içerisinde bulunmaktadır. MMT’nin doğrudan etkisinin görülebilmesi için ise bakterilerin doğrudan MMT’ler ile temas halinde olması gerekmektedir. Ayrıca, karşılaştırılabilir etkinin, degradasyona bağlı olarak MMT ve borun daha çok ortaya çıkmasıyla, zaman içerisinde gerçekleşebileceği ve optik yoğunluk testindeki sürenin bu etkinin görülmesi için yeterli olmadığı yorumu yapılmıştır.

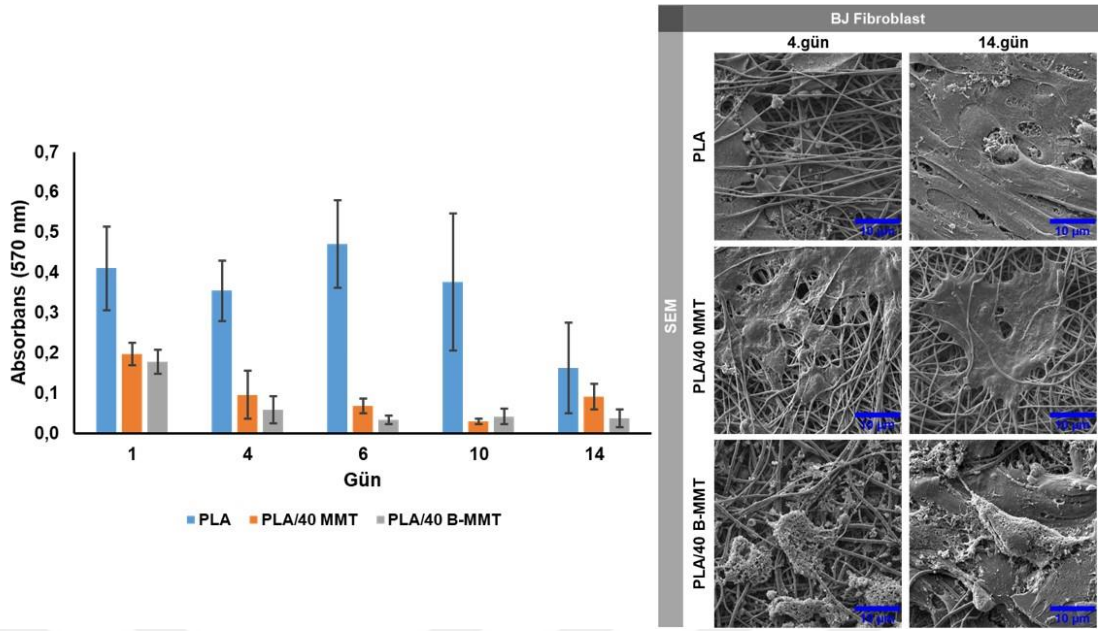


Şekil 4.25. *E.coli* ve *S.aureus* bakteri suşlarına karşı PLA fiber matrislerin antibakteriyel aktivite grafikleri (n=3).

4.4.3. HS2 ve İDF Hücrelerinin PLA Bazlı Fiber Matrisler Üzerindeki Davranışlarının incelenmesi

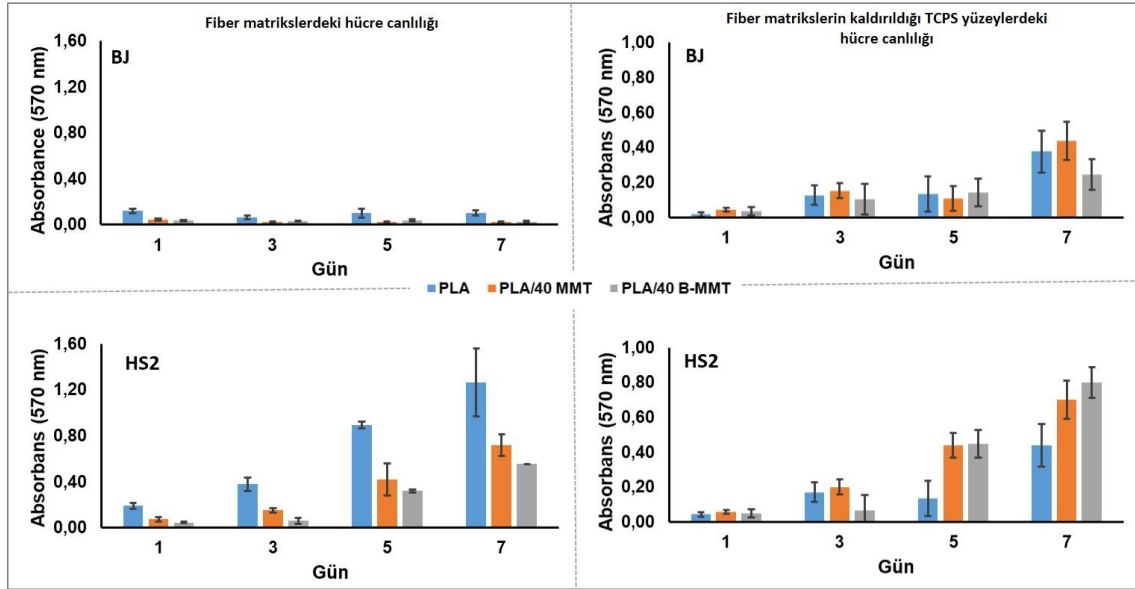
4.4.3.1. Hücre Kültürü Ön Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, PLA fiber matrislerdeki B-MMT'nin, yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin tespit edilebileceği en iyi hücre kültür koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak, BJ hücrelerinin görece yüksek MMT ve B-MMT içeren PLA fiber matrisler ile etkileşiminin belirlenmesine yönelik çalışma yapılmıştır. PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislere ekilen BJ hücrelerinin (1×10^5 hücre/cm²) metabolik aktiviteleri 14 gün süreyle takip edilmiş ve belirlenen günlerde SEM görüntüleri alınmıştır. Kültürün ilk gününden itibaren, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislerdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösteren absorbans değerleri oldukça düşük seyretmiştir. Bu sonuçlar, kültürün 4 ve 14. günlerinde SEM görüntüleri ile doğrulanmıştır (Şekil 4.26). Yüzde %40 oranında kil katkısının çok yüksek yüzey pürüzlülüğüne neden olması nedeniyle hücrelerin tutunma ve yayılma davranışlarını etkilemiş olabilecekleri yorumu yapılmıştır. Fiber matrislerdeki bor miktarları, besi ortamına doğrudan eklenen bor miktarlarının (tez çalışması kapsamında yapılan ilk hücre kültür çalışmalarındaki) altındadır. Bu nedenle, bor kaynaklı bir toksisiteden bahsetmek mümkün değildir. PLA fiber matrislerdeki hücrelerin çoğalma profili incelendiğinde, her ne kadar diğer gruplardan daha iyi olduğu görülse de kültürün ilerleyen günlerde metabolik aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, fiber matrislere hücre ekim yoğunluğunun ve hücrelerin sağlıklı olup olmadıklarının değerlendirildiği yeni bir çalışmanın yapılmasını gerektirmiştir.



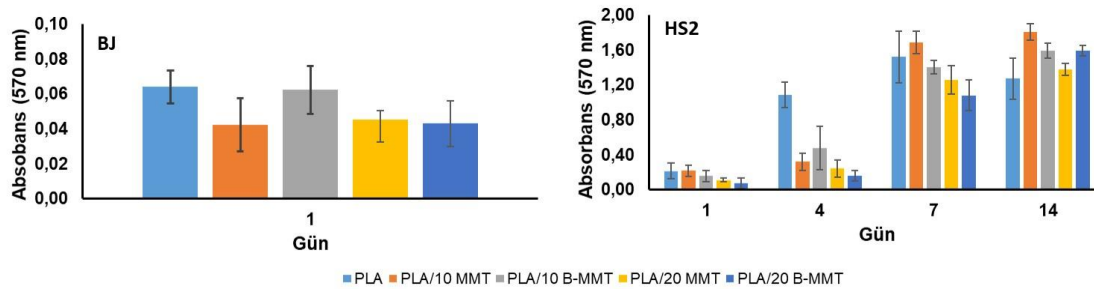
Şekil 4.26. PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislere ekilen BJ hücrelerinin MTT analizi ve SEM görüntüleri.

PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislere ekilen BJ ve HS2 hücrelerinin metabolik aktiviteleri 7 günlük kültür süresince MTT analizi ile takip edilmiştir. Hücrelerin ekim sayısı, bir önceki çalışmadan daha düşük tutulmuştur (2×10^4 hücre/cm²). Hücrelerin sağlıklı olup olmadıkları, fiber matrislerin kültüre edildiği TCPS yüzeylere tutunan hücrelerin takibi ile yapılmıştır. Şekil 4.27’de verilen MTT grafikleri incelendiğinde, fiber matrislere ekilen BJ hücrelerinin metabolik aktivitelerinin, HS2 hücrelerinden oldukça düşük olduğu saptanmıştır. HS2 hücrelerinin PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislerdeki metabolik aktiviteleri PLA grubundan daha düşük olmuştur. PLA ile kıyaslandığında, her iki hücrenin proliferasyonuna olumsuz etkileri olan PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT grupları bundan sonraki hücre kültürleri için çalışma dışı bırakılmıştır. Fiber matrislerin kaldırıldığı yüzeylere tutunan hücrelerin MTT analizleri incelendiğinde, BJ hücrelerinin 7 günlük kültür boyunca çoğaldıkları ancak metabolik aktivitelerinin düşük olduğu sonucu çıkarılmıştır. HS2 hücreleri ise çoğalmaya devam etmişlerdir.



Şekil 4.27. PLA, PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislerdeki ve fiber matrislerin kaldırıldığı TCPS yüzeylerdeki BJ ve HS2 hücrelerinin MTT analizi.

PLA/40 MMT ve PLA/40 B-MMT fiber matrislerin hücre çoğalmasına olumsuz etkileri tespit edildikten sonra, daha düşük oranlarda MMT ve B-MMT içeren fiber matrislere BJ ve HS2 hücre ekimi (2×10^4 hücre/cm²) yapılarak metabolik aktiviteleri takip edilmiştir (Şekil 4.28). BJ hücrelerinin ekildiği fiber matrislerde kültürün 3. günü tespit edilen kontaminasyon nedeniyle çalışma sonlandırılmıştır. HS2 hücrelerinde özellikle kültürün 14. gününde MMT ve B-MMT katkılı fiber matrislerde hücre üremesi PLA'ya göre daha yüksek bulunmuştur.

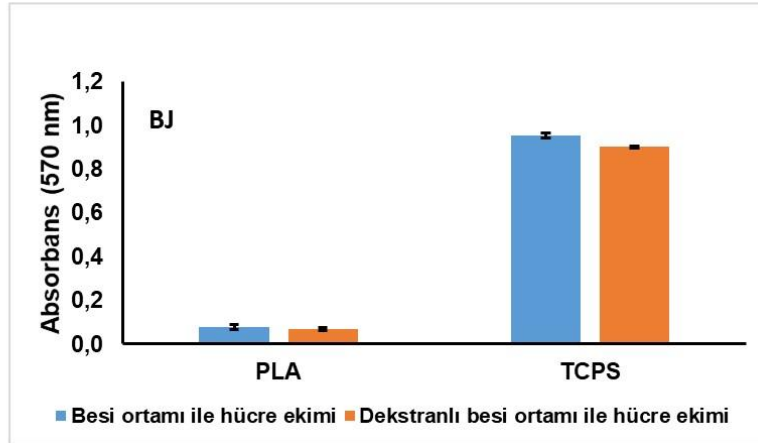
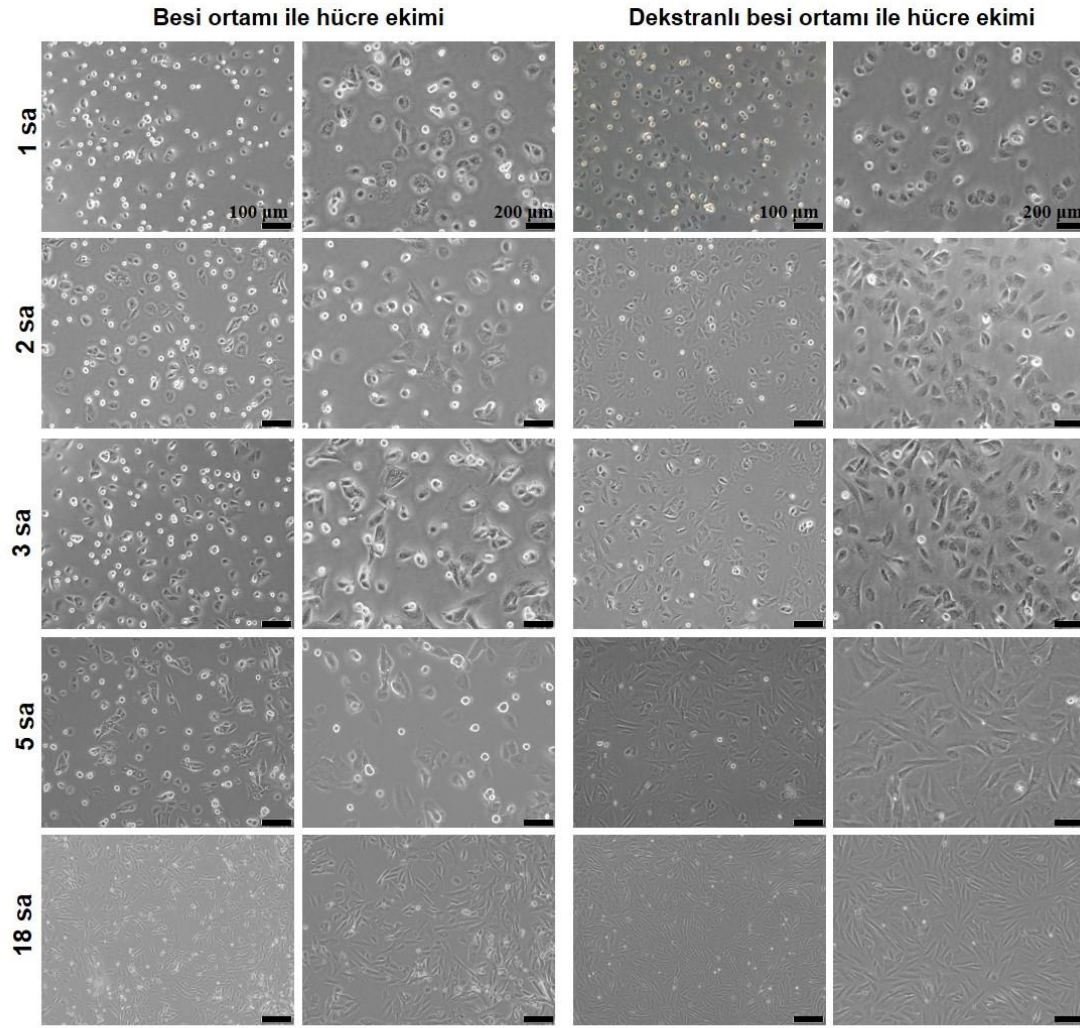


Şekil 4.28. PLA, PLA/10 MMT, PLA/10 B-MMT, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT fiber matrislerde kültüre edilen BJ ve HS2 hücrelerinin MTT analizi.

Hücre kültürü ön çalışmalarının bu aşamasına kadar elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, hücre ekim veriminin iyileştirilmesi gerektiği sonucu çıkarılmıştır. Ortalama 80 µm kalınlığa sahip fiber matrikslere, 20 µL besi ortamı ile hücre ekimi yapıldığında hücre süspansiyonunun bir kısmının kolaylıkla TCPS yüzeylere yayıldığı görülmüştür. Bu amaçla, ekim aşamasında hücrelerin besi ortamına %10 (w/v) dekstran eklenmesine karar verilmiştir. Dekstranlı besi ortamının BJ hücrelerinin morfolojisine ve tutunma sürelerine olan etkisi, öncelikle TCPS yüzeylerde optik mikroskop ile 18 sa süreyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.29). Dekstranlı ortam ile ekilen BJ hücrelerinin 2 sa sonunda elde edilen görüntüler incelendiğinde, yüzeye tutunan ve yayılan daha çok hücre olduğu tespit edilmiştir. Dekstran içermeyen besi ortamı ile ekilen grubun 3. sa görüntülerinde hala küresel morfolojide hücreler bulunurken, dekstranla ekilen hücrelerin yayılma davranışı gösterdikleri açıkça görülmektedir. Kültürün 5. sa görüntülerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, dekstran içeren ve içermeyen besi ortamı ile TCPS yüzeylere ve PLA fiber matrikslere ekilen BJ hücrelerinin 24 sa sonundaki mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.29). Dekstran ile hücre ekiminin 24 sa sonunda belirgin bir fark yaratmadığı tespit edilmesine rağmen, hücre tutunmasını homojen ve hızlı olacak şekilde desteklediği sonucuna varılmıştır.

Hücre ekiminin verimi, biyomalzeme-hücre etkileşiminin değerlendirildiği çalışmaların sonuçlarını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Statik hücre ekiminde karşılaşılan problemler arasında hücre tutunmasının zayıflığı yer almaktadır. Bununla birlikte ekim sırasında hücrelerin aglomere olması ve hücrelerin homojen olmayan şekilde dağılması hücre kültürünün başarısını etkilemektedir. Besi ortamlarına eklenen %10 (w/v) dekstranın, vizkosite ve yoğunluğu artırarak mezenkimal kök hücrelerinin ekim verimini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [143].

Hücre kültürü ön çalışmalarının sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmalara dekstran içeren besi ortamı ile $2-4 \times 10^4$ hücre/cm² yoğunlukta %40 (w/w)'ın altında MMT ve B-MTT içeren gruplarla devam edilmesine karar verilmiştir. BJ hücrelerinin fiber matrikslerdeki absorban değerlerinin genel olarak düşük seviyelerde olması nedeniyle, farklı bir insan dermal fibroblast hücresinin (İDF) (CC-2511, Lonza) temini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.29. Yüzde 10 (w/v) dekstran içeren besi ortamının BJ hücrelerinin tutunma davranışına olan etkisinin optik mikroskop ve MTT analizi ile değerlendirilmesi.

4.4.3.2. Hücre Kültüründe Yapılan Analizler

MTT Analizi

PLA bazlı fiber matrislere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analizinin sonuçları Şekil 4.30'da verilmiştir. PLA fiber matrisin 1. gün hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir. HS2'lerle yapılan kültürün MTT sonuçları incelendiğinde, tüm gruplarda hücre canlılığının, kültürün 14. gününe kadar arttığı gözlenmiştir. On dördüncü günden 21. güne gelindiğinde hücre canlılığı neredeyse sabit kalmıştır. Gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde, en yüksek hücre canlılığının genel olarak PLA fiber matrisler üzerinde olduğu belirlenmiştir. Kültürün 7. günü PLA/10 MMT grubunun da hücre canlılığını diğer gruplara göre daha fazla arttırdığı görülmektedir. Ayrıca kültürün son günü, PLA/20 B-MMT grubunda hücre canlılığı diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır. MMT ve B-MMT katkısının HS2 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğu düşünülmemektedir.

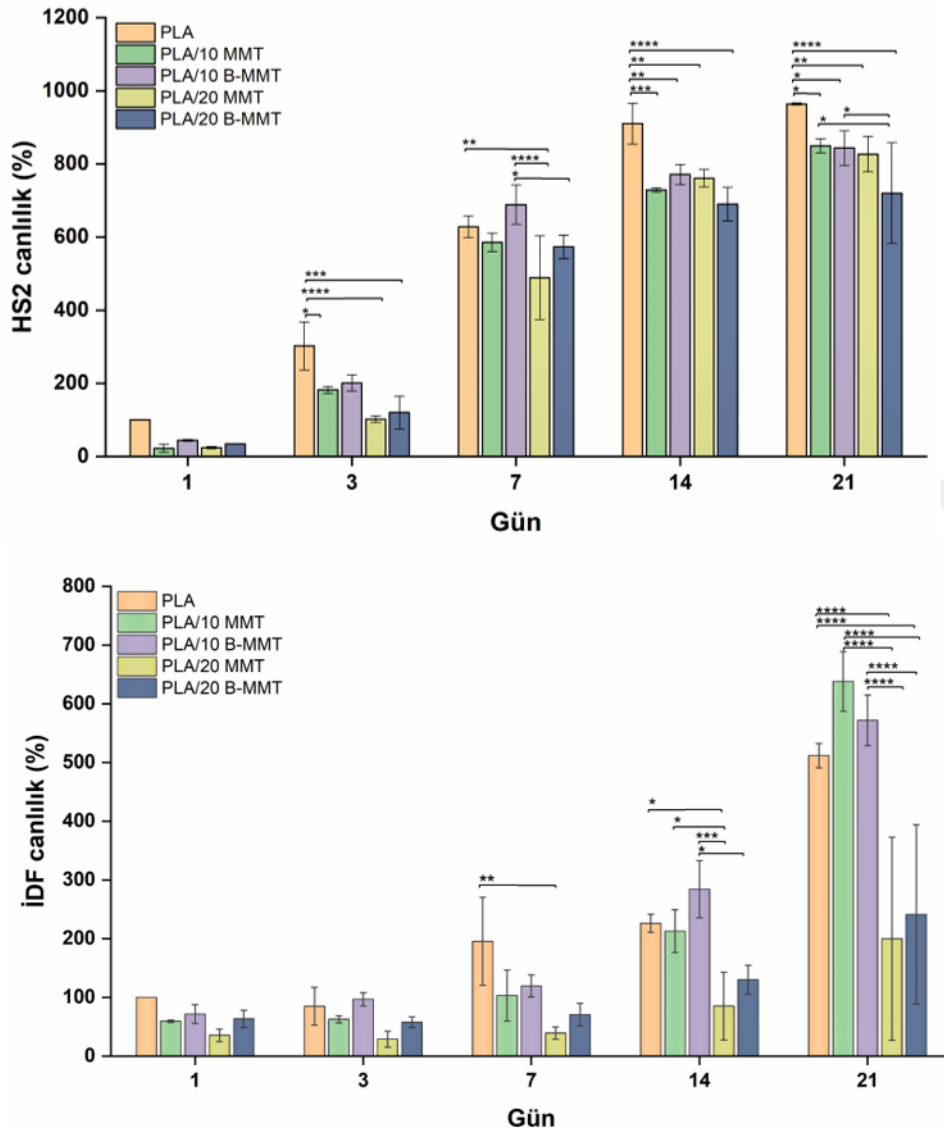
İDF hücreleri ile yapılan kültürün MTT sonuçları incelendiğinde ise tüm gruplarda hücre canlılığının 3. güne kadar neredeyse sabit kaldığı görülmüştür. Kültürün 7. günü PLA grubundaki hücre canlılığının PLA/20 MMT grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede artmış ($p \leq 0,01$) olduğu görülmüştür. Diğer yandan kültürün 14. gününde PLA/10 B-MMT grubunda hücre canlılığında önemli bir artış belirlenmiştir. Kültürün 21. gününde bu etki devam etmiş ve PLA/10 MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarında hücre proliferasyonu diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.

SEM Analizi

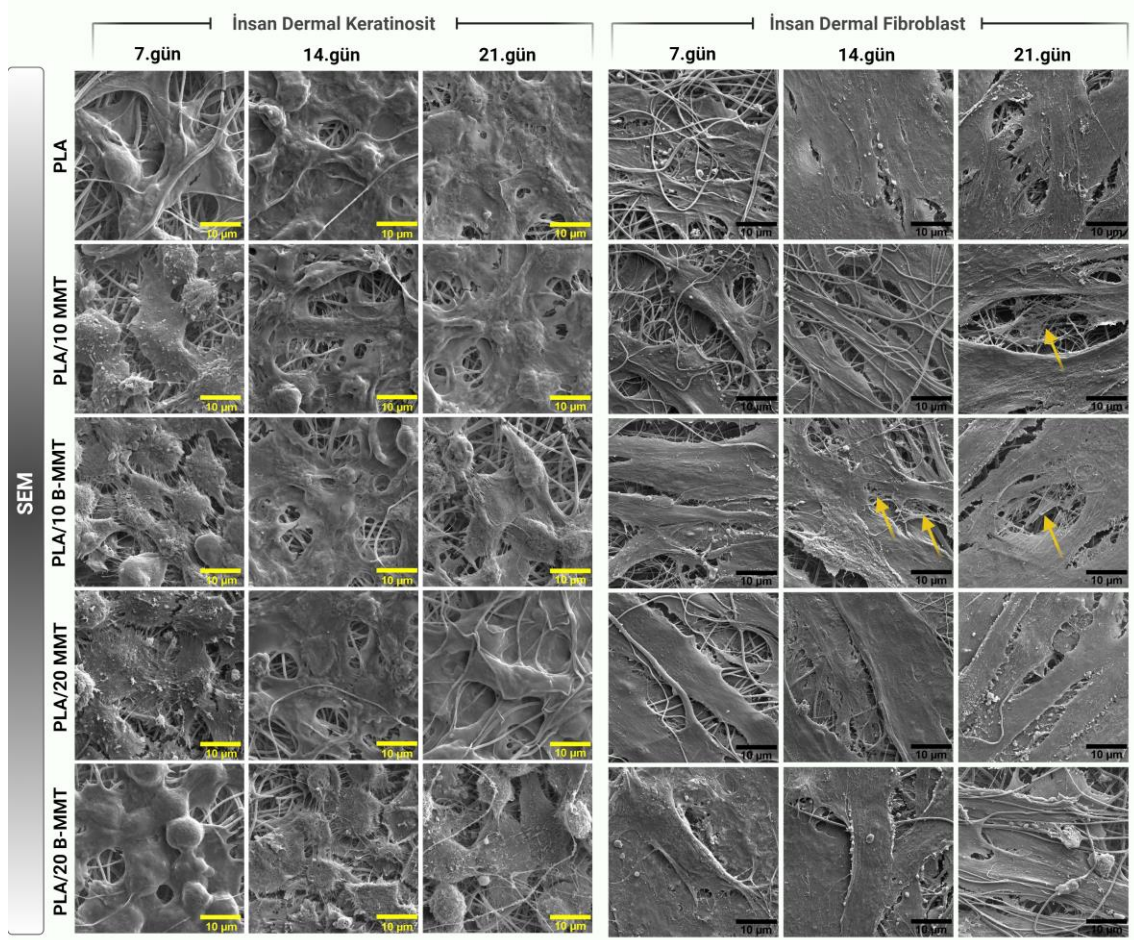
PLA fiber bazlı fiber matrislerin HS2 ve İDF hücrelerinin morfolojilerine etkisi kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde SEM analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.31).

HS2 hücrelerinin fiber matrisler üzerindeki SEM görüntüleri incelendiğinde, MTT sonuçları ile uyumlu olarak hücre sayısının kültürün ilerleyen günlerinde arttığı görülmektedir. Başlangıçta fiberlerin üzerinde tek tek görülen hücreler, kültürün ilerleyen günlerinde yerini yoğun bir ECM varlığına bırakmıştır. Kültürün 7. gününde, özellikle PLA/10 B-MMT örnekleri üzerinde keratinosit hücrelerine özgü "kaldırım taşı" morfolojisi daha belirgindir. Ayrıca MMT ve B-MMT katkılı fiber matrislerdeki hücrelerde, yoğun metabolik aktiviteyi işaret eden yüzey pürüzlülüğünün arttığı görülmektedir.

İDF hücrelerinin fiber matrisler üzerindeki SEM görüntüleri incelendiğinde de benzer şekilde hücre yoğunluğunun kültür süresi ile doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Özellikle, PLA/10 B-MMT, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarında hücresel içeriğin diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve hücrelerin tüm yüzeyi kapladığı görülmektedir. Bu gruplarda hücrelerin dermal fibroblastlara özgü bir morfoloji sergileyerek, neredeyse hizalanmış bir şekilde bir araya gelip hücre demetleri oluşturdukları gözlenmiştir. Ayrıca, PLA/10 MMT ve PLA/10 B-MMT grubunda hücrelerin sentezledikleri yoğun ECM yapısında kollajen fiberler ayırt edilmektedir.



Şekil 4.30. PLA bazlı fiber matrislere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin 21 günlük kültür boyunca mitokondriyal aktivitelerini gösteren MTT analiz sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).



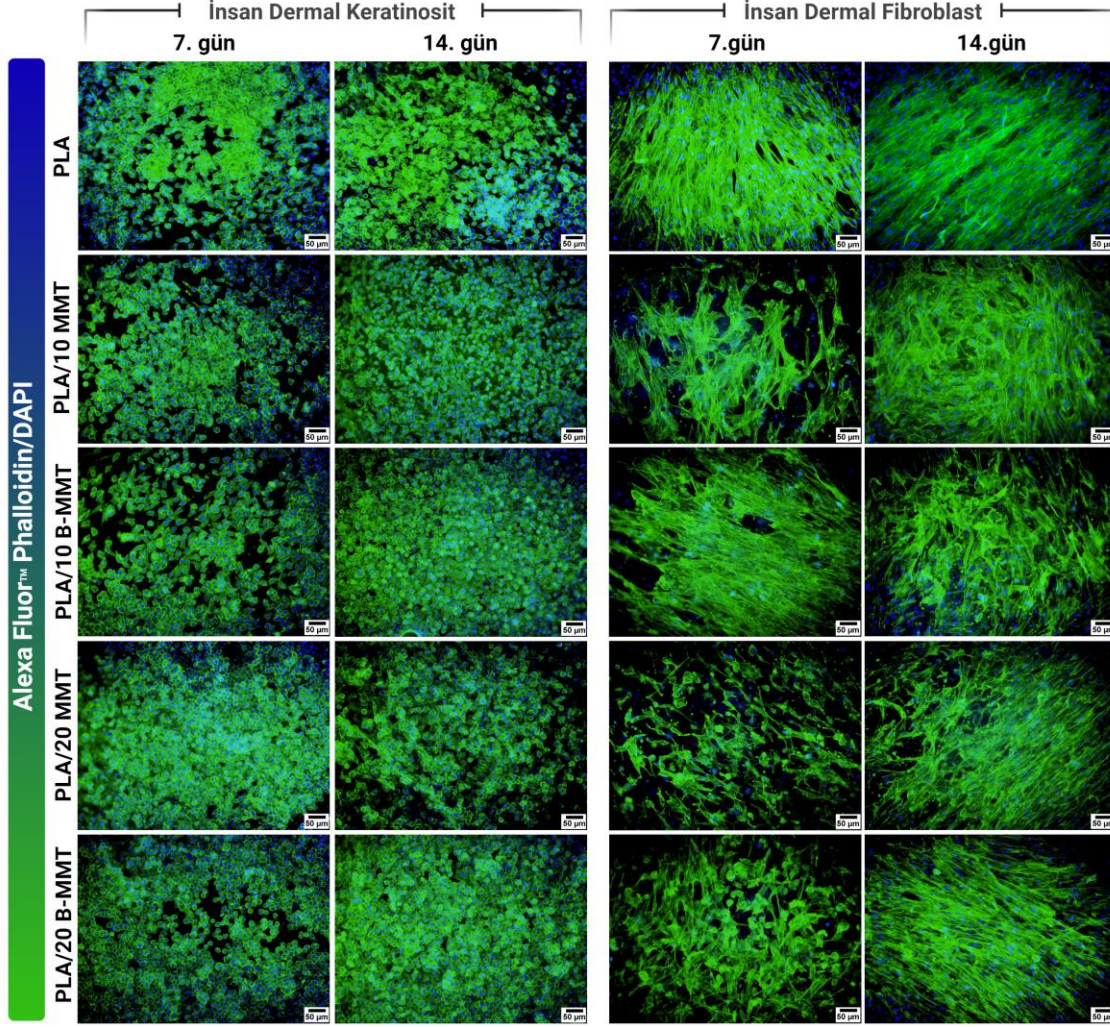
Şekil 4.31. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde SEM analiz görüntüleri.

Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI Boyama

PLA bazlı fiber matriksler üzerinde kültüre edilen HS2 ve İDF hücrelerinin hücre iskeleti ve çekirdek morfolojileri kültürün 7 ve 14. günlerinde Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyaması ile incelenmiştir (Şekil 4.32). Alexa Fluor® 488 Phalloidin konjuge anti F-aktin boyası hücrelerin aktin filamentlerinin yeşil renkte görünmesini sağlarken, DAPI boyası hücre çekirdeğine bağlanarak çekirdeklerin mavi renkte ışıma yapmasını sağlamaktadır.

HS2 hücrelerinin F-aktin/çekirdek boyamaları incelendiğinde tüm gruplarda hücrelerin keratinositlere özgü poligonal morfoloji sergiledikleri ve başlangıçta gruplar halinde çoğalan hücrelerin daha sonra tüm yüzeyi kapladıkları görülmektedir. Özellikle B-MMT katkılı fiber matrikslerde kültüre edilen HS2 hücrelerinin 14. günde yoğun bir F-aktin iskeleti boyanması gösterdikleri dikkati çekmiştir.

PLA bazlı fiber matrikslerde kültüre edilen İDF hücreleri ise büyük, yassı ve uzamış iğsi morfolojilerini tüm gruplarda sergilemiştir. Hücrelerin SEM görüntüleri ile benzer şekilde belirli bir yönde düzenlenmeye başladıkları görülmektedir. Kültürün 14. gününde, özellikle PLA/20 B-MMT grubunda hücre çekirdeklerinin çok daha belirgin olduğu ve hücre iskeletinin daha yoğun olduğu belirlenmiştir.

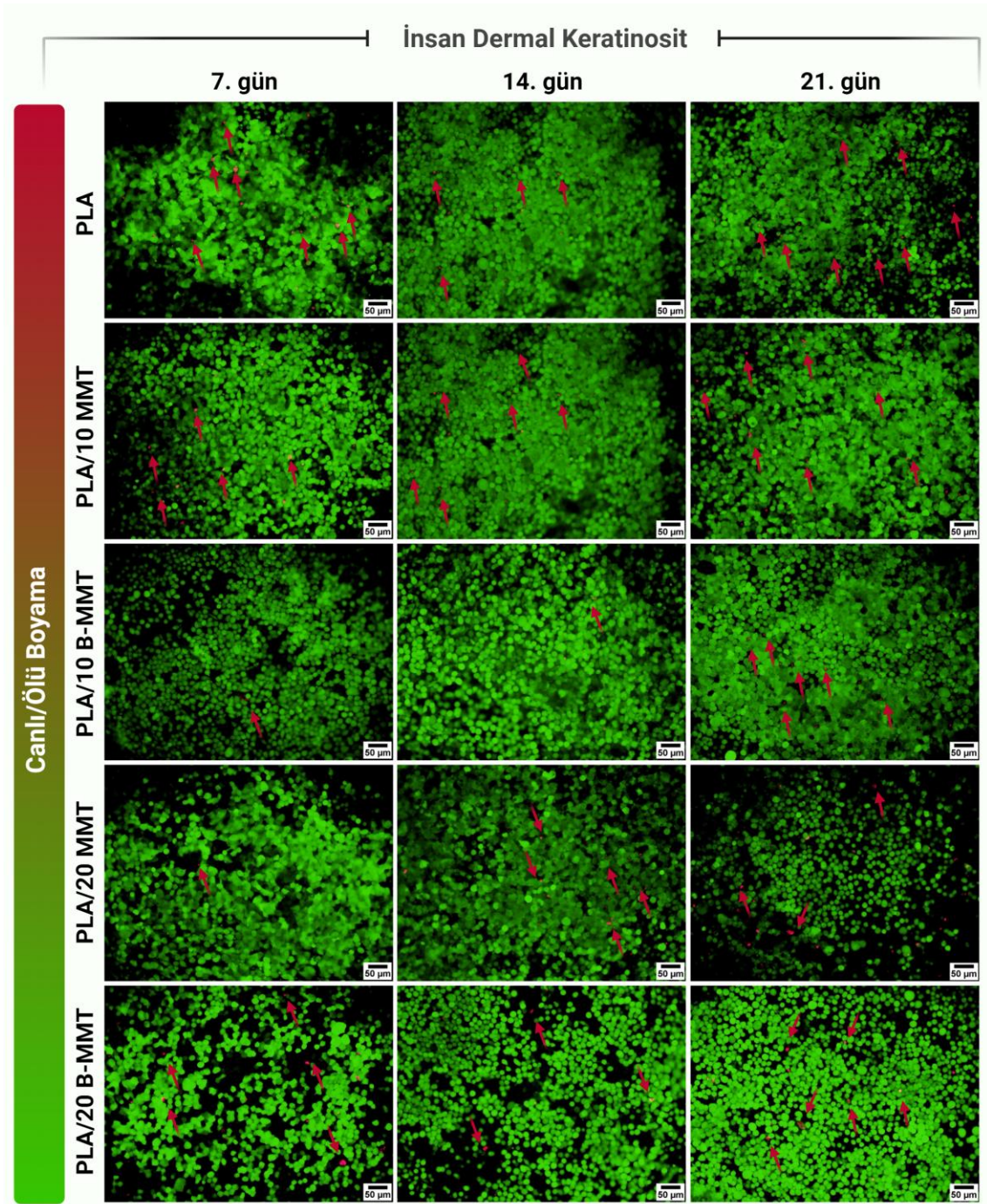


Şekil 4.32. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7. ve 14. gününde Alexa Fluor[®] Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).

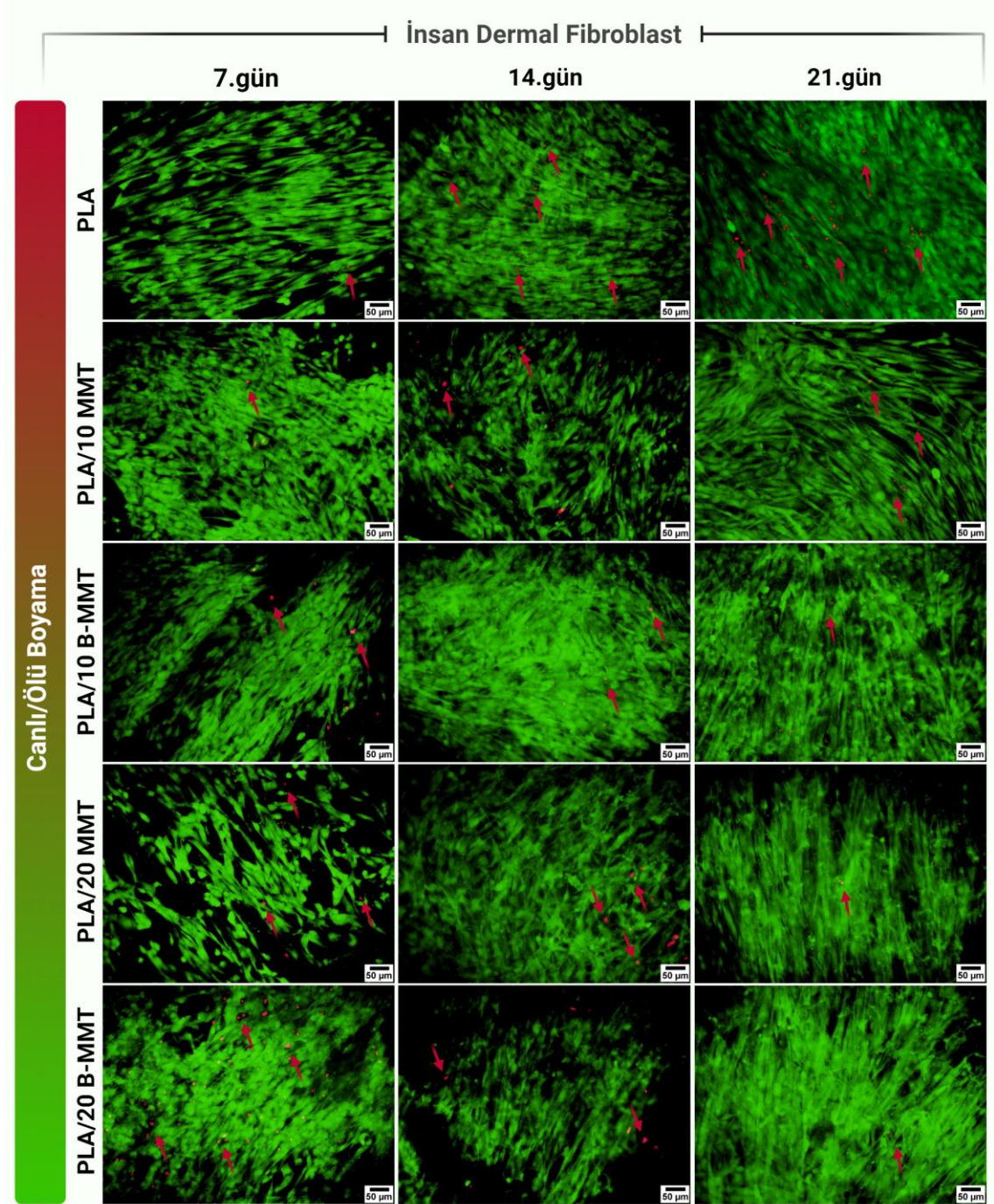
Canlı/Ölü Boyama

Canlı/ölü boyamada kullanılan boyalardan kalsein AM, canlı hücrelerin membranından sitoplazmaya geçerek kalseine indirgenmekte ve yeşil renkte floresan ışıma yapmaktadır. Etidyum homodimer-1 ise canlı hücre membranından geçemez ve ölü hücrelerin hasar gören membranlarından geçerek doğrudan nükleik asitlere bağlanıp kırmızı renkte floresan ışıma yapar. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin canlılıklarının belirlenmesi amacıyla kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. günlerinde canlı/ölü boyama yapılmış ve floresan mikroskop görüntüleri sırasıyla, Şekil 4.33 ve 4.34'te sunulmuştur.

Canlı/ölü boyama sonuçları incelendiğinde, her iki hücre için de tüm gruplarda canlı hücre yoğunluğunun oldukça fazla olduğu görülmektedir. Ölü hücre sayısının çok az olması PLA bazlı fiber matrikslerin hücre canlılığını oldukça etkin bir şekilde desteklediğini göstermektedir. Ayrıca MMT ve B-MMT katkısının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı belirlenmiştir. Hücre canlılığı her iki hücre için de kültürün ilerleyen günlerinde artmıştır. Aynı zamanda, kültürün son günü özellikle İDF hücreleri için PLA grubunda daha fazla ölü hücre görülürken MMT ve B-MMT katkılı fiber matrikslerde daha az ölü hücre olduğu görülmüştür.



Şekil 4.33. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır).

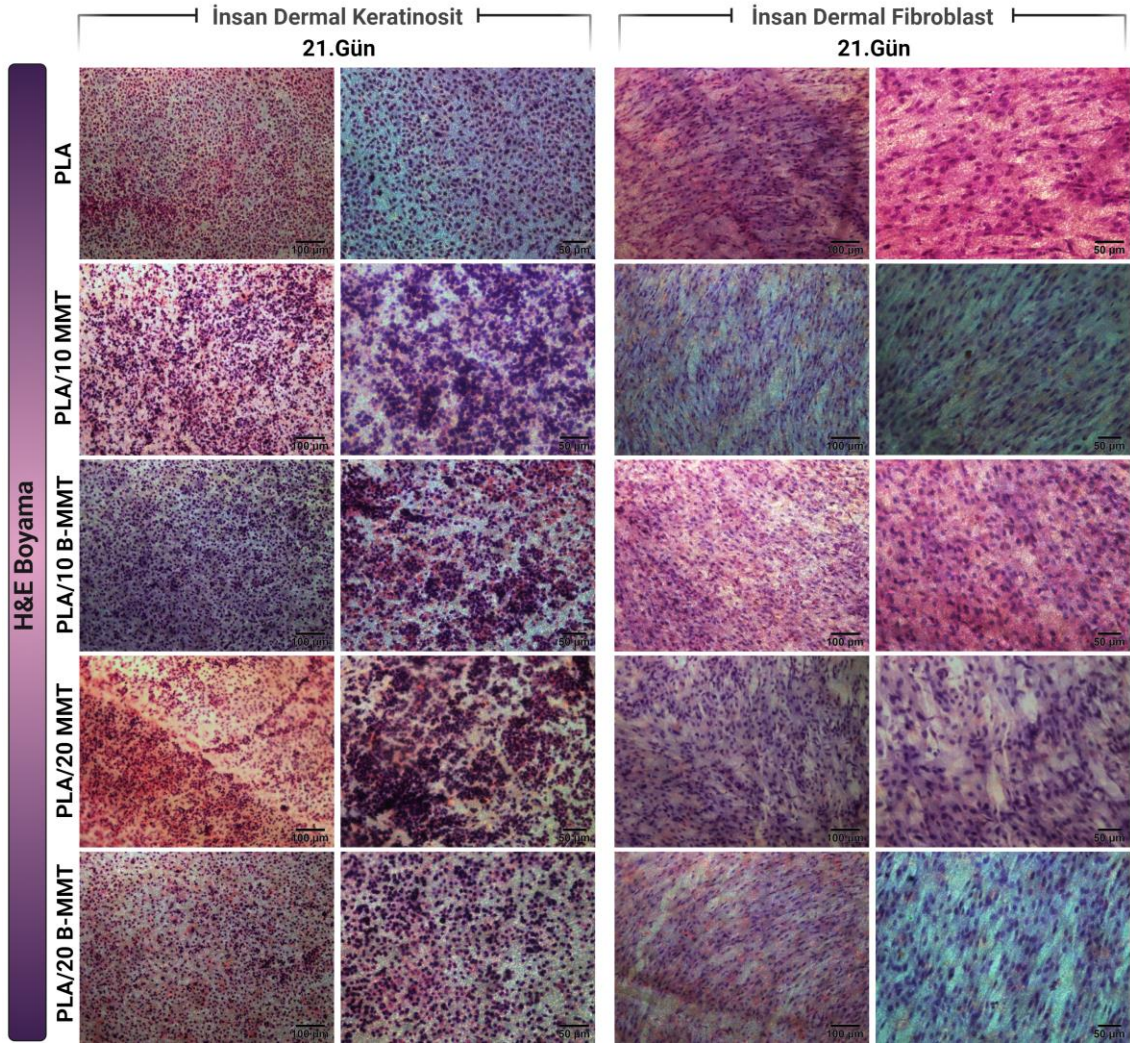


Şekil 4.34. PLA bazlı fiber matrislere ekilen İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 7., 14. ve 21. gününde canlı/ölü boyama görüntüleri (canlı hücreler yeşil; ölü hücreler kırmızı renkle boyanmıştır).

Hematoksilen & Eozin Boyama

Hematoksilen boyası hücre çekirdeğini morumsu mavi renkte boyarken, eozin, ECM ve sitoplazmayı pembe renkte boyamaktadır. Histolojik analizler kapsamında yapılan H&E boyamaları incelendiğinde, diğer analizler ile uyumlu olarak, her iki hücrenin de fiber

matriksler üzerinde oldukça iyi bir şekilde çoğaldıkları ve yoğun bir şekilde ECM sentezledikleri görülmektedir (Şekil 4.35). PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2'lerin boyama görüntüleri incelendiğinde, özellikle PLA/10 MMT, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarında keratinositlere özgü hücre gruplarının oldukça yoğun olduğu görülmüştür. İDF hücreleri ise düzensiz fiber matriksler üzerinde bulunmalarına rağmen yönelerek çoğalma özelliklerini korumuşlardır.

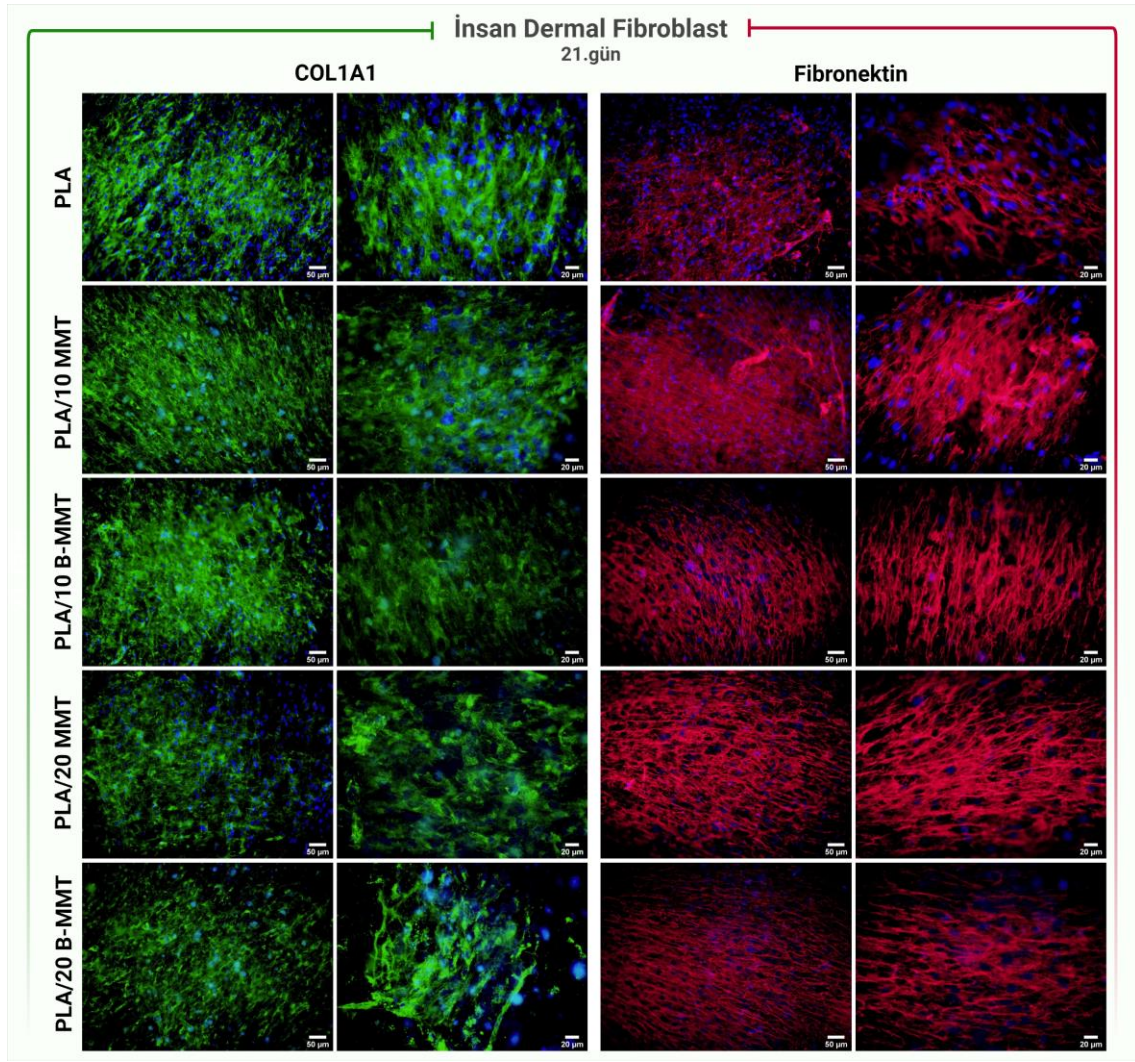


Şekil 4.35. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücrelerinin kültürasyonlarının 21. gününde Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri (Hematoksilen boyası hücre çekirdeğini morumsu mavi renkte boyarken, eozin, ECM ve sitoplazmayı pembe renkte boyamaktadır).

Immunohistokimyasal Boyama

PLA bazlı fiber matriksler üzerinde kültüre edilen İDF hücreleri tarafından sentezlenen kollajen1A1 (COL1A1) ve fibronektin yapılarını tespit etmek amacıyla immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır (Şekil 4.36). Deri dokusunda %80'ini COL1A1 tipi kollajen oluşturmaktadır. Yara iyileşmesinin proliferasyon basamağında ilk olarak granülasyon dokusu görülür. Bu doku tıpkı bir doku iskelesi gibi davranarak kanamanın durmasına ve yara yatağının ihtiyaç duyduğu mekanik desteğin oluşmasına destek olur. Bu aşamada fibroblast hücreleri tarafından yoğun bir pro-kollajen sentezi olmaktadır. Yara iyileşmesi sırasında skar oluşumuna neden olabilecek fazla kollajen ise MMP'ler (matriks metalo-proteinazlar) tarafından degrade edilmektedir. Granülasyon dokusu zamanla yerini zengin bir fibronektin ve yeniden şekillenme basamağında olgunlaşacak olan pro-kollajene bırakır [144].

Tüm gruplarda kollajen varlığını işaret eden bir boyama görülmekle birlikte, özellikle PLA/10 MMT ve PLA/10 B-MMT gruplarında çok daha yoğun bir kollajen içeriğine rastlanmıştır. Bu sonuçlar, SEM görüntülerinde belirlenen kollajen fiberleri doğrular niteliktedir. Ayrıca, PLA/10 MMT grubunda fibronektin yoğunluğunun diğer gruplara kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kollajen ve fibronektin sentezi hücrelerin aktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.36. PLA bazlı fiber matrikslere ekilen İDF hücreleri tarafından sentezlenen COL1A1 ve FN yapılarının kültürasyonların 21. gününde immunohistokimyasal boyamalarla gösterilmesi.

RT-PCR Analizi

Yara iyileşme sürecinde hücre davranışları, çeşitli etkiler ile değişen gen ifadeleri tarafından belirlenmektedir. Yara iyileşmesinin proliferasyon basamağında, yara kapanması, ECM'nin sentezi ve damarlanmanın gerçekleşmesi için keratinosit hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve endotel hücreler büyük bir uyum içinde iş birliği yaparlar. Yara kapanması için çoğalma özelliği bulunan keratinosit hücreleri (bazal tabakadaki) yara kenarlarından birbirlerine doğru göç ederler. Buluşmalarının ardından farklılaşmaya başlayarak epiderminin üst tabakalarını oluştururlar. Bazal tabakadan yukarıya doğru gidildikçe keratinosit hücreleri terminal diferensiyona yaklaşırlar. Fibroblastlar ise COL1A1 ve FN gibi ECM elamanlarının sentezinden sorumludur [144].

Keratin-14 (*KRT14*) epidermis tabakasının en altında bulunan çoğalma kapasitesi yüksek bazal keratinositlerde ifade edilir. Sağlıklı deri dokusunda sadece bazal keratinositlerde bulunurken yara dokusunda da yaralanmanın ilk haftasından sonra sonra suprabazal keratinositlerde de tespit edilmiştir [145]. HS2 hücrelerinin PLA fiber matrikslerdeki *KRT14* ifadeleri incelendiğinde, kültürün 7. gününde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.37). Kültürün 21. gününde ise gen ifadeleri tüm gruplarda 8 kat ve daha fazla olacak şekilde artmıştır. PLA/10 B-MMT grubundaki *KRT14* gen ifadesi PLA/10 MMT grubuna (*TP63*) ve PLA/20 B-MMT grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p \leq 0,0001$). PLA/20 B-MMT grubunda ise gen ifadesi neredeyse tüm gruplardan (PLA/10 MMT hariç) anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p \leq 0,001$ ve daha üstü). Bu durumda keratinosit hücrelerinin proliferatif özelliklerini en iyi şekilde destekleyen fiber matriksin PLA/10 B-MMT olduğu yorumu yapılmıştır

Tümör protein 63 (*TP63*) keratinositlerin farklılaşmasında rol oynamaktadır. *TP63* gen ifadesi epidermin tüm tabakalarındaki keratinositlerde olsa da bazaldan yukarıya doğru gidildikçe ifadesi artmaktadır. Kısacası, *TP63* gen ifadesinin artması keratinositlerin farklılaştığını göstermektedir [146]. Şekil 4.37’de tüm gruplarda gen ifadesinin kültürün ilerleyen zamanlarında *TP63* gen ifadelerinde belirgin değişiklik olmamıştır. Kültürün 21. gününde *KRT14* gen ifadesi en düşük olan PLA/20 B-MMT grubunda, yine aynı günde diğer gruplara göre daha yüksek *TP63* ifadesi tespit edilmiştir. Bu sonuçlar farklılaşmanın tespitinde birbirini desteklemektedir. Kültürün hem 7 hem de 21. gününde *TP63* gen ifadesi PLA/10 B-MMT grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (sırasıyla $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$).

Hücre dışı matriks elemanlarından biri olan laminin-5 (*LAMA5*) içerdiği RGD sekansı nedeniyle hücre tutunmasında önemli rol oynayan bir glikoproteindir. Keratinositler göç ederken aynı zamanda *LAMA5* sentezleyerek oluşacak yeni epidermal dokunun bazal membranını oluşturmak için hazırlık yaparlar. Dermal fibroblastlar da *LAMA5* sentezi ile yara iyileşmesine katkıda bulunurlar [147]. Şekil 4.37’de HS2 hücrelerinin *LAMA5* gen ifadesi düzeyleri verilmiştir. PLA bazlı fiber matriklere ekilen HS2 hücrelerinin gen ifadeleri kültürün ilerleyen günlerinde 2-3 kat artış göstermiştir. Bununla birlikte, kültürün 21. gününde gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, PLA10/B-MMT grubundaki gen ifadesinin, PLA ($p \leq 0,01$), PLA/10 MMT ($p \leq 0,05$) ve PLA ve PLA/20 B-MMT ($p \leq 0,05$) grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. Şekil 4.38’de ise İDF hücrelerinin *LAMA5* gen ifadeleri gösterilmektedir. Kültürün ilerleyen günlerinde

tüm gruplarda *LAMA5* gen ifadesi ya sabit kalmış ya da bir miktar düşmüştür. Ancak bu düşüş bir kattan daha azdır. İDF hücrelerinde PLA/20 B-MMT grubundaki gen ifadeleri, PLA ($p \leq 0,0001$), PLA10/ MMT ($p \leq 0,05$) ve PLA/10 B-MMT ($p \leq 0,01$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Kollajen 1A1 (*COL1A*) deri dermal dokusunda ECM'nin önemli bileşenlerinden biridir ve üretiminden fibroblastlar sorumludur [148]. İDF hücrelerinin farklı fiber matriksler üzerindeki *COL1A1* gen ifade düzeyleri Şekil 4.38'te verilmiştir. İlerleyen kültür süresince *COL1A1* gen ifadesi tüm gruplarda artmıştır. PLA grubu dışındaki tüm gruplarda bu artış anlamlı bulunmuştur. Özellikle PLA/10 B-MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarının günler arasında önemli derecede arttığı dikkati çekmektedir (her iki grup için de $p \leq 0,0001$). Kültürün 21. gününde *COL1A1* gen ifadesinin en fazla olduğu grup PLA/10 B-MMT olarak tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$ ve üstü).

Fibronektin (FN) yara iyileşmesinde keratinosit göçü için gerekli olan ve fibroblastlar tarafından sentezlenen bir ECM elemanıdır. Yara oluşumunun ilk dakikalarından itibaren sentezlenmeye başlar [149]. İDF hücrelerinin *FN* gen ifadeleri incelendiğinde, 7. günde gruplar arasında bir anlamlılık bulunmamıştır. Kültür süresince zamana bağlı olarak PLA/20 MMT grubu hariç tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür (bütün gruplarda $p \leq 0,0001$) (Şekil 4.38). PLA fiber matrikslerin MMT ya B-MMT içermesi *FN* ifadesinde anlamlı bir fark yaratmamakla birlikte, bu katkının oranı anlamlı bir gen ifadesi değişikliğine neden olmuştur. PLA/10 MMT grubunda *FN* gen ifadesi, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT grubundan önemli derecede yüksektir ($p \leq 0,0001$). Yine aynı şekilde PLA/10 B-MMT grubundaki gen ifadesi, PLA/20 MMT grubundan önemli ölçüde ($p \leq 0,0001$) yüksek iken, PLA/20 B-MMT grubundan anlamlı bir farkla daha yüksektir ($p \leq 0,01$).

Fibroblast büyüme faktörü 2 (*FGF2*) yara iyileşmesinin erken basamaklarında yüksek düzeyde ifade edilen mitojenik bir faktördür. Yara iyileşmesinin proliferasyon basamağının tamamlanmasının ardından zamanla ifadesi azalır. *FGF2* keratinositler ve fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir [150]. HS2 hücrelerinin fiber matriksler üzerindeki *FGF2* gen ifadeleri Şekil 4.37'de sunulmuştur. Bütün gruplarda gen ifadeleri zamana bağlı olarak anlamlı derecede artmıştır ($p \leq 0,0001$). Kültürün 7. gününde *FGF2* gen ifadesinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. PLA/10 B-MMT, PLA/20 MMT ve PLA/20 B-MMT gruplarının *FGF2* gen ifadesi PLA/10 B-MMT grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmakla birlikte (sırasıyla $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ ve

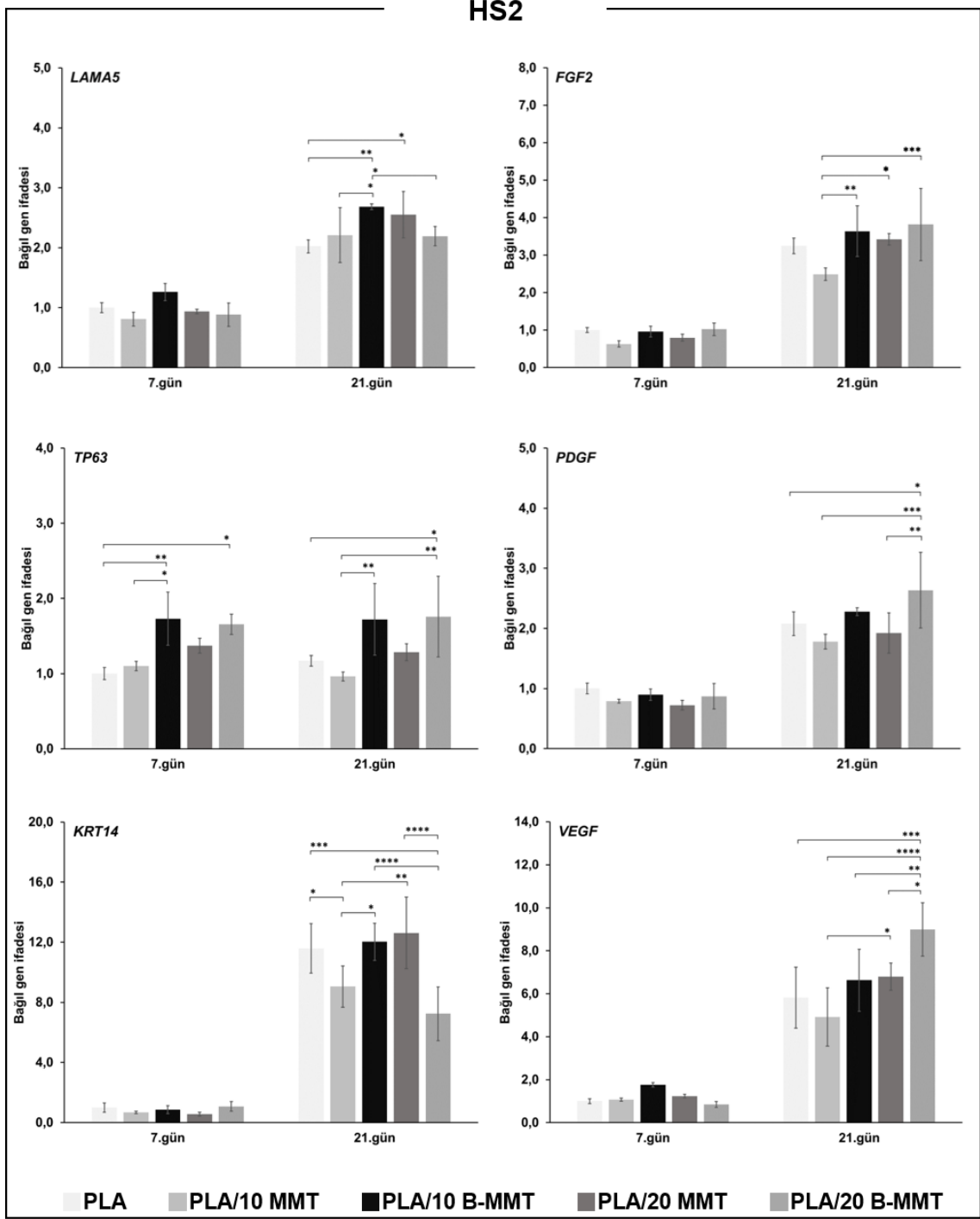
$p \leq 0,001$), bu grupların kendi arasında ya da PLA grubuna göre anlamlı bir farkı bulunmamaktadır. İDF hücrelerinin *FGF2* gen ifadeleri incelendiğinde, kültürün ilerleyen zamanlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.38). Kültürün 7.gününde PLA/20 B-MMT grubundaki İDF hücrelerinin *FGF2* gen ifadeleri, PLA ve PLA/10 B-MMT grubuna göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir (sırasıyla $p \leq 0,05$ ve $p \leq 0,01$). Yine kültürün 21. gününde PLA/20 B-MMT grubunda gen ifadesi, PLA/10 MMT grubundan daha fazladır ($p \leq 0,05$), ancak diğer gruplarla anlamlı bir farkı bulunmamaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) yara iyileşmesinin proliferasyon basamağının başında anjiyogenezi uyaran, endotel hücrelerinin göçünü ve düzenlenmesini sağlayan bir büyüme faktörüdür. Üretiminden keratinositler, fibroblastlar ve makrofajlar sorumludur [150]. HS2 hücrelerinin fiber matrikslerdeki *VEGF* gen ifadeleri kültürün ilerleyen zamanında bütün gruplarda anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p \leq 0,0001$) (Şekil 4.37). Gruplar arasında 7. günde herhangi bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, 21. güne gelindiğinde, PLA/20 B-MMT fiber matrikslerin HS2 hücrelerinin gen ifadesini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir ($p \leq 0,05$ ve üstü). PLA/10 MMT ve PLA/20 MMT grupları karşılaştırıldığında, MMT katkısı daha fazla olan grupta gen ifadesi daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Şekil 4.38’de verilen İDF hücrelerinin *VEGF* gen ifadeleri incelendiğinde ise kültürün ilerleyen günlerinde PLA/20 MMT grubu dışındaki grupların gen ifadelerinde artış olduğu görülmüştür ($p \leq 0,01$ ve üstü). Kültürün 7. gününde PLA/20 MMT grubunda kültüre edilen hücreler, tüm gruplardan daha yüksek bir gen ifadesine sahiptir ($p \leq 0,0001$). B-MMT içeren gruplar karşılaştırıldığında ise, gen ifadesi PLA/20 B-MMT grubunda, PLA/10 B-MMT grubundan anlamlı olarak daha yüksektir ($p \leq 0,05$). Yirmi birinci günde ise *VEGF* gen ifade düzeyi en yüksek olan grup PLA/10 MMT grubu olarak belirlenmiştir ($p \leq 0,01$ ve üstü). PLA/20 B-MMT grubunda da PLA/20 MMT grubuna göre gen ifadesi anlamlı bir şekilde yüksektir ($p \leq 0,05$).

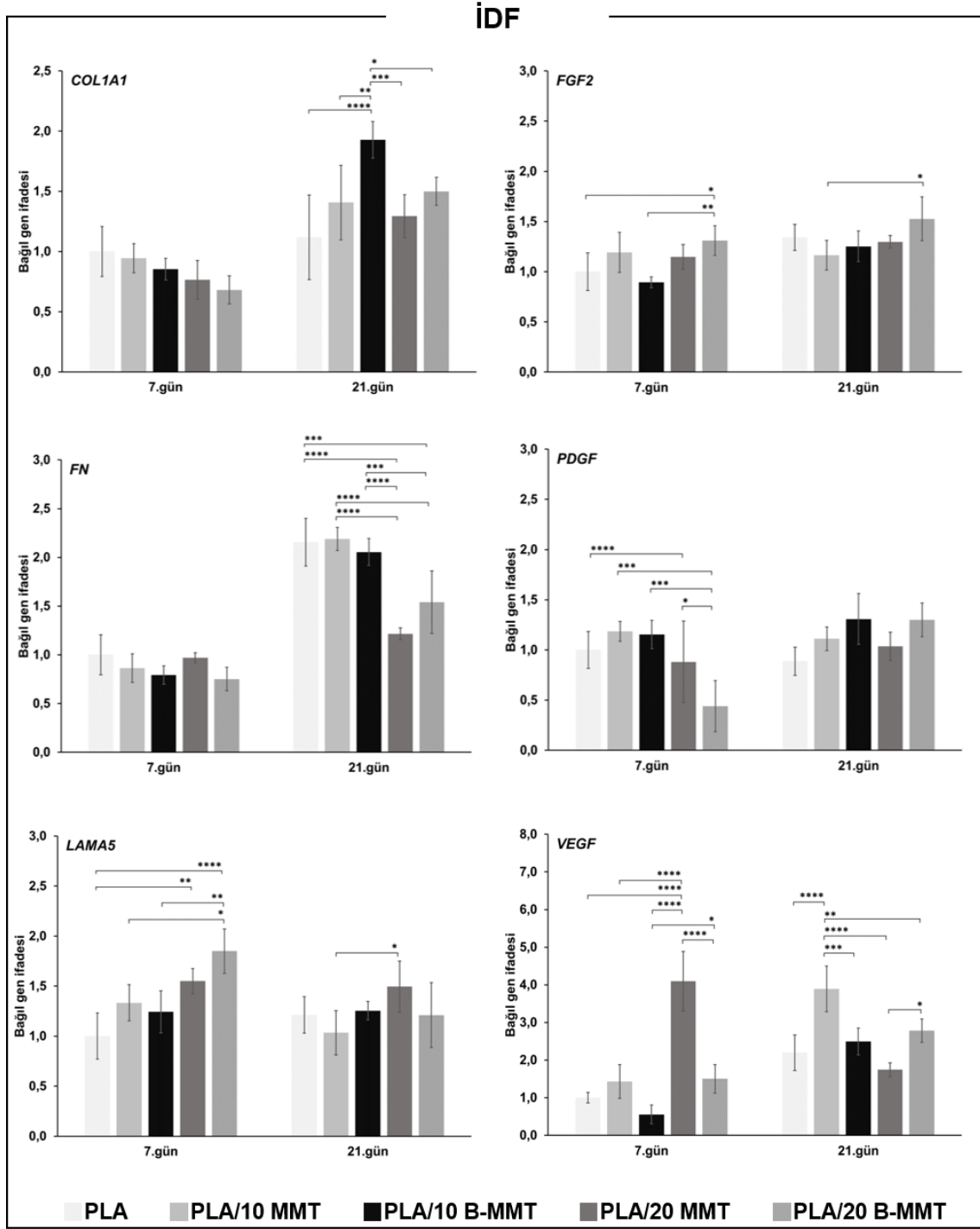
Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), kemotaktik ve mitotik etkiler göstererek yara iyileşmesinde rol oynamaktadır [151]. PDGF keratinositler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedir [66, 144]. Şekil 4.37’de PLA bazlı fiber matrikslerde kültüre edilen HS2 hücrelerinin *PDGF* gen ifade düzeyleri sunulmuştur. Kültürün ilerleyen günlerinde bütün gruplarda gen ifadesi artmıştır ($p \leq 0,0001$). Kültürün 7. gününde gruplar arasında *PDGF* gen ifadesi açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Yirmi birinci güne gelindiğinde ise, PLA/20 B-MMT grubundaki HS2

hücrelerinin gen ifadesi, PLA/10 B-MMT dışındaki bütün gruplardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$ ve üstü). İDF hücrelerinde *PDGF* gen ifadesi incelendiğinde ise kültürün ilerleyen günlerinde sadece PLA/20 B-MMT grubunda bir artış saptanmış ($p \leq 0,0001$), diğer gruplarda gen ifade düzeyi sabit kalmıştır (Şekil 4.38). Kültürün 21. gününde gruplar arasında bir fark bulunmazken, en düşük gen ifadesi PLA/20 B-MMT grubunda tespit edilmiştir. Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Genel olarak RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, MMT ve B-MMT katkılı fiber matrikslerin yara iyileşmesinde damarlanma ve hücre matrisinde sorumlu genlerin aktive olmasında etkili olduğu görülmektedir. Özellikle İDF hücrelerinde ECM'nin önemli bir bileşeni olan COL1A1'in gen ifadesi B-MMT gruplarında daha yüksek bulunmuştur. Her iki hücrede de mitotik etkiye sahip *FGF2* ve *PDGF* gen ifade düzeyleri B-MMT katkılı fiber matrikslerde daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Borun bu etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen B-MMT'nin yara iyileşmesindeki etkileri ilk kez sunulan tez çalışması kapsamında gösterilmiştir.



Şekil 4.37. HS2 hücrelerinin PLA bazlı fiber matrikslerde kültürasyonunun 7. ve 21. gününde gen ifadelerinin RT-PCR ile kantitatif olarak değerlendirilmesi (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin PLA grubuna göre kat farkını göstermektedir (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=4$, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).



Şekil 4.38. İDF hücrelerinin PLA bazlı fiber matrikslerde kültürasyonunun 7. ve 21. gününde gen ifadelerinin RT-PCR ile kantitatif olarak değerlendirilmesi (Bağıl gen ifadesi, β -aktin geni ile normalize edilen gen ifadelerinin PLA grubuna göre kat farkını göstermektedir (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=4$, aynı gün farklı gruplar arasında $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$).

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasının amacı, en genel çerçevede, terapötik etkilere sahip olduğu bilinen borun, serbest halde ya da bir nanokil taşıyıcı ile birlikte kullanıldığında, deri ve oral mukoza yara iyileşmesi üzerindeki olası etkilerinin, bu süreçte yer alan ana hücre tiplerinin yanıtlarıyla değerlendirilmesidir.

- Literatürde bor bileşiklerinin çeşitli hücreler üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmasına rağmen, borun toksik ya da faydalı dozu ya da bileşiği hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmanın ilk aşamasında, hücre kültür ortamlarına eklenen serbest borun, HUVEC (endotel), HS2 (keratinosit) ve BJ (fibroblast) hücrelerine olan etkileri, hücrelerin yara yatağındaki önemli görevleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

HUVEC'ler ile yapılan *in vitro* tübül oluşumu analizi sonucunda ortamda VEGF ya da B+VEGF bulunduğunda, beklenildiği gibi, hücrelerin tübül oluşturmaları gerçekleşmiştir. Ortamlarda anjiyogenezi tetikleyen VEGF olmadığında B içermeyen gruplardaki tübül oluşumu oldukça sınırlıyken, ortamlar 10 ve 20 µg/mL B içerdiğinde hücrelerin tübül oluşturma yeteneklerinin artması dikkat çekicidir.

HS2'lerin farklı B derişimlerindeki kültürlerinden hücre proliferasyonunun arttığına dair bir etki tespit edilmemiştir. Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyamalarında gruplar arasında belirgin bir farklılık yoktur, ancak canlı/ölü boyamalarında 20 µg/mL B içeren kültür ortamlarında daha çok ölü hücreye rastlanmıştır. Bor bileşiklerinin keratinosit hücre göçünü arttırdığını gösteren sınırlı sayıdaki çalışmada rapor edilen etki, sunulan tez çalışmasında sadece 12 sa sonunda 10 µg/mL B grubunda tespit edilmiştir. ROS analizi 14 gün sonunda 10 ve 20 µg/mL bor içeren gruplarda ROS'un azaldığını göstermektedir. Bu azalış, borun mitokondrinin antioksidan mekanizması üzerindeki etkisi ile açıklanabilir. Ancak kesin bir yargıya varmak için hem hücre içi hem de hücre dışı ROS birlikte değerlendirilmelidir. Bu analiz için ileride yapılacak çalışmalarda, negatif ve pozitif kontrol gruplarının eklenmesi değerlendirmeler açısından yararlı olacaktır. Özellikle hidrojen peroksit ile hücrelerin oksidan mekanizması aktiveleştirildikten sonra borun antioksidan etkisi daha iyi analiz edilebilir. HS2 hücrelerinin yoğun senesens boyanmaları, proliferasyon kapasiteleri ile uyumsuzdur, bu nedenle β -

galaktosidaz boyaması senesens-ilişkili gen ifadelerinin tespiti ile doğrulanmalıdır. RT-PCR sonuçları, HS2'lerin damarlanma ile ilişkili genlerinin ifadesinde bir farklılık olmadığını, bununla birlikte mitotik büyüme faktörü olan *FGF2* gen ifadesinin en iyi olduğu grubun 20 µg/mL B içeren grup olduğunu göstermiştir. Genel sonuçlar, HS2 hücrelerinde yara iyileşmesi için terapötik B dozunun 10-20 µg/mL arasında olduğunu göstermiştir.

BJ'lerin farklı bor derişimlerindeki kültürlerinde hücre proliferasyonlarının HS2'lerde görülmeyen şekilde arttığı tespit edilmiştir. Özellikle, kültürün 7. gününden itibaren 10 ve 20 µg/mL B içeren ortamlarda kültüre edilen hücrelerin metabolik aktiviteleri kültür süresince kontrol grubundan yaklaşık 2 kat daha fazladır. HS2'lerde olduğu gibi, BJ'lerin hücre morfolojilerinde de belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Canlı/ölü hücre boyamasında da gruplar arasında fark tespit edilmemiştir. Hücre göçü ve senesens sonuçları yine HS2'ler ile benzerdir. Hücre içi ROS aktivitesinde bir fark bulunmamıştır. RT-PCR analizi sonuçları ise, BJ'lerin hücresel cevaplarında çarpıcı şekilde farklılıkların olduğunu göstermiştir. Hem hücre dışı matris elemanlarının sentezinden sorumlu genlerin hem de damarlanma ile ilişkili genlerin ifadesinin 20 µg/mL B içeren grupta en yüksek olduğu bulunmuştur.

Borun hücre doğrudan etkisinin incelendiği bu aşamanın genel sonuçları, her üç hücre için de terapötik bor dozunun 10-20 µg/mL olduğunu göstermiştir.

- Yara iyileşme süreci, farklı iyileşme basamaklarının birbirini takip etmesiyle tamamlanmaktadır. Bu nedenle, borun yara bölgesinde uzun süre kalması ve yara örtüsünden kontrollü bir şekilde salınması gerekmektedir. Bu amaçla bor taşıyıcı olarak MMT'lerden faydalanılmıştır. MMT kendi başına yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilere sahip doğal bir malzemedir. Çalışma kapsamında tercih edilmesinin en önemli nedeni yüksek bor adsorplama yeteneği ve toksik olmayan doğası sayesinde yara örtüsü için ideal bir bileşen olmasıdır. Literatürde sıklıkla modifiye killer tercih edilse de son yıllarda yapılan araştırmalar, kilin polimerler içerisinde daha iyi dağılmasını sağlamak için organik kimyasallar ile yapılan bu modifikasyon işleminin, hücreler için toksik olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle çalışmada killere herhangi bir modifikasyon uygulanmadan adsorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Düşük bor derişimleri ile adsorpsiyon için en uygun koşulların belirlenmesine yönelik çalışmalarda analiz yönteminin kısıtlamaları

nedeniyle denemeler tamamlanamamıştır. Ancak, en genel çıkarımlar göz önüne alınarak, kilin KDK değeri hesaplanmış ve bu değerin 5 katına denk gelecek konsantrasyondaki B bor adsorpsiyon ortamına eklenmiştir. Adsorpsiyon süresi sonunda 1 g MMT’de ortalama 2847 µg B tespit edilmiştir. Killerden 24 sa sonunda 2485 µg B salınmıştır. Geliştirilecek yara örtülerinde B-MMT’ler fiberlerin içerisinde bulunacakları için B salım hızının daha düşük olacağı ve daha uzun süreli salımın gerçekleşeceği öngörülmüştür.

- Çalışmanın üçüncü bölümünde, elektroğirme yöntemi ile farklı oranlarda MMT ve/veya B-MMT’leri içeren PLGA bazlı fiber matrisler hazırlanmıştır. B-MMT’ler ile yapılan denemelerden önce kil katkısının fiber çapları ve çap dağılımlarına etkisinin belirlenmesi için MMT katkılı fiber matrisler hazırlanmıştır. Ortalama fiber çapları en yüksek PLGA (478 nm) grubunda olsa da gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. MMT ve PLGA arasındaki etkileşim fiziksel olduğu için FTIR analizi sonucunda kimyasal yapıda değişiklik tespit edilmemiştir. Elektroğirme sürecinde MMT’nin fiberlerin içinde konumlandığı PLGA/20 MMT grubuna ait XRD spektrumundaki nanokil piki ile tespit edilmiştir. PLGA/20 B-MMT’den salınan bor miktarı azometin H yöntemi ile tespit edilmiştir. Analiz sonuçları 1cm² fiber matristen 9 gün sonunda toplamda 0,20-0,25 µg B salındığını göstermektedir. Ancak, analiz yeterince hassas olmayan bir yöntemle yapıldığından, bu değerlerin gerçeği tam olarak yansıtmamış olabileceği değerlendirilmiştir. Elde edilen fiber matrislerin karakterizasyon sonuçları her ne kadar istenilen özelliklerle sahip bir biyomalzeme olduğunu gösterse de hücre kültür çalışmaları için yapılan sterilizasyon sırasında ortaya çıkan büzüşme problemi, malzemenin hücre davranışlarına olan etkisinin belirlenmesini olanaksız hale getirmiştir. Elektroğirme sırasında elektrik alan etkisiyle rahatlayan molekül zincirleri etanol ya da camsı geçiş sıcaklığına yakın bir sıcaklık ile karşılaştığında konformasyon değiştirir. PLGA’nın camsı geçiş sıcaklığı elektroğirme sonrası fizyolojik sıcaklığın altında bulunmuştur. Sterilizasyon sırasında hem etanol hem de fizyolojik sıcaklıklarda çözeltilerin kullanılması fiber matrislerin ani büzüşmesine neden olmuştur. Literatür bilgisi ışığında, PLGA fiber matrislere farklı modifikasyonlar yapılmış, ancak büzüşme problemi önlenememiştir. Yapılan denemeler sonucunda, fiber morfolojisi ve matris boyutunun en iyi

korunduğu işlem olarak 50°C’de 2 sa bekletmenin ardından, Pluronik F127 içerisinde 70°C’de 2 sa daha bekletmek olduğu belirlenmiş, ancak bu yaklaşım sonrasında yapılan uzun yıkama işlemi çok fazla örneğin kaybedilmesine ve zarar görmesine neden olmuştur. Yine de elde edilen örneklerle HS2 hücreleri ile kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çoğalmasının en iyi PLGA grubunda olduğu bulunmuş, bu grubu PLGA/10 B-MMT grubu izlemiştir. Ancak, azalan gözeneklilik ve fiber morfolojisindeki değişimler nedeniyle, hücresel cevaplar ile grupların bileşimi arasındaki ilişki belirlenememiştir. Ayrıca kültürün ilerleyen günlerinde yavaş da olsa fiber matriksler büzüşmeye devam etmişlerdir.

- Çalışmanın son bölümünde, çalışmalara PLGA yerine camsı geçiş sıcaklığı daha yüksek olan PLA ile devam edilmesine karar verilmiştir. İlk olarak PLA bazlı fiber matrikslerin üretim koşulları belirlenmiştir. SEM analizi sonuçlarından %10, 20, 40 oranlarında MMT ya da B-MMT içeren PLA bazlı fiber matrikslerin 350-480 nm arasında değişen ortalama fiber çaplarının arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. PLA bazlı fiber matrikslere MMT ya da B-MMT katkısı XRD analizi ile gösterilmiştir. Matrikslerin camsı geçiş sıcaklıkları 60°C ve üstünde bulunmuştur. Bu nedenle, büzüşme problemi ile karşılaşılmamıştır. Fiber matrikslerin ağırlıkları ve TG analiz sonuçlarına göre yapılan hesaplamalara göre yaklaşık kil içerikleri tespit edilmiş ve kilin adsorpladığı bor miktarı bilgisinden yararlanılarak, PLA/10 B-MMT ve PLA/20 B-MMT fiber matrikslerin 1 cm² başına sırasıyla, 2,8 ve 5,8 µg B içerdikleri bulunmuştur. Özellikle lipaz enzimi varlığında matriksteki bozunmanın diğer ortamlara nazaran daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir. Artan MMT oranıyla bozunma hızı artmıştır. MMT’nin varlığı fiberlerde defekt noktalarına neden olmakta ve aynı zamanda hidrofilik yapısı nedeniyle degradasyon ortamının fiberler içerisine girmesini sağlamaktadır. Bununla ilişkili olarak artan MMT katkısı ile birlikte fiberlerde hem bulk erozyon hem de yüzey erozyonu görülmüştür. Yara örtüsü materyalinin taşınması gereken özellikler arasında bulunan antibakteriyel etki incelendiğinde, PLA/10 B-MMT grubunun gram pozitif bakteri *S.aureus* suşuna karşı diğer gruplara göre belirgin bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Antibakteriyel etkinin MMT ve B-MMT gruplarına bağlı olarak belirlenebilmesi için bakterilerin doğrudan malzeme yüzeyine ekiminin çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Karakterizasyonları tamamlanan PLA bazlı fiber matriksler ile hücre kültür

çalışmaları yapılmıştır. Fiber matrikslerde bulunan bor miktarları düşük olduğundan ilk olarak %40 oranında MMT ve B-MMT içeren fiber matrikslere HS2 hücrelerinin ekilmesiyle denemeler yapılmıştır. Özellikle MTT analizi sonuçları yüksek oranda MMT içeren fiber matrikslerde hücrelerin canlılığının azaldığını göstermiştir. En iyi grup PLA olmakla birlikte, onda da zamana bağlı hücre canlılığı düşük bulunmuştur. Bu sonuçlardan ekim veriminin artırılması gerektiği ve %40'ın altındaki oranlarda MMT ya da B-MMT içeren gruplarla çalışmalara devam edilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Ekim verimi farklı örneklerin bulunduğu *in vitro* hücre kültür analizlerini içeren çalışmalarda oldukça önemlidir. Homojen bir ekim analiz sonuçlarının karşılaştırılabilir olmasını sağlamaktadır. Tez çalışması kapsamında bu nedenle dekstran ile ekim yöntemi tercih edilmiştir. Diğer yandan yapılan ön deneme sonuçları, BJ hücrelerinin PLA bazlı fiber matrikslerdeki canlılığının düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bunun nedeni ilerleyen pasaj sayısı ya da tespit edilemeyen bir kontaminasyon olabilir. İlerleyen çalışmalarda BJ yerine İDF adı verilen fibroblast hücreleri ile çalışmalara devam edilmiştir. Hücre kültür sonuçları değerlendirildiğinde, borun doğrudan etkisini gösteren ilk çalışmada olduğu gibi MMT ya da B-MMT katkısı HS2'lerin proliferasyonunu 7. gün sonuçları dışında olumsuz etkilenmiştir. Bu durum, matriksin yüzey morfolojisi ile ilişkilendirilebilir. Keratinosit hücreleri dokuda daha az hücre dışı matrisin bulunduğu bir ortamda, düzenli bir dizilimde tabakalar halinde bulunurlar. Yani özellikle PLA/10 B-MMT grubunda 14.gün itibariyle en yüksek proliferasyon hızına sahip İDF hücrelerinin aksine, yüzey pürüzlülüğünden olumsuz olarak etkilenmiş olabilirler. Bununla birlikte, SEM görüntüleri hücrelerin sağlıklı morfolojilerini koruduklarını göstermektedir. Canlı/ölü boyama analizlerinde tüm gruplarda ölü HS2 hücrelerinin bulunması yine fiberlerin yüzey morfolojisi ile açıklanabilir. Diğer boyama analizlerinde de küçük farklılıklar tespit edilmesine rağmen her iki hücrede de gruplar arası anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır. Bu bölümün en çarpıcı sonuçları RT-PCR analizinden elde edilmiştir. Damarlanma ile ilişkili genler olan *VEGF* ve *PDGF*'in ifadesi ve hücrenin mitotik aktivitesini arttıran gen *FGF2* gen ifadesi HS2 hücreleri için en yüksek PLA/20 B-MMT grubunda bulunmuştur. Aynı genler için İDF hücrelerindeki sonuçlar incelendiğinde, PDGF açısından olumlu bir artış olmadığı, VEGF açısından ise en yüksek gen ifadelerinin PLA/10 MMT ve PLA/20 MMT gruplarında olduğu

görülmüştür. *FGF2* ifadesi de PLA/20 B-MMT grubunda daha yüksektir. PLA fiber matrikslerde kültüre edilen HS2 hücrelerinin *TP63* ve *KRT14* gen ifadeleri PLA/10 B-MMT gruplarında yüksektir. İDF hücrelerinde *COL1A1* gen ifadesi en yüksek PLA/10 B-MMT grubundadır. Bu bölümün sonuçları değerlendirildiğinde, yara örtüsü olarak kullanılmak üzere hem PLA/10 B-MMT hem de PLA/20 B-MMT gruplarının farklı özellikler açısından yara örtüsü olmaya uygun adaylar olduğu tespit edilmiştir.

Sunulan tez çalışması hem serbest borun hem de bor katkılı montmorillonit nanokil içeren fiber matrikslerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin farklı hücreler varlığında detaylı olarak incelenmesi ile tamamlanmıştır. B-MMT katkılı PLA fiber matriksin, yara iyileşme basamaklarında, yara yatağına hem mekanik hem de bor ve MMT sayesinde biyolojik olarak destek verebilecek, raf ömrü uzun biyoaktif bir yara örtüsü adayı olabileceği değerlendirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Mir, M.N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima, M. Asad, Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: A review, *Progress in Biomaterials*, 7 (2018) 1-21.
- [2] C.K. Sen, G.M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T.K. Hunt, F. Gottrup, G.C. Gurtner, M.T. Longaker, Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy, *Wound Repair and Regeneration*, 17 (2009) 763-771.
- [3] J. Holl, C. Kowalewski, Z. Zimek, P. Fiedor, A. Kaminski, T. Oldak, M. Moniuszko, A. Eljaszewicz, Chronic diabetic wounds and their treatment with skin substitutes, *Cells*, 10 (2021) 655.
- [4] B. Chaveli-López, J.V. Bagán-Sebastián, Treatment of oral mucositis due to chemotherapy, *Clinical and Experimental Dental Research*, 8 (2016) e201-e209.
- [5] E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely Neisiany, S. Ramakrishna, Wound dressings: Current advances and future directions, *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (2019) 47738.
- [6] J.S. Choi, S.-H. Han, C. Hyun, H.S. Yoo, Buccal adhesive nanofibers containing human growth hormone for oral mucositis, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104 (2016) 1396-1406.
- [7] S. Jain, M. Datta, Montmorillonite-PLGA nanocomposites as an oral extended drug delivery vehicle for venlafaxine hydrochloride, *Applied Clay Science*, 99 (2014) 42-47.
- [8] S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini, Wound dressings - A review, *Biomedicine (Taipei)*, 5 (2015) 22.
- [9] M. Sharifi, S.H. Bahrami, N.H. Nejad, P.B. Milan, Electrospun PCL and PLA hybrid nanofibrous scaffolds containing *Nigella sativa* herbal extract for effective wound healing, *Journal of Applied Polymer Science*, 137 (2020) 49528.
- [10] Z. Wang, Z. Wang, W.W. Lu, W. Zhen, D. Yang, S. Peng, Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications, *NPG Asia Materials*, 9 (2017) e435-e435.
- [11] S. Mandla, L. Davenport Huyer, M. Radisic, Review: Multimodal bioactive material approaches for wound healing, *APL Bioengineering*, 2 (2018) 021503.
- [12] G.V. Joshi, H.A. Patel, B.D. Kevadiya, H.C. Bajaj, Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier, *Applied Clay Science*, 45 (2009) 248-253.
- [13] M. Mobaraki, S. Karnik, Y. Li, D.K. Mills, Therapeutic applications of halloysite, *Applied Sciences*, 12 (2022) 87.
- [14] A. Koç Demir, A.E. Elçin, Y.M. Elçin, Strontium-modified chitosan/montmorillonite composites as bone tissue engineering scaffold, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 89 (2018) 8-14.
- [15] A. Koç Demir, Development and characterization of zinc-incorporated montmorillonite/poly(ϵ -caprolactone) composite scaffold for osteogenic tissue-engineering applications, *Polymer Composites*, 39 (2018) E601-E608.

- [16] M. Tagliabue, A.P. Reverberi, R. Bagatin, Boron removal from water: needs, challenges and perspectives, *Journal of Cleaner Production*, 77 (2014) 56-64.
- [17] N. Öztürk, D. Kavak, Boron removal from aqueous solutions by adsorption on waste sepiolite and activated waste sepiolite using full factorial design, *Adsorption*, 10 (2004) 245-257.
- [18] R.I. Reda, M.M. Wen, A.H. El-Kamel, Ketoprofen-loaded Eudragit electrospun nanofibers for the treatment of oral mucositis, *International Journal of Nanomedicine*, 12 (2017) 2335-2351.
- [19] Z. Meng, Y. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, Y. Zheng, Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 30 (2010) 1204-1210.
- [20] A.I. Toma, J.M. Fuller, N.J. Willett, S.L. Goudy, Oral wound healing models and emerging regenerative therapies, *Translational Research*, 236 (2021) 17-34.
- [21] N. Mayet, Y.E. Choonara, P. Kumar, L.K. Tomar, C. Tyagi, L.C. Du Toit, V. Pillay, A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103 (2014) 2211-2230.
- [22] F.M. Watt, H. Fujiwara, Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (2011).
- [23] D.J. Tobin, Biochemistry of human skin-our brain on the outside, *Chemical Society Reviews*, 35 (2006) 52-67.
- [24] M. Waasdorp, B.P. Krom, F.J. Bikker, P.P.M. van Zuijlen, F.B. Niessen, S. Gibbs, The bigger picture: Why oral mucosa heals better than skin, *Biomolecules*, 11 (2021) 1165.
- [25] S.A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic, Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation, *Science Translational Medicine*, 6 (2014) 265.
- [26] H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, U. Mirastschijski, Skin wound Healing: an update on the current knowledge and concepts, *European Surgical Research*, 58 (2017) 81-94.
- [27] L. Chen, Z.H. Arbieva, S. Guo, P.T. Marucha, T.A. Mustoe, L.A. DiPietro, Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa, *BMC Genomics*, 11 (2010) 471.
- [28] X. Liu, H. Xu, M. Zhang, D.G. Yu, Electrospun medicated nanofibers for wound healing: Review, *Membranes (Basel)*, 11 (2021).
- [29] C.K. Sen, Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates, *Advances in wound care (New Rochelle)*, 10 (2021) 281-292.
- [30] Z. Luo, K. Xue, X. Zhang, J.Y.C. Lim, X. Lai, D.J. Young, Z.X. Zhang, Y.L. Wu, X.J. Loh, Thermogelling chitosan-based polymers for the treatment of oral mucosa ulcers, *Biomaterials Science*, 8 (2020) 1364-1379.
- [31] C. Scully, J. Epstein, S. Sonis, Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis, *Head&Neck*, 26 (2004) 77-84.

- [32] Z. Güngörmüş, Ö.B. Erdem, Kanser hastalarında yaşam kalitesi ve oral mukozit, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (2014) 24-30.
- [33] C. Pulito, A. Cristaudo, C.L. Porta, S. Zapperi, G. Blandino, A. Morrone, S. Strano, Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39 (2020) 210.
- [34] S.T. Sonis, The pathobiology of mucositis, *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004) 277-284.
- [35] M. Kohlhauser, H. Luze, S.P. Nischwitz, L.P. Kamolz, Historical evolution of skin grafting-A journey through time, *Medicina (Kaunas)*, 57 (2021).
- [36] H. Elkhenany, A. El-Derby, M. Abd Elkodous, R.A. Salah, A. Lotfy, N. El-Badri, Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge, *Stem Cell Research & Therapy*, 13 (2022) 8.
- [37] T.J. Brown, A. Gupta, Management of cancer therapy–Associated oral mucositis, *JCO Oncology Practice*, 16 (2020) 103-109.
- [38] W.J. Köstler, M. Hejna, C. Wenzel, C.C. Zielinski, Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment, *CA: A cancer journal for clinicians*, 51 (2001) 290-315.
- [39] A. Kusiak, B.A. Jereczek-Fossa, D. Cichońska, D. Alterio, Oncological-therapy related oral mucositis as an interdisciplinary problem—Literature review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (2020) 2464.
- [40] K. Çıtlak, S. Kapucu, Kemoterapi alan hastalarda görülen oral mukozitin önlemesi ve tedavisinde güncel yaklaşımlar: kanıta dayalı uygulamalar, *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 2 (2015) 70-77.
- [41] M. Karthaus, C. Rosenthal, A. Ganser, Prophylaxis and treatment of chemo- and radiotherapy-induced oral mucositis - are there new strategies?, *Bone Marrow Transplant*, 24 (1999) 1095-1108.
- [42] M. Abrigo, S.L. McArthur, P. Kingshott, Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects, *Macromolecular Bioscience*, 14 (2014) 772-792.
- [43] V. Vivcharenko, A. Przekora, Modifications of wound dressings with bioactive agents to achieve improved pro-healing properties, *Applied Sciences*, 11 (2021) 4114.
- [44] Z. Zhang, B.B. Michniak-Kohn, Tissue engineered human skin equivalents, *Pharmaceutics*, 4 (2012) 26-41.
- [45] M.S. Zafar, Z. Khurshid, K. Almas, Oral tissue engineering progress and challenges, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (2015) 387-397.
- [46] G.B. Tomar, R.K. Srivastava, N. Gupta, A.P. Barhanpurkar, S.T. Pote, H.M. Jhaveri, G.C. Mishra, M.R. Wani, Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393 (2010) 377-383.

- [47] X. Ji, Z. Zhang, Y. Han, J. Song, X. Xu, J. Jin, S. Su, D. Mu, X. Liu, S. Xu, H. Cui, Z. Zhao, Y. Wang, H. Liu, Mesenchymal stem cells derived from normal gingival tissue inhibit the proliferation of oral cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *International Journal of Oncology*, 49 (2016) 2011-2022.
- [48] O.M. Maria, M. Shalaby, A. Syme, N. Eliopoulos, T. Muanza, Adipose mesenchymal stromal cells minimize and repair radiation-induced oral mucositis, *Cytotherapy*, 18 (2016) 1129-1145.
- [49] K. Izumi, G. Takacs, H. Terashi, S.E. Feinberg, *Ex vivo* development of a composite human oral mucosal equivalent, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57 (1999) 571-577; discussion 577-578.
- [50] T. Hotta, S. Yokoo, H. Terashi, T. Komori, Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with *ex vivo* produced oral mucosa equivalent, *Kobe Journal of Medical Sciences*, 53 (2007) 1-14.
- [51] D.S. Thoma, M. Sancho-Puchades, D.A. Ettlin, C.H. Hämmerle, R.E. Jung, Impact of a collagen matrix on early healing, aesthetics and patient morbidity in oral mucosal wounds—A randomized study in humans, *Journal of clinical periodontology*, 39 (2012) 157-165.
- [52] N. Roy, N. Saha, T. Kitano, P. Saha, Development and characterization of novel medicated hydrogels for wound dressing, *Soft Materials*, 8 (2010) 130-148.
- [53] A.M. Abdelgawad, S.M. Hudson, O.J. Rojas, Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems, *Carbohydrate Polymers*, 100 (2014) 166-178.
- [54] A.B.M. Hilmi, A.S. Halim, Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering, *World Journal of Stem Cells*, 7 (2015) 428.
- [55] Y. Zhou, M. Wang, C. Yan, H. Liu, D.G. Yu, Advances in the application of electrospun drug-loaded nanofibers in the treatment of oral ulcers, *Biomolecules*, 12 (2022).
- [56] A. Chor, R.P. Gonçalves, A.M. Costa, M. Farina, A. Ponche, L. Sirelli, G. Schrodj, S. Gree, L.R. Andrade, K. Anselme, M.L. Dias, *In vitro* degradation of electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) for oral mucosa regeneration, *Polymers (Basel)*, 12 (2020).
- [57] Y. Dong, S.S. Feng, Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26 (2005) 6068-6076.
- [58] 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.
- [59] M. Şimşek, Tuning surface texture of electrospun polycaprolactone fibers: Effects of solvent systems and relative humidity, *Journal of Materials Research*, 35 (2020) 332-342.
- [60] H. Liu, C.R. Gough, Q. Deng, Z. Gu, F. Wang, X. Hu, Recent advances in electrospun sustainable composites for biomedical, environmental, energy, and packaging applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 4019.

- [61] M. Gümüşderelioğlu, S. Dalkıranoglu, R.S.T. Aydın, S. Çakmak, A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 98 (2011) 461-472.
- [62] A. Arslan, M. Şimşek, S.D. Aldemir, N.M. Kazaroğlu, M. Gümüşderelioğlu, Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: Effect of honey on electrospinning process, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25 (2014) 999-1012.
- [63] P. Pankongadisak, S. Sangklin, P. Chuysinuan, O. Suwantong, P. Supaphol, The use of electrospun curcumin-loaded poly (L-lactic acid) fiber mats as wound dressing materials, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53 (2019) 101121.
- [64] A. Sadeghianmaryan, Z. Yazdanpanah, Y.A. Soltani, H.A. Sardroud, M.H. Nasirtabrizi, X. Chen, Curcumin-loaded electrospun polycaprolactone/montmorillonite nanocomposite: Wound dressing application with antibacterial and low cell toxicity properties, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31 (2020) 169-187.
- [65] J. Zhao, F. Han, W. Zhang, Y. Yang, D. You, L. Li, Toward improved wound dressings: effects of polydopamine-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) electrospinning incorporating basic fibroblast growth factor and ponericin G1, *RSC Advances*, 9 (2019) 33038-33051.
- [66] C. Qian, T. Xin, W. Xiao, H. Zhu, Q. Zhang, L. Liu, R. Cheng, Z. Wang, W. Cui, Z. Ge, Vascularized silk electrospun fiber for promoting oral mucosa regeneration, *NPG Asia Materials*, 12 (2020) 1-16.
- [67] T. Costa, A. Ribeiro, R. Machado, C. Ribeiro, S. Lanceros-Mendez, A. Cavaco-Paulo, A. Almeida, J. das Neves, M. Lúcio, T. Viseu, Polymeric electrospun fibrous dressings for topical co-delivery of acyclovir and omega-3 fatty acids, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 (2019) 390.
- [68] L. Wei, S. Wu, W. Shi, A.L. Aldrich, T. Kielian, M.A. Carlson, R. Sun, X. Qin, B. Duan, Large-scale and rapid preparation of nanofibrous meshes and their application for drug-loaded multilayer mucoadhesive patch fabrication for mouth ulcer treatment, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11 (2019) 28740-28751.
- [69] E. Mazzoni, M.R. Iaquinta, C. Lanzillotti, C. Mazziotta, M. Maritati, M. Montesi, S. Sprio, A. Tampieri, M. Tognon, F. Martini, Bioactive materials for soft tissue repair, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9 (2021) 613787.
- [70] H. Safiaghdam, H. Nokhbatolfoghahaei, A. Khojasteh, Therapeutic metallic ions in bone tissue engineering: A systematic review of the literature, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18 (2019) 101-118.
- [71] M. Gümüşderelioğlu, E.Ö. Tunçay, G. Kaynak, T.T. Demirtaş, S.T. Aydın, S.S. Hakkı, Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31 (2015) 120-128.
- [72] E.Ö. Tunçay, T.T. Demirtaş, M. Gümüşderelioğlu, Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40 (2017) 72-81.

- [73] A. Arslan, S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46 (2018) 790-799.
- [74] Ö.E. Akdere, İ. Shikhaliyeva, M. Gümüşderelioğlu, Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells, *Cytotechnology*, 71 (2019) 611-622.
- [75] C. Yin, X. Jia, Q. Zhao, Z. Zhao, J. Wang, H. Fu, Z. Li, Y. Zhang, TCF7-like 2 promotes osteogenic differentiation and boron-induced bone repair via lipocalin 2, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 110 (2019) 110671.
- [76] M. Benderdour, T. Bui-Van, A. Dicko, F. Belleville, *In vivo* and *in vitro* effects of boron and boronated compounds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12 (1998) 2-7.
- [77] S. Ince, I. Kucukkurt, I.H. Cigerci, A. Fatih Fidan, A. Eryavuz, The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24 (2010) 161-164.
- [78] S. Murugesan, T. Scheibel, Copolymer/clay nanocomposites for biomedical applications, *Advanced Functional Materials*, 30 (2020) 1908101.
- [79] K.S. Katti, H. Jasuja, S.V. Jaswandkar, S. Mohanty, D.R. Katti, Nanoclays in medicine: a new frontier of an ancient medical practice, *Materials Advances*, 3 (2022) 7484-7500.
- [80] A.K. Gaharwar, L.M. Cross, C.W. Peak, K. Gold, J.K. Carrow, A. Brokesh, K.A. Singh, 2D Nanoclay for biomedical applications: Regenerative medicine, therapeutic delivery, and additive manufacturing, *Advanced Materials*, 31 (2019) e1900332.
- [81] M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanizadeh, Biomedical applications of cationic clay minerals, *RSC Advances*, 5 (2015) 29467-29481.
- [82] Y. Jin, C. Liu, W. Chai, A. Compaan, Y. Huang, Self-supporting nanoclay as internal scaffold material for direct printing of soft hydrogel composite structures in air, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (2017) 17456-17465.
- [83] S. Wang, F. Zheng, Y. Huang, Y. Fang, M. Shen, M. Zhu, X. Shi, Encapsulation of amoxicillin within laponite-doped poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers: preparation, characterization, and antibacterial activity, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4 (2012) 6393-6401.
- [84] N. Cai, Q. Dai, Z. Wang, X. Luo, Y. Xue, F. Yu, Toughening of electrospun poly (L-lactic acid) nanofiber scaffolds with unidirectionally aligned halloysite nanotubes, *Journal of Materials Science*, 50 (2015) 1435-1445.
- [85] A.K. Gaharwar, S. Mukundan, E. Karaca, A. Dolatshahi-Pirouz, A. Patel, K. Rangarajan, S.M. Mihaila, G. Iviglia, H. Zhang, A. Khademhosseini, Nanoclay-enriched poly (ϵ -caprolactone) electrospun scaffolds for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Tissue Engineering Part A*, 20 (2014) 2088-2101.

- [86] A.H. Ambre, D.R. Katti, K.S. Katti, Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymer scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A (2013) 2644-2660.
- [87] M. Chakraborti, J.K. Jackson, D. Plackett, S.E. Gilchrist, H.M. Burt, The application of layered double hydroxide clay (LDH)-poly (lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23 (2012) 1705-1713.
- [88] S. Ahmadi, S.S. Shafiei, F. Sabouni, Electrospun nanofibrous scaffolds of polycaprolactone/gelatin reinforced with layered double hydroxide nanoclay for nerve tissue engineering applications, *ACS Omega*, 7 (2022) 28351-28360.
- [89] J. Wang, S. Qian, X. Liu, L. Xu, X. Miao, Z. Xu, L. Cao, H. Wang, X. Jiang, M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO₂ surfaces, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (2017) 3364-3376.
- [90] F. Tuğcu-Demiröz, S. Saar, S. Tort, F. Acartürk, Electrospun metronidazole-loaded nanofibers for vaginal drug delivery, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46 (2020) 1015-1025.
- [91] A. Haider, S. Kwak, K.C. Gupta, I.-K. Kang, Antibacterial activity and cytocompatibility of PLGA/CuO hybrid nanofiber scaffolds prepared by electrospinning, *Journal of Nanomaterials*, 2015 (2015) 832762.
- [92] Y. Lin, R.F. Brown, S.B. Jung, D.E. Day, Angiogenic effects of borate glass microfibers in a rodent model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102 (2014) 4491-4499.
- [93] Y. Yazır, H. Dalçık, Vasküler patolojilerin araştırılmasında önemli bir araç: Endotel hücre kültürü, *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15 (2012) 137-142.
- [94] L.A.H. Durand, A. Góngora, J.M.P. López, A.R. Boccaccini, M.P. Zago, A. Baldi, A. Gorustovich, *In vitro* endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive glass in the SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O system, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (2014) 7620-7630.
- [95] L.A.H. Durand, G.E. Vargas, N.M. Romero, R. Vera-Mesones, J.M. Porto-López, A.R. Boccaccini, M.P. Zago, A. Baldi, A. Gorustovich, Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 1142-1148.
- [96] A.M. Wojtowicz, S. Oliveira, M.W. Carlson, A. Zawadzka, C.F. Rousseau, D. Baksh, The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing, *Wound Repair Regeneration*, 22 (2014) 246-255.
- [97] D.D. Ergün, A. Soyocak, Borik asidin fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı/sitotoksikite etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 16 (2021) 390-396.
- [98] M. Benderdour, T. Van Bui, K. Hess, A. Dicko, F. Belleville, B. Dousset, Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation, *Journal of Trace Elements in Medicine And Biology*, 14 (2000) 168-173.
- [99] M. Park, Q. Li, N. Shcheynikov, S. Muallem, W. Zeng, Borate transport and cell growth and proliferation: not only in plants, *Cell Cycle*, 4 (2005) 24-26.

- [100] M. Park, Q. Li, N. Shcheynikov, W. Zeng, S. Muallem, NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation, *Molecular cell*, 16 (2004) 331-341.
- [101] C. Rasmussen, C. Thomas-Virnig, B.L. Allen-Hoffmann, Classical Human Epidermal Keratinocyte Cell Culture, in: S.H. Randell, M.L. Fulcher (Eds.) *Epithelial Cell Culture Protocols: Second Edition*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013, pp. 161-175.
- [102] B.I. Pinto, N.D. Cruz, O.R. Lujan, C.R. Propper, R.S. Kellar, *In vitro* scratch assay to demonstrate effects of arsenic on skin cell migration, *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (2019).
- [103] N. Chebassier, E.H. Oujja, I. Viegas, B. Dreno, Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration, *Acta Dermato-Venereologica*, 84 (2004).
- [104] K. Khorsandi, R. Hosseinzadeh, H. Esfahani, K. Zandsalimi, F.K. Shahidi, H. Abrahamse, Accelerating skin regeneration and wound healing by controlled ROS from photodynamic treatment, *Inflammation and Regeneration*, 42 (2022) 1-20.
- [105] C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan, J. Barrett, M. Dryden, J. Cooke, D. Leaper, N.T. Georgopoulos, Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process, *International Wound Journal*, 14 (2017) 89-96.
- [106] L. Deng, C. Du, P. Song, T. Chen, S. Rui, D.G. Armstrong, W. Deng, The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021 (2021) 8852759.
- [107] S. Demirci, A. Doğan, S. Aydın, E.Ç. Dülger, F. Şahin, Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417 (2016) 119-133.
- [108] S. Yılmaz, A. Ustundag, O.C. Ulker, Y. Duydu, Protective effect of boric acid on oxidative DNA damage in Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines, *Cell Journal (Yakhteh)*, 17 (2016) 748.
- [109] S.R. Resnik, A. Egger, B. Abdo Abujamra, I. Jozic, Clinical implications of cellular senescence on wound healing, *Current Dermatology Reports*, 9 (2020) 286-297.
- [110] A. Awasthi, P. Jadhao, K. Kumari, Clay nano-adsorbent: structures, applications and mechanism for water treatment, *SN Applied Sciences*, 1 (2019) 1-21.
- [111] V. Masindi, M.W. Gitari, H. Tutu, M. Debeer, Removal of boron from aqueous solution using magnesite and bentonite clay composite, *Desalination and Water Treatment*, 57 (2016) 8754-8764.
- [112] R. Sah, P.H. Brown, Boron determination-A review of analytical methods, *Microchemical Journal*, 56 (1997) 285-304.
- [113] F. López, E. Giménez, F. Hernández, Analytical study on the determination of boron in environmental water samples, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 346 (1993) 984-987.

- [114] S. Goldberg, R. Glaubig, Boron adsorption and silicon release by the clay minerals kaolinite, montmorillonite, and illite, *Soil Science Society of America Journal*, 50 (1986) 1442-1448.
- [115] S. Goldberg, H. Forster, E. Heick, Boron adsorption mechanisms on oxides, clay minerals, and soils inferred from ionic strength effects, *Soil Science Society of America Journal*, 57 (1993) 704-708.
- [116] S. Yaghoobi-Rahni, B. Rezaei, N. Mirghaffari, Bentonite surface modification and characterization for high selective phosphate adsorption from aqueous media and its application for wastewater treatments, *Journal of Water Reuse and Desalination*, 7 (2017) 175-186.
- [117] A. Memic, T. Abdullah, H.S. Mohammed, K. Joshi Navare, T. Colombani, S.A. Bencherif, Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications, *ACS Applied Bio Materials*, 2 (2019) 952-969.
- [118] H. Fouad, T. Elsarnagawy, F.N. Almajhdi, K.A. Khalil, Preparation and *in vitro* thermo-mechanical characterization of electrospun PLGA nanofibers for soft and hard tissue replacement, *International Journal of Electrochemical Science*, 8 (2013) 2293-2304.
- [119] S. Sarkar, S.C. Datta, D.R. Biswas, Synthesis and characterization of nanoclay-polymer composites from soil clay with respect to their water-holding capacities and nutrient-release behavior, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014).
- [120] L. Lao, Y. Wang, Y. Zhu, Y. Zhang, C. Gao, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22 (2011) 1873-1884.
- [121] P. Liu, L. Sun, P. Liu, W. Yu, Q. Zhang, W. Zhang, J. Ma, P. Liu, J. Shen, Surface modification of porous PLGA scaffolds with plasma for preventing dimensional shrinkage and promoting scaffold–cell/tissue interactions, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (2018) 7605-7613.
- [122] B. Duan, X. Yuan, Y. Zhu, Y. Zhang, X. Li, Y. Zhang, K. Yao, A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning, *European Polymer Journal*, 42 (2006) 2013-2022.
- [123] S. Shirian, S. Ebrahimi-Barough, H. Saberi, A. Norouzi-Javidan, S.M.M. Mousavi, M.A. Derakhshan, B. Arjmand, J. Ai, Comparison of capability of human bone marrow mesenchymal stem cells and endometrial stem cells to differentiate into motor neurons on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffold, *Molecular Neurobiology*, 53 (2016) 5278-5287.
- [124] M. Shi, L. Xuan, Y. Zhang, D. Wang, F. Ye, X. Shi, Y. Li, Synergistic effects of thermal treatment and encapsulation of calcium phosphate nanoparticles on enhancing dimensional stability and osteogenic induction potential of free-standing PLGA electrospun membranes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183 (2019) 110437.
- [125] C. Ru, F. Wang, M. Pang, L. Sun, R. Chen, Y. Sun, Suspended, shrinkage-free, electrospun PLGA nanofibrous scaffold for skin tissue engineering, *ACS applied Materials & Interfaces*, 7 (2015) 10872-10877.

- [126] L.-F. Tseng, P.T. Mather, J.H. Henderson, Shape-memory-actuated change in scaffold fiber alignment directs stem cell morphology, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 8790-8801.
- [127] P.I. Campa-Siqueiros, T.J. Madera-Santana, M.M. Castillo-Ortega, J. López-Cervantes, J.F. Ayala-Zavala, E.L. Ortiz-Vazquez, Electrospun and co-electrospun biopolymer nanofibers for skin wounds on diabetic patients: An overview, *RSC advances*, 11 (2021) 15340-15350.
- [128] A. Ahmadian, A. Shafiee, N. Aliahmad, M. Agarwal, Overview of nano-fiber mats fabrication via electrospinning and morphology analysis, *Textiles*, 1 (2021) 206-226.
- [129] H. He, B. Liu, B. Xue, H. Zhang, Study on structure and properties of biodegradable PLA/PBAT/organic-modified MMT nanocomposites, *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 35 (2022) 503-520.
- [130] A.C.B. Benatti, A.F. Pattaro, A.A. Rodrigues, M.V. Xavier, A. Kaasi, M.I.R. Barbosa, A.L. Jardini, R. Maciel Filho, P. Kharmandayan, Bioreabsorbable polymers for tissue engineering: PLA, PGA, and their copolymers, *Materials for Biomedical Engineering*, Elsevier 2019, pp. 83-116.
- [131] S. Huan, G. Liu, W. Cheng, G. Han, L. Bai, Electrospun poly (lactic acid)-based fibrous nanocomposite reinforced by cellulose nanocrystals: impact of fiber uniaxial alignment on microstructure and mechanical properties, *Biomacromolecules*, 19 (2018) 1037-1046.
- [132] X. Gu, X. Song, C.-h. Shao, P. Zeng, X. Lu, X. Shen, Q. Yang, Electrospinning of poly (butylene-carbonate): Effect of solvents on the properties of the nanofibers film, *International Journal of Electrochemical Science*, 9 (2014) 8045-8056.
- [133] N. Golafshan, R. Rezahejani, M. Tarkesh Esfahani, M. Kharaziha, S.N. Khorasani, Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material, *Carbohydrate Polymers*, 176 (2017) 392-401.
- [134] E. Castro-Aguirre, R. Auras, S. Selke, M. Rubino, T. Marsh, Impact of nanoclays on the biodegradation of poly (lactic acid) nanocomposites, *Polymers*, 10 (2018) 202.
- [135] C. DelRe, Y. Jiang, P. Kang, J. Kwon, A. Hall, I. Jayapurna, Z. Ruan, L. Ma, K. Zolkin, T. Li, Near-complete depolymerization of polyesters with nano-dispersed enzymes, *Nature*, 592 (2021) 558-563.
- [136] N.F. Zaaba, M. Jaafar, A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation, *Polymer Engineering & Science*, 60 (2020) 2061-2075.
- [137] S.R. Gomes, G. Rodrigues, G.G. Martins, M.A. Roberto, M. Mafra, C.M. Henriques, J.C. Silva, *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 46 (2015) 348-358.
- [138] G.L. Pérez-González, L.J. Villarreal-Gómez, A. Serrano-Medina, E.J. Torres-Martínez, J.M. Cornejo-Bravo, Mucoadhesive electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications of polymers and the parameters' roles, *International Journal of Nanomedicine*, 14 (2019) 5271.

- [139] G. Qi, N. Li, D. Wang, X.S. Sun, Development of high-strength soy protein adhesives modified with sodium montmorillonite clay, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93 (2016) 1509-1517.
- [140] Z. Liu, X. Liu, S. Ramakrishna, Surface engineering of biomaterials in orthopedic and dental implants: Strategies to improve osteointegration, bacteriostatic and bactericidal activities, *Biotechnology Journal*, 16 (2021) 2000116.
- [141] L. Sopchenski, S. Cogo, M. Dias-Ntipanyj, S. Elifio-Espósito, K. Popat, P. Soares, Bioactive and antibacterial boron doped TiO₂ coating obtained by PEO, *Applied Surface Science*, 458 (2018) 49-58.
- [142] J. Wang, Y. Meng, Z. Jiang, M.T. Sarwar, L. Fu, H. Yang, Engineering nanoclay edges to enhance antimicrobial property against gram-negative bacteria: Understanding the membrane destruction mechanism by contact-kill, *Advanced Functional Materials*, (2022) 2210406.
- [143] M. Cámara-Torres, R. Sinha, C. Mota, L. Moroni, Improving cell distribution on 3D additive manufactured scaffolds through engineered seeding media density and viscosity, *Acta Biomaterialia*, 101 (2020) 183-195.
- [144] H.N. Wilkinson, M.J. Hardman, Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes, *Open Biol*, 10 (2020) 200223.
- [145] M.L. Usui, J.N. Mansbridge, W.G. Carter, M. Fujita, J.E. Olerud, Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56 (2008) 687-696.
- [146] A. Guo, C.A. Jahoda, An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells, *Experimental Dermatology*, 18 (2009) 720-726.
- [147] P. Rousselle, M. Montmasson, C. Garnier, Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization, *Matrix Biology*, 75 (2019) 12-26.
- [148] T. Hashimoto, K. Kojima, Y. Tamada, Higher gene expression related to wound healing by fibroblasts on silk fibroin biomaterial than on collagen, *Molecules*, 25 (2020) 1939.
- [149] L.E. Tracy, R.A. Minasian, E. Caterson, Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound, *Advances in Wound Care*, 5 (2016) 119-136.
- [150] B. Dousset, M. Benderdour, K. Hess, R. Mayap-Nzietchueng, F. Belleville, A. Duprez, Effects of boron in wound healing, *Trace elements in man and animals 10*, Springer 2002, pp. 1061-1065.
- [151] S.N. Menon, J.A. Flegg, S.W. McCue, R.C. Schugart, R.A. Dawson, D.S. McElwain, Modelling the interaction of keratinocytes and fibroblasts during normal and abnormal wound healing processes, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279 (2012) 3329-3338.

EKLER

EK 1: Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama

PLA bazlı fiber matrikslere ekilen HS2 ve İDF hücreleri kültürasyonlarının 21. gününde fikslenerek, H&E boyama ile incelenmiştir.

Fiksasyon:

Fiber matriksler %10 (v/v) Formalin çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 sa fikslenir. Süre sonunda PBS ile 3 defa 5 dk yıkama işlemi yapılır ve boyama işlemine kadar %1 (v/v) P/S içeren PBS içerisinde +4°C’de saklanır.

Susuzlaştırma:

- Fiber matriksler doku kasetlerine aktarılır.
- Doku kasetleri, %70’lik (v/v) EtOH içerisinde 30 dk bekletilir.
- Daha sonra, %95’lik (v/v) EtOH içerisinde 30 dk bekletilir.
- Yeni hazırlanan %95’lik (v/v) EtOH içerisinde kasetler 30 dk daha bekletilir.
- Doku kasetleri, %100’lük EtOH içerisine alınır ve 30 dk bekletilir. Bu işlem %100’lük yeni EtOH çözeltisi ile iki defa daha tekrarlanır.
- Ardından, doku kasetleri ksilen içerisine aktarılır ve 30 dk bekletilir. Bu işlem yeni ksilen çözeltisi ile bir kere daha tekrarlanır.
- Örnek kalınlıkları ışık mikroskobu altında incelemeye uygun olduklarından, ksilen sonrası kesit alınması için yapılan parafine gömme basamağına ihtiyaç duyulmamıştır.

H&E Boyama:

Fiber matriksleri içeren doku kasetleri sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur.

1. Ksilende 4 dk (2 kere) bekletilir.
2. %100’lük etanolde 2 dk bekletilir.
3. %100’lük etanolde 3 dk bekletilir.
4. %95’lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilir.
5. %70’lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilir.

6. Distile suda 2 dk bekletilir.
7. Mayer's hemotoksilin boya çözeltisinde 10 dk bekletilir.
8. Musluk suyunda 1 dk bekletilir
9. Asit-alkolde (%70'lik (v/v) etanol içerisinde %5 (v/v) asetik asit) 20s bekletilir.
10. Musluk suyunda asit-alkol hızlıca uzaklaştırılır
11. Scott's tamponuna 10 kere hızlıca daldırılıp çıkartılır. Fiber matriksler mor-mavi renge dönüşür.
12. Doku kasetleri, musluk suyuna daldırılıp çıkartılır.
13. Doku kasetleri, %70'lik (v/v) etanole daldırılıp çıkartılır.
14. Eozin boya çözeltisinde 1 dk bekletilir.
15. %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilir.
16. %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilir.
17. %100'lük etanolde 2 dk bekletilir.
18. %100'lük etanolde 3 dk bekletilir.
19. Ksilende 3 dk (2 kere) bekletilir.

Son olarak, boyanmış fiber matriksler ksilen bazlı kapatma ortamıyla iki lam arasına yerleştirilerek çeker ocak altında kurumaya bırakılmış ve optik mikroskop altında incelenmiştir.

