



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YARA İYİLEŞMESİ İÇİN İSKELE OLARAK
BİYOAKTİF *P-TERT*-BÜTİLKALİKS[4]AREN
NANOFİBERLERİN İNCELENMESİ**

ZUHAİR MOHAMMED

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şubat-2019

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Zuhair Mohammed tarafından hazırlanan “ Yara İyileşmesi İçin İskele Olarak Biyoaktif *p-tert-Bütikaliks[4]Aren Nanofiberlerin İncelenmesi* ” adlı tez çalışması 06/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Murat YILDIRIM

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Okan ERDAL

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa Yılmaz
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Zuhair MOHAMMED

06/02/2019



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YARA İYİLEŞMESİ İÇİN İSKELE OLARAK BİYOAKTİF *P-TERT*- BÜTİLKALİKS[4]AREN NANOFİBERLERİN İNCELENMESİ

ZUHAİR MOHAMMED

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi. Pembegül Uyar Arpacı
2019, 66 Sayfa

Jüri

Dr.Öğr.Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Doç. Dr. Murat YILDIRIM

Dr.Öğr.Üyesi Mehmet OKAN ERDAL

3B hücre kültür sistemlerinin, 2B sistemlerin aksine hücrelerin dokularda bulunduğu gerçek mikro-çevreyi giderek büyüyen bir kanıt olarak daha doğru temsil ettiğini ileri sürülmüştür. 3B hücre agregatlarının / sferoidlerinin doku rejenerasyonunda kullanılmasının başlıca avantajı, hücrelerin sadece in vivo yapısı değil, aynı zamanda hücrelerin, iyi tanımlanmış morfojenik ve fonksiyonel özellikleri olan doku ünitelerini kaynaştırma ve oluşturma yönündeki doğal eğilimlerini taklit etme kabiliyetleridir. Farklı fonksiyonel gruplara sahip olan *p-tert*-butilkaliks[4]aren nanofiberlerinin elektroğirmesi gerçekleştirilmiş ve bunların hücre yapışma fonksiyonu üzerindeki İnsan Dişeti Fibroblast (HGF-1) sito-uyumluluk davranışı incelenmiştir. Bu çalışmada, farklı fonksiyonel gruplara sahip kalsiyen nanofiberler, literatürde ilk kez HGF-1 (insan gingival fibroblast) hücreleri için iskeleler olarak kullanılacak ve hücre büyümesi ve yayılma kapasitelerinin gelişimi incelendi. Ayrıca, bağlı hücrelerin morfolojisini karakterize etmek ve hücre proliferasyonunu değerlendirmek için Konfkal Mikroskop / SEM / XTT ölçümleri kullanıldı.

Sonuç olarak, 2,3 ve 4-AMP kaliks[4]arenlerin sitotoksik etkilerini inceleyerek 4-AMP'nin HGF-1 hücresi üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu gördük. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren türevli nanofiber yüzeylerinde HGF-1 hücre morfolojisini inceleme sonucunda 2-AMP nanofiberlerin yüzeylerinde hücrelerin yapışarak çoğaldığı, büyüdüğü ve hücreler arası iskele bağlantıların nanofiber yönünde yayıldığı gözlemlendi. Elde ettiğimiz çizim deney sonuçlarına göre, 2-Amp nanofiber üzerinde HGF-1 hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması, 2B ortamın kontrolüyle kıyaslandığında daha hızlı hücre göçünü teşvik ederek ve hücre sayısını artarak oluşturulan yarayı kapladığı belirgin bir şekilde görüldü. Çalışmamız boyunca 2-AMP nanofiber yüzeylerine herhangi bir büyüme faktörü ekmeden bu yüzeylerde HGF-1 hücrelerinin çoğalma ve yayılmaları tesbit ettik.

Anahtar Kelimeler: İnsan Dişeti Fibroblast Hücre Hattı, Kaliksaren, Nanofiber, Elektrosin, 3B Hücre Kültürü, Yara İyileşmesi, Doku Mühendisliği

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE THESIS INVESTIGATION OF BIOACTIVE *P-TERT-BUTYL*CALIX[4]ARENE NANOFIBERS AS SCAFFOLDS FOR WOUND HEALING

ZUHAIR MOHAMMED

Advisor: Dr. Pembegül UYAR ARPACI

2019, 66 Pages

Jury

Assist. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Assoc. Dr. Murat YILDIRIM

Assist. Prof. Dr. Mehmet OKAN ERDAL

A growing body of evidence has suggested that 3D cell culture systems, in contrast to the 2D systems, represent more accurately the actual microenvironment where cells reside in tissues. The main advantage of using 3D cell aggregates/spheroids in tissue regeneration is their ability to mimic not only the architecture of the cells in vivo, but also the cells' natural tendency to fuse and form tissue units with well-defined morphogenic and functional properties. Electrospinning of *p-tert-butylcalix[4]arene* nanofibers with different functional groups were performed and their Human Gingival Fibroblast (HGF-1) cytocompatibility behaviour on cell adhesion function were examined. In this study, the calixene nanofibers with different functional groups will be used as scaffolds for HGF-1 (human gingival fibroblast) cells for the first time in the literature and the development of cell growth and spreading capacities will be examined. Finally, SEM/EDS measurement was used to characterize the morphology of the attached cells and evaluated the cell proliferation.

As a result, we examined the cytotoxic effects of 2,3 and 4-AMP calyx [4] arenes and found that 4-AMP had a cytotoxic effect on HGF-1 cells. 2-AMP, 3-AMP and 4-AMP calix-derived nanofiber surface HGF-1 cell morphology as a result of the study of 2-AMP nanofibers on the surface of the cells to grow, adhering to the scaffold connections between the cells and the spread of nanofiber cells across the direction was observed. According to the test results, the proliferation, migration and differentiation of HGF-1 cells on 2-AMP nanofiber was found to more compatible compared to cells on 2D environment. During our study, it was found that proliferation of HGF-1 cells on 2-AMP nanofiber surfaces could be possible without adding any growth factors.

Keywords: Human Gingival Fibroblast Cell Line, 3D-Cell Culture, Calixarene, Nanofiber, Electrospinning, Wound Healing, tissue engineering

ÖNSÖZ

Öncelikle bizleri bugünlere kavuşturan Yüce Allah (cc)'a hamd olsun.

Yüksek lisansa ilk başladığım günden buyana ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı öğrencilerini her zaman destekleyen Sayın Hocam Dr.Öğr.Üyesi. Pembegül Uyar Arpacı' ya sonsuz minnet ve saygılarımı sunarım.

Hayatımın her aşamasında ilgi ve desteklerini hissettiğim, tüm kararlarımda yanımda olan, bana güvenmenin, doğru insan olmanın, çalışmanın ve emek vermenin ne demek olduğunu öğreten, hayattaki en büyük şansım olan aileme, özellikle Canım Annem Zainab Hasan, sevgili Babam Nazar Salih ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Laboratuvarda tez deneylerini yapmam sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Müslüm Ağaç, Noora Omar, Kübra Çini, Emine Gök, Esin Şirin, H.Esra Akgül hocama ve bize laboratuvarda desteğini esirgemeyen değerli Emine Yavuz hocama, deneyler sırasında kullandığım maddeleri hazırlayan Dr. Fatih Özcan hocama ve Mohammed Ahmed arkadaşşıma teşekkür ederim.

Bugün türkçe konuşabiliyorsam, bu tezi türkçe yazabildiysem ve bu başarıyı elde ettiysem bunu öğretmenim sayın Aydın Göktaş hocama borçluyum kendisine sonusuz teşekkür ederim.



Zuhair Muhammed

KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	4
SİMGELER VE KISALTMALAR	6
1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
1.1. Yara İyileşmesi.....	9
1.1.1. Yara İyileşme Fazları.....	10
1.1.1.1. İnflamasyon Fazı	10
1.1.1.2. Proliferasyon Fazı (Çoğalma Fazı).....	11
1.1.1.3. Matürasyon (yeniden modelleme)	11
1.1.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	12
1.1.3. Yara İyileşmesi İçin Hücre Kültür Modelleri.....	13
1.1.3.1. Monokültür Hücre Modeli.....	13
1.1.3.2. Kornea Hücre Modeli	13
1.1.3.3. Cilt Epidermis Hücre Modeli	13
1.1.3.4. Ko-kültür Hücre modeli.....	14
1.1.3.5. Organoid / üç boyutlu hücre modeli	14
1.2. Nanofiberler.....	14
1.2.1. Nanofiberlerin Biyomedikal mühendisliğinde Uygulamaları	16
1.2.1.1 Yara İyileşmesi	16
1.2.1.2. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp	17
1.2.1.3. İlaç Salımı	18
1.3. Kaliksaren.....	19
1.3.1. Kaliksarenlerin Uygulama Alanları.....	21
1.3.2. Kaliksarenlerin Bazı Özellikleri	22
1.4. İnsan Gingival Fibroblastı (HGF-1) Hücre Kültürü:.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
2.1. KİMYASAL NUMUNE ANALİZLERİ.....	24

2.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin <i>p-tert</i> -bütikaliks[4]arenin Diamit türevleri sentezi:	24
2.1.2. Elektrospin Yöntemiyle Sentezlenen <i>P-tert</i> -bütıl Kaliks[4]Aren Bileşiklerinin (2-4)AMP Nanofiberlerinin Hazırlanması:	25
2.2. Nanofiber Yüzey Sterilizasyonu:	26
2.3. Biyolojik Numune Analizleri	27
2.3.1. İnsan Gingival Fibroblast (HGF-1) Hücre Kültürü:	27
2.3.2. HGF-1 Hücre Hattının Çözdürülmesi.....	27
2.3.3. HGF-1 Hücre Hattının Pasajlanması	28
2.3.4. HGF-1 Hücre Hattının Sayımı ve Ekimi:	29
2.3.5. Taramalı elektron mikroskopta (SEM) HGF-1 hücre hattının analizi :.....	30
2.3.6. HGF-1 Hücre Hattının Canlılık Testi-XTT Analizi:	30
2.3.7. Konfokal Mikroskopta HGF-1 Hücre Hattının Analizi :.....	31
2.3.8. İn Vitro Çizim Deneyi (Scratch Assays)	32
2.3.9. HGF-1 hücre hattının dondurma işlemi :	33
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	34
3.1. 2, 3 ve 4-AMP'nin Yapı, Karakterizasyon ve Analiz Sonuçları	34
3.1.1. 2, 3 ve 4-AMP'nin FT-IR Analizleri	34
3.1.2. 2, 3 ve 4-AMP'nin ¹ H-NMR Spektrumları	35
3.1.3. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin AFM, SEM ve TEM analizleri	37
3.2. HGF-1 Hücre Hattına İlaç Etkisinin İntert Mikroskop Görüntüleri	38
3.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Maddelerinin Sitotoksikite (XTT) Analizleri....	41
3.2.2. Lazer konfokal mikroskop görüntüleri	44
3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri	45
3.2.4. İn Vitro Çizim Deneyi (Scratch Assays) Görüntüleri.....	47
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	52
4.1 Sonuçlar.....	52
4.2 Öneriler.....	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α : Alfa
 μ : Mikro
 β : Beta
 δ : Delta
 J : Joule
 h : saat

Kısaltmalar

HGF-1 : İnsan gingival fibroblast hücre hattı
2B : İki boyutlu
3B : Üç boyutlu
ECM : Ekstraselüler matriks
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
Hanks's Salt Solution : Tuz tampon çözeltisi
DMSO : Dimetil sülfoksit
GF : Büyüme faktörü
2-AMP : 2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
3-AMP : 3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
4-AMP : 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
cm : Santimetre
CYP : Sitokrom P450
FT-IR : Fourier transform infrared spektroskopisi
g : Gram
H₂O : Su
L : Litre
mL : Mililitre
mV : Milivolt
nm : Nanometre
NMR : Nükleer manyetik rezonans
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
IC₅₀ : Hücre oranının % 50'ini öldüren konsantrasyondur
 μ m : Mikrometre
 μ M : Mikromolar
PVA : Polivinil alkol
PCL : polikaprolakton
PLGA : Poli laktik- *ko*- glikolik asit
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü beta

1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Tüm dünyada, yara tedavisi araştırmaları ve yara örtü uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Bu yara bakım ürünleri yara bölgesini örterek, zarar görmüş dokuyu dış etkilerden koruyarak yapısı uygunsa hücre üretimini aktive ederek iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır (Valenta ve ark., 2004). Geçmişte yara bakımı için değişik absorpsiyon kapasitesinde doğal ve sentetik bandajlar, hidrofil pamuk, sargı bezi ve gazlı bez gibi geleneksel yara örtüleri kullanılmaktaydı. Bu örtülerin öngörülen öncelikli işlevi, yara eksüdesinin buharlaşmasına olanak verecek şekilde yarayı kurutarak bakterilerin yara ortamında üremesini engellemektir (Zahedi ve ark., 2010).

Günümüzde yara çevresinde oluşturulan ılık ve nemli bir ortamın daha hızlı ve başarılı bir yara iyileşmesi sağladığı anlaşılmıştır. Modern yara bakımı anlayışında esas olan yaranın doğru değerlendirilmesi, yaranın nemli tutulması, aynı zamanda yaranın bakteri ve yabancı maddelerden korunması, fazla sızıntının yaradan uzaklaştırılması, yara bölgesinde gaz alış-verişine izin verilmesi ve yara çevresindeki sağlıklı dokulara zarar verilmemesi de ideal yara bakım ürününden beklenen özellikler arasındadır. Nemli ortamda yara iyileşmesini sağlayan örtücü özellikteki modern örtüler; yara dehidrasyonunu önleyerek dokunun canlılığını ve hücrelerin çoğalma yeteneğini korumakta, anjiogenezi hızlandırmakta ve yara iyileşmesinde aktif rolü olan büyüme faktörlerinin etkinliğini artırmaktadır. Bu modern anlayış, yara iyileşme sürecinde epitel hücrelerin hareketine izin verecek ideal ortam koşullarının oluşturulmasına dayanmaktadır. Yara çevresel tehditlerden ve bakteri nüfuziyetinden korunmalıdır. Bu sebeple yara tedavisi için gerekli ideal ortam koşulları; yara etrafında hücre ve dokuların rejenerasyonuna izin verecek kadar nemli bir ortam, etkin oksijen sirkülasyonu ve düşük bakteriyel kontaminasyon olarak özetlenmektedir. Bu ideal koşullara ulaşabilmek için modern yara örtüleri geliştirilmektedir (Mendez-Eastman., 2005).

Vücudun en dıştaki organı olan deri çok farklı fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Hasarlı derinin rejenerasyonu; hücreler, doğal ekstra hücresel matris molekülleri ve çözülebilir arabolucular arasındaki karmaşık doku etkileşimlerini içerir. Bu etkileşimler sonucunda doku yenilenebilir. Çok eski çağlardan itibaren iyi bir yara iyileşmesi ve yaranın enfeksiyon kapmasını önlemek için uygun malzemeler kullanılmaya çalışılmış ve buna yönelik malzemeler geliştirilmiştir. İlk çağlarda bal hamurları, bitkisel lifler ve hayvan yağları yara kapatma amacıyla kullanılmıştır. Günümüzde, yeni nesil

biyopolimerlerin bulunması ve yeni üretim tekniklerinin geliştirilmesiyle yara örtücü malzemelere çok sıra dışı özellikler kazandırılarak yaranın tedavi süreci hızlandırılmakta ve yaranın iyileşmesi daha iyi sağlanabilmektedir (Majno, 1975).

Fonksiyonel bir yara örtücü malzemenin tasarımı yaranın özellikleri, yaranın iyileşme süresi, yara örtücü malzemenin fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri göz önünde bulundurularak yapılır. Nihai amaç en hızlı iyileşme süresini yakalamak ve yaranın mükemmel bir estetik yakalanarak iyileşmesini sağlamaktır. Son çeyrek yüzyıldır özellikle membran yara örtücüler yaranın dış etkenlerden korunması ve yaranın estetik bir şekilde iyileştirilmesi bakımından iyi sonuçlar alınabilmiş malzemelerdir. Bu tip çok düşük gözeneğe sahip malzemeler değişik kompozisyonda yara örtücü malzeme olarak kullanılmaktadır. Elektroğirme yöntemi bu spesifik yara zorluklarını gidermek için hem sentetik hem de doğal polimerleri kullanabilen tekrarlanabilir, uygun maliyetli ve kolay bir yöntemdir. Elektroğirme ağlar birkaç yıl boyunca doku mühendisliği için iskeleler olarak kullanılmıştır, ama şaşırtıcı bir şekilde bakteri ve hücrelerin ortak kültürleri ve bakteri ile fiberlerin etkileşimleri üzerine az miktarda literatür vardır. Elektroğirme nanofiber yığınları yüksek gözeneklilik, üstün mekanik performans, esnek yüzey, yüksek yüzey alanı ve uzunluk/çap oranı gibi olağanüstü ciddi özellikler göstermiştir. Bahsedilen özellikler son yıllarda zar ilgisi, nano-sensörler, yara bandajları, doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemleri gibi mümkün uygulamalar için yaygın bir ilgiye sebep olmaktadır (Abrigo ve ark., 2014).

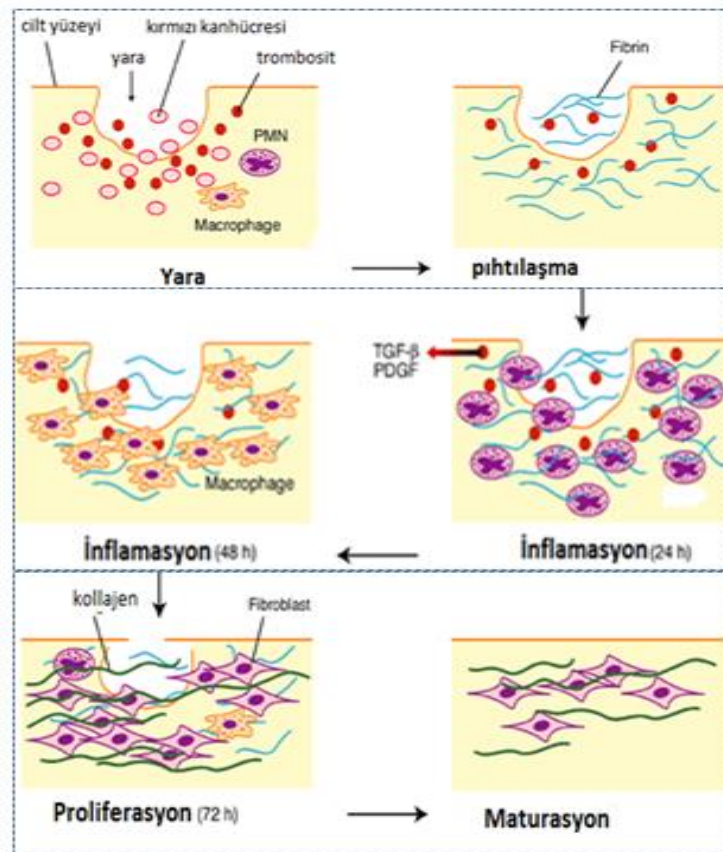
Literatür araştırmalarında genellikle yüksek moleküler ağırlıklı Polikabrolaktam (PCL) ve Polilaktid asit (PLA) gibi polimerlerin nanofiblerinin biyomedikal uygulamalarda çalışıldığı tespit edilmiş ancak kaliksaren bileşiklerinin nanofibleri üzerine biyolojik uygulamalara rastlanmamıştır. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan nanofiberlerin kullanım alanları gittikçe artmaktadır. Bu alanda genellikle çalışmalarda molekül ağırlığı büyük olan polimerler (Polivinil Prolidon(PVP), Polietilen(PE), Polianilin(PA) v.b.) kullanılmalarının yanısıra supramolekül kimyanın önemli üyelerinden kaliksarenlere yönelik daha az çalışma yapılmıştır (Chen ve ark., 2013).

Çalışmamızda, farklı fonksiyonel gruplara sahip olan kaliksaren, elektroğirme yöntemi ile nanofiberler oluşturularak literatürde ilk kez HGF-1 (insan gingival fibrblast) hücreleri için üç boyutlu (3B) iskele oluşturulmasını inceledik. Literatürde kaliksarenlerden üretilen nanofiberler ile HGF-1 (insan gingival fibrblast) hücresi ile yara iyileşmesinde yapılan ilk çalışmadır. Uygun fonksiyonlandırma ile

kaliksarenlerden oluşturulan bu 3B iskelelerle HGF-1 hücrelerinin etkileşimleri, hücre büyüme ve yayılma kapasitelerindeki gelişimi incelenecektir.

1.1. Yara İyileşmesi

Yaralanma, vücudun herhangi bir yerindeki doku morfolojisinin ve / veya işlevselliğinin travma, ameliyat veya başka nedenlerle devamlılığının bozulmasına denir. Yara iyileşmesi ise travma sonrası cildin bütünlüğünü korumak için önemli bir fizyolojik işlemdir. İyileşme sürecinin sistematik bir akışı vardır ve klasik olarak inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme (matürasyon) fazlarında incelenebilir (Şekil 1.1.) (Lindley ve ark., 2016).



Şekil 1.1. Yara iyileşme fazları

İnflamasyon fazında, yara bölgesine ilk olarak nötrofil hücreleri gelir, kalıntıları ve bakterileri temizler. Ayrıca protein yapısında büyüme faktörleri salınır. Genellikle bu fazın tamamlanması 72 saat sürer (Berman ve ark., 2017). Proliferasyon fazında, fibroblastlar ve endotel hücreler yara alanına göç etmeye başlar. Fibroblastlar çevre dokulardan, endotel hücreler ise yara kenarından gelir ve yaranın hücre içeriği artarak

bağ dokusunun birikmesiyle karakterize edilir. Proteoglikanlar, hiyaluronik asit , kollajen ve elastin dahil olmak üzere hücre dışı matris (ECM), orijinal pıhtı oluşumunu değiştirmek için granülasyon dokusu oluşturur (Su ve ark., 2010). Bu fazda çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri (GF) evreye katılır. Bu faz günler ve haftalar devam eder. Yara iyileşmesinin son adımı, mevcut hücrelerin apoptozu ile yeni hücrelerin üretimi arasında kesin bir dengeye ihtiyaç duyan yeniden şekillenme (matürasyon) aşamasıdır (Plikus ve ark., 2017). Bu fazda, kollajen üretimi ve bozunma seviyeleri eşitlendiğinde, doku tamirinin olgunlaşma evresinin başladığı söylenir. Yara tipine bağlı olarak bir yıl veya daha uzun sürebilir (Gokce ve ark., 2018).

1.1.1. Yara İyileşme Fazları

1.1.1.1. İnflamasyon Fazı

Bir yara meydana geldiğinde ilk olarak pıhtılaşma oluşumu başlar. Pıhtılaşma, kanamayı sınırlayan ve sitokin sinyalleşmesini başlatan bir trombosit tıkayıcıdır. Bu olay pıhtılaşma kaskadını başlatır ve hücre olmayan dokuların debridmanı için hücre alımını teşvik eder. Trombositler, açıkta kalan kolajen cevabına karşı kapak yaratırlar ve daha sonra sürekli trombosit agregasyonunu teşvik ederler (Goldman R., 2004). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve kandaki nötrofiller için kemotaktik olan TGF-b yara bölgesine birlikte gelirler. Nötrofiller PDGF'ye yanıt olarak trombositlere çekilir ve ilk olarak ölü doku ve bakteriyel partikülleri fagositize etmeye ve ayrıca reaktif oksijen türlerini kullanarak bakterilere karşı bir yara kaskadı oluşturmaya başlar (Kim ve ark., 1998). İnflamasyon fazı ilerledikçe, makrofajlar 24 ile 72 saat içinde dominant hücre tipi haline gelir ve yara iyileşmesi ilerledikçe değişir (Schulz ve ark., 2012). Makrofajların merkezi bir rol oynadığı ve yanıtlarının, patolojik inflamasyonu önlemek için iltihaplanma durumunun düzenlenmesi ve homeostazın sağlanması için önemli olduğu kabul edilmektedir (Barrientos ve ark., 2008).

1.1.1.2. Proliferasyon Fazı (Çoğalma Fazı)

Proliferasyon fazı 4. ile 21. günlerde meydana gelir, hücre dışı matriks (ECM) oluşumunu ve epitelizasyonu ifade eder. Yara iyileşmesinin aşamaları arasında önemli bir çakışma olmasına rağmen, bir sonraki aşamaya geçişi yaranın uygun şekilde iyileşip iyileşmediğini belirler (Broughton ve ark., 2006). ECM oluşumu trombosit degranülasyonu ile başlar çünkü proteoglikan, PDGF ve kollajen oluşumunun bilinen bir promotörüdür. Lokal fibroblastlar, yara kasılmasını desteklemek için miyofibroblastlara dönüştürmenin yanı sıra kollajen üreterek PDGF'ye cevap verirler (Reinke ve ark., 2012). Fibroblastlar, keratinositlerden epitelizasyonu uyaran keratinosit türevi büyüme faktörü (KGF) salgırlar. Endotelyal hücreler vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve kan damarlarının büyümesini teşvik etmek için temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) üretirler. Normal yara iyileşmesi fizyolojisinin bir ayırt edici özelliği yaklaşık 21 günde maksimum birikme ile devam eden kollajen üretimini durdurma yeteneğidir (Thorne ve ark., 2013).

1.1.1.3. Matürasyon (yeniden modelleme)

Kollajen üretimi ve bozunma seviyeleri eşitlendiğinde, doku tamirinin matürasyon evresinin başladığını ifade eder. Matürasyon fazında, proliferasyon sırasında yaygın olan tip III kollajen, tip I kollajen ile değiştirilir. Başlangıçta düzensiz kollajen lifleri yeniden düzenlenir, çapraz bağlanmış ve gerilim çizgileri boyunca hizalanmıştır. Matürasyon fazının başlangıcı, yaranın büyüklüğüne ve başlangıçta kapalı veya açık bırakılmış olup olmadığına bağlı olarak yaklaşık 3 gün ile 3 hafta arasında değişebilir (Desmouliere ve ark., 2005). Matürasyon fazı, benzer şekilde yara tipine bağlı olarak bir yıl veya daha uzun sürebilir. Faz ilerledikçe, yaranın gerilme mukavemeti artar. Kollajen 3 hafta sonra gerilme mukavemetinin yaklaşık %20'sine ulaşacak ve 12. haftada %80'e çıkacaktır. Maksimum skar kuvveti, örgüsüz cildin %80'i kadardır. Yara bölgesinde aktivite azaldığı için, skar kırmızı görünümünü kaybeder çünkü ihtiyaç duyulmayan kan damarları apoptoz ile giderilir. Yara iyileşmesinin aşamaları normal olarak öngörülebilir ve zamanında ilerler (Morton ve ark., 2016).

1.1.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara deriyi veya mukozayı oluşturan dokuların travma, cerrahi müdahale gibi farklı nedenlerle bütünlüğünün bozulması ya da kaybıyla, mevcut fizyolojik özelliklerinin geçici veya tamamen kaybolması olarak tanımlanır. Yaralar etyolojilerine göre akut ya da kronik olarak ikiye ayrılmaktadır. Akut yaralar geçici bir etkenin neden olduğu, kabul edilir ve belli bir süre sonra iyileşir. Bu yaraların iyileşmesini engelleyen faktörler az sayıdadır. Kronik yaralar ise sürekli bir etkenin neden olduğu, iyileşmeyen veya çok yavaş iyileşerek sıklıkla tekrarlanan yaralardır. İyileşmeyi engelleyen birçok sistemik ve lokal faktör söz konusudur. Organizmanın doğal tepkisi yaraları mümkün olduğunca kısa sürede kapatmak ve dokuların sürekliliğini yeniden sağlamaktır (Değim ve ark., 2008).

Yara iyileşmesi koordinasyon içinde iç-içe geçmiş bir dizi biyokimyasal, hücrel ve dinamik olaylar sürecidir. İyileşmenin ana ögesi hücre üremesidir. Çoğalan hücreler yarada ihtiyacı olan yerlere göç ederler. Yara iyileşmesinin tüm aşamalarında özellikle kollajen sentezi kilit rol oynamaktadır. Sentezlenen kollajen lifler, çapraz bağlanarak doku sağlamlığını ve bütünlüğünü sağlarlar (Hanna ve ark., 1997).

İyileşme süreci, yaralanmadan hemen sonra başlar ve doğal iyileşme süreci olarak adlandırılan özel bir sırayı izler. Yara kenarlarından salgılanan maddeler, damar ve hücreler arası değişimleri başlatarak kanamayı kontrol altına alır, enfeksiyonu engeller ve iyileşme sürecini hızlandırır. İyileşme işlemi yaralanan bölgeye yaranın büyüklüğüne ve ciddiyetine göre farklılıklar gösterse de iyileşme sürecindeki sıra değişmez. İyileşmede enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları bir sıra halinde gerçekleşmektedir (Maria ve ark., 1997). Yara iyileşmesini etkileyen bir çok lokal ve sistemik faktör bulunmaktadır. Lokal faktörler; yara bölgesinde enfeksiyon, yetersiz kan dolaşımı, hipoksi, doku nekrozu, yabancı partiküllerin varlığı, tekrarlayan travmalar ve yara bölgesinin hareketliği şeklinde sıralanabilir (Robson ve ark., 2001). Sistemik faktörler ise beslenme yetersizliği, diyabet, immun bağışıklık sendromu, hastanın yaşı ve genetik yapısı gibi faktörlerdir. Pek çok yara problemsiz iyileşirken kronik yaraların büyük kısmında onarım süresinin uzamasıyla birlikte iyileşmede sorunlar görülür. Bir kronik yaranın iyileşme yeteneğini kaybetmesi yara onarımının doğal evrelerinin bir yerinde aksama olduğunu göstermektedir (Hanna ve ark., 1997).

1.1.3. Yara İyileşmesi İçin Hücre Kültür Modelleri

1.1.3.1. Monokültür Hücre Modeli

Monokültür modelleri, re-epitelizasyon sürecini incelemek için uygun bir platform sunar. Re-epitelizasyon, insan veya hayvan vücudundaki dokuları örten hasarlı epitel dokularını yeniden başlatan önemli bir işlemdir. Re-epitelizasyon, özellikle keratinositler ve fibroblastlar arasındaki derinin dış yapılarını oluşturan bireysel hücreler arasındaki etkileşimlerden, trombositler, eozinofiller, T lenfositler, B lenfositler, miyofibroblastlar, büyüme faktörlerinin ve ECM'in yara iyileştirme işlemlerinin bu tür modelleri kullanarak bir dizi işaretçisinin ifadesini anlatmaktadır (Sesia ve ark., 2015).

1.1.3.2. Kornea Hücre Modeli

Hücre kültürleri ayrıca yaralı korneal epitel ve endodermisin iyileşmesinde yer alan süreçleri desteklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre kültürleri korneal dokuların iyileşmesini arttırmak için kullanılabilir. Kornea yaralandıktan sonra veya *in vitro* (laboratuvar ortamında) kültürlendikten sonra korneal epitelyal kök / progenitör hücrelerin hızla çoğaldığı ve geçici olarak hücreler ve daha sonra terminal olarak farklılaşmış hücrelere farklılaştığı bilinmektedir (Lavker ve ark., 2000). *İn vivo* (organizma içinde) korneal epitelyumun hasar görmesi, yara iyileşmesini dört farklı aşamada inceler, hücre göçü, yara bölgesini örtme bağlılığı, hücre çoğalması ve daha sonra oluşan hücrelere farklılaşır (Kuwabara ve ark., 1976).

1.1.3.3. Cilt Epidermis Hücre Modeli

Cilt yara iyileşmesinin modeli sıklıkla HaCaT hücre çizgisini, keratinositleri veya epidermal kök hücreleri içerir. Deri epitel hücrelerinin tek tabakası yara iyileşmesi için önemli bir standarttır (Li ve ark., 2013). Deri epitelyal hücre tek tabakaları, çizim tekniği kullanılarak oluşturulan bir boşluğu kaplamak için çoğalma ve hücre göçü oranını denemek için sıklıkla kullanılır (Liu ve ark., 2014).

1.1.3.4. Ko-kültür Hücre modeli

Hasarlı dokunun iyileşmesi sırasında normalde iletişim halinde olan hücrelerden oluşan ko-kültür hücre modelleri, *in vivo*'yu daha yakından taklit etmesiyle, mono-kültür modellerine kıyasla bir avantaj sağlar. Yara iyileştirme çalışmalarında ortak kültürlerin yeniliklerini göstermiştir (Amin ve ark., 2015). Ito ve arkadaşları, ultrason ve 1,25-dihidroksi vitamin D3 tedavisinin yara iyileşmesini arttırdığını göstermek için insan osteoblastik hücrelerinden (SaOS-2) ve endotel hücrelerinden (HUVEC) oluşan bir ko-kültür hücre modelini kullanmıştır (Ito ve ark., 2000).

1.1.3.5. Organoid / üç boyutlu hücre modeli

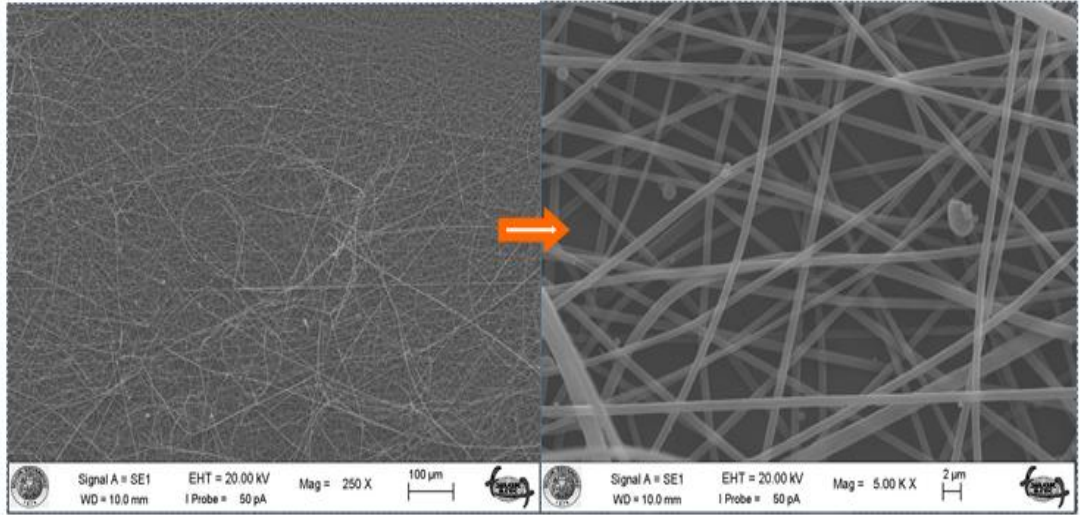
Üç boyutlu hücre modelleri, tek kültürlü modellerden daha iyi optimize eser ve daha fazla bilgi sunmaktadır. Bir organoidin yapımı, doğal kök hücrelerden embriyonun kültürünü içerir (Shkumatov ve ark., 2014). Galie ve Stegemann tarafından, yara iyileşmesinde organoid modellerin kullanımı tanımlanmış oksijen gerilimleri altında kültürlenen ve interstisyete maruz kalan üç boyutlu kolajen jelini içeren, içine gömülmüş fibroblast ve MSC'leri ile örneklenmiştir (Galie ve ark., 2014). Marquardt ve arkadaşları son zamanlarda yara iyileştirme çalışmaları dahil olmak üzere çeşitli cilt bazlı uygulamalarda kullanılacak ve yeni standartlaştırılmış insan üç boyutlu cilt yara iyileştirme modelini tarif etmişlerdir. Organoid modeller, uygun yapıya sahip olduklarından dolayı, yara iyileştirme çalışmaları için mono- ve ko-kültür modellerine önemli bir katkı olabilir (Marquardt ve ark., 2015).

1.2. Nanofiberler

500 nm'den ($1 \text{ nm} = 10^9 \text{ m}$) daha küçük çaplara sahip yüksek derecede gözenekli işlenmiş fiberlerdir (şekil 1.1). Nanofiber üretim tekniği uzun bir tarihe sahiptir ve 1900'de ilk olarak kullanmaya başlanmıştır (Babitha ve ark., 2017). Umut verici bir matriks olarak nanofiberlerin küçük, dar çap dağılımı ve yüksek yüzey alanı gibi bir çok avantajı vardır. Nanofiberler farklı polimerlerden üretilebilir, dolayısıyla farklı fiziksel özelliklere ve uygulama potansiyellerine sahiptir (Blakney ve ark., 2013).

Nanofiberlerin çapları kullanılan polimer tipine ve üretim yöntemine bağlıdır. Tüm polimer nanofiberler, geniş alan-hacim oranı, mekanik mukavemeti, yüksek gözenekliliği ve mikrofiber fonksiyonelleştirme esnekliği açısından benzersizdir. Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiber iskelelerin, iç fiber gözenekleri ve yüksek yüzey alanı gibi benzersiz özellikleri, hücre sinyal yollarını hızla aktive ederek fibroblastik hücrelerin yanıtını uyarır (Vasita ve ark., 2006). Nanofiberlerin yapılması için elektroğirim, çizim, şablon sentez ve termal-İndüklenmiş faz ayrımı dahil olmak üzere birçok farklı yöntem vardır. Elektroğirme, çeşitli polimerlerden sürekli nanofiberlerin kitle üretme kabiliyeti, kontrol edilebilir çapları, bileşimleri ve oryantasyonları olan ultra ince nanofiber üretim kabiliyeti nedeniyle nanofiberlerin üretilmesi için en yaygın kullanılan yöntemdir (Khajavi ve ark., 2016).

Nanofiberlerin bu esnekliği fiberlerin şekil ve düzenlemesini kontrol etmeyi sağlar, böylece uygulama amaçlarına bağlı olarak farklı yapılar imal edilebilir. Nanofiberler, yara iyileşmesi, doku mühendisliği ve ilaç salımı gibi birçok farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Doğal ve sentetik kaynaklardan gelen polimerlerin dikkatli seçilmesi, nanofiberlerin uygulama alanını genişletebilir. Ayrıca, nanofiberlerin kimyasal, biyokimyasal aktif farmasötik bileşen (API) veya kök hücreler yükleme diyabetik ayak üsleri tedavisi için iyi bir formları olabilir (Garg ve ark., 2015). Diyabet, glikoz kontrolünün disfonksiyonu, protein metabolizması ve lipit metabolizması üzerindeki tahrip yönetimi ile ilgili bir tür hastalıktır. Tıbbi malzemeler ve ilaç teknolojisinin gelişmesinin ardından nanofiberler, büyük gözeneklilik, eksüdasyonun emilmesi, oksijen, hücre dışı matris (ECM) benzer, su ve besin alışverişi değişim oranı fiberler geliştirilmiştir (Babitha ve ark., 2017).



Şekil 1.2. Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiber

1.2.1. Nanofiberlerin Biyomedikal mühendisliğinde Uygulamaları

1.2.1.1 Yara İyileşmesi

Yara örtüsü, yara iyileşmesinde epidermal ve dermal dokuların rejenerasyonunu kolaylaştırmanın yanı sıra, termal, kronik ve travmatik yaralar da dahil olmak üzere spesifik yara tiplerinin yönetiminde önemli bir rol oynar. İdeal bir yara örtüsünden: (i) hızlı, gelişmiş epitelizasyon ve yara iyileşmesi için eksuda emiliminin desteklenmesi ve (ii) antibiyotiğe dirençli, bakteriler dahil olmak üzere dış enfeksiyon mikroorganizma büyümesinin inhibisyonu göstermesi beklenmektedir (Zhao ve ark., 2014).

Nanoteknolojideki son gelişmeler, nanomalzemelerin sentezini sağlamıştır. Elektroğirme yoluyla hazırlanan nanofiber yapılar, *in vivo* ECM'leri taklit eden yapısal özellikler ve morfolojilere sahiptir. Geniş yüzey alanı ve yüksek derecede gözenekli konfigürasyonu ile Elektroğirme nanofiber iskeleler, fibroblastlar ve keratinositler gibi cilt hücrelerinin yapışmasını, çoğalmasını destekler ve yeni doğal ECM'lerin sentezi için kolajenler ve büyüme faktörleri gibi kritik ECM bileşenlerinin salgılanmasını kolaylaştırır (Unnithan ve ark., 2012).

Doğal insan hücre dışı matrisinin yapısını andırırken, bu nanofiberler gaz değişimini sağlar, bakteri kontaminasyonuna karşı, fiziksel ve mekanik koruma, ve yara yatağının tıkanmasını önler, böylece yara iyileşmesini kolaylaştırır. Nanofiber iskeleler çok çeşitli biyomateryallerden özellikle kitosan ve serisin gibi biyoyumlu ve

biyobozunabilir doğal biyopolimerler , mükemmel biyolojik uyumlulukları nedeniyle bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2014).

Cildin fiziksel bariyeri bozulduğundan, çoğunlukla bakteriler tarafından patojen invazyonu sıklıkla meydana gelir. Elektroğirme fiberleri de bakterilerle etkileşime girebilir ve bu etkileri üzerinde *in vitro* olarak bir çok çalışma vardır. Bu çalışmalar genellikle biyomedikal uygulamalar için fiberlerin kolonizasyonunu araştırmayı amaçlamaktadır. Bakteriyel kolonizasyon ve biyofilm oluşumu normal olarak bakteriyel bağlanmadan nanofiber matrislerin arayüzüne veya substratumuna başlar. Nanofiberlerin yara pansumanlarında mükemmel antimikrobiyal aktiviteye sahip uygulamaları son birkaç yılda aktif olarak bildirilmiştir. Üretilen polimerik kompozit nanofiberler, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel özellik sergilemiştir. Ayrıca, bu nanofibler daha etkili ve iyileşmiş bir iyileşme ve yara iyileşme hızına neden olmuştur (Trostrup ve ark., 2013).

Elektroğirme fiberleri, yaralı doku ve biyolojik ortamı ile çok farklı şekillerde etkileşime girebilir. Fiberler, kimyasal (polimer özellikleri) ve fiziksel (fiber çapı, mukavemet, gözeneklilik vb.) özelliklerine ve ayrıca fiberlere eklenmiş veya fiberlere dahil edilmiş ek moleküller yarayı etkileyebilir. Fiberlerin biyolojik dokular üzerindeki farklı etkilerinden dolayı, bu etkileşimlerin farklı yönlerine odaklanan bir çok çalışma vardır. Bu etkileşimler, yara iyileşmesini kolaylaştırmak ve yara yatağının iltihaplanması, enfeksiyonu gibi olumsuz vakalarla mücadele etmek için kasıtlı olarak kullanılabileceğinden, yara uygulamaları için fiberlerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar hakkında sistematik bir genel bakış sunmayı amaçlamaktadır (Abdelgawad ve ark., 2014).

1.2.1.2. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp

Doku mühendisliği iskelelerinin üretilmesi için literatürde bir çok yöntem bildirilmiştir. Bununla birlikte, son on yılda doku mühendisliği için iskelelerin hazırlanması nanofiber sistemleri hedeflenmiştir (Vasita ve ark., 2006). Doku rejenerasyonu için, biyo-uyumlu ve biyo-bozunabilir fiberli iskeleler, benzersiz yapıları ve hücre / hücre matrisini taklit ederek doğal bir çevre ve sağlam kabiliyetleri nedeniyle geleneksel iskelelere göre tercih edilir. Bu nedenle, elektroğirme nanofiberlerin doku mühendisliğinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Nanofiber iskeleler hücre-hücre etkileşimi üzerinde etki göstermediği gibi, hücreler ve matriks arasındaki etkileşimi de

arttırmıştır (Li ve ark., 2002). Elektroğirme nanofiber iskelelerin hiyerarşik yapısı ve doğal hücre dışı matrisi arasındaki yukarıda belirtilen özellikler ve benzerlikler nedeniyle, elektroğirme nanofiber iskeleler mükemmel bir hücre büyüme kabiliyeti sergilemiştir (Friess, 1998).

Kemik doku rejenerasyonunda, araştırmacılar PCL'nin potansiyel uygulamasını araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, PCL elektroğirme nanofiber iskelelerinin, MC3T3-E1 pre-osteoblast hücre adezyonunu ve proliferasyonunu arttırdığını ve ayrıca hücrenin farklılaşmasında yardımcı olduğunu ortaya çıkardı (Wong ve ark., 2014). Son zamanlarda doku mühendisliği için nanofiber iskelelerin uygulamaları üzerine artan sayıda çalışma bildirilmiştir. Çeşitli biyoloji ve mühendislik uzmanlıklarını birleştiren disiplinler arası bir alan olarak doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, hücre, biyomolekül ve biyomateryallerin üç temel varlığını kullanarak normal doku ve organ fonksiyonlarını geri kazandırmaya veya yeniden üretmeye çalışır. En aktif olarak araştırılan biyomateryallerden biri olan nanofiber iskele, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için çok yönlü bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Son derece yüksek yüzey-hacim oranı ve gözenekliliğiyle, nanofiberler biyolojik maddeler ve aktif türler için yüksek bir yükleme kapasitesi sunar. Ek olarak, hücre dışı matrisin (ECM) yerel *in vivo* topografik özelliklerini taklit eden birbirine bağlı mikro gözenekleri ağıyla, nanofiber iskeleler, hücre büyüme, proliferasyon ve farklılaşma için uygun bir yol sunmaktadır. Doku mühendisliğinin özel uygulaması için biyobozunur ve biyo-uyumlu doğal veya sentetik polimerler tipik olarak nano elyaf materyaller olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2005).

1.2.1.3. İlaç Salımı

Elektroğirme nanofiber içine çoklu ilaçlar yüklenebilir. Nanofiberin bir taşıyıcı olarak gösterdiği çok yönlülüğü akılda tutarak dünya çapında bir çok araştırma grubu, bir ilaç dağıtım sistemi (DDS) olarak elektroğirme yöntemiyle üretilmiş nanofiberin rolünü kapsamlı bir şekilde araştırmıştır (Chung ve ark., 2007).

Nanofiber ağların geniş yüzey alanı ve mikro gözenekli yapısı, ilaç ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere aktif biyomoleküllerin hücre fonksiyon modülasyonu için nanofiberlere kapsüllenmesi ve doğrudan dahil edilmesi için avantajlıdır. Bu, nanofiberleri ilaç ve terapötik madde dağıtımı için bir taşıyıcı olarak uygun hale getirir (Mazza ve ark., 2013). İlaçları fizyolojik olarak en uygun şekilde sunmak, tıp alanında

birincil öneme sahiptir. Daha küçük boyutlu ve uygun bir kaplama malzemesine sahip bir ilacın sağlanması hedeflenen bölge tarafından sindirilme veya emilme yeteneğini artırır. Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiberleri kullanılarak ilaç dağıtım oranının, taşıyıcının yüzey alanında ve ilacın kendisinde bir artışla arttığını düşünerek hedeflenen ilaç uygulamasıdır. Elektroğirme nanoliferin bir ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasının yararlarını vurgulayan çok sayıda araştırma yayınlanmıştır (Kenawy ve ark., 2002).

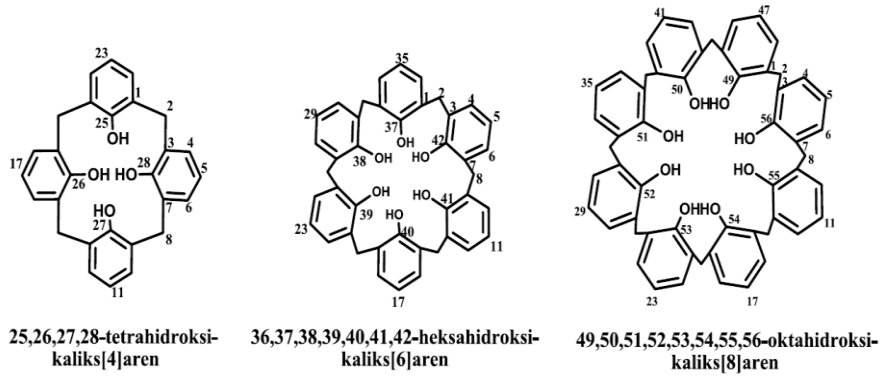
Tümör tedavisinde over kanserine karşı ortaya çıkan uygulama için biyouyumlu çekirdek-kabuk nanofiberler hazırlanmıştır. Polimerik çekirdek-kabuk nanofiberler, iki suda çözünebilir polimerler, PVA ve kitosan kullanılarak ko-eksenel elektroğirmeye dayanan ilaç verilmesi için bir taşıyıcı olarak hazırlandı. Anti-kanser madde, doksorubisin (DOX), SKOV3 insan yumurtalık kanseri hücrelerini hedeflemek için nanofiber çekirdeğe dahil edildi. *In vitro* salım deneyleri, yüklenen DOX'un, SKOV3'ün hücresel çekirdeğine verilebileceğini ve antikanser ilacının salım oranının, PVA-kitosan besleme oranının ayarlanmasıyla basit bir şekilde kontrol edilebileceğini göstermiştir. Önemli bir şekilde, DOX-yüklü PVA-kitosan çekirdek-kabuk nanofiberler yumurtalık kanseri kemoterapisi için çekirdek-kabuk nanofiberlerin potansiyel uygulamasını vurgulayarak yumurtalık kanseri hücrelerinin bağlanmasını ve çoğalmasını inhibe etmiştir (Yan ve ark., 2014).

Elektroğirme ile hazırlanmış nanofiberlere ilacın dahil edilmesi ve ilacın nanofiberlerin yüzeyine kaplanması gibi çeşitli yöntemler, nano-kargo taşıyıcısı olarak görev yapabilen elektrospin nanofiber iskelelerin hazırlanması için kullanılmıştır. Bu yöntemlerin hepsi ilacın salınım kinetiğini basit bir şekilde düzenleyerek hedef bölgesindeki bir ilacın kontrollü ve sürekli salınımını sağlamada yardımcı olabilir (Sill ve ark., 2008).

1.3. Kaliksaren

Kaliksaren, fenol / formaldehit yoğunlaşmasıyla elde edilen ve birçok uygulama buldukları süpramoleküler kimyada yaygın olarak kullanılan makrosiklik bileşiklerin bir ailesidir. Kaliks[n]arenler *p*-substitue fenol ile formaldehitin bazik ortamdaki kondensasyon reaksiyonu sonucu oluşan makrohalkalı oligomerlerdir. Kaliksarenler, metasiklofan sınıfına ait makrosiklik oligomerlerdir ve formaldehit ile *p*-substitue fenollerin bazik ortamdaki kondenzasyonu sonucu fenol birimlerinin hidroksil

gruplarına göre orto pozisyonundan birbirlerine metilen kopruleriyle bağlanması sonucu oluşurlar (Gutsche, 1989). Buradaki “n” kaliksaren bileşiğindeki fenolik birimlerin sayısını ifade eder. Kaliksarenler, supramoleküler kimyada taç eterler ve siklodekstrinler 1. ve 2. kuşak supramolekülleri oluştururken, benzer özellik göstermesi sebebiyle 3. kuşak supramoleküller olarak tanımlanmaktadır. Kolay fonksiyonlandırılabilirleri, halkalı yapıda ve farklı büyüklüklerde molekül boşluklarına sahip olabilmeleri nedeniyle çeşitli anyon , kation ve notral moleküller için çok iyi reseptörler (tasıyıcı) dir. Yapılan çalışmaların çoğu kaliks[4], [6] ve [8]arenler üzerinedir (Sekil 1.2) (Gutsche, 2008).

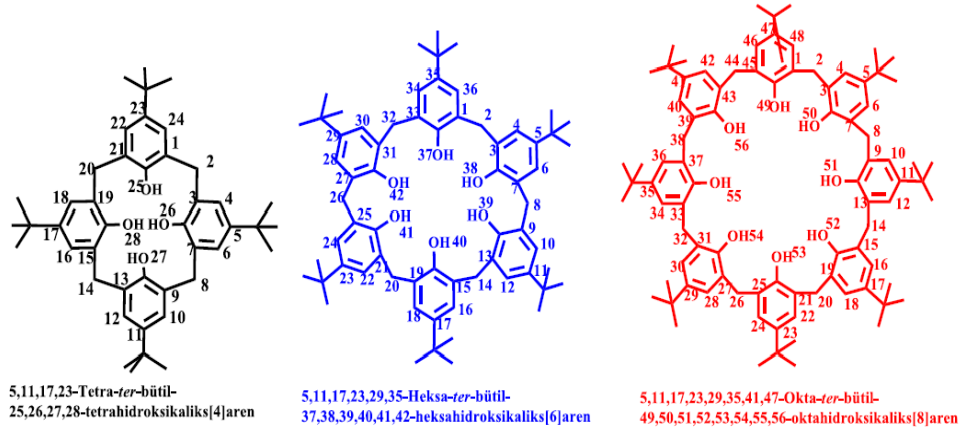


Şekil 1.3. Kaliks[4, [6] ve [8]arenlerin yapıları ve numaralandırılması

Kaliksaren (calixarene) kelimesi ilk olarak halkalı tetramerlerin molekül şeklini tanımlamak için seçilmişti. Günümüzde halkalı tetramerlerin molekül şekillerini onların buldukları konformasyondan aldıkları bilinmektedir, yani artık kaliks kelimesi molekülün şeklinin isimlendirilmesinde kullanılmamaktadır. Halkalı oligomerlerin farklı boyutlardaki türevleri arasındaki karışıklığı önlemek için Gutsche ve arkadaşları 'kaliks' ve 'aren' kelimeleri arasında parantez içerisinde yapıda bulunan aromatik birimlerin sayısının belirtilmesi ve ürün hangi fenolden elde ediliyorsa başına *p*-süstitüe eki getirmenin adlandırmada büyük kolaylık sağlayacağını söylemiştir (Gutsche, 1990).

Kaliks ve aren kelimelerinin arasına köşeli parantez ile yazılan “n” harfi fenolik biriminin miktarını bu da makrohalkalı yapının büyüklüğünü gösterir. Bu çalışmalar sonucu, “kaliks[n]aren” kelimesi temel alınarak Şekil 1.3’de belirtildiği gibi tüm süstitüentlerin yerleri ve onların spesifik pozisyonları numaralandırarak isimlendirilmiş ve "Journal of Organic Chemistry" dergisinde ilk kez yayınlamıştır. Buna göre *p-ter-*

bütülfenol ve formaldehitten sentezlenen halkalı tetramer 5,11,17,23- tetra-*ter*-bütülfenol-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren olarak adlandırılmaktadır (Gutsche, 1978).



Şekil. 1.4. *p-tert*-Bütülfenol[4]aren, *p-tert*-bütülfenol[6]aren ve *p-tert*-bütülfenol[8]aren'in numaralandırılması

1.3.1. Kaliksarenlerin Uygulama Alanları

Son yıllarda üçüncü kuşak süpramolekül olarak nitelendirilen kaliksarenlerin sentezinin yanı sıra kullanım alanları da dikkati çekmektedir. Çevresel atıklardan ağır ve değerli metallerin geri kazanılması, suyu kirletici anyon, katyon ve organik moleküllerden arıtma gibi uygulamalarının yanı sıra; biyolojik sistem için çok önemli olan enzimlere benzer işlev yapabilmeleri ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Kaliksarenlerin özellikleri nedeniyle bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve son yirmi yıldır bu konuda çalışmalar giderek hızlanmıştır (Crini, 2003). Bu çalışmalar, kaliksarenlerin farklı uygulama alanlarının oluşmasına temel oluşturmuştur. Bu bağlamda kaliksarenlerin bazı uygulama alanları;

- Enzim mimik olarak kaliksarenler,
- Molekül ya da iyon taşıyıcı (host) olarak kullanılması
- Kaliksarenlerin nanoteknolojide kullanımı
- Sensör (iyon seçici elektrot),
- Kolon dolgu maddesi olarak kromatografi çalışmalarında,
- Kiral ve Akiral katalizör olarak kullanılmaktadır.

1.3.2. Kaliksarenlerin bazı özellikleri

Kaliksarenlerin erime noktaları molekül büyüklükleri ile doğru orantılı olarak artar. Erime noktaları *p-tert*-bütilkaliks[4]aren'in 342-344 °C, *p-tert*-bütilkaliks[6]aren'in 380-381 °C, *p-tert*-bütilkaliks[8]aren'in 411-412 °C'dir. Bazı kaliksarenler kloroform, piridin gibi çözücülerde yeterli miktarda çözünebilmelerine rağmen, kaliksarenlerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri azdır. Ester, sülfonat, amino gibi suda çözünürlüğü artırıcı fonksiyonel grupların kaliksaren yapısına katılması ile suda çözünürlükleri artırılabilir. Kaliksarenlerin spektroskopik özellikleri incelendiğinde 280nm civarında absorban olduğu gözlenir. IR spektrumlarında parmak izi bölgesinde verdikleri pikler aynıdır. Bununla birlikte fenolik –OH gruplarına ait pikler ise 3150-3300 cm⁻¹ de görülür fakat molekülde meydana gelen molekül içi hidrojen bağlarından dolayı pikler yayvandır. Siklik yada lineer fenol formaldehit oligomerleri absorpsiyon oranı, kaliksarendeki halka sayısı ile değişmekle birlikte maksimum absorpsiyonu 280-288 nm'de verirler. *tert*-bütil grupları yüksek sıcaklıklarda singlet pik veririrken düşük sıcaklıklarda 2 tane dublet pik veririler. Bu durum kaliksarenlerin sıcaklık değişmesi ile konformasyonlarının değiştiğini gösterir (Gutsche, 1989).

1.4. İnsan Gingival Fibroblastı (HGF-1) Hücre Kültürü:

İnsan Gingival Fibroblast HGF-1 (ATCC, CRL46 2014, USA) hücre hattı model olarak kullanıldı. HGF-1 hücre hattı, 28 yaşında erkek bir hastadan ağız içi diş eti dokusundan elde edilir. Bu hücre hattı, tek katmanlı, büyüyen ve yapışkan bir hücre hattıdır . HGF-1 hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (4500 mg/ml glucose, sodium pyruvate, sodium bicarbonate içeren Sigma D6429) besiyeri içinde %10'luk ıslı ile inaktive edilmiş Fetal Dana Serumu FBS (Biochrom S0115) ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Biochrom A2213) eklenerek T75 hücre kültür kaplarını kaplayarak mililitrede 1x10⁶ hücre yoğunluğu ulaşana kadar 37°C'de % 5 CO₂'li, % 95 nemli etüv içerisinde inkübe edilir (Bu hücre hattının temel besiyerisi Katalog No. 30-2002 olan ATCC ile formüle edilmiştir) (McAllister, 1993).

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), HGF-1 hücrelerinde DNA sentezi ve proliferasyonunu uyarır. Bradykin reseptörleri, hücre başına 22000 görünür yoğunlukta ve 1.2 nM disosiyasyon sabiti (K_d) ile hücreler

üzerinde bulunur. Reseptörler, fosfolipaz C ve A2 ve kalsiyum kanalı efektörlerini içeren bir sinyal yoluna bağlanır. Bu test bir kaç farklı avantaj sağlar (McAllister, 1993)

:

- ✓ Deneyi aniden herhangi bir plaka konfigürasyonunda gerçekleştirilebilir;
- ✓ Hücreler yarayı kapatmak için belirli bir yönde hareket eder,
- ✓ Deney yüzeyi deneyden önce bir ECM ile kaplanabilir,
- ✓ Hücrelerin hareketi ve morfolojisi görsel olarak gerçek zamanlı olarak gözlemlenebilir ve deney boyunca yakalanan görüntüler böylece hız ölçümlerine izin verir (Vogt ve ark., 2010).

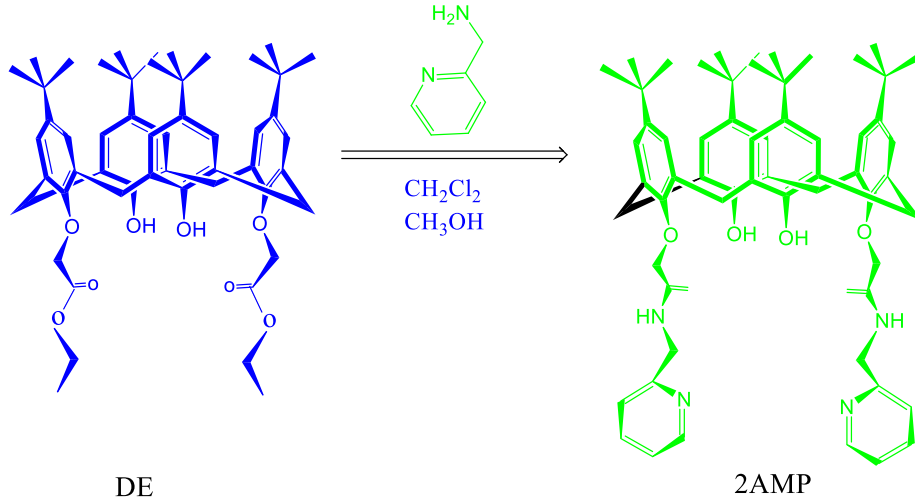
Bununla birlikte, bu sistemin bazı dezavantajları vardır. Bu testin “ev demlemek” olduğu için çizikleri oluşturma yöntemleri farklıdır. Farklı laboratuvarlar arasında ve çiziklerin boyutu, şekli ve aralıkları, belirli bir deneyde iyi bir şekilde analiz etmek için deneyden farklı olabilir (Staton ve ark., 2009). Dolayısıyla, kontrol ve deneysel tedavi gruplarının, tek tabakalı konfluens eşdeğer koşulları altında çalıştırılmasının ve yarayı meydana getirmek için denudasyon alanının kesinliğinin sağlanması zor olmaktadır (Tamada ve ark., 2007).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. KİMYASAL NUMUNE ANALİZLERİ

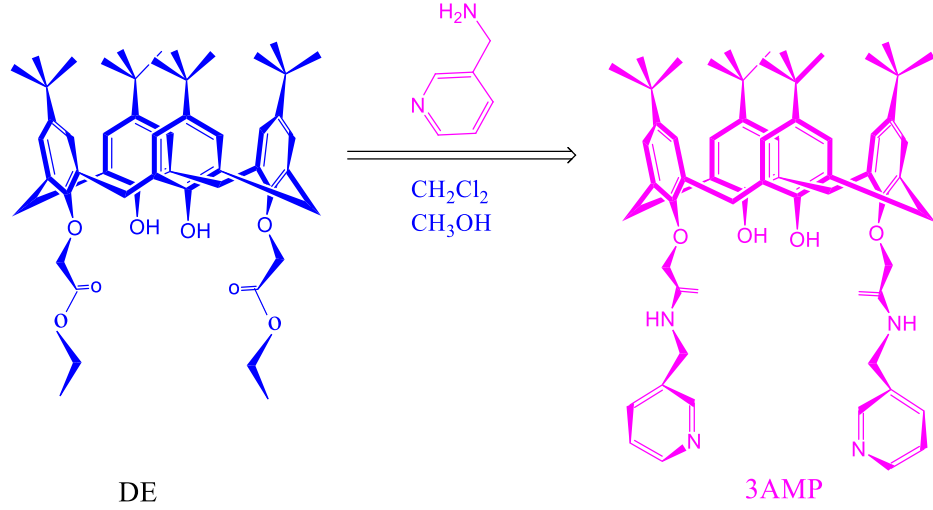
2.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin *p*-*tert*-bütilkaliks[4]arenin Diamit türevleri sentezi:

2.13 g (2.5 mmol) ilk reaksiyonda oluşan diester bileşiği CH_2Cl_2 : CH_3OH (45 ml/45 ml) içerisinde çözüldükten sonra üzerine 15 mmol (1.62 g) eklenir. Reaksiyon 72 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla karıştırılır. Reaksiyonu İTK'ile gözlenerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü takip edilir (1:1, Etilasetat : n-Hekzan) (Şekil 2.1.), (Şekil 2.2) ve (Şekil 2.3.). Üstelik reaksiyon FT-IR spektroskopisinde 1751 cm^{-1} 'deki ester karbonil bandının 2-AMP 1676 cm^{-1} , 3-AMP 1681 cm^{-1} ve 4-AMP için 1638 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü gözlemlendi. Çözücü reaksiyon sonunda buharlaşma ile uzaklaştırılarak kalan katı partikül 250ml CHCl_3 ile çözülür ve ayırma hunisinde saf H_2O ile yıkanarak organik faz kuru MgSO_4 ile kurutulduktan sonra süzülür. Süzüntü buharlaşma ile yoğunlaştırılır ve CH_3OH damlatılarak kristallenmeye bırakılır ve kristaller süzülerek alındı.



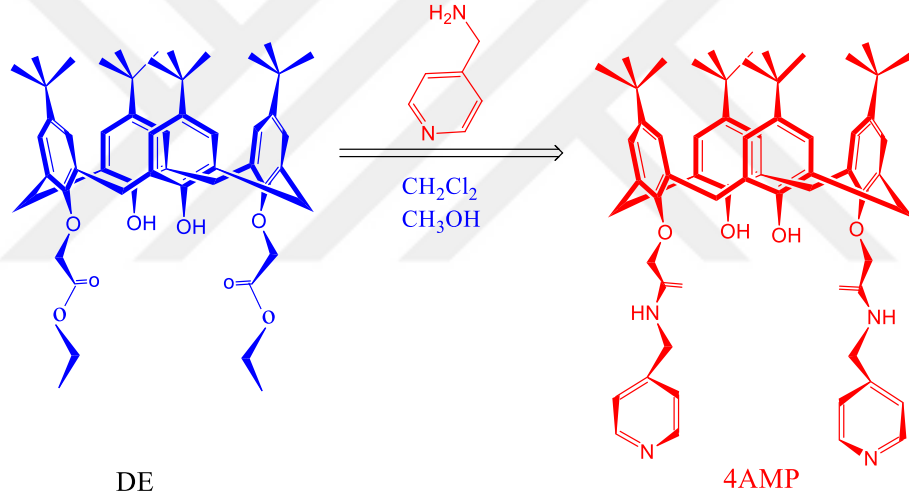
Şekil 2.1. 2-Aminometilpridin *p*-*tert*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevleri sentezi

2-AMP (2-Aminometilpridin *p*-*tert*-bütilkaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).



Şekil 2.2. 3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevleri sentezi

3-AMP (3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).



Şekil 2.3. 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevleri sentezi

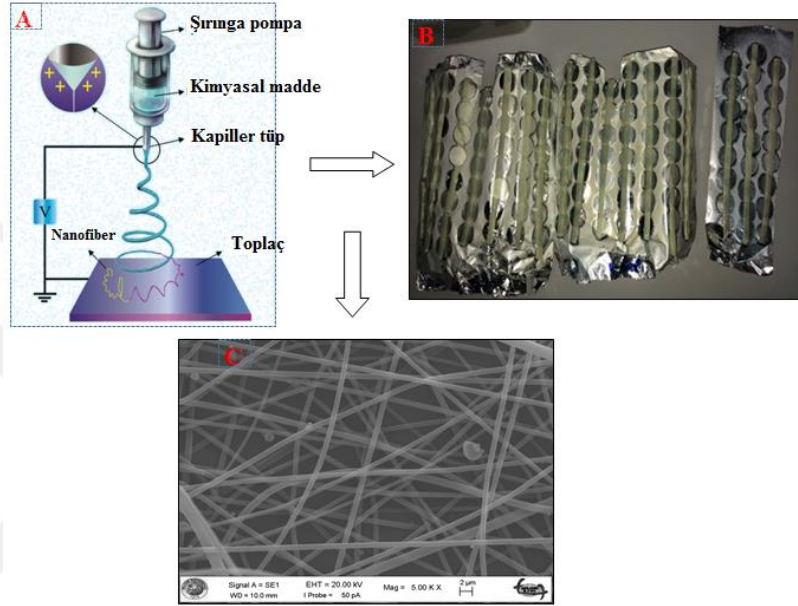
4-AMP (4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).

2.1.2. Elektroeğirme Yöntemiyle Sentezlenen *P-tert*-bütil Kaliks[4]Aren Bileşiklerinin (2-4)AMP Nanofiberlerinin Hazırlanması:

Nanofiberler Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Prof.Dr. Şeref Ertul'un laboratuvarında Dr. Fatih Özcan tarafından hazırlandı.

Elektrospın yöntemi için gerekli deney düzneği (Şekil 2.4) görülmektedir ve temel olarak 1) Yüksek voltaj güç kaynağı, 2) Şırınga pompa ve 3) Metal malzemeden yapılan toplaç olmak üzere üç önemli ana parçadan oluşmaktadır. Numune solüsyonu şırıngaya

enjekte edilerek pompa yardımıyla şırıngadan metal iğneye sabit bir hızla gönderilir. Metal iğnenin ucunda damlacık koni şeklini aldığı anda yüksek voltaj kaynağı açılarak istenilen değere vardığında, tüpün ucunda asılı bir damlacık olarak duran çözelti, elektrostatik itme kuvvetlerinden dolayı toplayıcı yüzeyine nano boyutta rasgele olarak fiberler halinde toplanır. Daha sonra bu fiberler indiyum kalay oksit (İTO) yüzey üzerine kaplanarak hazır hale getirilir.



Şekil 2.4. a) Nanofiber elektroğirme düzeneği, b) Elektroğirme ile lazer kesim İTO yüzeylerinin nanofiber kaplanması ve c) Nanofiber yüzeyi

Sentezlenen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP bileşiklerinin yapıları spektroskopik tekniklerle (FT-IR, ¹H-NMR), nanofiber yüzey karakterizasyonu ise SEM, AFM ve TEM gibi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.

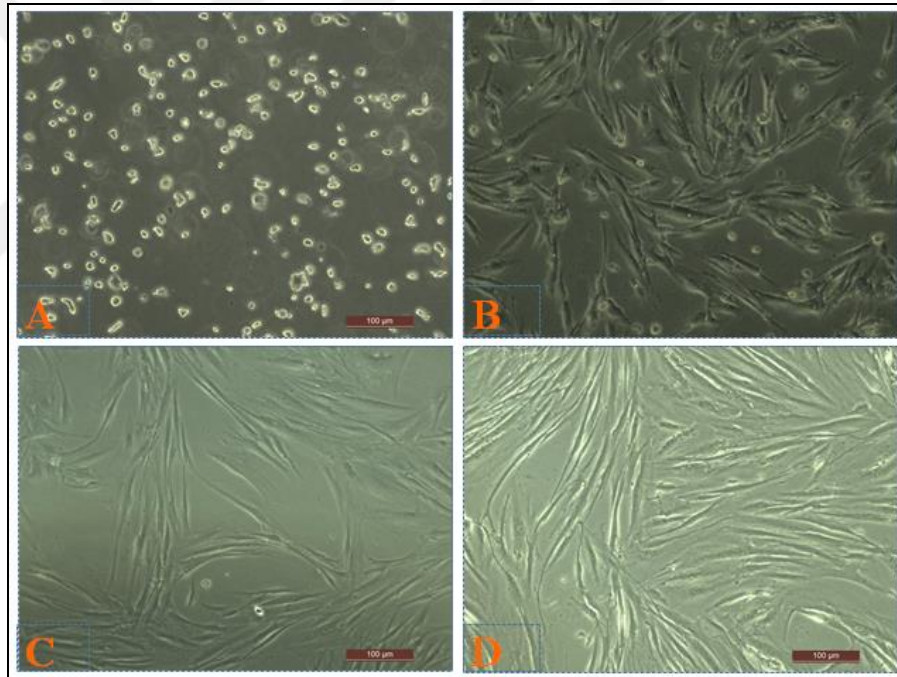
2.2. Nanofiber Yüzey Sterilizasyonu:

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanofiber yüzeylerine hücre ekimi yapılmadan önce, 12 kuyucuklu plakadaki kuyucuklara *p-tert*-bütikaliks[4]aren nanofiberler yerleştirilerek 2saat boyunca UV'de sterilize edildi.

2.3. Biyolojik Numune Analizleri

2.3.1. İnsan Gingival Fibroblast (HGF-1) Hücre Kültürü:

İnsan Gingival Fibroblast HGF-1 (ATCC, CRL46 2014, USA) hücre hattı model olarak kullanıldı. HGF-1 hücre hattı, 28 yaşında beyaz ırk bir hastanın ağız içi diş eti dokusundan elde edilmiştir. Bu hücre hattı, tek katmanlı büyüyen yapışkan bir hücre hattıdır (Şekil 2.6). HGF-1 hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (4500 mg/l glucose, sodium pyruvate, sodium bicarbonate içeren Sigma D6429) besiyeri içinde %10'luk ısı ile inaktive edilmiş Fetal Dana Serumu FBS (Biochrom S0115) ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Biochrom A2213) eklenerek T75 hücre kültür kaplarını kaplayarak 37°C'de % 5 CO₂'li, % 95 nemli etüv içerisinde inkübe edildi.



Şekil 2.5. HGF-1 hücrelerinin Inverted mikroskopta 10X objektife görüntüleri: a) HGF-1 çözüldükten sonra ; b) HGF-1 çözüldükten sonraki 2. Gün ; c) HGF-1 çözüldükten sonraki 3. gün ; d) HGF-1 çözüldükten sonraki 4. Gün (Leica DM IL LED).

2.3.2. HGF-1 Hücre Hattının Çözdürülmesi

HGF-1 hücrelerinin donmuş olarak bulunduğu kriyovial, sıvı nitrojenden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve su banyosunda (37 ° C) çözdürüldü. Kriyotüplerin etrafı %70'lik alkol ile iyice silinerek kabine alındı. Hücreler 37°C'ye ısıtılmış 9 mL besiyeride çözdürüldü. Falkona aktarılan hücreler, 5 dk 1200 rpm de santrifüj edildi ve hücre

pelleti (2-4mL) DMEM çözeltisi ile seyreltilerek T-25 kültür kabına aktarılarak 37 °C’de, % 5’lik CO’li inkübatöründe bırakıldı. T-25’teki HGF-1 hücresi, kap yüzeyini kapladıktan sonra T-75 hücre kültür kabına aktarıldı.

2.3.3. HGF-1 Hücre Hattının Pasajlanması

Hücre kültürü işlemi için yapılacak tüm işlemler steril kabinde kontaminasyon riskini en aza indirmek için yapılmaktadır. Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besiyer ortamı hücreler için yetersiz hale gelir hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalma hızları yavaşlar. Bunun için flasttaki besiyeri aspire edilerek flast yüzeyindeki besiyeri ve ölü hücre kalıntısını Hank’s tuz solüsyon çözeltisi ile uzaklaştırıldı. Daha sonra tripsin EDTA (Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit) (Biological Industries 0.25 % trypsin 0.05% EDTA, Israel) solüsyonuyla hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücreye zarar vermeye başlar. Bunu önleyebilmek için tripsinin inhibe edilmesi için en az tripsin hacminin iki katı DMEM besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulur (Sezen ve ark., 2008). Ardından hücreler 5 dk 1200 rpm’de santrifüj edildi. Pelleti 2-4 mL DMEM çözeltisi ile seyreltikten sonra hücrelerin kültür kaplarında homojen bir şekilde dağılmasını görmebilmek için invert mikroskop altında incelenip 37 °C’de, % 5’lik CO’li etüvde inkübe bırakıldı (Akbulut ve ark., 2016) (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. HGF-1 hücre hattı kültüründe kullanılan cihazlar; (a) inkübatör, (b) santrifüj, (c) invert mikroskop ve (d) su banyosu.

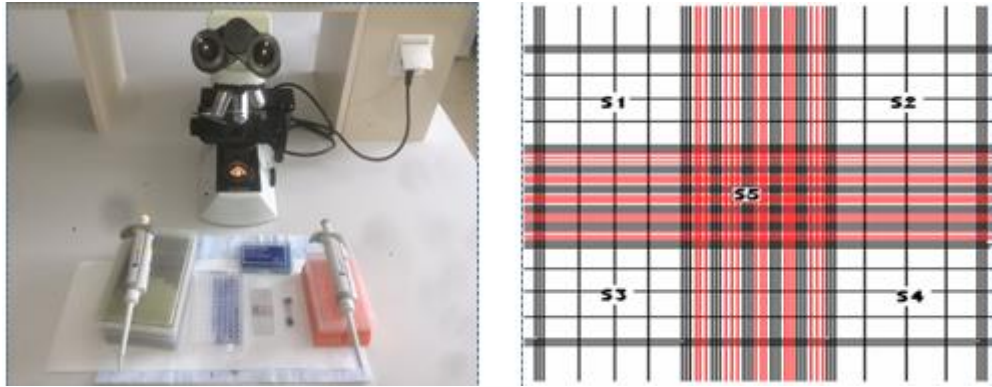
2.3.4. HGF-1 Hücresinin Sayımı ve Ekimi:

Hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesine hücre sayımı işlemi denilir. Santrifüjden gelen hücre süpernatantı çekilip pelleti hücre besiyeri ile çözdürülerek pipetaj yapıldı. Hücre sayımı hemositometre adı verilen özel lamlar kullanılarak sayıldı. Hemositometre üzerinde mikroskopik boyutta üç bölümlü çizgilerle bölünen 9 büyük kare oluşturan bir mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1 mm² 'dir (Şekil 2.8). Lam üzerine konulan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. Sonuçta her kare üzerindeki toplam hacmi aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml veya } 10^4 \text{ ml}$$

Sayım yapılmadan önce hücreler homojen hale getirilir ve hücre süspansiyonundan 50µl alınıp üzerine 50µl trifen mavisi (1: 1) ile iyice karıştırılarak bu solusyondan 10µl hemositometreye yüklenip ışık mikroskop altında hücreler incelendi. Boyama sonrası ölü hücreler koyu mavi renkte boyanırken canlı hücreler parlak renkte kalmaktadır (Kocakli ve ark., 2014). Işık mikroskop altında mililitredeki hücre sayısını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \text{Hücre sayısı (lam üzerinde)} \times 10^4$$



Şekil 2.7. hücre sayım malzemeleri ve Hemositometrik kamara diyagramı.

Bu hesaplama formül ile HGF-1 hücre sayımı tamamlanarak daha önce 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Kaliks[4]aren nanofiberlerin üzerine mililitredeki hücre yoğunluğu 15×10^4 olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra plaklar 48 saat bekletmek üzere inkübasyona bırakıldı. SEM, XTT ve konfokal analizleri için hücre ekim işlemi aynı basamaklarla uygulandı.

2.3.5. Taramalı elektron mikroskopta (SEM) HGF-1 hücre hattının analizi :

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren nanofiber numunelerin laboratuara alındıktan sonra belli bir süreliğine sterilizasyon yapıldı. Yüzeylerine HGF-1 hücresi ekilerek 48 saat inkübasyon sonrası fiberler yeni 24 kuyucuklu plaklara aktarılarak 2 kez 0.1M pH: 7.4 kakodilat tamponuyla yıkama sonrası, kakodilat tamponunda hazırlanan glutaraldehit solüsyonu ekleyerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bir süreliğine bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar 2 kez 0.1M kakodilat tamponunda yıkandı. Tampon uzaklaştırılarak plaka -80 °C derin dondurucuda 24 saat (1 gece) bekletildi. Ertesi gün, -110 °C'ye kadar soğutan liyofilizatörde plaka 24 saat (1 gece) bekletilerek kurutuldu. SEM analizi öncesi numuneler 5nm AuPd ile kaplanarak numune yüzeylerinde tutunup çoğalan hücreler, 500-X, 2000-X, 5000-X ve 10000-X büyütmelemlerde görüntülendi (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. a)Liyofilizatör Cihazı, b) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

2.3.6. HGF-1 Hücre Hattının Canlılık Testi-XTT Analizi:

XTT, mitokondriyal enzimlerle suda çözünür portakal renkli formazanına indirgenmiş bir tetrazolyum tuzudur. Bu analiz, metabolik aktif hücrelerin dehidrojenaz enzimleri tarafından XTT'yi turuncu renkli formazan bileşiklerine indirgeme yeteneğine dayanmaktadır (Gabrielson ve ark., 2002). XTT analiz sonucunda boyanın yoğunluğu, metabolik aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır (Roehm ve ark., 1991).

Yüzeylerine HGF-1 hücresi ekim yapılan 2, 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren nanofiberler, 72 saat inkübasyon ardından DMEM ve XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-

Nitro-5-Sulfophenyl-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Biological Industries) solüsyonundan ekleyerek hücreler solüsyon içerisinde 5 saatlik %5 CO₂, %95 nem içeren 37°C'deki inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, plaklarda çözülmüş olan formazan kristalleri epoch biotek marka ELISA okuyucuda 460 ve 650nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 2.10).



Şekil 2.9. ELISA Cihazı

2.3.7. Konfokal Mikroskopta HGF-1 Hücre Hattının Analizi :

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren nanofiberlerin üzerine ekilen HGF-1 hücrelerinin bu yüzeylerde çoğalmalarının ve morfolojilerinin incelenmesi için hem çekirdekleri hem de iskeleleri boyandı. 24 kuyucuklu plakalara nanofiberleri yerleştirilerek sterilizasyon yapıldıktan sonra yüzeylerine HGF-1 hücre ekimi yapıp 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonrası numuneler üzerindeki mediyum çekilerek PBS tamponuyla yıkandıktan sonra aspiratör yardımıyla tampon uzaklaştırılır ve %4 paraformaldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra PBS ile seyreltilen %0.5 Triton 100X solüsyonu eklenip 5 dakika süreliğine oda sıcaklığında bekletildi. Phalloodin boyası 40-X PBS ile seyreltildikten sonra nanofiberlerin üzerine eklenip oda sıcaklığında 30 dakika boyunca tutuldu. PBS tamponu ile yıkama işleminin ardından PBS ile seyreltilen 1000-X Dapi boyası 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmek üzere nanofiberlerin üzerine eklendi. Bu işlem sonrası nanofiberlerin üzerinden çözelti aspiratör ile uzaklaştırılıp PBS tamponu ile 2 defa yıkandı. Lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak HGF-1 hücre çekirdeğini

ve isketini 488 nm ve 635 nm dalga boylarında floresan ile uyarılarak görüntülendi (Şekil 2.11).



Şekil 2.10. Lazer Taramalı konfokal Mikroskobu

2.3.8. İn Vitro Çizim Deneyi (Scratch Assays)

Yara iyileşmesinde fibroblast migrasyonunun temel rolünü göz önünde bulundurmak için in vitro çizim deneyi testi yapıldı. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütikaliks[4]arenin matrisleri üzerinde hücre migrasyon aktivitesini değerlendirmek için araştırma yapıldı. In vitro yara iyileştirme testi, farklı deney koşulları altında kollektif hücre göçünü değerlendirmek ve ölçmek için uygun ve ekonomik bir yöntemdir. Kollektif hücre göçü, yara onarımı ve kanser metastazı gibi deriye ait birçok fizyolojik ve patolojik sürecin bir ayırt edici özelliğidir. Biri, aynı derecede birleşme ile in vitro “yaralar” haline getirerek hücre tek tabakalarını oluşturarak boyut ve geometri açısından tahlilin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini arttırabilir. Bu testi ilk olarak epitelyal veya mezenkimal hücreler için yara iyileşmesi modelleri olarak kullanılmıştır. Ayrıca in vitro ortamda hücre göçünü incelemek için basit ve ekonomik bir yöntemdir(Friedl ve ark., 2004).

24 kuyucuklu plakalara 2-AMP ve 3-AMP kaliks[4]aren nanofiberleri yerleştirilerek sterilizasyon yapıldıktan sonra yüzeylerine 15×10^5 HGF-1 hücre ekimi yapılarak 48 saat 37 °C’de inkübasyon içinde tutuldu. Süre sonrası numuneler üzerlerindeki mediyum çekilmeden steril 100’lük pipet ucu kullanıp yarak oluşturarak

mikroskop altında incelendi. Ardından besiyeri uzlaştırılıp ve 2 defa Hank's ile yıkandıktan sonra üzerlerine DMEM besiyerisi eklenip çizilen alanların her bir kuyucusunda HGF-1 hücrenin göç etme kabiliyetini incelemek için ışık mikroskop kullanılarak 0, 12, 24 ve 48 saatlerinde farklı görüntüler alındı.

2.3.9. HGF-1 hücre hattının dondurma işlemi :

Mikrobiyal kontaminasyon veya genotipik değişiklikler uzun süreli hücre kültürlerinde ortaya çıkabilir ve iyi karakterli hücre hatlarının kaybına yol açabilir. Hücre kaybını önlemek için, hücreler sıvı nitrojende (-196°C) sonsuza kadar dondurulabilir, saklanabilir ve bu amaçla yüksek sayıda hücre gerekebilir. T75 flask yüzeyini kaplayan HGF-1 hücresine pasajlama işlemi uygulanarak hücre pelleti %10 DMSO , % 90 fetal sığır serumu dondurma medyumunu ile seyreltilerek dondurma tüpleri içerisine konuldu (Çiçek ve ark., 2006). Bu tüpler, izopropilalkol içeren Mr.Frosty ile -80°C dondurucuya taşınıp 1 gece boyunca bekletildikten sonra kriyovialler uzun süreli sıvı nitrojen (-196°C) tanklarına kataloglanarak transfer edildi (Şekil 2.12).

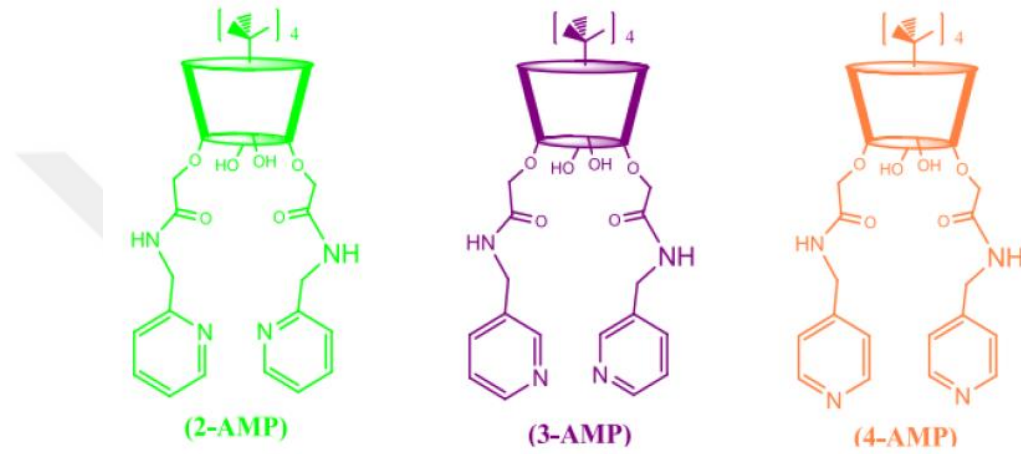


Şekil 2.11. (a) -80°C dondurucu ve (b) -196°C azot tankı

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

3.1. 2, 3 ve 4-AMP'nin Yapı, Karakterizasyon ve Analiz Sonuçları

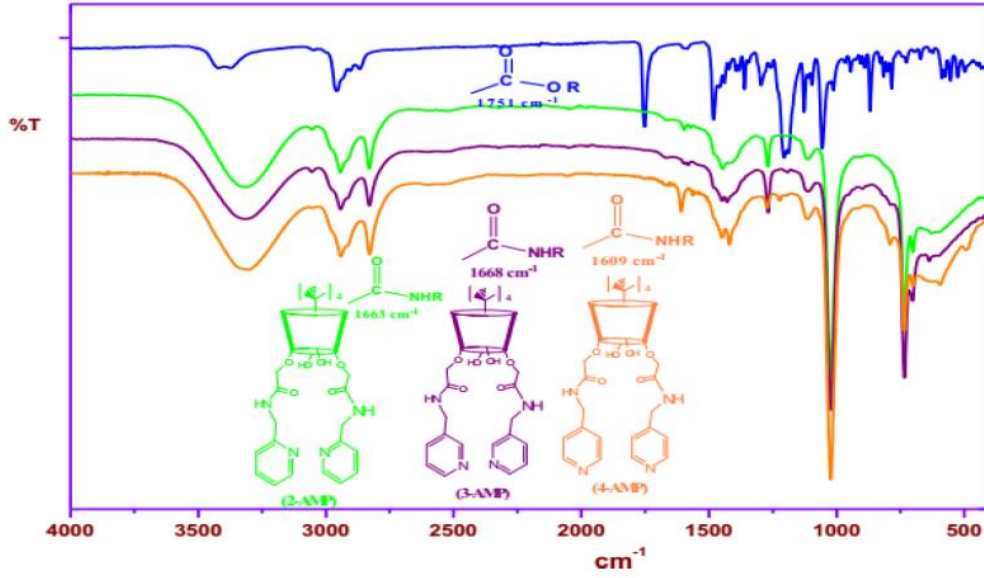
Çalışma süresince 2, 3 ve 4-AMP'nin toz halleri ve bu maddelerden oluşturulan nanofiber yapılar kullanıldı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamid türevleri

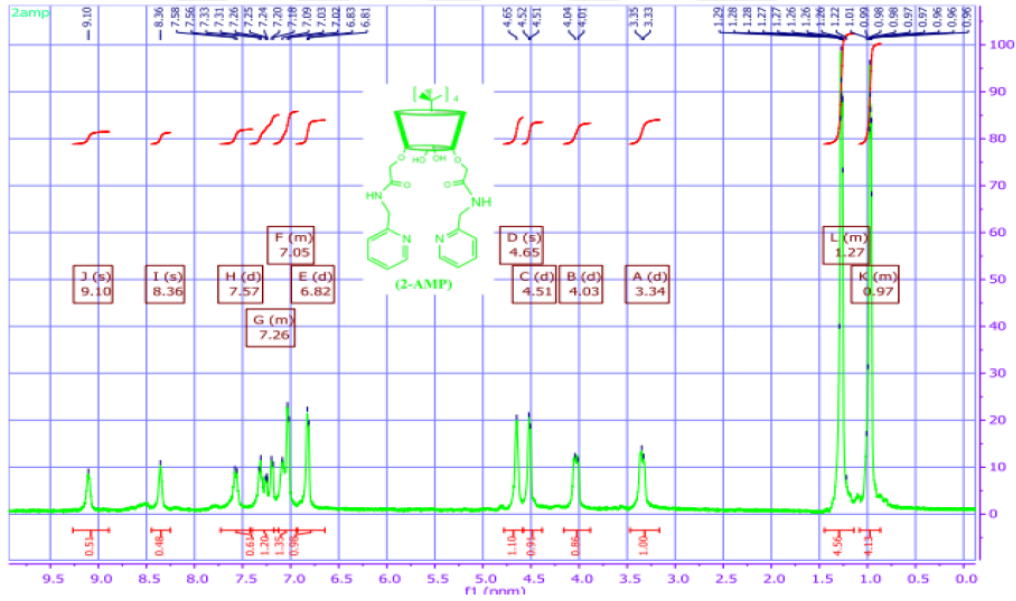
3.1.1. 2, 3 ve 4-AMP'nin FT-IR Analizleri

2, 3 ve 4- Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin FT-IR'larına bakıldığında FT-IR spektroskopisinde 1751 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 2-AMP için 1663 cm^{-1} , 3-AMP 1668 cm^{-1} ve 4-AMP için 1609 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü takip edildi (Şekil 3.2).



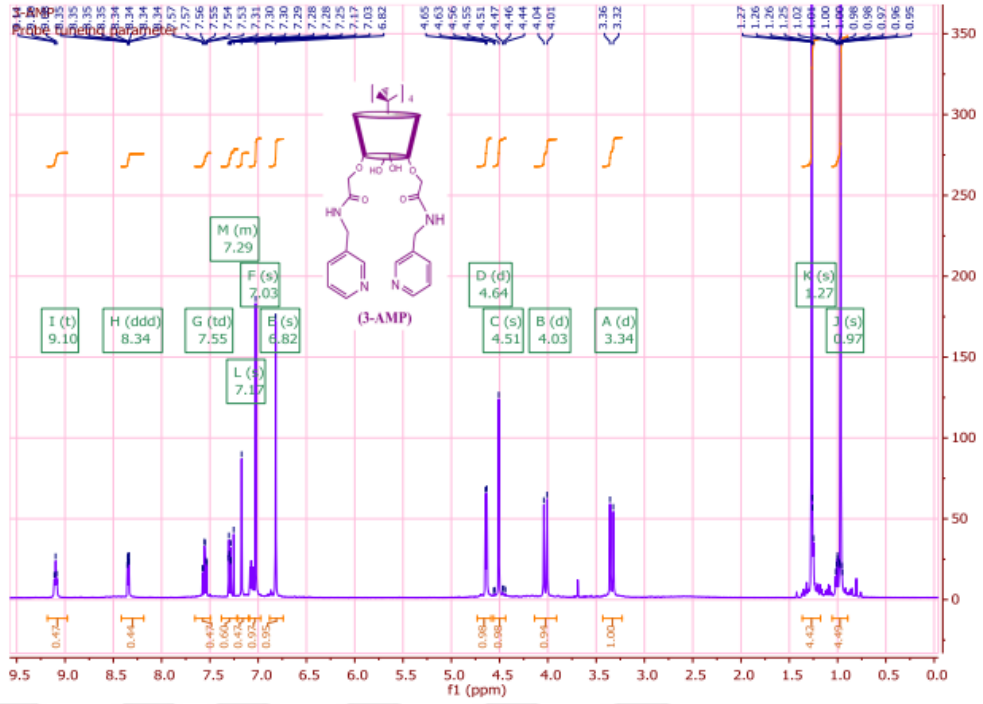
Şekil 3.2. 2 , 3 ve 4-AMP'nin FT-IR analizleri

3.1.2. 2 , 3 ve 4-AMP'nin ¹H-NMR Spektrumları



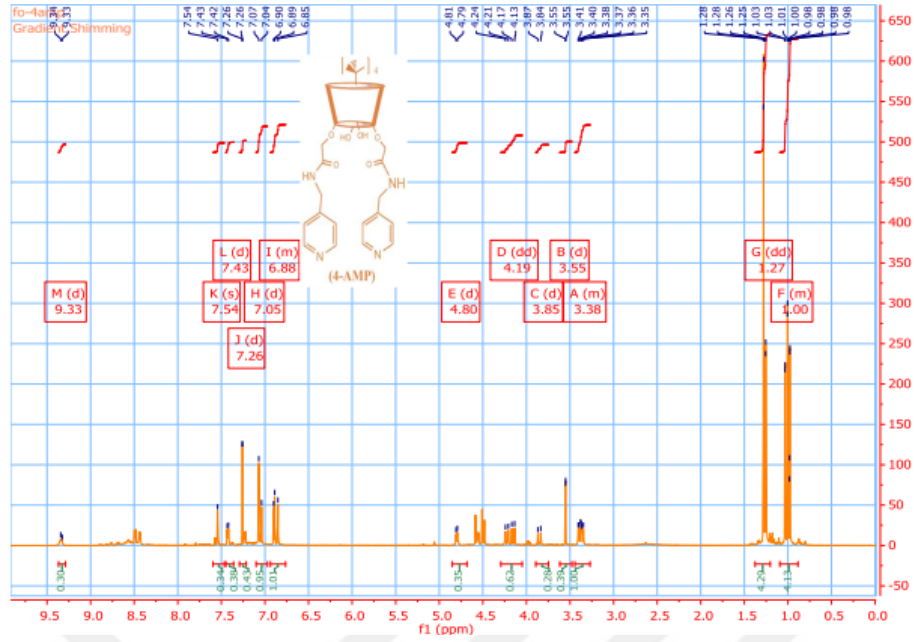
Şekil 3.3. 2-AMP'nin ¹H-NMR spektrumları

2-AMP; verim: 1.48 g, (% 65.0), E.n : 259-262 IR :1676 cm⁻¹ (C=N) vmax (ATR): 3454, 3358, 1676 cm⁻¹ ; ¹H-NMR (400 MHz CDC13): δ 0.97 (18H, s, tBu), 6.82 (4H, s, ArH), 1.27 (18H, s, tBu), 4.51–4.65 (8H, m, OCH₂, Ar–CH₂–NH), 3.34 (4H, d, J= 13.3 Hz, ArCH₂Ar), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.05 (4H, s, ArH), 8.45 (2H, d, J=4.5 Hz, PyH), 7.31 (2H, s, OH), 4.03 (4H, d, J =13.3 Hz, ArCH₂Ar), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). 7.57 (2H, d, J=7.8 Hz, PyH), anal. hesaplı. C₆₀H₇₂O₆N₄: C, 76.24; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan; C, 76.28; H, 7.70; N, 5.88% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil.3.3).



Şekil 3.4. 3-AMP'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları

3-AMP; verim: 1.5 g, (% 65.8), E.n : 239-242 IR : 1681 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): $3454, 3358, 1681\text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 0.98 (18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH₂Ar), 1.22 (18H, s, tBu), 3.90 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH₂Ar), 6.85 (4H, s, ArH), 4.46–4.49 (8H, m, OCH₂, Ar–CH₂–NH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 9.21 (2H, t, NH), 8.62 (2H, d, PyH), 8.45 (2H, d, $J=4.5\text{ Hz}$, PyH). anal. hesaplı. $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil 3.4).



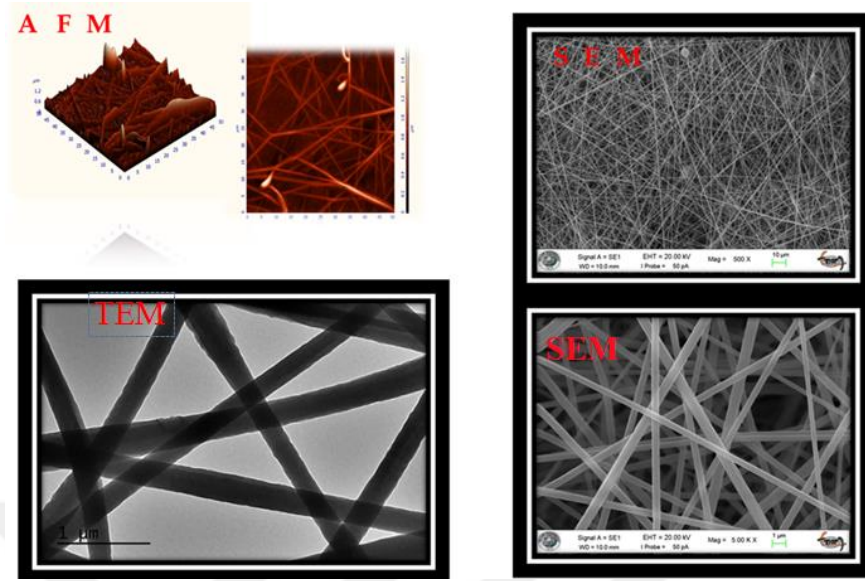
Şekil 3.5. 4-AMP'nin ¹H-NMR spektrumları

4-AMP; verim: 1.72 g, (% 75.5) , E.n : 239-242 IR :1638 cm⁻¹ (C=N) v_{max} (ATR): ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃): δ 1.27 (18H, s, tBu), 3454, 3358, 1638 cm⁻¹; 1.0 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH₂Ar), 6.88 (4H, s, ArH), 3.55 (4H, sAr-CH₂-NH), 4.80 (4H, s, OCH₂), 3.86 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH₂Ar), 7.05 (2H, m, PyH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.26 (2H, d, J= 7.8 Hz, PyH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, J= 7.8 Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). anal. hesaplı. C₆₀H₇₂O₆N₄: C,76.23; H,7.68; N,5.93. Bulunan: C,76.31; H,7.74; N,5.83 % (MA: 944.56 g/mol) (Şekil 3.5).

3.1.3. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin AFM, SEM ve TEM analizleri

2, 3 ve 4-AMP nanofiberlerin yüzey analizleri AFM, SEM ve TEM gibi karakterizasyon teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır (Şekil 3.6). Bu teknikler kullanılarak nanofiberlerin morfolojik özellikleri olarak lif çapı ve çap dağılımı, boncuk büyüklüğü ve sayısı, yüzey özellikleri arasında incelenmektedir. SEM sonuçlarına göre nanofiberlerin çaplarının büyüklüğü 186.4 nm boyutunda olup nanofiber tabakasındaki dağılımları homojendir. Nanofiber yüzeyinde bulunan boncuklar, üzerine damlayan polimer çözeltileri olarak tanımlanmaktadır. Deneylerimizde kullanılan 2, 3 ve 4-AMP nanofiber yüzeyleri polimer katkılı olmadığı için boncuksuz yapıda olduğu SEM, TEM görüntülerinde gösterilmektedir. Nanofiberler uzunlukları boyunca gözeneklere sahip

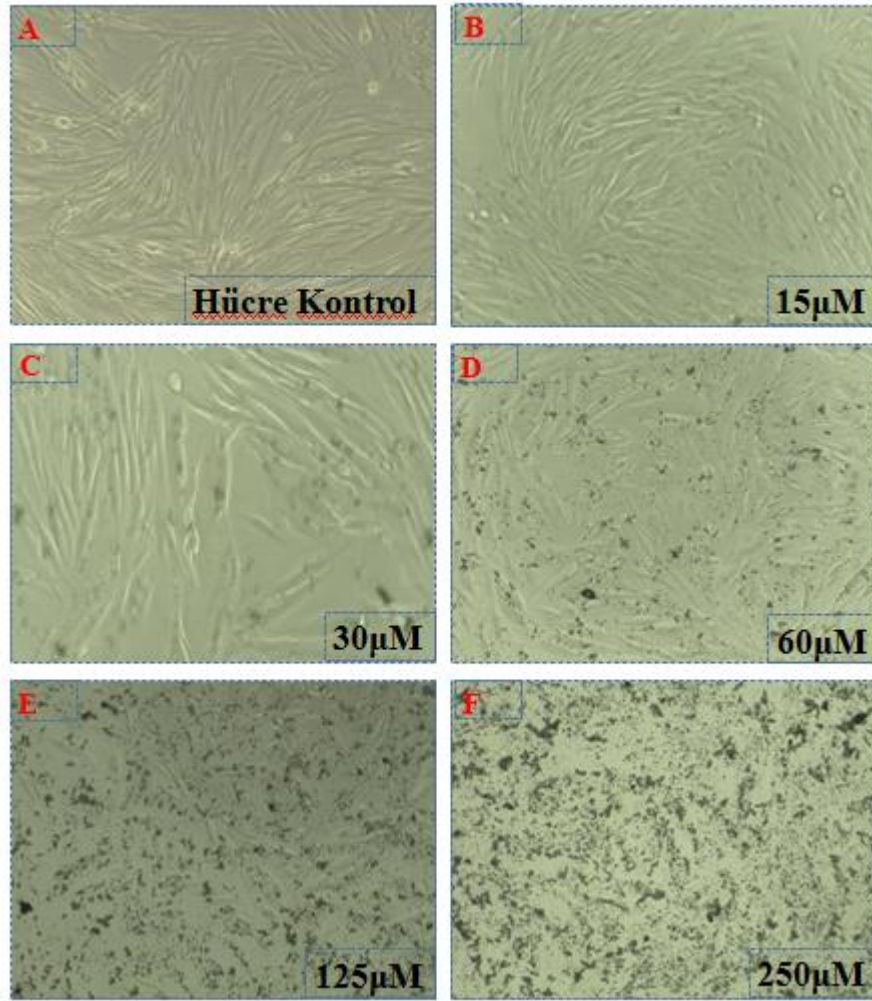
olurlar. Gözenek büyüklüğü ve dağılımı belirlenmesi için yapılan 3B AFM analizi sonucunda 20x20 µm’lik alanda gözenek çap ve dağılımı homojendir.



Şekil 3.6. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP’nin AFM, TEM ve SEM görüntüleri

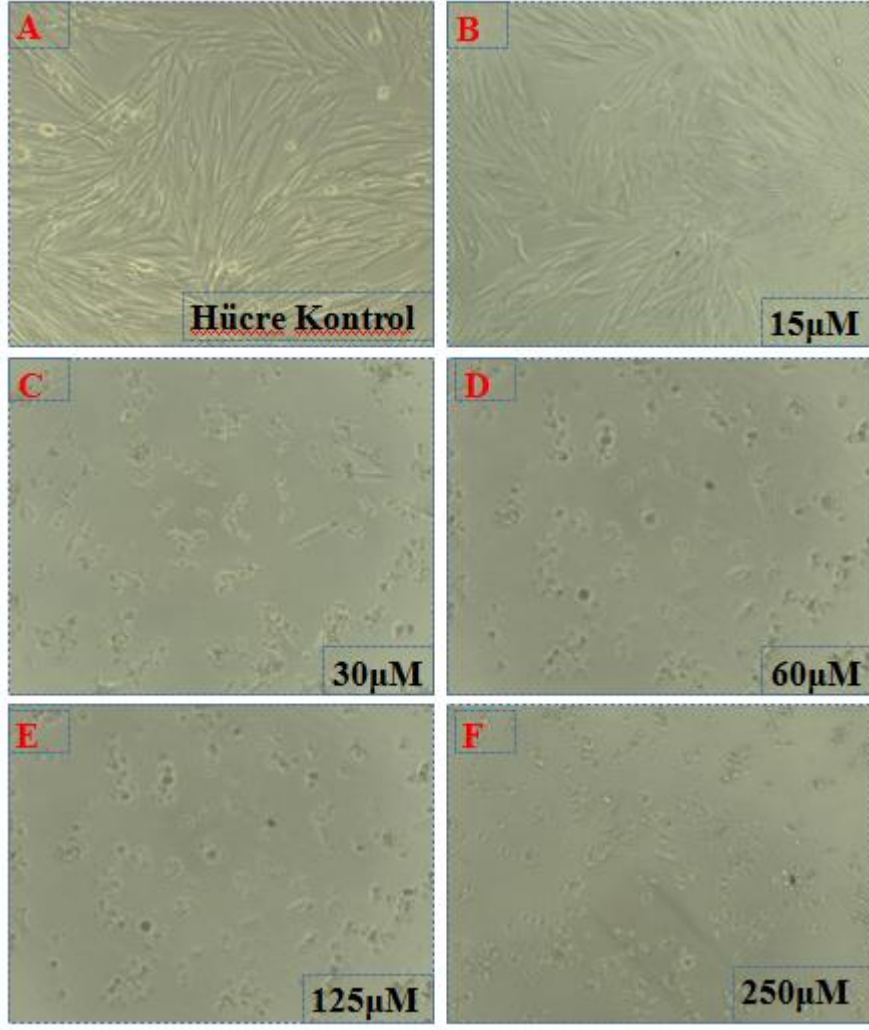
3.2. HGF-1 Hücrelerine İlaç Etkisinin İnter Mikroskop Görüntüleri

96 kuyucuklu plakalara 15×10^4 HGF-1 hücre ekimi yapılarak 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP’nin farklı dozlarının HGF-1 hücresi üzerinde oluşturduğu morfolojik farklılığı inter mikroskopla aşağıda belirtildiği gibi incelenerek görüntülendi (şekil 3.7), (şekil 3.8) ve (şekil 3.9).



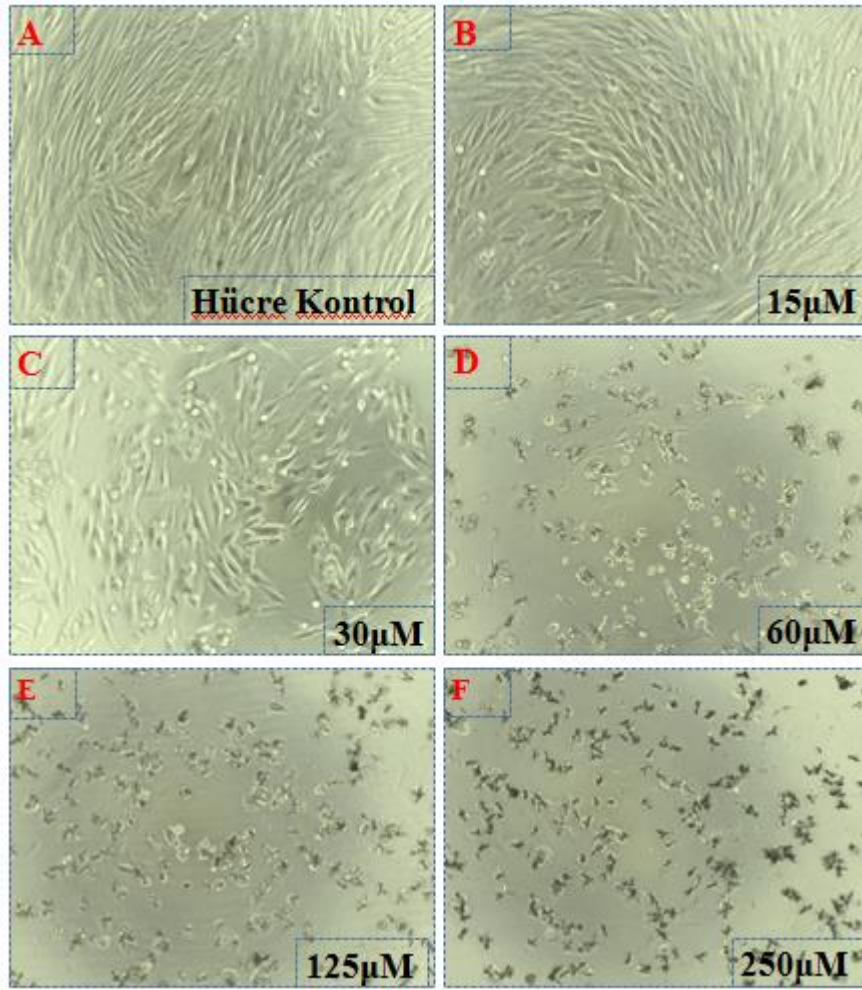
Şekil 3.7. 96 kuyucuklu plakaya ekilen HGF-1 hücresi 2-AMP'de 48 saat etkileşimlerinin 10X invert mikroskop görüntüleri; a) kontrol, b) 15 µM, c) 30 µM, d) 60 µM, e) 125 µM, f) 250 µM.

İnvert mikroskop analiz sonuçlarına göre 2-AMP'nin HGF-1 hücresi üzerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı görüldü.



Şekil 3.8. 96 kuyucuklu plakaya ekilen HGF-1 hücresi 3-AMP’de 48 saat etkileşimlerinin 10X invert mikroskop görüntüleri; a) kontrol, b) 15 µM, c) 30 µM, d) 60 µM, e)125 µM, f) 250 µM.

İnvert mikroskop analiz sonuçlarına göre 3-AMP’nin HGF-1 hücresi üzerinde doza bağlı olarak 30 µM’lık dozdan başlayarak sitotoksik etki yaptığı görüldü.



Şekil 3.9. 96 kuyucuklu plakaya ekilen HGF-1 hücresi 4-AMP’de 48 saat etkileşimlerinin 10X invert mikroskop görüntüleri; a) Kontrol, b) 15 µM, c) 30 µM, d) 60 µM, e)125 µM, f) 250 µM.

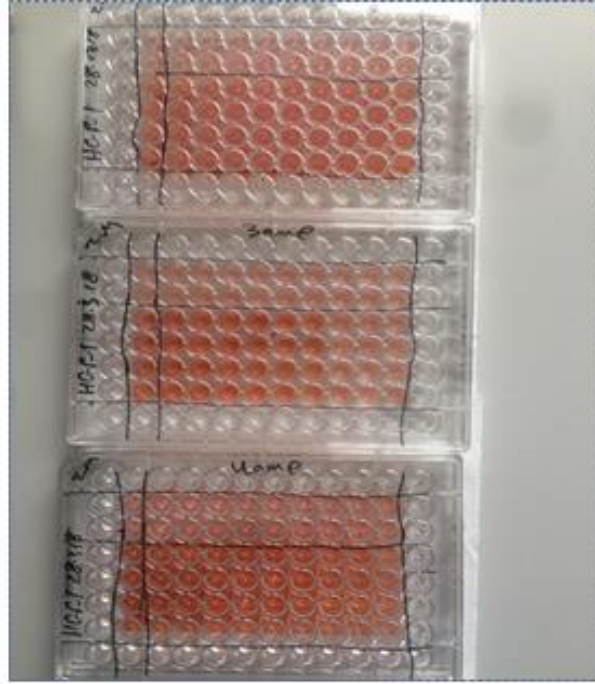
İnvert mikroskoptaki analiz sonuçlarına göre 4-AMP’nin HGF-1 hücresi üzerinde doza bağlı olarak 30 µM’lık dozdan başlayarak sitotoksik etki yaptığı görüldü.

Bu sonuçlara göre 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddelerinin hangi doz aralığında etkili olduğunu incelemek ve IC₅₀ değerini belirlemek için sitotoksisite (XTT) deneyi yapıldı.

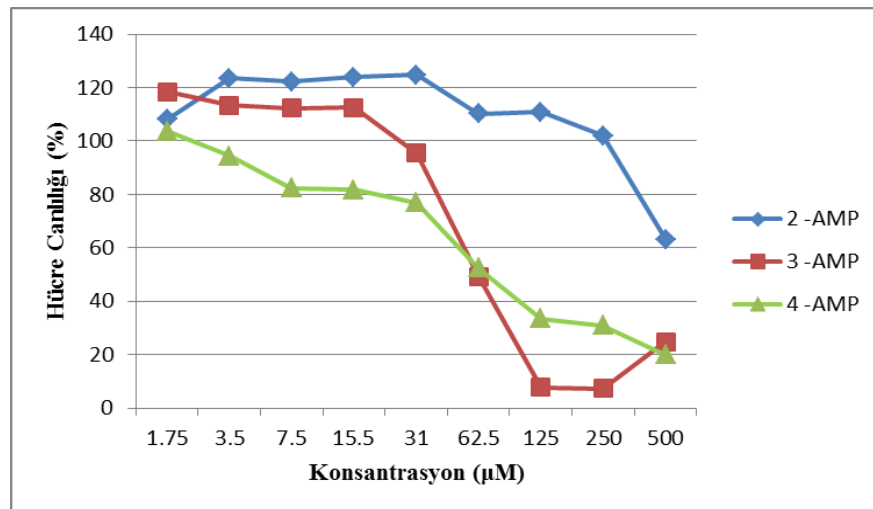
3.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Maddelerinin Sitotoksisite (XTT) Analizleri

96 kuyucuklu 3 plakaya kuyucuk başı 15×10^4 HGF-1 hücresi olacak şekilde ekimi yapılarak plakalar 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Sitotoksisite analizi yapılacak olan 2, 3 ve 4-AMP bileşiklerini % 0.1 DMSO ve DMEM besiyeri ile çözdürüldü. Belirtilen süre sonrası çözdürülen bileşikler konsantrasyonu 500µM’den 2µM’ye kadar seyrelterek eklendi ve 24 saat inkübatörde bırakıldı. Ertesi gün invert mikroskopla

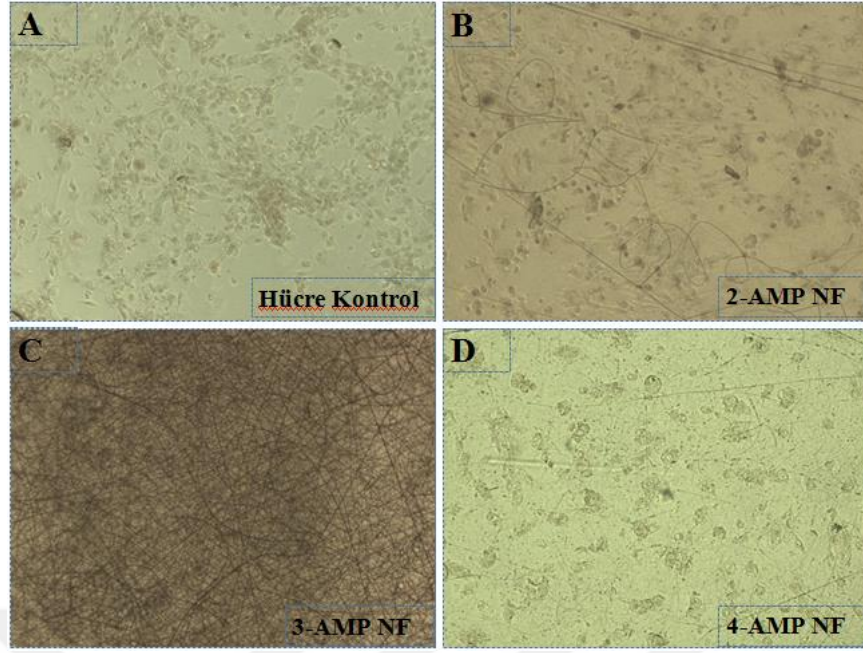
incelenerek fotoğraf çekildi. Ardından XTT solüsyonu eklendikten sonra 5 saat inkübatörde bekletildi. Aktif HGF-1 hücrelerin mitokondriyelerinde bulunan dehidrojenaz adlı enzimler tarafından XTT'deki tetrazolyum tuzunu formazan turuncu rengi indirgenmesi Şekil 3.10 ve Şekil 3.12'de görüldüğü gibi, ELISA cihazı yardımıyla 460 ve 680 nm dalga boylarında maddelerin etkisi sonucu hücrelerde ölüm olup olmadığı spektrofotometrikle ölçüldü (Şekil 3.13) (Süslü, 2009). Bileşiklerin HGF-1 hücresine olan IC₅₀ değerleri hesaplanarak gösterildi (Şekil 3.11). Nanofiber sentezi üretiminde biyouyumluluğa uygun maddenin seçilebilmesi için XTT yöntemi kullanıldı.



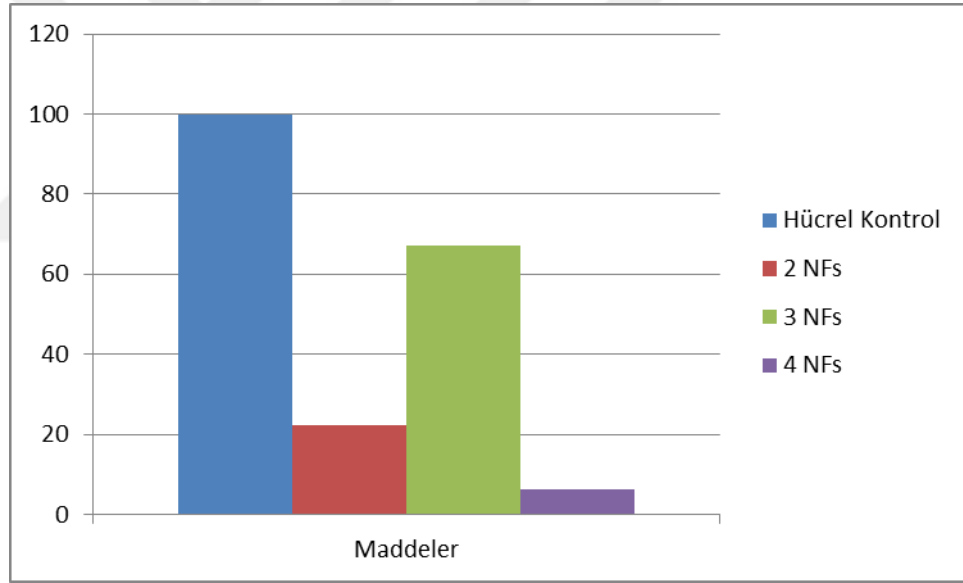
Şekil 3.10. 96 kuyucuklu plakalara ekilen HGF-1 hücresiyle 2, 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren bileşiklerinin XTT ile renk değişimi.



Şekil 3.11. 96 kuyucuklu plakalarda 15×10^4 HGF-1 hücresinin 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP 48 saat sonraki XTT absorbans sonuç grafiği



Şekil 3.12. 24 kuyucuklu plakalara ekilen HGF-1 hücresiyle 2 , 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren Nanofiberlerin XTT ile renk değişimi.

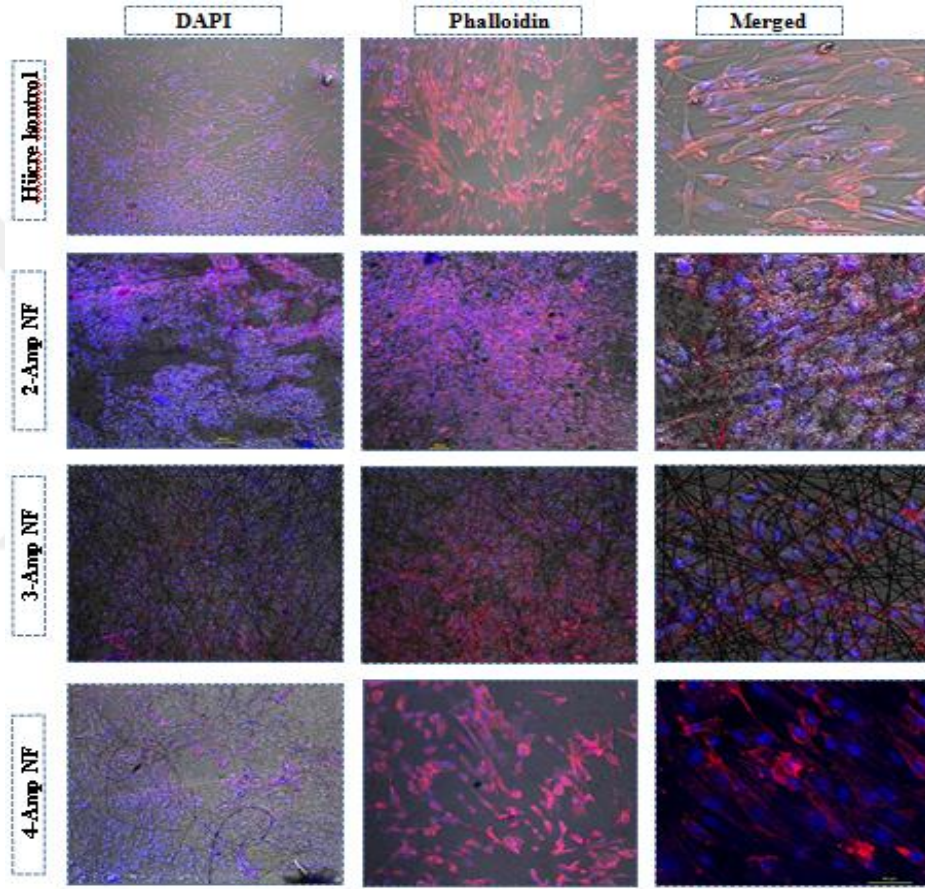


Şekil 3.13. Hücre canlılığı

XTT analiz sonrası 4-AMP'de HGF-1 hücre canlılığı en düşük doz olan 15 μM 'de % 81.67437, 3-AMP % 112.5388, 2-AMP'de ise % 123.9649'dir. Hücre canlılığı yüksek doz olan 500 μM 'de 2-AMP'de % 63.1744, 3-AMP'de % 24.87068 ve 4-AMP'de % 19.90757 olarak görülmektedir. Buna göre sitotoksosite sıralaması 4-AMP, 3-AMP ve 2-AMP'dir.

3.2.2. Lazer konfokal mikroskop görüntüleri

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanofiber yüzeylerine HGF-1 hücrelerini ekim yapılarak nanofiberlerin üzerinde hücrelerin çekirdekleri ve hücre iskeleleri boyandı. Lazer konfokal mikroskop sistemi kullanılıp HGF-1 hücre organellerinin 488 ve 635 nm dalga boylarında floresanla uyarılarak görüntülendi (Şekil 3.14).



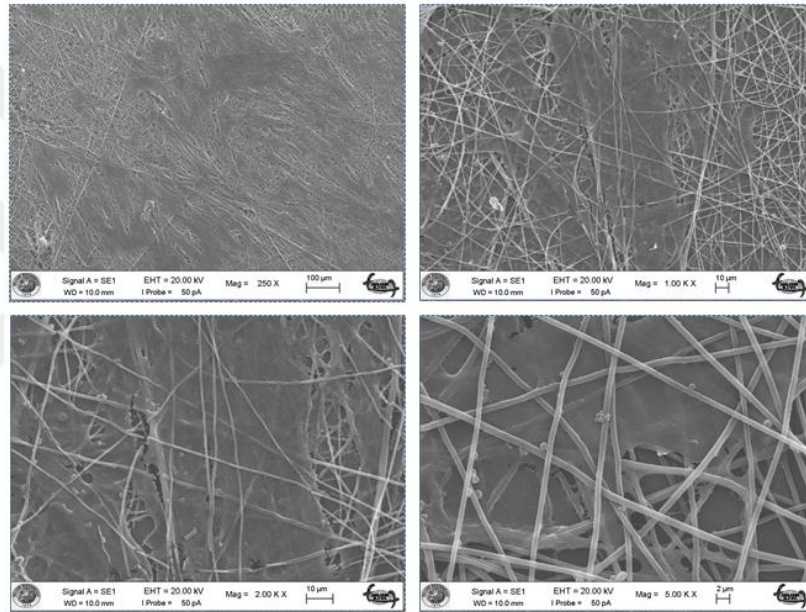
Şekil 3.14. 15×10^4 HGF-1 hücrenin (2,3 ve 4-AMP) nanofiber üzerinde 48 saat Sonraki $50 \mu\text{m}$ ve $100 \mu\text{m}$ lazer konfokal mikroskop görüntüleri.

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren nanofiberlerin üzerine ekilen 15×10^4 HGF-1 hücrelerinin, 48 saat boyunca bu yüzelerde morfolojisinin incelenmesi için hem çekirdekleri hem iskeletleri boyandı. Konfokal görüntüleri sonucunda, 2-AMP nanofiberlerin yüzelerinde hücre çekirdeğinin hacim büyüklüğünü, hücreler arası iskelet bağlantıların devam etmesi, 3-AMP nanofiber üzerinde hücre çekirdeğinin 2AMP'ye göre daha küçük hacimde olduğunu, hücrelerin bölündüğünü fakat hücreler

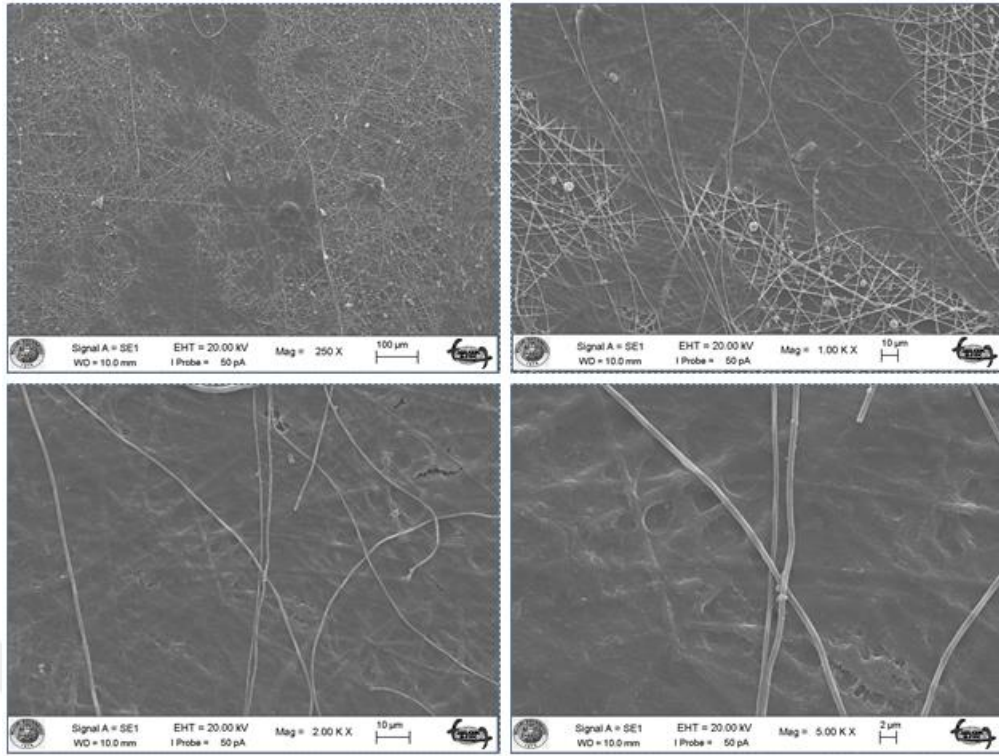
arası bağlantıların devam etmemesi ve farklılaşması, 4-AMP nanofiber üzerinde ise hücrelerin ölümü ve morfoloji bozukluğuna sebep olduğu gözlemlendi.

3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

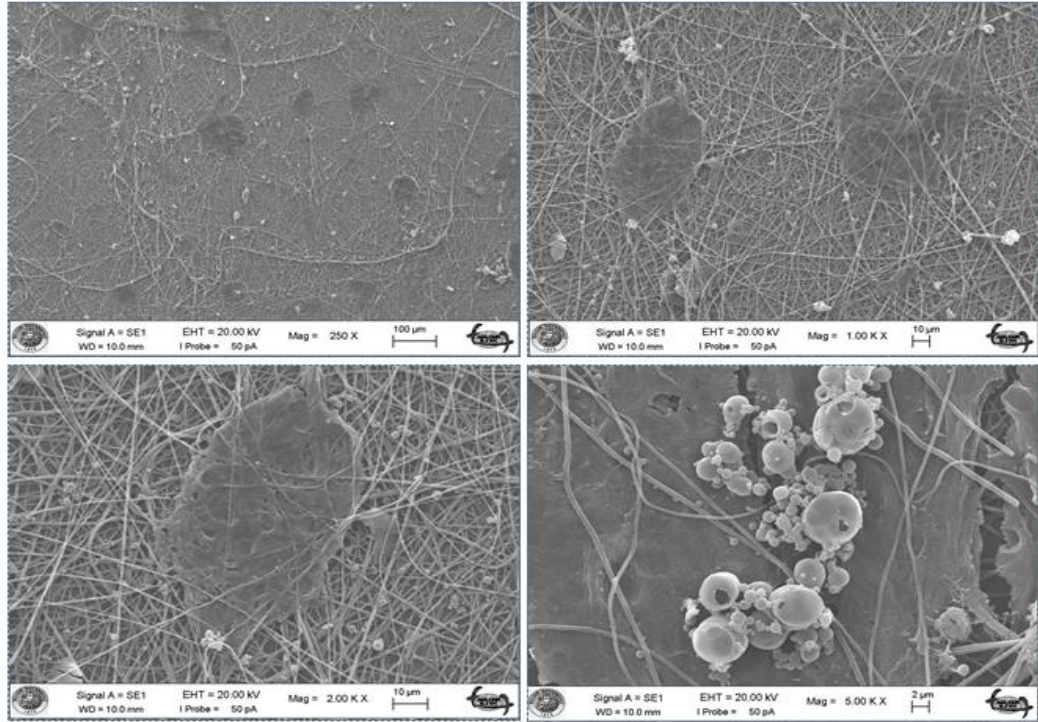
SEM analizi öncesi 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP numunelerinin 5nm AuPd ile kaplandı. Daha sonra numuneler SEM ile incelenerek yüzeyde tutunup çoğalan hücreler 250X, 100X, 200X,1000X büyütmelemlerde görüntümlendi (Şekil 3.15), (Şekil 3.16) ve (Şekil 3.17).



Şekil 3.15. 15×10^4 ekilen HGF-1 hücresinin 2-AMP platformu üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X,1000X) büyütmelemlerde görüntümleri.



Şekil 3.16. 15×10^4 ekilen HGF-1 hücrenin 3-AMP platformu üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X,1000X) büyütmelerde görüntüleri.



Şekil 3.17. 15×10^4 ekilen HGF-1 hücrenin 4-AMP platformu üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X,1000X) büyütmelerde görüntüleri.

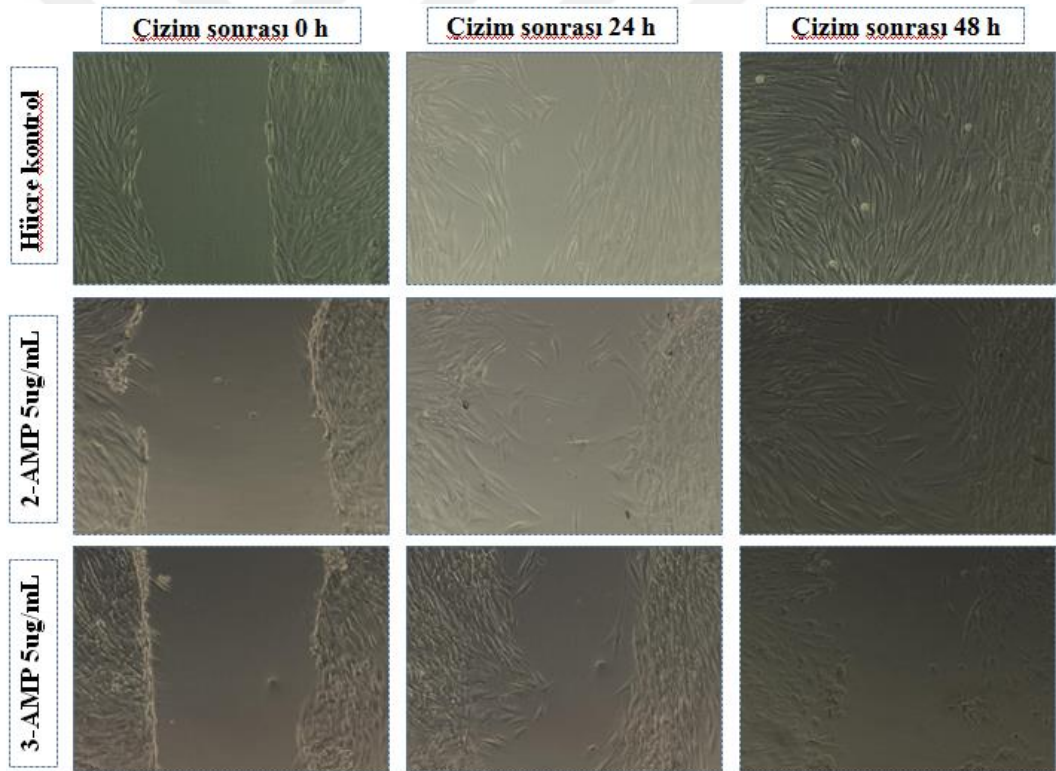
2 , 3 ve 4-AMP nanofiber yüzeylerinde 48 saat boyunca 15×10^4 sayıda HGF-1 hücrenin yayılması gözlemlendi. Bu numunelerin 5 nm AuPd ile kaplanması taramalı elektron

mikroskobunda (SEM) görüntülendi. 2-AMP nanofiber yüzeylerinde hücrelerin çoğaldıklarını, yayıldıklarını ve fiberler yönünde uzadıkları farkedildi. Biyoyumluluk verileri analizine dayanarak 2-Amp nanofiber iskeleleri HGF-1 hücresinin yapışmasını kolaylaştırdığı sonucu elde edildi.

3.2.4. İn Vitro Çizim Deneyi (Scratch Assays) Görüntüleri

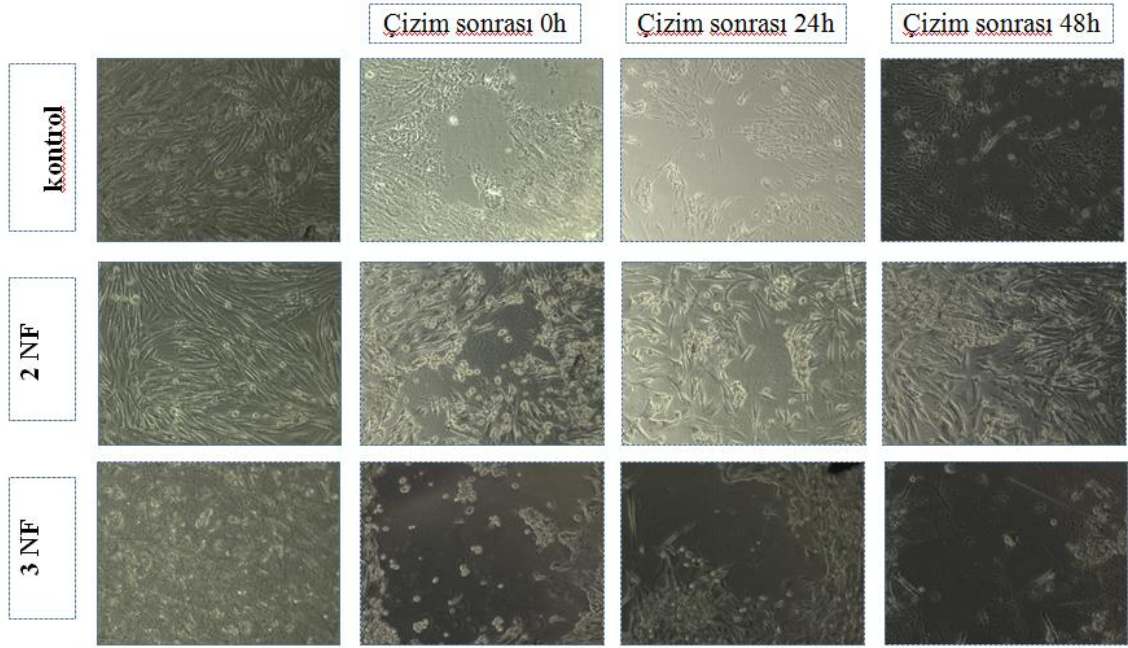
Yapılan XTT analiz deney sonrası 4-AMP'nin HGF-1 hücresi üzerinde sitotoksikite yaptığı için çizim deneylerinde 4-AMP'yi kullanmadık.

2 ve 3-AMP'nin 5µg/mL dozunda HGF-1 hücreleri 0,24 ve 48 saat boyunca oluşturulan boşluğa göç ederek kaplaması için bırakıldı. Çizim sonrası 0,24 ve 48 saatlerinde ışık mikroskop kullanarak (10X) büyütmede boşluklara göç eden hücre oranı görüntülendi (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. 24 kuyucuklu plakaya ekilen 15×10^4 HGF-1 hücresi 5µM 2-AMP ve 3-AMP kaliksarenin (0, 24 ve 48) saatlerinde hücre migrasyonunun 10X invert mikroskop görüntüleri.

2 ve 3-AMP'nin nanofiberleri üzerine HGF-1 hücreleri ekip 0, 24 ve 48 saat boyunca oluşturulan boşluğu kapatmaları incelendi. Çizim sonrası 0, 24 ve 48 saatlerinde ışık mikroskop kullanarak (10X) büyütmede boşluklara göç eden hücre oranı görüntülendi (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. İn vitro deneyi (0, 24 ve 48) saatlerde 2 ve 3-AMP NF'ler üzerinde yapılan çizim sonrası hücre migrasyonu 10X invert mikroskop görüntüleri.

Elde ettiğimiz çizim deney sonuçlarına göre, 3B ortamı olan 2-Amp nanofiber üzerinde HGF-1 hücrelerin yapışması, proliferasyonu, motilitesi, migrasyonu ve farklılaşması dahil olmak üzere hücresel davranışlar, 2B ortamın kontrolüyle kıyaslandığında daha hızlı hücre göçünü teşvik ederek ve hücre sayısını artarak oluşturulan yarayı kapladığı belirgin bir şekilde görüldü.

Pelipenko ve arkadaşları, 300-700nm aralığında fiberlerin fibroblast proliferasyonunu uyarak doku yenilenmesi için en uygun olduğu, daha ince fiberlerin de hücre hareketliliğini etkilediği ve dolaylı olarak kapanmayı faydalı olduğunun sonucuna varmışlardır (Pelipenko ve ark., 2015).

Ojeh ve Navsaria çalışmalarında, fibroblastlar ile biyomühendisliğin, proliferasyon, farklılaşma, ECM proteinleri ve keratin ekspresyonu arttığını gösterdi. Bu nedenle deri epitel hücreleri, yara iyileşmesinin mekanizmalarını ve ilaç keşfi çalışmalarında büyük bir potansiyel sunmaktadır (Ojeh ve ark., 2014).

Gautam ve arkadaşları, deri hücreleri fiberlerin doğal ECM'ye yapısal benzerliğinden dolayı elektroçizme nanofiberleri ile temas ettiğinde spesifik reaksiyonlar gösterir. Fiberleri oluşturan polimerin fizikokimyasal özellikleri, bu etkileşimleri belirleyen ve modüle eden önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, hidrofilik fiberler genel olarak başlangıç hücre-hücre bağlantısı için ideal bir yüzey sağlarken, hidrofobik fiberlere (örneğin PCL'ye dayalı) hücre eklenmesi daha az etkilidir (Gautam ve ark., 2014).

Planz ve arkadaşları, fibroblastların saf PCL fiberlerinden (su temas açısı 119 °) daha yüksek olan hidrofilik PCL / jelatin fiberleri (su temas açısı 0 °) üzerinde önemli ölçüde daha hızlı çoğaldığını göstermiştir (Planz ve ark., 2016).

Pelipenko ve arkadaşları, keratinositlerin hareketliliğinin, küçük nanofiber gözenek (2560 ± 1260 nm) boyutlu PVA nanofiber matrisleri nedeniyle engellendiği varsayımına dayanmaktadır. Esnek hücre parçalarının (hücre-hücre, iskele ve sitoplazma) interfiber ağlarda tutulduğunu, hücre çekirdeklerinin yüzeyde kaldığını ve böylece yüzeydeki hücre göçünü sınırlandırdığını ve üç boyutlu matrislere nüfuz ettiğini görmüşlerdir (Pelipenko ve ark., 2013).

Kurpinski ve arkadaşları, nanofiberin hücre göçünü ve uzamasını yönlendirebileceği sonuçlarına dayanarak hizalanmış nanofiber oryantasyon ile matrisler üretmeye odaklanmıştır. Sıralanmış nanofiberlerden oluşan matris miktarı üç boyutlu matrisler endotel hücre infiltrasyonu artırdığını göstermiştir (Kurpinski ve ark., 2010).

Rho ve arkadaşları, kollajen tip I laminin ve fibronektin ile kaplı kolajen nanofiber matrisleri ve keratinosit adhezyonu üzerindeki etkilerini ve yayılmalarını araştırmışlardır. Böyle doğal ECM proteinleri, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri için köprüler olarak işlev gören bir çok hücre tipinde eksprese edilen bir protein ailesi olan integrinler tarafından tanınan bir arjinin-glisin-aspartik asit dizisini (RGD) içerir. Kaplanmamış kolajen matrisler hücre yapışması üzerinde herhangi bir etki

göstermezken, tip I kollajen ve laminin ile kaplanmış fiber matrisler hücre morfolojisi üzerinde önemli ölçüde hücre yapışmasını ve yayılmasını teşvik etmiştir. Bununla birlikte, fibronektin ile kaplanmış matrislerin yapışma kapasitesi zor iyileşmiştir (Rho ve ark., 2006).

Sato ve arkadaşları, ko-kültürde keratinositlerin ve fibroblastların hücre-hücre etkileşimlerinin, prostaglandin üretimini artırarak yara iyileşme sürecini geliştirdiğini gösterdiler (Sato ve ark., 1997).

Fu ve arkadaşları, Egzojen TGF- β 1'in kültüre dahil edilmesi, insan dermal fibroblastlarının, fibrinojen ve tip I kollajen içeren nanofiber matrisler üzerindeki farklı hücresel tepkilerini, emülsiyonlu bir yara yatağı benzeri ortamda tespit etmemizi sağladı. Fibrinojen içeren nanofiberlerin, kollajen içeren nanofiber matrislere göre hücre göçünü ve fibroblasttan miyofibroblast farklılaşmasını indüklemek için daha elverişli olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, cildin nanofiber regüle hücre fenotipik ekspresyonuna mekanik bir açıklama sağlar (Fu ve ark., 2017).

Lv ve arkadaşları, hücre dışı matrise (ECM) benzer çapa sahip nanofiberlerin, hücre yapışması ve çoğalması sürecini hızlandırdığını kanıtlamışlardır (Lv ve ark., 2017).

Babitha ve arkadaşları, yara iyileşmesi yüksek performanslı kapasiteleri olan uygulanmış yara sargısı ölçülebilir. Birincisi, fibroblastlar ve keratinositler gibi yenilenme hücreleri için uygun bir evre sağlamak, nanofiber sargısı hücrelerin büyümesini iyi bir evre olarak geliştirdiği kanıtlanmıştır. İkincisi, pansumanın hemostazı pıhtı oluşumu için faydalı olmalıdır. Bu özel şartlara sahip olan nanofiber sargısı, kan damarı yenilenmesi ve hücre çoğalması için bol oksijen değiştirme ve enfeksiyon riskini azaltma kabiliyeti de gereklidir (Babitha ve ark., 2017).

Powell ve arkadaşları, dondurularak kurutulan ve elektroğirme tekniği kullanarak sığır kollajeninden üretilmiş kolajen nanofiber iskeleler üzerinde karşılaştırmalı bir çalışma yapmışlardır. Elde edilen verilerin analizinden, elektroğirme nanofiber iskelelerin, dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan iskelelerden daha iyi bir yara yatağı olabileceği sonucuna varmışlardır. Elektroğirme nanofiber iskelelerin daha iyi performansı geleneksel dondurularak kurutulmuş iskelelere kıyasla nanofiberler üzerindeki daha iyi hücresel organizasyona bağlanmıştır (Powell ve ark., 2008).

Kumbar ve arkadaşları, deri dokusu rejenerasyonunda olası uygulamalarına göre (150–225, 200–300, 250–467, 500–900, 600–1200, 2500–3000 ve 3250–6000) nm nanofiber çaplı elektroğirme PLGA nanofiber iskelelerin yüzeyinde

kültürlenmiş fibroblastik hücrelerin morfolojisine dayanarak, tüm yapı iskelelerinin biyoyumlu bir yapı sergilediği, ancak en uygun ortamın 350-550 mm çapındaki nanofiber iskeleler tarafından sağlandığı sonucuna varılmışlardır (Kumbar ve ark., 2008).

Gholipour ve arkadaşları, Kitosan-PVA'dan oluşan elektroğirme karışımı nanofiber iskeleler hazırlamışlar ve sonuçlarına göre, 25/75 kitosan / PVA oranının karıştırılmış nanofiber iskelelerin hazırlanmasında en uygun olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca *in vitro* çalışmalara maruz bırakıldığında kitosan / PVA elektroğirme nanofiber iskelelerinin Gram-negatif bakterilere karşı mükemmel antibakteriyel aktivite gösterdiklerini ortaya koymuştur. Böylece, iskeleler bir yara sargısı olarak kullanılabilir (Gholipour ve ark., 2009).



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında HGF-1 hücre hattının kaliks[4]aren türevli bileşiklerin yara iyileştirme özelliklerini, hücre büyüme ve yayılma kapasitelerindeki gelişmeyi incelemeye çalıştık. Çalışmamızda 96 kuyucuklu plakalarda yaptığımız deneyler ile kaliks[4]aren türevlerinin 500 μM 'deki HGF-1 hücre canlılığını etkileyen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'deki IC_{50} değerlerini araştırdık.

	IC_{50} (μM)
2Amp	➤ 500
3Amp	70.208
4Amp	82.328

Çalışmamızda 24 kuyucuklu plakara yerleştirdiğimiz 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren türevli nanofiber yüzeylerinde HGF-1 hücre morfolojisinin incelenmesi için hem çekirdekleri hem de iskeletleri boyandı. Konfokal görüntü sonucunda, 2-AMP nanofiberlerin yüzeylerinde hücre çekirdeğinin hacim büyüklüğünü, hücreler arası iskelet bağlantılarının nanofiber yüzeyinde yayıldığını gözlemlendi. 3-AMP nanofiber üzerinde hücre çekirdeğinin 2AMP'ye göre daha küçük hacimde olduğunu, hücrelerin bölündüğünü fakat hücreler arası bağlantıların devam etmemesi ve farklılaşmaması görüntülendi. 4-AMP nanofiber üzerinde ise hücrelerin ölümü ve morfoloji bozukluğuna sebep olduğu gözlemlendi.

Yine çalışmamızda 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanofiber yüzeylerinde HGF-1 hücrelerinin yayılması için 24 kuyucuklu plakalara ekim yapıp incelendi. Bu numunelerin 5nm AuPd ile kaplanması taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülendi. SEM görüntüleri sonucunda 2-AMP nanofiber yüzeylerinde hücrelerin çoğaldıklarını, yayıldıklarını ve fiberler yönünde uzadıklarını görüntüledik. 2-AMP'nin 3B yüzey formuna benzer özellikler sergilediği ve bu yüzden HGF-1 hücrelerinin 3B ortamdakine benzer morfolojik özellikler gösterdiği; 3-AMP nanofiber üzerindeki hücrelerde çoğalma olduğunu fakat uzamadıkları; 4-AMP nanofiber üzerinde hücrelerin öldüğü gözlemlendi.

HGF-1 hücre hattı için 2 , 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren türevlilerinden üretilen nanofiberler hücre kültürleri için ideal platformlar oluşturmaktadırlar. Bu türevliler arasında HGF-1 hücrelerinin canlılığını artarak en benimsediği 2-AMP, HGF-1 hücrelerinin ölümüne en etkili olan anti-iyileşme olarak 4-AMP'dir. Çünkü 2-AMP hücrenin doğal ECM matrisine ve hücre hareketliliğini destekleyen benzer bir ortam oluşturmasına izin vermiştir.

Nanofiber üzerinde hücre çalışmaları ile ilgili yapılan araştırmalarda genellikle bir çok büyüme faktörleri ile desteklenmektedir. Fakat çalışmamız boyunca 2-AMP nanofiber yüzeylerine hiç bir büyüme faktörü ekmeden bu yüzeylerde HGF-1 hücrelerinin çoğalma ve yayılmaları görüldü.



4.2 Öneriler

Tüm dünyada farklı kimyasallarla üretilen 3B nanofiberlerin yara tedavisi, doku mühendisliği araştırmaları ve uygulamaları önemli bir yer tutmakta ve hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Çünkü nanofiber zarlar, doğal hücre dışı matrise benzerliği sebebiyle hücre çoğalmasını ve göçünü teşvik eder. Bu nanofiber teknolojinin araştırma alanların yanı sıra, günlük yaşantımızda ticari canlılık ve uygulamaya doğru önemli ilerlemeler sağlayabileceğini öngörüyoruz.

Farklı yüzey modifikasyon alternatifleri olan kaliksaren nanofiberler *in vitro* ortamında fibroblast hücrelerin adhezyonunu ve proliferasyonunu desteklemekte ve daha iyi bir platformlar sunacağını umuyoruz.

Yaptığımız deneylerde kaliks[4]aren türevli bileşikden hazırlanan 3B nanofiberlerin yara örtüleri için yeni bir platform oluşturabilmesi umududur. Bu 3B nanofiberlerin geliştirilmesi *in vivo* ortamına benzer şekilde normal dokuyu taklit ederek hücre çoğalması ve farklılaşmasını sağladığı için bu fiberlerin *in vivo* ortamında kullanılabilceği düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abrigo, M., McArthur, S.I., Kingshott, P., **2014**, Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects.
- Abdelgawad, A.M., Hudson, S.M., Rojas, O.J., **2014**, Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym*;100:166–78.
- Akbulut, M. B., Uyar Arpacı, P., Unverdi Eldeniz, A., **2016**, Effects of novel root repair materials on attachment and morphological behaviour of periodontal ligament fibroblasts: Scanning electron microscopy observation. *Microsc ResTech*, 79 (12),1214-1221.
- Amin, A., Mokhdomi, T.A., Bukhari, S., **2015**, Tectorigenin ablates the inflammation-induced epithelial-mesenchymal transition in a co-culture model of human lung carcinoma. *Pharmacol Rep*; 67:382e387.
- Ağaç, M., **2018**, Elektro döndürme yöntemi ile elde edilen kaliksaren nanoliflerin kolon hücresi etkileşimlerinin incelenmesi, Selçuk Üniversitesi Yüksek lisans tezi.
- Babitha, S., Rachita, L., Karthikeyan, K., Shoba, E., Janani, I., Poornima, B., et al., **2017**, Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *Int. J. Pharm*,523(1):52-90.
- Barrientos, S., Stojadinovic O., Golinko, M.S., **2008**, Perspective article: growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*,16:585–601.
- Berman, B., Maderal, A., Raphael, B., **2017**, Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol Surg*; 43(Suppl.1):S3e18.
- Blakney, A.K., Ball, C., Krogstad, E.A., Woodrow, K.A., **2013**, Electrospun fibers for vaginal anti-hiv drug delivery. *Antiviral Res.*,100:S9-S16.
- Broughton, G., Janis, J., Attinger, C., **2006**, Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* ;117:1e-s.
- Crini, G., **2003**, Studies on adsorption of dyes on beta-cyclodextrin polymer. *Bioresour Technol*. 2003 Nov;90(2):193-8.
- Chen, G.D., Miao Yue-E., Liu, T., **2013**, Electrically conductive polyaniline / polyimide nanofiber membranes prepared via a combination of electrospinning and subsequent in situ. Polymerization. *ACS Applied Materials & Interfaces* , 5, 1206-1212.
- Chung, H.J., Park, T.G., **2007**, Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (4–5), 249–262.

- Çiçek, C., Bilgiç, A., **2006**, Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi*; 20 (3): 231-241.
- Değim, Z., **2008**, Use of microparticulate systems to accelerate skin wound healing. *J. Drug Target*. 16(6), 437-448.
- Desmouliere, Alexis., Chaponnier, Christine, Gabbiani, Giulio, **2005**, Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13 (1): 7–12.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., Tusch, M., **2004**, Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 441-449.
- Friess, W., **1998**, Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (2), 113–136.
- Fu, X., Meng, X., Ji, C., Xie, W., Wang, L., Kon, D., Wan, H., **2017**, Differential regulation of skin fibroblasts for their $\text{tgf-}\beta\text{1}$ -dependent wound healing activities by biomimetic nanofibers.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., Möllby, R., **2002**, Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Methods* 50, 63–73.
- Galie, PA., Stegemann, JP., **2014**, Injection of mesenchymal stromal cells into a mechanically stimulated in vitro model of cardiac fibrosis has paracrine effect on resident fibroblasts. *Cytotherapy*. 16:906e914.
- Garg, T., Rath, G., Goyal, A., **2015**, Biomaterials-based nanofiber scaffold: targeted and controlled carrier for cell and drug delivery. *J Drug Targeting*. 23 (3): 202–221.
- Gauglitz, GG., Korting, HC., Pavicic, T., Ruzicka, T., Jeschke, MG., **2011**, Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med*; 17:113e25.
- Gautam, S., Chou, C.-F., Dinda, A.K., Potdar, P.D., Mishra, N.C., **2014**, Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 34 -402-409.
- Gholipour, K.A., Bahrami, S.H., Nouri, M., **2009**, Chitosan–poly (vinyl alcohol) blend nanofibers: morphology, biological and antimicrobial properties. *e-Polymers*, 1580.
- Goldman, R., **2004**, Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*; 17(1):24–35.

- Gokce, O., Mercandetti, M., Delamarche, E., **2018**, high-content optical codes for protecting rapid diagnostic tests from counterfeiting. *Anal Chem.* 2018 Jun 19;90(12):7383-7390.
- Gutsche, C. D., **1989**, Calixarenes, monographs in supramolecular chemistr. Stoddart, J.F., Ed.; *The Royal Society of Chemistry: Cambridge*, Vol. 1.
- Gutsche, C. D., **2008**, Calixarenes an introduction. 2nd ed.; *Royal Society of Chemistry: Cambridge*.
- Gutsche, C.D., and Mukhukrishnan, R., **1978**, Calixarenes. 1. analysis of the product mixtures produce by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with p-substituted phenols. *J. Org. Chem.*, 43, 4905-6.
- Halldorsson, S., Lucumi, E., Gomez-Sjoberg, R., Fleming, R.M., **2015**, Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens Bioelectron.* 63:218e231.
- Hanna, J.R., Giacomelli, J.A., **1997**, A review of wound healing and wound dressing products. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 36(1), 2-14.
- Ito, M., Azuma, Y., Ohta, T., Komoriya, K., **2000**, Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound Med Biol.* 26:161e166.
- Kenawy, E.-R., Bowlin, G.L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D.G., Sanders, E.H., Wnek, G.E., **2002**, Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J. Control. Release* 81 (1–2), 57–64.
- Khajavi, R., Abbasipour, M., Bahador, A., **2016**, Electrospun biodegradable nanofibers scaffolds for bone tissue engineering. *J Appl Polym Sci.* 133 (3): 1–19.
- Kim, WJ-H., Gittes, GK., Longaker, MT., **1998**, Signal transduction in wound pharmacology. *Arch Pharm Res.* 21(5):487–95.
- Kocakli, ZG., Akillioglu, K., Dogan, A., **2014**, Sıçanda aort düz kas izolasyonu ve kültürü. *Kırkıncı Ulusal Fizyoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı*.
- Kurpinski K.T., Stephenson, J.T., Janairo, R.R.R., Lee, H., Li, S., **2010**, The effect of fiberalignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds. *Biomaterials*, 31-3536-3542.
- Kumbar, S.G., Nukavarapu, S.P., James, R., Nair, L.S., Laurencin, C.T., **2008**, Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 29 (30), 4100–4107.
- Kuwabara, T., Perkins, DG., Cogan, DG., **1976**, Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol.* 15:4e14.

- Langenhove, L., **2007**, Smart textiles for medicine and healthcare. materials, systems and applications, sf: 27-47.
- Lavker, RM., Sun, TT., **2000**, Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci USA*.97:13473e13475.,
- Lee, SJ., Heo, DN., Moon, JH., Ko, WK., Lee, JB., Bae, MS., **2014**, Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles Preparation, characterization and antibacterial activity. *Carbohydr Polym*;111:530–7.
- Li, X., Liang, L., Zhao, P., **2013**, The effects of adenoviral transfection of the keratinocyte growth factor gene on epidermal stem cells: an in vitro study. *Mol Cell*. 36:316e321.
- Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K., **2002**, Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater.Res.* 60 (4), 613–621.
- Liang, CC., Park, AY., Guan, JL., **2007**, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329e333.
- Lindley, LE., Stojadinovic, O., Pastar, I., Tomic-Canic, M., **2016**, Biology and biomarkers for wound healing. *Plast Reconstr Surg*;138(Suppl. 3): 18Se28S.
- Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., **2014**, 12- Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J Exp Med*. 211:1063e1078.
- Lv, F., Wang, J., Xu, P., Han, YM., Ma, HS., Xu, H., **2017**, A conductive bioceramic/polymer composite biomaterial for diabetic wound healing. *Acta Biomater.*,60:128-43.
- Majno, G., Bouvier, C. A., Gabbiani, G., **1975**, Proceedings: Binding of anti-actin auto-antibodies to platelets. *Thromb Diath Haemorrh* 1975 Nov 15;34(2):577.
- Maria, B., Witte, M.D., Barbul, A., **1997** , General principles of wound healing. *Surg. Clin. N.Am.*, 77(3), 509-528.
- Marquardt, Y., Amann, PM., Heise, R., **2015**, Characterization of a novel standardized human three-dimensional skin wound healing model using non-sequential fractional ultrapulsed CO2 laser treatments. *Lasers Surg Med*.47:257e265.
- McAllister, BS., Leeb-Lundberg, F., Olson, M. S., **1993**, Bradykinin inhibition of EGF- and PDGF-induced DNA synthesis in human fibroblasts. *Am. J. Physiol*. 265: C477-C484.
- McAllister, BS., Leeb-Lundberg, F., Javors, M. A., Olson, M. S., **1993**, Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys*. 304: 294-301.

- Mendez-Eastman, S., **2005**, Wound dressing categories. *Plastic Surg. Nurs.* 25(2), 95-99.
- Morton, L.M.; Phillips, T.J., **2016**, Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 74 (4): 589–605.
- Mazza, M., Notman, R., Anwar, J., Rodger, A., Hicks, M., Parkinson, G., **2013**, Nanofiber-based delivery of therapeutic peptides to the brain. *ACS Nano*; 7:1016–26.
- Ojeh, N.O., Navsaria, H.A., **2014**, An in vitro skin model to study the effect of mesenchymal stem cells in wound healing and epidermal regeneration. *J Biomed Mater Res A.*102:2785e2792.
- Pelipenko, J., Kocbek, P., Govedarica, B., Rosic, R., Baumgartner, S., Kristl, J., **2013**, The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84 401-411.
- Pelipenko, J., Kocbek, P., Kristl, J., **2015**, Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *European Journal of Pharmaceutical Science.*;66(1879–0720 (Electronic)):29–35.
- Powell, H.M., Supp, D.M., Boyce, S.T., **2008**, Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials* 29 (7), 834–843.
- Planz, V., Seif, S., Atchison, J.S., Vukosavljevic, B., Sparenberg, L., Kroner, E., Windbergs, M., **2016**, Three-dimensional hierarchical cultivation of human skin cells on bio-adaptive hybrid fibers. *Integr Biol (Camb)*. 2016 Jul 11;8(7):775-84.
- Reinke, JM., Sorg, H., **2012**, Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, 49:35–43.
- Robson, M.C., Steed, D.L., Franz, M.G., **2001**, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Prob. Surg.*, 38(2), 71-141.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., **1991**, An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilising the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142, 257–265.
- Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.-M., Park, Y.J., Hong, S.-D., Roh, S., Cho, J.J., Park, W.H., Min, B.-M., **2006**, Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27 -1452-1461.
- Santoro, M.M., Gaudino, G., **2005**, Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research.* 304 (1): 274–286.

- Sato, T., Kirimura, Y., Mori Y., **1997**, The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 109:334e349.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., Geissmann, F., **2012**, A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*;336:86–90.
- Sesia, SB., Duhr, R., Medeiros DA., Cunha, C., Medeiros da Cunha, C., Todorov, A., Schaeren, S., Padovan, E., Spagnoli, G., Martin, I., Barbero, A.,**2015**, Antiinflammatory tissue repair macrophages enhance the cartilage-forming capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Cell Physiol.* 230:1258e1269.
- Sezen, A., Arzu, T., **2008**, primer hücre kültürü uygulama kursu 23-24.
- Shkumatov, A., Baek, K., Kong, H., **2014**, Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies. *PLoS One.* 9:e94764.
- Sill, T.J., von Recum, H.A., **2008**, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29 (13), 1989–2006.
- Staton, C.A., Reed, M.W., Brown, N.J., **2009**, A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Path.* 90, 195-221.
- Tamada, M., Perez, T.D., Nelson, W.J., Sheetz, M.P., **2007**, Two distinct modes of myosin assembly and dynamics during epithelial wound closure. *J. Cell Biol.*, 176, 27-33.
- Thorne, C. J., Jones, C. M., Harvey, P., Hulme, J., Owen, A. **2013**, An analysis of the introduction and efficacy of a novel training programme for ERC basic life support assessors. *Resuscitation.* 2013 Apr;84(4):526-9.
- Todaro, G.j., Lazar, G. K., Green, H., **1965**, The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *J. Cell Physiol.* 66, 325–333.
- Trostrup, H., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Høiby, N., Moser, C., **2013**, What is new in the understanding of non healing wounds epidemiology, pathophysiology, and therapies, ulcers.
- Unnithan, AR., Barakat, NAM., Tirupathi, Pichiah, PB., Gnanasekaran, G., Nirmala, R.,Cha, YS., **2012**, Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacinHCl. *Carbohydr Polym*; 90:1786–93.
- Vogt, A. P., Chen, Z., Osunkoya, A. O., **2010**, Rete testis invasion by malignant germ cell tumor and/or intratubular germ cell neoplasia: what is the significance of this finding?. *Hum Pathol.* 2010 Sep;41(9):1339-44.

- Valenta, C., Auner, B.G., **2004**, The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58, 279-289.
- Vasita, R., Katti, D., **2006**, Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomed.* 1 (1): 15–30.
- Yan, E., Fan, Y., Sun, Z., Gao, J., Hao, X., Pei, S., **2014**, Biocompatible core–shellelectrospun nanofibers as potential application for chemotherapy againstovary cancer. *Mater Sci Eng C*;41:217–23.
- Zahedi, P., De Souza, R., Allen, C. J., Piquette-Miller, M., **2010**, Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy. *Drug Deliv.* 2010 Aug;17(6):365-75.
- Zhang, M., Li, H., Ma, H, Qin J., **2013**, A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model. *Wound Repair Regen.* 21:897e903.
- Zhang, Y., Lim, C., Ramakrishna, S., Huang, ZM., **2005**, Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater SciMater Med*;16:933–46.
- Zhao, R., Li, X., Sun, B., Zhang, Y., Zhang, D., Tang, Z., **2014**, Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property aspotential wound dressings. *Int J Biol Macromol*; 68:92–7.
- Wei, Y., Chen, F., Zhang, T., Chen, D., Jia, X., Wang, J., Guo, W., Chen, J., **2015**, A tubing-free microfluidic wound healing assay enabling the quantification of vascular smooth muscle cell migration. *Sci Rep.* 5:14049.
- Wong, H.M., Tjong, S. C., Liao, C. Z., Yeung, K.W.K., **2014**, The development, fabrication, and material characterization of polypropylene composites reinforced with carbon nanofiber and hydroxyapatite nanorod hybrid fillers. *Int J Nanomedicine.* 2014 Mar 11;9:1299-310.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zuhair Mohammed
Uyruğu : Irak
Doğum Yeri ve Tarihi : Salahaddin 24/08/1992
Telefon : 0 553 157 69 45
Faks :
e-mail : Zohearzohear110@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Tuzhurmatu Erkek Lisesi, Merkez, Salahaddin	2009
Üniversite	: Tikrit Üniversitesi, Merkez, Salahaddin	
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016-2019	Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Uygulama Merkezi (İLTEK-ARGE)	Araştırmacı Öğrenci

UZMANLIK ALANI

Fen Bilimleri

YABANCI DİLLER

1- Arapça

2- Türkçe

YAYINLAR

- 1- Zuhair Mohammed, Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Comparative in vitro Evaluation of Water Soluble Supramolecular p-tert-butylcalix[4]arene’, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017, (Poster)
- 2- Zuhair Mohammed, Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Evaluation of Antiproliferative Activities of Water Soluble Supramolecular p-tert-butylcalix[4]arene’ 5th International BAU Drug Design Congress: Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017, (Poster Sunum)

- 3- Zuhair Mohammed, Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Calixarene Nanofiber Design For Human Gingival Fibroblast 3D-Cell Culture’, international molecular biology and biotechnology congress, Konya-Turkey, 2017, (Poster Sunum)

