

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER TEMELLİ YARA ÖRTÜ MALZEMESİ ÜRETİMİ
VE BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Cansu GÜLCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Temmuz, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER TEMELLİ YARA ÖRTÜ MALZEMESİ ÜRETİMİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Cansu GÜLCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 27.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Polimer Temelli Yara Örtüsü Üretimi ve Biyolojik Aktivitesinin Değerlendirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Cansu GÜLCAN

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2021-4207 numaralı projesi ile ve TÜBİTAK BİDEB tarafından 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.



Aileme
ve
canım kendime

TEŞEKKÜR

Tanıştığımız andan itibaren her konuda rahatlıkla iletişim kurabildiğim, her konuda yardımcı olan, akademik hayatımda bana yol gösteren ve göstermeye devam eden canım hocam Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN'a,

Biyouyumluluk analizlerini yapan Buşra AKGÜL ve yol gösteren Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a

Antibakteriyel analizleri yapan Sena Nur Dokuz ve yol gösteren Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e,

Yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI'ya

Laboratuvarında bana her daim yardımcı olan, birlikte dertlenip birlikte güldüğüm, tez sürecini keyifli hale getiren canım arkadaşlarım Nilbeste BONCUKÇU, İrem ÇOKSU, Hatice DEMİR, Melis IŞIK TOKSOY, Yiğit Can BAYCILI ve Seher AR'a,

Yüksek lisansın en başında tanıştığım ve bana yol arkadaşı olan dostlarım Pelin SARAÇOĞLU ve Özge YILMAZ'a,

Canım ailem Bilge GÜLCAN, Ertuğrul GÜLCAN ve Batuhan GÜLCAN'a bana her konuda destek oldukları için,

Her daim yanımda olan ve bana desteğini esirgemeyen Aysu SANCAK ve Dr. Ali Cem HACIALİOĞLU'na,

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destek veren TÜBİTAK BİDEB'e,

Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

BEE'O Propolis firmasına teşekkür ederim.

Ve son olarak da kendime teşekkür ediyorum. Daha nice başarılarla!

Cansu GÜLCAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Deri ve Yapısı.....	3
2.2 Yara.....	4
2.3 Yara İyileşmesi.....	4
2.3.1 Hemostaz.....	5
2.3.2 Enflamasyon.....	5
2.3.3 Proliferasyon	5
2.3.4 Yeniden Şekillenme.....	6
2.4 Geleneksel Yara Örtüleri.....	6
2.5 Modern Yara Örtüleri.....	6
2.5.1 Yarı-Geçirgen Film Örtüler	7
2.5.2 Yarı-Geçirgen Köpük Örtüler	7
2.5.3 Aljinat	8
2.5.4 Hidrojel	8
2.5.5 Hidrokolloid	8
2.5.6 Büyüme Faktörü İçeren Yara Örtüleri	9
2.5.7 Antimikrobiyal Yara Örtüleri.....	9
2.5.8 Nanofiber Yapıdaki Yara Örtüler	11
2.6 Elektro-Eğirme Yöntemi ve Parametreleri.....	13
2.7 Polimerlerin Çapraz Bağlanması	16
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	18
3.1 Kullanılan Kimyasallar	18

3.2	Kullanılan Cihazlar	19
3.3	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	20
3.3.1	%1 (w/v) Üre Çözeltisi	20
3.3.2	%3 (w/v) İpek Serisin Çözeltisi.....	20
3.3.3	%8 (w/v) PVA Çözeltisi	20
3.3.4	%8 (w/v) PVA /%3 (w/v) İpek Serisin (İS) Çözeltisi	21
3.3.5	Karbonildiimidazol/Tetrahidrofuran Çapraz Bağlayıcı Çözeltisi	21
3.3.6	Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Çözeltisi.....	21
3.4	Elektro-Eğirme ile PVA/İpek Serisin Nanofiber Üretimi	22
3.5	PVA/İpek Serisin Nanofiberlerin CDI ile Çapraz Bağlanması	22
3.6	PVA/İS Nanofiber Matlara Propolis Yüklenmesi	23
3.7	Üretilen Yara Örtü Malzemesinin Karakterizasyonu	23
3.7.1	Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi.....	23
3.7.2	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi.....	24
3.7.3	Şişme Testi.....	24
3.7.4	Bozunma Testi.....	24
3.7.5	<i>In-vitro</i> Propolis Salım Testi	25
3.8	Üretilen Yara Örtüsü Malzemesinin Biyolojik Aktivite Testleri	25
3.8.1	Biyouyumluluk Testi	25
3.8.2	<i>In-vitro</i> Yara İyileşmesi Analizi (Scratch Assay)	27
3.8.3	Antibakteriyel Aktivite Testi.....	27
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	29
4.1	Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi	29
4.2	Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi.....	30
4.3	Şişme Testi	32
4.4	Bozunma Testi.....	34
4.5	<i>In-vitro</i> Propolis Salım Testi	35
4.6	Üretilen Yara Örtü Malzemesinin Biyolojik Aktivite Testleri.....	38
4.6.1	Biyouyumluluk Testi	38
4.6.2	<i>In-vitro</i> Yara İyileşmesi Analizi (Scratch Assay)	40
4.6.3	Antibakteriyel Aktivite Testi.....	46
4.7	Genel Sonuç ve Öneriler	47
	KAYNAKÇA	49
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	56

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
Au	Altın
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakika Başına Devir Sayısı (Revolutions per minute)
P	Fosfat
H	Hidrojen
w/v	Kütle/Hacim
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
rpm	Dakika Başına Devir Sayısı (Revolutions per minute)
Cl	Klor
w/v	Kütle/Hacim
O	Oksijen
Pd	Paladyum
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Na	Sodyum
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CA	Selüloz Asetat
CDI	N,N-Karbonildiimidazol, 1,1- Karbonildiimidazol
CFU	Koloni Oluşturan Birim (Colony forming unit)
CTL	Biyoaktif Laktozla Modifiye Edilmiş Kitosan
DMEM/ F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture?
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ECM	Ekstraselüler Matriks
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorür
EDTA	Etilen diamintetra asetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
Eks	Ekstrakt
FBS	Fetal Bovin Serum
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
IL	İnterlökin
İS	İpek Serisin
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF	Nanofiber
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PF-4	Platelet (Trombosit) Faktörü-4
PROP	Propolis
PVA	Polivinil Alkol
PVA/İS/CDI	Çapraz Bağlı Polivinil Alkol/İpek Sersin Nanofiber Matlar
PVA/İS/CDI/PROP	Çapraz Bağlı Propolis Yüklü Polivinil Alkol/İpek Sersin Nanofiber Matlar
rhEGF	Rekombinant İnsan Epidermal Büyüme Faktörü
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standart Sapma
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
SRW	Nanofiber Islak Ağırlık
SRD	Nanofiber Kuru Ağırlık
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
THF	Tetrahidrofuran
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UV-Vis	UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi
W_0	0. Andaki Nanofiber Ağırlığı
W_t	T Anındaki Nanofiber Ağırlığı
XRD	X-Işınımı Difraksiyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Derinin katmanları	3
Şekil 2.2	Yara iyileşme basamakları.....	4
Şekil 2.3	Elektro-eğirme cihazı bölümleri	13
Şekil 2.4	N,N- Karbonildiimidazol (Hermanson, 2008).....	16
Şekil 2.5	Hidroksil ve amin gruplarının N, N- Karbonildiimidazol ile çapraz bağlanması (Hermanson, 2008)	17
Şekil 3.1	%8 (w/v) PVA / %3 (w/v) İS çözeltisinin hazırlanması	21
Şekil 3.2	Elektro-eğirme cihazı	22
Şekil 4.1	PVA/İS nanofiber görüntüleri (A) 10.000x büyütme, (B) 20.000x, büyütme (C) 40.000x büyütme ve (D) 60.000x büyütme	29
Şekil 4.2	PVA/İS, İS ve PVA'nın karşılaştırmalı FT-IR spektrumu.....	31
Şekil 4.3	Serbest propolis, PVA/İS/CDI/PROP, PVA/İS/CDI ve PVA/İS'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumu	32
Şekil 4.4	PU-PVA/İS/CDI NF matların zamana bağlı (%) şişme grafiği	33
Şekil 4.5	PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların zamana bağlı (%) kalan ağırlık grafiği	35
Şekil 4.6	Propolis-su kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 4.7	48 saatlik propolis salım grafiği.....	37
Şekil 4.8	PVA/İS/CDI NF ve PVA/İS/CDI/PROP NF'lerin zamana bağlı hücre canlılığı (%) grafiği	39
Şekil 4.9	PVA/İS/CDI NF ekstraktlarının L929 hücre hattında zamana bağlı <i>in-vitro</i> yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	41
Şekil 4.10	0,05 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında yara <i>in-vitro</i> iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi	42
Şekil 4.11	0,1 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında <i>in-vitro</i> yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi	43
Şekil 4.12	0,2 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında <i>in-vitro</i> yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi	44
Şekil 4.13	(%) Yara kapanması grafiği.....	45
Şekil 4.14	(A) <i>E. coli</i> bulunan agar plaka üzerinde PVA/İS nanofiber mat, (B) <i>S.aureus</i> bulunan agar plaka üzerinde PVA/İS nanofiber mat, (C) <i>E. coli</i> bulunan agar plaka üzerinde propolis yüklü PVA/İS nanofiber mat, (D) <i>S.aureus</i> bulunan agar plaka üzerinde propolis yüklü PVA/İS nanofiber mat	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Elektro-eğirme yöntemi parametreleri	14
Tablo 3.1	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve markaları	18
Tablo 3.2	Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve marka bilgileri	19
Tablo 3.3	NF mat çapraz bağlama denemeleri	23
Tablo 4.1	Elektro-eğirme denemeleri	30
Tablo 4.2	PU-PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların zamana bağlı şişme-ağırlık tablosu	33
Tablo 4.3	Zamana bağlı ağırlık tablosu	34
Tablo 4.4	Propolis-su kalibrasyon eğrisi için alınan değerler	36

Polimer Temelli Yara Örtü Malzemesi Üretimi ve Biyolojik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Cansu GÜLCAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Normal fizyolojik koşullar altında, deri hasarının iyileşmesi planlı bir süreçtir. Sağlıklı bir insanda, invaziv patojenleri ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemi harekete geçirilerek enfeksiyondan kaçınılır. Ancak dış faktörler sebebiyle kontaminasyona uğrarsa enfeksiyon meydana gelir ve bu durumda büyüme faktörleri ve hücre dışı matriks bileşenlerinin (kolajen, elastin ve fibrin) etkin rol oynamasına engel olarak normal yara iyileşme sürecini tehlikeye atar. Bu nedenle, yaraya bakteri girmesini engelleyen ve mikroorganizmaların büyümesini önleyebilen antimikrobiyal yara örtülerinin geliştirilmesi önemli hale gelmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sentetik polimerlerin doğal polimerler ve doğal ürünler ile kullanılmasının yara örtü malzemesinin antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir.

Üretilen yara örtü malzemesinde elastikiyet sağlayabilmesi ve yüksek elektro-eğirme kabiliyeti sebebiyle polivinil alkol (PVA), ideal nemli ortamı sağlama ve bariyer görevi görerek enfeksiyonu önleme özellikleri sebebiyle poliüretan (PU) kullanılmıştır. Antibakteriyel aktivite göstermeleri, yara iyileşmesini hızlandırmaları ve doğal kaynaklı olmaları sebebiyle de ipek serisin (İS) ve propolis tercih edilmiştir. Poliüretan köpük membran üzerine PVA-İS polimer çözeltisi elektro-eğirme yöntemi ile bir araya getirilmiş olup, N, N-Karbonildiimidazol (CDI) ile polimerlerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Son olarak, yara örtü malzemesi üzerine propolis damlatma yöntemi ile

emdirilmiştir. Elektro-eğirme yöntemi sayesinde nanofibröz yapıların biyolojik ekstraselüler matriksi taklit etmesi ve biyouyumluluk sağlanması planlanmıştır. Literatürde yara iyileşmesi hedefli yara örtü malzemesi olarak polivinil alkol, ipek serisin, propolis ve poliüretan içerikli bir çalışma bulunmamış olup, ilk defa bu malzemelerin sinerjistik etkisi gözlenmiştir.

Elde edilen yara örtü malzemesinin karakterizasyonu için; taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanılarak oluşan nanofiberlerin çap ve çap dağılımları, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak fonksiyonel grupların analizi, sıvı alımı oranının hesaplanması için şişme testi, zaman içerisindeki kütle kaybı tayini için bozunma testi, zaman içerisinde propolis salımının tayin edilebilmesi için salım testi yapılmıştır. Yara örtü malzemesinin antibakteriyel aktivitesi inhibisyon bölgesi testi yöntemi ile, biyouyumluluğu ise 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile, yara kapatma yeteneği ise *in-vitro* yara iyileşmesi analizi (Scratch Assay) ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İpek serisin, propolis, polivinil alkol, nanofiber, antibakteriyel yara örtüsü

Production of Polymer-based Wound Dressing Material and Evaluation of the Biological Activity

Cansu GÜLCAN

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN

Under normal physiological conditions, healing of skin injury is a planned and organized process. In a healthy person, infection is avoided by activating the immune system to eliminate invasive pathogens. However, if it is contaminated by external factors, infection occurs, and it compromises the normal wound healing process by preventing growth factors and extracellular matrix components (collagen, elastin, and fibrin) from playing an active role. Therefore, it has become important to develop antimicrobial dressings that can prevent bacteria from entering the wound and prevent the growth of microorganisms. In recent studies, it has been shown that the use of synthetic polymers with natural polymers and natural products increases the antimicrobial activity of the wound dressing material.

Polyvinyl alcohol (PVA) was used in the produced wound dressing material due to its elasticity and high electro-spinning ability, and polyurethane (PU) due to its properties to provide the ideal moist environment and prevent infection by acting as a barrier. Silk sericin (SS) and propolis were preferred because they show antibacterial activity, accelerate wound healing and are of natural origin. The PVA-SS polymer solution was brought together on the polyurethane foam membrane by electro-spinning method, and the polymers were cross-linked with N, N-Carbonyldiimidazole (CDI). Finally, the dressing material was impregnated propolis via drip method. Nanofibrous structures are

planned to mimic the biological extracellular matrix and provide biocompatibility with the electro-spinning method. In the literature, there has not been any study found layered wound dressing material produced from polyvinyl alcohol, silk sericin, propolis and polyurethane. Thus, the synergistic effect of these materials was observed for the first time.

For the characterization of the obtained wound dressing material; diameter and diameter distributions of nanofibers determined by using scanning electron microscopy (SEM), analysis of functional groups determined by using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Swelling test was carried out to calculate the rate of fluid uptake and decomposition test was performed for mass loss over time and propolis release test was performed for determination of propolis release over time. The antibacterial activity of the dressing material was investigated by the inhibition zone test method, and the biocompatibility was examined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analysis and wound closure ability was determined by *in-vitro* wound healing analysis (Scratch Assay).

Keywords: Silk sericin, propolis, polyvinyl alcohol, nanofiber, antibacterial wound dressing

1.1 Literatür Özeti

Yara, bir dokunun, fiziksel, termal hasar ya da medikal bir bozukluk sebebiyle, normal anatomik yapısı ve fonksiyonunun hasar ve bozulmaya uğraması sonucu oluşur. (Velnar ve ark., 2009; Simões ve ark.,2018). Yaraları koruma ve iyileştirme amacıyla yara örtüleri ortaya çıkmıştır. Geleneksel yara örtüleri olarak gazlı bez, pamuk gibi malzemeler kullanılmıştır. Gerekli nemi sağlayamaması, sadece bariyer görevi görmesi ve uzun vadede maliyetli olması sebebiyle yeni yara örtülerine ihtiyaç duyulmuştur. Modern yara örtüleri sadece bariyer değil, gerekli nemli ortamı sağlamaya ve yara iyileşmesini teşvik etmeye odaklanmıştır (Dhivya ve ark.,2015)

Yara örtüleri film, köpük, aljinat, hidrokolloid, hidrojel, büyüme faktörü içeren, antimikrobiyal etki gösteren olarak sınıflandırılabilir. Bunların yanı sıra bir yara örtü kategorisi olarak nanofiber yapıdaki yara örtüleri sunduğu avantajlar ile öne çıkmıştır. Boyutları birkaç mikrondan başlayıp birkaç yüz nanometreye kadar farklılaşabilen nanofiberlerin elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesiyle nanofibröz ağlar oluşur. (Homaeigohar & Boccaccini, 2020). Elektro-eğirme basit ve çok yönlü olması sebebiyle doku mühendisliği, ilaç taşıma, yara iyileşmesi ve biyosensör uygulamalarında sıkça tercih edilmektedir (Hassiba ve ark., 2016). Elektro-eğirme yönteminin yara örtülerinde kullanılmak istenmesinin sebebi bu yöntemle elde edilen nanofiber yapıların insan vücudundaki ekstraselüler matriks dokusunu taklit edebilen bir ortam yaratmasıdır. (Aramwit ve ark., 2010). Mikro ve nanofiberler ekstraselüler matriksi mimik ederken, hücre göçünü ve çoğalmasını teşvik eder (Khan, 2014)

Tez çalışmasında elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesi planlanan nanofiberler, elastikiyet ve yüksek elektro-eğirme kabiliyeti olan sentetik polimer polivinil alkol, antimikrobiyal aktivite göstermesi ve yara iyileşmesini hızlandırması sebebiyle için doğal polimer ipek serisin ile çözelti haline getirilip, ideal nemli ortamı sağlama ve bariyer görevi üstlenerek enfeksiyonu önleme özellikleri sebebiyle poliüretan köpük üzerine bir araya getirilmiştir. Bir sonraki aşamada bu sisteme antimikrobiyal aktivite göstermesi ve yara iyileşmesini hızlandırması sebebiyle propolis yüklenerek katmanlı yara örtü

malzemesi elde edilmiştir. Biyouyumluluğu yüksek, antimikrobiyal aktivite gösterecek ve gerekli nemli ortamı sağlayacak bir katmanlı yara örtü malzemesi üretimi hedeflenmiştir. Doğal ürünler insan vücuduna kolay uyum sağlar fakat hızlı bozunma yaşanabilir. Bu sebeple doğal malzemelerin olabildiğince sentetik polimerler ile desteklenmesi gerekir (Boateng ve ark., 2015, Eskandarinia ve ark.,2020). Bu sebeple kullanacağımız doğal malzemeler olan ipek serisin ve propolis, polivinil alkol ve poliüretan polimerleri ile destekleme amaçlanmıştır.

1.2 Tezin Amacı

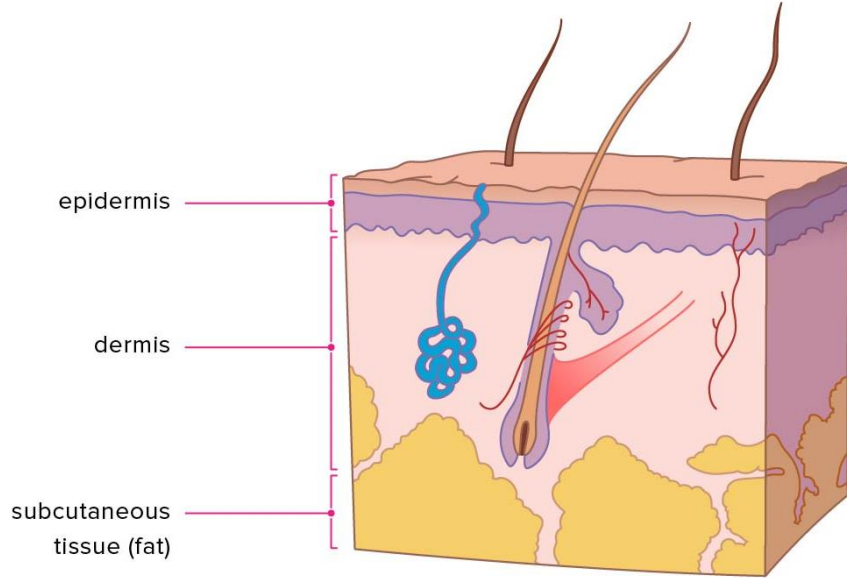
Tez çalışmasında antibakteriyel etki gösterecek, şişme kapasitesi yüksek olan, biyouyumlu, doğal polimer ipek serisin ve doğal bir ürün olan propolis ile sentetik polimerler polivinil alkol ve poliüretandan oluşan elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiş polimer bazlı katmanlı bir yara örtü malzemesi üretimi, karakterizasyonu ve biyolojik etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışması ile poliüretan köpük membran üzerinde, elektro-eğirme yöntemi ile polivinil alkol ve ipek serisinden nanofiberler üretilmiş, daha sonrasında bu sisteme propolis yüklenerek katmanlı yara örtü malzemesi elde edilmiştir. Elde edilen bu katmanlı yara örtü malzemesi elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiş olup, ilk defa bu malzemelerin sinerjistik etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Propolis, emdirme yöntemi ile yüklendiği için üretilen yara örtü malzemesinin; hızlı bir salım göstermesi, antimikrobiyal özelliğinin yüksek olması, şişme kapasitesinin yüksek olması ve biyouyumlu olması beklenmektedir.

2.1 Deri ve Yapısı

İnsan vücudunda bulunan en büyük organ olan deri, vücut sıcaklığı düzenlemesi, su kaybı kontrolü ve hissetme gibi işlevleri vardır. Bunların yanı sıra deri altında bulunan kas, kemik ve organ gibi yapıların hasar görmemesi için dış etmenlerden korur (Simões ve ark., 2018).



Şekil 2.1 Derinin katmanları

Dışarıdan içeriye doğru 3 ana bölümden oluşur, sırasıyla epidermis, dermis ve hipodermis. Epidermis, ağırlıklı olarak keratinosit adı verilen keratin üreten hücrelerden oluşur. Bunun yanında pigmentasyonu sağlayan melanositler de bu katman da bulunur. Derinin en üst tabakası olduğu için dış etkenlere karşı koruma su kaybını önleme gibi önemli işlevleri bulunur (Lanigan ve ark., 2010; Chua ve ark., 2016; Kalva ve ark.,2021). Dermis, epidermise göre daha kalın bir bağ doku tabakasıdır. Bu bağ doku tabakası ağırlıklı olarak ekstraselüler matriksten (ECM) oluşmaktadır. ECM çoğunlukla fibröz ve yapısal proteinlerden olan kollajen ve elastin içermektedir. Bu yapılar deriye mekanik güç, elastikiyet sağlamaktadır (Chua ve ark., 2016, Üçgül ve ark., 2018). Dermis katmanının altında bulunan hipodermis ise yağ dokusu içermesi sebebiyle enerji rezervi

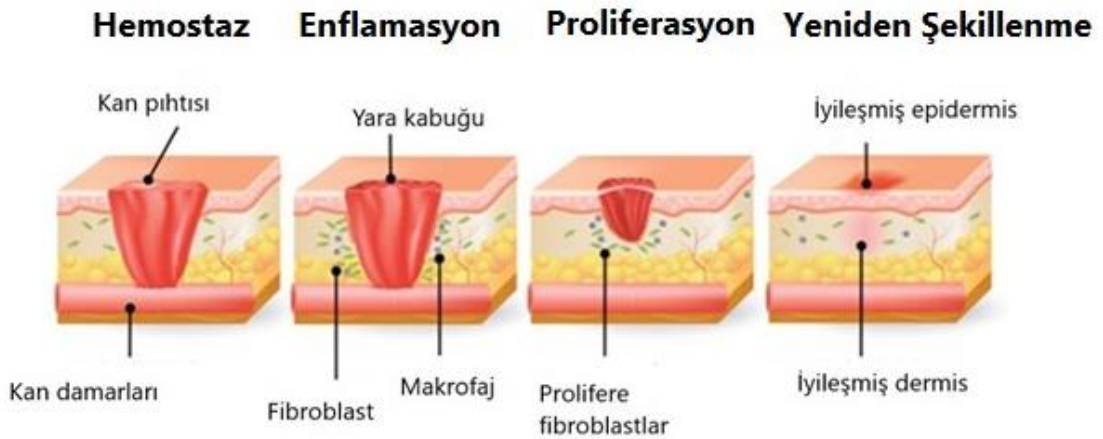
olarak işlev görür. Bunun yanında dermiş katmanına büyüme faktörü kaynağıdır (Rodrigues ve ark., 2019).

2.2 Yara

Bir dokunun, fiziksel, termal hasar ya da medikal bir bozukluk sebebiyle, normal anatomik yapısı ve fonksiyonunun hasar ve bozulmaya uğraması sonucu oluşur. İyileşme sürecinin süresine göre yaralar akut veya kronik olarak sınıflandırılır. Akut yaralar; aşınma, yanık, kesik, yırtık ve delinme sonucu ortaya çıkar ve etkilenen cilt katmanlarının boyutuna ve sayısına bağlı bir iyileşme süreci gerçekleşir. İyileşme süresi 5 ile 30 gün arasındadır, iyileşme devamlıdır. Kronik yara meydana geldiğinde ise cilt kusurlu bir iyileşme süreci gösterir. Olağan fizyolojik koşullar altında epidermal yapının kendini yenilemesi oldukça hızlıdır. İyileşmeyi engelleyen ve iyileşme süresini uzatan enfeksiyon, doku hipoksisi ve eksüda gibi faktörler vardır. Yaradaki sürekli enflamasyon durumu yaranın iyileşmesini engeller. Kronik yaralara örnek olarak diyabetik ayak, venöz ve arteriyel ülserler verilebilir (Velnar ve ark., 2009; Simões ve ark.,2018).

2.3 Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi dört ana basamaktan oluşur. Bu basamaklar hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları olarak sıralanırlar. Bu basamaklar sırasıyla meydana gelir fakat aynı zamanda birbirleri ile örtüşür (Rodrigues ve ark., 2019).



Şekil 2.2 Yara iyileşme basamakları

2.3.1 Hemostaz

Dokunun hasar alması ile kan kaybını önlemek adına damarlar daralır ve trombositler kan pıhtısı oluşturarak kanamayı durdurur (Rodrigues ve ark., 2019). Yarada oluşan pıhtı kolajen, trombositler, trombinler ve fibronektin içerir ve bu faktörler enflamatuvar yanıtı oluşturan sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakır. Fibrin pıhtısı, nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi gelen hücreler için iskele görevi görür. Bir sonraki aşama olan enflamasyon için ortam hazırlanmış olur (Broughton ve ark., 2006).

2.3.2 Enflamasyon

Nötrofiller, interlökin (IL)-1, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β ve bakteriyel ürünler tarafından bakterilere karşı ilk savunma hattı olarak hemen pıhtıya çağırılır. Monositler, yaralanmadan 48-96 saat sonra toplanır ve yara bölgesinde doku ile aktive olan makrofajlara dönüşür. (Rodrigues ve ark., 2019) Aktive olan makrofajlar, bir sonraki aşama olan proliferasyon fazında anjiyogenez ve fibröz dokunun oluşumunda rol oynayacaklardır. Nötrofiller enzimler ile yara bölgesinde bakteri ve hücre kalıntıları temizler. Bu aşamada yarada lökositler ve makrofajlar bulunmaktadır. Makrofajlar, fibroblastları uyaran (kolajen üreten) ve anjiyogenezi destekleyen interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör (TNF) ve keratinositleri uyaran dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) olmak üzere birçok sitokin ve enzim salgılatır (Broughton ve ark., 2006).

2.3.3 Proliferasyon

Enflamasyon fazı sona erdiğinde, anjiyogenez meydana gelir. Anjiyogenez, tümör nekroz faktör (TNF)- α tarafından uyarılarak endotelial hücre çoğalmasını, göçünü ve yeni kan damarları oluşturmak için dallanmayı başlatır (Broughton ve ark., 2006, Rodrigues ve ark., 2019) Yaranın kronikleşmemesi için kılcal damar oluşumu yara iyileşmesi için önemli bir adımdır. Yara kenarında bulunan epitel hücreler çoğalmaya başlar, bakteri kontaminasyonu ve sıvı kaybı için tekrar bariyer oluşturmaya çalışır. Epitel hücre proliferasyonunu, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- α uyarır. Proliferatif fazın son kısmı granülasyon dokusu oluşumdur. Fibroblastlar çevre dokudan yara bölgesine göç eder, aktive olur ve kolajen sentezlemeye başlar ve çoğalır. Trombositlerden ve makrofajlardan türetilmiş olan platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) fibroblastlara giden ana

sinyallerdir. PDGF'ne yanıt olarak fibroblastlar, kolajen tip III, glikozaminoglikanlar ve fibronektin'den oluşan geçici bir matris sentezlemeye başlar (Broughton ve ark., 2006)

2.3.4 Yeniden Şekillenme

Kolajen sentezi yaralanma itibariyle 4-5 hafta devam eder. Yara almış dokudaki kolajen, yara almamış dokudaki kolajenden daha incedir (Broughton ve ark., 2006). Olgunlaşma sırasında granülasyon dokusundaki hücre yoğunluğu ve metabolik aktivite azalır. Başlangıçta yüksek seviyelerde sentezlenen tip III kolajen, tip I kolajene dönüşür. Bu dönüşüm sebebiyle gerilme mukavemeti artar. Yeni epitelize olmuş bir yaranın gerilme mukavemeti, normal dokunun sadece yaklaşık %25'i kadardır. İyileşmiş veya onarılmış doku asla yaralanmamış normal dokular kadar güçlü değildir. Daha uzun bir süre sonrasında, onarılan dokudaki kolajen organizasyonundaki değişiklikler, gerilme mukavemetini normal dokunun maksimum yaklaşık %80'ine kadar artıracaktır (Schultz ve ark.,2011).

2.4 Geleneksel Yara Örtüleri

Gazlı bez, pamuk yünü, bandajlar gibi geleneksel yara örtüleri, yarayı sadece bir bariyer olarak korur ve kontaminasyondan koruma amaçlıdır. Yarada oluşabilecek olan yara sıvısının (eksüda) emilmesi sağlanabilir fakat sağlıklı dokuların nemlenmesi (maserasyon) sebebiyle kısa aralıklarla yara örtüsü değişimi yapılmak zorunda kalınmaktadır. Bu malzemelerinin kuru olması sebebiyle, yaradan ayrılması da hasta için acı verici ve yaralı bölge için travmatik olmaktadır. Bu dezavantajlar hastanın hayat kalitesini düşürdüğü gibi yara iyileşmesini uygun maliyetli bir süreç olmaktan çıkarmaktadır. Hafif eksüdası olan, kuru yaralarda kullanılabilir örtülerdir (Dhivya ve ark., 2015, Zhao ve ark., 2015, Borda ve ark., 2016).

2.5 Modern Yara Örtüleri

Geleneksel yara örtülerinin gerekli nemi sağlayamaması ve sadece bariyer görevi görmesi sebebiyle yeni yara örtülerine ihtiyaç duyulmuştur. Modern yara örtüleri sadece bariyer değil, gerekli nemli ortamı sağlamaya ve yara iyileşmesini teşvik etmeye odaklanmıştır. Modern yara örtüleri genellikle sentetik polimer bazlıdır ve yara ile etkileşime geçen biyoaktif ürünlerdir. Bu ürünler film, köpük, aljinat, hidrojel, hidrokolloid, büyüme faktörü içeren, antimikrobiyal özellikli ve nanofiber yapıdaki yara örtüleri olarak örnek verilebilir (Dhivya ve ark.,2015).

Hastanın yara bölgesinde kullanması tedavisini pozitif yönde etkileyecek olan ideal yara örtü özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

- Gaz alışverişini sağlamalı
- Toksik ve alerjenik özellik göstermemeli
- Anjiyogenezi (damarlanma) ve bağ dokuyu uyarmalı
- Enfeksiyona sebep olacak bakteri geçişine izin vermemeli
- Epidermal migrasyonu uyarmalı
- Kan akışının sağlanması için gerekli doku sıcaklığını korumalı
- Eksudayı absorbe ederken aynı zamanda nemli ortam sağlamalı
- Maserasyona (ıslanıp yumuşama) sebebiyet vermemeli
- Yara örtüsü kolay çıkarılmalı ve bölgeye hasar vermemelidir (Borda ve ark., 2016).

2.5.1 Yarı-Geçirgen Film Örtüler

Film örtüler, genellikle poliüretandan üretilmiş olup ince, yapışkan, transparan, gözenekli yapıdadır. Adının yarı-geçirgen olmasının sebebi, oksijen, karbondioksit ve su buharının geçişini sağlayan bununla birlikte örtünün içerisine sıvı ve bakteri girişini önleyen örtüler olmasıdır. Elastik olması sebebiyle eklemlerde rahatlıkla kullanılır. Transparan olması sebebiyle de muayene sırasında örtüyü kaldırmaya gerek duyulmaz. Emici özellikte olmayan örtülerdir bu sebeple yüksek eksüdalı yaralarda kullanılmazlar. Yapışkan oldukları için dikkatli çıkarılması gerekmektedir (Abdelrahman ve ark.,2011, Borda ve ark., 2016).

2.5.2 Yarı-Geçirgen Köpük Örtüler

Köpük örtüler, poliüretan ve silikondan üretilirler. Yapışkanlı ya da yapışkansız versiyonları vardır Dış katmanı hidrofobik olup sıvı geçirmezdir fakat gözenekli yapısı nedeniyle oksijen, karbondioksit ve su buharı geçişini sağlar. Isı yalıtımı ve ideal nemli ortam sağlarlar. Köpük yüksek eksüda emme kapasitesine sahiptir. Bacak ülserleri, granüle yaralar ve eksüda seviyesi orta ve yüksek olan yaralarda kullanıma uygundur. Kuru yaralara uygun değildir. Köpük örtünün iyileşme sağlayabilmesi için eksüdaya ihtiyacı vardır (Abdelrahman ve ark.,2011, Dhivya ve ark.,2015, Borda ve ark., 2016).

2.5.3 Aljinat

Aljinat, deniz yosunundan elde edilen, sodyum ve kalsiyum tuzlarını içeren doğal bir polimerdir. (Dhivya ve ark.,2015) Yara ile temas ettiğinde, aljinattan gelen kalsiyum iyonları yara eksüdasındaki sodyum iyonları ile yer değiştirerek yarayı koruyan hidrofilik bir jel oluşumuna yol açar. Kontaminasyonu ve eksüda birikimini önler. (Borda ve ark.,2016). Yüksek emiciliği sebebiyle, eksüda miktarı fazla olan orta ve ağır yaralarda kullanılır Aljinat içerisindeki kalsiyum bileşeni bir hemostat görevi görür ve bu nedenle kanayan yaralarda faydalıdır. Kuru yaralara uygun değildir, yarayı kurutabilir (Abdelrahman ve ark.,2011, Dhivya ve ark.,2015). Thomas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aljinat örtülerin, makrofaj hücrelerinin TNF- α üretimini indükleyerek, yara iyileşme sürecini hızlandırdığını ifade etmiştir (Dhivya ve ark.,2015).

2.5.4 Hidrojel

Hidrojel yara örtüleri, polivinil pirolidin ve polimetakrilat gibi sentetik polimerlerden üretilir (Dhivya ve ark.,2015) Yüksek su oranına sahiplerdir ve suda çözünmeyen örtülerdir (Abdelrahman ve ark.,2011) Yüksek su oranına sahip örtüler olmalarından dolayı yaraya gerekli nemli ortamı sağlar. Esnek bir yapıdadır, yaradan çıkarırken hastaya acı vermez. Yüksek eksüdalı, ağır yaralar dışında tüm yaralarda kullanılabilen örtülerdir. Hidrojinin dezavantajları ise eksüda birikmesi sebebiyle maserasyona ve kötü koku oluşumuna sebep olan bakterilerin üremesine yol açabilmesidir (Dhivya ve ark.,2015).

2.5.5 Hidrokolloid

Hidrokolloid yara örtüleri iki katmadan oluşurlar; dış katman su geçirmez bariyer, iç katman ise kolloidal kısımdır (Dhivya ve ark.,2015). Bu örtülerin iç katmanı yani kolloidal kısmı karboksimetilselüloz, jelatin ve pektin gibi jel oluşumunu sağlayan malzemelerden üretilmiş olup, poliüretan köpük veya film gibi destek olabilecek bir dış katman ile tamamlanır (Abdelrahman ve ark.,2011). Hidrokolloid yara örtüsü, yara eksüdasıyla , karşılaştığında sıvıyı hapseder ve bir örtücü jel oluşturur. Gerekli nemli ortam sağlanmış olur ve yara iyileşme sürecini stimüle eder (Borda ve ark., 2016). Su buharına karşı geçirgendir fakat bakterilerin geçmesine izin vermez. Eksüdayı emici özelliktedir. Hafif ile orta seviyedeki eksüdalı yaralarda kullanımı uygundur (Dhivya ve ark.,2015).

2.5.6 Büyüme Faktörü İçeren Yara Örtüleri

Büyüme faktörleri ve sitokinler yara iyileşmesinde rol oynayan hücreleri yönlendirmede önemli yapılardır (Barrientos ve ark,2008). Direkt olarak yaraya iletilen büyüme faktörü, hücre proliferasyonunu indükler. Rekombinant insan epidermal büyüme faktörünü (rhEGF) içeren kitosan nanopartikülleri ile yüklü fibrin jeli, epidermal büyüme faktörü (EGF) dağıtımı için nanopartiküler ve mikropartiküler sistemler, kompozit poli (N-vinil kaprolaktam)-kalsiyum aljinat (PVCL) hidrojel filmlerinde enkapsüle trombin reseptör agonist peptidi (TRAP) örnekleri verilebilir (Mogaşanu ve Grumezescu,2014).

2.5.7 Antimikrobiyal Yara Örtüleri

Antimikrobiyal yara örtüler, yaraya mikroorganizma girişini önleyen ve çoğalmasını engelleyen örtülerdir. Cilt yaralarının bakteriyel kontaminasyonu yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir. Bu sebeple antimikrobiyal örtüler hayati önem taşır. Bu sebeple sentetik ve/veya doğal polimerler ile üretilen çeşitli formlardaki yara örtüleri (film, köpük, hidrojel, nanofiber membran vb.) geliştirilmiş olup antimikrobiyal ajanlar ile birleştirilmiştir. Antimikrobiyal örtülerin içerdiği antibiyotik (vankomisin, ampicilin, tetrasiklin), antibakteriyel aktivite gösteren nanopartiküller (gümüş, titanyum dioksit, çinko oksit), antimikrobiyal etki gösteren doğal ürünler (bal, ipek, esansiyel yağlar, kitosan) ile fonksiyonunu gerçekleştirir (Kunz ve ark., 2016, Simões ve ark., 2018).

Propolis, bir diğer adıyla arı tutkalı, bal arılarının ağaç tomurcuklarından ya da kavak, söğüt, karaağaç, kayan, kozalaklı ağaç ve at kestanesi gibi ağaçlardan topladığı doğal reçineli bir maddedir. Bal arılarının propolisi kovan yapımında yapı malzemesi olarak kullanıldığı bilinmektedir (Oryan et al., 2018). Alifatik asitler, esterler, aromatik asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, aldehytler, amino asitler, ketonlar, kalkonlar, hidrokalonlar, terpenoidler, vitaminler ve inorganik maddeler dahil olmak üzere şu ana kadar propoliste 300'den fazla farklı bileşik karakterize edilmiştir (Martinotti & Ranzato, 2015).

Propolisin bulunduğu bölgeye, iklime, mevsime göre kimyasal yapısı farklılık gösterse de içinde bulunan en önemli ve ilgi çeken bileşikler flavonoidlerdir (Uzel ve ark., 2005). Bunun sebebi flavonoidlerin antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan ve antialerjik aktivite gösterdiği çalışmalarca kanıtlanmıştır (Cushnie & Lamb, 2005). Literatürde çeşitli bölgelere ait propolisler ile ilgili yara iyileşmesi çalışmaları mevcut bulunmaktadır. Yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılmak üzere propolis içeren polivinil alkol/ karboksimetil selüloz hidrojel üretilmiştir. Antimikrobiyal aktivitelerine bakıldığında

propolis oranı arttıkça inhibisyon bölgesinin büyüdüğü görülmüştür (Oliveria ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada ise elektro-eğirme yöntemi ile polivinil alkol nano iskeleleri ve propolis nanopartiküllerinin yara iyileştirme aktiviteleri *in-vitro* ve *in-vivo* incelenmiştir. Propolisin yaranın kapanmasını hızlandırdığı anlaşılmıştır (Alberti ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında da kullanılacak olan Anadolu propolisi ülkemiz bilim insanlarınca yapılan bir çalışmada Türkiye'nin dört farklı yerinden alınıp kimyasal içeriğine ve antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Bu dört farklı Anadolu propolisinin ana bileşenleri flavonoidler olarak belirlenmiş olup başlıca pinokembrin, pinostropin, isalpinin, pinobaksin, kuersetin, naringenin, galangin ve krisin olarak bulunmuştur. Etanolik özütleri hazırlanan propolisler toplam 13 farklı gram-pozitif ve Gram negatif bakteri ve maya benzeri mantara karşı incelenmiştir. Dört farklı Anadolu propolisi de *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Candida tropicalis*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Uzel ve ark., 2005).

İpek Serisin, İpek böceği, *Bombyx mori*, tarafından üretilen ipek esasen fibroin ve serisin adı verilen iki proteinden oluşur. Yapısında yaklaşık olarak %75 ipek fibroin ve %25 ipek serisin bulunur. Tutkal benzeri ipek serisin proteininin moleküler yapısı, çoğu güçlü polar tarafa sahip olan serin, tirozin, glutamik asit, aspartik asit ve lizin gibi çok sayıda hidrofilik amino asit içeren rastgele bobin (random-coil) ve β -tabaka yapılarından oluşur. Yüksek hidrofilikliğin sebebi hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi fonksiyonel gruplar içermesidir (Khan, 2014). Genelde ipek fibroin biyomedikal alanda daha çok kullanılsa da sonradan yapılan çalışmalarda ipek serisinin de epitel doku onarımı konusunda potansiyeli araştırılmış ve ipek serisin bazlı yara örtülerinin geliştirilmesine sebep olmuştur (Arango ve ark., 2020). İpek serisin kırılkan bir yapıya sahiptir, yapılan ilk çalışmalarda bu yüzden doku mühendisliğinde çok dikkat çekmemiştir. İpek serisinin amorf yapıda olmasından dolayı, saf ipek serisinden oluşan film ve iskele yapısındaki yara örtüleri kırılkan ve dayanıksız olmuştur (Mandal ve ark., 2009; Aramwit ve ark., 2010; Siritienthong ve ark., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu dezavantajın önüne geçmek için, ipek serisini bazı polimerler ile karıştırma ya da serisinin yapısını fiziksel ve kimyasal işlemlerle değiştirerek stabilite ve performansını arttırabildiği bilinmektedir (Arango ve ark., 2020). Örneğin; ipek serisin, polivinil alkol ve kitosan ile

karıştırılmış ve elektro-eğirme yöntemi ile nanofiber matrisler üretilmiştir. Üretilen matrislerde glutaraldehit buharı ile çapraz bağlanma sağlanmıştır. Sonuç olarak *in-vitro* ve *in-vivo* olarak yara iyileşmesinde ve antibiyotik salımında serisin bazı matrisler başarılı olmuştur (Sapru ve ark., 2018). Chao ve ark. yaptıkları çalışmada ise, elektro eğirme yöntemi ile tigesiklin yüklü serisin ve polivinil alkol kompozit fiberler üretilmiştir. İnhibisyon bölge testi ile 13 mm çapındaki SS/PVA kompozit fiber numunesi *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı sırasıyla 18.60 ± 0.89 mm ve 26.43 ± 1.07 mm inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. Bu inhibisyon bölgesi ipek serisinin antibakteriyel özelliği sebebiyle oluşmuştur. Tigesiklin yüklü SS/PVA kompozit fiber numunesi ile *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı 30.13 ± 1.31 mm ve 40.51 ± 0.65 mm inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. İpek serisin ve tigesiklinin sinerjistik antibakteriyel etkisi bu çalışma ile ortaya konulmuştur (Chao ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada ise, polivinil alkol bazlı serisin film üretilmiş, *E. coli*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Proteus* türleri gibi patojenik yara bakterileri için önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür. Filmin şişme oranı %70 elde edilmiş olup, bu da serisinin yüksek nem tutma kapasitesine sahip olduğunu gösterir (Abirami ve ark., 2019). Serisin proteini biyobozunur ve biyouyumlu bir doğal polimerdir. Antibakteriyel özelliğinin yanı sıra antioksidan, anti-elastaz, anti-tirozinaz özellikleri de bulunmaktadır (Lamboni ve ark., 2015). Bunların yanında ipek serisinin keratinosit ve fibroblastların çoğalmasını desteklediği, kolajen üretimini artırdığı ve yaralarda daha iyi bir yeniden epitelizasyon sağladığı bulunmuştur. İpek serisin içeren epitel onarımı ve yara iyileşmesi için incelenen bazı materyaller, ipek serisinin hücre adezyonunu azalttığını ve yara örtüsünün çıkarılması anında rejenere dokunun tahrip olmasını önleyen klinik deneyler de literatürde bulunmaktadır (Arango ve ark., 2020). Bu özellikleri sebebiyle doku mühendisliği konusunda umut verici bir biyomateriyaldir.

2.5.8 Nanofiber Yapıdaki Yara Örtüler

Elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen nanofiber yara örtüleri sentetik veya doğal polimerlerin kombinasyonları ile üretilmektedir. Ekstraselüler matriksi taklit edebilmesi, yüzey alanı/hacim oranlarının yüksek olması, yüksek porozite fakat bakteriyel girişe engelleyecek boyutlarda olması, istenen malzemelerle kolay ve ucuz üretim sebebiyle tercih edilir (Khan, 2014, Tort ve ark., 2015). Bunların yanında istenen antimikrobiyal ajanlar, büyüme faktörleri nanofibere entegre edilebilir (Tort ve ark., 2015).

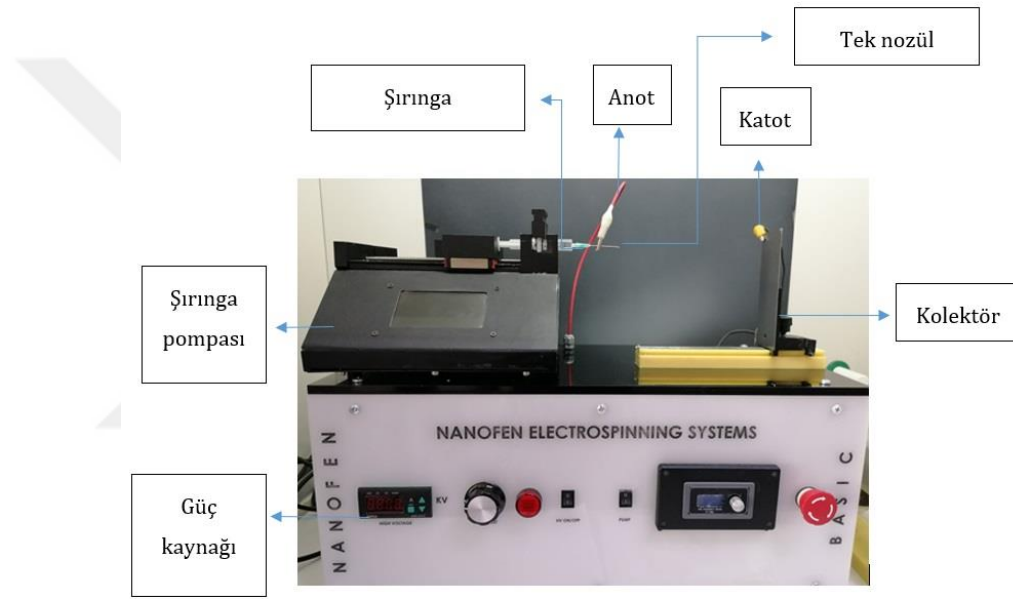
Polivinil alkol suda çözünebilen sentetik bir polimerdir. Polivinil alkol (PVA), ilk olarak Hermann ve 1924'te Haehnel tarafından polivinil asetatın etanol içinde potasyum hidroksit ile hidrolize edilmesiyle hazırlanmıştır (Nagarkar & Patel, 2019). Esasen hidroliz yoluyla polivinil asetatın yapılan PVA, biyolojik organizmalar tarafından kolayca bozunur ve suda çözünür kristal yapıya sahip bir polimerdir (Gaaz ve ark., 2015). Biyouyumluluk, gaz bariyer özellikleri, yüksek mukavemet, esneklik, yüksek termal stabilite gibi özelliklere sahiptir (Reagan ve ark., 2020). Bu özelliklerin yanında doğal bir hidrojel olma yetisine sahip olması yara örtüsü uygulamalarında kullanılmak üzere etkili bir polimer haline getirmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile PVA fiber üretimi literatürde sıkça görülmekte olup, insan vücudundaki ekstraselüler matriksin taklit edilmesinin en kolay yoludur (Okur ve ark., 2020). PVA nanofiber üretimlerinde yüksek elektro-eğirme yeteneği sayesinde genelde doğal polimerlere destek olmak amacıyla kullanılır (Adeli ve ark., 2018). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında elektro-eğirme yöntemi ile bal yüklenmiş aljinat/PVA bazlı nanofibröz membranlar yara örtü malzemesi olarak geliştirilmiştir. Elde edilen yara örtüsü inhibisyon bölge testi ile *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür (Tang ve ark., 2019). Adeli ve ark., elektro-eğirme yöntemi ile polivinil alkol/kitosan/nişasta bazlı nanofibröz tabakalar üretilmiştir. Bu tabakalar *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinin yanında hücre büyümesini ve çoğalmasını sağlamıştır (Adeli ve ark., 2018).

Bu çalışmada baz olarak kullanılacak olan poliüretan köpük membran sentetik bir polimerdir. Yarı geçirgenliği sayesinde, ideal yara örtülerinde istenen bir özellik olan, yara bölgesinde gerekli nemi sağlar (Mir ve ark., 2018). Hazır poliüretan köpük, mikro gözenekli üst katman ve gözenekli alt katmandan oluşur. Bu katmanlar nemin kaybolmasını ve bakteriyel enfeksiyonu önlemektedir (Hinrichs ve ark., 1992). Elektro-eğrilmiş nanofiber poliüretan membranlar, kontrollü su kaybı, mükemmel oksijen geçirgenliği ve yüksek sıvı tahliye kabiliyeti göstermiştir (Khil ve ark., 2003). Eskandarinia ve ark. yaptıkları çalışmada ise, iki katmanlı poliüretan/propolis ve polikaprolakton/jelatin iskelesi elde edilmiştir. Poliüretan/propolis yarayı dış kontaminasyondan ve su kaybından korumak için üst katman olarak kullanılmıştır. Üst katman sayesinde, inhibisyon bölge testi ile elde edilen sonuca göre, *S. aureus*, *E. coli* ve *S. epidermidis* bakterilerine karşı önemli ölçüde antibakteriyel aktivite gözlemlenmiştir (Eskandarinia ve ark., 2020). Literatürdeki yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere sentetik polimerler yara örtü malzemesi olarak sıkça kullanılmaktadır. Suda çözünür

yapıları, biyouyumlulukları, doğal polimerlere göre daha yüksek mekanik özellik göstermeleri sebebiyle tercih edilmektedir (Boateng & Catanzano, 2015).

2.6 Elektro-Eğirme Yöntemi ve Parametreleri

Elektro-eğirme, viskoelastik polimer çözeltilerinden nano ve mikro aralıktaki çaplara sahip fiberlerin üretilmesi için kullanılan basit ve ucuz bir tekniktir. Yüksek en-boy oranlarına ve geniş bir yüzey alanına sahip üç boyutlu bir nanofiber ağı üretilebilen bir yöntemdir (Khan, 2014, Zupančič, 2019). Bir elektro-eğirme düzeneği, bir şırınga pompası, tek (single), koaksiyal veya tri-aksiyal şırınga iğnesi (nozül) ile yüksek voltajlı bir kaynak ve bir kolektörden oluşur (Zupančič, 2019).



Şekil 2.3 Elektro-eğirme cihazı bölümleri

Bir polimer çözeltisi, karışabilir polimer karışımı (blend), karışmaz polimer karışımı (blend) veya emülsiyon şeklinde şırınga içerisinde bulunur. Şırınga pompası ile ayarlanan akış hızı ile polimer dispersiyonu şırınga ucundan pompalanmaya başlanır. Şırınga ucundaki şırınga iğnesine (nozül) yüksek voltaj uygulandığında, polimer dispersiyonu içinde yük indüklenir. Elektrik kuvvetleri yüklü polimer çözeltisindeki damlacık yüzey gerilimini aştığında, bir Taylor konisi oluşur ve polimer jeti yüksek gerilim ile oluşturulan elektrik alanı tarafından topraklanmış kolektöre doğru çekilir. Polimer jeti, kolektöre doğru yol kat ederken polimer dispersiyonunun çözücüsü buharlaşarak uçar ve son olarak kolektör üzerinde bir nanofiber mat oluşturur (Zupančič, 2019).

Basit ve kullanımının kolay olması sebebiyle elektro-eğirme doku mühendisliği, ilaç taşıma, yara iyileşmesi ve biyosensör uygulamalarında sıkça tercih edilmektedir (Hassiba ve ark., 2016). Elektro-eğirme yönteminin yara örtülerinde kullanılmak istenmesinin sebebi bu yöntemle elde edilen nanofiber yapıların insan vücudundaki ekstraselüler matriks dokusuna çok benzer bir ortam yaratmasıdır (Aramwit ve ark., 2010). Mikro ve nanofiberler ekstraselüler matriksi mimik ederken, hücre göçünü ve çoğalmasını teşvik eder (Khan, 2014).

Elektro-eğirme yönteminin parametrelerini üç ana başlıkta inceleyebiliriz. Bunlar çözelti, üretim ve ortam parametreleri olarak ayrılırlar (Khajavi & Abbasipour, 2017).

Tablo 2.1 Elektro-eğirme yöntemi parametreleri

Çözelti	Üretim	Ortam
Konsantrasyon	Voltaj	Sıcaklık
Moleküler ağırlık	Akış hızı	Nem
Yüzey gerilimi	Nozül-kolektör arası uzaklık	
İletkenlik		
Çözücünün uçuculuğu		

Elektro-eğirme işlemi sırasında nanofiberlerin morfolojisini ve özelliklerini yukarıda Tablo 2.1’de verilen parametreler etkilemektedir.

Çözelti parametreleri olan çözeltinin konsantrasyonu, moleküler ağırlığı, yüzey gerilimi, iletkenliği ve çözücünün uçuculuğu olarak adlandırılabilir. Polimer konsantrasyonu artırıldığında (yüksek konsantrasyon), viskoelastik kuvvet baskındır ve yüzey gerilimini yenerek boncuksuz nanofiberler elde edilir. Polimer konsantrasyonu yeteri kadar yüksek olmadığında viskozite de zayıf olur ve elektro-eğirme işlemi gerçekleşemez (Khajavi & Abbasipour, 2017). Yüksek viskozitede, çözücü molekülleri, elektrik yüklerinin etkisi altında gerilme nedeniyle dolaşmış polimer molekülleri üzerinde dağılır. Düşük viskozitede ise, polimer moleküllerinin yüzey geriliminin etkisi altında boncuklarda toplanmasına yol açar (Uslu ve ark., 2010). Polimerin moleküler ağırlığı büyük önem taşır çünkü polimer zincirleri ne kadar birbirlerine dolaşık ise (entanglement), elektriksel alana maruz bırakıldıklarındaki intermoleküler etkileşim daha fazla olur ve bu sebeple eğirme (spinnability) yeteneği gösterirler. Elektro-eğirme sürecinin başlatılması için yüzey geriliminin aşılması için yüklenmiş polimer çözeltisine ihtiyaç vardır fakat polimer jeti

kolektöre doğru yol alırken yüzey gerilimi boncuk oluşumuna sebebiyet verebilir (Uslu ve ark., 2010). Polimer çözeltisi yüksek bir iletkenliğe sahip ise polimer jeti büyük miktarda elektriksel yük taşır. Bu sayede polimer jet gerilmesi artar ve homojen, boncuksuz nanofiber üretilir (Mishra ve ark., 2018). Elektro-eğrilmiş nanofiberlerin morfolojisini kontrol eden önemli faktörlerden biri çözücü uçuculuğudur. Polimer çözeltisinin çözücüsünün seçimine bağlı olarak elektro-eğrilmiş nanofiberlerin gözenekli yapıya sahip olmasını ve hızlı kurummasını sağlar. Yeteri kadar kurumayan nanofiberler, nozülünden kolektöre varmaya çalışırken veya kolektöre vardığında birbirlerine kurdele gibi (ribbon-like) dolanabilir (Bhattacharai ve ark., 2019).

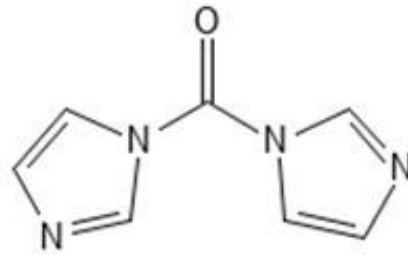
Üretim parametreleri ise voltaj, akış hızı, şırınga ucu-kolektör arasındaki uzaklık ve kolektör olarak sınıflandırılabilir. Öncelikle polimer çözeltisinin Taylor konisinden polimer jeti oluşturacak kritik voltaja ulaşması gerekmektedir. Sonrasında ise yapılan çalışmalarda yüksek voltajın boncuk oluşumuna sebep olmasının yanı sıra daha yüksek voltajların, yüklü polimer jeti üzerindeki elektrostatik itme kuvvetinde bir artışa neden olduğunu ve bunun da daha ince fiber çapına neden olduğunu bulmuştur (Mishra ve ark., 2018). Polimerin akış hızı, nanofiberlerin boyutu, şekli ve porozitesi üzerinde direkt bir etkiye sahiptir. Megelski ve ark. polistiren/tetrahidrofuran (THF) ile yaptığı bir çalışmada akış hızı arttıkça, artan fiber çapı ve gözenekler gözlemlenmiştir. Nozül ve kolektör arasındaki mesafe ise elektro-eğirme ve elektrospreylemeyi birbirinden ayıran önemli bir faktördür. Genel olarak 10-20 cm arasında değişen bir mesafedir (Bhattacharai ve ark., 2019) Nozül ve kolektör arasındaki mesafe polimer çözeltisi çözücüsünün buharlaşmasına engel olacak kadar kısa ya da boncuklu fiber oluşumuna sebep olacak kadar uzun bir mesafe olmamalıdır (Khajavi & Abbasipour, 2017).

Ortam parametreleri de nem ve sıcaklık olarak ikiye ayrılmaktadır. Amiralıyan ve ark., 25, 50 ve 75°C'de elektro-eğrilmiş ipek fiberlerinin morfolojisini incelemişlerdir. 50 ve 75°C'de yassı lifler üretilirken, 25°C'de dairesel yapı gözlemlenmiştir. Elde edilen fiberler, farklı sıcaklıklarda aynı çap aralığında olma özelliği taşımışlardır. Morfolojik yapı, elektro-eğirme sürecinde sıcaklığın 50°C'ye artması ile dairesel bir kesitten şerit benzeri bir şekle hafifçe değişmiştir. Düşük nem, kuruluğa ve çözücünün buharlaşma hızının artmasına neden olmaktadır. Buna karşılık, yüksek nem, polimer jeti üzerindeki yüklerin nötralizasyonu ve küçük gerdirme kuvvetleri sebebiyle fiber kalınlığına sebep olacaktır (Khajavi & Abbasipour, 2017).

2.7 Polimerlerin Çapraz Bağlanması

Biyobozunur polimerik fiber yapılar, belirli uygulamalar için optimize edilebilen geniş bir yüzey alanı ve yüksek bir gözeneklilik sağlayabilir. Yara örtülerinde kullanılan bu polimerlerin, uygun bozunma davranışı ve mekanik dayanım göstermesi gerekmektedir. Örneğin, PVA en eski sentetik polimerlerden biri olmasına rağmen, mükemmel biyouyumluluğu, biyobozunurluğu, mükemmel şeffaflığı, film oluşturma yetenekleri, termal stabilitesi ve kimyasal direnci nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaya devam etmektedir. Avantajlarının yanı sıra sınırlı mukavemeti, düşük termal kararlılığı ve hidrofilik olması sebebiyle sulu ortamlarda hızlı çözünmesi gibi nedenlerle çapraz bağlanma işlemi zorunlu kılınmıştır. Polimerlerin çapraz bağlanması, moleküler arası güçlü 3 boyutlu kimyasal bağların oluşması anlamına gelmektedir. Çoğunluğu toksik etki göstermekte olup birçok çapraz bağlayıcı bulunmaktadır. Örnek olarak glutaraldehit, genipin, 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid hidroklorür (EDC), asetaldehit, formaldehit sitrik asit, borik asit ve N, N-karbonildiimidazol verilebilir (P.Zahedi ve ark.,2010, Vázquez ve Martínez.,2019, Teixeira ve ark.,2020).

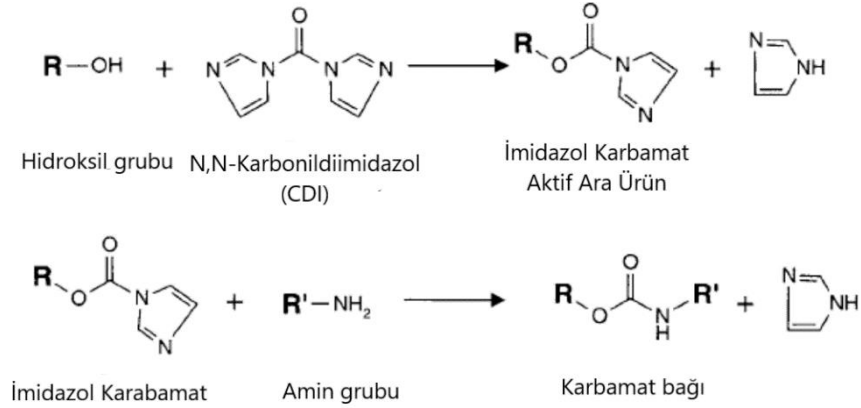
N, N-Karbonildiimidazol, iki asil imidazol ayrılan grubu içeren oldukça aktif bir karbonilleyici ajandır. CDI konjugasyon için karboksilik asitleri veya hidroksil gruplarını aktive edebilmesi ve sıfır uzunluklu amid bağları veya bir karbon uzunluklu N-alkil karbamat bağları oluşturmaları özelliği ile bilinir (Hermanson,2008).



Şekil 2.4 N,N- Karbonildiimidazol (Hermanson, 2008)

Bir hidroksil fonksiyonel grubunu aktive etmek için CDI kullanıldığında, bir -OH grubu ile reaksiyonu ile oluşturulan aktif ara madde, bir imidazol karbamatıdır. Bir amin saldırısı, imidazolu serbest bırakır, ancak karbonili serbest bırakmaz. Böylece, hidroksil içeren

moleküller, tek karbonlu spacer sonucu olarak amin içeren moleküllere bağlanarak, kararlı ürean (N-alkil karbamat) bağları oluşturur (Hermanson,2008).



Şekil 2.5 Hidroksil ve amin gruplarının N, N- Karbonildiimidazol ile çapraz bağlanması (Hermanson, 2008)

CDI reaksiyonları, susuz THF ile inert bir nitrojen ortamında yapılır. Hidroksil grubu içeren polimerler olan PVA ve poliakrilik asit literatürde yaygın bir şekilde çapraz bağlayıcı olarak karbonildiimidazol ile kullanılır (Smith ve ark.,2020). Jiménez ve San Martín, 2019’da yaptıkları bir çalışmada, elektro-eğirme yöntemi ile kolajen ve elastin doku iskeleler üretmişlerdir. Doku iskelelerini CDI kullanarak çapraz bağlanması sağlanmıştır. Glutaraldehite göre daha fazla hücre büyümesi görülmüştür. (Jiménez & San Martín, 2019). Gruppuso ve ark., hiyalüronik asit, biyoaktif laktozla modifiye edilmiş kitosan (CTL) ve polietilen oksit kullanılarak hazırlanan elektro-eğrilmiş membranlar glutaraldehit, genipin, EDC/NHS ve ısı kullanılarak çapraz bağlanmıştır. CDI ile çapraz bağlanan nanofiberlerin şişme ve bozunabilirlik açısından en iyi sonuç veren çapraz bağlayıcı olmuştur (Gruppuso ve ark.,2022).

3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve markaları

Kimyasal Adı	Markası
İpek Serisin	Sigma Aldrich
Polivinil Alkol (89.000-98.000 g/mol)	Sigma Aldrich
Polivinil Alkol (30.000-51.000 g/mol)	ZAG Kimya
Anadolu Propolisi	BEE’O
Poliüretan köpük	Pharmafoam
Üre	BioBasic
1,1- Karbonildiimidazol	Merck
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma Aldrich
Sodyum fosfat monobazik dihidrat	Riedel-de Haën
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat	Fluka
NaCl	Riedel-de Haën

3.2 Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan tüm cihazlar ve markalarına ait bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve marka bilgileri

Cihaz	Cihaz Markası ve Cihaz Modeli
Elektro-eğirme cihazı	Nanofen
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss EVO LS10
UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-Vis)	Shimadzu UV-1700
FT-IR Spektrofotometresi	Thermo Scientific NICOLET iS10
X-Işını Difraksiyonu Analizi (XRD)	PANalytical X’Pert PRO
Liyofilizatör	Heto Drywinner
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001
pH metre	HANNA HI 2211
Ultrasonik su banyosu	Bandelin SONOREX
Çalkalamalı su banyosu	N-BIOTEK NB-303
Hassas terazi	Precisa XB 220A
Hassas terazi	Sartorius CP225D
Vakumlu etüv	Binder

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve marka bilgileri (devamı)

Etüv	Binder
Mikropipet	ISOLAB
Laminar akış kabin	Faster
Çalkalamalı su banyosu	GFL
İnkübatör	Binder
Santrifüj	Himac
Vortex	Heidolph REAX Top

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 %1 (w/v) Üre Çözeltisi

İpek serisin 50-60 °C sıcaklığın altında katılaşması sebebiyle, ipek serisin çözeltisini hazırlarken kullanmak üzere %1 w/v üre çözeltisi hazırlanmıştır. 50 mL ultra saf su içerisinde 5 gram üre eklenerek homojen hale getirilmiştir (Eslah ve ark.,2016)

3.3.2 %3 (w/v) İpek Serisin Çözeltisi

Hazırlanmış olan %1 (w/v) üre çözeltisinden 8,33 mL alınarak içerisinde 0,25 gram ipek serisin konulmuştur. Isıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde 50-60 °C sıcaklık arasında homojenize olana kadar karıştırılmıştır. 2 saat sonunda homojenize %3 (w/v) ipek serisin çözeltisi elde edilmiştir.

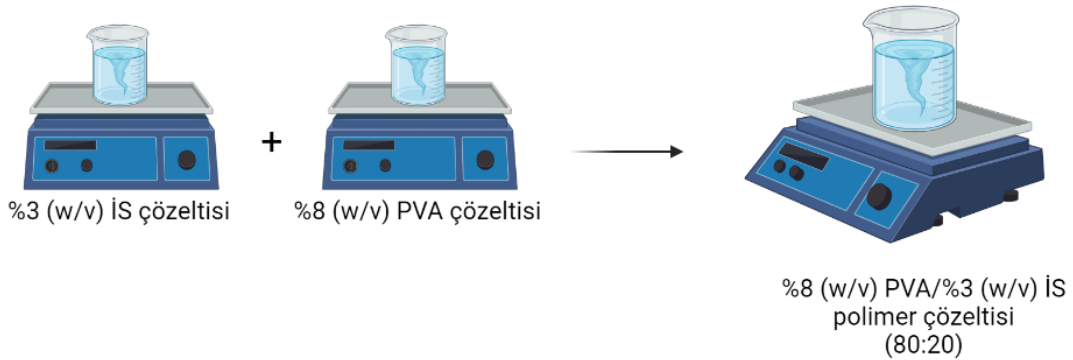
3.3.3 %8 (w/v) PVA Çözeltisi

Molekül ağırlıkları 30.000-51.000 g/mol ve 89.000-98.000 g/mol olan iki farklı polivinil alkol karıştırılarak %8 (w/v) PVA çözeltisi hazırlanmıştır. Her iki PVA'den 0,8 gram tartılmış olup, 10 mL ultra saf su içerisinde karıştırılmıştır. 2 saat boyunca 80 °C sıcaklık

ve sonrasında sıcaklık uygulanmadan 2 saat ısıtıcılı karıştırıcıda homojen çözeltiler hazırlanmıştır. Sonrasında nihai çözelti için hazırlanan çözeltilerden hacimce %70'ini 30.000-51.000 g/mol PVA ve %30'u 89.000-98.000 g/mol PVA olmak üzere karıştırılmıştır.

3.3.4 %8 (w/v) PVA /%3 (w/v) İpek Serisin (İS) Çözeltisi

(80:20) oranlarında PVA/İS çözeltileri hazırlanmıştır. 5 mL'lik PVA/İS çözeltisi için 4 mL %8 (w/v) PVA ve 1 mL %3 (w/v) İS çözeltisi karıştırılıp 50-60 °C sıcaklık uygulanarak homojenize edilmiştir.



Şekil 3.1 %8 (w/v) PVA / %3 (w/v) İS çözeltisinin hazırlanması

3.3.5 Karbonildiimidazol/Tetrahidrofuran Çapraz Bağlayıcı Çözeltisi

N, N'-Karbonildiimidazol (CDI) organik çözücü olan Tetrahidrofuran (THF) içerisinde manyetik karıştırıcı ve vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Farklı konsantrasyonlar nanofiber matlar için hazırlanmış olup, optimize edilen değer 1 gram NF mat başına 7,5 mg/mL konsantrasyon bulunmuştur.

3.3.6 Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Çözeltisi

Propolis salım, şişme ve bozunma testlerinde kullanmak üzere 0,01 M fosfat tamponlu salin çözeltisi hazırlanmıştır. 1 L ultra saf su içerisinde, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{H.Na}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaCl kimyasalları kullanılmıştır. Manyetik karıştırıcı ile homojenize edilmiştir. Sonrasında pH 7.4'e ayarlanmıştır.

3.4 Elektro-Eğirme ile PVA/İpek Serisin Nanofiber Üretimi

Hazırlanan 5 mL'lik %8 (w/v) Polivinil alkol/%3 (w/v) İpek Serisin çözeltisi 5 mL'lik şırınga içine alınmıştır. Kolektör üzeri alüminyum folyo ile kaplanıp, poliüretan köpük membranlar alüminyum folyo üzerine yapıştırılmıştır. Kullanılan şırınga ucu küt ve 21 Gauge (dış çap:0.81mm, iç çap: 0.51 mm) kalınlığındadır. Üretilen PVA/İS nanofiber matlar çapraz bağlanmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2 Elektro-eğirme cihazı

3.5 PVA/İpek Serisin Nanofiberlerin CDI ile Çapraz Bağlanması

%8 PVA (w/v) /%3 (w/v) İS çözeltisinden üretilen PVA/İS nanofiber matlar CDI ile organik çözücü olan THF içerisinde reaksiyona sokulmuştur. CDI sulu ortam içerisinde hidrolize uğradığı ve hızlıca imidazol ile CO₂ dönüşmesi sebebiyle için THF organik çözücü olarak seçilmiştir. Polivinil alkolün hidroksil (-OH) grubunu ile CDI ile aktive edilmiştir. Sonrasında imidazol karbamat adlı ara bir aktif madde ortaya çıkar. Bu ara aktif maddenin imidazol içeren diğer bir koluna ipek serisin tarafından amin saldırısı olduğunda ise imidazol serbest kalır ve amin içerikli moleküller de bağlanır. Böylece, PVA'nın hidroksil grubu ve ipek serisinin amin grubu tek karbonlu bağlayıcı (spacer) ile kararlı üretan (N-alkil karbamat) bağları oluşturur (Hermanson, 2008).

Tablo 3.3 NF mat çapraz bağlama denemeleri

PVA (w/v)	İS (w/v)	NF Mat Ağırlığı (mg)	Konsantrasyon CDI/THF (mg/mL)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon süresi (saat)
%8	%3	2	3,75	40°C	24 s
%8	%3	2	7,5	40°C	24 s
%8	%3	2	9	40°C	24 s
%8	%3	2	12	40°C	24 s
%8	%3	2	26	40°C	24 s

Tablo 3.3'te belirtildiği üzere farklı konsantrasyonlar sabit ağırlıktaki nanofiber matlar ile denenmiş olup, optimize edilen değer 7,5 mg/mL konsantrasyon bulunmuştur. Her bir NF mata 5 dakika inert gaz olan azot gazı uygulanmıştır. Sonrasında reaksiyon 40°C sıcaklığındaki etüvde 24 saat sürmüştür (Oktay ve ark.,2015). Etüvden çıkan numuneler saat başı yıkama yapılarak organik çözücü THF uzaklaştırılmıştır. Propolis yüklemesi öncesi NF matlar liyofilize edilmek üzere -20°C dondurulmuştur.

3.6 PVA/İS Nanofiber Matlara Propolis Yüklenmesi

1 cm² boyutundaki çapraz bağlanmış liyofilize NF matlara 0,05 mg/ mL, 0,01 mg/ mL ve 0,2 mg/mL konsantrasyonlarında 35 µL propolis sulu çözeltisi damlatma yolu ile emdirilmiştir. Propolis yüklemesi sonrasında liyofilize edilen matlar karakterizasyonlar için +4 °C'de saklanmıştır.

3.7 Üretilen Yara Örtü Malzemesinin Karakterizasyonu

PVA, İS ve propolis ekstrakt içeren yara örtü malzemesi fizikokimyasal ve morfolojik analizler ile karakterize edilmiştir. Daha sonra salım ve bozunma testleri de yapılmıştır.

3.7.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Görüntüleme öncesi liyofilize PVA/İS NF matlar Au-Pd alaşımı ile kaplanmış olup, iletken hale getirilmiştir. Oluşan nanofiberlerin ortalama çap ve çap dağılımları taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir (Eslah ve ark., 2016; Eskandarinia ve ark., 2020).

3.7.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Toz malzemeler PVA, İS, CDI ve üretilen ürünler olan PVA/İS NF matlar PVA/İS/CDI NF matlar (çapraz bağlı) ve PVA/İS/CDI/PRO NF matların (çapraz bağlı propolis yüklü) fonksiyonel grup analizleri aşağıda 400-4000 cm⁻¹ dalga boyları aralığında FT-IR spektroskopisi ile fonksiyonel grup analizleri yapılmıştır. Malzemelerin tek başına formlarının fonksiyonel grup geçirgenlikleri (transmittance) ile karşılaştırılıp, malzemeler arası etkileşim FT-IR spektroskopisi ile analiz edilmiştir (Eslah ve ark., 2016).

3.7.3 Şişme Testi

Liyofilize edilmiş PU-PVA/İS/CDI/PROP NF matlar 0,01 M PBS çözeltisi içerisine yerleştirilmiştir. 37 °C derece sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda 150 rpm’de bekletilmiştir. Kuru ağırlıkları (0. saat) tartılmıştır. Çalkalamalı su banyosuna yerleştirildikten sonra belirli saatlerde tartım yapılmıştır. Elde edilen ağırlıklar ile zamana bağlı şişme grafiği çizilmiştir. Şişme testi iki tekrarlı yapılmış olup, hesaplamalar ortalama ağırlıklara göre yapılmıştır. NF matların şişme oranı eşitlik 3.1’de verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (Shi ve ark., 2012, Adeli ve ark.,2018 Eskandarinia ve ark., 2020).

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{SRW - SRD}{SRD} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada SRW nanofiber matların ıslak ağırlıklarını, SRD ise kuru ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.7.4 Bozunma Testi

Liyofilize edilmiş çapraz bağlı propolis yüklü PVA/İS/CDI/PROP NF matlar, 0,01 M PBS çözeltisi içerisine yerleştirildi. 37 °C derece sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda 150 rpm’de bekletildi. Kuru ağırlıkları (0.saat) tartılmıştır. Yerleştirdikten 1.,7. ve 21.günlerde kurutulup tartım yapılmıştır. Eşitlik 3.2’de verilen yüzde kalana ağırlık formülü ile hesaplanmıştır ve zamana bağlı kaybedilen ağırlık (bozunma) grafiği çizilmiştir. Bozunma testi iki tekrarlı yapılmış olup, hesaplamalar ortalama ağırlıklara göre yapılmıştır. (Shi ve ark., 2012, Adeli ve ark.,2019 Eskandarinia ve ark., 2020).

$$Kalan\ ağırlık\ (\%) = \frac{W_t}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada W_t nanofiber matların t zamanındaki ağırlığını, W_0 ise nanofiber matların 0. anındaki ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.7.5 *In-vitro* Propolis Salım Testi

Propolis salım testi için PVA/İS/CDI/PRO NF matların 37°C'lik PBS çözeltisine ekleyip 150 rpm çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. Farklı zamanlarda numuneden alınan örneklerin propolis miktarı UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak ile miktar tayini yapılmıştır. Eşitlik 3.3'te verilen yüzde kümülatif salım ile hesaplanmıştır (Eskandarina et al., 2019).

$$Kümülatif\ salım\ (\%) = \frac{Toplam\ salınan\ propolis\ (mg)}{Başlangıçta\ yüklenen\ propolis\ (mg)} \times 100 \quad (3.3)$$

3.8 Üretilen Yara Örtüsü Malzemesinin Biyolojik Aktivite Testleri

3.8.1 Biyoyumluluk Testi

3.8.1.1 Fibroblast hücrelerinin kültürünün oluşturulması:

Yara örtü malzemelerinin biyoyumluluk testleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik bölümü, hücre kültürü ve doku mühendisliği laboratuvarındaki kriyobanktan temin edilen fare fibroblast hücreleri (L929) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fibroblastların kültüre edilmesi için %10 FBS ve %1 penisilin streptomisin içeren DMEM/F12 büyüme ortamı ve %5 CO₂, %95 nem ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatör şartları kullanılmıştır. Hücrelerin görüntülenmesinde invert mikroskop kullanılmıştır. Fibroblast hücreleri 75T flask yüzeyinde %70-80 hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %0,25'lik tripsin-EDTA kullanılarak toplanmıştır. Tripsinize edilmiş hücreler büyüme ortamı içinde yeniden süspanse edilmiş olup daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre pelletine 1 mL büyüme ortamı eklenerek Thoma lamında tripan mavisi ile hücre sayımı yapılmıştır (Neamnark vd., 2007). Biyoyumluluk testi için gerekli hücre sayısı süspanse edilerek kullanılmış olup diğer hücrelerin kültürü aynı şartlar kullanılarak devam ettirilmiştir.

3.8.1.2 İndirekt hücre canlılık analizi

PVA/İS/CDI NF ve üç farklı konsantrasyonda propolis (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL ve 0,2 mg/mL) yüklenen PVA/İS/CDI/PROP NF matlar biyoyumluluk özellikleri ISO-10993-5 standardına göre test edilmiştir (ISO-10993-5). Hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek amacıyla sık kullanılan ve kolorimetrik bir analiz olan MTT testi kullanılarak hücre canlılığı analizi yapılmıştır (Adeli ve ark., 2018; Eskandarina ve ark., 2020). MTT testinde ortama verilen sarı tetrazolyum tuzu canlı hücreler tarafından indirgenerek mor renkli formazana dönüşmektedir. Oluşan formazan kristallerini çözdürmek için genellikle DMSO kullanıldığı bildirilmektedir. Çözdürülen formazan kristallerinin yoğunluğu hücre canlılığının hesaplanmasında kullanılmaktadır (Gerlier ve Thomasset, 1986).

Hücre canlılık analizinde kullanılmaları için 1x1 cm'lik boyutlarda kesilen yara örtü malzemeleri, UV ile 45 dakika boyunca sterilize edilmiştir ve ardından steril koşullarda (laminer flow kabinde) hücre büyüme ortamı içeren (6 mL) falkonlara aktarılmıştır. Bu falkonlar 130 rpm ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre konulmuş ve 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. 1., 2. ve 3. gün sonlarında yara örtü malzemelerinin ekstraktlarından örnekler alınmış ve hücre canlılık analizinde kullanılmak üzere +4 ° C'de saklanmıştır.

Elde edilen ekstraktlarda bulunan (yara örtü malzemelerinden zamana bağlı olarak salınan) bileşenlerin hücre canlılığına etkileri MTT testi ile incelenmiştir. Bu test için 96 kuyulu plakaların her kuyusuna 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Plakalar %5 CO₂, %95 nem ve 37 °C şartlarında 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu ortamı taze besi yeri ile değiştirilirken deney grupları yara örtü malzemelerine ait 1., 2. ve 3. gün ekstraktları ile değiştirilmiştir. Her grup için üç tekrarlı çalışılmıştır. Hücreler inkübasyon koşullarında 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra plakaların her bir kuyusuna 10 µL MTT solüsyonu (10 mg/mL) eklenip ve plakalar karanlık inkübasyon koşullarında 4 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda canlı hücrelerde meydana gelen ve suda çözünmeyen mor renkli formazanı çözdürmek için her bir kuyuya 100 µL DMSO eklenip ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalardaki optik yoğunluk mikroparka okuyucu ile 570 nm'de ölçülmüştür. Her grup için tüm değerler, ortalama $\pm$ SD'ler alınarak hesaplanmıştır (n=3). Eşitlik 3.4'te verilen formül kullanılarak yara örtü malzemelerinin hücre canlılığına etkisi (%) kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Ayrıca deney gruplarının kendi aralarında hücre canlılığına etkileri karşılaştırılmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.8.2 *In-vitro* Yara İyileşmesi Analizi (Scratch Assay)

PVA/İS/CDI NF ve üç farklı konsantrasyonda propolis (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL ve 0,2 mg/mL) yüklenen PVA/İS/CDI/PROP NF matlar *in-vitro* yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla hücre göçü deneyi (çizik testi) yapıldı (Pijuan vd., 2019). Biyouyumluluk analizinde kullanılmak üzere hazırlanan, yara örtü malzemelerine ait 1., 2. ve 3. gün ekstraksiyon ortamları bu test için tekrar hazırlanmıştır.

In-vitro yara iyileşmesi analizi için öncelikle 6 kuyulu plakalarda iki boyutlu bir yara modeli oluşturulmuştur. Bunun için de plakanın her bir kuyusuna 3×10^5 sayıda fibroblast hücresi ekilip ve hücreler 24 saat boyunca inkübasyon şartlarında bekletildi. Bu süre sonunda 200 µL'lik steril bir pipet ucuyla kuyularda çizik atılarak hücresiz alanlar oluşturuldu. Çizik sonrası kuyulardaki hücre artıklarını uzaklaştırmak için ortam aspire edilip ve PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kontrol grubu kuyularına taze besiyeri, deney grubu kuyularına da ekstraksiyon ortamları eklenmiştir. Kuyuların 0. saat, 6.saat, 24. ve 48. saat inkübasyon sonrasındaki görüntüleri faz kontrast mikroskobu kullanılarak izlendi ve yara alanı Image J yazılımı kullanılarak ölçüldü. Yara kapanma yüzdesi eşitlik 3.5'te verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yara kapanması} = \frac{G(0) - G(t)}{G(0)} \times 100 \quad (3.5)$$

Burada $G(0)$ 0. saat anında ölçülen yara alanı, $G(t)$ ise çizikten t saat sonraki yara alanını ifade etmektedir.

3.8.3 Antibakteriyel Aktivite Testi

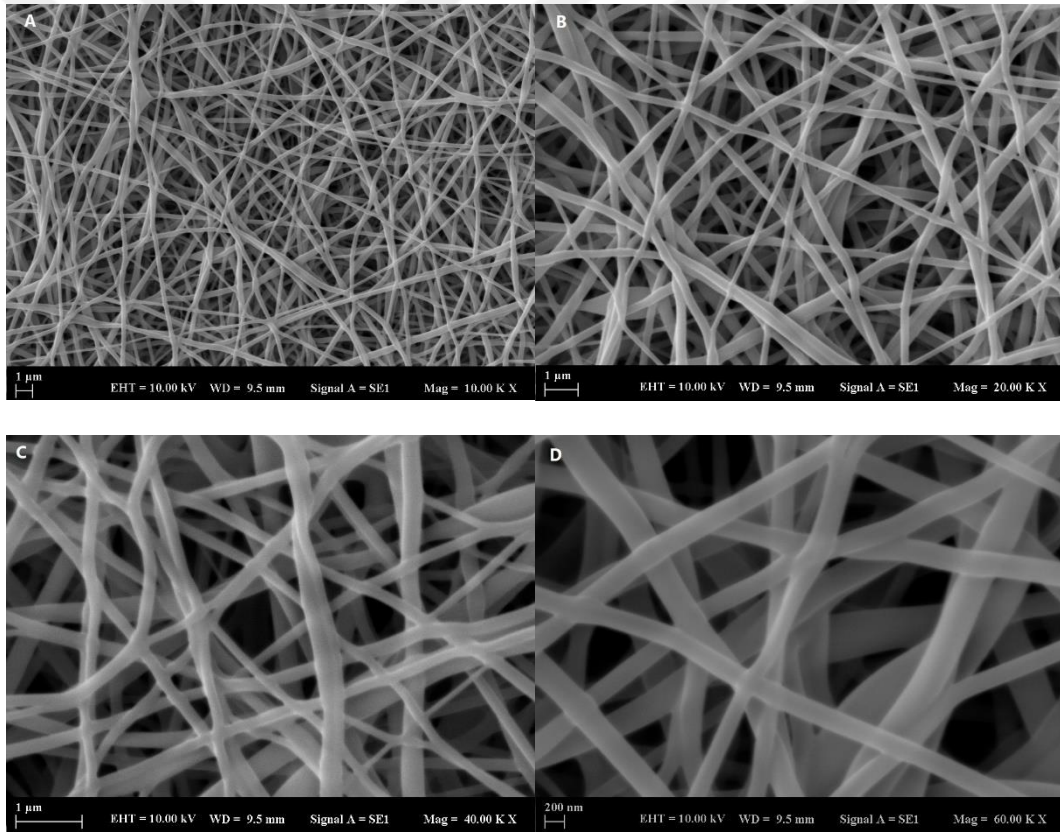
Kronik yara oluşumunun ilk aşamalarında Gram-pozitif organizmalar, özellikle *S. aureus* baskındır. Daha sonraki aşamalarda, Gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* türleri gözlenir ve derinin daha derin katmanlarını istila etme eğiliminde olup önemli doku hasarına neden olur (Simões ve ark.,2018) Bu sebeple yara örtü malzemesinin antibakteriyel aktivitesi başlıca inhibisyon bölge testi ile Gram-negatif bakteri olan *E. coli* ve Gram-pozitif bakteri olan *S. aureus* üzerinde belirlenmiştir. *E. coli* ve *S. aureus* stok kültürlerden birer koloni alınarak alınan bakteriler 3 mL Mueller Hinton Broth sıvı

kültürüne inoküle edilmiştir. 37 °C etüvde 16-18 saat inkübe edilmiştir. Inkubasyon sonrası elde edilen hücre kültürleri seyreltilerek 10⁸ CFU/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. MHA agar üzerine, hücre sayısı 10⁸ CFU/mL olan *E. coli* ve *S. aureus*, 100 µl olacak şekilde ayrı ayrı petrilere damlatılmış daha sonra petrilerde boşluk kalmayacak şekilde swab ile yayılmıştır. Petriler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bakterilerin yayıldığı petrilere PVA/İS/CDI NF matlar ve PVA/İS/CDI/PROP NF matlar yerleştirilmiştir ve 37 °C etüvde 18 saat inkübe edilmiştir. Bir sonraki gün yara örtü malzemesinin antibakteriyel aktivite gösterdiği (inhibisyon) bölgesi (clearance zone) hesaplanmıştır (Adeli et al., 2018; Eskandarina et al., 2020).



4.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

PVA/İS nanofiber matlar SEM ile analiz edilmiştir. Şekil 4.1'deki görüntülerde görüldüğü üzere boncuksuz ve homojen nanofiberler elektro-eğirme yöntemi ile elde edilmiştir. ImageJ programı ile rastgele seçilen 100 adet PVA/İS nanofiber çapları ölçülmüştür. Ortalama NF çapı 204.53 nm, minimum NF çapı 86.33 nm, maksimum NF çapı 376 nm ölçülmüştür.



Şekil 4.1 PVA/İS nanofiber görüntüleri (A) 10.000x büyütme, (B) 20.000x, büyütme (C) 40.000x büyütme ve (D) 60.000x büyütme

Tablo 4.1'de görüldüğü üzere farklı voltaj, akış hızı ve şırınga ucu-kolektör arası mesafe değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Optimum koşullar akış hızı 1 mL/saat, voltaj 21 kV ve şırınga ucu-kolektör uzaklığı 12 cm olacak şekilde bulunmuştur. Optimum koşullar sağlandığında Taylor konisi ve polimer jeti oluşmuştur. Voltajın 21 kV üzerine çıkması

elektrospreylemeye ve boncuklu fiber oluşumuna sebep olmuştur. Bu da fiber çapında artış anlamına gelmektedir (Mishra ve ark., 2018). Aynı zamanda voltajın 21 kV altında olması da şırınga ucunda büyük damlalara sebep olup, polimer çözeltisinin kaybına sebep olmuştur. Kritik voltajın 21 kV olduğuna kanaat getirilmiştir. Akış hızının 1,5 mL/saat olması ile fiber çapında artış, damla oluşumu gözlenmiştir (Megelski ve ark.,2002). Uzaklık 12 cm üzerine çıktığında oluşan fiberler kolektöre ulaşamamıştır.

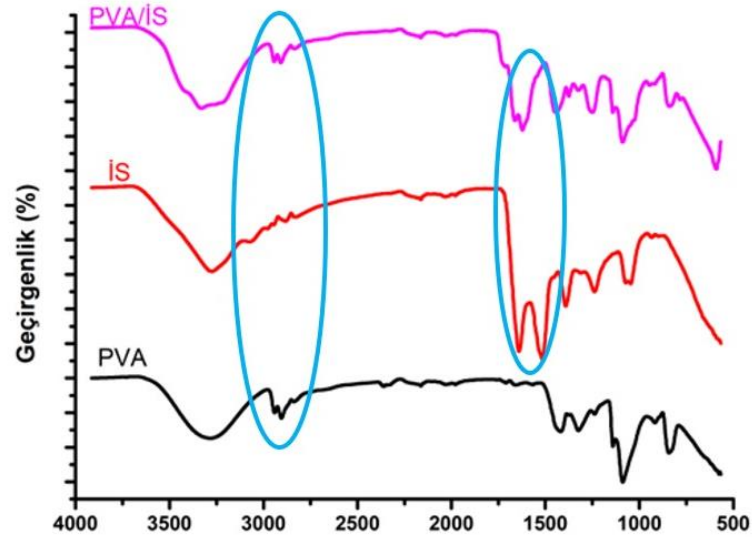
Tablo 4.1 Elektro-eğirme denemeleri

Voltaj (kV)	Akış hızı (mL/saat)	Uzaklık (cm)	Şırınga İğnesi (Gauge)
27	1,5	12	21
27	1	15	21
21	1,5	15	21
21	1	12	21
18	1	12	21
18	1,5	15	21

Eslah ve ark., elektro-eğirme yöntemi ile üretilen,PVA/İS nanofiberlerini 365-426 nm çaplarında elde etmişlerdir (Eslah ve ark., 2015). Chao ve ark., elektro-eğirme yöntemi ile üretilen PVA/İS kompozit nanofiberlere tigesiklin antibiyotiği entegre etmişlerdir.Bu çalışmada ise ortalama nanofiber çapı 356 nm olarak bulunmuştur (Chao ve ark.,2018). Yan ve ark., elektro-eğirme yöntemi ile PVA/İS nanofiberlerin üretilmesi ve A549 hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi üzerindeki etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada ortalama nanofiber çapını 200 nm olarak elde etmişlerdir (Yan ve ark.,2017). Üretilen PVA/İS nanofiberlerin çap ve çap dağılımları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

4.2 Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Yara örtü malzemesi üretiminde kullanılan malzemeler olan toz malzemeler PVA, İS, CDI ve üretilen ürünler olan PVA/İS nanofiber matlar, PVA/İS/CDI (çapraz bağlı) nanofiber matlar ve PVA/İS/CDI/PRO (çapraz bağlı ve propolis yüklü) nanofiber matların fonksiyonel grup analizleri aşağıda Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

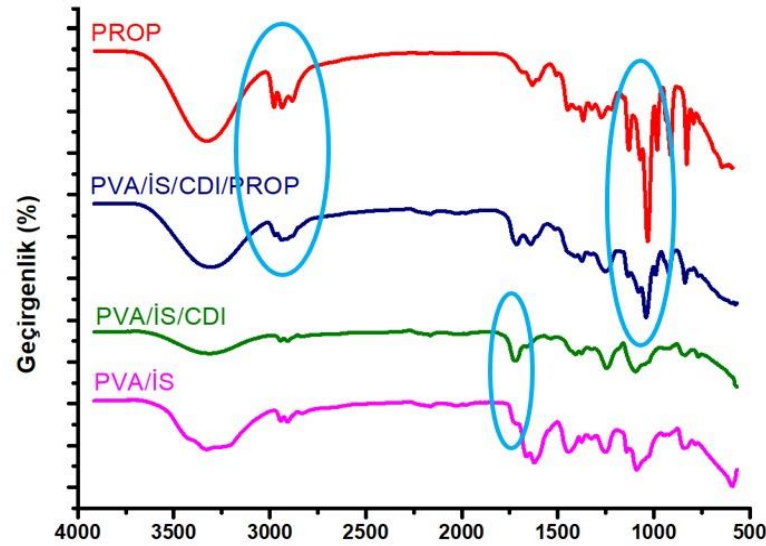


Şekil 4.2 PVA/İS, İS ve PVA'nın karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

PVA toz numunesinde, $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ arasında oluşan O-H gerilme bandı 3285 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. $3000-2840\text{ cm}^{-1}$ arasında oluşan 2941 cm^{-1} bandı alkil C-H gerilmesine aittir. Asetat grupları sebebiyle oluşan C-O gerilme titreşimi 1720 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1418 cm^{-1} 'de oluşan pik C-H gerilmesine, 1324 cm^{-1} oluşan pik C-H deformasyonuna, 1088 cm^{-1} oluşan pik C-O gerilmesine ve 842 cm^{-1} C-C gerilmesine aittir (Eslah ve ark.,2013, Kharazmi ve ark.,2015).

İpek serisin toz numunesinde (İS) $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunan N-H eğilme titreşimi sebebiyle oluşmuştur. O-H gerilme bandı ise $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunduğu için N-H eğilme bandı ile üst üste binmiştir. Bu sebeple N-H eğilme ve O-H gerilme sonucu oluşan pik 3272 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır. $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ bandında bulunan C=O'nun gerilme titreşimini 1641 cm^{-1} (amid I) piki, $1580-1510\text{ cm}^{-1}$ bandında bulunan N-H eğilmesinin varlığını 1515 cm^{-1} (amid II) piki ile doğrulanmıştır. C-N gerilmesi (amid III) 1392 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Eslah ve ark., 2013, Saha ve ark.,2019).

Polivinil alkol/İpek serisin nanofiber matlar (PVA/İS) görüldüğü üzere, PVA'da bulunmayan amid I $1610-1695\text{ cm}^{-1}$ aralığında (C=O gerilme) ve amid III için 1441 cm^{-1} 'de (C-N gerilme) pik gözlenmiştir. PVA ve PVA/İS NF matlar karşılaştırıldığında PVA/İS nanofiber spektrumunda amid II'ye ait 1515 cm^{-1} pik gözükmemektedir. Bunun sebebi serisinin amid grupları ile PVA'nın -OH grupları arasındaki etkileşimin daha yüksek olmasıdır (Eslah ve ark., 2013).



Şekil 4.3 Serbest propolis, PVA/İS/CDI/PROP, PVA/İS/CDI ve PVA/İS'nin karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

Çapraz bağlı polivinil alkol/ipek serisin NF matlar (PVA/İS/CDI), 1717 cm^{-1} 'de bulunan ve çapraz bağlama sonucu oluşan karbamat bağının sebep olduğu pik karşımıza çıkmaktadır. Bu pik PVA/İS NF matların çapraz bağlandığı anlamına gelmektedir. Bunun yanı sıra karbonildiimidazol ile hidroksil gruplarının neden olduğu bant yoğunluğunu azaltması ile karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında PVA/İS ve PVA/İS/CDI karşılaştırıldığında amid bantlarının yoğunluğunun azaldığını görülmektedir. -OH ve amid bantlarının yoğunluklarının azalmasına sebep olarak karbonildiimidazolün, polivinil alkolün -OH gruplarına bağlanırken bir yandan da ipek serisinin amin gruplarına bağlanarak polimerleri çapraz bağlaması düşünülmektedir (Elschner ve ark., 2018).

Son olarak nihai ürün olan çapraz bağlı ve propolis yüklü polivinil alkol/ipek serisin nanofiber matlar (PVA/İS/CDI/PRO), polivinil alkol ve ipek serisinde bulunan ve fenol bileşiklerin O-H gerilmesinden dolayı 3427 cm^{-1} 'de bant göstermiştir. Propolis kaynaklı C-H gerilmesi 2938 cm^{-1} 'de ve aromatik eter C-O-C bağının gerilmesi 1039 cm^{-1} 'de pik olarak karşımıza çıkmaktadır (Hegazi ve ark.,2019). Sonuç olarak spektrumda analiz edilen malzemelerin fonksiyonel gruplarına ait bantlar net olarak FT-IR spektrumlarında gözlenmiştir.

4.3 Şişme Testi

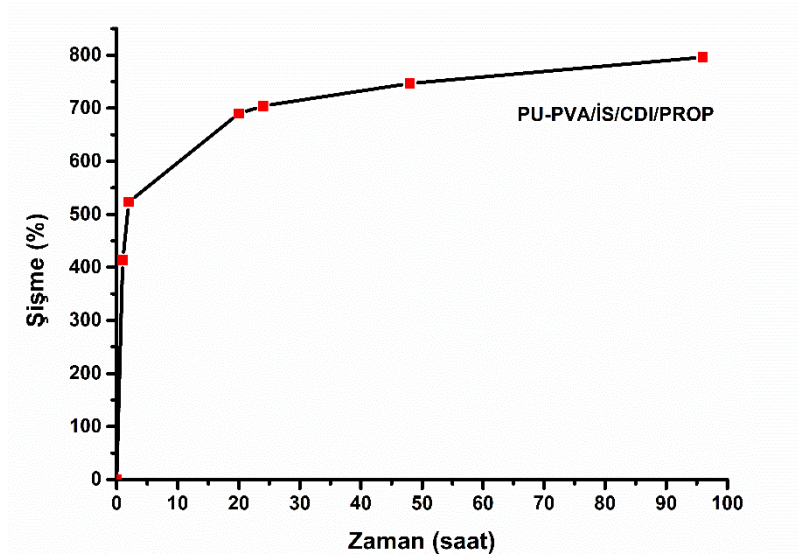
Yarada oluşabilecek eksüda sebebiyle yara örtü malzemesinin şişme oranı bir diğer deyişle sıvı absorplama yeteneği büyük önem taşımaktadır. İdeal bir yara örtü malzemesinin sıvı alımı %100-900 arasında değişmektedir (Adeli ve ark., 2018). Aşağıda

verilen Tablo 4.2’de görüldüğü üzere belirli aralıklarla çalkalamalı su banyosunda PBS içerisinde bulunan PU köpük membran ve PVA/İS/CDI nanofiber matların ağırlıkları ölçülmüştür.

Tablo 4.2 PU-PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların zamana bağlı şişme-ağırlık tablosu

Zaman (saat)	PU-PVA/İS/CDI/PROP NF Ağırlık (mg)
0	52,14
1	267,95
2	325,05
20	411,9
24	419,40
48	441,5
96	467,2

PU-PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların zamana bağlı şişme-ağırlık bilgileri Tablo 4.2’deki gibidir. Bu bilgilere bağlı olarak şişme oranı hesabına göre PU-PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların ve yüzde şişme (%) – zaman (saat) grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.4 PU-PVA/İS/CDI NF matların zamana bağlı (%) şişme grafiği

Polivinil alkol ve poliüretan hidrofilik polimerlerdir. Yapılarında hidroksil grup bulundurulur. İpek serisin de yapısında bulundurduğu hidroksil, karboksil ve amino

grupları sayesinde hidrofilik yapıya sahiptir. Bu sebeple su tutma kapasiteleri yüksek polimerlerdir. Hidrofilik yapıları yanı sıra nanofiber matın yapısındaki nano ve mikro gözenekler sayesinde de 96.saatte %796,04 şişme oranına ulaştığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (Mandal ve ark., 2009, Khan 2014, Eslah ve ark.,2015, Adeli ve ark.,2018, Bakhsheshi-Rad ve ark.,2020).

4.4 Bozunma Testi

Üretilen PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matlar hidrofilik olmaları ve yüzey alanlarının geniş olması sebebiyle, CDI ile çapraz bağlanmadan önce, su ve PBS ile temas haline geçtikleri anda erimişlerdir. PVA/İS NF matlar çapraz bağlama reaksiyonuna tabii tutularak mekanik dayanımın sağlanması amaçlanmıştır.

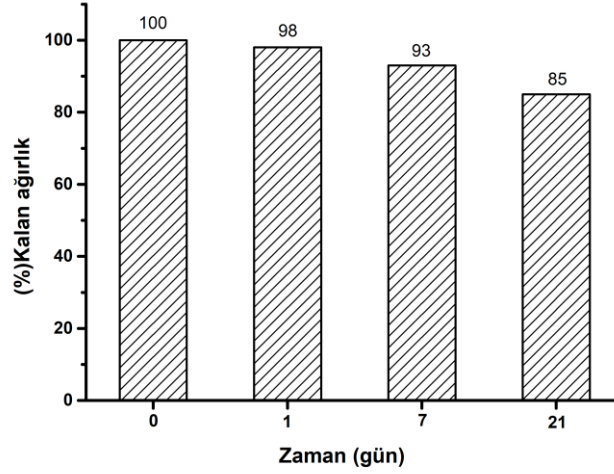
Aşağıda verilen Tablo 4.3'te görüldüğü üzere belirli aralıklarla çalkalamalı su banyosunda pH 7.4 olan PBS içerisinde bulunan PVA/İS/CDI/PROP NF matların ağırlıkları kurutularak tartılmıştır. Eşitlik 3.2'de verilen (%) kalan ağırlık formülü ile grafik çizilmiştir.

Tablo 4.3 Zamana bağlı ağırlık tablosu

Zaman (gün)	Ağırlık (mg)
0	9,00
1	8,82
7	8,37
21	7,65

PVA/İS/CDI/PROP NF matların ortalama kuru ağırlıkları 9,00 mg olarak tartılmıştır. PBS çözeltisi içerisinde 1, 7 ve 21 gün çalkalamalı su banyosunda 150 rpm'de bekletilmişlerdir. 1., 7. ve 21. günlerde numuneler dondurulup, liyofilize edilmiş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır. Şekil 4.5'te de görüldüğü üzere elde edilen ölçümlere göre PVA/İS/CDI/PROP NF matlar 21 gün sonunda ağırlıklarının ortalama %15'ini kaybetmişlerdir. Kütle kaybının sebebi olarak PVA ve İS polimerlerinin hidrofilik yapıda

olmaları ve ipek serisinin PBS çözeltisi içerisinde salım gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Adeli ve ark.,2018, Mandal ve ark.,2018).



Şekil 4.5 PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların zamana bağlı (%) kalan ağırlık grafiği

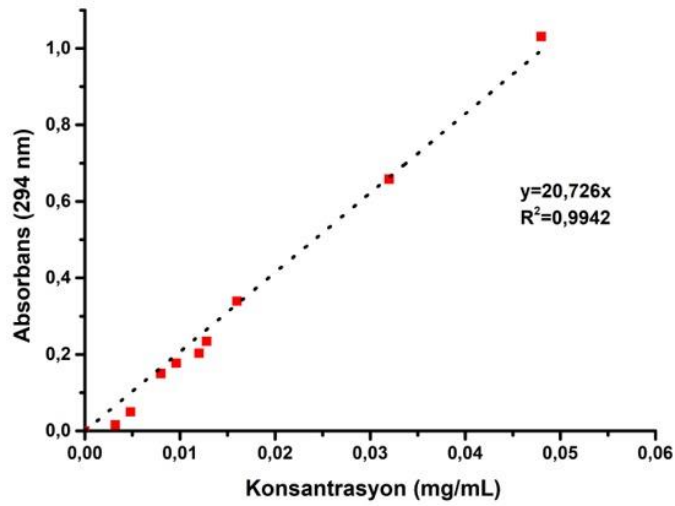
Mandal ve ark., elektro-eğirme yöntemi ile üretilen PVA/İS nanofiberler 30 gün PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. NF matlar 30 gün sonunda %15-18'lik bir kütle kaybı yaşamışlardır. PVA matların PBS çözeltisi içerisinde stabil kaldığı fakat PVA/İS NF matların ipek serisinin zamanla salımının gerçekleşmesi sebebiyle kütle kaybı yaşanmıştır (Mandal ve ark.,2018). Üretilen PVA/İS/CDI/PROP nanofiberlerin zamana bağlı bozunma davranışları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

4.5 In-vitro Propolis Salım Testi

Propolis salım testi için, Tablo 4.4'te görüldüğü üzere 0,0032-0,048 mg/mL arasındaki farklı konsantrasyonlarda propolis-su çözeltilerinin 294 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. 294 nm olmasının sebebi Anadolu propolisi içerisindeki fenolik maddeler 280-320 nm arasında pik vermektedir (Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013).

Tablo 4.4 Propolis-su kalibrasyon eğrisi için alınan değerler

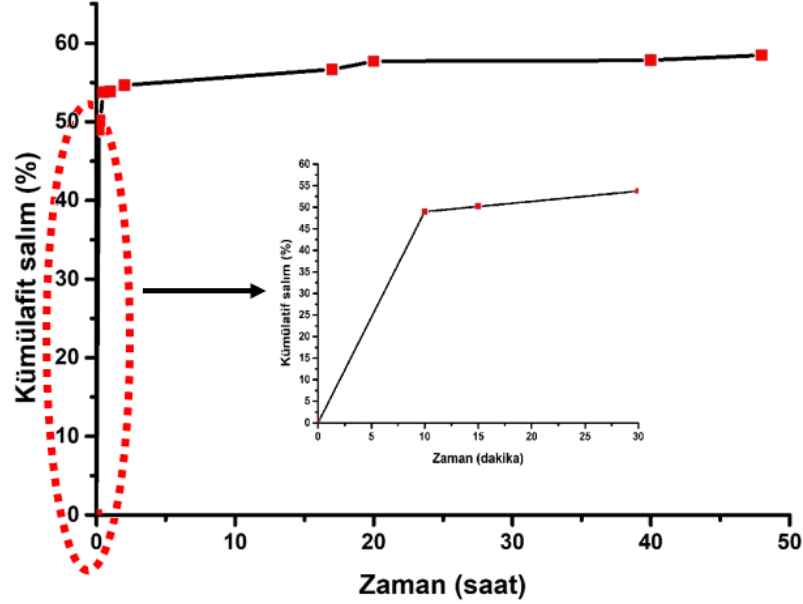
Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans (294 nm)
0,0032	0,016
0,0048	0,05
0,008	0,15
0,0096	0,177
0,0120	0,203
0,0128	0,234
0,016	0,339
0,032	0,658
0,048	1,031



Şekil 4.6 Propolis-su kalibrasyon eğrisi

Farklı zamanlarda propolis yüklü PVA/İS nanofiber matın salım ortamından alınan örneklerin UV-Görünür bölge spektrofotometresi absorbans ölçümü yapılmıştır. Alınan ölçümler ile NF mattan salımı gerçekleşen propolis miktarı Şekil 4.6’da verilen

kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Salımı gerçekleşen propolis miktarının, Eşitlik 3.3'te verilen yüzde kümülatif salım hesabı ile grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.7 48 saatlik propolis salım grafiği

Şekil 4.7'da görüldüğü üzere, ilk yarım saat içerisinde yüklenen propolisin kümülatif olarak %53,7'si salınmıştır. İlk 10 dakika içerisinde ani salım (burst release) olduğu gözlemlenmiştir. İlk 48 saatte meydana gelen saf propolisin kümülatif salım grafiği verilmektedir. İlk 30 dakikada meydana gelen %53,7 propolis salımı sonrasında zamana bağlı olarak dramatik bir artış gözlenmemiştir. 48 saat sonunda kümülatif salım %58,5'e ulaşmıştır.

Yüklenen propolisin yarısından fazlasının ilk 30 dakika içerisinde salmasının nedeni propolisin çapraz bağlı PVA/İS nanofiber matlara damlatma/emdirme yolu ile entegre edilmiş olmasıdır. Bir diğer deyişle, propolisin çapraz bağlı PVA/İS nanofiber matın yüzeyinde bulunmasıdır. Ani salıma iki farklı yorum getirilebilir. Uzun vadeli kontrollü salımda olumsuz bir sonucu olarak kabul edilebilirken belirli durumlarda hızlı serbest bırakma veya yüksek başlangıç oranları istenebilir. Bir diğer deyişle, yaranın tedavisi için ani salım gerçekleşmesi yara bölgesinin direkt yara örtüsü ile temas anında başlaması sebebiyle avantajlı bir durum haline gelebilmektedir. (Huang ve Brazel, 2001).

Khoshnevisan ve ark., propolis emdirilmiş selüloz asetat/polikaprolakton nanofiber matların üretilmesi ve bu fiberlerin antibakteriyel ve antioksidan etkinliklerini

incelemişlerdir. Bu çalışmada emdirilmiş propolisin hızlı bir şekilde salınması ve bakterilerin nanofiberlerin yüzeyine absorbe olmaları nedeniyle, serbest propolisten daha düşük propolis değerine sahip olmalarına rağmen benzer antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Sonuç olarak propolis emdirilmiş NF matın, enfekte yaraları tedavi etmede etkili olabileceğini doğruladı. (Khoshnevisan ve ark.,2019). Üretilen propolis yüklü PVA/İS/CDI nanofiberlerin zamana bağlı propolis salım davranışları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

4.6 Üretilen Yara Örtü Malzemesinin Biyolojik Aktivite Testleri

4.6.1 Biyouyumluluk Testi

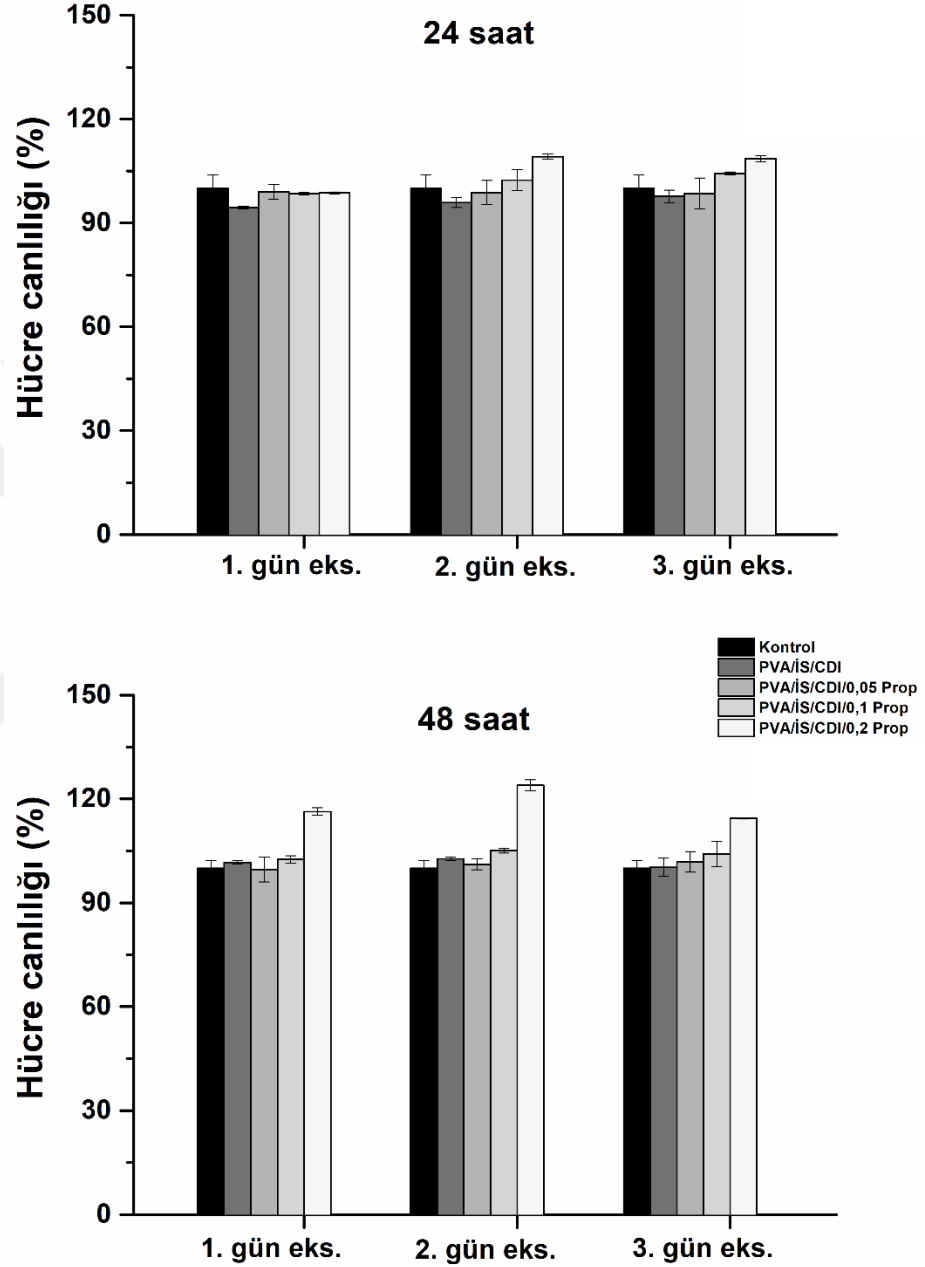
4.6.1.1 İndirekt Hücre Canlılık Analizi

Hücre canlılığını tayin etmek için PVA/İS/CDI NF matların ve üç farklı propolis konsantrasyonu (0,05, 0,1 ve 0,2 mg/mL) uygulanmış PVA/İS/CDI/PROP NF matların 1., 2. ve 3. gün ekstraktlarından örnek alınmıştır. Alınan ekstrakt örnekleri L929 fibroblast hücreleri ile muamele edilmiş ve analiz gerçekleştirilmiştir. (%) Hücre canlılığı formülü kullanılarak yara örtü malzemelerinin hücre canlılığına etkisi kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Şekil 4.8’de gösterildiği gibidir. 24.saat ve 48.saat kontrol grubu hücre canlılığı (%) %100 olarak kabul edilmiştir.

24.saatte, 1.,2. ve 3. gün PVA/İS/CDI NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %93,48, %94,87 ve %96,70 hesaplanmıştır. 1., 2. ve 3. gün PVA/İS/CDI/0,05 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %97,07, %96,82 ve %96,52 olarak, PVA/İS/CDI /0,1 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %95,48, %99,39 ve %101,34 ve PVA/İS/CDI/0,2 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %94,69, %105,18 ve %104,63 olarak hesaplanmıştır.

48.saatte 1.,2. ve 3. gün PVA//CDI NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %100,73, %101,74 ve %99,26 hesaplanmıştır. 1., 2. ve 3. gün PVA/İS/CDI /0,05 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %97,64, %99,15 ve %99,88 olarak, PVA/İS/CDI/0,1 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %99,55, %102,07 ve %101,12 ve PVA/İS/CDI/0,2 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %112,39, %120 ve %110,39 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre tüm NF matlar %94 ve üzeri hücre canlılığı gösterdiği için üretilen NF matlar oldukça biyoyumludur. Nihai ürün olan 0,2 mg/mL propolis konsantrasyonu yüklenmiş PVA/İS/CDI/PROP NF mat en fazla (%) hücre canlılığı sağlayan konsantrasyon olarak bulunmuştur.

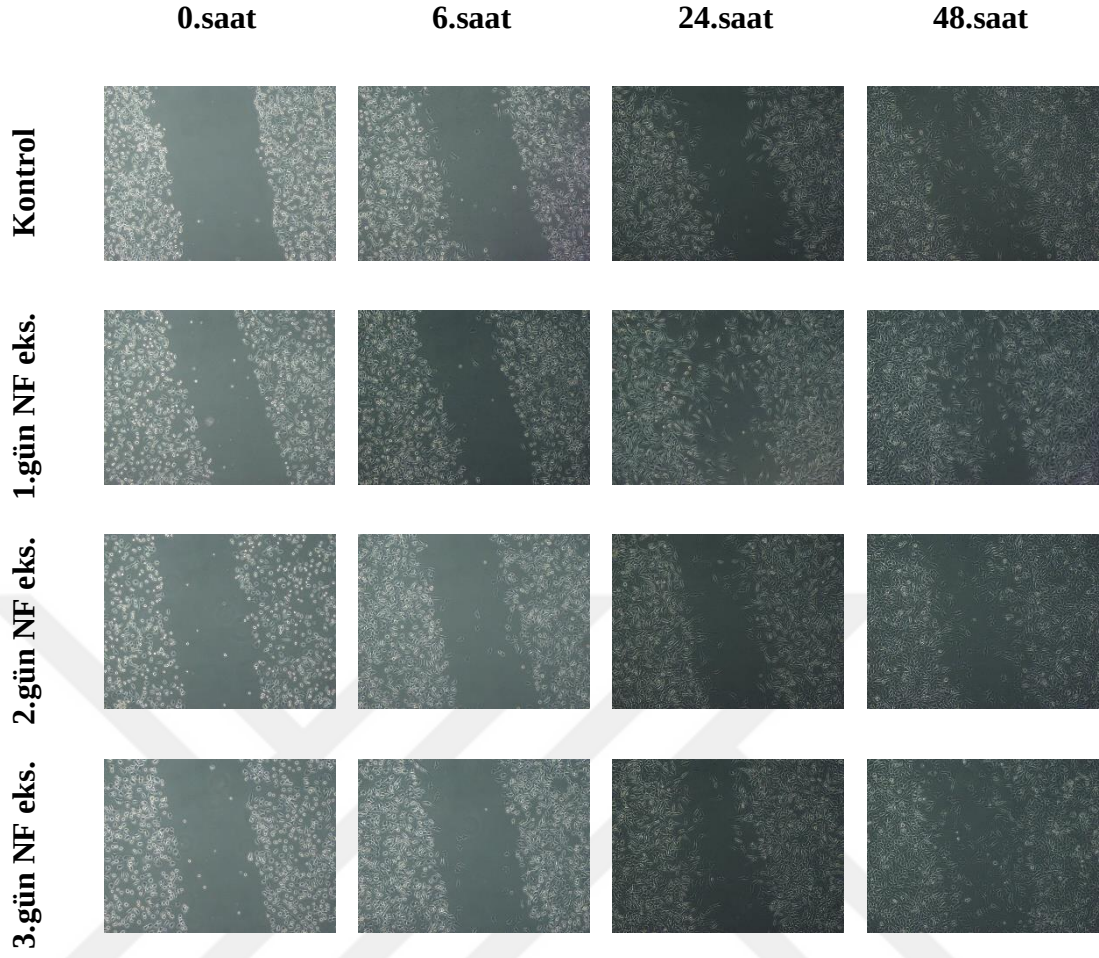


Şekil 4.8 PVA/İS/CDI NF ve PVA/İS/CDI/PROP NF’lerin zamana bağlı hücre canlılığı (%) grafiği

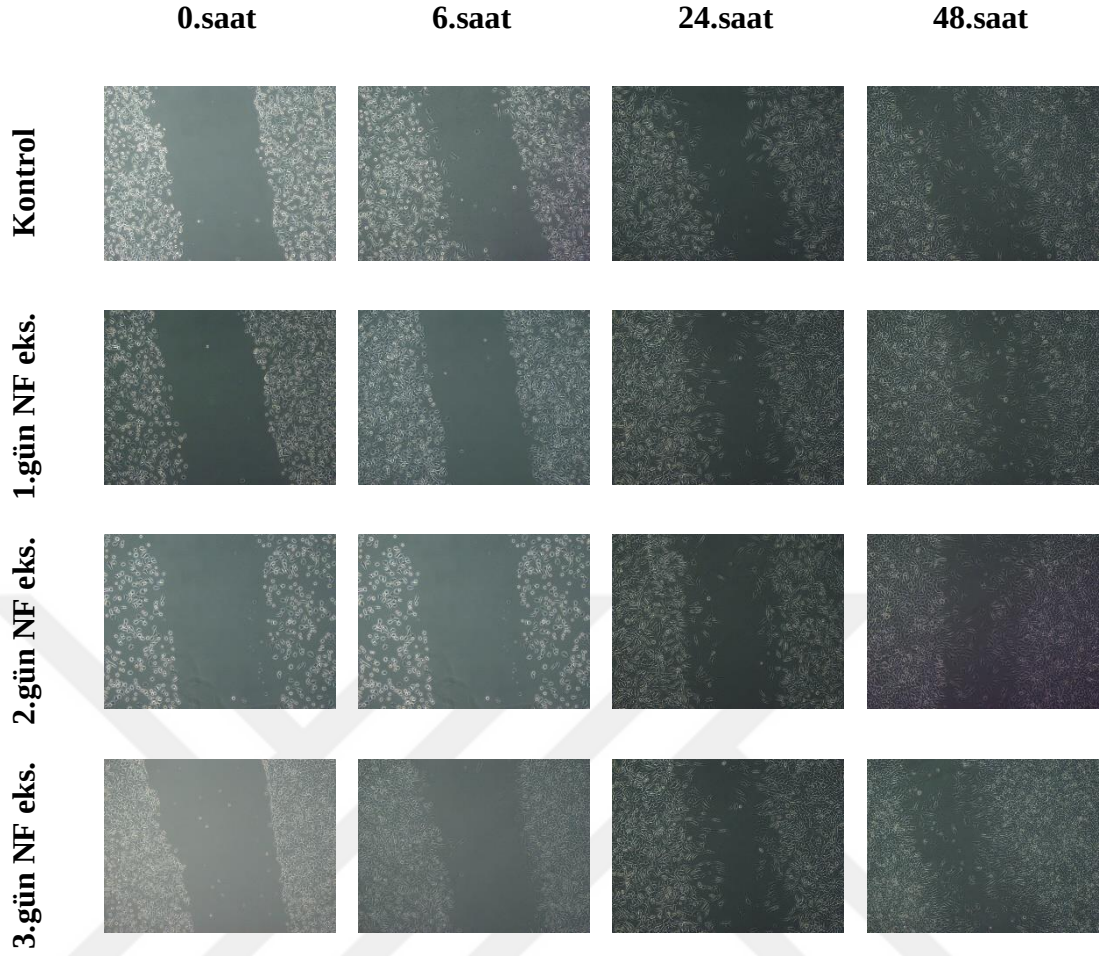
Literatürde Adeli ve ark. yaptıkları çalışmada elektro-eğrilmiş PVA/kitosan/nişasta nanofiber matların 24 ve 48. saatlerde yapılan hücre canlılığı analizinde 24 saat sonra %72-95, 48 saat temas ettikten sonra %68-98 aralığına yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Bakhsheshi-Rad ve ark. yaptıkları çalışmada ise ipek serisin içeren PVA/CD NF matlar 3.gün sonunda %75-102 ve 7 gün sonra %86-118 aralığında bir hücre canlılığı göstermiştir. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında, üretilen PVA/İS/CDI ve PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların hücre proliferasyonunu teşvik eden, biyouyumlu malzemeler olduğu anlaşılmaktadır (Adeli ve ark., 2018, Linh & Lee, 2011).

4.6.2 *In-vitro* Yara İyileşmesi Analizi (Scratch Assay)

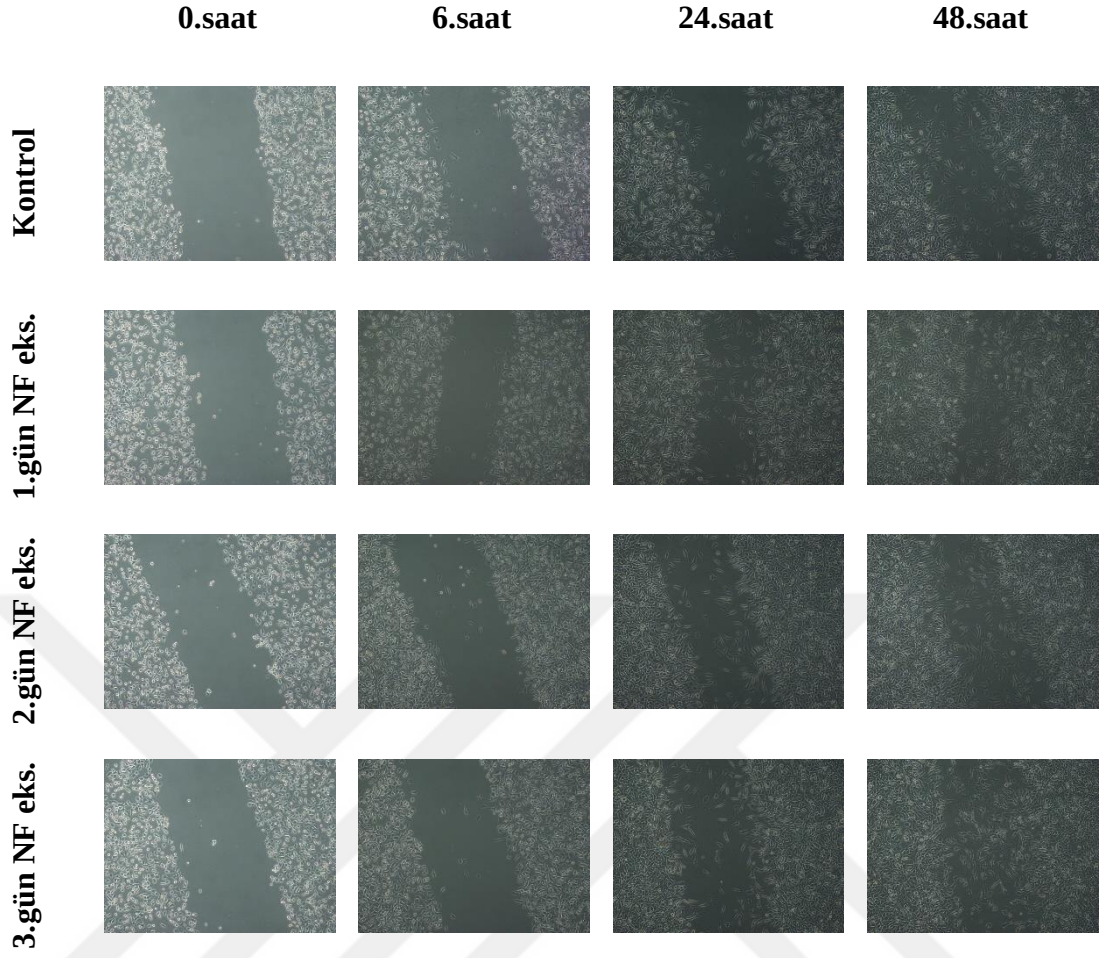
PVA/İS/CDI NF matlar ve üç farklı propolis konsantrasyonu (0,05, 0,1 ve 0,2 mg/mL) uygulanmış PVA/İS/CDI/PROP NF matlar ile *in-vitro* yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla hücre göçü deneyi (çizik testi) yapılmıştır (Pijuan vd., 2019). Biyouyumluluk analizinde de kullanılan, üç farklı (0,05, 0,1 ve 0,2 mg/mL) propolis konsantrasyonu uygulanmış yara örtü malzemelerine ait 1., 2. ve 3. gün ekstraksiyon ortamları tekrar hazırlanmıştır. 6 kuyulu platelere ekilen hücrelerin üzerine artı şeklinde çizik atılmıştır ve 1., 2. ve 3.gün ekstraksiyon ortamları ile buluşturulmuştur. Zamana bağlı olarak (0., 6., 24., 48. saat) hücre proliferasyonu işaretlenen bölgeler fotoğraflanarak gözlemlenmiştir. Eşitlik 3.4'te verilen yüzde yara kapanma formülü 48. saatlerdeki görüntülere uygulanmıştır (Adeli ve ark.,2018).



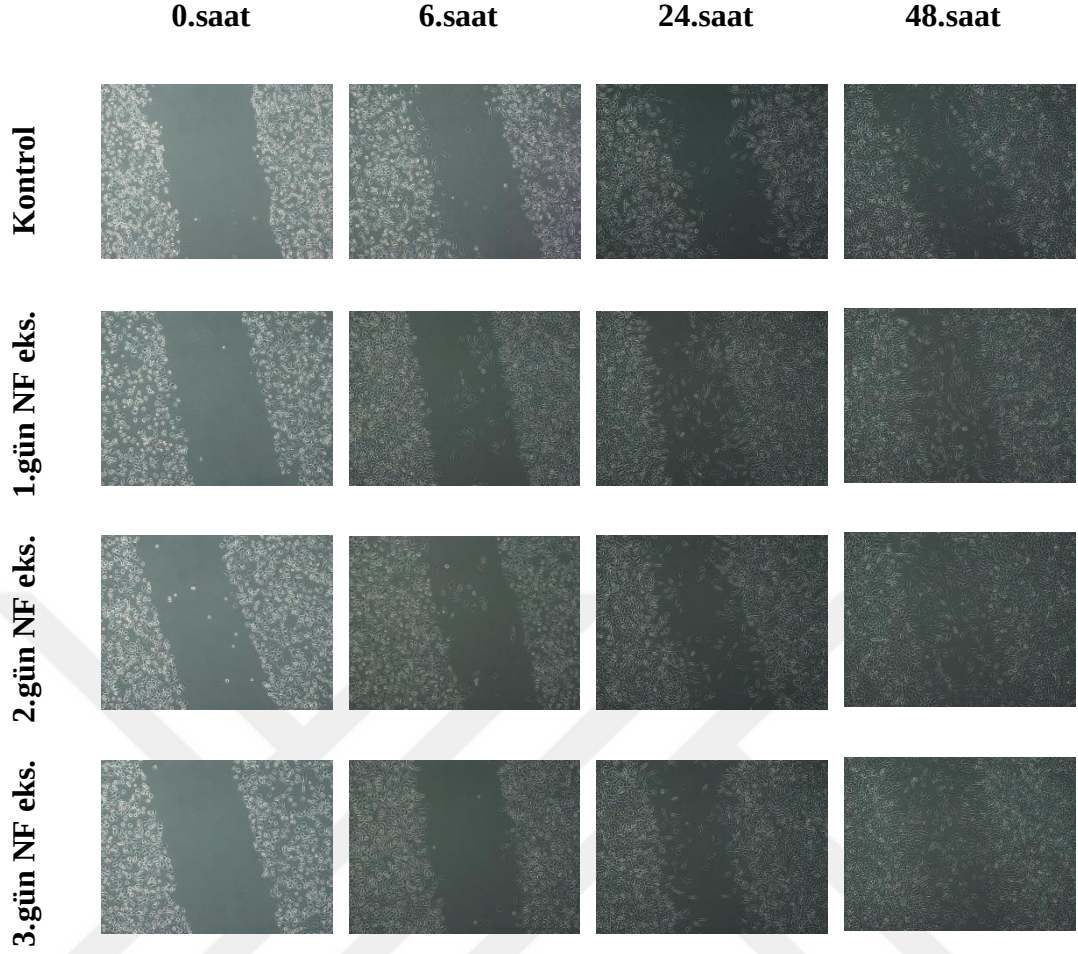
Şekil 4.9 PVA/İS/CDI NF ekstraktlarının L929 hücre hattında zamana bağlı *in-vitro* yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi



Şekil 4.10 0,05 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında yara *in-vitro* iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi

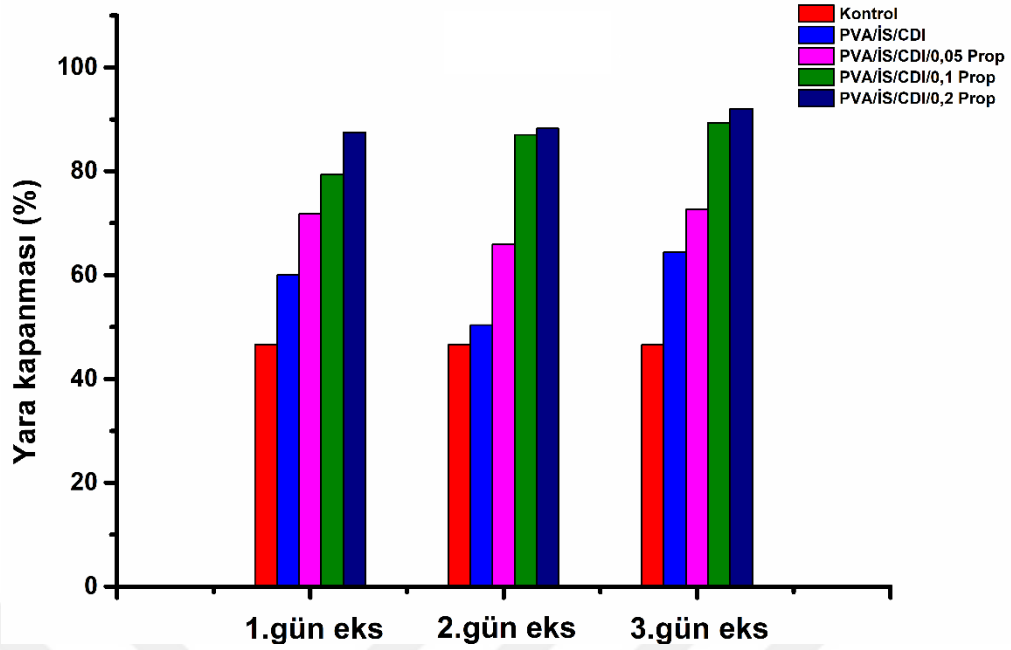


Şekil 4.11 0,1 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında *in-vitro* yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi



Şekil 4.12 0,2 mg/mL Propolis yüklü PVA/İS/CDI ekstraktlarının L929 hücre hattında *in-vitro* yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi

Image J MRI Wound Healing programı ile 1., 2. ve 3. gün ekstraktlarının 48. saatteki çiziklerin kapanması programın alan hesabı ölçülmüştür. Eşitlik 3.5'te verilen yara kapanma (%) formülüne göre hesaplanmıştır. 0. andaki kontroller G (0) olarak, PVA/İS/CDI ve PVA/İS/CDI/PROP 1., 2. ve 3. gün ekstraktlarının 48. saatlerindeki çizik alanı ise G (48) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13 (%) Yara kapanması grafiği

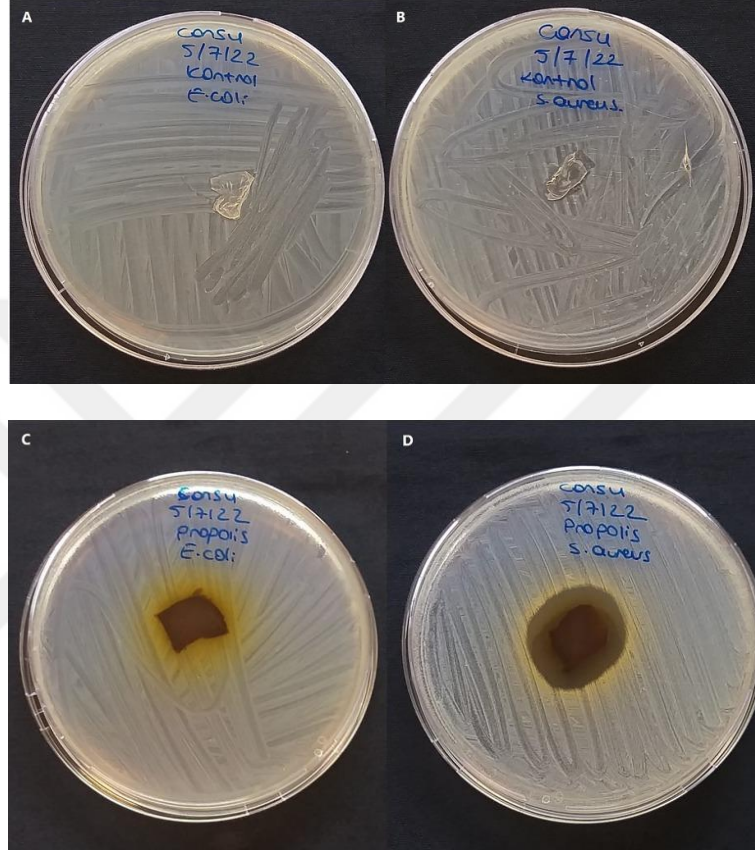
Şekil 4.13'te de gösterildiği üzere yara kapanma yüzdesi (%) 0. andaki çizige 48.saat kontrolü %46,60 olarak hesaplanmıştır. 1.,2. ve 3. gün PVA//CDI NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdeleri sırasıyla %60, %50,35 ve %64,38 olarak hesaplanmıştır. 1., 2. ve 3. gün PVA/İS/CDI /0,05 PROP NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdeleri sırasıyla %71,74, %65,97 ve %72,62 olarak, PVA/İS/CDI/0,1 PROP NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdeleri sırasıyla %79,36, %89,33, %87 ve %89,33 olarak ve PVA/İS/CDI/0,2 PROP NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdeleri sırasıyla %87,46, %88,22 ve %92,03 olarak hesaplanmıştır.

Propolis yüklenmemiş PVA/İS/CDI NF matlar ile nihai ürün olan propolis yüklü PVA/İS/CDI/PROP NF matların yara kapatma yeteneği daha fazladır. Propolis yüklenmemiş NF matlara göre çizik kapanma yüzdesinin artış sebebi propolisin hücre proliferasyonunu ve/veya göçünü uyarması olarak açıklanabilir. Propolis konsantrasyonu 0,05 mg/mL'den 0,2 mg/mL'ye doğru arttıkça hücre canlılığı artmıştır (Oryan ve ark., 2017). Bunun yanı sıra biyoyumlu bir ortamda hücrelerin zamana bağlı olarak çoğalması da kapanma yüzdesinin artışına neden olmuştur.

Literatürde ise Gilotra ve ark. yaptıkları çalışmada PVA/İS NF matlar üretmiş ve matların ekstraktları 24 saat sonrasında %55-%65 arasında iyileşme göstermiştir (Gilotra ve ark., 2018). M.Afonso ve ark. propolis ve bal ile yara iyileşmesi hakkında yaptıkları çalışmada yara kapanması propolisli örneklerden en fazla yara kapanması sağlayan sahip %0,5 konsantrasyona sahip olan propolis olmuştur (M.Afonso ve ark., 2020).

4.6.3 Antibakteriyel Aktivite Testi

Şekil 4.14'te verilen PVA/İS/CDI nanofiber matların ve propolis yüklü PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların disk difüzyon metodu ile *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin bulunduğu agar plakalarda inhibisyon bölgesi oluşturma yeteneğini gözlemek adına antibakteriyel analiz yapılmıştır.



Şekil 4.14 (A) *E. coli* bulunan agar plaka üzerinde PVA/İS nanofiber mat, (B) *S. aureus* bulunan agar plaka üzerinde PVA/İS nanofiber mat, (C) *E. coli* bulunan agar plaka üzerinde propolis yüklü PVA/İS nanofiber mat, (D) *S. aureus* bulunan agar plaka üzerinde propolis yüklü PVA/İS nanofiber mat

Şekil 4.14 (A) ve (B)'de bulunan PVA/İS nanofiber matların *E. coli* veya *S. aureus* bakterilerine karşı herhangi bir inhibisyon bölgesi göstermediği gözlenmiştir. Bunun sebebi üretilen PVA/İS nanofiber matların (80:20) oranında polivinil alkol ve ipek serisin içermesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Polivinil alkolün antibakteriyel bir etki göstermediği bilinmektedir (Olewnik-Kruszkowska ve ark.,2019). Bunun yanı sıra nanofiberde bulunan ipek serisin oranı, antibakteriyel etki göstermeye yetecek kadar olmadığı bu sebeple PVA/İS NF matlarda bir inhibisyon bölgesi oluşmadığı düşünülmektedir. Literatürde ise Chao ve ark., yaptıkları bir çalışmada elektro eğirme

yöntemi ile tigesiklin yüklü serisin ve polivinil alkol kompozit fiberler üretilmiştir. İnhibisyon bölge testi ile 13 mm çapındaki antibiyotik (tigesiklin) yüklenmemiş SS/PVA kompozit fiber numunesi *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı sırasıyla 18.60 ± 0.89 mm ve 26.43 ± 1.07 mm inhibisyon bölgesi oluşturmuştur (Chao ve ark., 2018). Şekil 4.14 (C) bulunan propolis yüklü PVA/İS nanofiber matın *E. coli* bakterisine karşı inhibisyon bölgesi oluşturmadığını ancak (D)'de bulunan propolis yüklü PVA/İS nanofiber matın *S. aureus* bakterilerine karşı 2,5-3 cm arası bir inhibisyon bölgesi oluşturduğu görülmektedir. *E. coli* gram-negatif bakteri olması sebebiyle dış zarla çevrili olan ince bir peptidoglikan hücre duvarı ile çevrilidir. *S. aureus* gibi gram-pozitif bakterilerin bir dış zarı yoktur, ancak çok daha kalın peptidoglikan tabakaları ile çevrilidirler (Silhavy ve ark., 2010). Bu nedenle *E. coli*, *S. aureus*'tan farklı olarak içerdiği ikincil hücre zarı sebebiyle daha dayanıklı hücre yapısına sahip olduğundan propolis yüklü nanofiber mat *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterirken *E. coli*'ye karşı herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Literatürde Khoshnevisan ve ark., yaptıkları çalışmada serbest propolis ve propolis-CA/PCL NF matlar, Gram-negatif suşlar üzerinde daha düşük antibakteriyel etki göstermiştir. Literatürdeki çalışmalarda Gram-negatif bakterilerin propolise Gram-pozitiflere göre daha az duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir. Bunun nedeni, farklı hücre duvarı kimyasal yapısı ve propolisin bakteriye nüfuz etmesini önleyen Gram-negatif akış pompalarının varlığı olduğu düşünülmektedir (Khoshnevisan ve ark., 2019).

4.7 Genel Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışması ile poliüretan köpük membran üzerinde, elektro-eğirme yöntemi ile polivinil alkol ve ipek serisinden nanofiberler üretilmiş, daha sonrasında bu sisteme propolis yüklenerek katmanlı bir yara örtü malzemesi elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile literatürde ilk defa doğal polimer ipek serisin ve doğal bir ürün olan propolis ile sentetik polimerler polivinil alkol ve poliüretandan oluşan bir yara örtü malzemesi üretilmiştir ve bu malzemelerin sinerjistik etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda, %8 (w/v) PVA/ %3 (w/v) İS çözeltileri hazırlanıp, elektro-eğirme yöntemi ile nanofiber matlar üretilmiştir. Üretilen PVA/İS nanofiberler, N, N- Karbonildiimidazol (CDI) ile çapraz bağlanarak mekanik dayanım sağlanmıştır. Çapraz bağlayıcının optimize edilmiş konsantrasyonu yapılan çalışmalarla 1 gram PVA/İS NF başına 7,5 mg/mL CDI olarak bulunmuştur. Sonrasında üç farklı konsantrasyonda (0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL ve

0,2 mg/mL) propolis çözeltisi PVA/İS/CDI NF matlara yüklenmiştir. Morfolojik ve fizikokimyasal analizler ile karakterize edilmiştir. Daha sonra salım ve bozunma testleri de yapılmıştır. Üretilen PVA/İS NF matların morfolojik analizi SEM ile analiz edilmiştir. 204.53 nm, minimum NF çapı 86.33 nm, maksimum NF çapı 376 nm ölçülmüştür. Üretilen nanofiberler boncuksuz ve homojen dağılım göstermişlerdir. PVA/İS NF matların çapraz bağlanması ve propolis yüklenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir. FT-IR analizi ile bu işlemler doğrulanmıştır. Kullanılan polimerlerin hidrofilik olması sebebiyle PU-PVA/İS/CDI/PROP NF mat şişme testinde 96.saatte %796'ya ulaşmıştır. 21 günde ise sadece %15'lik bir ağırlık kaybına uğramıştır. Salım testinde ise ilk 30 dakikada meydana gelen %53,7 propolis salımı sonrasında zamana bağlı olarak dramatik bir artış gözlenmemiştir. 48 saat sonunda kümülatif salım %58,5'e ulaşmıştır. Damlatma yolu ile propolis yüklendiği için propolis ani salım gerçekleştirmektedir. Hızlı bir salım yapabilmesi sebebiyle ile yara örtü malzemesinde avantaj olabilmektedir. 48.saatte PVA//CDI NF mat ekstraktlarının hücre canlılığı %101,74, PVA/İS/CDI/0,2 PROP NF mat ekstraktlarının hücre canlılık yüzdeleri sırasıyla %112,39'ye ulaşmıştır. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında, üretilen PVA/İS/CDI ve PVA/İS/CDI/PROP nanofiber matların hücre proliferasyonunu teşvik eden, biyouyumlu malzemeler olduğu anlaşılmaktadır. *In-vitro* yara kapanması analizinde ise propolis yüklenmemiş PVA//CDI NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdesi %64,38 iken propolis yüklenmesi ile PVA/İS/CDI/0,2 PROP NF mat ekstraktlarının yara kapatma yüzdesi %92,03 olarak hesaplanmıştır. Propolisin hücre proliferasyonunu teşvik ettiği anlaşılmıştır. PVA/İS/CDI NF matlara yüklenen propolis konsantrasyonlarında en fazla hücre canlılığı ve yara kapatabilme yeteneği gösteren NF mat 0,2 mg/mL konsntrasyonda propolis damlatılmış olan PVA/İS/CDI/PROP olarak bulunmuştur. Antibakteriyel aktivite testinde ise PVA/İS/CDI/PROP NF matlar, *S. aureus* bakterisine karşı inhibisyon bölgesi oluşturmuş fakat *E. coli*'ye karşı bir bir inhibiyon bölgesi oluşturmamıştır.

Bu çalışmanın devamı olarak, ilerleyen çalışmalarda elektro-eğirme yöntemi ile üretilcek olan PVA/İS nanofiber matlar damlatma ile propolis entegrasyonu dışında çözelti içerisine de propolis eklenerek nanofiber üretimi, propolisin antioksidan aktivitesine sahip olduğu bilinmesi sebebiyle antioksidan aktivite analizinin yapılması, Gram-negatif bakteriler üzerinde etkin moleküllerin entegrasyonu ile nanofiber üretimi yapılabilir.

- 1,1'-Carbonyldiimidazole, PubChem (2022). 14 Temmuz 2022, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_1_-Carbonyldiimidazole
- Abdelrahman, T., & Newton, H. (2011). Wound dressings: principles and practice. Surgery (Oxford), 29(10), 491-495. doi: 10.1016/j.mpsur.2011.06.007
- Abirami M, Shayanathi SS and Rajendran R. (2019). Synthesis and characterization of PVA based sericin film for antibacterial wound dressing. Int J Pharm Sci & Res, 10(2): 875-80.
- Adeli, H., Khorasani, M. T., & Parvazinia, M. (2018). Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and *in-vitro* healing assay. International Journal of Biological Macromolecules.
- Agrawal, P., Soni, S., Mittal, G., & Bhatnagar, A. (2014). Role of Polymeric Biomaterials as Wound Healing Agents. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 13(3), 180– 190.
- Alberti, T., Coelho, D., de Prá, M., Maraschin, M., & Veleirinho, B. (2020). Electrospun PVA nanoscaffolds associated with propolis nanoparticles with wound healing activity. Journal Of Materials Science, 55(23), 9712-9727.
- Amiraliyan, N., Nouri, M., Haghighat Kish, M., 2009. Effect of some electrospinning parameters on morphology of natural silk-based nanofibers. J. Appl. Polym. Sci. 113, 226-234.
- Aramwit, P., Siritienthong, T., Kanokpanont, S., & Srichana, T. (2010). Formulation and characterization of silk sericin–PVA scaffold crosslinked with genipin. International Journal Of Biological Macromolecules, 47(5), 668-675.
- Arango, M. C., Montoya, Y., Peresin, M. S., Bustamante, J., & Álvarez-López, C. (2020). Silk sericin as a biomaterial for tissue engineering: a review. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 1–15.
- Bakhsheshi-Rad, H., Ismail, A., Aziz, M., Akbari, M., Hadisi, Z., Omid, M., & Chen, X. (2020). Development of the PVA/CS nanofibers containing silk protein sericin as a wound dressing: *In-vitro* and *in-vivo* assessment. International Journal Of Biological Macromolecules, 149, 513-521. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.139
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair And Regeneration, 16(5), 585-601. doi: 10.1111/j.1524-475x.2008.00410.x
- Boateng, J., & Catanzano, O. (2015). Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. Journal Of Pharmaceutical Sciences, 104(11), 3653-3680.
- Borda, L., Macquhae, F., & Kirsner, R. (2016). Wound Dressings: A Comprehensive Review. Current Dermatology Reports, 5(4), 287-297. doi: 10.1007/s13671-016-0162-5

- Broughton, George II M.D., Ph.D., COL., M.C., U.S.A.; Janis, Jeffrey E. M.D.; Attinger, Christopher E. M.D. Wound Healing: An Overview, Plastic and Reconstructive Surgery: June 2006 - Volume 117 - Issue 7S - p 1e-S-32e-S doi: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9
- Chao, S., Li, Y., Zhao, R., Zhang, L., Li, Y., Wang, C., & Li, X. (2018). Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 44, 440-447.
- Chua, A., Khoo, Y., Tan, B., Tan, K., Foo, C., & Chong, S. (2016). Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns & Trauma*, 4. doi: 10.1186/s41038-016-0027-y
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356.
- Dhivya, S., Padma, V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings – a review. *Biomedicine*, 5(4). doi: 10.7603/s40681-015-0022-9
- Elschner, T., Bračič, M., Mohan, T., Kargl, R., & Stana Kleinschek, K. (2017). Modification of cellulose thin films with lysine moieties: a promising approach to achieve antifouling performance. *Cellulose*, 25(1), 537-547. doi: 10.1007/s10570-017-1538-9
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6– 265sr6.
- Eskandarinia A, Kefayat A, Rafienia M, Agheb M, Navid S, Ebrahimpour K, (2019) Cornstarch-based wound dressing incorporated with hyaluronic acid and propolis: *in-vitro* and *in-vivo* studies, *Carbohydrate Polymers*
- Eskandarinia, A., Kefayat, A., Agheb, M. et al. (2020) A Novel Bilayer Wound Dressing Composed of a Dense Polyurethane/Propolis Membrane and a Biodegradable Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffold. *Sci Rep* 10, 3063
- Eslah, S., Tavanai, H., Morshed, M. (2015) Electrospinning and characterization of poly (vinyl alcohol)–sericin nanofibers as a potential for tissue engineering applications, *The Journal of The Textile Institute*, 107:8, 949-957.
- Gaaz, T., Sulong, A., Akhtar, M., Kadhum, A., Mohamad, A., & Al-Amiery, A. (2015). Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*, 20(12), 22833-22847. doi: 10.3390/molecules201219884
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.
- Gilotra, S., Chouhan, D., Bhardwaj, N., Nandi, S., & Mandal, B. (2018). Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications. *Materials Science And Engineering: C*, 90, 420-432. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.077
- Gruppuso, M., Iorio, F., Turco, G., Marsich, E., & Porrelli, D. (2022). Hyaluronic acid/lactose-modified chitosan electrospun wound dressings – Crosslinking and stability criticalities. *Carbohydrate Polymers*, 288, 119375. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119375

- Hassiba, A., El Zowalaty, M., Nasrallah, G., Webster, T., Luyt, A., Abdullah, A., & Elzatahry, A. (2016). Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. *Nanomedicine*, 11(6), 715-737.
- Hegazi, A., El-Houssiny, A., & Fouad, E. (2019). Egyptian propolis 14: Potential antibacterial activity of propolis-encapsulated alginate nanoparticles against different pathogenic bacteria strains. *Advances In Natural Sciences: Nanoscience And Nanotechnology*, 10(4), 045019. doi: 10.1088/2043-6254/ab52f4
- Hermanson, G.T. (2008), *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Elsevier
- Homaeigohar, S., & Boccaccini, A. (2020). Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta Biomaterialia*, 107, 25-49.
- Huang, X., & Brazel, C. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal Of Controlled Release*, 73(2-3), 121-136. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00248-6
- ISO-10993-5:ISO10993-5:2009. (2021). Retrieved 26 January 2021, from <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Jiménez Vázquez, J., San Martín Martínez, E. Collagen and elastin scaffold by electrospinning for skin tissue engineering applications. *Journal of Materials Research* 34, 2819–2827 (2019). <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.233>
- Kalva, S., Augustine, R., Al Mamun, A., Dalvi, Y., Vijay, N., & Hasan, A. (2021). Active agents loaded extracellular matrix mimetic electrospun membranes for wound healing applications. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 63, 102500. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102500
- Khajavi, R., & Abbasipour, M. (2017). Controlling nanofiber morphology by the electrospinning process. *Electrospun Nanofibers*, 109-123. doi: 10.1016/b978-0-08-100907-9.00005-2
- Khan, M.M.R. (2014). Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine || Electrospun silk sericin nanofibers for biomedical applications, 125–156.
- Kharazmi, Alireza; Faraji, Nastaran; Mat Hussin, Roslina; Saion, Elias; Yunus, W Mahmood Mat; Behzad, Kasra (2015). Structural, optical, opto-thermal and thermal properties of ZnS–PVA nanofluids synthesized through a radiolytic approach. *Beilstein Journalof Nanotechnology*, 6(), 529–536. doi:10.3762/bjnano.6.55
- Khil, M., Cha, D., Kim, H., Kim, I., & Bhattarai, N. (2003). Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 67B (2), 675-679.
- Khoshnevisan, K., Maleki, H., Samadian, H., Doostan, M., & Khorramizadeh, M. (2019). Antibacterial and antioxidant assessment of cellulose acetate/polycaprolactone nanofibrous mats impregnated with propolis. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 140, 1260-1268. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.207
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. doi: 10.3390/pathogens10020165

- Kunz, R., Brancalhão, R., Ribeiro, L., & Natali, M. (2016). Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Research International*, 2016, 1-19. doi: 10.1155/2016/8175701
- Lamboni, L., Gauthier, M., Yang, G., & Wang, Q. (2015). Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1855-1867.
- Lawton S (2019) Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nursing Times* [online]; 115, 12, 30-33
- Linh, N., & Lee, B. (2011). Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application. *Journal Of Biomaterials Applications*, 27(3), 255-266. doi: 10.1177/0885328211401932
- M. Afonso, A., Gonçalves, J., Luís, Â., Gallardo, E., & Duarte, A. (2020). Evaluation of the In Vitro Wound-Healing Activity and Phytochemical Characterization of Propolis and Honey. *Applied Sciences*, 10(5), 1845. doi: 10.3390/app10051845
- Mandal, B., Priya, A., & Kundu, S. (2009). Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3007-3020.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & Trauma*, 3(1), 1-7.
- Megelski, S.; Stephens, J.S.; Chase, D.B.; Rabolt, J.F. (2002) Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules* 2002, 35, 8456–8466.
- Mishra, R., Mishra, P., Verma, K., Mondal, A., Chaudhary, R., Abolhasani, M., & Loganathan, S. (2018). Electrospinning production of nanofibrous membranes. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 767-800. doi: 10.1007/s10311-018-00838-w
- Mir, M., Ali, M., Barakullah, A., Gulzar, A., Arshad, M., Fatima, S., & Asad, M. (2018). Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress In Biomaterials*, 7(1), 1-21.
- Mogoşanu, G., & Grumezescu, A. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal Of Pharmaceutics*, 463(2), 127-136. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015
- Nagarkar, R., & Patel, J. (2019). Polyvinyl alcohol: A comprehensive study. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 34-44.
- Okur, M., Karantas, I., Şenyiğit, Z., Üstündağ Okur, N., & Siafaka, P. (2020). Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences*.
- Oktay, B., Kayaman-Apohan, N., Erdem-Kuruca, S., & Süleymanoğlu, M. (2015). Fabrication of collagen immobilized electrospun poly (vinyl alcohol) scaffolds. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(8), 978–987. <https://doi.org/10.1002/pat.3512>

- Olewnik-Kruszkowska, E., Gierszewska, M., Jakubowska, E., Tarach, I., Sedlarik, V., & Pummerova, M. (2019). Antibacterial Films Based on PVA and PVA–Chitosan Modified with Poly(Hexamethylene Guanidine). *Polymers*, 11(12), 2093. doi: 10.3390/polym11122093
- Oliveira, R., Moreira, A., Thiré, R., Quilty, B., Passos, T., & Simon, P. et al. (2017). Absorbent polyvinyl alcohol-sodium carboxymethyl cellulose hydrogels for propolis delivery in wound healing applications. *Polymer Engineering & Science*.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 469- 483.
- Patil, P. P., Reagan, M. R., & Bohara, R. A. (2020). Silk fibroin and silk-based biomaterial derivatives for ideal wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Payam Zahedi; Iraj Rezaeian; Seyed-Omid Ranaei-Siadat; Seyed-Hassan Jafari; Pitt Supaphol (2010). A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. , 21(2), 0–0. doi:10.1002/pat.1625
- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., ... & Panosa, A. (2019). *In-vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 107.
- Qingfeng Shi; Chengjun Zhou; Yiyang Yue; Weihong Guo; Yiqiang Wu; Qinglin Wu (2012). Mechanical properties and *in-vitro* degradation of electrospun bio-nanocomposite mats from PLA and cellulose nanocrystals. , 90(1), –301-308.
- Rezzan Aliyazıcıoglu, Huseyin Sahin, Omer Erturk, Esra Ulusoy & Sevgi Kolayli (2013) Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey, *International Journal of Food Properties*, 16:2, 277-287, DOI: 10.1080/10942912.2010.551312
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C., & Gurtner, G. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665-706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017
- Saha J, Mondal MIH, Sheikh MRK, Habib MA (2019) Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyxmori Silk Cocoon Waste. *J Textile Sci Eng* 9: 390. doi: 10.4172/2165-8064.1000390
- Sapru, S., Das, S., Mandal, M., Ghosh, A., & Kundu, S. (2018). Prospects of nonmulberry silk protein sericin-based nanofibrous matrices for wound healing – *In-vitro* and *in-vivo* investigations. *Acta Biomaterialia*, 78, 137-150.
- Sasipriya, K.; Suriyaprabha, R.; Prabu, P.; Rajendran, V. (2013). Synthesis and characterisation of polymeric nanofibers poly (vinyl alcohol) and poly (vinyl alcohol)/silica using indigenous electrospinning set up. *Materials Research*, 16(4), 824–830. doi:10.1590/S1516-14392013005000050
- Schultz, G., Chin, G., Moldawer, L., & Diegelmann, R. (2011). *Principles of Wound Healing*. University Of Adelaide Press. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5>
- Silhavy, T., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 2(5), a000414-a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414

- Simões, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonça, A. G., & Correia, I. J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 130–141.
- Siritienthong, T., Ratanavaraporn, J., & Aramwit, P. (2012). Development of ethyl alcohol- precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds. *International Journal Of Pharmaceutics*, 439(1-2), 175-186.
- Smith, S., Goodge, K., Delaney, M., Struzyk, A., Tansey, N., & Frey, M. (2020). A Comprehensive Review of the Covalent Immobilization of Biomolecules onto Electrospun Nanofibers. *Nanomaterials*, 10(11), 2142. doi: 10.3390/nano10112142
- Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., & Zhou, Y. et al. (2019). Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 219, 113-120.
- Teixeira, M., Amorim, M., & Felgueiras, H. (2019). Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers*, 12(1), 7. doi: 10.3390/polym12010007
- TORT, S., & ACARTÜRK, F. (2015). Wound Healing and Electrospun Wound Dressings: Review. *Türkiye Klinikleri Journal Of Pharmacy Sciences*, 4(2), 68-78. doi: 10.5336/pharmsci.2015-45768
- Uslu, İ., Keskin, S., Gül, A., Karabulut, T., & Aksu, M. (2010). Preparation and Properties of Electrospun Poly(vinyl alcohol) Blended Hybrid Polymer with Aloe vera and HPMC as Wound Dressing. *Hacettepe Journal Of Biology And Chemistry*, 38(1), 19-25.
- Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., & Sali'h, B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160(2), 189-195.
- Üçgül, İ., Aras, S., & Elibüyük, U. (2018). EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ. *Uludağ University Journal Of The Faculty Of Engineering*, 23(1), 295-310. doi: 10.17482/uumfd.327376
- Vázquez, J., & Martínez, E. (2019). Collagen and elastin scaffold by electrospinning for skin tissue engineering applications. *Journal Of Materials Research*, 34(16), 2819-2827. doi: 10.1557/jmr.2019.233
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 1528–1542
- W. L. J. Hinrichs; E. J. C. M. P. Lommen; Ch. R. H. Wildevuur; Prof. Dr. J. Feijen (1992). Fabrication and characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing., 3(4), 287–303
- Yan, S., Li, X., Dai, J., Wang, Y., Wang, B., & Lu, Y. et al. (2017). Electrospinning of PVA/sericin nanofiber and the effect on epithelial-mesenchymal transition of A549 cells. *Materials Science And Engineering: C*, 79, 436-444. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.048
- Yousef, H., Alhajj, M. and Sharma, S. (2021). *Anatomy, Skin (Integument),, Epidermis*. Statpearls Publishing. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix. *Journal Of Glaucoma*, 23, S20-S23. doi: 10.1097/ijg.0000000000000108
- Zaidi, Z., & Lanigan, S. W. (2010). Skin: structure and function. In *Dermatology in Clinical Practice* (pp. 1-15). Springer, London.
- Zhao, R., Li, X., Sun, B., Tong, Y., Jiang, Z., & Wang, C. (2015). Nitrofurazone-loaded electrospun PLLA/sericin-based dual-layer fiber mats for wound dressing applications. *RSC Advances*, 5(22), 16940-16949. doi: 10.1039/c4ra16208k
- Zupančič, Š. (2019). Core-shell nanofibers as drug delivery systems. *Acta Pharmaceutica*, 69(2), 131-153. Retrieved from <https://sciendo.com/article/10.2478/acph-2019-0014>



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Gülcan, C., Derman, S. (2021). Production of polymer-based wound dressing material and evaluation of its biological activity. 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021), November 24-26, 2021/ Ankara, Turkey (Poster sunumu).

Projeler

1. Polimer Temelli Yara Örtü Malzemesi Üretimi ve Biyolojik Aktivitesinin Değerlendirilmesi, Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN (Yürütücü), Cansu GÜLCAN (Araştırmacı), YÜLAP FYL-2021-4207, 04.03.2021-27.07.2022.

Burslar

1. Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu, (Başvuru No.1649B022113645)