



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



LL-37 NANOPARTİKÜLLERİ İLE
FONKSİYONLANDIRILMIŞ PCL/JELATİN
FİBER ÖRTÜNÜN IN VITRO 3 BOYUTLU
YARA MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Fazilet CANATAN ERGÜN

DOKTORA TEZİ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Fazilet CANATAN ERGÜN tarafından hazırlanan “LL-37 Nanopartikülleri ile Fonksiyonlandırılmış PCL/Jelatin Fiber Örtünün In Vitro 3 Boyutlu Yara Modelinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması 23/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

.....

Danışman

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

.....

Üye

Doç. Dr. Kemal ÇETİN

.....

Üye

Doç. Dr. Esmâ ERYILMAZ DOĞAN

.....

Üye

Doç. Dr. Buğrahan EMSEN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından 221419008 nolu proje ve Ufuk Avrupa CSA-Twinning kapsamında desteklenen 101079123 sözleşme nolu REGENEU projesi ile desteklenmiştir.

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.

Fazilet CANATAN ERGÜN

23/07/2025

ÖZET

DOKTORA TEZİ

LL-37 NANOPARTİKÜLLERİ İLE FONKSİYONLANDIRILMIŞ PCL/JELATİN FİBER ÖRTÜNÜN IN VİTRO 3 BOYUTLU YARA MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fazilet CANATAN ERGÜN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

2025, 114 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Doç. Dr. Kemal ÇETİN

Doç. Dr. Esmâ ERYILMAZ DOĞAN

Doç. Dr. Buğrahan EMSEN

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında skarsız yara iyileşmeyi sağlamada önemli gelişmeler olsa da halen mükemmel cilt iyileştirme konusu bir zorluk olarak karşımızdadır. Detaylı yara iyileşme süreçlerinin incelenmesinde, *in vitro* testler; spesifik bileşiklerin etkilerini ve buna bağlı genetik değişimleri değerlendirmede mükemmel bir araç olmaları nedeniyle önem kazanmaktadır. Yara iyileşme aşamalarındaki karmaşıklığı açıklamada iki boyutlu (2B) hücre kültürü yetersiz kalmakta bu süreçte *in vitro* üç boyutlu (3B) modellerin hücre matrisi ve hücre-hücre etkileşimleri tercih edilmektedir. Hücrelerin tercihi optimal hidrofiliklik, hücresel yapışma, göç ve çoğalma için çok sayıda hücre bağlanma yerine sahip olması açısından doğal polimerlerdir. Ancak doğal polimerlerin yeterli mekanik mukavemetinin olmaması, bir üretimden diğerine varyasyon göstermesi ve patojen bulaşma riskinden dolayı alternatifi sentetik polimerlerdir. Sentetik polimerler dayanıklı mekanik özellik yanında çeşitli çözücüler ve ısı işlemlerle işlenebilir ancak hücre afinitesi, yüksek hidrofobiklik ve hücre tanıma bölgelerinin olmaması gibi özellikleri mevcuttur. Çözüm olarak doğal-sentetik kompozit polimerlerin kullanımı önerilmektedir. Doktora tez çalışmasında antimikrobiyal peptit (AMP) LL37 enkapsüle edilmiş kitosan nanoparçacıklarının (LL37-CSNP) elde edilmesi için kitosan nanopartiküller (CSNP) iyonotropik jelasyon yöntemi ile üretilmiş, ardından LL37, CSNP'ler ile enkapsüle edilmiştir. İkinci aşamada polikaprolakton (PCL) ve Jelatin (Jel) içeren kompozit polimer çözeltisinin elektro-eğirilmesi ile üretilen fiber mat üzerine LL37-CSNP'ler emdirilmiştir. Üçüncü aşamada fonksiyonlandırılmış fiber matın laboratuvar koşullarında üretilen 3B *in vitro* insan cilt moldellerine uygulanarak yara iyileştirici etkisi ve antibakteriyel etkisi değerlendirilmiştir. NP'ler ve fiberlerin morfolojileri FE-SEM ile analiz edilmiştir. Kompozit liflerin kimyasal yapılarını karakterize etmek için FTIR spektroskopisi yapılmıştır. Lifli ağın mekanik özellikleri ve ıslanabilirliği ölçülmüştür. Matların *in vitro* bozunma hızı, mat ağırlığındaki değişikliğin izlenmesiyle belirlenmiştir. Fiber matın antibakteriyel etkisi mikro plakadaki bakteri üremesi belirlenerek değerlendirilmiştir. *In vitro* üç boyutlu deri modelleri geliştirilmiştir. Dokular üzerinde hematoksilin eosin (H&E) boyama ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 15 µg/mL LL37 enkapsüle edilmiş olan CSNP'lerin boyutları 210,90±2.59 nm, polidispersite indeksi (PDI) 0,306±0.02 ve Zeta potansiyeli 51,21±0.93 bulunmuştur. 15-LL37-CSNP'lerde LL37 enkapsülesyon verimi %80 bulunurken, NP'lerden LL37 salımı birinci derece modeliyle uyumlu bulunmuştur. LL-37'nin küresel yapı sergileyen 15-LL37-CSNP'ler göstermiş oldukları fizikokimyasal özellikleri, biyouyumlulukları ve antibakteriyel etkileri ile çalışmanın bir sonraki aşamasında fiberlerin fonksiyonlandırılması için uygun bulunmuştur. PCL/Jel fiber matın fizikokimyasal test sonuçları ortalama

fiber çaplarının 510,3±227,61 nm olduğunu gösterirken, fiber matın hidrofilitik özellikte olması ve biyouyumlu bulunması biyomedikal uygulamalar için uygunluğunu desteklemiştir. Doktora çalışmasının bir diğer aşaması olan *in vitro* u boyutlu deri modellerinde H&E ve immünohistokimya analizleriyle involukrin, sitokeratin, laminin proteinlerinin ifadeleri mikroskopik olarak gösterilmiştir. 15-LL37-CSNP'lerin *in vitro* modellerde punch ile oluşturulan yaraların kapanmasına etkisi MTT analizi ve mikroskopik incelemelerle gösterilmiştir. Tez çalışmasında yara iyileştirme potansiyeli gösteren fonksiyonel biyomalzeme geliştirilmiş olup, yara iyileştirici etkinliği projede geliştirilen yara modellerinde doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal Peptit, Doku Mühendisliği, Elektro-eğirme, Fiber, Jelatin, Kitosan Nanopartikül, LL37, PCL



ABSTRACT

Ph.D THESIS

EVALUATION OF THE EFFICACY OF PCL/GELATIN FIBER MAT FUNCTIONALIZED BY LL-37 NANOPARTICLES IN IN VITRO 3D WOUND MODEL

Fazilet CANATAN ERGÜN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

2025, 114 Pages

Jury

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Assoc. Prof. Dr. Kemal ÇETİN

Assoc. Prof. Dr. Esmâ ERYILMAZ DOĞAN

Assoc. Prof. Dr. Buğrahan EMSEN

Despite significant advancements in regenerative medicine and tissue engineering aimed at achieving scarless wound healing, attaining perfect skin regeneration remains a major challenge. In the detailed investigation of wound healing processes, *in vitro* tests have gained prominence as they are excellent tools for evaluating the effects of specific compounds and associated genetic changes. However, two-dimensional (2D) cell cultures are insufficient to fully explain the complexity of wound healing stages; thus, *in vitro* three-dimensional (3D) models are preferred due to their ability to mimic cell-matrix and cell-cell interactions. Natural polymers are typically favored for cell compatibility, offering optimal hydrophilicity, cellular adhesion, migration, and proliferation due to the abundance of cell-binding sites. Nevertheless, natural polymers often suffer from poor mechanical strength, batch-to-batch variability, and a potential risk of pathogen contamination. To overcome these limitations, synthetic polymers serve as alternatives, offering robust mechanical properties and processability with various solvents and thermal methods. However, their drawbacks include low cell affinity, high hydrophobicity, and lack of recognition sites for cells. As a solution, the use of natural-synthetic composite polymers has been proposed. In this doctoral study, antimicrobial peptide (AMP) LL37-loaded chitosan nanoparticles (LL37-CSNPs) were developed. Initially, chitosan nanoparticles (CSNPs) were produced using the ionotropic gelation method, followed by the encapsulation of LL37 into these CSNPs. In the second phase, LL37-CSNPs were embedded onto a fibrous mat fabricated by electrospinning a composite polymer solution containing polycaprolactone (PCL) and gelatin (Gel). In the third phase, the functionalized fibrous mat was applied to lab-grown 3D *in vitro* human skin models to evaluate its wound healing capacity and antibacterial activity. The morphology of the nanoparticles and fibers was analyzed by FE-SEM. FTIR spectroscopy was performed to characterize the chemical structure of the composite fibers. The mechanical properties and wettability of the fibrous mats were also measured. The *in vitro* degradation rate of the mats was determined by monitoring weight changes over time. The antibacterial effect of the mats was evaluated based on bacterial growth inhibition in microplates. Additionally, 3D *in vitro* skin models were developed.

Histological (H&E staining) and immunohistochemical analyses were conducted to assess the expression of key skin proteins such as involucrin, cytokeratin, and laminin. Based on the results, LL37-CSNPs containing 15 $\mu\text{g/mL}$ of LL37 exhibited a particle size of 210.90 ± 2.59 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.306 ± 0.02 , and a zeta potential of 51.21 ± 0.93 mV. The encapsulation efficiency of LL37 in 15-LL37-CSNPs was found to be 80%, and LL37 release from the nanoparticles followed a first-order kinetic model. Due to their physicochemical properties, biocompatibility, and antibacterial effects, the spherical 15-LL37-CSNPs were deemed suitable for fiber functionalization in the next phase of the study. The physicochemical tests of the PCL/Gel fiber mats indicated an average fiber diameter of 510.3 ± 227.61 nm, hydrophilic character, and biocompatibility, supporting their potential for biomedical applications. In the final phase of the doctoral research, the expression of involucrin, cytokeratin, and laminin proteins in the 3D *in vitro* skin models was demonstrated via H&E staining and immunohistochemistry. The wound-healing effect of 15-LL37-CSNPs on punch-induced wounds in the models was confirmed by MTT assay and microscopic evaluations. As a result, a functional biomaterial with demonstrated wound healing potential was developed, and its effectiveness was validated using the custom-designed wound models in this study.

Keywords: Antimicrobial Peptide, Tissue Engineering, Electrospinning, Fiber, Gelatin, Chitosan Nanoparticle, LL37, PCL



ÖNSÖZ

Doktora eğitim ve tez sürecimin başından sonuna kadar yardım etmede oldukça cömert, ilgili, yardım ve desteğini her daim hissettiğim, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum, tezimdaki tüm metni okuyup yorumlarını ve önerilerini paylaşma inceliği gösteren karşılaştığım zorlukları değerli bilgi ve tecrübesi ile süreci aşmamda büyük bir hoşgörü, sabırla karşılayan çok değerli ve sevgili hocam Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a canı gönülden teşekkür ediyorum ve saygılarımı sunuyorum.

Çalışmalarımızın başlangıcından itibaren sahip olduğu imkanları sunmakta anlayışlı olan tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. Kemal ÇETİN'e, değerli tez izleme jüri üyesi Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ'a, anabilim dalıyla ve danışmanımla tanışmamda vesile olan değerli yedek tez jüri üyesi Prof. Dr. Ahmet AVCI'ya ve tez jürisindeki diğer değerli akademisyen hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışma sürecinde antibakteriyel duyarlılık analiz protokolünü oluşturma, uygulama aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gökhan KARS'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda her daim desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim dalı değerli öğretim üyelerine, Necmettin Erbakan Üniversitesi değerli öğretim üyelerine, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM) akademik, idari ve teknik personeline teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yardımını esirgemeyen Dr. Emre Fatih EDİZ'e, çalışmalarımın hücre kültür ve laboratuvar aşamalarında bir arada çalıştığım ve süreç boyunca yardımcı olan değerli arkadaşım Sümeyye KOZAN'a, antibakteriyel duyarlılık analizlerinde yardımcı olan değerli arkadaşım Beyza Nur SAYANER TAŞCI'ya teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca BİTAM'da manevi desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi iletiyorum.

Bu doktora ve tez çalışma sürecimin gerçekleştirilmesinde, TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında doktora bursiyeri olarak araştırma faaliyetlerimi sürdürebilme, akademik hedeflerime ulaşım sağlama, bilimsel gelişimime maddi-manevi katkı sağlama ve araştırma alanımda derinleşmemi desteklediği için TÜBİTAK 2211-A'ya teşekkür ederim.

221419008 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması, değerli danışman hocam Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'ın yürütücülüğünü yaptığı Ufuk Avrupa (Horizon Europe) programı kapsamında desteklenen "Consolidating Expertise at Necmettin Erbakan University Towards Development of Regenerative Medicine (REGENEU)" projesi kapsamında desteklenmiştir. REGENEU projesi sayesinde rejeneratif tıp alanındaki bilimsel bakış açım gelişmiş ve araştırma becerilerim ileri düzeye taşınmıştır. Proje süresince sunulan eğitimler, araştırma ortamı ve çok uluslu iş birliği fırsatları akademik gelişimime değerli katkılar sağlamıştır. Bu vesileyle başta sevgili danışman hocama, projede emeği geçen tüm araştırmacı akademisyenlere ve destekleyici kurumlara içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyu yanımda olmaları, yıllarca sevgilerini her an hissettirmeleri, bir an olsun esirgemenen verdikleri maddi-manevi destekleri ve en önemlisi eğitim hayatım boyunca araştırma yapmam için belki çok sıradan şartları dahi oluşturmadaki katkıları için değerli aileme sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunuyor ve bir gün haklarını ödeyebilmeyi ümit ediyorum.

Doktora eğitimim boyunca hayatı birlikte paylaştığım her anımda yanımda hissettiğim çok değerli eşim Uçman ERGÜN'e tüm kalbimle sevgimi iletiyorum.

Fazilet CANATAN ERGÜN
KONYA-2025



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	8
2.1. Nanoteknoloji.....	8
2.1.1. Nanoteknolojide kullanılan polimerler	8
2.2. Nanopartikül	9
2.2.1. CSNP üretim yöntemi: iyonik jelasyon	10
2.3. Fiber.....	11
2.3.1. Fiber mat üretim yöntemi: elektro-eğirme.....	12
2.4. Antimikrobiyal Peptit (AMP)	13
2.5. 3B İnsan Cildi Mimarisi	16
2.5.1. Epidermis	17
2.5.2. Dermis ve deri altı doku.....	17
2.6. 3B Cilt Modelleri	19
2.6.1. 3B Cilt yara modeli.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan cihazlar	25
3.1.1.1. NP üretiminde kullanılan cihazlar	25
3.1.1.2. Fiber üretiminde kullanılan cihazlar	25
3.1.1.3. Cilt modeli geliştirmek için kullanılan cihazlar.....	25
3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	26
3.1.2.1. NP üretiminde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	26
3.1.2.2. Fiber üretiminde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	26
3.1.2.3. Cilt modeli geliştirmek için kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. İyonik jelasyon yöntemiyle boş CSNP'lerin hazırlanması	27
3.2.1.1. İyonik jelasyon yöntemiyle LL37-CSNP'lerin hazırlanması	28
3.2.2. Elektro-eğirme yöntemiyle PCL/Jel fiber mat hazırlanması	29
3.2.2.1. LL37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel fiber mat üretilmesi	30
3.2.3. CSNP'lerin fiziko kimyasal ve biyolojik karakterizasyon testleri.....	30
3.2.3.1. CSNP ve LL37-CSNP'lerin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM) analizleri.....	30

3.2.3.2. CSNP ve LL37-CSNP'lerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) analizi.....	31
3.2.3.3. CSNP ve LL37-CSNP'lerin fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	31
3.2.3.4. LL37 kapsülleme verimliliği (%EE).....	31
3.2.3.5. <i>In vitro</i> salım kinetiği.....	31
3.2.3.6. Biyouyumluluk testleri	34
3.2.3.7. CSNP ve LL37-CSNP için antibakteriyel duyarlılık testi	34
3.2.4. PCL/Jel Fiber matların fiziko kimyasal ve biyolojik karakterizasyon testleri	35
3.2.4.1. PCL/Jel fiber mat için FE-SEM analizleri.....	35
3.2.4.2. PCL/Jel ve LL37-CSNP yüklü PCL/Jel fiber matın FTIR analizleri	35
3.2.4.3. Temas açısı analizi.....	35
3.2.4.4. Mekanik analiz.....	35
3.2.4.5. PCL/Jel fiber mat biyobozunma testi.....	36
3.2.4.6. LL37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel fiber matdan <i>in vitro</i> salım kinetiği ..	36
3.2.4.7. PCL/Jel fiber mat örneklerinde biyouyumluluk analizi.....	36
3.2.4.8. PCL/Jel fiber mat örneklerinde antibakteriyel duyarlılık testi.....	37
3.2.4.9. PCL/Jel fiber mat örnekleri lazer taramalı konfokal mikroskop ve SEM görüntüleme	37
3.2.4.10. PCL/Jel fiber mat örnekleri için 2B modelde çizik testi.....	38
3.2.5. 3B cilt modeli geliştirilmesi.....	39
3.2.5.1. 3B cilt yara modeli.....	40
3.2.5.2. <i>In vitro</i> 3B insan cilt modeli ve 3B insan cilt yara modeli morfoloji ve karakterizasyonu	41
3.2.6. İstatistik analizler.....	44
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	46
4.1. NP'lerin Morfoloji ve Karakterizasyon Sonuçları.....	46
4.1.1. CSNP ve LL37-CSNP'lerin FE-SEM analiz sonuçları	46
4.1.2. CSNP ve LL37-CSNP'lerin partikül boyutu, PDI ve ZP analiz sonuçları ...	47
4.1.3. FTIR analiz sonuçları.....	51
4.1.4. LL37 enkapsülasyon verimliliği (%EE)	53
4.1.5. CSNP'lerden LL37 <i>in vitro</i> salım kinetiği.....	55
4.1.6. CSNP ve LL37-CSNP'lerin biyouyumluluk testi sonuçları	57
4.1.7. CSNP ve LL37-CSNP'ler için antibakteriyel duyarlılık test sonuçları	62
4.2. Fiber Matların Morfoloji ve Karakterizasyon Sonuçları	64
4.2.1. Fiber matların FE-SEM analiz sonuçları	64
4.2.2. Fiber matların FTIR analiz sonuçları	65
4.2.3. Fiber matların biyolojik bozunma/ağırlık kaybı analiz sonuçları	67
4.2.4. Fiber matların biyouyumluluk analiz sonuçları	69
4.2.5. Fiber matlardan LL37'nin <i>in vitro</i> salım kinetiği sonuçları	73
4.2.6. Fiber matların temas açısı analiz sonuçları.....	74
4.2.7. Fiber matların antibakteriyel test sonuçları	75
4.2.8. Fiber matların mekanik analiz sonuçları.....	77
4.2.9. Fiber matların lazer taramalı konfokal mikroskop ve SEM görüntüleme sonuçları.....	78
4.2.10. Fiber matların 2B çizik testi sonuçları	80
4.3. <i>In vitro</i> 3B insan cilt doku ve yara modeli.....	83

4.3.1. <i>In vitro</i> 3B insan cilt doku ve yara modeli H&E boyama sonuçları.....	83
4.3.2. <i>In vitro</i> 3B insan cilt doku modelinin immunohistokimyasal (IHC) karakterizasyonu	84
4.3.3. 3B insan cilt doku yara kapanma için MTT analizi sonuçları	86
4.3.4. 3B insan cilt doku yara kapanma için invert mikroskop görüntüleme sonuçları.....	87
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	89
5.1. Sonuçlar	89
5.2. Öneriler	95
6. KAYNAKLAR	97



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°	Derece
C	Santigrad
μ	Mikro
g	Gram
L	Litre
M	Molar
μg	Mikrogram
mg	Miligram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mol	Mol
nm	Nanometre
kV	Kilovolt
cm	Santimetre
mm	Milimetre
MPa	Megapaskal
pH	Power of hydrogen (hidrojen gücü)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
mw	Molecular weight (moleküler ağırlık)
mL/saat	Saatteki akan mililitre
R ²	Regresyon katsayısı
±	Artı eksi işareti
>	Büyüktür
<	Küçüktür
CFU/mL oluşturan birim)	Colony Forming Units per Milliliter (Mililitre başına koloni)

Kısaltmalar

2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
7,5-LL37-CSNP	7,5 μg/mL LL37 yüklü kitosan nanopartikül
7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel	7,5 μg/mL LL37 yüklü kitosan nanopartikül emdirilmiş polikaprolakton ve jelatin fiber mat
15-LL37-CSNP 15 μg/mL	LL37 yüklü kitosan nanopartikül
15-LL37-CSNP-PCL/Jel	15 μg/mL LL37 yüklü kitosan nanopartikül emdirilmiş polikaprolakton ve jelatin fiber mat
AA	Asetik asit
ALI	Air-Liquid Interface (Hava-Sıvı Arayüzü)
AMP	Antimikrobiyal peptit
AMR	Antimikrobiyal direnç
BSA	Sığır serumu albümini
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
Col	Kolajen
CS	Kitosan

CSNP	Kitosan nanopartikül
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Ekstraselüler Matris
EE	Enkapsülasyon verimliliği
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FE-SEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FTSE	Tam katmanlı deri eşdeğeri
H&E	Hemotoksilin ve Eozin
hBD-2	İnsan beta defensin-2
hBD-3	İnsan beta defensin-3
HCl	Hidroklorik asit
hDF	İnsan dermal fibroblast
HDP	Konak savunma peptitleri
hEC	İnsan epidermal hücre
hEK	İnsan epidermal keratinosit
HS2	İnsan keratinosit hücre hattı
IHC	İmmünohistokimya
Jel	Jelatin
LL37	Lösin-Lösin 37
LL37-CSNP	LL37 yüklü kitosan nanopartikül
MDR	Çoklu ilaç direnci
MTT Bromide	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium
NB	Nanoboyut
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NP	Nanopartikül
OD	Optik yoğunluk
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı)
PAA	Poliakrilik asit
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu çözelti
PCL	Polikaprolakton
PCL/Jel	Polikaprolakton ve jelatin polimer karışımı
PDEGMA	Poli dietilen glikol metil eter metakrilat
PDI	Polidisperseite indeksi
PDMS	Polidimetilsiloksan
PEO	Polietilen-glikol
PET	Polietilen tereftalat
PES	Polietersülfon
PLA	Polilaktid
PLGA	Poli laktid-ko-glikolit
PMMA	Polimetilmetakrilat
PS	Polistiren

PVA	Poli vinil alkol
PU	Poliüretan
RHE	Yeniden yapılandırılmış insan epidermisi
Rh-Phalloidin	Rodamin faloidin
RNA	Ribonükleik asit
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC	Keratinli tabaka
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SG	Granüler tabaka
SS	Dikenli tabaka
TPP	Sodyum tripolifosfat
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-
Tetrazolium-5-Carboxanilide	
ZP	Zeta potansiyel



1. GİRİŞ

İnsan vücudunda en büyük organ, deridir. Derinin organizmada işlevsel vazgeçilmezliği bariyer görevinin sürdürülmesidir (Stamm ve ark., 2016). Deri patolojik enfeksiyonlara karşı önleyici fiziksel bir bariyer olma görevi yanında, hidrasyon, termoregülasyon ve vücut metabolizmasını koruma gibi bir dizi hayati işlevleri yerine getirmektedir (Anjum ve ark., 2017). Derinin yüzeysel bölgeleri mükemmel bir şekilde iyileşme sergilerken derin bölgelerde ise uygun tedavi türleri olmadan zor iyileşme sergilemektedir. Yara tedavilerinin yeterli olmaması veya zamanında müdahale edilememesi durumunda cildi normal haline getiremez böylelikle ciddi sağlık sorunlarına hatta ölümlere yol açar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre, 180.000 ölüm yanık nedeniyle gerçekleşmekte ve her yıl 11 milyondan fazla cilt yarası için zamanında ve etkili tıbbi müdahale gerekmektedir (Sun ve ark., 2022). Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 6,5 milyon kronik yaralara sahip hasta olduğu, yıllık maliyetin 25 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmekte ve ek olarak akut veya travmatik yaralarda yılda 7-10 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Chen ve ark., 2014; Stamm ve ark., 2016). Yaralanmalar için skarsız yara iyileşmeyi sağlamada muazzam adımlar atılmış olsa da halen mükemmel cilt iyileştirmek önemli bir zorluk olmaya devam ediyor (Sun ve ark., 2022). Yara iyileşme aşamaları hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi olmak üzere karmaşık dört süreçten oluşmaktadır (Chen ve ark., 2014). Detaylı yara iyileşme süreçlerinin incelenmesinde *in vivo* deneyleri gerçekleştirilmeden önce *in vitro* testlerin gerçekleştirilmesi önem arz eder. *In vitro* teste öncelik verilmesindeki asıl maksat, spesifik bileşiklerin etkisinin beraberinde genetik değişimlerin de iyileşme süreci üzerindeki etkisini incelemeye mükemmel bir araç olmasıdır. Yara iyileşme sürecindeki karmaşıklık, iki boyutlu (2D) hücre kültürünün ifade edebilmesinin oldukça ötesindedir bu yüzden yeni üç boyutlu (3D) *in vitro* modeller iyileşme sürecindeki hücre matrisi ve hücre-hücre etkileşimleri gibi karmaşık süreçleri modellemesinden dolayı tercih edilmektedirler (Stamm ve ark., 2016).

Rejeneratif tıpta hücre temelli tedaviler ve doku mühendisliği en çok çalışılan iki yöntemdir. Doku işlevini onaran, koruyan veya arttıran biyolojik ikameler üretmek için disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliği, *in vitro* ortamlarda implante edilebilir dokular oluşturma amacıyla hücrelerin, yapı iskelelerinin ve büyüme faktörlerinin kombinasyonundan faydalanır. Malzeme seçimi ve optimizasyonu doku implantasyonunun başarısını belirleyen kilit unsurlardır. Hücrelerin tercihi optimal

hidrofobiklik, hücresel yapışma, göç ve çoğalma için çok sayıda hücre bağlanma yerine sahip olması açısından doğal polimerlerdir. Doğal dokuların hücre dışı matrisinden (ECM) türetilen polimerler, sinyal moleküllerine geçici rezervuar görevi görebilecek bol miktarda büyüme faktörü bağlanma bölgelerine sahiptir. Ancak doğal polimerlerin yeterli mekanik mukavemetinin olmaması, partiden partiye varyasyonlar ve patojen bulaşma riskinden dolayı alternatif, sentetik polimerlerdir. Sentetik polimerler mekanik özellik yanında çeşitli çözücüler veya ısı işlemleriyle işlenebilir. Ancak sentetik polimerlere karşı hücre afinitesi, yüksek hidrofobiklik ve hücre tanıma bölgelerinin olmaması nedeniyle nispeten düşüktür. Bu duruma çözüm olarak araştırmacılar sentetik ve doğal polimerlerin kombine halinde kullanılması önerdiler. Kompozit halde doğal polimerler sito-uyumluluk sağlarken sentetik polimerler ise omurgayı oluşturarak mekanik kuvvetlere dayanıklılık sergiler (Farzamfar ve ark., 2020).

Son yıllarda belirli hastalıkların tedavisinde dendrimerler, lipozomlar, nanokabuklar, emülsiyonlar, nanotüpler ve fiberler şeklinde ilaç taşıyabilen fonksiyonel nanomalzemelerin üretiminde nanoteknoloji gelişmektedir. Fiberler nano ölçekte bir çapa sahip nanolifler, lif üretim yöntemlerinden elektro-eğirme tekniği ile üretilmektedir. Son on yılda yara pansuman ve yerel kanser tedavisi gibi farmasötik uygulamalar için antibakteriyel veya antikanser ilaçlarla yüklü fiber mat malzemelerin üretiminde elektro-eğirme tekniğinin kullanımı üzerine çalışmaların sayısı artmıştır. Böylelikle elektrospun ürünlere kolaylıkla farklı ilaçların entegre edilebilmesi ve bunların salım profilleri, liflerin morfolojileri, gözeneklilikleri ve bileşimleri değiştirilerek düzenlenmektedir (Parham ve ark., 2020; Farokhi ve ark., 2018; Ding ve ark., 2019; Moeini ve ark., 2020; Homaeigohar ve Boccaccini, 2020; Huesca-Urióstegui ve ark., 2022). Fiberler yara sargıları, yara iyileştirme iskeleleri, rejeneratif tıp, cilt dokusunun biyomühendisliği ve çok yönlü ilaç dağıtımı gibi oldukça geniş uygulama yelpazesi olan biyomedikal alanda muazzam potansiyelde yeni bir nanomalzeme biçimi olarak karşımızdadır (Behere ve Ingavle, 2022).

Fiberler, doğal deri organ ECM'de yer alan protein fibrillerinin boyut ve yapısını oldukça mükemmel kopyalayabilmekte, yara iyileşmesi ve cilt yenilenmesi uygulamalarında iyileşmeyi teşvik eden bir mikro-ortam yaratmaktadır. İkincisi fiberler hava ve nem geçirgenliğini sağlaması yanında dış patojen istilasına karşı engelleyici etkisi, küçük gözenek boyutu, yüksek gözenekliliğe sahip bir yapı olmasıdır. Üçüncüsü yara iyileştirme verimliliği ve rejenerasyon sonuçlarını iyileştirmek amacıyla elektro-eğirme tekniği biyoaktif ve terapötik ajanları yüklemek için ilaç taşıyıcıları olarak görev

alabilir (Wu ve ark., 2021b; Schneider ve ark., 2009; Memic ve ark., 2019; Gao ve ark., 2021; Liu ve ark., 2021; Gao ve ark., 2018; Li ve ark., 2022). Fiberler ilaç çözünürlüğü ve terapötik etkinliği arttırabilen geniş spesifik yüzey alanı ortaya koyar. Çoklu ajanlar (antimikrobiyaller, büyüme faktörleri gibi) karışım, koaksiyel ve emülsiyon elektro-eğirme tekniği kullanılarak fiber ağlara entegre edilmektedir. Fonksiyonel bir fiber yara örtüsü tasarlamada gereken ölçütler yara tipinin özellikleri, yara iyileşme süresi, yara örtüsünün mekanik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin tümünü kapsamaktadır. Bu aşamada birincil hedef mümkün olan en hızlı yara iyileşmesi oranlarına ve en iyi yara iyileşmesi performansına ulaşmak olacaktır (Miguel ve ark., 2018; Esentürk ve ark., 2016). Elektro-eğirme tekniği enjeksiyon iğnesi ve toplama levhası arasında yüksek voltajlı bir elektrik alanının oluşturulduğu, ardından bir jet oluşumu için bir sıvı damlacığının elektrikleştirilerek gerdirmeye ve uzama işlemleriyle lif oluşumunun meydana geldiği bir elektrohidrokinamik bir süreci kapsar (Rahmati ve ark., 2021; Xue ve ark., 2019).

Polimer ürünleri kimyasal bileşimlerine göre doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Doğal polimerler mükemmel derecede biyoyumlulukları, bozunabilirlikleri ve hücre-hücre tanıma yetenekleri sayesinde biyomedikal ve farmasötik alanlarda yaygın olarak kullanılmakta olup gelişmiş yara iyileşmesi uygulamalarında daha arzu edilen işlevleri elde etmek için kendilerini kimyasal veya biyolojik olarak değiştirmeye izin veren birçok aktif fonksiyonel gruba sahiptir. Doğal biyopolimerler kitosan (CS), selüloz, kollajen, jelatin (Jel), elastin, keratin, ipek fibroin, zein, soya protein şeklinde verilebilmekte olup sentetik polimerlere göre biyoyumluluk, biyobozunurluk ve biyolojik sistemdeki toksik olmayan özellikleri ile özel ilgi uyandırmıştır. Sentetik polimerler kendi içinde sentetik bozunmayan polimerler (poliüretan(PU), polidimetilsiloksan(PDMS), polietilen tereftalat(PET), polietersülfon(PES), polistiren(PS), poli(akrilik asit)(PAA), poli(metil metakrilat)(PMMA) ve poli(di(etilen glikol) metil eter metakrilat)(PDEGMA) gibi ve sentetik bozunabilir polimerler (poli-ε-kaprolakton(PCL), polilaktid(PLA), poli(laktid-ko-glikolit)(PLGA), poli(vinil alkol)(PVA) ve polietilen-glikol(PEO) gibi) olarak ayrılmaktadır. Sentetik bozunabilir polimerler birçok tıbbi uygulama için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Li ve ark., 2012; Negut ve ark., 2020; Bacakova ve ark., 2019; Huesca-Urióstegui ve ark., 2022; Parham ve ark., 2022)

Çeşitli polimerler, nanopartiküller ve diğer bileşenlerin kombinasyonu, tek tek bileşenlerin özelliklerinden daha iyi özelliklere sahip hibrit malzeme elde etmede yaygın

kullanılan bir stratejidir. Tek başına sentetik malzemeler, minimum değişkenlik sergileyerek tasarlandığı gibi hassas ve tutarlı bir şekilde üretilebilmesine rağmen bozulmuş yan ürünlerinin proinflatuar tepkilere yol açarak istenmeyen sonuçlara neden olabilir. Aksine tek başına doğal malzemeler biyolojik anlamda birçok doku veya organla uyumluluk sergilemekte ancak yara iyileşmesi için tüm gereksinimleri karşılayamamaktadır. Hem doğal hem de sentetik polimerlerin özelliklerinden faydalanarak elde edilen doğal-sentetik kompozit materyaller yara iyileşme sürecindeki eksikliklerin üstesinden gelerek daha geniş uygulamalarda yer bulmuştur (Gomes ve ark., 2017) sentetik biyomateryal grubu arasından PCL özellikle biyomedikal alanda çekicidir ve hastalık modellerine uygulamaları başarılıdır. İşlenebilme kolaylığı, uygun maliyet terapötik çekiciliğine katkı sağlar. Bu açıdan biyouyumlu sentetik polimer grubundan olan poli-ε-kaprolakton (PCL) en sık tercih edilen malzeme olup diğer polyesterlerle karşılaştırıldığında belirli uygulamalar için gerekli olan yavaş bozunma karakteristiğine sahip ve bozunma ürünleri doğada toksik etki oluşturmamaktadır. PCL çeşitli malzeme gruplarıyla mükemmel karışım uyumluluğuna sahip olmakla birlikte bir dizi tıbbi ve ilaç dağıtım cihazında kullanılan FDA onaylı yarı kristal biyobozunur bir polyesterdir. Tersine jelatin (Jel) ise kolajenin (Col) kısmi hidrolizi ile elde edilen protein bazlı doğal bir biyopolimerdir. Kalıtsal biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, düşük immünojenitesi, ekstraksiyon kolaylığı yanı sıra düşük maliyeti ve ticari bulunabilirliği sayesinde yara iyileştirici pansumanlarda, cilt doku mühendisliği alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu materyal, Col'in denatürasyon sürecinden geçerek aminoasit bileşimini büyük ölçüde korur. Jel tip A, kolajen asidik çözeltilere batırılarak üretilirken Jel tip B alkali koşullar altında ekstrakte edilir (Nair ve Laurencin, 2005; Mondrinos ve ark., 2006; Kweon ve ark., 2003; Foox ve Zilberman, 2015; Anjum ve ark., 2017). Jel'in nanoliflere dahil edilmesi fibroblastların ve keratinositlerin bağlanmasını, göçünü ve çoğalmasını teşvik etmenin yanında temel ECM bileşenlerinin *in vitro* salgılanmasını, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoaktivite gibi hücreye uygun biyolojik özellikleriyle *in vivo* yara iyileşmesini hızlandırır (Behere ve Ingavle, 2022). Jelatin ve çeşitli adaylar arasından özellikle PCL biyomedikal alanda büyük ilgiyle araştırılmıştır. PCL ve jelatinin kompozit kullanımları, bu malzemelerin tek başına uygulanmasıyla ilgili birçok dezavantajı ortadan kaldırmıştır. PCL mekanik mukavemet sağlayarak bozunma olmadan doku yenilenmesi için yeterli zamanı kazandırır. Bu aşamada Jel ise kompozit yapının yüzey ıslanabilirliğini düzenleme ve hücre tanıma siteleri ile yapıyı daha sito-uyumlu hale getirir.

Lifli polimerik ağların avantajları ECM'in lifli bileşenini taklit etme, mikroplara karşı koruyucu bariyer olma, hasarlı cildin nemini tutma, gaz alışverişine izin verme ve yaradaki eksüdayı emme şeklinde sıralanabilmektedir. En anlamlı özelliği büyüme ve anjiyojenik faktörler, sitokinler, hormonlar, vitaminler, antioksidanlar, antimikrobiyal ve antitümör ajanlar, aminoasitler, yara iyileştirici peptitler ve antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) gibi oldukça çeşitli biyoaktif moleküllerle yüklenebilir olmalarıdır (Albright ve ark., 2018; Unnithan ve ark., 2015; Li ve ark., 2019).

Antibakteriyel bir etki sağlamak için kompozit liflere AMP'ler, gümüş iyonları, ilaçlar (antibiyotikler) veya doğadan türetilen antibakteriyel bileşikler entegre edilebilir. Bu açıdan AMP'lere yeni tedavi stratejileri olarak giderek daha fazla odaklanılmaktadır. Günümüzde çoklu ilaç direncine bağlı mikrobiyal enfeksiyonlar, ciddi düşünülmesi gereken bir tehdit olmakta, enfeksiyon sonucu yara iyileşmemektedir. AMP'ler mikrobiyal yayılmayı kontrol etme ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı koyma gibi ihtiyaçlara umut verici alternatiflerdir. Dünya çapında antimikrobiyal direnç (AMR) araştırmaların odak noktası halindedir ki bu noktalar: (i) mevcut olan veya yeni AMP'leri belirleyerek etki mekanizmaları ve memeli hücrelerine ve/veya kan hücrelerine karşı toksisiteleri dahil olmak üzere yaygın mikroorganizmalara karşı etkinliklerini karakterize etmek, (ii) AMP'lerin proinflamatuvar sitokinleri modüle etmedeki ve adaptif immün mekanizmasındaki rolünü değerlendirmek ve (iii) AMP dağıtımı için yeni yaklaşımları belirlemek olarak sıralanabilir (Patrulea ve ark., 2015; Homaeigohar ve Boccaccini, 2022; Singh ve Jonnalagadda, 2020; Thapa ve ark., 2020; Gieringer ve ark., 2011; Abdel-Sayed ve ark., 2016; Seppanen ve ark., 2019). AMP'ler hem Gram Pozitif (+) hem de Gram Negatif (-) bakterilerine, virüslerine ve mantarlarına biyolojik aktivitesi özellikle çoklu ilaçlara dirençli bakterileri öldürme yetenekleri özel ilgi uyandırmaktadır. AMP'ler negatif yüklü bakteri duvarı ile pozitif yüklü AMP'ler arasındaki elektrostatik çekim mantığına göre hücre zarının bütünlüğünü bozan etki mekanizması sergiler. AMP'ler sitoplazmik membran yoluyla yayılabilir ve hücre içinde birikebilir, ardından DNA replikasyonunu bloke eder, RNA ve protein sentezini bozar sonuç olarak hücre duvarı lizisine yol açar. AMP'lerin birçoğu antimikrobiyal aktivite yanı sıra doku rejenerasyon sürecinde yara iyileşmesi ve anjiyogenez için anahtar faktörleri uyararak hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak topikal uygulama sonrası umut verici sonuçlar verirler. Bu anlamda yara restorasyonunda çok önemli bir faktör olan dermal hücrelerin anjiyogenezini, göçünü ve proliferasyonunu destekleyen AMP, insan katelisinidin LL37'dir. LL37 hava yolu epitel hücrelerinin göçünü, çoğalmasını ve yara kapanmasını indüklemiştir.

İnsanlarda en iyi karakterize edilen AMP'ler, LL37 ve defensinler olup makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri ve dentritik hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. AMP'lerin ana engeli kısa eliminasyon yarı ömürleri olup kan dolaşımında bir kez proteazların varlığında hızlı bozunmalarıdır. Bu nedenle AMP'lerin çoğu, özellikle yaralara topikal uygulamaya yöneliktir (Nutti ve ark., 2017; Ho ve ark., 2016; Pfalzgraff ve ark., 2018; Patrulea ve ark., 2020; Steinstraesser ve ark., 2012; Takahashi ve Gallo, 2017). LL37'nin verilmesi ve enfeksiyon kontrolü için lipozomlar, polimerler, lipidler ve hatta inorganik NP'ler dağıtım sistemi olarak tanıtılmıştır. Bu nanotaşıyıcılardan en uygun doğal biyopolimer CS olup ilaç/gen dağıtımı, doku mühendisliği, kemik rejenerasyonu ve yara pansumanları gibi biyomedikal alanda umut verici aday haline gelmektedir (Martin-Serrano ve ark., 2019; Elbehairi ve ark., 2020). CS, ilaç dağıtım sistemlerinde nanopartiküller (NP'ler) olarak kullanılabilir. İlaçları bozulmadan koruyabilir ve yarı ömrünü arttırmak için ilaç salınımını sürdürebilir (Semwal ve ark., 2013; Ojeda-Hernandez ve ark., 2020; Kamal ve ark., 2021; Tzeyung ve ark., 2019). Kitosan nanopartiküllerin (CSNP'lerin) bu benzersiz özellikleri sayesinde ilaç dağıtım sistemlerinde en çok arzu edilen biyolojik kapsülleyici ajan olarak AMP'nin kapsüllemesi, antibakteriyel aktiviteyi ve biyoyararlanımı geliştirmektedir (Hassan ve ark., 2021; Elshaarawy ve ark., 2020; Piras ve ark., 2015).

Bu çalışmada ilk aşama LL37 antimikrobiyal peptidinin varlığı CSNP'leri içerisine enkapsüle edilmesi, ikinci aşama PCL/Jelatin(PCL/Jel) kompozit polimer çözeltisinin elektro eğirme yöntemiyle fonksiyonel bir fiber mat üretilmesi, son aşamada ise LL37-CSNP çözeltisinin PCL/Jel fiber mata emdirilerek elde edilmesi literatürde bir ilk olmuştur. Bu anlamda LL37'nin biyolojik ortamda hızlı bir şekilde ortamdaki kaybolmasını önlemek amacıyla kitosan nanopartikülleri ve kompozit lifler sayesinde kontrollü bir dağıtım sisteminin ortaya konulması planlanmaktadır. Ayrıca antimikrobiyalliği sağlamada geçmişten günümüze halen kullanılmakta olan antibiyotik tedavilerine olan ihtiyaçların azaltılması, antibiyotiklere karşı oluşturulan direnç mekanizmasının ve antibiyotiklerin olası yan etkilerinin ortadan kaldırılması açısından yeni alternatif bir çözüm olacağı düşünülmektedir. LL37'nin antimikrobiyalliği yanında LL37'nin enkapsüle edilmesi için kullanılan kitosan nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkisinin olduğu bilinmekte olup bu duruma göre kitosan nanopartiküllerinin de LL37 birlikteliğinde antimikrobiyallik özelliği üzerine ek katkı sağlayıp sağlamayacağı araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, laboratuvar koşullarında *in vitro* olarak üretilen üç boyutlu insan cilt yara modeli, gerçek insan cilt yarasını en yakın şekilde simüle eden

sistem olması sayesinde, hâlen yaygın olarak kullanılan hayvan deneylerine olan ihtiyacı azaltma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, insan cilt dokusuna biyolojik açıdan daha yakın olması nedeniyle, hayvan modellerinden elde edilen sonuçlara kıyasla daha güvenilir ve klinik açıdan daha anlamlı veriler sağlayabileceği düşünülmektedir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoteknoloji

Son yıllarda en umut verici bilimsel disiplinlerden biri olarak ortaya çıkan nanoteknoloji, nanometre (nm) boyutuyla ilgilenen ve gelişmekte olan bir bilimdir (Steinstraesser ve ark., 2008). Son zamanlarda nanoteknoloji ve polimerler ile birlikte, diğer alanlar arasında ilaç endüstrisinde ve terapötik yeniliğin dahil olduğu birçok alanda oldukça büyük bir ilgi uyandırmıştır (Agarwal ve ark., 2018). Birleşik Krallık Standartlar Enstitüsü'nün tanımına göre nanoteknoloji, nano ölçekte kontrollü yapıların, araçların ve sistemlerin tasarımı, karakterizasyonu, üretimi ve uygulaması olarak tanımlanmıştır. (Bawa, 2019). Parçacık boyutunun nano ölçekli değerlere indirgenmesi, yüzey/hacim oranını arttırmakta, bu da daha sonra mekanik, kimyasal ve optik özellikleri birkaç kata kadar göstererek parçacıkların reaktivitesini artırmaktadır (He ve ark., 2019; Fahimirad ve ark., 2020). Geçtiğimiz on yılda, nanoteknolojideki araştırmalar katlanarak artmış, birçok şirket tıbbi tedavi, teşhis, çevresel verimlilik ve enerji üretiminde geniş uygulamalara sahip nano ölçekli malzemelerin yeni formlarının üretiminde uzmanlaşmıştır (Dasari ve ark., 2020; Jalali-Jivan ve ark., 2020).

2.1.1. Nanoteknolojide kullanılan polimerler

Nanoteknolojide kullanılan polimerler kendisini oluşturan madde özelliklerine göre doğal polimerler ve sentetik polimerlerdir (Gibas ve Janik., 2010; Tüylek, Z., 2020). Doğada yer alan biyolojik yapılardan elde edilen ve oldukça işlevsel özelliğe sahip polimerler doğal polimerler olarak adlandırılmaktadır. Kollajen, jelatin, aljinat, elastin, aktin gibi proteinler, selüloz, nişasta, dekstran, kitosan gibi polisakkaritler sayılabilmektedir (Parham ve ark., 2022). Kollajen, bağ doku içeriğinde bolca bulunan biyobozunur ve biyouyumlu bir protein olarak tanımlanmaktadır (Sezer ve Cevher, 2011). 28 tip kollajen çeşidinin bulunduğu ve en yaygın olanlarının daha çok deri, kemik ve tendon gibi bağ dokuda yer alan Tip I kollajeni bilinmektedir (Schrieber ve Gareis, 2007). Kollajenin yapısı ilk kez Astbury tarafından 1938 yılında ortaya konulmuştur (Houacinea ark., 2018). Kitin'in de-asetilasyon işlemi ile elde edilen kitosan, β -(1-4)-D-glikozamin'in ve N-asetil-D-glikozamin'in rastgele bağlanması ile oluşturulmuş lineer aminopolisakkarit olduğu tanımlanmaktadır (Muzzarelli ve Muzzarelli, 2002). De-

asetilasyon derecesi, amino gruplarının sayısının, asetilamino gruplarının sayısına oranı ile belirlenmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarının kabuk yapısında yer alan ve selülozdan sonra en fazla bulunan doğal bir polimer olarak bilinen kitin olmaktadır (Wedmore ve ark., 2006; López-Chávez ve ark., 2006). Yara bölgesi üzerindeki hemostatik etkisi, pek çok yara örtüsünde tercih edilme nedenini oluşturmaktadır. Ayrıca yara iyileşmesinde erken faz reaksiyonunu arttırdığı ve fibroblast formasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Paul ve Sharma, 2004). Üstelik kitosanın aynı zamanda çok etkili bir adsorbent olması, toksik etkisinin olmaması ve biyoaktif özelliklere sahip olması gibi nedenlerle ilaç sanayi uygulamalarında yaygın olarak görülmektedir (Gürsu, E., 2019). Aljinat, β -D(1-4)-Mannuronik Asit (M) ile α -L(1-4)-Guluronik Asit (G) monomerlerinden oluşan biyobozunabilen lineer bir polisakkarit kopolimeri adıyla tanımlanmaktadır (Chrastil, J., 1991). Laminaria ve ascophyllum türevleri gibi kahverengi alglerden doğal bir polisakkarit türevidir (Bahar, D. U., 2021). Aljinat lifleri ortamdaki iyon varlığına göre tersinir yapılar oluşturmaları en temel iyon değişim özelliğinin varlığını belirtmektedir (Chrastil, J., 1991). Ayrıca aljinat liflerinin emiciliğini arttırmak amacıyla sodyum iyonları, kalsiyum aljinat liflerine de eklenebilmektedir. Yara bölgesinde eksuda ile temas halindeyken kalsiyum ve sodyum iyon değişimi ile meydana gelen hidrofilik aljinat jeli, yara iyileşme süreci için nemli bir ortam sağlamakla birlikte epitelizasyon ve granülasyon doku oluşumunu arttırdığı belirlenmektedir. Üstelik aljinat içerikli yara örtüsü tarafından serbest kalan kalsiyum iyonları, pıhtılaşmada rol oynayan protrombin maddesinin aktivasyonunda etkili olurken dahası kalsiyum ve lifli matris varlığı kanın pıhtılaşmasında yardımcı olan materyalleri desteklemektedir (Houacine ve ark., 2018).

Sentetik polimerlerden olan poli- ϵ -kaprolakton (PCL), polilaktid (PLA) ve poli(laktid-ko-glikolit) (PLGA) alifatik polyesterlerdir. PCL belirli uygulamalar için gerekli olabilen yavaş bozunan bir polimerdir (Ali Akbari Ghavimi ve ark., 2015) ve bozunma ürünleri doğada toksik değildir (Wang ve ark., 2005). Polyester bozunmasının asidik ürünleri, implantasyondan sonraki iyileşme sürecini etkileyebilir ve iltihaplanmaya neden olabilir (Ceonzo ve ark., 2006). Bununla birlikte, PCL'nin yavaş bozunması nedeniyle, bu risk, önemli ölçüde daha hızlı bozulan PLA ve PLGA'ya kıyasla önemli ölçüde daha düşüktür (Woodruff ve Hutmacher., 2010).

2.2. Nanopartikül

Kitosan (CS), toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir yapısıyla dikkat çeken doğal bir polimerdir. Kitin (poli-N-asetilglukozamin) türevi olan bu biyopolimer, deasetillenmiş yapısı sayesinde katyonik özellik gösterir; yapısında yer alan aktif amino grupları ve hidroksil fonksiyonel gruplar, CS'ye özgün kimyasal reaktivite kazandırır. CS; polikasyonik yapısı, metal iyonlarıyla şelat oluşturma kapasitesi ve film oluşturuca özelliği ile biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. N-asetilglukozamin içeren monomer birimleri, hemostazın uyarılmasına, hücre proliferasyonunun desteklenmesine ve dolayısıyla yara iyileşmesinin hızlanmasına katkı sağlamaktadır. Bu biyolojik özellikleri, kitosani antimikrobiyal ajanların kapsüllenmesi amacıyla geliştirilen yeni nesil nanoteknolojik sistemlerde güçlü bir aday haline getirmektedir. CS polimeri biyoaktif peptitlerin taşınmasında da yaygın olarak değerlendirilmiştir. Kitosan nanopartiküller (CSNP'ler) ile kapsüllenen antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler), çeşitli hayvan modeli çalışmalarında umut verici sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Patrulea ve ark., 2015; Keong ve Halim., 2009; Fahimirad ve Ajalloueian., 2019). Önceki *in vivo* yara iyileştirme çalışmalarına dayanarak, serbest formdaki LL-37 peptidinin yara bölgesindeki hızlı degradasyonu ve biyolojik dengesizlik nedeniyle terapötik etkisinin kısıtlandığı bildirilmiştir. Bu durum, etkili bir klinik sonuç için daha yüksek dozlara ve daha sık uygulamalara ihtiyaç duyulmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, AMP'lerin CSNP içinde kapsüllenmesi, peptitleri çevresel stres faktörlerine karşı koruyarak stabilitelelerini artırmakta ve biyolojik yarı ömürlerini uzatmaktadır (Lin ve ark., 2020; Ramos ve ark., 2011). Ayrıca bu yöntem, peptitlerin insan hücrelerine karşı oluşturabileceği sitotoksisiteyi de önemli ölçüde azaltmaktadır (Piras ve ark., 2015). Tüm bu avantajlar CSNP'leri AMP'lerin kontrollü salınımı ve hedefe yönelik dağıtımı açısından oldukça değerli bir taşıyıcı sistem haline getirmektedir.

2.2.1. CSNP üretim yöntemi: iyonik jelasyon

CSNP sistemlerini hazırlamak için iyonotropik jelleşme, emülsiyon çapraz bağlanma, nanopresipitasyon, tuzla dışarı çıkarma vb. gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden birinin seçimi, partikül boyutu gereksinimi, aktif maddenin termal ve kimyasal stabilitesi, salınım kinetik profillerinin tekrar edilebilirliği, nihai ürünün stabilitesi ve nihai ürünle ilişkili kalıntı toksisite gibi faktörlere bağlıdır. Bu çalışmada iyonik CSNP üretiminde jelasyon yöntemine odaklanılmaktadır. Zıt yüklü

makromoleküller arasındaki kompleksleşme kullanılarak CSNP'lerin hazırlanması, sürecin çok basit ve hassas olması nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Ayrıca, kimyasal çapraz bağlanma yerine elektrostatik etkileşimle tersinir fiziksel çapraz bağlanma uygulanarak, reaktiflerin olası toksisitesi ve diğer istenmeyen etkilerden kaçınılmıştır. TPP, elektrostatik kuvvetlerle katyonik CS ile etkileşebilen bir polianyondur. Park ve arkadaşları, CS damlacıklarını TPP çözeltisine damlatarak TPP-CS kompleksinin hazırlanmasını bildirdikten sonra, birçok araştırmacı bu yöntemin potansiyel farmasötik kullanımını araştırmıştır (Park ve ark., 2006). İyonik jelleşme yönteminde, chitosan, CS'nin katyonunu elde etmek için sulu asidik çözeltide çözülür. Bu çözeltiden sonra, sürekli karıştırma altında damla damla polianyonik TPP çözeltisine eklenir. CS moleküllerinde, TPP'nin negatif yüklü fosforik iyonlarıyla reaksiyona girerek çapraz bağlanmış CSNP oluşturabilecek bol miktarda NH_3 grubu bulunur (Debnath ve ark., 2011). CS, aralarındaki karşılıklı orana bağlı olarak farklı çaplarda nanopartiküller oluşturmak için polifosfat iyonları ile etkileşime girer (Agarwal ve ark., 2018).

2.3. Fiber

Fiberler, genellikle nanometre ölçeğinde çapa sahip liflerdir (Parham ve ark., 2022). Fiberler farklı üretim yöntemleriyle elde edilebilir. Bunlar arasında bakteriler tarafından üretilen nanoselüloz gibi biyolojik sentez yöntemleri, kendi kendine düzenlenme, faz ayrımı, ara yüzey polimerizasyonu, antisolvent çökeltme, eriyik işleme gibi teknikler yer alır. Elektriksel olarak iletken malzemeler için uygun yöntemler de mevcuttur. Bunlar arasında elektro-eğirme, hem sade uygulama prensibi hem de yüksek verimliliği sayesinde öne çıkar. Ayrıca bu yöntem, polimer bazlı liflerin ölçeklenebilir ve kontrollü üretimi açısından oldukça avantajlıdır (Bacakova ve ark., 2019a; Manoukian ve ark., 2017; Rasouli ve ark., 2019).

Elektrospun yöntemiyle üretilen fiber bazlı yapılar, yara bölgesinde etkin bir fiziksel bariyer oluşturarak açık yarayı dış çevresel faktörlerden ve eksojen mikroorganizmaların olası kontaminasyonundan koruma potansiyeline sahiptir. Bu tür elektrospun iskelelerin mimarisi, doğal hücre dışı matrisi (ECM) yüksek düzeyde taklit edebilme kapasitesi sayesinde, hücrelerin adezyon, yayılım ve proliferasyon süreçlerini destekleyebilecek uygun bir mikroçevre sunar (Serio ve ark., 2019). Böylece doku yenilenmesi için ideal bir biyolojik şablon görevi görürler. Elektrospun matlar aynı zamanda, gaz alışverişine izin veren, yara eksüdalarının uzaklaştırılmasını kolaylaştıran

ve nemli yara iyileşme ortamının korunmasına katkı sağlayan yapılar olarak öne çıkmaktadır (Deng ve ark., 2018). Bu mikroçevresel özellikler, yaranın iyileşme sürecini hızlandırmak açısından önemli avantajlar sunar. Tüm bu niteliklere ek olarak, elektrospun yapılar çeşitli biyoaktif moleküller, terapötik ajanlar veya antimikrobiyal bileşiklerle yüklenebilir. Bu sayede, bu ajanların yara bölgesine kontrollü ve hedeflenmiş salınımı sağlanarak hem enfeksiyon riski azaltılabilir hem de yara iyileşmesi daha etkin biçimde desteklenebilir (Jiang ve ark., 2016).

Doğal ve sentetik biyobozunur polimerler arasında, polilaktik asit (PCL) ve jelatin (Jel), yara örtüsü materyali olarak en yaygın şekilde araştırılan iki önemli bileşiktir. PCL, yüksek biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği, işlenebilirliği ve mekanik dayanıklılığı ile öne çıkarken (Xu ve ark., 2018); Jel ise iyi porozite, sıvı tutma kapasitesi, antijenik olmayan yapısı ve hücre-spesifik bağlanma bölgeleri gibi özellikleriyle dikkat çekmektedir (Aldana ve ark., 2019). Ancak her iki polimerin de kendi başlarına belirli sınırlılıkları bulunmaktadır. PCL, yapısal olarak hidrofobik bir karaktere sahiptir, hücrelere özgü tanıma bölgelerinden yoksundur (Liverani ve Boccaccini., 2016) ve bozunma hızı görece yavaştır (Pal ve ark., 2017). Buna karşılık, Jel ise hidrofilik yapıda olup hızlı bozunabilirlik gösterir ve mekanik dayanımı düşüktür (Fallah ve ark., 2016). Ayrıca, bazı sentetik polimerlerden elde edilen elektrospun liflerin insan dermal fibroblast hücrelerine maruz kalması durumunda immün yanıt oluşabileceği bildirilmiştir (Blackstone ve ark., 2018). Bu nedenle, PCL ve Jel birlikte kullanımı, her iki malzemenin eksik yönlerini dengeleyip güçlü yanlarını bir araya getirmek adına akılcı bir çözüm sunar. Bu tür hibrit yapılar, yalnızca mekanik olarak dayanıklı olmakla kalmaz; aynı zamanda hücrelerle biyolojik etkileşimi destekleyen yapılar oluşturarak yara iyileşme sürecini daha etkili ve hızlı bir şekilde destekleyebilir.

2.3.1. Fiber mat üretim yöntemi: elektro-eğirme

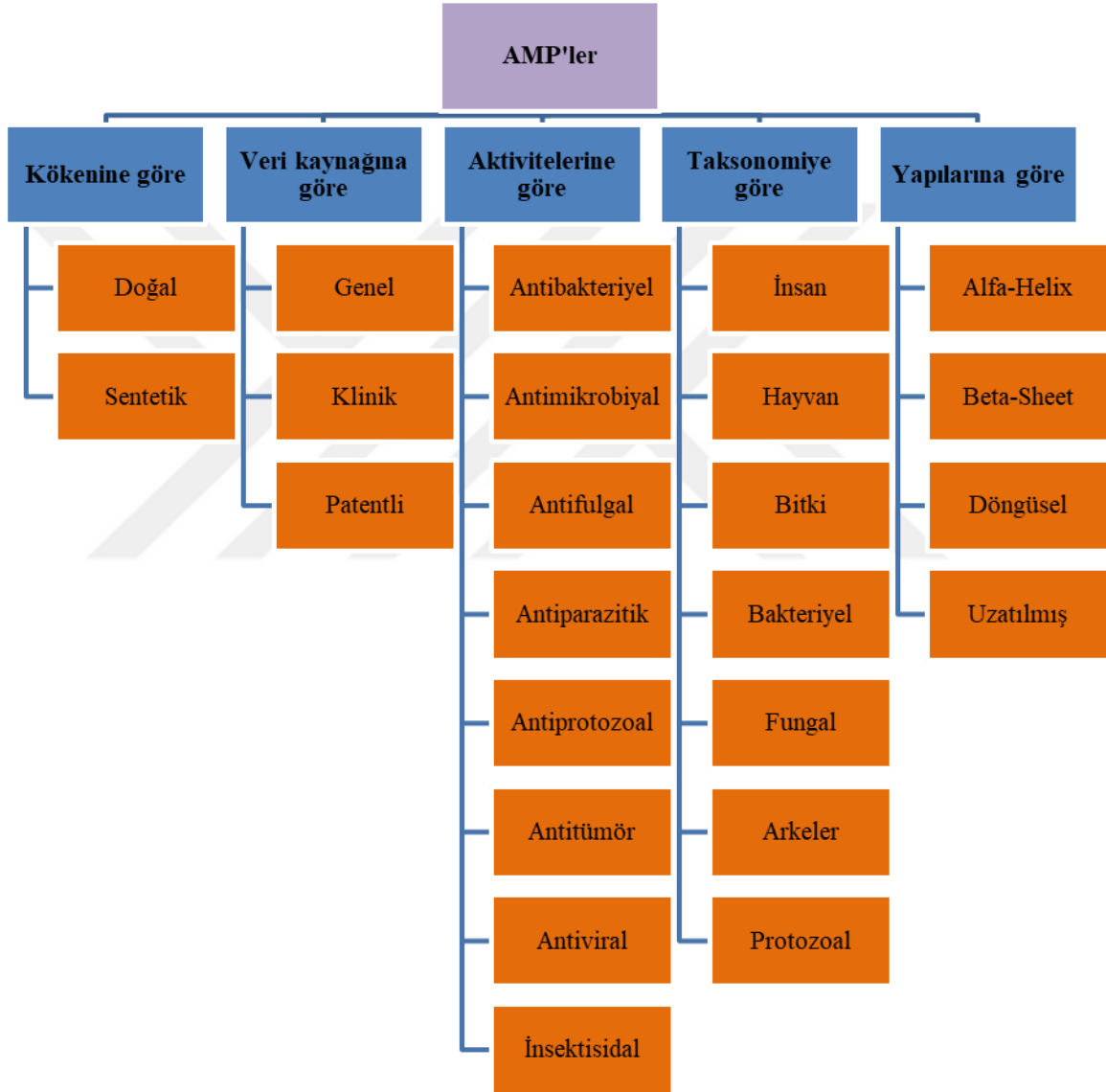
Elektro-eğirme, çapı birkaç mikrometreden nanometrenin altına kadar değişen ultra ince liflerin üretimi için esnek ve ilginç bir teknolojidir (Jiang ve ark., 2018). Elektro-eğirme teknolojisi, ortalama boyut, gözeneklilik ve morfoloji üzerinde hassas kontrole sahip son iskeleyi elde etmek için dolgu maddelerini ve polimerleri işleme tekniğidir (Mochane ve ark., 2019). Eriyik üfleme, zorla eğirme, kendi kendine montaj, şablon sentezi ve elektro-eğirme gibi farklı teknikler, liflerin çapını mikron ile nanometre boyutları arasında değiştirebilir, böylece polimer malzemelerden veya dolgulardan oluşan

ultra ince lifli membranlar üretilebilir. Elektrospinning, küçük ila alt mikron veya nanometre boyutunda, büyük yüzey alanı/hacim oranında, yüksek gözeneklilikte, esneklikte ve çeşitli morfolojik yönelimlerde arıtma gereksinimlerini etkili bir şekilde karşılayabilen çok yönlü arıtma cihazlarından biri olarak ortaya çıkmıştır (Wang ve ark., 2019). Yeterli bir elektrik alanının etkisi altında, polimer veya dolgu çözeltisi şırınga iğnesinden dışarı doğru sıkıştırılır, bir Taylor konisi oluşturulur ve uygun bir mesafede uygun bir zemin toplayıcısına düşer (Mochane ve ark., 2019). Elektro-eğirme işleminde polimer çözeltisinin işlenmesi sırasında nihai işleyiş kabiliyetini etkileyen iç ve dış faktörler vardır. Nem, ilerleme gerilimi, çözeltinin viskozitesi, iletkenlik, polimerlerin ortalama moleküler ağırlığı ve çözücü çözünmesi (çözünürlük parametreleri), elektrospun materyallerin verimini, özellikle de morfolojiyi ve sonuçta ortaya çıkan özellikleri etkiler (Li ve ark., 2018a; Sukigara ve ark., 2003).

2.4. Antimikrobiyal Peptit (AMP)

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili bir savunma mekanizması olarak ön plana çıkmakta ve mikrobiyal yayılımı kontrol altına almak için umut vadeden alternatif ajanlar arasında yer almaktadır. Bu küçük moleküller, özellikle antimikrobiyal direnç (AMR) oluşturan patojenlere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olmaları nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde dikkat çekmektedir (Rios ve ark., 2016; Patrulea ve ark., 2020). Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), aynı zamanda konak savunma peptitleri (HDP'ler) olarak da bilinmekte olup; bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlar dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda doğal olarak bulunurlar. Genellikle 10 ila 50 amino asit kalıntısından oluşmakla birlikte, nadir durumlarda bu uzunluk 100 amino aside kadar çıkabilmektedir. Yapısal olarak çoğu AMP, katyonik karakter (net yükleri genellikle -4 ile +20 arasında değişir) taşımakta ve amfipatik özellikler göstermektedir. Bu özellikler, onların mikrobiyal zarlarla etkileşimini ve antimikrobiyal aktivitelerini belirleyen temel yapısal unsurlardır. Antimikrobiyal peptitlerin keşfi neredeyse bir asır öncesine dayanmaktadır. 1922 yılında Alexander Fleming, tükürük, gözyaşı ve insan idrarında doğal olarak bulunan antibakteriyel özellikteki bir enzim olan lizozimi tanımlamış ve böylece AMP'lerin varlığını ilk kez bilimsel olarak ortaya koymuştur (Fleming, A., 1922). Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), köken aldıkları organizma türüne, üretildikleri veri kaynaklarına, etki gösterdikleri mikroorganizmalara, taksonomik sınıflandırmalarına, konformasyonel

yapılarına ve amino asit içeriklerine göre çeşitli alt kategorilere ayrılabilir. Ancak AMP'lerin sınıflandırılmasında en yaygın yaklaşım, onların ikincil yapısal özelliklerine dayanır. Bu bağlamda AMP'ler genellikle dört temel yapısal aile altında toplanmaktadır: alfa sarmal yapıları, beta tabaka yapıları, döngüsel yapılar ve genişletilmiş konformasyonlara sahip peptitler. Şekil 2.1'de AMP'lerin sınıflandırılması gösterilmektedir.



Şekil 2.1. AMP'lerin sınıflandırılması (Patruela ve ark., 2020)

AMP'ler hem Gram pozitif (Gram (+)) hem de Gram negatif (Gram (-)) bakterilere, ayrıca çeşitli virüs ve mantar türlerine karşı geniş biyolojik aktivite sergilemektedir. Özellikle çoklu ilaç direnci (MDR) geliştirmiş bakterileri hedef alabilme potansiyelleri,

bu moleküllere olan ilgiyi önemli ölçüde artırmıştır (Nutı ve ark., 2017). AMP'lerin antimikrobiyal etkileri çoğunlukla mikrobiyal hücre zarının bütünlüğünü bozma yoluyla gerçekleşir. Bu bozulma, hücre içi veziküllerin ve diğer önemli bileşenlerin dış ortama hızla sızmasıyla birlikte meydana gelir. AMP'lerin patojenlerle etkileşimi, genellikle negatif yüklü mikrobiyal hücre duvarı ile pozitif yüklü peptitler arasındaki elektrostatik çekimle başlar. Bu ilk etkileşimin ardından, peptitler mikrobiyal zarın fosfolipid çift tabakasına ulaşır ve burada kümelenerek çeşitli zar bozulma mekanizmalarını başlatır. Bu mekanizmalar arasında 'agrega', 'toroidal por', 'varil-kama modeli' ve 'halı modeli' gibi yapılar yer almakta olup, tümü hücre zarında geçirgenliğin artmasına ve nihayetinde hücre lizisine neden olur (Ho ve ark., 2016). Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), yalnızca hücre zarında yapısal bozulmalara yol açmakla kalmaz; aynı zamanda sitoplazmik membranı geçerek hücre içine nüfuz edebilir ve burada birikerek çeşitli hücre işlevleri de hedef alabilirler. Bu süreçte AMP'ler, DNA replikasyonunu engelleyebilir, RNA transkripsiyonunu ve protein sentezini bozarak hücre metabolizmasını sekteye uğratar. Bu çok yönlü etki, nihayetinde hücre duvarı bütünlüğünün kaybı ve lizis ile sonuçlanır (Patrulea ve ark., 2020).

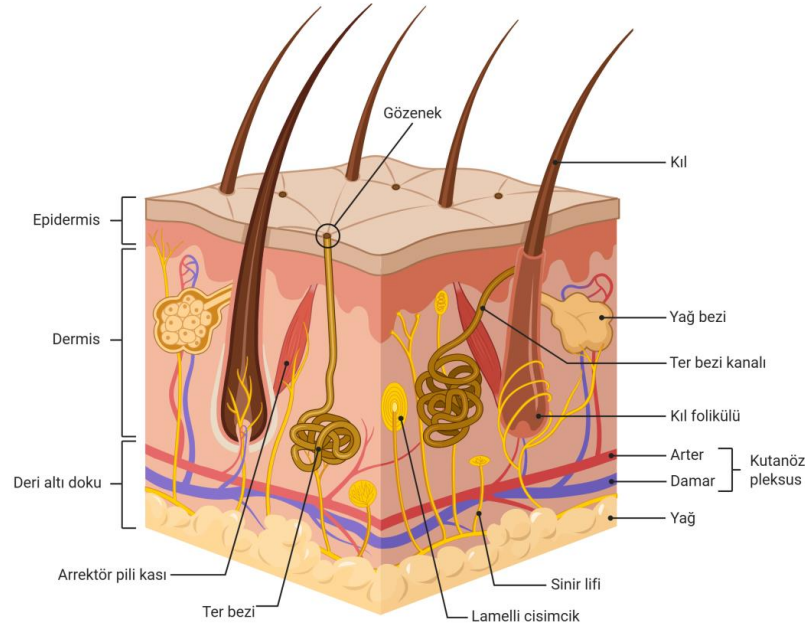
Pek çok antimikrobiyal peptit (AMP), yalnızca mikrobiyal patojenlere karşı savunma sağlamakla kalmayıp aynı zamanda yara iyileşmesi ve anjiyogenez gibi doku rejenerasyon süreçlerini destekleyen biyolojik aktiviteler de göstermektedir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde topikal uygulama sonrasında elde edilen veriler, bu peptitlerin tedavi edici potansiyelini ortaya koymaktadır. Örneğin, klinik araştırmalarda faz II aşamasında değerlendirilen LL-37 peptidinin, dermal hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu ve anjiyogenezini teşvik ederek yara onarım sürecinde önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (Steinstraesser ve ark., 2012). Benzer şekilde, insan beta defensinlerinden hBD-2'nin keratinosit göçünü indüklediği, hBD-3'ün ise *Staphylococcus aureus* ile enfekte diyabetik yara modellerinde (domuz modeli) 10 katlık bir bakteriyel yük azalması sağladığı ve yara kapanma sürecini anlamlı şekilde hızlandırdığı rapor edilmiştir (Kolar ve Dermott, 2011). Ayrıca hem hBD-3 hem de LL-37'nin yalnızca dermal hücreleri değil, aynı zamanda kornea epitel hücrelerini de aktive ederek gelişmiş oküler yüzey iyileşmesini desteklediği bildirilmiştir (Shaykhiev ve ark., 2005). LL-37, hava yolu epitel hücrelerinde de benzer şekilde hücre göçü, çoğalması ve yara kapanması süreçlerini uyarıcı etki göstermektedir (Gomes ve ark., 2017-a).

AMP'lerin klinik uygulamalardaki potansiyellerine rağmen, stabilite sorunları, kısa biyolojik yarı ömürleri ve hedef dışı sitotoksik etkileri, geniş çaplı terapötik

kullanımlarını önemli ölçüde sınırlayan temel engeller arasında yer almaktadır. Bu sınırlamaları aşmak amacıyla, son yıllarda AMP'lerin etkinliğini artırmak ve hedefe yönelik dağıtımını sağlamak için çeşitli stratejiler ve sistemler geliştirilmiştir. Bu bağlamda öne çıkan alanlardan biri de nanoteknolojidir. Nanopartiküller (NP'ler) gibi nanotaşıyıcılar, ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmış yapılar olup, AMP'lerle konjuge edildiklerinde sinerjistik etki sağlayabilirler. Bu konjugasyon, antimikrobiyal peptitlerin biyoaktivitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda hedef bölgede daha yüksek lokal konsantrasyonlara ulaşarak terapötik etkinliği güçlendirir (Pal ve ark., 2019). Ayrıca nanoteknolojik sistemler, AMP'lerin çözünürlüğünü, biyoyararlanımını ve hedef dokuya penetrasyonunu iyileştirme potansiyeline sahiptir. Kontrollü salınım olanağı sunmaları, terapötik sürekliliğin sağlanmasında da önemli bir avantajdır (Bahrami ve ark., 2020; Borro ve Malmsten, 2019). Bununla birlikte, nanoparçacıklar AMP'leri çevresel koşullarda karşılaşılabilecekleri enzimatik degradasyon gibi olumsuz etkilerden de koruyabilir, böylece peptitlerin stabilitesini artırarak biyolojik ortamlarda daha uzun süre etkili kalmalarına olanak tanır (Gomes ve ark., 2017-a).

2.5. 3B İnsan Cildi Mimarisi

Cilt, insan vücudunun en büyük organıdır. Dış çevre ile iç organlar arasında bir bariyer oluşturur. Ayrıca deri, vücudu sıvı kaybından, çevresel etkilerden, yaralanmalardan ve enfeksiyonlardan korur ve vücut sıcaklığının düzenlenmesine yardımcı olur (Proksch ve ark., 2008). Bu amaçla cilt üç katmandan oluşmaktadır. İnsan derisi *in vivo* gibi üç tipik katmana ayrılabilir. Bunlar: epidermis, dermis ve deri altı dokusudur. Şekil 2.2'de insan canlı doku katmanları sırasıyla gösterilmektedir.



Şekil 2.2. İnsan derisinin epidermis, dermis ve deri altı doku olmak üzere canlı dokudaki yapısı (<https://Biorender.com>).

2.5.1. Epidermis

Epidermis, insan derisinin en dış tabakasıdır ve kalınlığı 0,4 ila 1,5 mm arasında değişmektedir. Bu tabaka cildin temel işlevlerini yerine getirerek, vücudu mekanik hasarlardan ve çevreden gelen çözünebilir maddelerin girişinden korur, aynı zamanda su kaybına karşı bariyer görevi görür. İnsan epidermal keratinositleri (hEK), epidermal hücrelerin en az %80'ini oluşturur. Bu ektodermal hücreler, 30'dan fazla farklı keratin içeren oldukça yapılandırılmış protein filamentleri ile karakterize edilen komşu hücrelerle desmozomlar veya modifiye edilmiş desmozomal bağlantılar oluşturur (Haake, A. R., 1999; Molly ve ark., 1982). Bazal keratinositler, dermal-epidermal birleşim noktasındaki bazal membran üzerinde yer alır ve saç folikülü kök hücre bölgesinde sınırsız çoğalma potansiyeline sahip epidermal kök hücrelerden türetilir (Taylor ve ark., 2000; Watt, F. M., 2002). Bu bazal keratinositler, histolojik kesitlerde oldukça düzenli bir palizat yapısı olarak görünür ve hücreler arası bağlantılar, yani sıkı bağlantılar yoluyla epidermal bariyeri oluşturur (Furuse ve ark., 2002).

2.5.2. Dermis ve deri altı doku

Epiderminin altında dermal-epidermal birleşim yeri veya bazal membran, epidermis ile dermis arasındaki arayüzü oluşturur. Bazal membranın başlıca bileşenleri tip IV kollajen (Kefalides, N. A., 1973; Briggaman ve Wheeler Jr., 1975; Briggaman, R. A., 1982; Sage, H., 1982), laminin (Beck ve ark., 1990) ve fibronektin (Laurie ve ark., 1983) gibi glikoproteinler ve proteoglikan heparan sülfattır (Schleicher ve ark., 1989). Bu yapı dışı doğru gelen kesme kuvvetlerine direnç gösterir, büyümenin polaritesini belirler ve yarı geçirgen bir bariyer görevi görür. Keratinositler bazal membrana hemidesmozom-bağlayıcı filament kompleksleri aracılığıyla bağlanır.

Altındaki dermis, sınırları, kan damarı ağını ve epidermal uzantıları içeren lifli, filamentli ve amorf bağ dokusu sistemidir. Dermis iki katmana ayrılır: üstteki papiller dermis, epidermise dallanır ve dermal papillalar aracılığıyla onun konturlarına uyum sağlar; Bu yapı, epidermis-dermis birleşiminin yüzey alanını artırarak mekanik mukavemete katkıda bulunur (Haake, A. R., 1999). Altındaki retiküler dermis, dermisin çoğunluğunu oluşturur ve tip I ve III kolajen ve elastik liflerden oluşan yoğun bir kolajen lif ağı aracılığıyla elastikiyet sağlar (Burgeson, R. E., 1982). Mezenkimal kökenli insan dermal fibroblastları (hDF'ler), dermisteki baskın hücre tipidir; Bu hücreler papiller dermiste retiküler dermistekinden daha yüksek yoğunluklarda bulunur ve daha yüksek çoğalma oranlarına sahiptir (Harper ve Grove, 1979). hDF'ler dokular içerisinde göç eder ve sürekli bir kolajen yeniden şekillendirme aktivitesi ile karakterize edilirler; Mevcut kolajen liflerini parçalayıp yeni lifli veya liffsiz matris proteinleri sentezlerler, böylece yapısal bir hücre dışı matris iskeleti sağlarlar (Haake, A. R., 1999). Miyofibroblastlar, düz kas hücrelerine benzer şekilde davranan ve yara iyileşmesi gibi durumlarda matris kasılmasından sorumlu olan bir hDF alt türüdür (Gabbiani ve ark., 1982). Dermal dendritik hücreler (Headington ve Cerio, 1990), mast hücreleri ve farklılaşmış kan monositlerinden türetilen makrofajlar gibi yerleşik bağışıklık-yetenekli hücreler, ciltteki bağışıklık tepkisine katkıda bulunur. Bu hücreler, doku yeniden şekillenmesinden yara iyileşmesine kadar çeşitli süreçlerde yer alır (Lasser, A., 1983) ve ayrıca sitokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak diğer cilt hücrelerini uyarır ve düzenler (Haake, A. R., 1999).

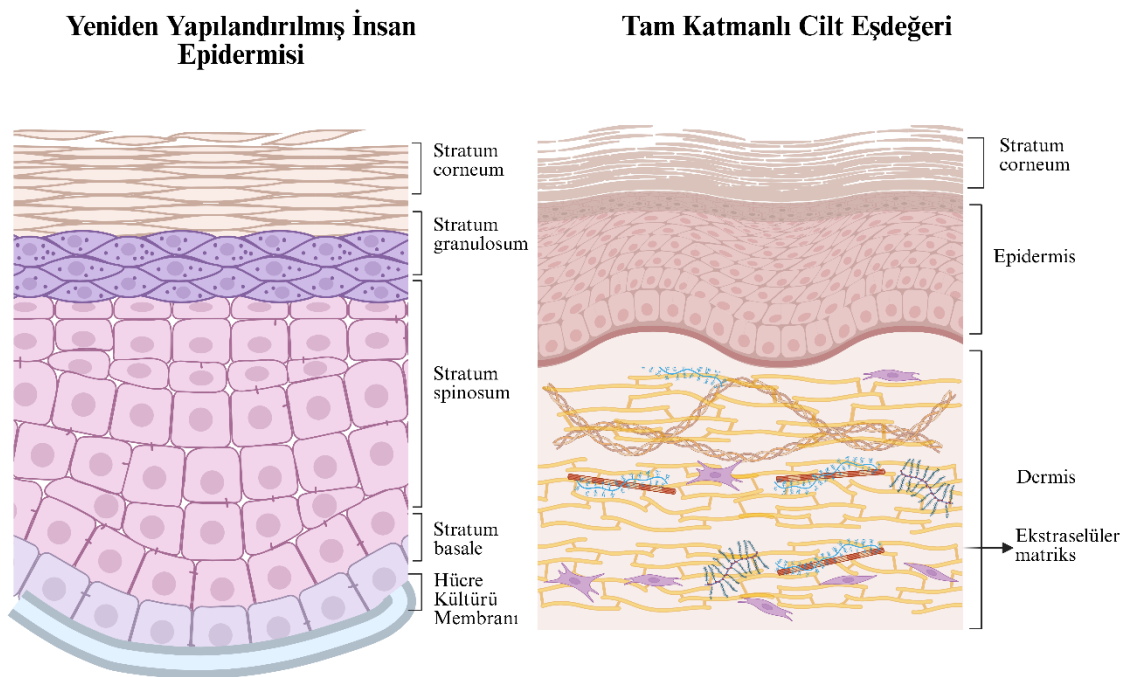
Deri altı dokusu veya hipodermis, insan derisinin en alt tabakasını oluşturur. Mezenkimal kökenli yağ hücreleri, vücuda ısı yalıtımı sağlayan, cildi yastıklayan ve enerji rezervi görevi gören deri altı yağ dokusunu oluşturur (Haake, A. R., 1999).

2.6. 3B Cilt Modelleri

Cilt, potansiyel olarak zararlı mikrobiyal, termal, mekanik ve kimyasal etkilerin ilk temas noktasıdır ve farklı farmakolojik ve kozmetik bileşiklerin hedefidir. Bu nedenle ciltle temas eden kimyasalların risk ve etkinliğinin değerlendirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Bu nedenle, *in vitro* üretilen organ benzeri deri ikameleri artan bir ilgi kazanmıştır. (Reuter ve ark., 2017). Geçtiğimiz 30 yıl içinde farklı yeniden yapılandırılmış deri eşdeğerleri geliştirilmiştir (Coquette ve ark., 1999; MacNeil, S., 2007; Rheinwald ve Green, 1977). Bu deri ikameleri, doğal derinin hücresel ve yapısal özelliklerini taklit eder (Groeber ve ark., 2011) ve bu nedenle tüketici ürünü testleri için önemli modeller olarak hizmet eder (Ponec, M., 2002). Ayrıca, bu *in vitro* cilt modelleri dermatolojik araştırmalarda yara iyileşmesi (Rossi ve ark., 2015), yaşlanma (Pageon ve ark., 2014), bulaşıcı hastalıklar (MacNeil S., 2007; Green ve ark., 2004; Jannasch ve ark., 2015), cilt kanseri (Commandeur ve ark., 2012) ve cilt biyolojisi (Gschwandtner ve ark., 2012) üzerine çalışmalar yapmak için kullanılabilir. İnsan hücreleri kullanıldığından, yüksek oranda tekrarlanabilir deri ikameleri *in vitro* olarak büyük miktarlarda üretilebilmekte ve daha iyi öngörülebilirlik sunmaktadır. Böylece hayvan modelleri ile insan koşulları arasındaki tür farklılıklarından kaynaklanan deneysel yanlış yorumlamalar en aza indirilebilir. Ayrıca, deri eşdeğerleri hayvan çalışmaları üzerinde değiştirme, azaltma ve iyileştirme kavramını uygular (3R ilkesi).

Deri mühendisliği genellikle derinin karmaşık yapısını basitleştirerek, onu tek veya çift bölmeli bir organizasyona indirgeyerek başlar. En basit *in vitro* deri eşdeğeri, yeniden yapılandırılmış insan epidermisi (RHE) veya epidermal modeldir. Genellikle bazal membranın yerini alan bir kolajen iskelet üzerinde yetiştirilen neonatal sünnet derisi hücrelerinden (hEC'ler) oluşur. Kültür sırasında hücreler kalsiyum gradyanları ve havasız arayüzünün tetiklediği bir farklılaşma sürecinden geçerler. RHE, geliştirmesi ve kullanımı kolay, yüksek maliyet etkinliğine sahip, yüksek standardizasyon derecesine sahip ve büyük miktarlarda üretilebilir bir modeldir. RHE modelleri, daha karmaşık cilt modellerine kıyasla üretimi nispeten basit olduğundan, cilt tahrişi veya aşınması çalışmalarında yaygın olarak kullanılır; Bu modellerden bazıları, OECD'nin *in vitro* cilt aşınma testleri için 431 numaralı Kılavuzuna (OECD. Test No. 431) ve *in vitro* cilt tahriş testleri için 439 numaralı Kılavuzuna (OECD. Test No. 439) göre Avrupa Birliği tarafından doğrulanmıştır. Hücreler ilerledikçe, palizat bazal tabaka (SB) ve ardından

sırayla stratum spinosum (SS), stratum granulosum (SG) ve stratum corneum (SC) olmak üzere tipik bir epidermal yapı oluştururlar. Ancak bu RHE modelleri hala insan derisinin en dış tabakasını taklit etmekte ve alttaki ECM ile hücrel etkileşimlerden yoksundur. İnsan derisini daha iyi taklit edebilmek için dermisi temsil eden ikinci bir bölme entegre edilerek tam kalınlıkta deri eşdeğeri (FTSE) oluşturulabilir. Tam kalınlıkta deri eşdeğerleri (FTSE), fibroblastların yerleştirildiği ekstraselüler matrisi (ECM) taklit eden doğal veya yapay bir iskele üzerine inşa edilen dermis tarafından genişletilir (Brohem ve ark., 2011). Şekil 2.3'te RHE ve FTSE modellerinin şematik gösterimi verilmektedir.



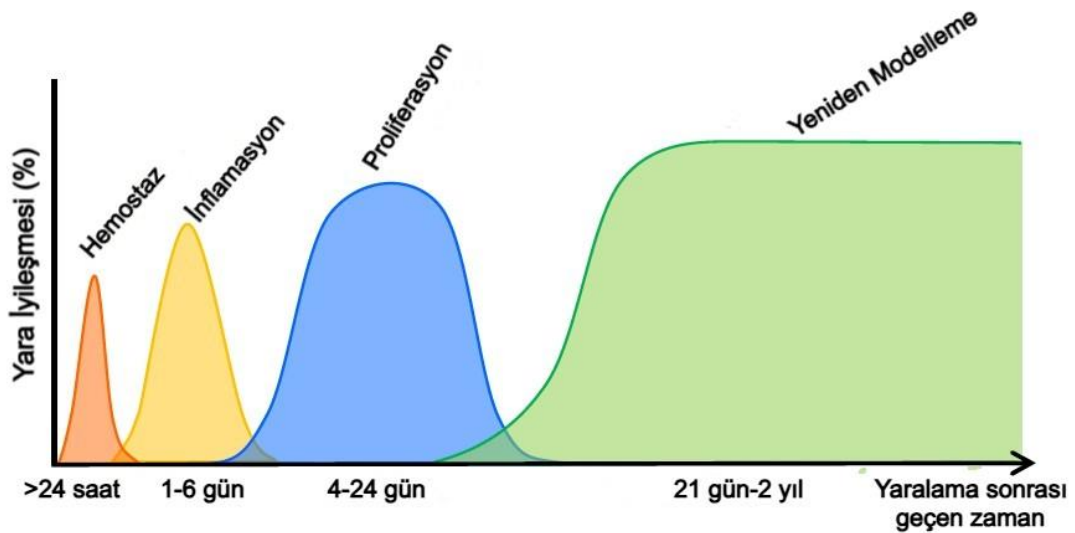
Şekil 2.3. RHE ve FTSE modellerinin şematik gösterimi (<https://Biorender.com>)

2.6.1. 3B Cilt yara modeli

Vücudun en büyük organı olan cilt, duyuşsal fonksiyonları gerçekleştirir. Fiziksel veya kimyasal tehlikelere karşı savunma sağlar ve homeostazini kontrol eder. Ancak hasar görmüş cilt bu önemli görevleri yerine getiremez, bu durum enfeksiyon ve sıvı kaybı gibi sorunlara neden olabilmektedir (Moulin ve ark., 2000; Xie ve ark., 2010). Yara onarımı ve cilt fonksiyonu ile bütünlüğünün korunmasının altında yatan biyolojik

süreçlere ilişkin mevcut anlayışımız sınırlıdır. Bu bilgi eksikliğinin bir kısmı temel cilt araştırmaları için uygun *in vitro* ve *ex vivo* modellerin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, insan derisinin onarımı ve yenilenmesine ilişkin anlayışımızı ilerletmek için gelişmiş modellerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Gottrup ve ark., 2000).

Yaralanan cilt kendini yenileme mekanizmasına sahiptir ve yaralanma sonrası yara iyileşme süreci 4 aşamadan oluşur. Hemostatik faz yaralanmadan hemen sonra başlar. Kan yarayı doldurur ve toplanan trombositler ve kırmızı kan hücreleri pıhtı oluşturarak kanamayı durdurur ve yara iyileşme sürecinin bir sonraki adımı için geçici bir matris oluşturur. Daha sonra inflamasyon fazında yara ortamındaki hasarlı hücreler ve dokular temizlenir. Proliferatif faz, hücrelerin yaraya göç etmesini ve yeni hücre dışı matrisin üretilmesini içerir ve bu da yaranın kapanmasına yol açar. Bu durum, yara ortamındaki kolajen ve glikozaminoglikanlar gibi ECM ürünlerinin ve hücre sayısının artmasını sağlar. Son olarak fibroblastların ürettiği doku yeniden modelleme aşamasında olgunlaşır. Yaraların düzgün ve tam olarak kapanması ve iyileşmesi için farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimler kritik öneme sahiptir. Özellikle fibroblastlar yani bağ dokusu hücreleri ile keratinositler arasındaki etkileşim çok önemlidir (Deshayes ve ark., 2018). Şekil 2.4'te hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme yara iyileşmesinin zamansal evreleri gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Yara iyileşmesinin zamansal evreleri: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme

Hemostaz evresi, dokuda kan damarlarının hasarıyla ortaya çıkar. Cilt yaralarının iyileşmesinin ilk aşamasında, kan pıhtılaşması kan pıhtısının oluşumunu teşvik eder, böylece kanamayı önlemek ve hücre istilası için geçici bir matris sağlamak üzere hemostazı geri kazandırır (Singer ve Clark., 1999). Kan pıhtısı, damar düz kas hücrelerinin geçici kasılmasıyla (vazokonstriksiyon) birlikte kan kaybını sınırlar ve pıhtılaşma kaskadını harekete geçirir. Trombinin fibrinojeni parçalaması sonucu oluşan çapraz bağlı fibrin lifleri, plazma fibronektini, vitronektini ve trombospondin ile birlikte kan pıhtısının çoğunluğunu oluşturur. Trombositler fibrin pıhtısı içinde sıkışır ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi çeşitli araçlar salgılar (Velnar ve ark., 2009; Moulin, V., 1995; Clark, R. A. F., 1999; Barrientos ve ark., 2008), dolaşan iltihaplı hücreleri harekete geçiren ve yara bölgesinde lokal deri hücresi tepkilerini uyaran kemotaktik ipuçları sağlar (Clark, R. A. F., 1999).

Klasik ve alternatif tamamlayıcı kaskadların başlatılması, inflamatuvar fazın başlangıcını ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktive olmasını haber verir. Üretilen anafilatoksinler damar geçirgenliğini artırır ve monositleri ve nötrofilleri yara ortamına sızmaya çeker (Clark, R. A. F., 1999). Yara bölgesine ulaştıklarında nötrofiller, proteolitik enzimler ve serbest radikaller salgılayarak yabancı parçacıkları, bakterileri ve hasarlı dokuyu tüketen ilk hücrelerdir (Tonnesen ve ark., 1988). Fagositoz ve debridman süreçleri ayrıca, yaklaşık 48 saat sonra ortaya çıkan ve nötrofillerden daha uzun bir ömre sahip olan aktive edilmiş monosit kökenli makrofajlar tarafından da desteklenir (Velnar ve ark., 2009). Makrofajlar patojenleri, doku artıklarını ve inaktif nötrofilleri fagosite eder (Clark, R. A. F., 1999) ve çeşitli kemokinler sağlayan temel düzenleyici hücreler olarak görev yapar.

Endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler gibi doku hücreleri, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Moulin ve ark., 2000; Barrientos ve ark., 2008; Rappolee ve ark., 1988), fibroblast büyüme faktörü ailesi (Moulin ve ark., 2000; Clark, R. A. F., 1999; Rappolee ve ark., 1988), vasküler endotel büyüme faktörü (Barrientos ve ark., 2008; Nissen ve ark., 1998; Tsirogianni ve ark., 2006), dönüştürücü büyüme faktörü α ve β (Moulin ve ark., 2000; Clark, R. A. F., 1999; Tsirogianni ve ark., 2006), insülin benzeri büyüme faktörü (Moulin ve ark., 2000), epidermal büyüme faktörü (Moulin ve ark., 2000; Rappolee ve ark., 1988; Schultz ve ark., 1991; Cohen ve Elliott, 1963) ve tümör nekroz faktörü α gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve interlökinler 1 ve 6 (Moulin ve ark., 2000; Kishimoto, T.,1989) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasıyla aktive edilir ve

granülasyon dokusunun oluşumunu başlatır (Singer ve Clark, 1999). Son olarak, lenfositler yaralanma bölgesine çekilir ve bağışıklık tepkisinin adaptif fazı başlatılır (Tsirogianni ve ark., 2006; Martin ve Muir, 1990; Schäffer ve Barbul, 1998).

Bağışıklık tepkisi başarıyla tetiklendiğinde, akut yaralar doku onarımına doğru kayar (Velnar ve ark., 2009). Şiddetli iltihap durumlarında veya bağışıklık sisteminin etkinleşmesinde başarısızlık durumunda, deri hücrelerinin uyarılmasında önemli rol oynayan önemli büyüme faktörleri ve sitokinler eksik kalır ve yaralar kronikleşebilir. Üçüncü aşama olan proliferasyonda, hDF'ler yara boşluğuna göç eder, çoğalır ve geçici fibrin matrisini parçalamaya başlar, onu yeniden şekillendirir ve onu tip I ve III prokollajenler, hyaluronik asit, fibronektin ve proteoglikanlara dayalı yeni sentezlenmiş bir ekstraselüler matrisle değiştirir (Velnar ve ark., 2009; Moulin ve ark., 2000). Miyofibroblast fenotiplerini değiştirerek yarayı aktif olarak kasmaya, yara kenarlarına yaklaşmaya ve geçici bir kan pıhtısı yerine granülasyon dokusunun oluşumuna katkıda bulunmaya başlarlar (Gabbiani ve ark., 1972; Majno ve ark., 1971). Yaralanmaya, inflamasyona (Velnar ve ark., 2009; Moulin ve ark., 2000; Clark, R. A. F., 1999) ve hipoksik koşullara (Nissen ve ark., 1998; Hunt ve ark., 1967; Shweiki ve ark., 1992) ve laktat birikimine (Clark, R. A. F., 1999; Hunt ve ark., 2008; Porporato ve ark., 2012) yanıt olarak, bağışıklık hücreleri ve çevreleyen doku hücreleri, yerleşik insan dermal mikrovasküler endotel hücreleri (hmvEC) çeken anjiyojenik kemokinler salgılar. Bu endotel hücreleri çoğalmaya başlar ve ana damardaki bazal membranı parçalamak için proteazlar üretir. Kılcal damarlar, çevredeki hasarsız dokudan yaraya doğru uzanır, dallanır ve uçlarında birleşerek kılcal halkalar oluşturur ve yaranın içinde oksijen ve besin taşıyan bir mikro vasküler pleksus oluşturur (Moulin ve ark., 2000; Clark, R. A. F., 1999).

Yara iyileşmesinin son evresi yeniden modelleme, yalnızca ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden yapılandırılmasıyla sınırlı kalmaz; aynı zamanda yeni oluşan epidermal tabakanın ve damar yapılarının olgunlaşmasıyla birlikte kalıcı skar dokusunun gelişimini de meydana getirir. Bu süreç, özellikle geniş çaplı yaralanmalarda, genellikle yara kenarlarında başlar. Dolayısıyla, kenar bölgelerdeki ECM'nin yapısı ve kalitesi, merkez bölgeye göre anlamlı biçimde farklılık gösterebilir. Başlangıçta ECM'de bulunan geçici yapılar (örneğin fibronektin ve hyaluronik asit) zamanla ortadan kalkarken (Clark, R. A. F., 1999), kollajen lifleri büyür, daha belirgin yönelimler kazanır. İlk evrelerde baskın olan tip III kollajenin yerini, çapraz bağ oranı daha yüksek olan tip I kollajen alır (Moulin ve ark., 2000). Bu değişim, yaranın gerilme dayanımında gözle görülür bir artışa neden olur ve bu direnç, sağlıklı deri dokusunun yaklaşık %80'ine kadar ulaşabilir

(Velnar ve ark., 2009; Levenson ve ark., 1965). Zaman ilerledikçe damar oluşumu yavaşlar, hücrel aktivite giderek azalır; hDF'ler, makrofajlar ve hmvEC'ler apoptoz ile ortamdan çekilir. Nihayetinde, hücrel yoğunluğu azalmış, kalıcı bir yara izi şekillenir. Bu yeniden yapılanma süreci oldukça yavaş seyretmekle birlikte, ECM'deki dönüşüm yıllar sürebilir (Clark, R.A.F., 1999).

In vivo modellerin aksine, *in vitro* test sistemleri ve *in vitro* yara modelleri; daha sade, düşük maliyetli ve kolay standartlaştırılabilen deney ortamlarının oluşturulmasına olanak tanır. Bu sistemler sayesinde, tek ya da çok hücreli kültürlerle yürütülen çalışmalar, belirli bir bileşimin etki mekanizmasını araştırmak açısından *in vivo* yöntemlere kıyasla daha pratik bir yol sunar. Ayrıca, *in vivo* sistemlerde sıkça karşılaşılan doğal biyolojik heterojenlikten bağımsız olarak, çeşitli konsantrasyonların eş zamanlı test edilmesi mümkündür. Bu durum, etki analizlerinin daha kontrollü ve tekrarlanabilir koşullar altında gerçekleştirilmesine katkı sağlar (Gottrup ve ark., 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

3.1.1.1. NP üretiminde kullanılan cihazlar

Ultrasonik homojenleştirici (Bandelin GM 3200, 200 W, 20 kHz, KE 76 prop), Santrifüj (NF800R, Nüve), Ultrasonik banyo (180 W, ISOLAB Laborgeräte GmbH), İnkübatörlü çalkalayıcı (Unimax 1010 & Incubator 1000, Heidplph Persia), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (GeminiSEM 500, ZEISS), Floresans mikroskop (Zeiss Primovert), Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (IRTracer-100, Shimadzu), Hassas terazi (Explorer EX224/AD, Ohaus), Ultra saf su cihazı (Millipore UV Water Purification, Merck), Liyofilizatör (Hypercool HC-4110, Gyrozen), Zeta Sizer (Nanoplus 3, Micromeritics), Manyetik karıştırıcı (MSH-20A, Daihan), Vorteks (MaXshake VM30, Daihan) kullanılmıştır.

3.1.1.2. Fiber üretiminde kullanılan cihazlar

Hassas terazi (Explorer EX224/AD, Ohaus), Manyetik karıştırıcı (MSH-20A, Daihan), Elektro-eğirme cihazı (el yapımı) kullanılmıştır.

3.1.1.3. Cilt modeli geliştirmek için kullanılan cihazlar

Biyogüvenlik kabini, santrifüj cihazı, CO₂'li inkübatör, UV/Vis Spektrometre (Multiskan SkyHigh Microplate UV/Vis Spectrophotometer, Thermofisher) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

3.1.2.1. NP üretiminde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kitosan (CS) (mw: 50,000-190,000 Da, Sigma Aldrich), Sodyum tripolifosfat (TPP) (Sigma Aldrich), Ultra saf su, Asetik asit (Glacial, %100, Merck), Tween 80 (Sigma Aldrich), NaCl, 1M Sodyum hidroksit (NaOH), 1M Hidroklorik asit (HCl), Antimikrobiyal peptit LL-37(LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) (Qyabio), Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (Invitrogen), Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo) kullanılmıştır.

3.1.2.2. Fiber üretiminde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Poli-ε-Kaprolakton (PCL) (Mw: 80,000 Da, Sigma Aldrich), Jelatin (Jel) (200 Bloom, Sigma Aldrich), 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (abcr) kullanılmıştır.

3.1.2.3. Cilt modeli geliştirmek için kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

RHE modeli için gerekli malzemeler; Keratinosit (HS2) hücre kültürü, Dermal basal cell medium (ATCC), Dermal basal cell medium ek kit (ATCC), FBS (Gibco), Antibiyotik (Amphotericin B), % 0.05-Tripsin, Fosfat tamponlu salin (PBS), 12 kuyulu plaka, 24 kuyulu plaka, 12 kuyulu plaka için insert (Cellquart), 24 kuyulu plaka için insert (Sarstedt), hücre kültür flask (Nest) kullanılmıştır.

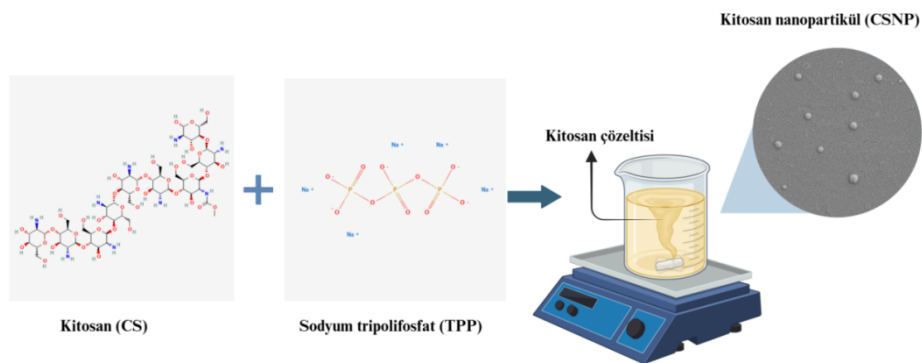
FTSE modeli geliştirmek için; Keratinosit (HS2) hücre kültürü, Fibroblast (HDF) hücre kültürü, Dermal basal cell medium, Dermal basal cell medium ek kit, Fibroblast büyüme medium (FGM), Fetal Bovin Serum (FBS), Antibiyotik (Amphotericin B), Tip-1 sıçan kuyruğu kolajeni (Gibco), 5X rekonstrüksiyon buffer (5XRB), Tripsin-EDTA, PBS, 12 kuyulu plaka (SP Life Science), 12 derin kuyulu plaka (Grainer), hücre kültür flask (Nest), 12 kuyulu hücre kültür insert, 0.4 µm (Cellquart) kullanılmıştır. Ayrıca hücreleri çoğaltmak ve üç boyutlu modellerin değerlendirilmesi için 4.5 g/L glukoz ve L-glutamin içeren, sodyum pirüvat içermeyen 1X Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza), Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (Serena), EpiLife Medium 60 µM kalsiyumlu (Gibco), Tripsin EDTA %0.05 (1X) (Serena), Hematoksilin ve Eozin Boyama Kit (Abcam), Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich), DAB

Substrate Kit (Thermo Scientific), Gentamisin (Sigma Aldrich), L-Askorbik Asit (Sigma Aldrich), HEPES (1M) Buffer Solution (Gibco), Heparin solüsyonu %0,2 (Stemcell), Hidrokortizon (Stemcell), 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich), Rodamin (Sigma Aldrich), Rodamin Faloidin (Invitrogen), StemPro Accutase (Gibco), XTT (Hücre Proliferasyon Kit, Serva), MTT (Sigma Aldrich), İzopropanol (Honeywell), DMSO (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. İmmüno histokimya analizi için; PBS, %4 paraformaldehit, %1 BSA, %0,5 Triton X-100, DAB Substrate kit(Thermo Scientific), Stable peroxide substrate buffer (1X)(Thermo Scientific), Laminin monoclonal antibody (1:100)(Invitrogen), Involucrin monoclonal antibody (1:100)(Invitrogen), Cytokeratin 10 monoclonal antibody (1:100)(Invitrogen), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody-HRP conjugate (Invitrogen), Goat anti-Mouse IgG (H+L) secondary antibody (Invitrogen) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İyonik jelasyon yöntemiyle boş CSNP'lerin hazırlanması

İlk aşamada optimizasyon amacıyla farklı CS ve farklı sodyum TPP konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı. Şekil 3.1'de boş kitosan nanopartikül (CSNP) üretiminin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3.1. CSNP üretiminin şematik gösterimi (<https://Biorender.com>)

Tüm deney gruplarında CSNP'ler iyonotropik jelasyon yöntemiyle üretildi. CSNP-1 ve CSNP-2 grubunda CS konsantrasyonu 0,7 mg/mL, TPP konsantrasyonu 0,3 mg/mL'dir.

CSNP-3 ve CSNP-4 grubunda CS konsantrasyonu 0,3 mg/mL, TPP konsantrasyonu 0,1 mg/mL'dir. CS:TPP hacim oranları 2:1'dir. Çizelge 1'e göre CSNP-2 ve CSNP-4 için 100 mM NaCl çözeltileri kullanılırken CSNP-1 ve CSNP-3 için Tween 80 solüsyonu kullanıldı. CS (%1 v/v) asetik asit çözeltisinde, TPP ise ultrasaf suda 24 saat boyunca çözdürülerek hazırlandı. Çözeltilerin pH seviyeleri NaOH (1 M) veya HCl (1 M) ilave edilerek ayarlandı. TPP solüsyonu oda sıcaklığında CS:TPP (2:1) oranına göre 500 rpm'de manyetik karıştırma altında CS solüsyonuna bir şırınga ile damla damla ilave edildi. Karışım ortam sıcaklığında 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışmaya devam etti. CSNP çözeltisi santrifüj öncesi ultrasonik homojenizatörde karıştırıldı. Karışım halinde olan çözelti 4 °C'de 40 dk boyunca ve 14000 rpm'de santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatant atılarak pellet toplandı (Agarwal ve ark., 2018; Fahimirah ve ark., 2021; Rashki ve ark., 2022). CSNP üretim parametreleri Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. CSNP optimizasyonu için deney gruplarında belirlenen parametreler

Gruplar	CS (mg/mL, pH 5)	TPP (mg/mL, pH 2)	CS/TPP (v/v)	NaCl (mM)	Tween80
CSNP-1	0,7	0,3	2:1	-	+
CSNP-2	0,7	0,3	2:1	100	-
CSNP-3	0,3	0,1	2:1	-	+
CSNP-4	0,3	0,1	2:1	100	-

CSNP-1, CSNP-2, CSNP-3 ve CSNP-4 üretiminde ortama eklenen NaCl/tween 80 çözeltisinin varlığında partikül boyut optimizasyonu için sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.2.1.1. İyonik jelasyon yöntemiyle LL37-CSNP'lerin hazırlanması

CSNP optimizasyon süreci sonucunda CSNP-1 (CS:TPP-0,7:0,3) parametreleri belirlenerek LL37-CSNP üretim sürecine geçildi. Asetonitril-su çözeltisi içerisinde 1 mg/ml nihai konsantrasyonda çözünmüş antimikrobiyal peptit (AMP) LL-37 çözeltisi hazırlandı. CS (%1 v/v) asetik asit çözeltisinde, TPP ise ultrasaf suda 24 saat boyunca çözdürülerek hazırlandı. Çözeltilerin pH seviyeleri NaOH (1 M) veya HCl (1 M) ilave edilerek ayarlandı. 24 saat sonra CS çözeltisine LL37 çözeltisi 0,5 mL/dk akış hızında şırınga pompası aracılığıyla damla damla eklenerek +4°C'de 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışması sağlandı. Ardından TPP solüsyonu +4°C'de CS:TPP (2:1)(v/v) oranında, 0,25 mL/dk akış hızında şırınga pompası aracılığıyla damla damla eklenerek

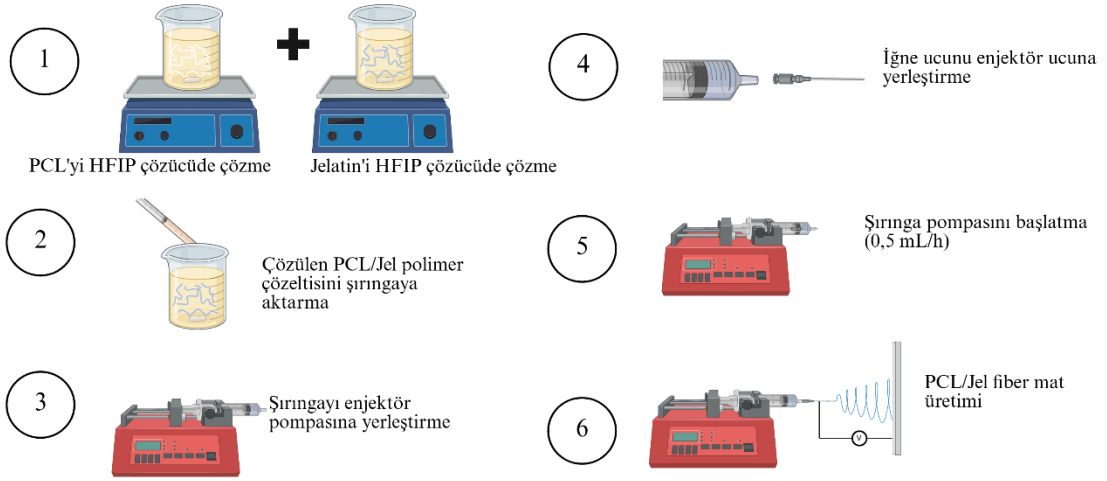
manyetik karıştırıcıda 4 saat boyunca karışması sağlandı. LL37-CSNP çözeltisi santrifüj öncesi ultrasonik homojenizatörde karıştırıldı. Daha sonra çözelti 40 dk boyunca ve 14000 rpm seviyelerinde santrifüjlendi. Ependorf santrifüj tüplerdeki pellet üzerindeki süpernatantlar Micro BCA ile enkapsülasyon verimi analizi için toplanarak -20°C’de muhafaza edildi. Pelletler liyofilizasyon işlemi öncesi ilk 24 saat -20°C’de ardından -80°C’de muhafaza edildi. Liyofilizasyon için hazır hale getirilen pelletler 24 saat boyunca -110°C’de dondurularak kurutuldu (Agarwal ve ark., 2018; Fahimirah ve ark., 2021; Rashki ve ark., 2022). Çizelge 3.2’ye göre LL37-CSNP üretimini için gerekli çözelti konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 3.2. LL37-CSNP üretiminde çözelti konsantrasyonları

LL37-CSNP üretiminde kullanılan çözeltiler	Konsantrasyon
CS	0,7 mg/mL
TPP	0,3 mg/mL
LL-37	30 µg/mL / 15 µg/mL / 7,5 µg/mL

3.2.2. Elektro-eğirme yöntemiyle PCL/Jel fiber mat hazırlanması

PCL ve Jel çözeltisinin konsantrasyonu sırasıyla %8 (a/h) ve %8 (a/h) olarak hesaplandı. Elektro-eğirme için parametreler 14 kV’a ayarlanmış yüksek voltajlı güç kaynağı, uçtan toplayıcıya mesafe 12,5 cm ve akış hızı 0,5 mL/saat ile gerçekleştirildi. PCL/Jel (60:40) çözeltisini hazırlamak için 240 mg PCL, 3 mL HFIP çözücüsünde 24 saat boyunca oda sıcaklığında 800 rpm hızında manyetik karıştırıcıda karışması sağlandı. Benzer şekilde, 160 mg jelatin, 2 mL HFIP çözücüsünde 24 saat boyunca oda sıcaklığında 800 rpm manyetik karıştırıcıda karışması sağlandı. Daha sonra çözünmüş haldeki PCL ve Jel çözeltileri oda sıcaklığında 800 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıda 4 saat boyunca karışması sağlandı (Zhang ve ark., 2005; Farzamfar ve ark., 2020; Zahiri ve ark., 2020). Şekil 3.2’de PCL/Jel kompozit fiber üretiminin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3.2. PCL/Jel kompozit fiber mat üretiminin şematik gösterimi (<https://Biorender.com>).

3.2.2.1. LL37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel fiber mat üretilmesi

Üretilen PCL/Jel (60:40) fiber mat örnekler 6 mm çapında dairesel diskler kesilerek hazırlandı. Ependorf tüpte 1 mL ultra saf su içerisinde 1 mg liyofilize haldeki LL37-CSNP çözülmesi sağlandı. 1 mg/mL konsantrasyondaki LL37-CSNP çözeltisinden 25 μ L disk üzerine damlatılarak LL37-CSNP emdirilmiş fiber mat örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.2.3. CSNP'lerin fiziko kimyasal ve biyolojik karakterizasyon testleri

3.2.3.1. CSNP ve LL37-CSNP'lerin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizleri

Nanopartiküllerin yüzeyi ve şekli, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (ZEISS GeminiSEM 500) ile incelendi. FE-SEM gözlemi öncesi deney gruplarına ait liyofilize kuru CSNP ve LL37-CSNP numunesi suda çözüldü (1 mg/ml). Ultrasonik homojenizatörde homojenize edilip, üç damla cam lamel üzerine damlatılarak oda koşullarında 24 saat boyunca kurutuldu. Kuru numune üzerine basınç altında püskürtmeli iridyum kaplama yapıldı. 4 nm iridyum ile kaplandı. Ölçümler 2 kV'luk ekstra yüksek voltaj altında gözlemlendi.

3.2.3.2. CSNP ve LL37-CSNP'lerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) analizi

CSNP ve LL37-CSNP pelletleri 1:10 oranında seyreltilerek 30 dk boyunca ultrasonik banyoda (ISOLAB Laborgeräte GmbH 180 W) homojenize edildi. Örnekler sırasıyla 0.45 µm ve 0.22 µm filtre ile süzüldü. Numuneler hazırlandıktan sonra partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) belirlendi. Ortalama parçacık boyutu, 50 okuma ile üç ardışık ölçümün ortalaması alınarak hesaplandı.

3.2.3.3. CSNP ve LL37-CSNP'lerin fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

CSNP ile LL37-CSNP örneklerinde etken madde ve polimer arasındaki etkileşimler Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile tespit edildi. Numuneler 400 cm⁻¹ ile 4000 cm⁻¹ spektrum aralığında taranarak analiz edildi. Elde edilen spektrum CS spektrum ve TPP spektrum ile karşılaştırıldı.

3.2.3.4. LL37 kapsülleme verimliliği (%EE)

CSNP'lerin içerisinde bulunan LL37 miktarının belirlenmesi için örneklerden santrifüj sonrası toplanan süpernatant içerisindeki enkapsüle edilmeyen LL37 miktarı Albumin eşdeğeri olarak hesaplandı. Micro BCA test kiti kullanılarak albumin standardına göre (40-20-10-5-1-0 µg/mL aralığında) kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. CSNP oluştururken başta eklenen LL37 miktarından % kapsülleme verimliliği (%EE) denklem 1 kullanılarak hesaplandı (Rashki ve ark., 2022).

$$EE(\%) = \frac{\text{Toplam LL37 konsantrasyon} - \text{Serbest LL37 konsantrasyon}}{\text{Toplam LL37 konsantrasyon}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.3.5. *In vitro* salım kinetiği

15-LL37-CSNP ve 7,5-LL37-CSNP'lerden LL37'nin *in vitro* kümülatif salımı profilleri, 37°C'de PBS (pH 6,8) ortamında 24 gün boyunca (her 24 saatte bir) toplanan süpernatantlarda bulunan LL37'nin albumin eşdeğeri olarak hesaplanmasıyla

belirlenmiştir. Micro BCA test içerisindeki albümin standardına göre (40-20-10-5-1-0 µg/mL aralığında) kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve hesaplamalar yapılmıştır. LL37 salım kinetiğini tahmin etmek için salım çalışmalarından elde edilen veriler sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell modeli gibi çeşitli kinetik modellere uygulanmıştır (Nair ve ark., 2019).

3.2.3.5.1. Sıfırıncı derece kinetik modeli

Sıfırıncı dereceden kinetik, formülasyondan ilacın sabit hızla salımını tanımlar ve bu salım süresi ya da konsantrasyondan bağımsızdır. Sıfırıncı dereceden salım, denklem (2)'ye göre ifade edilir.

$$C_0 - C_t = K_0 \cdot t \quad (2)$$

Burada C_0 başlangıç ilaç konsantrasyonunu, C_t belirli bir 't' zamanındaki salınan ilaç miktarını ve K_0 sıfırıncı dereceden hız sabitini temsil etmektedir. Bu modele uygunluk, ilacın kümülatif salım yüzdesinin zamana karşı grafiğe dökülmesiyle değerlendirilmiştir.

3.2.3.5.2. Birinci derece kinetik modeli

Burada, salınım hızı başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu ve zamanla ilişkilidir. İlaç salınım kinetiği, denklem (3)'e göre belirlenmektedir. C_0 başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu, t zaman ve K_t birinci dereceden hız sabitidir.

$$\text{Log } C = \text{Log } C_0 - K_t/2.303 \quad (3)$$

3.2.3.5.3. Korsmeyer Peppas kinetik modeli

Korsmeyer-Peppas modeli, polimerik sistemlerden ilaç salınımı mekanizmasını tahmin eder. Veriler, kümülatif ilaç salınımının (%) logaritması ile zamanın logaritması grafiği çizilmiştir. Kinetik modeli denklem (4)'e göre belirlenmektedir.

$$C_t / C_\infty = K t^n, \quad (4)$$

C_t / C_∞ , t zamanındaki ilaç salınımının kesirini (oranını) ve K hız sabitini temsil eder.

3.2.3.5.4. Higuchi kinetik modeli

Bu model genellikle matris sistemlerinden ilaç salınımını tanımlar. Elde edilen veriler, bu modele uyum sağlamak için kümülatif ilaç salınımının yüzdelik değerinin zamanın kareköküne karşı grafiğe dökülmesiyle denklem (5)'e göre hesaplanmıştır.

$$C_t = KH \sqrt{t} \quad (5)$$

C_t , t zamanındaki salınan ilaç miktarını ve KH Higuchi hız sabitini temsil eder (Nair ve ark., 2019).

3.2.3.5.5. Hixson-Crowell kinetik modeli

Bu model, ilaç salınımının partiküllerin yüzey alanı ve hacmine bağlı olduğunu tanımlar ve denklem (6)'da temsil edilir.

$$C_0^{(1/3)} - C_t^{(1/3)} = KHC_t \quad (6)$$

KH hız sabiti, C_0 başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu ve C_t t zamanındaki ilaç salınımını belirtmektedir. Salınım çalışmasından elde edilen veriler, kalan ilaç yüzdesinin küp kökünü zamanla karşılaştırarak bu modele uygun hale getirilmiştir (Nair ve ark., 2019).

Kinetik modeller matematiksel formüller içerir ve salım mekanizmasını açıklar, regresyon analizi kinetik modelleri veriye uyarlamak amacıyla kullanılmaktadır. Matematiksel formüllerin veri ile uyumunu test etmek için regresyon uygulanmaktadır. Kinetik modele regresyon analizi uygulanarak R-Kare (R^2), Kök Ortalama Kare Hata (RMSE), Veriler Arası Farkların Kareleri Toplamı (RSS), Akaike Bilgi Kriteri (AIC), Baesian Bilgi Kriteri (BIC) gibi metrik değerler hesaplanmaktadır. Bu değerler karşılaştırılarak en iyi uyum gösteren kinetik model belirlenmektedir. R^2 ; modelin veriyi ne kadar iyi açıkladığını gösteren değerdir. 0 ile 1 aralığında değer almaktadır. 0 değeri model veriyi açıklayamıyor iken 1 değeri model veriye mükemmel uyuyor anlamına gelmektedir. RMSE; modelin tahmin doğruluğunu ölçer. Daha düşük RMSE değeri daha iyi uyumu göstermektedir. RSS; toplam hata miktarını gösterir. Küçük RSS değerleri, modelin veriye daha yakın tahminler yaptığını göstermektedir. AIC; modelin hem uyumunu hem de karmaşıklığını dikkate alan bir ölçüttür. Farklı modeller arasında karşılaştırma yaparken daha düşük AIC değeri, genelde daha iyi model anlamına gelmektedir. BIC; AIC'ye benzer, ancak büyük veri setlerinde AIC gibi, model

karşılaştırmalarında kullanılır. Daha düşük BIC değeri, daha iyi model uyumu demektir (Costa ve Lobo, 2001).

3.2.3.6. Biyouyumluluk testleri

CSNP(1-2-3-4), 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'nin keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için hücreler başlangıçta %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 antibiyotikler (gentamisin) içeren DMEM ortamında kültürlendi. Kuyulara 150 µg/mL ile 0,29 µg/mL arasında değişen 10 farklı konsantrasyonda dağıtılırken, hücre kontrolü ve besiyeri kontrolü olarak belirlenen kuyulara CSNP/LL37-CSNP eklenmedi. Aktif olarak çoğalan hücreler, orta kontroller olarak belirlenen kuyular hariç, 50 µL ortamda kuyu başına 5000 hücre yoğunluğunda 96 kuyulu bir hücre kültürü plakasına ekildi. Plakalar daha sonra bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyuya canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür içeren XTT sitotoksosite solüsyonu (Sartorius) eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Kuyulardaki absorbans, canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için bir ELISA plaka okuyucusu kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. CSNP (1-2-3-4), 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, kontrol hücrelerinin çoğalmasının yüzdesi olarak hesaplandı; burada CSNP/LL37-CSNP içermeyen kontrol hücrelerinin çoğalması %100 canlılığa karşılık gelmiştir.

3.2.3.7. CSNP ve LL37-CSNP için antibakteriyel duyarlılık testi

CSNP, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları hazırlanmıştır. Bu gruplar disk şekilli filtre kâğıdı üzerine her örnekten 25 µL damlatılarak diskler kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş disklerin antibakteriyel etkinliği besiyeri çerisindeki bakterilerin üreme yüzdeleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)(ATCC 29213) ve gram-negatif *Escherichia coli* (*E.coli*) (ATCC 25922) suşları test suşları olarak kullanılmıştır. Aktifleştirilen her bakteri kültüründen 3 koloni seçerek ve kültür yoğunluğu 0,5 McFarland olana kadar 4-5 mL Mueller Hinton Broth (MHB) içinde süspanse edilmiştir. 5x10⁶ CFU/mL hücre bakteri kültürü hazırlanmıştır. Her kuyu içerisinde 100 µL'lik son hacimde bakteri ekimi yapılmıştır. Ekim ardından kağıt diskler 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan kuyu

içerisine koyularak 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süreç sonunda kuyulardan kağıt diskler alınarak bakteri canlılığı çok kuyulu plaka okuyucuda 600 nm'de ölçülmüştür.

3.2.4. PCL/Jel Fiber matların fiziko kimyasal ve biyolojik karakterizasyon testleri

3.2.4.1. PCL/Jel fiber mat için FE-SEM analizleri

Elektroçirime yöntemiyle üretilen fiberlerin morfolojisi ve çapı, taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) altında incelendi. FE-SEM gözlemlerinden önce fiberler, basınç altında püskürtmeli iridyum kaplama için 1 cm x 1 cm kareler halinde kesildi ve 4 nm iridium ile kaplandı. Ölçümler 2 kV'luk ekstra yüksek voltaj altında gözlemlendi.

3.2.4.2. PCL/Jel ve LL37-CSNP yüklü PCL/Jel fiber matın FTIR analizleri

PCL/Jel (60:40) fiber mat örneğinin FTIR analizi gerçekleştirildi. Numune spektrumları 4000 cm^{-1} ila 400 cm^{-1} arasında kaydedildi. Cihazın sensörüne küçük miktarda fiber mat konularak PCL/Jel (60:40) fiberinin FTIR spektrumları elde edildi ve spektrum daha sonra PCL spektrumu ve Jel spektrumu ile karşılaştırıldı.

3.2.4.3. Temas açısı analizi

Temas açısı, sıvı bir solüsyonun katı bir malzeme yüzeyini ıslatma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Temas açısı analiz cihazı, sıvının damlatıldığı pipet, numune tablası, numune yüzeyi üzerindeki damlacığın görüntüsünün alınması için bir kamera, alınan görüntülerin aktarıldığı bilgisayar ve damlanın analiz edilmesi için gerekli yazılımdan oluşmaktadır. Su temas açısının 90° üzerinde çıkması analiz edilen numunenin hidrofobik yapı sergilediğini, 90° altındaki sonuçlar ise numunenin hidrofilik bir yapı sergilediğini gösterir. Su temas açısı “sesil (yerleştirilen) damla yöntemi” uygulanarak ölçülmüştür.

3.2.4.4. Mekanik analiz

PCL/Jel fiber matın gerilme mukavemeti, elastik modülü ve kopma uzaması için çekme testi gerçekleştirilmiştir. Gerilme kuvveti, elastik modülü, kopma uzaması gibi

mekanik özellikler hesaplanmıştır. Ortalama mat kalınlığı yaklaşık 0,01 mm bulunmuştur. 10x50x0,1 mm ebatlarında kesildikten sonra 10 mm/dk çekme hızında her örnek için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.4.5. PCL/Jel fiber mat biyobozunma testi

Üretilen PCL/Jel fiber numunenin biyobozunurluğunu gözlemlemek için 6 mm çapında 3 örnek kesilerek PBS çözeltisinde bekletildi. 16.güne kadar her 3 örnek PBS çözeltiden alınıp kurutularak FE-SEM görüntüleri alındı. PBS'te 1, 8 ve 16. gün bekletildikten sonra kurutulan mat ağırlıkları tartılarak % ağırlık kaybı belirlendi.

3.2.4.6. LL37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel fiber matdan *in vitro* salım kinetiği

LL37'nin *in vitro* salımı, 37°C, PBS (pH 6,8) ortamında 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak PCL/Jel fiber mat üzerine 25 µL emdirilerek kurutulmuştur. Fiber mat örnekleri ependorf tüpe alınarak PBS içerisinde 24 gün boyunca (her 24 saatte bir) toplanan süpernatant kullanılarak salınan albümine eşdeğer LL37 miktarı belirlenmiştir. Micro BCA test içerisindeki albümin standardına göre (40-20-10-5-1-0 µg/mL aralığında) kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş, LL37 salım kinetiğini tahmin etmek için salım çalışmalarından elde edilen veriler sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell Modeli gibi çeşitli kinetik modellere uygulanmıştır.

3.2.4.7. PCL/Jel fiber mat örneklerinde biyoyumluluk analizi

PCL/Jel fiber matların biyoyumluluk analizi için sırasıyla Fiber-1(boş), Fiber-2 (7,5-LL37-CSNP), Fiber-3 (15-LL37-CSNP), Fiber-4 (7,5-LL37), Fiber-5 (15-LL37), Fiber-6 (CSNP) grupları oluşturuldu. Fiber grupları üzerine 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış çözeltilerden (CSNP/7,5-LL37/15-LL37/7,5-LL37-CSNP/15-LL37-CSNP) 25 µL damlatılarak kurumaya bırakıldı. Her bir fiber grubu 24 saat, 48 saat ve 72 saat için 96'lı kuyulu plaka içerisinde 3 tekrarlı hazırlandı. Her fiber grubunun yer aldığı kuyu içerisine %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (gentamisin) içeren DMEM ortamından 150 µL eklenerek inkübasyona alındı. 24, 48 ve 72 saat süreleri sonunda fiber grupları kuyulardan alınarak fiber ekstraktları keratinosit hücreleri için besiyeri olarak

kullanılmak üzere muhafaza edildi. MK hariç, HK, Fiber-1, Fiber-2, Fiber-3, Fiber-4, Fiber-5 ve Fiber-6 için 150 µL besiyerinde kuyu başına 10000 hücre yoğunluğunda 96 kuyulu bir hücre kültür plakasına ekim yapıldı. 24 saat inkübasyonun ardından eski medium atıldı. Yeni medium olarak fiber gruplarına ait 24, 48 ve 72 saatlik ekstraktlar eklenerek 37°C'de inkübasyona alındı. 24-48-72 saatlik ekstraktların 48 saat inkübasyonunun ardından her kuyuya canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür içeren XTT sitotoksosite solüsyonu (Sartorius) eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Kuyulardaki absorbans, canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için bir ELISA plaka okuyucusu kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. Fiber matların hücre canlılığı üzerindeki etkisi, kontrol hücrelerinin canlılığının yüzdesi olarak hesaplandı; burada fiber mat ekstraktı içermeyen kontrol hücrelerinin çoğalması %100 canlılığa karşılık gelmiştir.

3.2.4.8.PCL/Jel fiber mat örneklerinde antibakteriyel duyarlılık testi

CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları hazırlanmıştır. Bu gruplar disk şekilli PCL/Jel fiber mat üzerine her örnekten 25 µL damlatılmış, diskler kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş disklerin antibakteriyel etkinliği sıvı besiyerine ekim yapılan bakteriler üzerinde değerlendirilmiştir. Gram-pozitif *S.aureus* (ATCC 29213) ve gram-negatif *E.coli* (ATCC 25922) suşları test suşları olarak kullanılmıştır. Bölüm 3.2.3.7'de verilen protokol uygulanmıştır.

3.2.4.9. PCL/Jel fiber mat örnekleri lazer taramalı konfokal mikroskop ve SEM görüntüleme

Fiber örnekler üç tekrarlı olmak üzere hem lazer taramalı konfokal mikroskopta hem de SEM'de görüntüleme amacıyla 6 mm çapında dairesel şekilde kesildi. Her örnek üzerine 15-LL37-CSNP çözeltisinden 25 µL damlatılarak kurutuldu. İlk olarak fiber örnekler 96'lı plaka içine uyumlu hücre tacına yerleştirildi. Ardından 96 kuyulu plakaya alındı. Her kuyu içine 100 µL DMEM eklendi. Her hücre tacı içerisindeki fiber örnek için 50 µL DMEM içerisinde 1×10^4 keratinosit hücre ekildi. 72 saat boyunca 37°C, %5 CO₂'li inkübatör ortamında inkübe edildi. Konfokal mikroskopta görüntüleme prosedürüne göre; fiber örnekler küçük petri plakaya aktarıldı. Fiber örnekler 500 µL sodyum kakodilat çözeltisi ile bir kez yıkandı. Fiksasyon işlemi için fiber örnekler üzerine 1

mL'lik %3 glutaraldehit çözeltisi eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde glutaraldehit çekilerek atıldı. 300 µL Tween 80 ile iki kez yıkandı. Ardından 300 µL Triton-X çözeltisi ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekradan 300 µL Tween 80 ile iki kez yıkandı. Her fiber örneğine DAPI, rodamin-falloidin ve PBS karışımı olan 2 mL boyama çözeltisi eklenerek 20 dk inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her fiber örneği 300 µL Tween 80 ile iki kez yıkandı. Tween 80 yıkanmasından sonra 1 mL PBS ile yıkama yapıldı. Fiber örneklerinin yıkama işleminden sonra her örnek lam üzerine alındı. Lamel üzerine mounting solüsyonu eklenerek baloncuk oluşturmadan lam üzerine kapatılarak 1-2 saat kurumaya bırakıldı. Lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülemesi yapıldı. SEM görüntüleme prosedürüne göre; fiber örnekler 96 kuyucuklu plakaya alınarak üzerine 0,1 M sodyum kakodilat çözeltisi ile iki kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından 0,1 M sodyum kakodilat içerisinde hazırlanan %3 glutaraldehit çözeltisinden her bir kuyuya 50 µL eklenerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası glutaraldehit çekilerek her kuyuya 50 µL saf su ile üç kez yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra sırasıyla %50, %80, %90 ve %96 etanolde her kuyu için 50 µL eklenerek her bir yüzde derişimde 20 dk bekletildi. Ardından her kuyu için 50 µL HMDS eklenerek çeker ocakta 24 saat boyunca kurutuldu. Kurutma sonrası SEM görüntüleme amacıyla kaplama yapıldı.

3.2.4.10. PCL/Jel fiber mat örnekleri için 2B modelde çizik testi

Çizik testi için PCL/Jel fiber örneklerden 6 mm çapında dairesel diskler kesildi. *In vitro* yara iyileşme etkisini 2 boyutlu(2B) keratinosit hücre kültür ortamında incelemek amacıyla HK, CSNP-PCL/Jel, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel grupları 3 tekrarlı olarak hazırlandı. 96 kuyulu plakada her kuyu için 3×10^4 keratinosit hücresi 50 µL DMEM besiyeri içerisinde ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyon sonrası hücrelerin kuyu alanını kapladığı gözlemlendi. Hücre kaplı kuyu alanına steril pipet ucu kullanılarak çizik yarası oluşturuldu. Kuyulardaki 2B çizik yara modellerinin üzerine HK hariç diğer fiber grupları yerleştirildi. Uygulamanın 1., 7. ve 14.günlerinde kuyularda fiber mat örnekler çıkarılarak invert mikroskop altında 2B çizik yara modelinde yara kapanması gözlemlendi. Yara kapanma yüzdesi Image-J programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.5. 3B cilt modeli geliştirilmesi

Yeniden yapılandırılmış epidermal model (RHE), keratinosit hücrelerinin insertlere ekilmesiyle oluşturulur. Keratinositler hücre kültür flasklarında çoğaltıldı. İnsertler, polistrine halkaya sahip ve üzerinde polikarbonat membran bulunan plastik kaplardır. Membran alt taraftan hücrelerin beslenmesini sağlayan 0,4 µm çapında gözenekler içerir. RHE'nin oluşturulma sürecinde keratinosit hücreleri insert içinde hücre kültürü besiyerine daldırılarak kültürlenir. 24 saat sonra, besiyeri seviyesi membranın üst kısmının (apikal bölge) havaya maruz kalacak şekilde değiştirilir. Bu hava-sıvı arayüzü (air-liquid interface (ALI)) kültürü keratinositlerin fonksiyonel bir epidermis haline gelmesi yani farklılaşması açısından önem arz eder. Hava-sıvı arayüzü kültürü sırasında kullanılan yeni besiyeri başlangıç kültür besiyeri ile karşılaştırıldığında daha yüksek CaCl₂ seviyeleri içerir. Sırasıyla kullanılan besiyerleri; E1 besiyeri (60 µM CaCl₂), E2 besiyeri (E1 besiyeri her mL'si için 4,8 µL CaCl₂) ve E3(E2 besiyeri her mL'si için 2,4 mL CaCl₂) dir. Bu farklı seviye keratinositlerin farklılaşması için ek bir uyarıcı sağlar. Prosedüre göre çoğaltılan keratinosit kültür kabındaki eski besiyeri atıldı. 75 cm²'lik kültür flaskı 4,5 mL PBS ile yıkandı ve atıldı. 75 cm²'lik flask için 2 mL %0,05-Tripsin eklenerek 37°C inkübatörde 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 12'li ve 24'lü kuyulu plaka ile birlikte insertler hazırlandı. İnkübasyon sonrası hücreler flasklardan kaldırılarak 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek keratinositler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre pelleti E2 besiyerinde yeniden süspansiyon edildi. Hücre sayısı thoma sayım lamında ve trypan mavisi kullanarak belirlendi. 12 kuyulu plakada her insert için 500 µL E2 besiyeri 5x10⁵ hücre, 24'lü plaka her insert için 300 µL E2 besiyeri içinde 3x10⁵ hücre eklendi. 37°C ve %5 CO₂ ortamında 2 saat inkübasyonda tutunması için bekletildi. Ardından insertlerin 12 kuyulu plakada insert dışına 1 mL E2 besiyeri, 24 kuyulu plakada ise insert dışına 500 µL E2 besiyeri hava kabarcığı olmadığından emin olarak eklendi. Plakalar 37°C ve %5 CO₂'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrası ALI kültürü başlatmak için insertlerden besiyeri dikkatlice çekilerek atıldı. İnsertlerin dışındaki E2 besiyeri E3 besiyeriyle değiştirildi. Besiyeri değişimleri 24 kuyulu plaka için haftada üç, 12 kuyulu plaka için haftada iki kez değiştirildi.

Tam kalınlıkta deri eşdeğeri (FTSE) ya da tam kalınlıkta deri modeli, yalnızca epidermal bir bileşen değil, aynı zamanda dermal bir bileşen de içerir. Dermis tip-I kolajen matrisinden oluşur ve bu matrisin içine insan dermal fibroblast (HDF) hücreleri

yerleştirilir. Keratinosit hücreleri dermisin üzerine ekilir. Kolajen jelindeki HDF'ler, ekstrasellüler matris (ECM) proteinlerini üreterek matrisi yeniden organize eder ve çoğalırlar. Bu aktivite, yüzeydeki keratinositlerin proliferasyonunu uyarır. Keratinositlerin bu süreçte farklılaşması CaCl_2 seviyelerinin ayarlanması ve uygun ALI'in kullanılmasıyla uyarılır. Çok katmanlı epidermis, farklı farklılaşma aşamalarındaki keratinositleri içerir ve FTSE modeli stratum korneum oluşumuyla tamamlanır. Prosedüre göre; İlk olarak kolajen jel bileşeninde gerekli kültür flasklarında çoğaltılan HDF hücrelerinin eski besiyeri çekilerek atıldı. 75 cm^2 'lik flask için 2 mL PBS ile yıkanması sonrası atıldı. 2,5 mL Tripsin eklenerek 37°C ve %5 CO_2 ortamında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kaldırılan HDF'ler 15 mL'lik falkon tüpe aktararak 800 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek HDF'ler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre pelleti FGM'da yeniden süspansedildi. Hücre sayısı thoma sayım lamında ve trypan blue kullanılarak belirlendi. Hücre pelleti 4×10^6 hücre/mL olarak ayarlandı. 15 mL'lik falkon tüp içerisinde sırasıyla 6 mL sıçan kuyruğu kolajeni, 1,6 mL 5xRB, 400 μL HDF (4×10^6 hücre/mL) karıştırılarak toplam hacmi 8 mL olan kolajen jeli hazırlandı. 12 kuyulu plaka içerisindeki her insert için 400 μL baloncuk oluşturmadan kolajen jel karışımı eklendi. İnsertler 37°C ve %5 CO_2 ortamında 30 dk inkübe edilerek kolajen jelinin polimerleşmesi sağlandı. HDF'ler kolajen yataklarında 5 saate kadar bekleyebilmektedir. Bu süreci geçirmeden kültür flasklarında çoğaltılan keratinosit hücrelerindeki eski besiyeri atıldı. 75 cm^2 'lik kültür flaskı 4,5 mL PBS ile yıkandı ve atıldı. 75 cm^2 'lik flask için 2 mL %0,05-Tripsin eklenerek 37°C inkübatörde 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler flasklardan kaldırılarak 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek keratinositler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre pelleti E2 ortamında yeniden süspansedildi. Hücre sayısı thoma sayım lamında ve trypan mavisi kullanılarak belirlendi. Hücre pelleti 4×10^5 hücre/mL olarak ayarlandı. 12 kuyulu plakada kolajen yatağına zarar vermeden her inserte 500 μL keratinosit (4×10^5 hücre/mL) eklendi. İnsert dışına 1 mL E2 besiyeri eklenerek inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra insert içinde bulunan besiyeri çekilerek atıldı ve 12 derin kuyulu plakaya insertler aktarıldı. İnsert dışına 4,5 mL E3 besiyeri eklendi. Besiyeri değişimleri haftada 2 kez yapıldı.

3.2.5.1. 3B cilt yara modeli

12 kuyulu plaka ve 24 kuyulu plaka için ayrı ayrı yıkama prosedürü hazırlandı. 12 kuyulu plaka içerisindeki RHE ve FTSE modeller için yıkama prosedürüne göre, 12 kuyulu ayrı bir plaka hazırlandı. Üst sırada (4 kuyu), her bir kuyuya 1 mL PBS eklendi. Orta sırada (4 kuyu), her kuyuya 750 µL 1X-Tripsin-EDTA eklendi. Alt sırada (4 kuyu) her kuyuya 1 mL FBS eklendi. Ayrıca 6 kuyulu plaka yıkama istasyonu olarak hazırlandı ve her kuyuya 1 mL E3 besiyeri eklendi. 24 kuyulu plaka içerisindeki RHE ve FTSE modeller için yıkama prosedürüne göre ise 12 kuyulu ayrı bir plaka hazırlandı. Üst sırada (4 kuyu), her bir kuyuya 500 µL PBS eklendi. Orta sırada (4 kuyu) her kuyuya 300 µL 1X-Tripsin-EDTA eklendi. Alt sırada (4 kuyu), her kuyuya 500 µL FBS eklendi. Ayrıca 6 kuyulu plaka yıkama istasyonu olarak hazırlandı ve her kuyuya 500 µL E3 besiyeri eklendi. İlk olarak başlangıçta küçük petri kabında punch yapılmış modeller kısa bir süreliğine PBS içeren kuyuya daldırıldı. Hemen ardından 3 dk boyunca oda sıcaklığında Tripsin-EDTA içinde inkübe edildi. Sonrasında düz uçlu forseps yardımıyla FBS içine son olarak da E3 besiyeri içinde nazikçe çalkalandı. Bu işlemlerden sonra model tekrar küçük bir petri kabına yerleştirilerek ince uçlu cımbız yardımıyla punch yeri dikkatlice çıkarıldı. Punch yapılmış modeller tekrar plakalarına geri yerleştirildi. Epidermal modeller kültürün onuncu gününden daha erken ve on beşinci gününden daha geç olmayan bir zamanda punch yapılmalıdır. Tam iyileşme ve bariyer onarımı, sonrasında 14 gün boyunca gözlemlenebilir.

3.2.5.2. *In vitro* 3B insan cilt modeli ve 3B insan cilt yara modeli morfoloji ve karakterizasyonu

Doku örneklerinin otoliz ve bozulmaya uğramasını engellemek için formaldehit kullanılarak hücresel yapıların sabitlenmesi sağlandı. Ardından dokudaki suyun uzaklaştırılması için artan derişimlerde etanol serileriyle dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Etanol ile dehidre edilen doku, parafin ile uyumlu hale getirilmek üzere ksilol ile saydamlaştırıldı. Ksilol ile saydamlaştırılan doku, erimiş parafin ile doyurularak infiltrasyon sağlandı. İnfiltrasyonu tamamlanan doku, uygun doku gömme kaseti içerisine alınarak parafinde katılaştırıldı ve mikrotomda kesilmeye hazır hale getirildi.

3.2.5.2.1. 3B cilt modellerinin fiksasyonu

3B deri modeline ait insertler, 12 kuyulu plaka içine transfer edildi. Her insert içine 1 mL, dış kısmına ise 2 mL %10 paraformaldehit çözeltisi eklendi. İntertler oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında insertlerin iç kısmındaki çözelti çekilerek atıldı. Bir neşter yardımıyla deri dokusunun kıvrılmasını önlemek amacıyla doku 3 cm x 3 cm boyutlarında lens kağıdı üzerine yerleştirildi. Daha sonra doku, doku gömme kaseti içerisine alınarak soğuk %70 etanol içerisinde doku gömme işlemine kadar bekletildi.

3.2.5.2.2. 3B cilt modellerinin parafine gömülmesi

Fiksasyonun ardından tekrar PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Gömme işlemi öncesinde doku artan derişimlerde etanol ile dehidre edildi. Bunun için sırasıyla %50 etanolde 15 dk, %70 etanolde 15 dk, %80 etanolde iki kez her birinde 30 dk, %96 etanolde iki kez her biri 30 dk bekletme işlemleri yapıldı. Fikse edilmiş ve dehidre edilmiş cilt modelleri parafin doldurulmuş uygun bir kalıba yerleştirildi. Doku istenilen kesit yönüne uygun oryantasyonda yerleştirildi. Kalıp doku gömme kaseti ile kapatıldı ve üzerine ilave parafin eklendi. Parafine gömülmüş doku örneği en az 1 saat boyunca -80°C'de donduruldu. Ardından mikrotom cihazına (Microm) parafine gömülmüş doku yerleştirilerek 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler mikroskop lamalarına yerleştirildi ve 37°C'de en az 8 saat boyunca kurutuldu.

3.2.5.2.3. H&E boyama

Kesitler 60°C sıcaklıktaki inkübatörde en az 4 saat bekletilerek kesitlerdeki parafin eritildi. Deparafinasyon işlemi için sırasıyla ksilende iki kez 10 dk, rehidrasyon işlemi için %96 etanolde 3 kez daldırma, %80 etanolde 3 kez daldırma, %70 etanolde 3 kez daldırma, %50 etanolde 3 kez daldırma ve son olarak distile saf suda hafifçe çalkalama işlemi yapıldı. Hematoksilin ile boyama aşamasında; doku kesitleri hematoksilin solüsyonunda 3-5 dk süreyle boyandı. Boyama süresi sonunda, doku kesitleri distile su ile iki kez durulandı. Bluing (maviye çevirme) aşamasında; doku kesitleri bluing solüsyonunda 10-15 sn süreyle işleme tabi tutuldu. İşlem sonrasında, doku kesitleri distile su ile iki kez durulandı. Lam %96 etanole daldırıldı ve fazla alkol hafifçe kurutuldu. Eosin ile boyama aşamasında; doku kesitleri eosin Y solüsyonunda 2-3 dk boyandı. Boyama süresi sonunda, doku kesitleri %96 etanol ile yıkandı. Lamalar üç kez

%96 etanol ile dehidrate edildi. Mounting solüsyonu lam ile lamel arasına eklenerek baloncuk oluşturmadan kapatıldı. Hazırlık tamamlanmasının ardından mikroskop altında inceleme yapılmak için hazır hale getirildi.

3.2.5.2.4. İmmunohistokimyasal (IHC) analiz

Lamlara alınmış doku kesitleri 60°C etüvde 4 saat boyunca inkübe edilerek parafinin erimesi sağlandı. Lamlar iki kez her seferinde 5 dk süreyle ksilende deparafinize edildi. Lamlar iki kez her seferinde 3 dk süreyle %100 alkolde bekletildi. Ardından sırasıyla %95, %70 ve %50 oranındaki alkollerden her biri 3 dk olacak şekilde işleminden geçirildi. Lamları oda sıcaklığında 1 mL %0.5 Triton-X-100/PBS içinde 5 dk inkübe edildi. Ardından permeabilizasyon tamponunu yıkamak için lamları 0,5 mL PBS içinde 5 dk inkübe edilerek yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla kesitler oda sıcaklığında Thermo scientific peroxidase suppressor içinde 30 dk inkübe edildi. Lamlar PBS ile iki kez her seferinde 5 dk yıkandı. Her bir lam kesitine 100 µL bloke edici tampon (%1 BSA) eklendi ve nemli bir ortamda 1 saat inkübe edildi. Sonrasında bloke edici tampon lamların üzerinden süzerek uzaklaştırıldı. Bloklama çözeltisi çıkarıldıktan sonra her lam kesiti için uygun şekilde seyreltilmiş birincil antikor (involukrin, sitokeratin, laminin) lam kesitlerinin üzerine 100 µL olacak şekilde uygulandı ve nemli ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS ile iki kez, her defasında 5 dk yıkandı. PBS uzaklaştırıldı ve kesitleri karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat boyunca %1 BSA içinde hazırlanmış HRP ile konjuge ikincil antikorla 30 dk boyunca inkübe edildi. Lamlar PBS ile iki kez her birinde 5 dk yıkandı. Antikor boyamasının rengini ortaya çıkarmak için lam kesitlerine taze hazırlanmış DAB substrat çözeltisinden 100 µL eklendi. İstenilen renk yoğunluğu elde edilene kadar bekletildi. Ardından lamlar PBS ile üç kez, her seferinde 2 dk yıkandı. Mikroskop altında kahverengi renk oluşumu gözlemlendi. Sonrasında doku lamlarına mounting solüsyonu kullanılarak lamel yerleştirildi. Böylelikle hazırlanan lamlar oda sıcaklığında kalıcı olarak saklanabilir ve görüntülenebilir hale getirildi. Son olarak antikor boyaması tekrardan mikroskop altında gözlemlenerek kaydedildi.

3.2.5.2.5. Yara kapanmasının MTT analiz ile tespiti

24 kuyulu plaka insertlerinde yer alan doku modellerinde epidermal model ve yaralı (punch) model ve 15-LL37-CSNP damlatılmış yaralı (punch) model için 1.gün ve 11.gün doku canlılık etkisini MTT analizi yapılması planlandı. MTT analizinde aktif metabolizmaya sahip hücrelerde mavi bir formazan tuzuna indirgenmesi sonucu gözlemlenir. Hem epidermal model, yaralı (punch) model ve 15-LL37-CSNP damlatılmış yaralı (punch) model 1.gün ve 11.gün arasındaki yara kapanma farklılığını gözlemlemek amacıyla MTT 1 mg/mL konsantrasyonda PBS çözeltisi içerisinde hazırlandı. 24 kuyulu plaka içine 500 µL MTT eklendi. Baloncuk oluşturmadan MTT üzerine hem epidermal model hem de punch epidermal modeller yerleştirildi. 37°C, %5 CO₂ ortam şartlarındaki inkübatörde 2-3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda 24 kuyulu plaka içerisindeki modeller yeni bir 24 kuyulu plaka içerisine aktarıldı. Aktarım yapılırken insert tabanındaki MTT kalıntısı peçeteye emdirildi. Yeni plakadaki insert içine 500 µL izopropanol, insert dışına 500 µL izopropanol eklendi. Ardından 24'lü plakadaki modeller 100 rpm hızındaki çalkalayıcıda 1 saat boyunca çalkalandı. 1 saat sonunda insert tabanındaki membran bir iğne yardımıyla parçalanarak insert iç ve dışta yer alan mor renkli çözülmüş formazan sıvısının birbirine karışması sağlandı. Sıvıların homojen karışmasını sağlamak amacıyla 15 dk 100 rpm de tekrar çalkalanması sağlandı. Ardından 96 kuyulu plakadaki kuyularına 2x200 µL örnekler ve izopropanol blank örnek pipetle koyuldu. Absorbans ölçümü 570 nm optik yoğunluk (OD) değerinde yapıldı. Son olarak sonuçlara göre doku canlılık hesabı yapıldı.

3.2.5.2.6. İvert mikroskopta yara kapanma görüntüleme

24 kuyulu plaka insertlerinde doku modellerinin punch yapılarak yaralanması sonrası kontrol, LL37, 15-LL37-CSNP gruplarında yara kapanmanın mikroskopik görüntüleri kaydedildi. Yaralanmanın 0.gün, 1.gün, 6.gün ve 11.gün arasındaki farklılıkların alınan mikroskopik görüntülerle karşılaştırması yapılarak gruplar arasında yara kapanma etkinliği değerlendirildi.

3.2.6. İstatistik analizler

Biyoyumluluk, antibakteriyel ve yara iyileşme testleri en az üç bağımsız tekrarlar gerçekleştirilmiştir. Her bir test için deney grupları ile kontrol gruplarının sonuçları

karşılaştırılmış ve istatistiksel analizde Student's t-testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

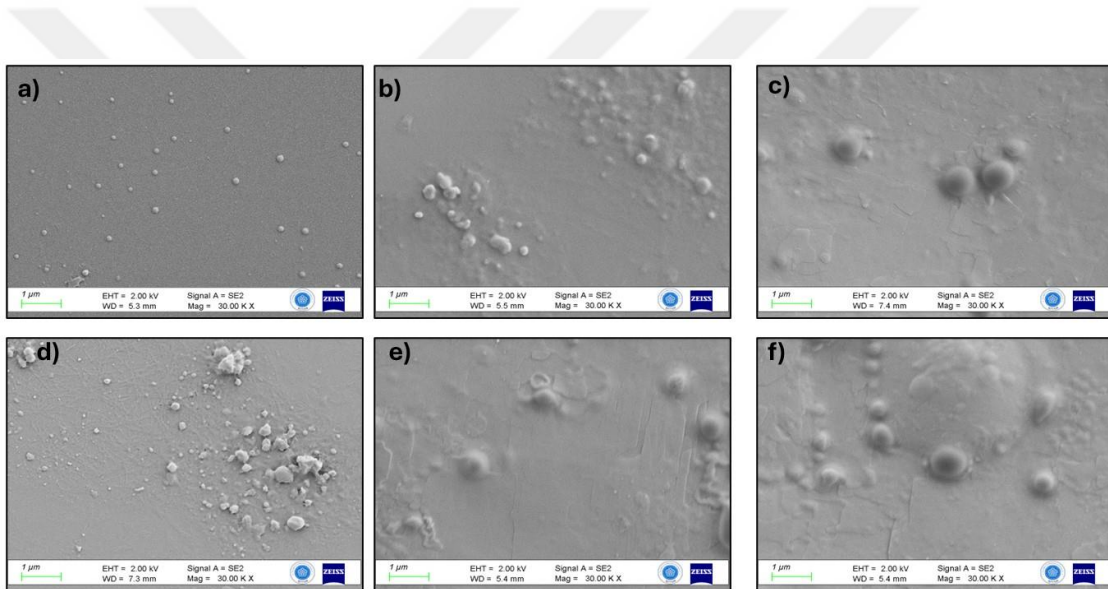


4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. NP'lerin Morfoloji ve Karakterizasyon Sonuçları

4.1.1. CSNP ve LL37-CSNP'lerin FE-SEM analiz sonuçları

Seyreltilmiş çözeltinin lam üzerine damlatılarak kurutulmasıyla elde edilen CSNP-1, CSNP-2, CSNP-3, CSNP-4, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları için nanopartikül morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) altında farklı büyütme oranlarında incelendi. Şekil 4.1'de CSNP-1 örneğinin 30.00 kx büyütme oranındaki FE-SEM görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 4.1. a) CSNP-1, b) CSNP-2, c) CSNP-3, d) CSNP-4, e) 7,5-LL37-CSNP, f) 15-LL37-CSNP örneklerinin 30.00 kx FE-SEM görüntüleri

CSNP ve LL37 enkapsüle edilmiş CSNP gruplarında aglomerasyonu engellemek için Tween 80 ajanı ve NaCl çözeltisinin etkinliği incelenmiştir. Başarılı bir kitosan nanopartikül oluşumunda göz önünde bulundurulması gereken önemli parametrelerden biri Tween 80 ajanının optimizasyonudur (Tıǧlı ve ark., 2012). Aglomerasyonu engellemek için kullanılan NaCl çözeltisinin varlığı CSNP'lerin kristalize-parçacık morfolojisinde, Tween 80 çözeltisinin varlığı ise CSNP'lerin oldukça küresel morfolojide olduğunu göstermektedir. Çözelti içeriklerine NaCl çözeltisi eklemenin temel nedeni partikül hazırlama üzerinde kontrol sağlamaktır. Önceki yapılan çalışmalara uygun olarak tek değerlikli tuzların varlığı CS zincirlerindeki sertliği ve yük itmesini azaltarak partikül

boyutlarının daha kompakt oluşumuna dolayısıyla NP'lerin oluşumuna katkı sağlayacağı bildirilmesine rağmen yüksek NaCl konsantrasyonu CS ve TPP arasındaki etkileşim azalmasına neden olurken orta düzeydeki NaCl konsantrasyonu NP'lerin koloidal stabilite gelişimi ve homojen partikül boyut dağılımını gerçekleştirmesi açısından idealdir (Sreekumar ve ark., 2018; Antoniou ve ark., 2015). Bir başka çalışmaya göre çözültüde iyonize haldeki tuz CS ile çapraz bağlayıcı arasındaki elektrostatik etkileşimin zayıflamasına sebep olduğu bildirilmektedir (Huang ve Lapitsky, 2011).

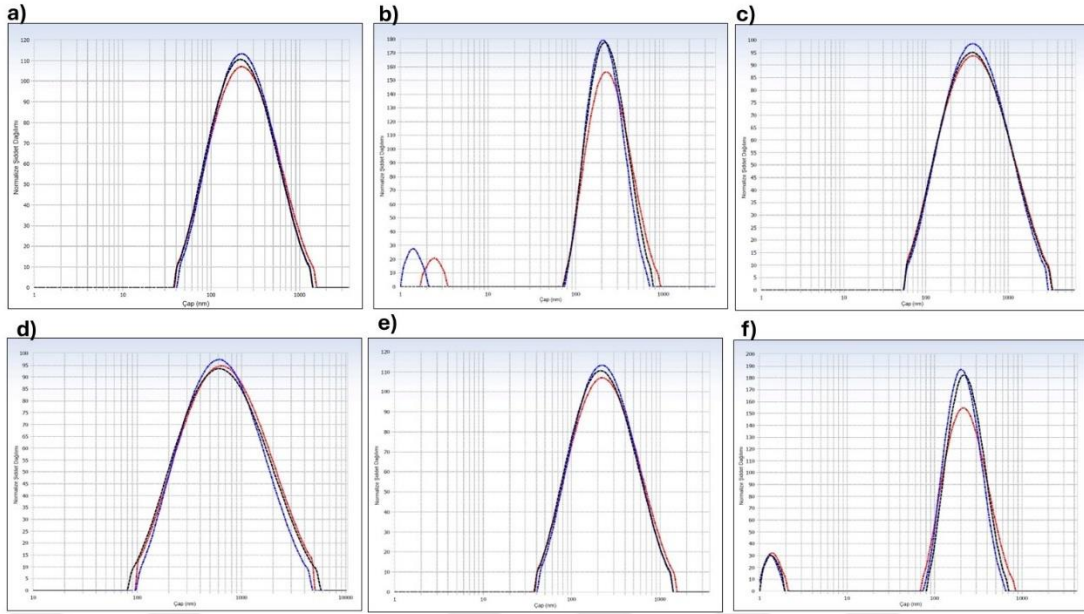
4.1.2. CSNP ve LL37-CSNP'lerin partikül boyutu, PDI ve ZP analiz sonuçları

CSNP (1-2-3-4)'ler, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP için ortalama partikül boyutu, PDI ve ZP ölçümleri yapılmıştır. Grupların ortalama partikül boyutu, PDI ve ZP değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. CSNP gruplarının ortalama partikül boyutu, PDI ve ZP değerleri

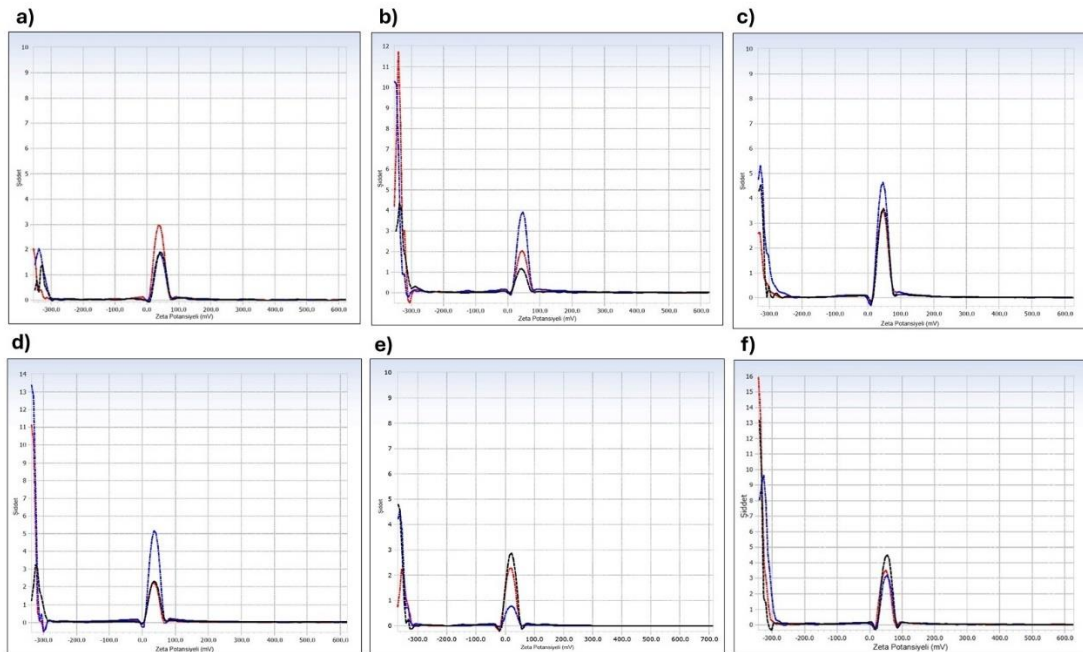
Gruplar	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI	ZP (mV)
CSNP-1	180,40±2,16	0,289±0,00	40,57±1,82
CSNP-2	198,00±4,48	0,259±0,03	43,68±1,40
CSNP-3	291,90±6,65	0,364±0,01	46,26±0,72
CSNP-4	496,40±9,80	0,321±0,00	35,75±0,97
7,5-LL37-CSNP	195,60±3,50	0,257±0,02	19,26±1,39
15-LL37-CSNP	210,90±2,59	0,306±0,02	51,21±0,93

Şekil 4.1'de CSNP gruplarının Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.1. Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği a) CSNP-1 (* NB değeri: $180,4 \pm 2,16$ nm * PDI değeri: $0,289 \pm 0,00$) b) CSNP-2 (* NB değeri: $198,0 \pm 4,48$ nm * PDI değeri: $0,259 \pm 0,03$) c) CSNP-3 (* NB değeri: $291,9 \pm 6,65$ nm * PDI değeri: $0,364 \pm 0,01$) d) CSNP-4 (* NB değeri: $496,4 \pm 9,80$ nm * PDI değeri: $0,321 \pm 0,00$) e) 7,5-LL37-CSNP (* NB değeri: $195,60 \pm 3,50$ nm * PDI değeri: $0,257 \pm 0,02$) f) 15-LL37-CSNP (* NB değeri: $210,9 \pm 2,59$ nm * PDI değeri: $0,306 \pm 0,02$)

Şekil 4.2’de CSNP gruplarının Zeta Potansiyeli grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Zeta potansiyel analiz grafikleri a) CSNP-1 (*Zeta Potansiyel değeri: $40,57 \pm 1,82$ mV) b) CSNP-2 (*Zeta Potansiyel değeri: $43,68 \pm 1,40$ mV) c) CSNP-3 (*Zeta Potansiyel değeri: $46,26 \pm 0,72$ mV) d) CSNP-4 (*Zeta Potansiyel değeri: $35,75 \pm 0,97$ mV) e) 7,5-LL37-CSNP (*Zeta Potansiyel değeri: $19,26 \pm 1,39$ mV) f) 15-LL37-CSNP (*Zeta Potansiyel değeri: $51,21 \pm 0,93$ mV)

CSNP üretiminde partikül boyutu üzerinde etkinliği olan birçok parametre bulunmaktadır. Bu parametreler; CS konsantrasyonu, TPP konsantrasyonu, CS:TPP hacim oranı, pH, NaCl çözeltisi ekleme, Tween 80 ekleme, santrifüj ve santrifüj tekrarı, ultrasonik banyo süresi, filtreleme olarak verilebilir. Bu parametreler partikül boyutu, PDI ve ZP değerleri üzerinde etkili olması açısından önemlidir. CSNP'lerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde en önemli faktörlerden birisi CS konsantrasyonudur. CSNP çözeltisi hazırlanırken CS konsantrasyonunun artışıyla birlikte daha fazla CS molekülü birbirini yakalayacak ve TPP ile çapraz bağlanma yaparak tek büyük bir parçacık meydana getirecektir. CS parçacık boyutundaki artışın sebebi için CS molekülündeki “-OH grupları” moleküller arası hidrojen bağlarına ve “-NH₃⁺” varlığı moleküller arası elektrostatik itmeye atfedilebileceği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2012). CS konsantrasyon değerlerinin değişikliği CSNP'leri üzerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu bildirilmektedir (Algharib ve ark., 2022).

Parçacık boyutu, parçacık dağılımı ve ZP'yi kontrol eden önemli parametrelerden birisi de CS:TPP oranıdır. Parçacık boyutundaki artış CS:TPP hacim oranındaki artış ile paraleldir. Oran açısından özellikle CS bileşeninin TPP bileşenine göre büyük hacimde olması çökerek topaklaşma sorunu açısından önemlidir. Algharib ve diğerlerinin çalışmalarında benzer durum olduğu gösterilmiştir (Algharib ve ark., 2022). Bu anlamda deney gruplarında CS:TPP oranı 2:1 olarak belirlendi. Ancak nanopartikül boyutunu ayarlamak için bu oran 3:1, 4:1 ya da 5:1 oranlarına kadar değiştirilebilir.

CS çözeltisine TPP çözeltisi ekleyerek nanoparçacık oluşumu sırasında damla damla akış hızının ve karıştırma süresi önemlidir. CS çözeltisine eklenen TPP çözeltisinin akış hızının artışı parçacık boyutu ve PDI değerini artırma eğilimi göstermektedir. Bu durum Majedi ve diğerlerinin çalışmalarında bildirilen sonuçlarla uyum göstermektedir (Majedi ve ark., 2014).

CS ve TPP çözeltilerinin pH değerleri CSNP'lerin üretimi esnasında önemli bir çevresel değişkendir. Nanoparçacıkların asidik ortamda oluşumu arzu edilen nanoboyutlarda nanopartikül elde edilmesi için gereklidir. CS'nin asidik ortamda çözünürlük artışı CS amino gruplarının asidik pH değerinde protonasyonuna yol açar sonuç olarak CS'nin NH₂ grubunun protonasyonu zincir gevşemesine etki ederek daha hızlı hidrojen bağı ayrışmasına ve asidik ortamda etkili solvent difüzyonuna yol açmaktadır (Pilipenko ve ark., 2019). Benzer şekilde CS solüsyonunun pH değeri 5,5 üzerine çıktığında amino gruplarının protonasyon miktarının azalmasına bağlı olarak aglomerasyona ve daha büyük parçacık oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir

(Hussain ve Sahudin, 2016). Ek olarak ortamın pH değerinin asidik ortamdan alkali ortama geçirilirse protonasyon/deprotonasyon işlemlerinin ZP değeri üzerinde azalmaya neden olduğu varsayılmıştır (Pilipenko ve ark., 2019). Çalışmanın tüm deney gruplarında 1M HCl çözeltisi kullanılarak CS çözeltisinin pH değerini 5, 1M NaOH çözeltisi kullanılarak TPP çözeltisinin pH değerini 2 olarak ayarlandı. Bu açıdan CSNP oluşum ortamının pH değerinin 3.5-4 olması optimum asidik ortamı sağlar.

CSNP'lerin toplanması bu sistemlerin iyi bilinen bir dezavantajıdır. NP'lerin toplanmasını önlemek için Tween 80 gibi bir yüzey aktif maddenin kullanıldığı bildirilmektedir. Agarwal ve diğerlerinin çalışmasında CSNP üretimi sırasında Tween 80 ajanı olmaksızın nanopartikül oluşumunun sağlanamadığı gösterilmiştir. Ancak Tween 80 miktarı arttırılırsa parçacık boyutunu arttırdığı bildirilmektedir. Çalışmalarına göre CSNP boyut dağılımları %0.5 ve %1 Tween 80 için sırasıyla 148.8 ± 1.1 nm (PDI=0.066) ve 177.0 ± 3.2 nm (PDI=0.090) olarak gösterilmektedir (Ozturk ve ark., 2020; Agarwal ve ark., 2018). Ancak bu durum CS molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi parametreleriyle değişiklik göstermektedir (Gan ve ark., 2005; Zhao ve Wu, 2006; Csaba ve ark., 2009).

CSNP(1-2-3-4), 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP için nanopartikül çap ortalamaları sırasıyla $179 \pm 2,16$ nm, $198,0 \pm 4,48$ nm, $291,9 \pm 6,65$ nm, $496,4 \pm 9,80$ nm, $195,60 \pm 3,50$ nm ve $210,90 \pm 2,59$ nm olarak ölçüldü. Rashki ve diğerleri tarafından (Rashki ve ark., 2022) yüksüz kitosan nanopartikül üretiminde tespit edilen 129 nm nanopartikül çapına yakın değerde olduğu belirtilmiş ve benzer sonuçların elde edilmiştir.

TPP çözeltisi CS çözeltisine eklenirken CS çözeltisinin manyetik karıştırıcı üzerindeki hızı oluşan parçacık boyutu üzerinde etkili olan bir diğer parametredir. Optimum bir karıştırma TPP'nin CS çözeltisi içerisinde çözünmesini hızlandırmasıyla birlikte CS zincirleriyle daha hızlı bir bağlanma sonucu NP boyutunda azalma sağlayabilmesinin aksine güçlü bir karıştırma ise parçacıklar arasındaki itici kuvveti yok ederek parçacıkların toplanmasına neden olabilmektedir (Fan ve ark., 2012; Jonassen ve ark., 2012). Algharib ve arkadaşları parçacık boyutlarını manyetik karıştırıcıda 500 rpm için $138,50 \pm 0,50$, 1000 rpm için $67,17 \pm 0,77$ ve 1000 rpm üzeri için $105,50 \pm 0,50$ tespit etmişlerdir (Algharib ve ark., 2022). Bu çalışmaya göre CSNP deney gruplarındaki manyetik karıştırıcı değeri 800 rpm olarak ayarlandı bu açıdan istenilen nanopartikül boyutunu elde etmek için gereklidir.

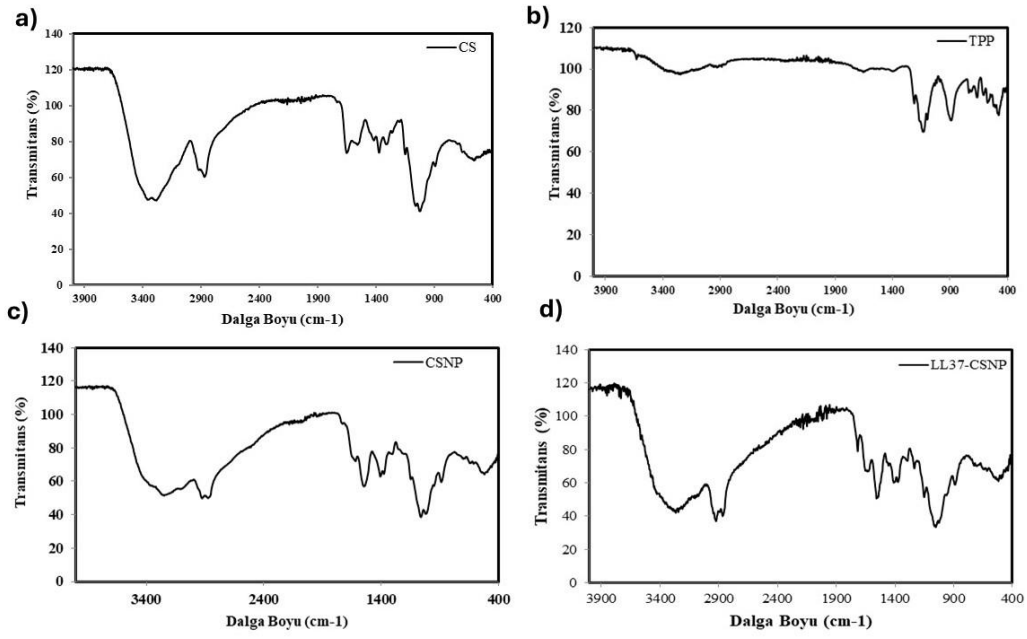
Süspansiyonlarda parçacık boyutu dağılımını incelemek amacıyla PDI kullanılır (Algharib ve ark., 2022). PDI'nin küçük değerlerde olması düzgün ve homojen parçacık

dağılımını, PDI'nin daha yüksek değerlerde olması ise çeşitli parçacık boyut aralığını göstermektedir (Hassan ve ark., 2018). Özellikle deney gruplarındaki PDI değerlerinin 0,2 ile 0,4 aralığında kalması benzer bir çalışmada olduğu gibi homojen dar bir boyut dağılımına işaret etmektedir. PDI değerlerindeki artışın meydana gelmesi artan CS konsantrasyonu sebebi olarak CSNP'ler üzerinde aglomerasyon oluşturma eğilimiyle artan polidispersiteye zemin oluşturmaktadır. Algharib ve arkadaşlarının CS konsantrasyonları 0.3'ten 5 mg/ml arasında iken alınan PDI değerleri 0.27 ± 0.02 'den 0.67 ± 0.05 'e yükselmesiyle tespit edilmektedir (Algharib ve ark., 2022).

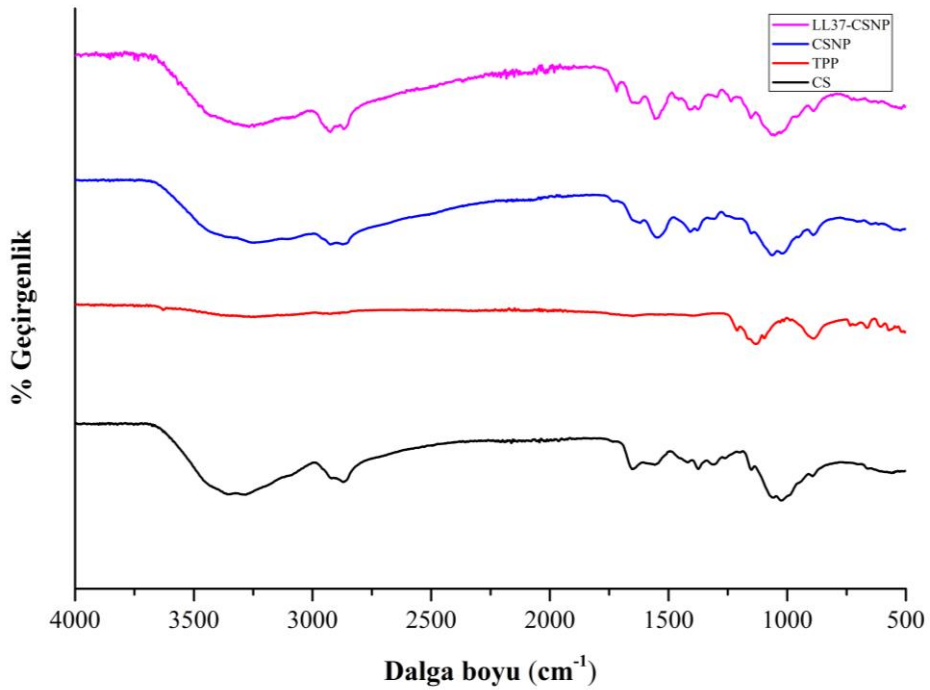
ZP değeri özellikle nanopartiküllerin stabilitesini belirleyen bir faktördür. Üretilen nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesi için $> + 30$ mV ve < -30 mV'lik bir parçacık yükü standardıdır (Nallamuthu ve ark., 2015). Dolayısıyla deney gruplarında CSNP'lerin ZP değer sonuçları partiküllerin oldukça iyi stabiliteye sahip olduklarını göstermektedir. Lazaridou ve arkadaşlarının çalışmaları benzer şekilde CSNP'lerin ZP değerlerinin pozitif ve $37.6-40.1$ mV arasında değiştiğini bildirmiştir (Lazaridou ve ark., 2020). Nanopartiküllerin yüksek ZP değerleri hücre zarının negatif yüklü olması nedeniyle etkileşime girerek hücre alımının artmasına fayda sağlayacaktır (Algharib ve ark., 2022). Çalışmada CSNP(1-2-3-4) ve 15-LL37-CSNP grupları için ZP değerleri $> + 30$ mV kriterine uygunluğu üretilen nanopartiküllerin oldukça iyi stabilite sergilediğini göstermektedir.

4.1.3. FTIR analiz sonuçları

FTIR analiz için cihazın sensörüne 1 mg CS, TPP, CSNP, LL37-CSNP numunelerinden alınarak FTIR spektrumları elde edildi ve daha sonra CS, TPP, CSNP ve LL37-CSNP örneklerinde bulunan fonksiyonel gruplar 4000 ile 400 cm^{-1} arasındaki çözünürlükle kaydedildi. FTIR analiz sonuçları Şekil 4.3'te CS, TPP, CSNP ve LL37-CSNP için ayrı ayrı ve Şekil 4.4'te karşılaştırılmış olarak tek grafikte gösterilmektedir.



Şekil 4.3. CS, TPP, CSNP ve LL37-CSNP FTIR spektrumu



Şekil 4.4. Çakıştırılmış FTIR spektrumu

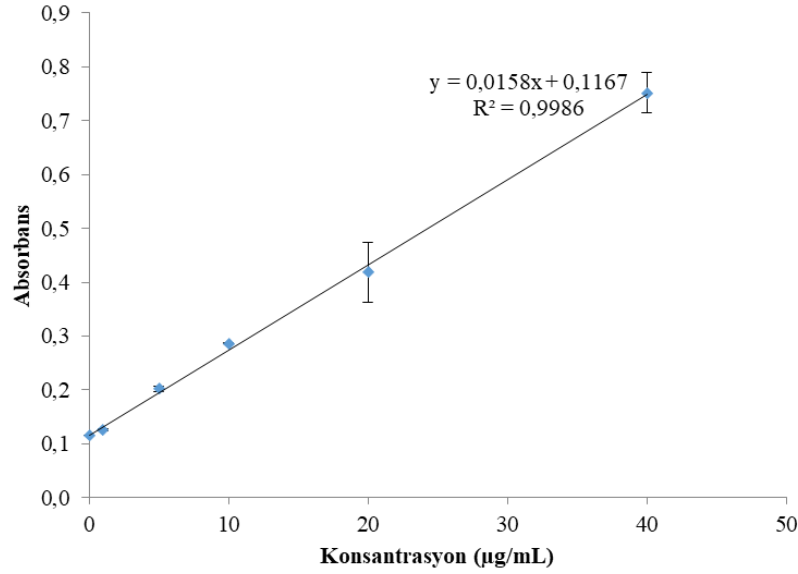
Saf CS spektrumunda yer alan spesifik FTIR pikleri sırasıyla $3353,74 \text{ cm}^{-1}$ OH gerilmesi olan geniş bir pik, $3282,98 \text{ cm}^{-1}$ N-H gerilmesi, $2922,23 \text{ cm}^{-1}$ CH_2 asimetrik gerilmesi, $2869,83 \text{ cm}^{-1}$ CH_3 simetrik gerilmesi, $1652,98 \text{ cm}^{-1}$ C=O (Amid I) gerilmesi, $1562,86 \text{ cm}^{-1}$ N-H (Amid II) bükülmesi, $1425,10 \text{ cm}^{-1}$ CH_2 bükülmesi, $1374,34 \text{ cm}^{-1}$ CH_3

simetrik gerilmesi, 1150 cm^{-1} C-O-C asimetrik gerilmesi görülmektedir. TPP spektrumunda yer alan spesifik FTIR pikleri sırasıyla $1396,14\text{ cm}^{-1}$ P=O simetrik gerilmesi, $1210,38\text{ cm}^{-1}$ P=O asimetrik gerilmesi, $1096,72\text{ cm}^{-1}$ PO_3^{-2} simetrik gerilmesi, $888,38\text{ cm}^{-1}$ P-O-P bükülmesi görülmektedir. CSNP spektrumunda $3245,36\text{ cm}^{-1}$ OH gerilmesi, $2922,25\text{ cm}^{-1}$ CH_2 asimetrik gerilmesi, $2871,58\text{ cm}^{-1}$ CH_3 simetrik gerilmesi, $1618,19\text{ cm}^{-1}$ C=O (Amid I) gerilmesi, $1548,75\text{ cm}^{-1}$ N-H (Amid II) bükülmesi, $1149,58\text{ cm}^{-1}$ P=O asimetrik gerilmesi, $1062,74\text{ cm}^{-1}$ C-O-C gerilmesi, $890,76\text{ cm}^{-1}$ P-O-P bükülmesi görülmektedir. CS ve TPP'nin çapraz bağlandığını söyleyebilmek için CSNP'lere ait spektrumda fosforik grup ile amonyum grubunun etkileştiğini göstermek gerekmektedir (Xu ve Du, 2003; Qi ve ark., 2004). $1618,19\text{ cm}^{-1}$ ve $1548,75\text{ cm}^{-1}$ NH_2 grubu ve P=O grubunun etkileştiğini böylelikle TPP ile CS arasındaki iyonik çapraz bağları doğrular. $3245\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ aralığında OH ve NH_2 gruplarının varlığı CS'nin yapısal bütünlüğünü koruyarak hidrojen bağlarının arttırmasıyla yeni etkileşimler oluşturmuştur. $1149,58\text{ cm}^{-1}$, $1062,74\text{ cm}^{-1}$, $1017,90\text{ cm}^{-1}$ ve 890 cm^{-1} TPP'a ait P=O ve P-O-P yapılarının CSNP içinde yer aldığını göstermektedir.

LL37'nin FTIR spektrumunda yer aldığı pik için bir çalışmaya göre LL37 ve türevlerinin ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde LL37'nin spektrumunda $1653\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde dar bir ana pik gözlemlendiği ve bu bölge α -helikal proteinlerinin amid I bandında maksimumunun bulunduğu bildirilmiştir (Nagant ve ark., 2012). Benzer şekilde farklı bir çalışmaya göre LL37 peptit varlığı amid I bandında $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ aralığında gösterilmektedir (Oren ve ark., 1999). Literatürdeki çalışma sonuçlarına göre tespit edilen net pik LL37-CSNP spektrumunda $1653,66\text{ cm}^{-1}$ Amid I bandında dar bir pik vermesi sonucu önceki çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Bu durum LL37'nin CSNP içeriğine başarılı şekilde enkapsüle olduğunu doğrulamaktadır.

4.1.4. LL37 enkapsülasyon verimliliği (%EE)

Şekil 4.5'te LL37'nin CSNP içindeki enkapsülasyon verimliliği Micro BCA protein testi içerisindeki albümin standart ($40\text{-}20\text{-}10\text{-}5\text{-}1\text{-}0\text{ }\mu\text{g/mL}$) kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. Albümin standart kalibrasyon eğrisi

Üç farklı LL37-CSNP grubunun %EE değerleri Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Çizelge 4.2. Yüklenen net LL37 konsantrasyonlarına göre % EE

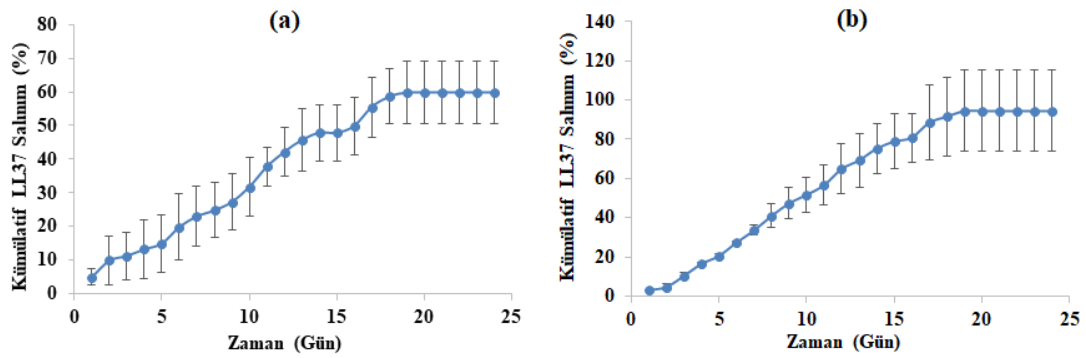
LL37 (µg/mL)	EE (%)
30 µg/mL	55,57 ± 11,90
15 µg/mL	80,32 ± 4,94
7,5 µg/mL	97,81 ± 2,72

Çizelge 4.2’ye göre kapsülleme sırasıyla 30 µg/mL, 15 µg/mL ve 7,5 µg/mL konsantrasyonlarda yüklenen LL37 değerinin %EE değerleri sırasıyla %55,57, %80,32, %97,81 olarak hesaplandı. Rashki ve arkadaşlarının çalışmasında LL37'nin CS-NP içindeki kapsülleme verimliliği %86,9 bulunmuştur (Rashki ve ark., 2022). Nair ve arkadaşlarının çalışmasında kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerinin formülasyonları 5:1, 4:1, 3:1 orantılarına göre kapsülleme verimlilikleri sırasıyla %80,4, %80,2 ve %88,4 bulunmuştur (Nair ve ark., 2019). Çalışmaya göre CS:TPP hacim oranı düştükçe kapsülleme verimliliğinin artış göstermesi mevcut tez çalışmasında CS:TPP hacim oranının 2:1 olmasıyla kapsülleme verimliliğinin başarılı olması arasındaki ilişki açısından oldukça benzerdir. Benzer bir diğer çalışmada ise, temporin B'nin (TB) CS-NPs içine kapsülleme verimliliği yaklaşık %75 olarak bulunmuştur (Piras ve ark.,2015). Literatürde yer alan çalışmalarla mevcut tez çalışmasındaki bulgular benzerlik göstermektedir.

4.1.5. CSNP'lerden LL37 *in vitro* salım kinetiği

CSNP'lerden ilaç salınımı, terapötik etkileri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Herdiana ve ark., 2022). Farklı şekil ve boyutlardaki CSNP'ler, fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ilaç salınımını etkiler. Bozulma hızı, kimyasal bileşim, moleküler ağırlık (MW), çözünürlük nanopartiküllerin salınımını etkileyecektir. Hatta ilaç-ilaç veya ilaç-polimer etkileşimlerinin de ilaç salınımını önemli ölçüde etkilediği görülmektedir (Iacob ve ark., 2021).

LL37'nin 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP 24 günlük salım profili PBS'te (pH 6.8), 37 °C'de Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. (a) 7,5-LL37-CSNP'den LL37 salım profili, (b) 15-LL37-CSNP'den LL37 salım profili

7,5-LL37-CSNP'den LL37 kümülatif salım %59,86, 15-LL37-CSNP'den 24 gün sonunda kümülatif salım %94,39 olarak hesaplandı. 18.güne kadar doğrusal ve sürekli yavaş bir salım olduğu 18.günden 24.güne kadar salımın tamamlandığı gözlenmektedir. LL37'nin salımının 18 gün sürmesi LL37-CS etkileşiminden kaynaklanmış olabilir. Tıǧlı Aydın ve Pulat'ın çalışmasında pH değişimine bağlı olarak *in vitro* salım çalışmasında kitosandan Fluorouracil (5-FU)'in kontrollü ve sürekli salındığını ancak 408 saatlik inkübasyon süresinden sonra değişen pH ortamlarına bağlı olarak kümülatif salım miktarlarının %29,1-60,8 arasında değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (Tıǧlı Aydın ve Pulat, 2012). LL37 kapsüllenmesi, LL37'nin kararsızlık ve hızlı bozunmasına karşı korunmayı sağlamak ve terapötik etkinin sağlanmasını amaçlamaktadır (Lin ve ark., 2020; Ramos ve ark., 2011; Fahimirad ve ark., 2021). Ancak LL37'nin CSNP'den yavaş salınma nedenlerinden biri CSNP'lerin sert ve hidrofobik çekirdeği, yüklenmiş LL37'nin çekirdekten difüzyonunu kısıtlamaktadır. CSNP'lerin dış ortama nüfuz etmesi sonrası

polimerin parçalanarak yüklenen LL37'nin dış ortama difüze olması zaman alacağı bildirilmiştir (Li ve ark., 2018).

In vitro salım kinetiğinde modellemeyi belirlemek için, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarının gözlemi ile doğrusal olmayan fonksiyon arasındaki en yakın uyumu sağlayan parametreler kullanılarak yapılmıştır. Salınım verilerine en iyi uyum sağlayan model, başlık 3.2.3.5. *In Vitro* Salım'da anlatılan modellerdeki korelasyon katsayısı (R^2) temel alınarak seçilmiştir. LL37'nin CSNP'lerden salınım kinetiğini karakterize etmek amacıyla, deneysel verilere matematiksel modeller uygulanmış ve en iyi uyum sağlayan model, en yüksek korelasyon katsayısı (R^2), en düşük RMSE, RSS, AIC, BIC değerine göre seçilmiştir. Salım kinetiği modellerine uygunluğun belirlenmesi sürecinde, matematiksel hesaplamaların ve grafiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için Python tabanlı Google Colab programı kullanılmıştır. Çizelge 4.3'e göre, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'nin salınım profilleri, birinci dereceden salınım modeline en uygun bulunmuştur. LL37 salım hızı kapsül içerisinde kalan miktara bağlı olup bu durum gecikmeli ama sabit bir salım süreci varlığını göstermektedir. Birinci dereceden salım kinetiğinde, aktif maddenin salım hızı kalan ilaç miktarına orantılıdır. Yani, ilaç miktarı azaldıkça salım hızı da azalmaktadır.

Çizelge 4.3. 7.5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'den 24 günlük salım kinetiklerinin R^2 değerleri

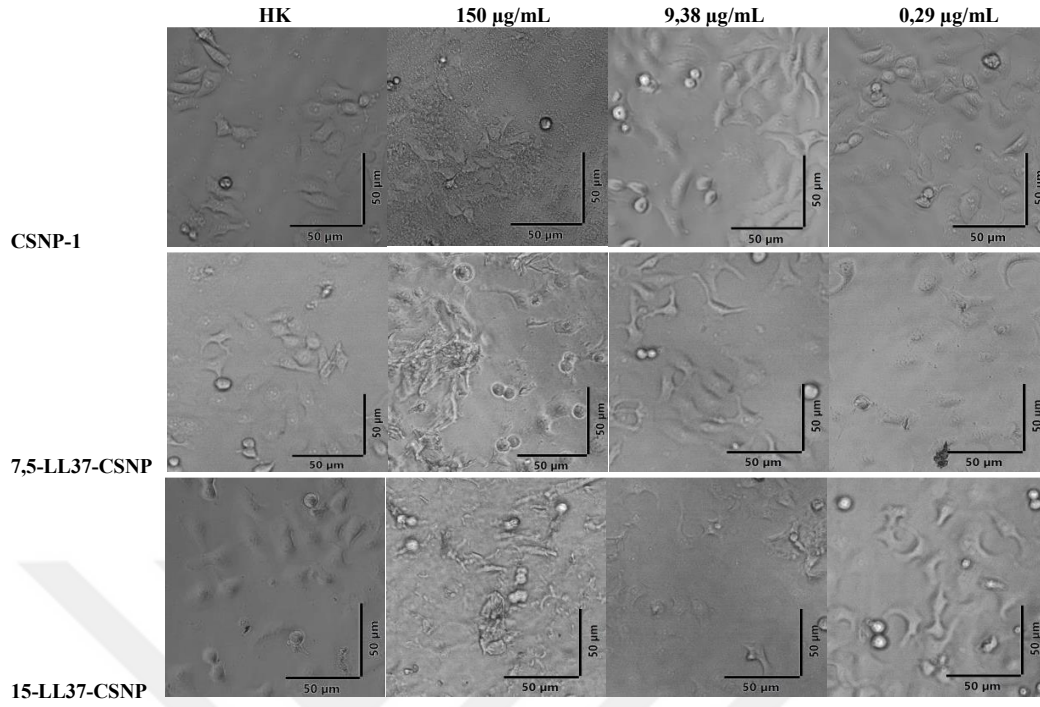
Salım Kinetik Modeli	7.5-LL37-CSNP					15-LL37-CSNP				
	R^2	RMSE	RSS	AIC	BIC	R^2	RMSE	RSS	AIC	BIC
Birinci Dereceden Salım Kinetiği	0,98	2,87	197,80	54,62	56,98	0,97	5,32	679,64	84,24	86,60
Korsmeyer Peppas	0,97	3,39	276,06	62,62	64,98	0,96	6,28	945,50	92,17	94,52
Sıfıncı Dereceden Salım Kinetiği	0,96	3,94	371,63	69,76	72,11	0,95	7,03	1186,55	97,62	99,97
Hixson Crowell Salım Kinetiği	0,90	6,12	898,58	90,95	93,30	0,87	11,353	3091,37	120,60	122,96
Higuchi Salım Kinetiği	0,88	6,67	1069,23	93,12	94,30	0,85	12,59	3804,77	123,58	124,76

Sun ve diğerlerinin çalışmasında 5-FU yüklü kitosan nanopartikülleri (5-FU-CN) hazırlanmış ve sürekli salınım davranışları *in vitro* salınım ve *in vivo* farmakokinetik çalışmalarla araştırılmıştır. 5-FU-CN'nin birinci dereceden kinetik modele uyduğunu bildirmişlerdir (Sun ve ark., 2017). Benzer şekilde Nasri ve diğerlerinin çalışmasında

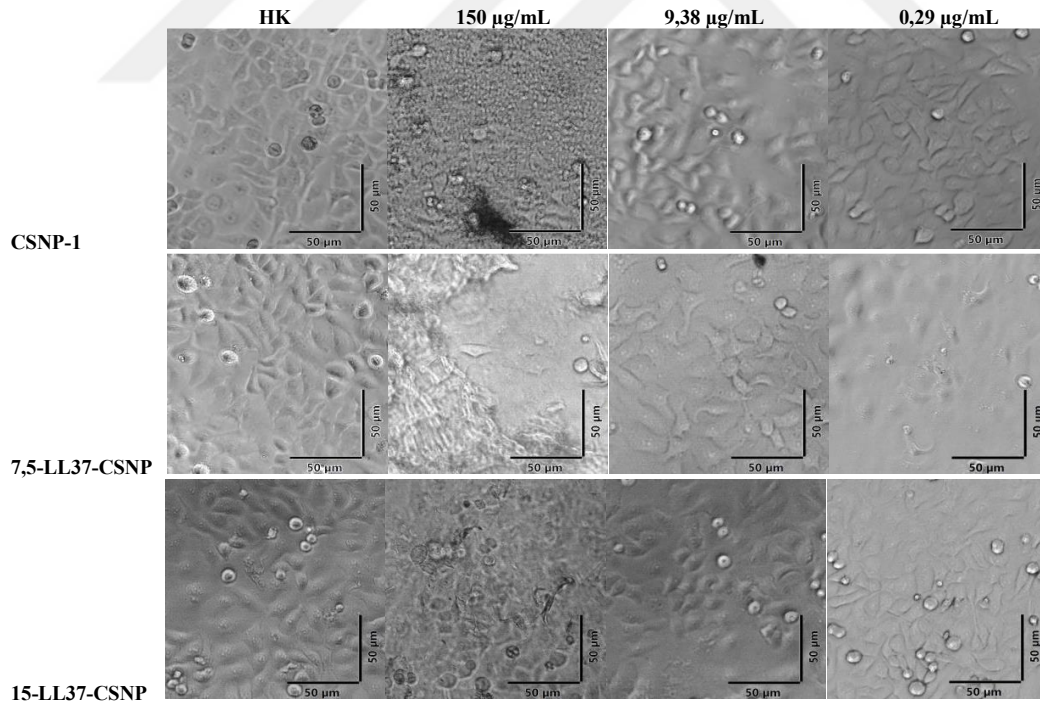
mikropartiküllerin (MP'ler) en iyi kinetik modeli, en yüksek R^2 değerinin belirlenmesi yoluyla değerlendirilmiştir. Genel olarak, kitosan MP'lerinden biyopeptitlerin salınım kinetiği birinci derece (0,992–0,995) ve Korsmeyer–Peppas (0,995–0,996) modellerine iyi uymuştur (Nasri ve ark., 2021). Bu bulgular, mevcut çalışmanın bulguları ile tutarlıdır. Mevcut çalışmanın bulguları, LL37 yüklü CSNP'lerin 24 gün boyunca devam eden uzun bir salım süreciyle birlikte zamanla kapsüldeki LL37 miktarı azaldıkça, salım hızı da azalmıştır ve salınan LL37 miktarının değişimi logaritmik halde gerçekleşen salım profilini doğrulamaktadır. LL37 ile CSNP arasındaki güçlü etkileşim, sert nanopartikül çekirdeğiyle birleşerek, yavaş bir salım kinetiği gözlenir. LL37'nin CSNP'ler içinde kapsüllenmesi, sürekli salım ve stabiliteyi sağlayarak terapötik potansiyelini artırmak için umut verici bir strateji sunmaktadır. Tez çalışmasında üretilen 15-LL37-CSNP'lerin salım kinetiği, literatürle uyumludur ve CSNP tabanlı ilaç dağıtım sistemlerini tahmin etmede birinci dereceden salım profili uygulanabilirliğini göstermektedir.

4.1.6. CSNP ve LL37-CSNP'lerin biyoyumluluk testi sonuçları

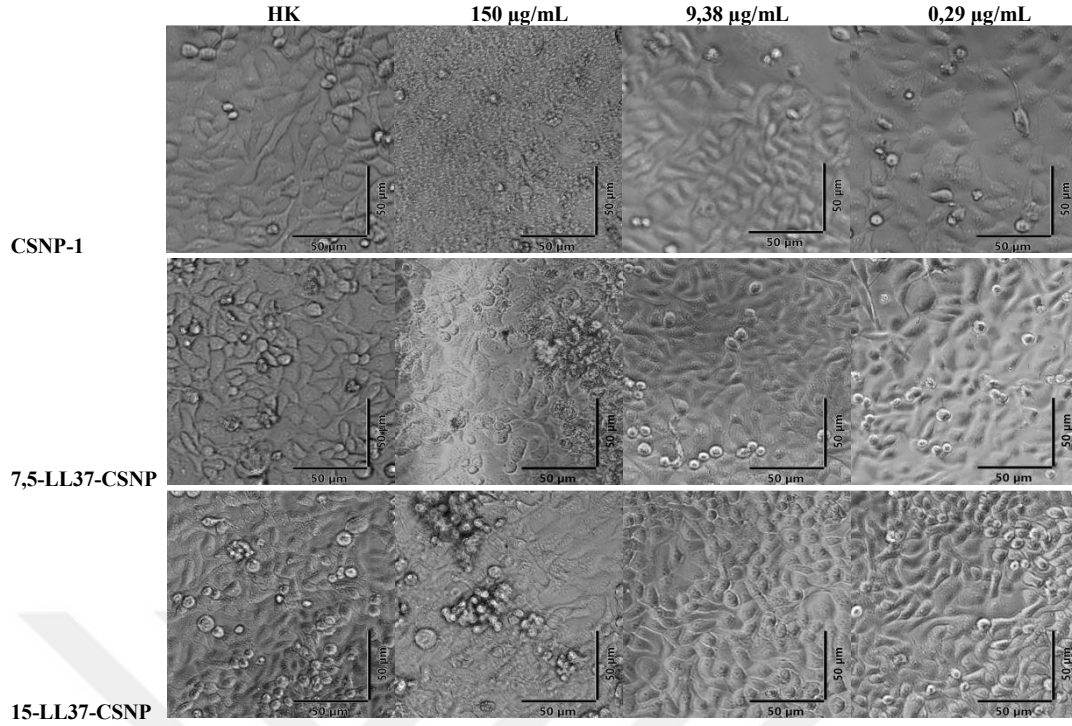
CSNP-1 ve LL-37 enkapsüle edilmiş 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları keratinosit hücrelerinin canlılık ve üremesine etkisi analiz edilmiş ve en yüksek konsantrasyon olan 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP'lerin hücre canlılığı dahi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NP'lerin biyoyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.7, 4.8, 4.9'da CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'lere ait 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası kontrol ve NP gruplarının hücre morfolojileri gösterilmektedir.



Şekil 4.7. 150 $\mu\text{g/mL}$, 9,38 $\mu\text{g/mL}$, 0,29 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ (Kontrol) CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP ile 24 saat inkübasyon ardından hücre görüntüleri.

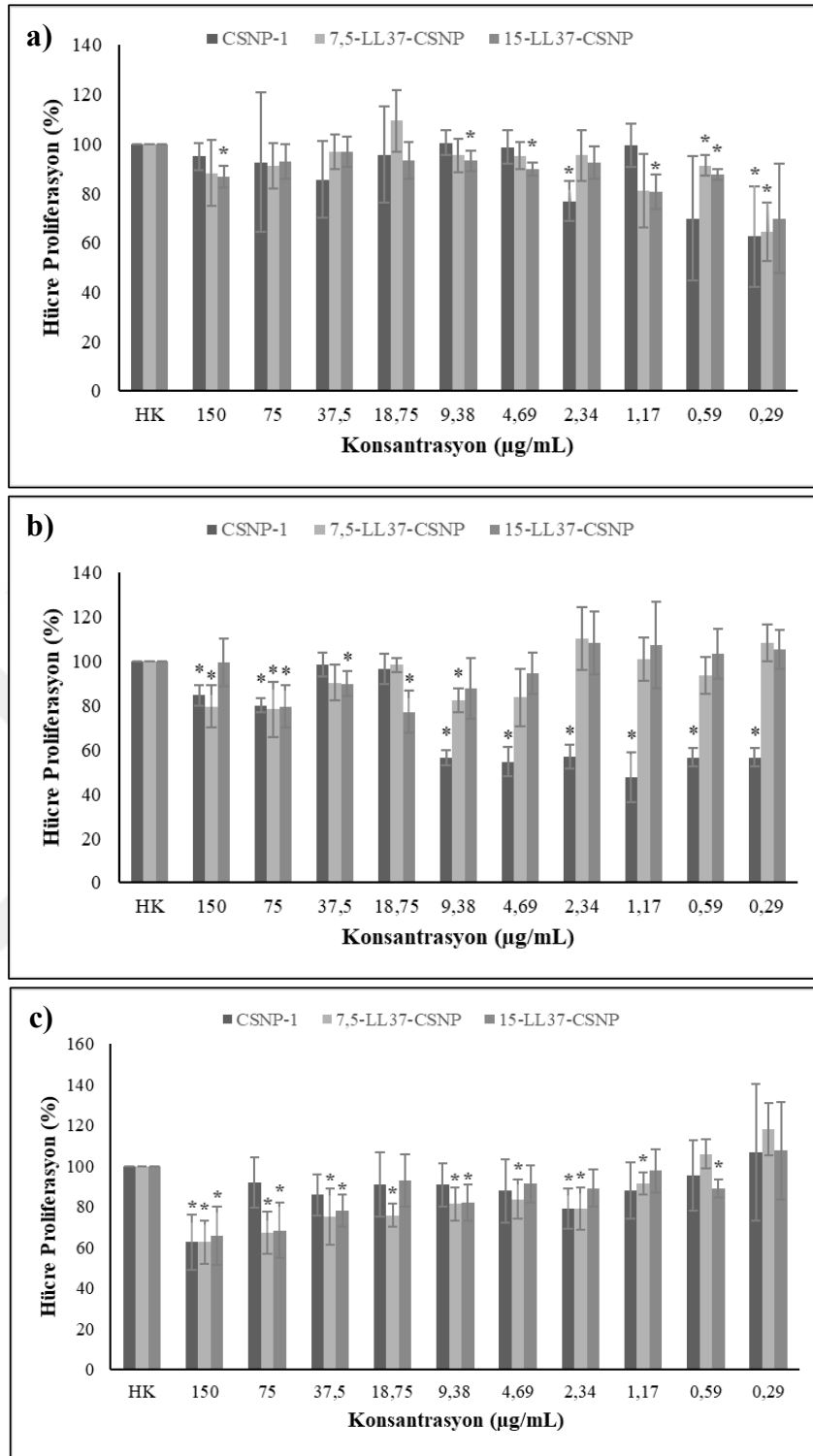


Şekil 4.8. 150 $\mu\text{g/mL}$, 9,38 $\mu\text{g/mL}$, 0,29 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ (Kontrol) CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP ile 48 saat inkübasyon ardından hücre görüntüleri.



Şekil 4.9. 150 µg/mL, 9,38 µg/mL, 0,29 µg/mL, 0 µg/mL (Kontrol) CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP ile 72 saat inkübasyon ardından hücre görüntüleri.

Şekil 4.10'da CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarına ait 24, 48 ve 72 saat sonundaki 10 farklı dozda hücre proliferasyon yüzde grafiği verilmiştir.



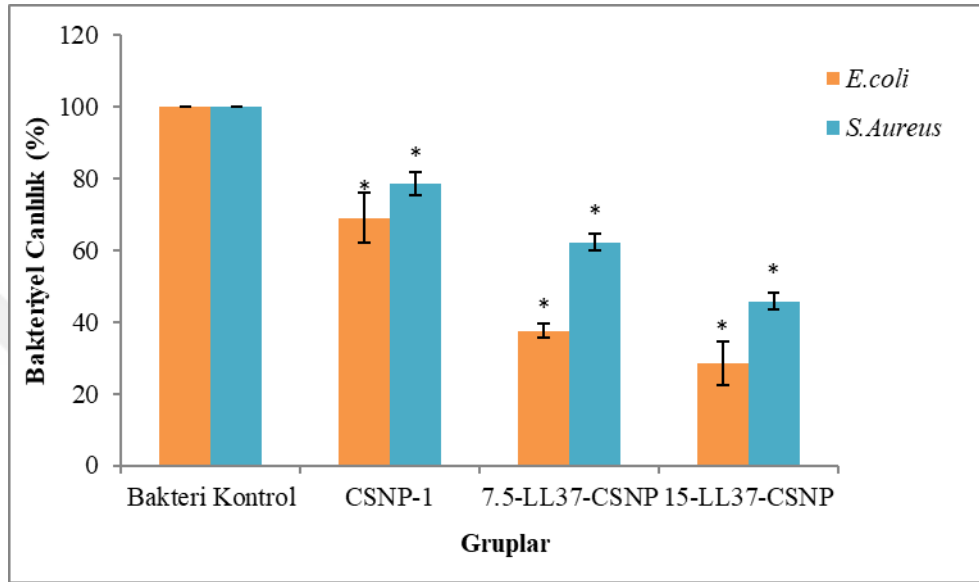
Şekil 4.10. CSNP formülasyonlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri: CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'nin a) 24 saat b) 48 saat c) 72 saat inkübasyon ardından hücre üreme analiz sonuçları

Bu çalışmada, istatistiksel analizler Student's t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve her test grubu kendi içerisinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklar gösterilmiştir (*). Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3).

Çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarının keratinosit hücreleri üzerindeki biyoyumlulukları, MTT analiziyle 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, zaman ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunda anlamlı değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir (* $p < 0,05$). 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda (Şekil 4.10a), genel olarak tüm gruplarda hücre proliferasyon oranları kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyede kalmış, yalnızca CSNP-1 grubunun 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir (* $= p < 0,05$). Bu azalış ise yine biyoyumluluk sınırlarında olup hücre canlılığı % 94,86 canlılık seviyesindedir. Diğer konsantrasyonlarda ve gruplarda anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, nanoparçacıkların 24 saatlik kısa süreli maruziyetlerinde hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığını ve biyoyumlu olduğunu göstermektedir. 48 saatlik inkübasyonda (Şekil 4.10b) ise, yalnızca boş CSNPlerin %70 in altında bir hücre proliferasyonuna neden olduğu görülmektedir. Diğer grupların farklı konsantrasyonları ise biyoyumluluk sınırları içerisinde etki göstermişlerdir. Yüksek doz CSNP-1 (150 ve 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gruplarında da anlamlı fark gözlenmiştir. Bu durum, LL37'nin salımı ile artan maruziyet süresinin, hücre proliferasyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterebileceğini düşündürmektedir. 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlar (Şekil 4.10c), konsantrasyona bağlı toksik etkinin arttığını söylenebilir (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarının çoğu konsantrasyonlarında hücre proliferasyon oranı anlamlı şekilde azalmış olsa da halen biyoyumluluk sınırları içerisinde hücre canlılığı gözlenmiştir (* $= p < 0,05$). En düşük proliferasyon oranları, özellikle LL37 yüklü nanoparçacıkların yüksek konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Bununla birlikte, daha düşük konsantrasyonlarda ($\leq 1,17 \mu\text{g}/\text{mL}$) 15-LL37-CSNP grubu, hücre canlılığı açısından daha stabil ve biyoyumlu sonuçlar vermiştir. Bu bulgular, LL37 içeren nanoparçacıkların etkilerinin hem doz hem de zaman bağımlı olduğunu göstermektedir. Özellikle uzun süreli uygulamalarda düşük konsantrasyonlar tercih edildiğinde biyoyumluluk korunmakta, böylece güvenli bir doz aralığı tanımlanabilmektedir. Benzer şekilde Costa ve diğerleri, hücre metabolizma üzerindeki etki için, CSNP'lerinin koşulları kontrolle karşılaştırıldığında test edilen tüm konsantrasyonların keratinosit hücreleriyle biyoyumlu olduğunu görmenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir (Costa ve ark., 2023). Bir diğer çalışmada, Piras ve diğerleri serbest temporin B'nin CS-NP'lere yüklenmesi sonrası peptidin memeli hücrelerine yönelik sito-uyumluluk değerlendirmesinde toksisite profilini azaltmadaki mükemmel rolü gösterilmiştir (Piras ve ark., 2015).

4.1.7. CSNP ve LL37-CSNP'ler için antibakteriyel duyarlılık test sonuçları

Şekil 4.11'de CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları için *E.coli* ve *S.aureus* bakteri türleri üzerindeki yüzde bakteriyel canlılık grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.11. CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP'lerin *E.coli* ve *S.aureus* bakteri türlerinin canlılıklarına etkisinin grafiksel gösterimi

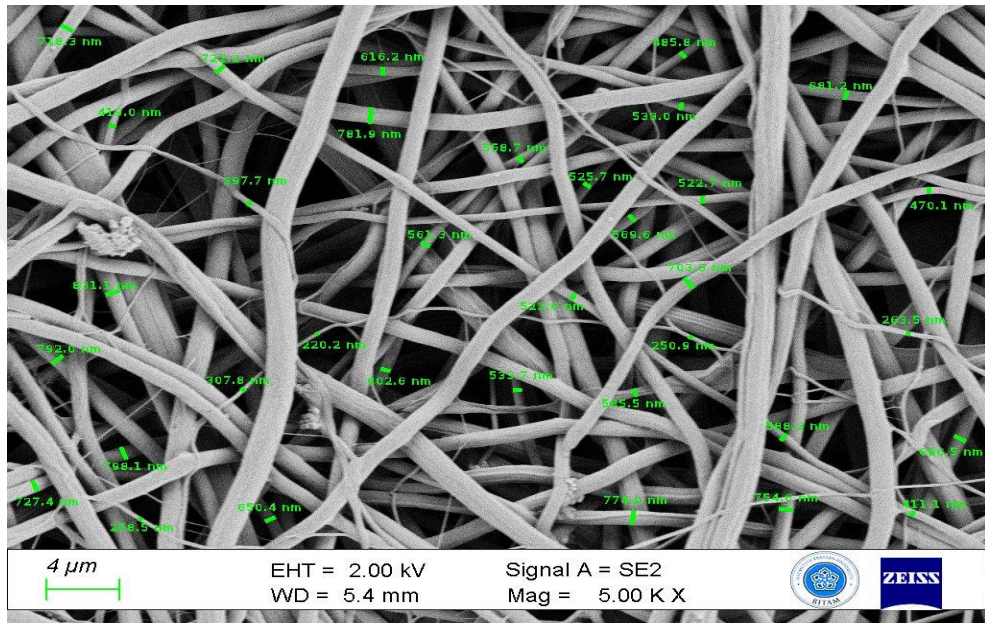
CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarının antibakteriyel etkileri, *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde yapılan *in vitro* canlılık analizleri ile değerlendirilmiştir. Deneyler, n = 3 (üç tekrarlı) olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma (\pm SD) şeklinde sunulmuştur. Her test grubu kendi kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve gruplar arası farklılıkların istatistiksel analizi için Student's t-testi kullanılmış olup, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark gösteren gruplar yıldız (*) işareti ile belirtilmiştir. CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP gruplarının antimikrobiyal etkinlikleri, *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde bakteriyel canlılık (%) temel alınarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Grafik incelendiğinde, tüm deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla bakteriyel canlılıkta anlamlı derecede azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$), bu da LL37 enkapsülasyonunun antibakteriyel etkinliği önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. *E.coli* üzerindeki etki, kontrol grubunda %100 canlılık gözlenirken, CSNP-1 uygulaması ile canlılık oranı yaklaşık %70'e düşmüş ve bu durum CS nanoparçacıklarının sınırlı da olsa kendiliğinden antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ancak LL37 yüklenmesiyle bu etki anlamlı şekilde artmıştır. 7,5-

LL37-CSNP grubunda canlılık %50 düzeyine, 15-LL37-CSNP grubunda ise yaklaşık %35'e düşmüştür. Bu durum LL37 konsantrasyonuna bağlı olarak doza bağımlı bir antibakteriyel etkinliğin varlığını göstermektedir. *S.aureus* üzerindeki etki için benzer bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak, genel olarak bu bakterinin *E.coli*'ye göre daha dirençli olduğu görülmüştür. CSNP-1 grubunda canlılık oranı ~%80, 7,5-LL37-CSNP grubunda ~%65, 15-LL37-CSNP grubunda ise ~%50 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, Gram pozitif bakterilerin daha kalın peptidoglikan tabakasına sahip olması nedeniyle LL37 penetrasyonunun zorlaştığını ve bu sebeple etkinliğin görece daha az olduğunu düşündürmektedir. Grafikte tüm deney gruplarındaki canlılık azalmaları * ile gösterilmiş olup, bu grupların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p<0,05$) ortaya koymaktadır. LL37 konsantrasyonu arttıkça her iki bakteriye karşı da antibakteriyel etkinlik belirgin şekilde artmıştır. En yüksek etki, 15-LL37-CSNP grubunda gözlenmiştir. Gram negatif *E.coli*, Gram pozitif *S.aureus*'a kıyasla LL37'ye karşı daha duyarlı bulunmuştur. Ek olarak CSNP'ler içeriğindeki CS özelliklerinin verdiği antimikrobiyal etkiye ek olarak partiküllerin nano boyutları oldukça büyük yüzey alan potansiyeline sahip olmaktadır (Shukla ve ark., 2013; Ing ve ark., 2012). Noore ve diğerlerinin çalışmasında LL-37'nin, konvansiyonel antibiyotiklere kıyasla hem hücre dışı hem de hücre içi *S. aureus*'u hızlı bir şekilde ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Noore ve ark., 2013). Neshani ve arkadaşlarının çalışmasında LL37'nin öldürücü yeteneğe sahip geniş antimikrobiyal profilinin (*Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterokoklar* ve *Escherichia coli*) olduğunu rapor edilmiştir (Neshani ve ark., 2019). Literatürde yer alan çalışmalara paralel olarak LL37'nin *S.aureus* (gram pozitif) ve *E.coli* (gram negatif) üzerindeki antimikrobiyal etkinliği, tez çalışmasındaki LL37 yüklü CSNP'lerin antibakteriyel etki mekanizmasını genişlettiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde diğer çalışmalardan birinde Piras ve arkadaşları, TB yüklü CS-NP'lerin *Staphylococcus epidermidis* suşlarına karşı antibakteriyel etkisini en az 4 gün boyunca araştırmışlardır. Sonuçlar, Temporin B yüklü CS-NP'lerin, CS-NP'lere kıyasla bakterilerin sayısında (CFU/ml) yaklaşık 4-log'luk bir azalma sağladığını göstermiştir (Piras ve ark., 2015). Bir diğer çalışma, Almaaytah ve diğerleri, antibakteriyel RBRBR-CS-NP'lerin *S.aureus* suşları üzerindeki etkisi 4 gün boyunca incelenmiştir. Geliştirilen nanoformülasyonun kontrol bakterilerine kıyasla CFU/mL sayısında 5-log'luk bir azalma sağlayabileceğini göstermiştir (Almaaytah ve ark., 2017).

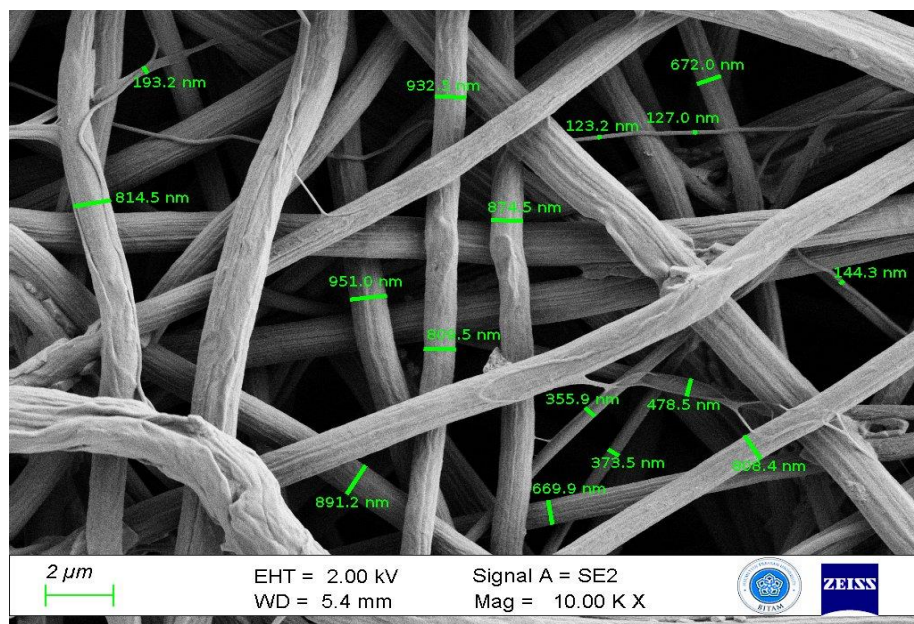
4.2. Fiber Matların Morfoji ve Karakterizasyon Sonuçları

4.2.1. Fiber matların FE-SEM analiz sonuçları

PCL/Jel matın fiber morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile incelendi. Şekil 4.12’de 5.00 kx ve Şekil 4.13’te 10.00 kx büyütme oranındaki fiber mat örneği gösterilmektedir.

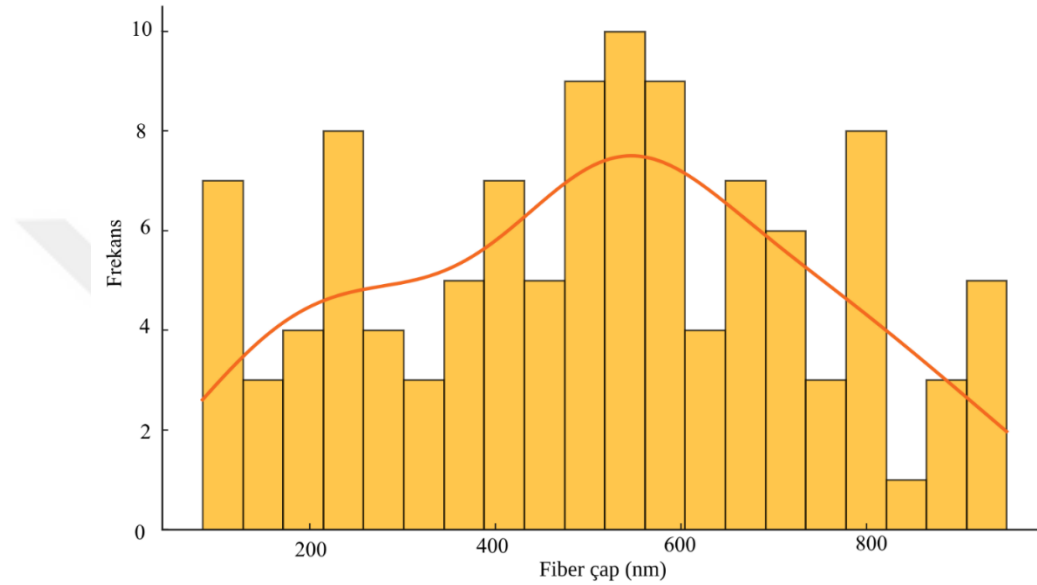


Şekil 4.12. PCL/Jel (60:40) 5.00 kX büyütme oranındaki fiber örneği



Şekil 4.13. PCL/Jel (60:40) 10.00 kX büyütme oranındaki fiber örneği

PCL/Jel (60:40) kompozit fiber mat üretiminde elektro-eğirme tekniği ile elde edilen fiberlerin çapını tespit edebilmek için yapılan FE-SEM analizlerinde image J görüntü işleme uygulamasına göre hesaplandı. PCL/Jel(60:40) kompozit mat üretiminde genel fiber çap ortalaması $510,3 \pm 227,62$ nm olarak hesaplandı. Şekil 4.14'te image-J'de ölçülen fiberlerin histogram dağılım grafiği gösterilmektedir.

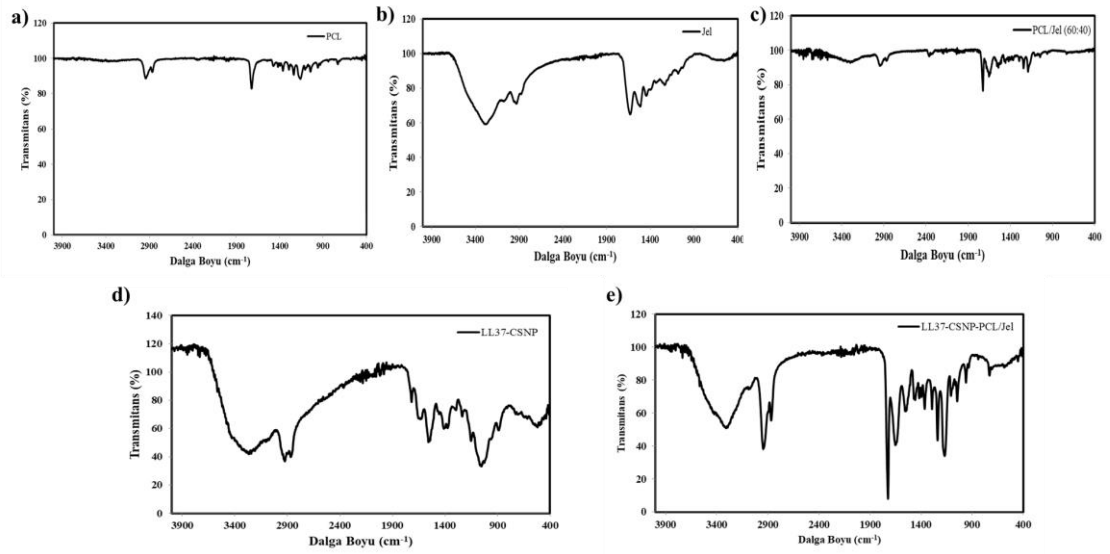


Şekil 4.14. PCL/Jel fiber çapların frekans-fiber çap (nm) histogram dağılım grafiği

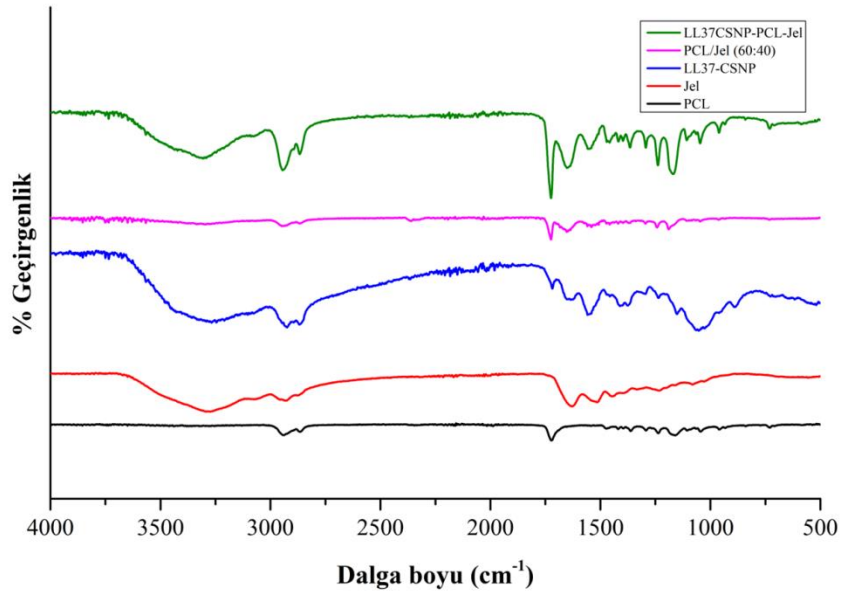
Fiber mat üretiminde parametrelerin fiber çapı üzerinde etkinliği oldukça yüksektir. Fiber mat üretiminde kullanılan polimerlerin moleküler ağırlığının artışı fiber çap ortalamasını arttırmaktadır. Benzer şekilde Zahiri ve arkadaşlarının çalışmasında elektro-eğirme yöntemiyle üretilen PCL/Jel (60:40) fiber mat örneğinin ortalama fiber çapının 1285 nm olarak hesaplanmıştır (Zahiri ve ark., 2020).

4.2.2. Fiber matların FTIR analiz sonuçları

FTIR analiz için cihazın sensörüne gereken miktarda PCL, Jelatin ve PCL/Jel(60:40) fiber mat numunelerinin FTIR spektrumları elde edildi. Elektrospun fiber mat kimyasal bağlanma tespiti için spektrumda yer alan fonksiyonel gruplar 4000 ile 400 cm^{-1} arasındaki çözünürlükle kaydedildi. Şekil 4.15'te PCL, Jelatin, PCL/Jel ve LL-37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel mat'ın FTIR spektrumları ayrı ayrı gösterilmiş ve Şekil 4.16'da spektrumlar çakıştırılmıştır.



Şekil 4.15. FTIR spektrumları a) PCL b) Jelatin c) PCL/Jel d) LL37-CSNP e) LL37-CSNP emdirilmiş PCL/Jel mat



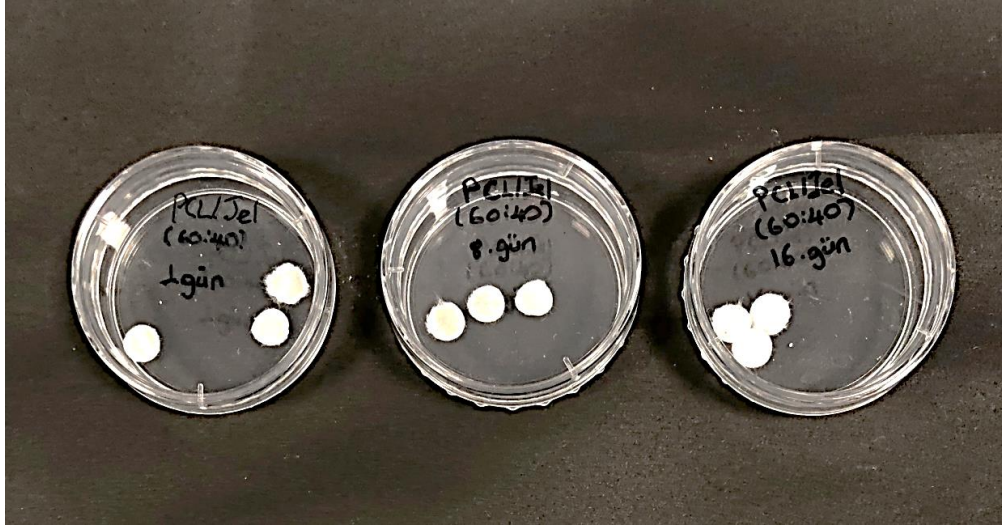
Şekil 4.16. LL37-CSNP-PCL/Jel (60:40) fiber matın bileşenlerinin FTIR spektrumu

PCL için spektrumda sırasıyla $2944,51 \text{ cm}^{-1}$ (asimetrik CH_2 gerilmesi), $2861,45 \text{ cm}^{-1}$ (simetrik CH_2 gerilmesi), $1720,88 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{C}=\text{O}$ ester karbonil grubu gerilmesi), $1291,39 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}-\text{O}$ gerilmesi), $1234,67 \text{ cm}^{-1}$ (asimetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilmesi), $1050,31 \text{ cm}^{-1}$ (simetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilmesi) bantlar gözlenmektedir. Jel için spektrumda sırasıyla $3272,40 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{N}-\text{H}$ gerilme titreşimi), $1629,80 \text{ cm}^{-1}$ (Amid I'in $\text{C}=\text{O}$ gerilmesi), $1515,06 \text{ cm}^{-1}$ (Amid II'nin

N–H bükülme titreşimi), 1445,88 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$ bükülme titreşimi), 1231,72 cm^{-1} (Amid III'ün N–H gerilmesi), 1072,59 cm^{-1} ve 1023,97 cm^{-1} (C=O gerilme titreşimi) bantları gözlenmektedir. PCL/Jel (60:40) fiber mat FTIR analizinde PCL'nin tüm karakteristik bantları ve jelatinin neredeyse tüm bantları gözlenmektedir. 3272,40 cm^{-1} 'deki karakteristik jelatin bandı PCL/Jel (60:40) bandında 3303,22 cm^{-1} şeklinde gözlenmektedir. Bu bandın varlığı PCL/Jel (60:40) spektrumunda düşük şiddette gözlenmektedir. Bunun nedeni, karıştırma işlemi jelatini yapı iskelesinin içine yerleştirmesi ve FTIR yoluyla tespit edilmesinin zorlaşması olabilir. PCL/Jel (60:40) kompozit fiber mat, orijinal olarak 1720,88 cm^{-1} ve 1291,39 cm^{-1} 'de bulunan PCL'nin karakteristik bantlarına karşılık gelen, 1724,20 cm^{-1} ve 1295,59 cm^{-1} 'de iki güçlü absorpsiyon bandı ortaya çıktı. Ayrıca jelatinin 1629,80 cm^{-1} 'deki ayırt edici amid bandı düşük yoğunluk göstermiş ve 1653,29 cm^{-1} civarına kaymıştır. 1540,72 cm^{-1} 'de amid grubunun özelliği olan başka bir bant tespit edildi. LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat FTIR spektrumu incelendiğinde emdirilmiş LL37-CSNP'e ait piklerin fiber mat spektrumunda tespit edildi. Özellikle enkapsüllemenin başarılı olduğunu ortaya koyan LL37'e ait α -heliks yapısının spektrumdaki karşılığı 1653–1654 cm^{-1} aralığında amid I bölgesinde olup LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat FTIR spektrumunda karşılığı 1655,10 cm^{-1} 'dir. Sonuç olarak PCL/Jel fiber mat LL37-CSNP emdirilerek LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat ismiyle fonksiyonelleştirilmiştir.

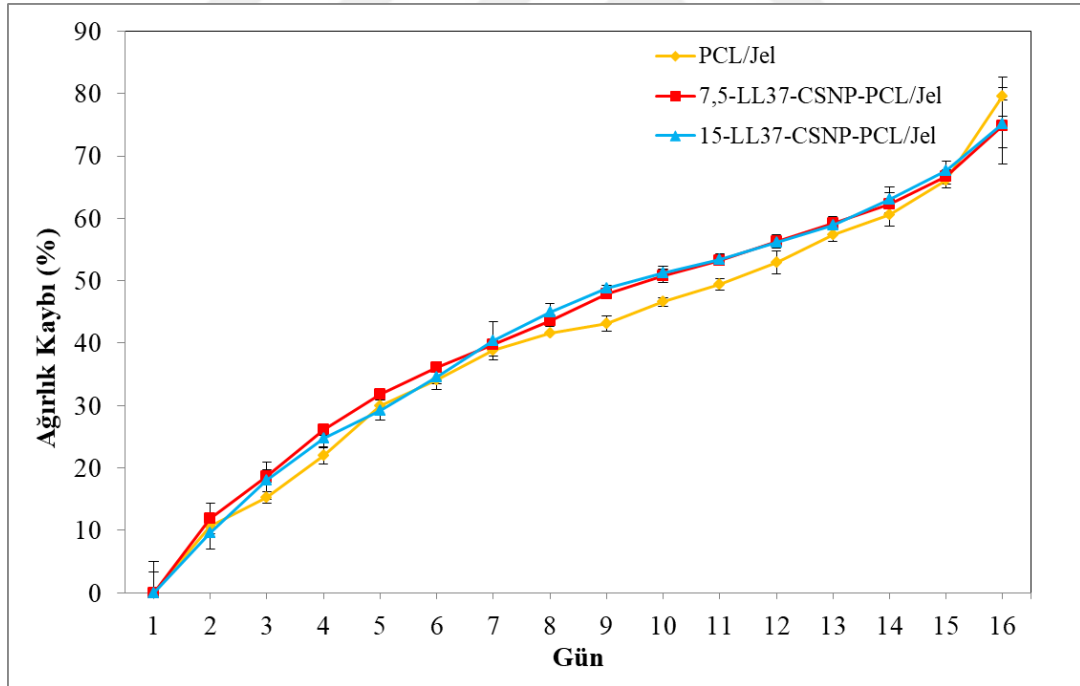
4.2.3. Fiber matların biyolojik bozunma/ağırlık kaybı analiz sonuçları

Şekil 4.17'de 6 mm çapında dairesel kesilen üç PCL/Jelatin fiber mat örneklerinin içeriğinde PBS solüsyonu bulunan flask içerisinde bekletilerek 1., 8., ve 16.gün sonunda kurutulmuş halleri gösterilmektedir.



Şekil 4.17. PCL-Jel (60:40) fiber dairesel kesitlerin PBS'te 1., 8. ve 16. gün bekletilerek kurutulmuş formları

Şekil 4.18'de verilen grafiğe göre 1.günden 16.güne kadar PBS'te bekletilerek kurutulan PCL/Jel fiberlerin ağırlık kaybı hesaplanmıştır.



Şekil 4.18. PCL/Jel, 7,5-LL37CSNP-PCL/Jel, 15-LL37CSNP-PCL/Jel, fiber matların 16 günlük % ağırlık kaybı grafiği

Çizelge 4.4'e göre PCL/Jel, 15-LL37CSNP-PCL/Jel, 7,5-LL37CSNP-PCL/Jel fiber matlarının PBS'te 8. ve 16.gün sonundaki ağırlık kayıplarının yüzde olarak değerleri gösterilmektedir.

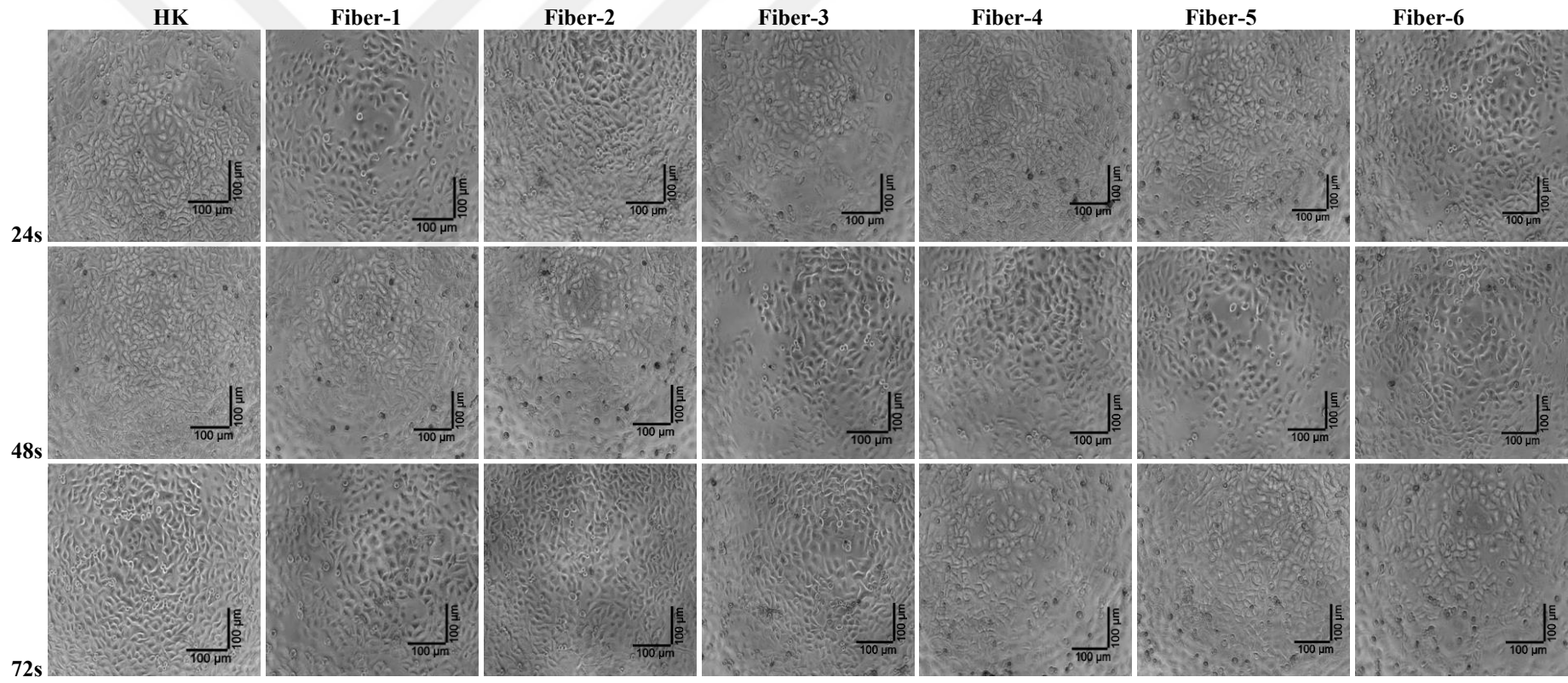
Çizelge 4.4. PCL/Jel, 15-LL37CSNP-PCL/Jel, 7,5-LL37CSNP-PCL/Jel fiber matlarının PBS'te 8. ve 16.gün sonundaki ağırlık kayıpları

Fiberlerin % Ağırlık Kaybı	8.gün	16.gün
PCL/Jel	% 41,64±0,00	% 79,55±3,13
7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel	% 45±1,36	% 75,16±3,85
15-LL37-CSNP-PCL/Jel	% 43,53±0,83	% 74,79±6,11

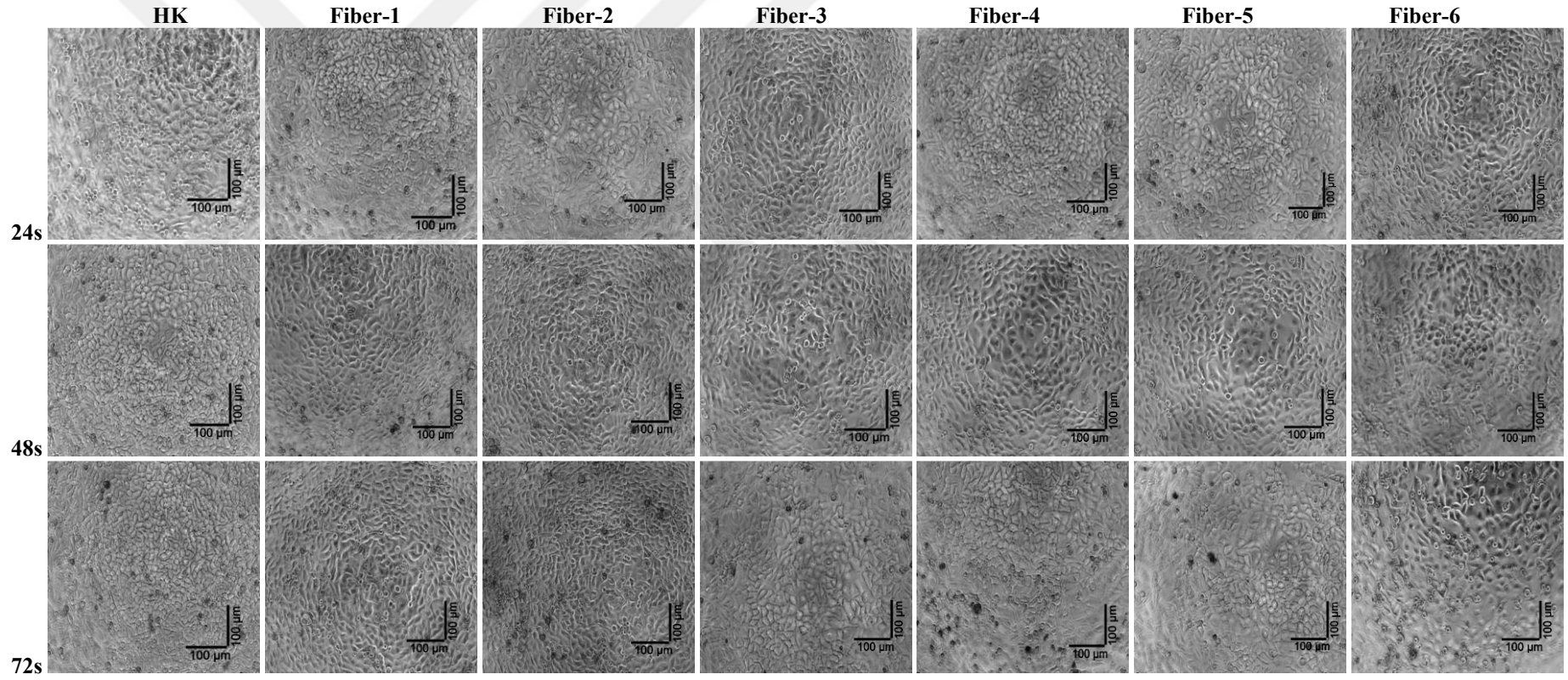
PCL/Jel fiber matın zamanla bozunması, hücre çoğalması ve ekstrasellüler matris üretimini mümkün hale getirdiğinden yara iyileşmesi için uygulanabilirlik açısından önemli bir parametredir. Fiber mat gruplarının ağırlık kayıpları 8.gün ve 16.gün süreyle PBS ortamında bekletilerek ölçümleri alınmıştır. Grupların % ağırlık kayıpları karşılaştırıldığında 8.gün ve 16 gün için PCL/Jel, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum LL37-CSNP'lerin fiber matın bozunma hızını etkilemediği anlamına gelebilmektedir. Benzer şekilde Kurkumin yüklü CSNP'lerin PCL/Jel fiber mat bozunma hızı üzerinde anlamlı bir farklılık meydana getirmediği Zahiri ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Zahiri ve ark., 2020). Ağırlık kaybının büyük kısmını PCL/Jel kombinasyonundaki Jel oluşturmaktadır. Jel'in sıvı ile temasında çözünerek ortama karışması meydana gelmektedir (Ghasemi-Mobarakeh ve ark., 2008; Babaloo ve ark., 2019).

4.2.4. Fiber matların biyoyumluluk analiz sonuçları

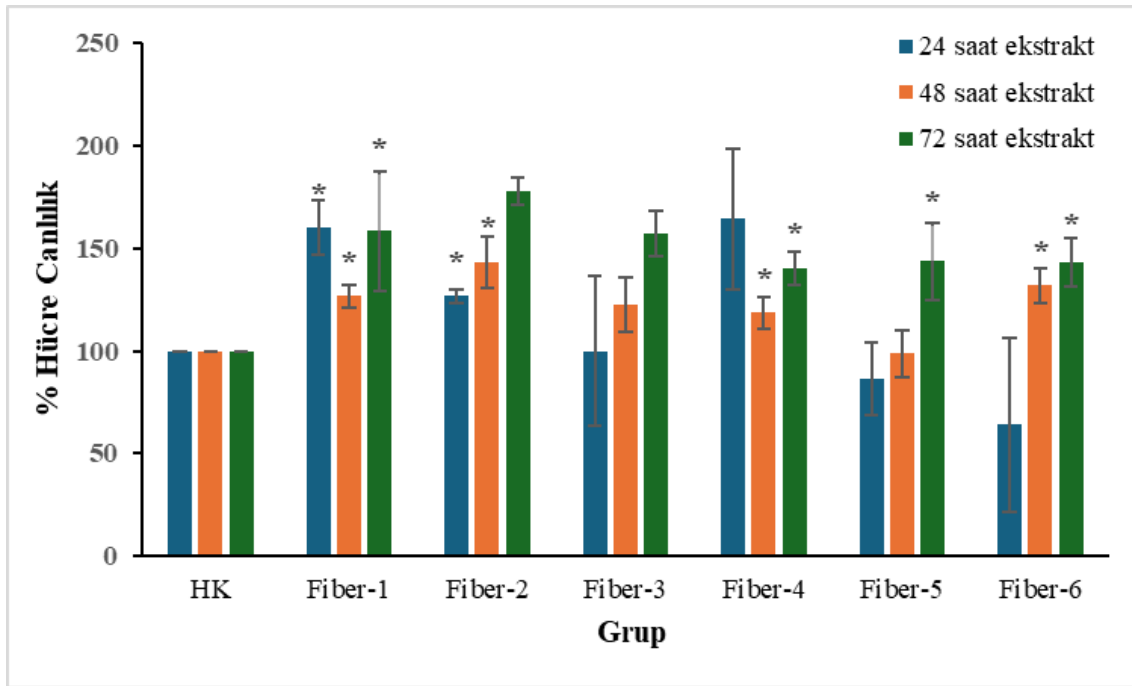
PCL/Jel (60:40) fiber mat çeşitleri olan Fiber-1(boş PCL/Jel), Fiber-2 (7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel), Fiber-3(15-LL37-CSNP-PCL/Jel), Fiber-4 (7,5-LL37-PCL/Jel), Fiber-5 (15-LL37-PCL/Jel), Fiber-6 (CSNP-PCL/Jel) 24-48-72 saat süreyle hücre kültürü besiyerinde bekletilerek elde edilen ekstraktlar 24 saat ve 48 saat süreyle keratinosit hücrelerine uygulanmıştır. 48 saat sonunda biyoyumluluk testi yapılmıştır. Şekil 4.19'da 24-48-72s bekletilen fiber ekstraktlarının keratinosit hücrelerine uygulamasından 24 saat sonraki morfolojileri gösterilmektedir. Şekil 4.20'de 24-48-72s bekletilen fiber ekstraktlarının hücrelere uygulamasından 48 saat sonraki morfolojileri gösterilmektedir. Şekil 4.21'de 48 saat sonunda biyoyumluluk testinin fiber gruplarının ekstraktlarının hücre üremesine etkisi grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.19. 24-48-72s bekletilen fiber ekstraktlarının keratinosit hücrelerine uygulamasından 24 saat sonraki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.20. 24-48-72s bekletilen fiber ekstraktlarının keratinosit hücrelerine uygulamasından 48 saat sonraki mikroskop görüntüleri



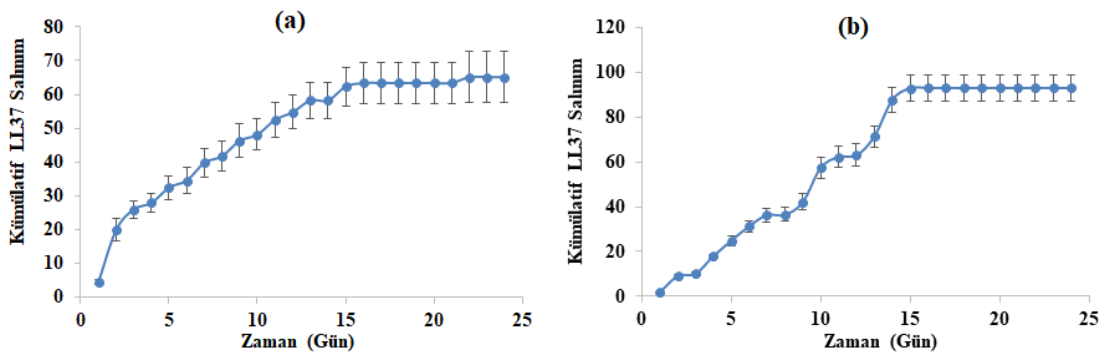
Şekil 4.21. 48 saat sonunda fiber grup ekstraktlarının hücre canlılık testi % hücre proliferasyon grafiği

Bu çalışmada, farklı fiber gruplarının 24, 48 ve 72 saatlik ekstraktlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Veriler üç bağımsız tekrarlar elde edilmiş olup ortalama \pm SD şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler Student's t-testi ile yapılmış ve her test grubu kendi kontrol grubu (HK) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark gösteren gruplar $p < 0.05$ olarak işaretlenmiştir. Kontrol Grubu (HK) için 24, 48 ve 72 saat ekstraktlarında hücre canlılığı %100 alınmış ve diğer gruplar bu referans üzerinden karşılaştırılmıştır. Fiber-1 (Boş PCL/Jel) grubunda her üç ekstraksiyon süresinde de kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (*= $p < 0,05$). Bu durum, fiber matrisin (PCL/Jel) kendi başına biyoyumlu olduğunu ve hücre proliferasyonunu destekleyici etkisinin bulunduğunu göstermektedir. Fiber-2 (7,5 μ g LL-37 yüklü CSNP-PCL/Jel) 24, 48 ve 72 saat ekstraktlarında hücre canlılığı, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (*= $p < 0,05$). LL-37'nin CSNP'ye yüklü şekilde verilmesi hem antibakteriyel etkiyi sürdürülebilir kılmakta hem de hücre çoğalmasını pozitif yönde desteklemektedir. Bu sonuçlar, yüksek biyoyumluluk ve hücre stimülasyonu potansiyelini ortaya koymaktadır. Fiber-3 (15 μ g LL-37 yüklü CSNP-PCL/Jel) grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Yüksek LL-37 konsantrasyonunun CSNP ile kombinasyonu, hücreler üzerinde nötr ya da dengeleyici bir etki göstermiş

olabilir. Fiber-4 (7,5 µg LL-37 yüklü PCL/Jel) 48 ve 72 saatlik ekstraktlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (*= p<0,05). LL-37'nin Fiber-5 (15 µg LL-37 yüklü PCL/Jel) 48 ve 72 saat ekstraktlarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (*= p<0,05). Yüksek LL-37 dozuna rağmen hücre canlılığının artmış olması, bu konsantrasyonun yara iyileştirici etkisinin belirginleştiğinden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, LL-37'nin zamanla hücre ortamında daha kontrollü salınmış olabileceği yorumlanabilir. Fiber-6 (Boş CSNP yüklü PCL/Jel) 48 ve 72 saatlik ekstraktlarda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (*= p<0,05). CSNP'nin tek başına varlığı bile hücre çoğalmasında pozitif etkileyebileceğini ve nötr hatta biyolojik olarak aktif olabileceğini göstermektedir. Bu durum, CSNP'nin sadece taşıyıcı değil, aynı zamanda biyolojik olarak destekleyici bir ajan olabileceğini işaret eder. Sonuç olarak, LL-37'nin dozunun yanı sıra taşıyıcı sistem (CSNP) varlığı, hücre canlılığı üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır.

4.2.5. Fiber matlardan LL37'nin *in vitro* salım kinetiği sonuçları

Salınım verilerine en iyi uyum sağlayan model, bölüm 3.2.3.5. *In Vitro* Salım'da anlatılan modellerdeki korelasyon katsayısı (R^2) temel alınarak seçilmiştir. En yüksek R^2 değerini veren model, salım verilerinin en iyi uyum sağladığı model olarak kabul edilmiştir. 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel 24 günlük salım profili PBS'te (pH 6.8), 37 °C'de Şekil 4.22'de gösterilmektedir.



Şekil 4.22. (a) 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel'den LL37 salım profili, (b) 15-LL37-CSNP-PCL/Jel'den LL37 salım profili

7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel'den LL37'nin kümülatif salımı değeri %65,17, 15-LL37-CSNP-PCL/Jel'den 24 gün sonunda kümülatif salım değeri %93,16 olarak hesaplandı.

15.güne kadar doğrusal ve sürekli yavaş bir salımın olduğu 15.günden 24.güne kadar salımın biterek tamamlandığı gözlenmektedir.

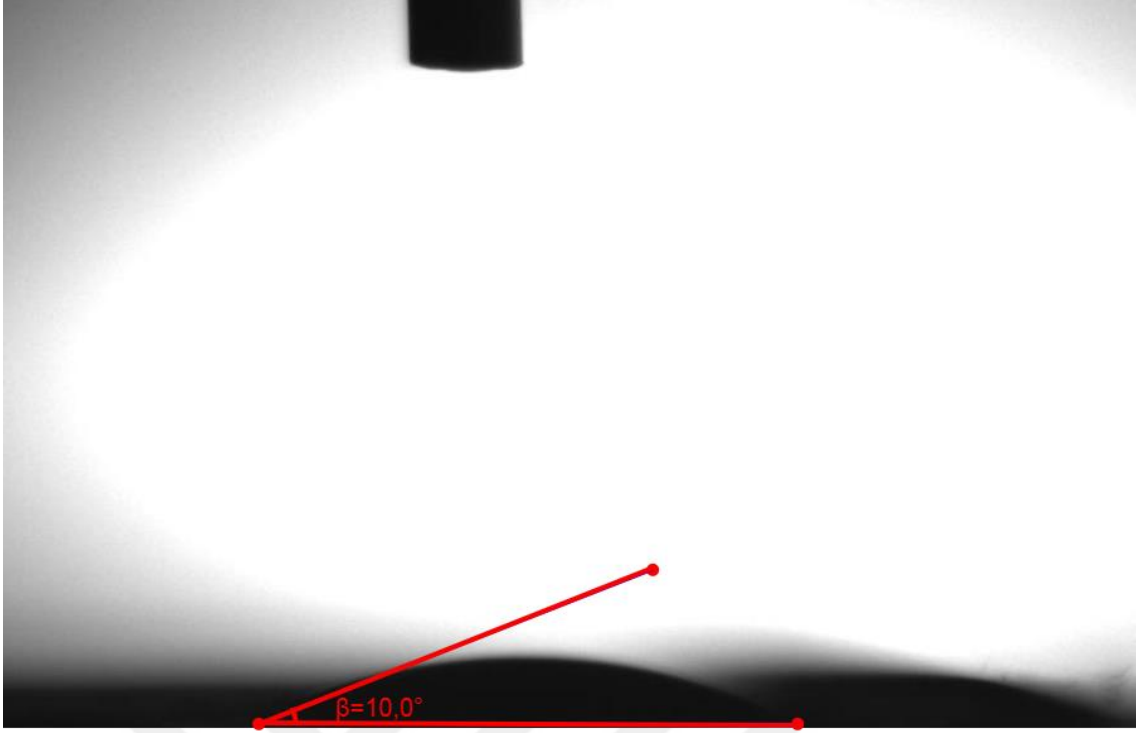
Salım kinetiği modellerine uygunluğun belirlenmesi sürecinde, matematiksel hesaplamaların ve grafiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için Python tabanlı Google Colab programı kullanılmıştır. Çizelge 4.5'e göre 7.5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel için en yüksek R^2 değeri ve en küçük RMSE, RSS, AIC, BIC değerleri olarak birinci dereceden salım kinetiği modeline uyum sağladığını göstermektedir. Bölüm 4.1.5.'te LL37-CSNP'lerin *in vitro* salım kinetiği salım kinetiği ile oldukça benzer sonuçlar elde edilmesi açısından uyumludur.

Çizelge 4.5. 7.5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel'den 24 günlük salım kinetiklerinin R^2 değerleri

Kinetik Salım Model	7.5-LL37-CSNP-PCL/Jel					15-LL37-CSNP-PCL/Jel				
	R^2	RMSE	RSS	AIC	BIC	R^2	RMSE	RSS	AIC	BIC
Birinci Dereceden Salım	0,98	5,58	747,91	86,54	88,90	0,94	13,93	4659,371	130,44	132,80
Korsmeyer-Peppas	0,94	10,52	2656,68	116,96	119,32	0,92	16,00	6143,65	137,09	139,44
Higuchi	0,95	10,60	2697,29	115,33	116,50	0,83	23,54	13298,76	153,62	154,80
Sıfıncı Derecede	0,86	17,54	7387,64	141,51	143,86	0,90	17,76	7571,00	142,10	144,45
Hixson Crowell	0,79	21,15	10740,13	150,49	152,84	0,82	24,36	14244,51	157,27	159,62

4.2.6. Fiber matların temas açısı analiz sonuçları

Bu çalışmada, elektrospinning yöntemiyle üretilen PCL/Jel (60:40) fiber matların yüzey özellikleri incelenmiştir. Su temas açısı ölçümleri, damlatılan su damlasının yüzeye yaptığı açı olarak hesaplanmıştır. Fiber üzerinde hidrofilitik- hidrofobiklik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. PCL/Jel (60:40) fiber mat örneğinde su ile temas açısı $9,99 \pm 6,71^\circ$ olarak ölçülmüştür. Yüzeyin ıslanabilirliğini etkileyen oldukça dar temas açısı sebebiyle hidrofilitik davranış sergilemiştir. Şekil 4.23'te PCL/Jel (60:40) fiber mat su temas açısı görüntüsü yer almaktadır.

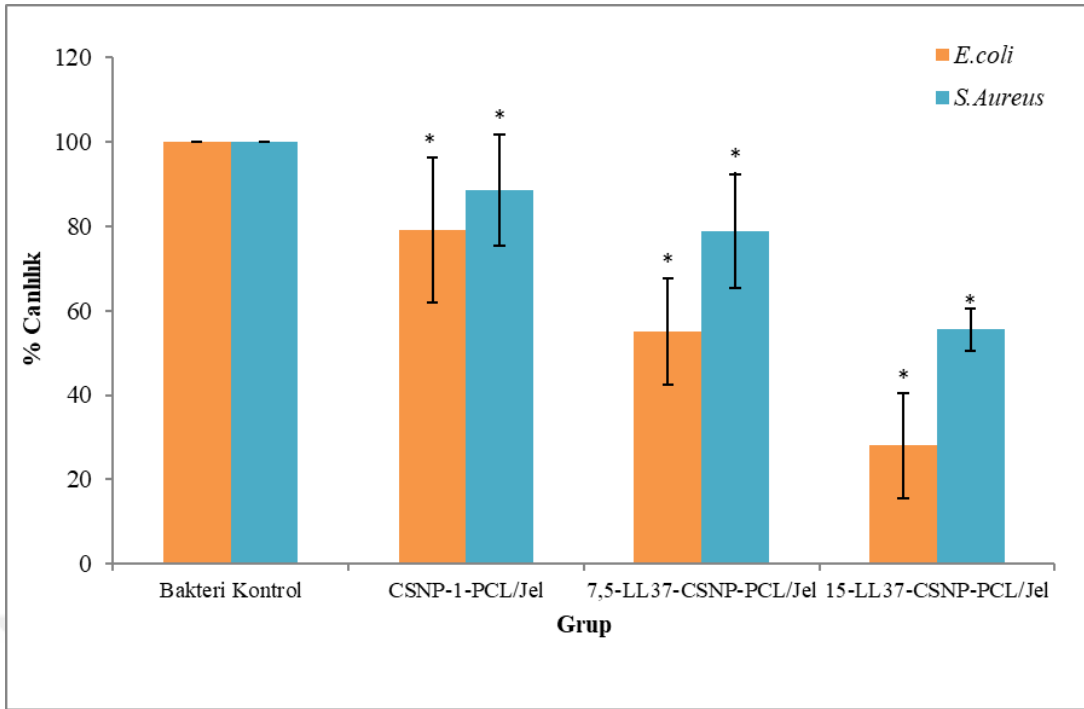


Şekil 4.23. PCL/Jel (60:40) fiber mat için su temas açısı

Bu sonuç, literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça düşük bir değeri göstermektedir. Örneğin, PCL fiber matların su temas açısı genellikle $127,3^\circ \pm 1,3^\circ$ civarındadır. Bu durum, PCL'nin hidrofobik doğasının bir sonucudur (Huang ve ark., 2021). Jel katkısı, PCL'nin hidrofobik özelliklerini değiştirmiş ve yüzeyin daha hidrofilik hale gelmesine neden olmuştur. Buradan elde edilen bulguya göre Jel'in PCL ile oluşturduğu kompozit yapı, yüzey özelliklerini değiştirerek ve hidrofilik bir yapı oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum, yara iyileşmesi ve hücre tutunması gibi biyomedikal uygulamalar için olumlu bir özellik olarak değerlendirilebilir.

4.2.7. Fiber matların antibakteriyel test sonuçları

Şekil 4.24'te yüzde bakteriyel canlılık sonuçları incelendiğinde, fiber mat üzerine damlatılan CSNP formülasyonlarında özellikle LL37'nin CSNP'lere yüklenmesiyle boş CSNP-1'e göre bakterisidal etkisini arttırdığı gözlemlendi. Özellikle *E.coli* bakteri türü üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin daha kuvvetli olduğu gözlemlendi. Sonuçların bölüm 4.1.7'de CSNP formülasyonlarının gösterdiği bakterisidal etki sonuçlarıyla oldukça benzer ve uyumlu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.24. CSNP-1-PCL/Jel, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel grupları için *E.coli* ve *S.aureus* bakteri türleri üzerindeki yüzde bakteriyel canlılık grafiği

Bu çalışmada farklı formülasyonlara sahip fiberlerin antibakteriyel etkisi, *E.coli* ve *S.aureus* suşlarına karşı üç bağımsız tekrar (n=3) ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda değerlendirilmiştir. Bakteriyel canlılık yüzdeleri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuş ve istatistiksel analizler için iki grup karşılaştırmalı Student's t-testi kullanılmıştır. Her test grubu kendi kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Tüm değerlendirmeler %95 güven aralığında yapılmış olup, kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren değerler $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre: Kontrol grubu (bakteri ile muamele edilen ancak herhangi bir formülasyon uygulanmamış grup) her iki bakteri için de canlılık oranını %100'e yakın düzeyde korumuştur. CSNP-1-PCL/Jel grubunda, hem *E.coli* (%80) hem de *S. aureus* (%90) canlılık oranlarında anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu durum, CSNP'nin tek başına sınırlı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. 7,5 μg LL-37 yüklü CSNP-PCL/Jel (7,5-LL37-CSNP) grubunda, *E.coli* canlılığı %55–60 seviyelerine kadar düşerken, *S.aureus* için bu oran %75–80 aralığında gerçekleşmiştir. Bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu sonuç, LL-37'nin CSNP ile birlikte kullanıldığında sinerjik bir antibakteriyel etki yarattığını göstermektedir. 15 μg LL-37 yüklü CSNP-PCL/Jel (15-LL37-CSNP) grubunda ise *E.coli* canlılığı %30'a kadar düşerek en belirgin antibakteriyel aktivite

gözlenmiştir ($p < 0,05$). *S.aureus* canlılığı da %55–60 aralığında olup, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. LL-37 dozunun artırılması, antibakteriyel etkinliğin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmasına katkı sağlamıştır. LL-37'nin hem *E.coli* hem de *S.aureus* üzerine doza bağımlı antibakteriyel etki gösterdiğini, özellikle CSNP taşıyıcı sistemiyle birlikte uygulandığında bu etkinin önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. CSNP'nin tek başına da anlamlı antibakteriyel etkiye sahip olması, taşıyıcı sistemin yalnızca kontrollü salım sağlamakla kalmayıp aynı zamanda biyolojik aktiviteye katkı sunduğunu göstermektedir. 15-LL37-CSNP formülasyonu, her iki bakteri türü için de en düşük canlılık oranlarına ulaştığından, en etkili antibakteriyel formülasyon olarak ön plana çıkmaktadır.

LL37, AMP sınıfına ait olup bakteriyel membranlara elektrostatik etkileşimle bağlanarak hücre duvarında por oluşumu ya da membran destabilizasyonu yoluyla etki göstermektedir. Bu mekanizma özellikle Gram negatif bakterilerin dış zarındaki lipopolisakkarit (LPS) ile yüksek afinite gösteren LL-37 mekanizmasının etkinliği açısından oldukça önemlidir. *E.coli* bakteri türlerinin dış zarında LPS molekülleri içermektedir. LL37'nin pozitif yüklü yapısı LPS ile güçlü elektrostatik etkileşime girerek membranı daha kolay şekilde bozar. Bu durumun aksine Gram-pozitif bakteriler (*S.aureus* gibi) daha kalın bir peptidoglikan tabakasına sahiptir, bu sebeple LL37'nin *S.aureus* membranına erişimini nispeten zorlaştırmaktadır. Overhage ve arkadaşları çalışmalarında LL37'nin *E.coli* ve *S.aureus* üzerindeki antibakteriyel etkinliği karşılaştırılmış ve *E.coli* üzerindeki antibakteriyel etkinliğin daha yüksek olduğunu, LL37'nin gram negatif hücre duvarlarını daha kolay aşabildiği bildirilmiştir (Overhage ve ark., 2008). Benzer şekilde Talapko ve arkadaşlarının çalışmasında LL37'nin *E.coli* üzerindeki morfolojide hızlı deformasyon ve permeabilite artışına neden olduğu, buna karşın *S.aureus*'ta bu etkinin daha yavaş ve sınırlı kaldığı gösterilmiştir (Talapko ve ark., 2022).

4.2.8. Fiber matların mekanik analiz sonuçları

Çizelge 4.6'ya göre PCL/Jel(60:40) örneği 3 tekrarlı olarak çekme-germe cihazında test edilerek mekanik analiz değerleri yer almaktadır.

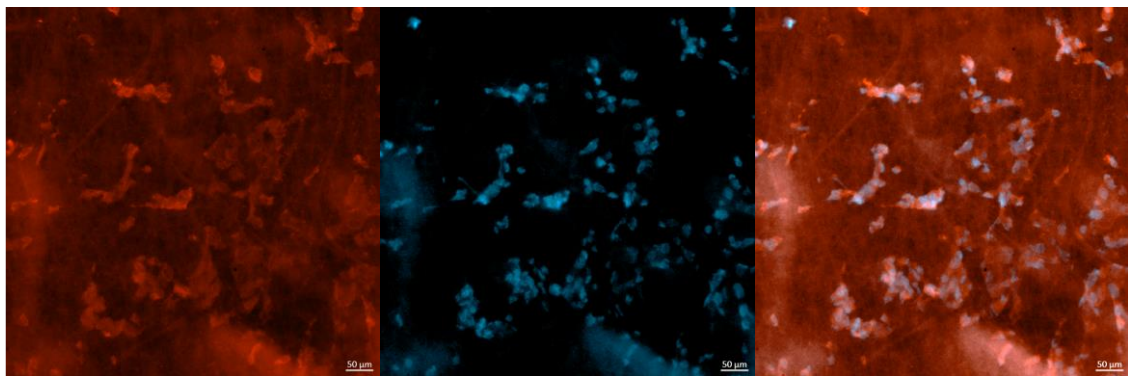
Çizelge 4.6. PCL/Jel(60:40) örneğinin 3 tekrarlı maksimum mekanik analiz değerleri

Fiber örnekler	Maksimum gerilim (N/mm ²)	Maksimum uzama yüzdesi (%)	Young modülü (MPa)	Kopma gerilim yüzdesi (%)
PCL/Jel-1	14,50	42,60	5,14	71,56
PCL/Jel-2	22,40	50	8,92	110,56
PCL/Jel-3	23,90	64,70	7,81	117,96
Ortalama	20,26±4,12	52,43±9,18	7,29±1,59	100,03±20,35

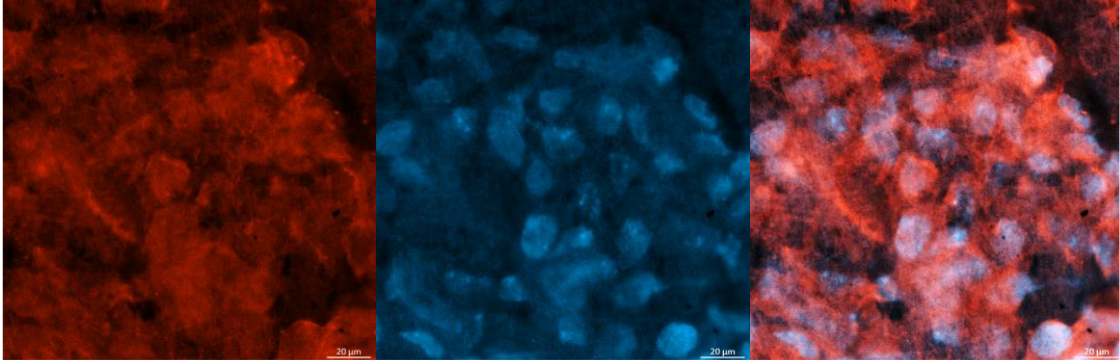
PCL ve Jel'in mekanik davranışı oldukça farklı olup Jel, PCL'ye göre daha elastiktir bu sebeple daha düşük kopma uzaması göstermektedir. Jel'in varlığı, saf PCL'ye göre kopma uzamasıyla birlikte elastik modülünü arttırabilmektedir. Jel ile PCL uyumu, PCL zincirlerine yüksek gerilim değerlerine izin veren daha iyi bir hareketlilik kazandırmaktadır. Longo ve arkadaşlarının çalışmasında, PCL/Jel (Karışım 80:20), saf PCL'nin kopma gerilimine göre yaklaşık %270 artışla %350 civarında kopma gerilimi gösterdiği, PCL/Jel (Karışım 60:40), %110 civarında (hala saf PCL'den daha yüksek) bir kırılma gerilimi gösterdiği bildirilmiştir (Longo ve ark., 2022). Mevcut çalışmada PCL/Jel örneklerinin çekme testindeki mekanik analiz değerleri ile literatür benzer sonuçlar göstermiştir.

4.2.9. Fiber matların lazer taramalı konfokal mikroskop ve SEM görüntüleme sonuçları

Şekil 4.25'te keratinosit hücresi ekimi yapılmış 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğinin 72 saat inkübasyon sonrası lazer taramalı konfokal mikroskop 40x görüntülemesi verilmektedir.

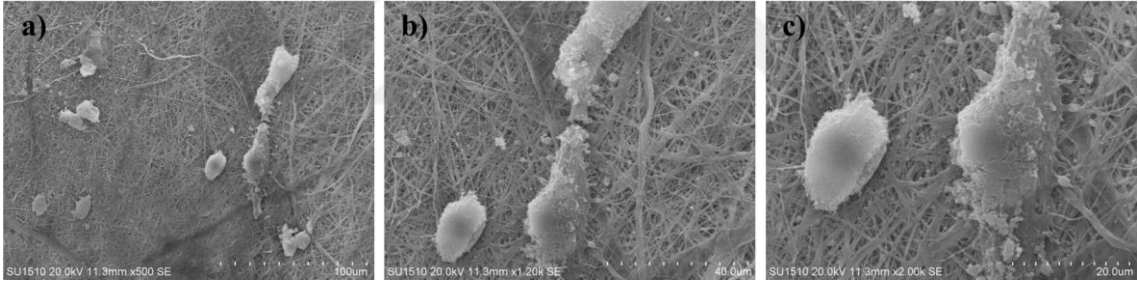
**Şekil 4.25.** Keratinosit hücrelerin tutunmuş olduğu 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat (40X)

Şekil 4.26’da keratinosit ekimi yapılmış 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğinin 72 saat inkübasyon sonrası lazer taramalı konfokal mikroskop 60x görüntülemesi verilmektedir.



Şekil 4.26. Keratinosit hücrelerin tutunmuş olduğu 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat (60X)

Şekil 4.27’de keratinosit ekimi yapılmış 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğinin 72 saat inkübasyon sonrası SEM’de görüntülemeleri gösterilmektedir.



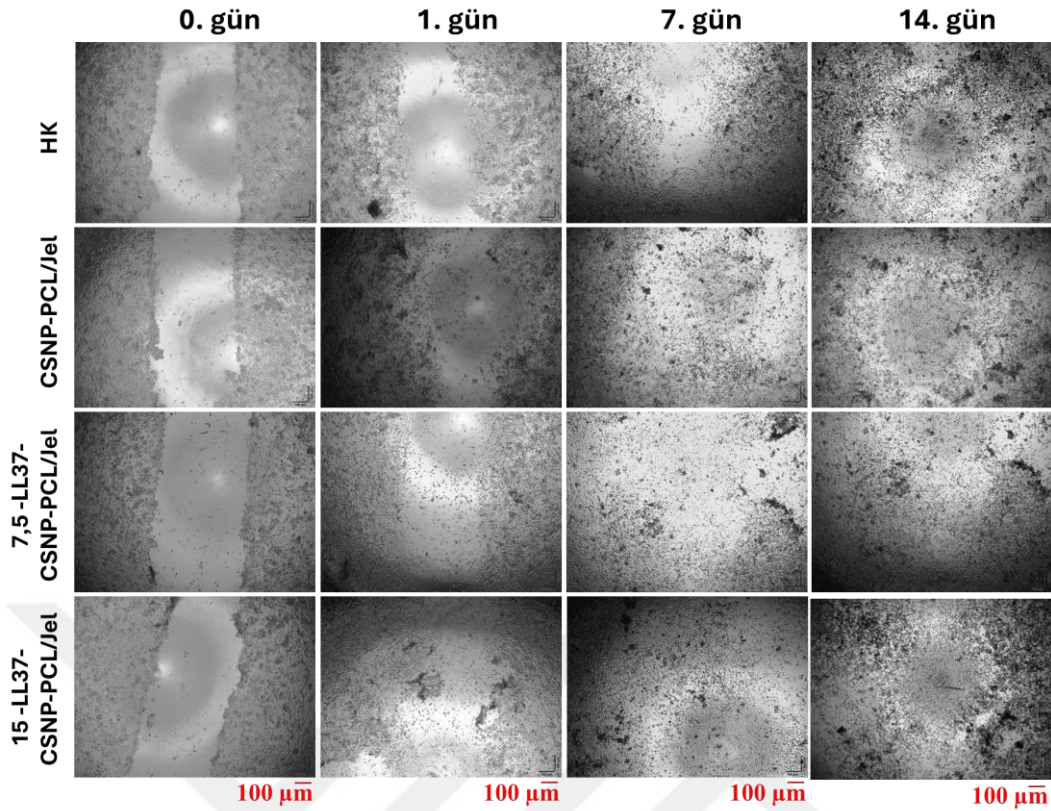
Şekil 4.27. Keratinosit ekiminden 72 saat sonrası 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğinin a) 500x, b) 1200x, c) 2000x büyütme oranlarında SEM görüntülemeleri

15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat üzerine ekilen keratinosit hücrelerin morfoloji ve hücre-materyal etkileşimleri konfokal lazer taramalı mikroskopi ve SEM ile analiz edilmiştir. Görüntüleme sonuçları genel değerlendirmesinde hücrelerin fiber mat üzerine başarılı bir şekilde tutunduğunu, bölündüğünü ve yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Konfokal mikroskopide Rhodamin-Faloidin kırmızı rengiyle aktin filamentlerini veya sitoplazmayı, DAPI mavi rengiyle çekirdekte floresan boyanmalar sonucu hücrelerin matris üzerinde yayılım gösterdiği görülmektedir. Çift boyanın üst üste çakıştırılarak görüntülenmesine göre hücrelerin matris üzerinde yayılmış morfolojik olarak sağlıklı bir şekilde fiber mat üzerinde organize olduğunu desteklemektedir. LL37’nin varlığı yalnızca antimikrobiyal etkisiyle değil aynı zamanda immünomodülatör

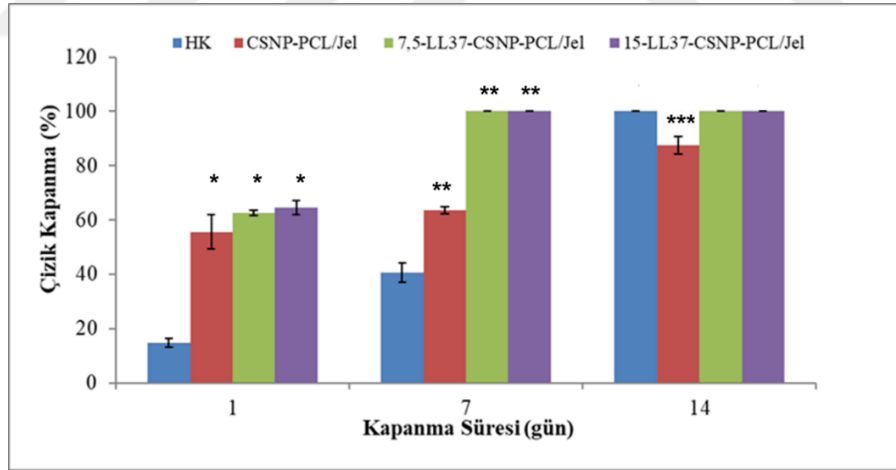
ve yara iyileştirici özellikleriyle keratinositlerin proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Dorschner ve ark., 2001; Heilborn ve ark., 2003). Bu nedenle LL37'nin varlığı hücre davranışı üzerinde doğrudan pozitif yönde etkili olduğu önerilebilir. LL37'nin CSNP'lerden kontrollü salım sisteminde yer alması peptidin lokal biyoyararlanımını arttırmış ve olası sitotoksik etkileri minimize etmiştir (Rashki ve ark., 2022). SEM görüntüleri değerlendirmesinde hücre matrisi fibere güçlü şekilde tutunmuş, morfolojik olarak sağlam şekilde yüzeye uzantılar oluşturarak entegre halde hücreler görüntülenmiştir. Hücrelerin fibröz yapıya entegre olması, LL37'nin hücre proliferasyonunu destekleyen etkisiyle uyumlu olup aynı zamanda CS'nin biyoyoumlu doğasını da yansıtmaktadır. LL37-CSNP'ler yüzeyde nano topografi oluşturarak hücrelerin tutunmasını kolaylaştırıcı bir rol oynamış olduğu düşünülebilir (Kong ve ark., 2010). Ek olarak PCL/Jel kompozit fiber yapının hücre için elverişli doğası gereği hücre adezyonuna yönelik hidrofilik özelliği literatür çalışmalarıyla desteklenmektedir (Zhang ve ark., 2005; Li ve ark., 2002) ancak 15-LL37-CSNP emdirilen PCL/Jel fiber matın yüzeyi daha da fonksiyonel hale getirerek hem antibakteriyel koruma hem de hücrel aktiviteyi destekleyen çift yönlü bir biyomedikal platform olarak sunulmaktadır. Benzer şekilde yakın zamandaki bir çalışmaya göre Fahimirad ve arkadaşları, çift katmanlı PCL/PVA fiber matrise kitosan nanopartiküller ile LL37 (ve VEGF) yükleyerek, kontrollü salım ve antimikrobiyal özelliklerle yara iyileşmesinde hem *in vitro* hem de *in vivo* başarı elde etmişlerdir (Fahimirad ve ark., 2024). Sonuç olarak mevcut çalışma, yara iyileştirme sürecinde cilt rejenerasyonuna yönelik doku mühendisliği uygulamaları için oldukça umut vadeden bir aday olduğunu da göstermektedir.

4.2.10. Fiber matların 2B çizik testi sonuçları

Şekil 4.28'e göre çizik yapılan kuyularda oluşturulan yaranın 0., 1., 7. ve 14.günlere göre invert mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. Çizik kapanmanın % hesabı için Image-J uygulaması kullanılarak ölçümler 3 tekrarlı şekilde yapıldı. Şekil 4.29'da günlere göre çizik kapanma % hesabı gösterilmektedir.



Şekil 4.28. HK ve fiber gruplarının 0., 1., 7. ve 14.günlük çizik kapanma görüntüleri



Şekil 4.29. 1., 7. ve 14. Günlerinde çizik kapanma yüzde grafiği

Bu çalışmada, LL-37 yüklü CSNP içeren PCL/Jel matlarının yara iyileşme kapasitesi, 2 boyutlu çizik testinde çizik kapanma (%) oranı üzerinden değerlendirilmiştir. Hücre çizik kapanma analizleri; kontrol grubu (HK), yalnızca CSNP-PCL/Jel, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel gruplarında sırasıyla 1., 7. ve 14. günlerde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Çalışmada, farklı formülasyonların yara iyileşmesi üzerine etkisi çizik kapanma oranları üzerinden değerlendirilmiş ve sonuçlar

üç bağımsız tekrar (n=3) ile elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD cinsinden ifade edilmiş olup, istatistiksel analizlerde her test grubunun sonuçları kendi kontrol grubuyla karşılaştırılarak Student's t-testiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir ve anlamlı farklar grafik üzerinde * işareti ile gösterilmiştir.

Birinci gün HK, yaklaşık %15–20 oranında çizik kapanması göstermiştir. HK'ya kıyasla CSNP-PCL/Jel grubunda kapanma oranı yaklaşık %60 civarındadır ve CSNP-PCL/Jel grubu, HK grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek çizik kapanma oranı göstermiştir. Bu durum, CSNP'nin erken dönemde yara iyileşmesini destekleyici etkisi olduğunu gösterir. 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel gruplarında ise kapanma oranı %65–70 arasında bulunmuş ve her iki grup da kapanma oranı HK'ya göre istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). LL-37'nin yara iyileşmesini erken evrede desteklediğini, ancak birinci günde 7,5 LL37 ve 15 LL37 grupları arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlenmiştir. Birinci günün sonuçları, LL37 peptidinin ve CSNP kombinasyonunun, yara iyileşmesini hızlandırma konusunda etkili olduğunu ve ilk 24 saatte önemli bir iyileşme sağladığını göstermiştir.

Yedinci gün HK grubunda yara kapanma oranı yaklaşık %45 olarak ölçülmüştür. CSNP-PCL/Jel uygulaması %65 civarında kapanma sağlamış ve HK grubuna göre anlamlı düzeyde iyileşme sağlamıştır. Bu da CSNP'nin etkisinin sadece erken dönemle sınırlı olmadığını, ilk hafta boyunca yara iyileşmesini hızlandırmaya devam ettiğini ortaya koymaktadır. LL-37 içeren gruplar, 7,5 ve 15 μ g dozlarda yaklaşık %95–100 kapanma oranı ile en yüksek iyileşme değerlerine ulaşmıştır. Bu iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir, ancak her ikisi de HK ve CSNP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkili bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu sonuçlar, LL-37'nin yara iyileşmesini özellikle 7. günde oldukça etkili biçimde hızlandığını göstermektedir.

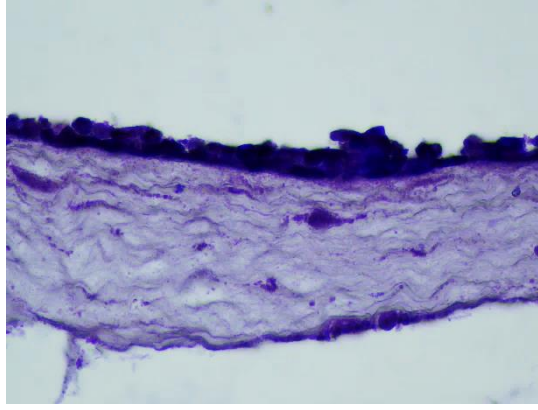
14.gün için HK grubunda çizik kapanma oranı %100 olarak tam yara iyileşmesi gözlenmektedir. CSNP-PCL/Jel grubunda HK'ya göre anlamlı şekilde daha düşük kapanma oranı göstermesine rağmen çizik kapanma yaklaşık değerinin %85 olmasıyla yine de yara iyileşmesini desteklediği ifade edilebilir. 7,5 ve 15 μ g LL-37 içeren gruplar, LL37 katkısıyla daha erken iyileşme sağlanmış olsa da HK ile fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, bu da her iki dozun da yara iyileşmesini tamamladığını göstermektedir. Bu durum, LL37'nin erken ve orta dönemde iyileşmeyi hızlandırıcı etkisini, kontrollü salımın katkısını ve klinik anlamda daha hızlı toparlanma potansiyelini destekler. Özetle LL-37'nin yara iyileşmesinde etkili bir biyomolekül olduğunu ve nanoparçacık taşıyıcı

sistem (CSNP) ile kullanıldığında sinerjik bir etki ortaya koyduğunu göstermektedir. Özellikle 7. ve 14. gün sonuçlarında, LL-37 içeren formülasyonlar yara kapanmasını anlamlı şekilde hızlandırmış ve yüksek dozda dahi toksik etki gözlenmeden etkinliğini sürdürmüştür. Bu bulgular, LL-37'nin kontrollü salım sistemleri aracılığıyla dermal doku rejenerasyonunu desteklemede potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Ek olarak, LL37'nin sadece erken dönem değil, aynı zamanda geç evre yara kapanmasını da destekleyebileceğini düşündürmektedir. LL-37'nin migrasyon, anjiyogenez ve inflamasyon regülasyonundaki rolü literatürde iyi belgelenmiştir (Sørensen ve ark., 2003). Özellikle John ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada LL37 gibi bir peptid olan W379 peptidi, bir hücre çizik denemesinde ve proliferasyon denemesinde keratinositlerin ve dermal fibroblastların göçünü ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (John ve ark., 2023). Mevcut çalışmada benzer şekilde 2B'lu hücre kültür ortamında gerçekleştirilen çizik testinde LL37'nin keratinosit migrasyonunu artırarak epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada LL37, CSNP'ler aracılığıyla PCL/Jel mat içerisine yüklenmiş ve bu formun yara iyileşmesine etkisi değerlendirilmiştir. Bu yöntem hem kontrollü salım sağlayarak peptidin stabilitesini artırmakta hem de lokal uygulanabilirliğini iyileştirmektedir. Bu yönüyle, çalışma LL37'nin lokal doz kontrollü uygulamasıyla hücre çizik kapanmasına olan katkısını ilk kez bu 2B'lu sistem üzerinde deneysel olarak ortaya koyarak 3B doku modeli için ön değerlendirme sağlamak ve literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

4.3. *In vitro* 3B insan cilt doku ve yara modeli

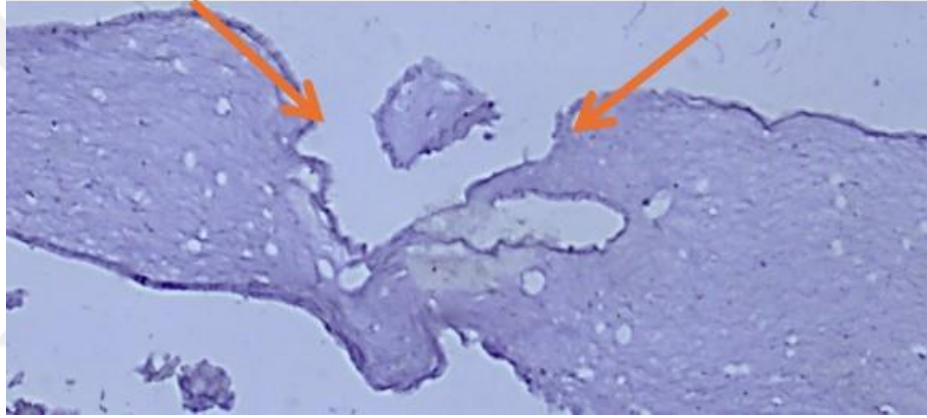
4.3.1. *In vitro* 3B insan cilt doku ve yara modeli H&E boyama sonuçları

Şekil 4.30'a göre 12 günlük FTSE modele ait H&E boyama mikroskop görüntüsü sunulmaktadır.



Şekil 4.30. 12 günlük FTSE modele ait H&E boyama görüntüsü

Şekil 4.31’de FTSE yara modeli 0.gün için H&E boyamaya ait görüntü gösterilmektedir.

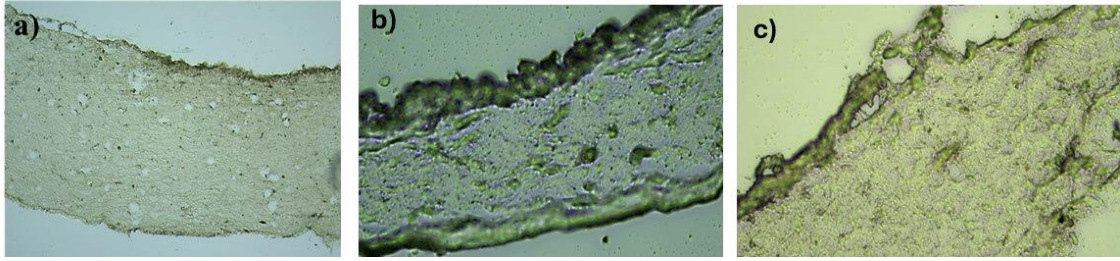


Şekil 4.31. FTSE yara modeli 0.gün için H&E boyama görüntüsü

Şekillerden anlaşıldığı üzere 12 günde insan derisine benzer bir model geliştirilmiş ve bu modelde yara oluşum da gösterilebilmiştir. Üst katman keratinosit hücrelerinin oluşturduğu keratin tabakası olup, orta katman kolajen matriks, en alt katman ise fibroblast hücrelerinden oluşmaktadır.

4.3.2. *In vitro* 3B insan cilt doku modelinin immunohistokimyasal (IHC) karakterizasyonu

Şekil 4.32’de *in vitro* FTSE modelinin sırasıyla involukrin, sitokeratin laminin antikorlarıyla gerçekleştirilen IHC’nin DAB boyama görüntüsü gösterilmektedir.



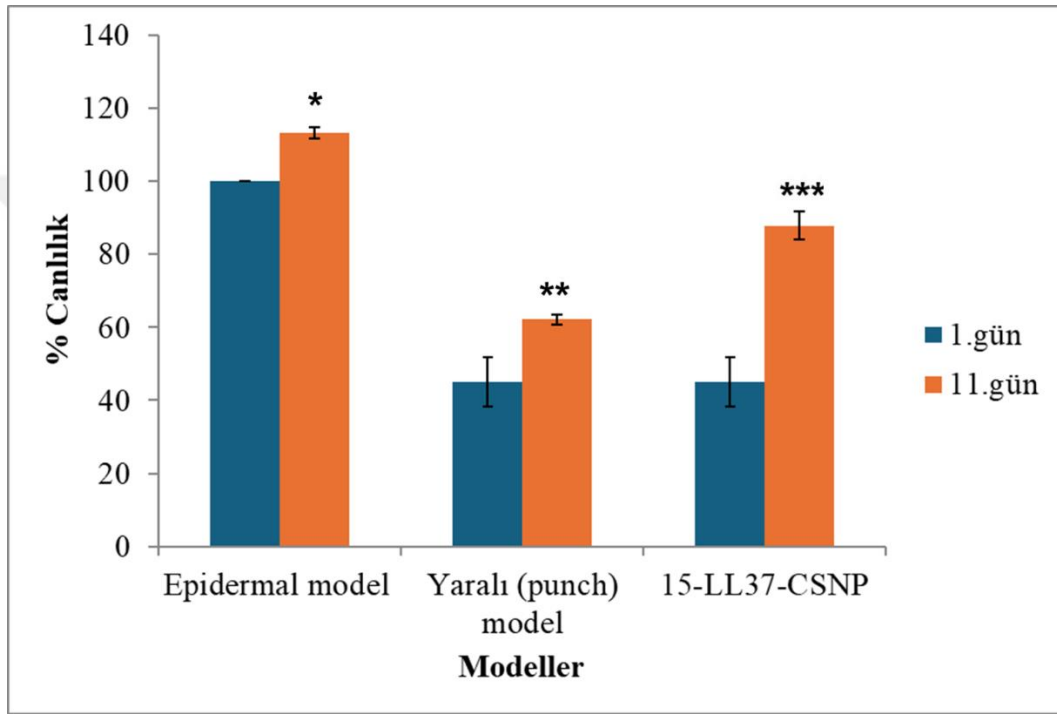
Şekil 4.32. FTSE modelinde a) involucrin, b) sitokeratin, c) laminin protein ifadelerinin IHC ile gösterimi

In vitro tam katman deri modeli için deri modeline ait belirteç proteinler olan involucrin, sitokeratin, laminin ifadeleri gösterilerek karakterize edilmiştir. İnvölüktrin, keratinosit terminal farklılaşmasının geç aşamalarında sentezlenen sitosolik bir öncü proteindir. Watt (1983), involucrinin keratinositler büyümeye başladıktan sonra, hücre dış yüzey örtüsü oluşumuna yakın bir aşamada sentezlendiğini bildirmiştir (Watt, F. M., 1983). SG tabakasındaki epidermal hücreler, keratin sentezini durdurur ve bunun yerine geç epidermal farklılaşma proteinlerini (örneğin involucrin, lorikrin ve filagrin) üretmeye başlarlar. Bu, keratinositlerin epidermiste farklılaşmasının geç evresine işaret eder. Keratinosit terminal farklılaşmasının son aşaması, SC olarak bilinen boynuzsu tabakanın, yani keratinle dolu, çekirdeksiz ölü hücrelerden oluşan bariyer katmanının oluşumudur. Bu süreç, epidermal bariyerin oluşumu açısından kritiktir. SG’de başlatılan geç farklılaşma ile cilt koruyucu tabakası olan SC oluşturulur. Involukrin, lorikrin ve filagrin gibi proteinler, bu bariyerin moleküler yapı taşlarıdır ve SC’nin dayanıklılığını ve su kaybına karşı geçirgenliğini belirler (Reijnders ve ark., 2015). Mulder ve arkadaşları çalışmalarında stratum granulosum seviyesinde involüktrin boyanması gözlemiştir. İnvölüktrin, ayrıca diferansiyasyon hızının da bir göstergesi olduğu, üst tabakaya göre erken ekspresyonu over-diferansiyasyon belirtisi de olabildiği bildirilmiştir (Mulder ve ark., 2023). Sitokeratin filaman protein ailesinin üyeleridir ve sadece keratinositlerde (epidermise ait hücrelerde) bulunur. Bazal tabakada yer alan keratinositler başlıca keratin 5 ve 14’ü; suprabazal (spinözum) tabakadaki farklılaşmış keratinositler ise keratin 1 ve 10’u ifade eder. Bu nedenle sitokeratin antikoru, epidermisin bazal katmanını (örneğin K5 boya pozitifliği) ve üst katmanlarını (örneğin K10 pozitifliği) ayırmada kullanılır. Örneğin Reijnders ve arkadaşları model ciltte K5’in stratum bazale, K10’un tüm suprabazal tabakalara özgü olduğunu göstermiştir (Reijnders ve ark., 2015). Laminin, epidermis ile dermis arasındaki bağın kritik bir elemanıdır; hemidizmozom oluşumunu başlatır ve epidermisin dermise sabitlenmesini sağlar (Nishiyama ve ark., 2000). IHC’de

laminin pozitifliği, bazal laminalarda net bir hat verir ve dermal-epidermal sınırı gösterir (Nishiyama ve ark., 2000; Mulder ve ark., 2023).

4.3.3. 3B insan cilt doku yara kapanma için MTT analizi sonuçları

Şekil 4.33'te epidermal ve yara (punch) modelinde 1.gün ve 11.gün için % canlılık analiz grafiği gösterilmektedir.



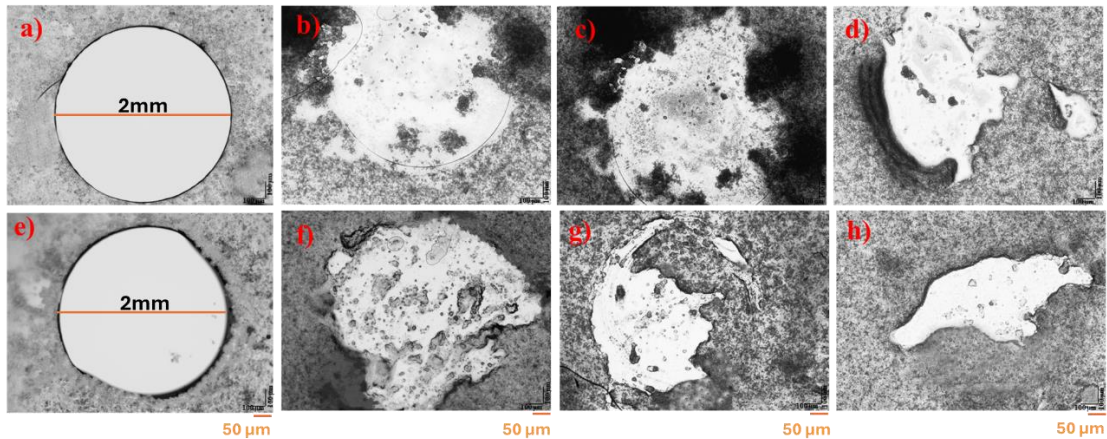
Şekil 4.33. Epidermal, yara (punch) ve 15-LL37-CSNP modellerinde % canlılık analizi

Bu çalışmada, farklı deney gruplarının hücresel canlılık üzerine etkisi, % canlılık oranı temel alınarak 1. ve 11. günlerde değerlendirilmiştir. Deneysel veriler üç bağımsız tekrar ile elde edilmiş ve istatistiksel analizler Student's t-testi her test grubunda 1. ve 11. günlerdeki yara iyileşme oranı hücre canlılığındaki yüzde değişim ile değerlendirilmiştir. Anlamlı farklılıklar $p < 0,05$ düzeyinde kabul edilmiş ve grafiksel gösterimlerde * işareti ile belirtilmiştir. Epidermal model, sağlıklı ve hasarsız doku yapısını temsil etmekte olup, deneysel karşılaştırmalarda referans (kontrol) grup olarak kullanılmıştır. 1. gün canlılık oranı yaklaşık %100 olup, sistemin başlangıç durumu açısından baz alınmıştır. 11. gün itibarıyla canlılıkta %110–115 seviyelerine ulaşan bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, kültür ortamında hücre proliferasyonunun zamanla artabileceğini göstermekte, aynı zamanda modelin fizyolojik stabilitesini koruduğunu desteklemektedir. Hasar verilmiş

epidermal dokuyu taklit eden yaralı (punch) modelde: 1. gün hücre canlılığı %45 düzeyde olup, hücre canlılığında azalış epidermal modele kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 11. gün canlılık oranı %60'a yükselmiş olsa da, bu değer hâlâ kontrol grubunun belirgin şekilde altındadır ($p<0,05$). Bu durum yaralı modelde doğal iyileşme sürecinin sınırlı kaldığını ve dışsal müdahaleye gereksinim duyduğunu ortaya koymaktadır. 15-LL37-CSNP uygulandığı bu grupta: 1. gün hücre canlılığı yaklaşık %45 olup, yaralı model ile benzer seviyededir. 11. gün sonunda canlılık oranı %95–100 düzeyine ulaşmış ve bu artış hem 1. güne göre hem de yaralı modele kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuçlar, LL-37 yüklü CSNP sisteminin hücre proliferasyonunu destekleyerek yara iyileşmesinde etkili bir biyolojik yanıt oluşturduğunu desteklemekte ve yara iyileşme süreçlerinde terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4.3.4. 3B insan cilt doku yara kapanma için invert mikroskop görüntüleme sonuçları

Şekil 4.34'te 24'lü epidermal modellere 2 mm çaplı punch ile yaralama sonrası 0.gün, 1.gün, 6.gün ve 11.gün için invert mikroskopta yapılarak yara kapanma süreci değerlendirilmiştir.



Şekil 4.34. Punch ile yaralama sonrası epidermal modellerin a) Doku kontrol (0.gün), b) Doku kontrol (1.gün), c) Doku kontrol (6.gün), d) Doku kontrol (11.gün), e) 15-LL37-CSNP+doku (0.gün), f) 15-LL37-CSNP+doku (1.gün), g) 15-LL37-CSNP+doku (6.gün), h) 15-LL37-CSNP+doku (11.gün) invert mikroskop görüntülemeleri

Şekil 4.34'te punch ile oluşturulan epidermal yara modelinde, kontrol ve 15-LL37-CSNP uygulama gruplarının farklı zamanlardaki mikroskop görüntüleri karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubunda yara bölgesinin 11. gün sonunda dahi tam olarak kapanmadığı, hücrel organizasyonun zayıf olduğu ve morfolojik bütünlüğün sağlanamadığı gözlenmiştir. Buna karşın, 15-LL37-CSNP uygulanan grupta 6. günden itibaren doku onarımının belirgin şekilde başladığı ve 11. gün sonunda yara alanının tamamen kapanarak hücrel bütünlüğün büyük ölçüde sağlandığı görülmüştür. Görsel bulgular, daha önce elde edilen canlılık yüzdeleriyle (Şekil 4.33.) tutarlılık göstermekte olup, yapılan Student's t-testi ile bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($n=3$, $p < 0,05$). Bu sonuçlar, LL-37 yüklü CSNP sisteminin yara iyileşmesini hızlandıran etkili bir biyomoleküler taşıyıcı sistem olduğunu desteklemektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

CSNP üretiminde optimizasyon süreci bilindiği üzere oldukça önem arz etmektedir. CSNP üretiminde birçok parametre (CS konsantrasyonu, TPP konsantrasyonu, CS:TPP hacim oranı, pH, tuz/Tween80 etkisi, santrifüj süresi, santrifüj tekrarı, ultrasonik banyo süresi, filtreleme) yer almaktadır. CS konsantrasyonunun TPP konsantrasyonuna göre artışı partikül morfolojisini etkileyerek küçük küresel görünümünden büyük parçacık görünümüne neden olması durumu istenmeyen agromelasyonu beraberinde getirmektedir. CS:TPP oranlarını 2:1 olarak belirlenmesi optimum nanopartikül eldesi açısından önemlidir. Tween 80 ajanının nanopartikül üretimindeki varlığı partiküllerin küresel görünüme sahip olmasını sağlamaktadır çünkü köpüren yapısıyla partiküller arasında bariyer görevi görmesi aglomera sorununu engellemektedir. CS çözeltisine TPP çözeltisinin yavaş ve kontrollü eklenmesi parçacık boyutu ve PDI değerlerinin daha homojen olmasını sağladığı araştırma sonuçlarıyla uyumludur. Aglomerasyonda dikkat edilmesi gereken önemli nokta çözeltinin asiditesinin 5,5 üzerine çıkmamasıdır bu yüzden asidik CS çözeltisine eklenen TPP çözeltisinin karışım pH değerini 5,5 üzerine çıkarmaması için kontrollü pH değeri ayarı yapılması gereklidir. Bu açıdan karışım pH değeri aralığı 3,5-4 olarak ayarlanmıştır. Çalışmada CSNP deney gruplarının (1-2-3-4) NP çap ortalamaları sırasıyla $179 \pm 2,16$ nm, $198,0 \pm 4,48$ nm, $291,9 \pm 6,65$ nm, $496,4 \pm 9,80$ nm ve $210,9 \pm 2,59$ nm olarak ölçüldü. CSNP-1 grubunun nanopartikül ortalama değeri istenilen nano boyut aralığı için uygun olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın ilerleyen aşamasında LL37 yüklenmesi partikül boyutunu daha fazla arttırabileceğinden boyut aralığının nano dışına çıkmaması açısından tercih edilmektedir. Benzer şekilde Zahiri ve arkadaşlarının çalışmasına göre CSNP'lerin boyut ortalaması 278 ± 60 nm iken, kurkumin yüklenen CSNP'lerin boyut ortalaması 359 ± 65 nm olarak hesaplanmıştır. CSNP'lerin nanoboyut aralığında olduğunu kurkumin yüklenmesine rağmen nanoboyut aralığı dışına çıkılmadan homojen boyut dağılımına sahip olduğu gösterilmiştir (Zahiri ve ark., 2020). Ayrıca partikül üretiminde CS molekül ağırlığının farklılık göstermesi de üretilen boyut üzerinde etkili olmaktadır. Bu çalışmada düşük moleküler ağırlıklı CS kullanımı daha istenilen dar boyut aralığına katkı sağladığı önerilebilir. Ultrasonikasyon nanopartiküllerin bekleyerek çökmesi ve topaklanması sorununu engellemesi açısından önemlidir. Ancak optimum sürenin ve rpm değerinin aşılması durumunda parçacıklar arasındaki itici kuvvet kaybolur ve agrega oluşumunu

beraberinde getirir. Çalışmada bu sürenin 15 dk üzerine çıkmaması belirlenmiştir. Bu anlamda 800 rpm optimum değer olarak ayarlanmıştır. Homojen ve dar boyut aralığında olup olmadığını tespit etmek açısından PDI'nin küçük değer olması partikül boyutunun nano aralıkta olması açısından gereklidir. Çalışmada yüksüz CSNP grubu tercih edilirken dikkat edilen parametrelerden birisidir. Aynı zamanda partiküllerin sadece dar boyut aralığında olması tek başına yeterli olmayıp stabilitesinin devamlılığı da önem arz etmektedir. Stabilitenin konup korunmadığı ZP değeri ile belirlenebilmekte olup deney gruplarında +30 mV üzerinde tespit edilen gruplar için stabilitenin korunduğu gözlemlenmiştir. İstenilen nanoboyut aralığında tercih edilen CSNP-1 grubu parametreleri ayarlanarak formülasyon içeriğine LL37 peptidi enkapsülasyonu yapılmak amacıyla sırasıyla 30 µg/mL, 15 µg/mL ve 7,5 µg/mL konsantrasyonlarında LL37 yüklemesi yapılmıştır. Enkapsülasyon verimliliği konsantrasyon sıralamasına göre %55,57, %80,32, %97,81 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada enkapsülasyon için verimliliği %80,32 olarak hesaplanan 15 µg/mL konsantrasyon tercih edilmiştir. Ardından çalışmanın sonraki inceleme aşaması LL37'nin CSNP'den ortama salım kinetiğidir. 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP için 24 günlük salım kinetiğine göre uygunluğu en büyük R², en küçük RMSE, RSS, AIC ve BIC değerlerine tespit edilerek her iki konsantrasyonda birinci dereceden salım kinetik modeli olarak belirlenmiştir. Çalışma için birinci dereceden salım kinetik modeline göre 18. güne kadar doğrusal ve sürekli bir salım olmuş, 18. günden 24. güne kadar salım sabit bir değerde devam ederek tamamlanmıştır. 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP için 24 günlük kümülatif salım yüzdeleri sırasıyla % 59,86 ve %94,39 olarak hesaplanmıştır. Kümülatif salımın %100'e yakını tamamlayan konsantrasyon 15 µg/mL olarak değerlendirilmiştir. Biyoyumluluk analizlerinde, CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası keratinosit hücrelerinin canlılık ve üremesine etkisi analiz edilmiş ve en yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NP'lerin keratinosit hücreleriyle biyoyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Antibakteriyel duyarlılık testinde CSNP-1, 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP grupları *E.coli* ve *S.aureus* bakteri türleri üzerindeki etkinlikleri ayrı ayrı incelenerek etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Her üç grup da hem *E.coli* hem de *S.aureus* bakteriyel canlılıkları engelleyen performans sergilediği özellikle de *E.coli* üzerindeki performansının daha da etkili olduğu söylenebilir. CSNP-1 grubu bileşenindeki CS'nin bakteriyel canlılık üzerinde kayda değer engelleyici etkisi olmasına rağmen tek başına yeterli olmamaktadır. Bu etkinin daha çok istenilen performans seviyelerine ulaşabilmesi

amacıyla CSNP-1 içeriğine LL37 yüklenmesi sağlanarak LL37-CSNP'lerin antibakteriyel mekanizmayı genişlettiği gözlemlenmiştir.

PCL/Jel kompozit fiber mat üretiminde parametrelerin optimize edilmesi istenilen kalitede materyal üretimini için temeldir. Fiber çapı optimize edilmesinde birçok parametre (polimer, voltaj, toplayıcı uç arasındaki mesafe, akış hızı, viskozite vb.) sayılabilir. Homojen ve boncuksuz fiber üretimi için uçtan toplayıcıya kadar olan mesafede uçtan püskürtülen polimer çözeltisindeki uçucu çözeltilerin ortamından uzaklaştırılması önemlidir. Bu açıdan kaynak voltajının ideal kV aralığında olmasına dikkat edilmelidir. Bu açıdan çalışmada 14 kV çalışma voltajı ve 12,5 cm mesafe değeri ideal olarak belirlenmiştir. Image J görüntü işleme uygulamasına göre genel fiber çap ortalaması $510,3 \pm 227,61$ nm olarak tespit edilmiştir. PCL/Jel karışımında PCL hacim oranının artışı fiber çapı üzerinde artışı sağlarken, Jel artışı fiber çapının küçülmesine neden olmaktadır. Bu sebeple PCL/Jel hacim oranının 60:40 olarak tercih edilmesi fiber çapının ideal aralıklarda kalması açısından önemlidir. Bu çalışmada geliştirilen PCL/Jel (60:40) kompozit fiber matın ve LL37-CSNP ile fonksiyonelleştirilmiş versiyonunun kimyasal karakterizasyonu FTIR spektroskopisi ile detaylı şekilde analiz edilmiştir. FTIR spektrumları, fiber yapıların bileşenlerine ait karakteristik fonksiyonel grupların varlığını ve bu gruplar arasında oluşan etkileşimleri net bir şekilde ortaya koymuştur. PCL'nin karakteristik bantları olan $2944,51$ cm^{-1} (asimetrik $-\text{CH}_2$ gerilmesi), $2861,45$ cm^{-1} (simetrik $-\text{CH}_2$ gerilmesi), $1720,88$ cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ ester gerilmesi), $1291,39$ cm^{-1} ve $1234,67$ cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilme titreşimleri) PCL/Jel fiber mat spektrumunda korunmuş ve $1724,20$ cm^{-1} ve $1295,59$ cm^{-1} 'e hafif bir kayma göstermiştir. Bu kaymalar, PCL ile Jel arasında fiziksel etkileşimlerin gerçekleştiğini ve iki fazın birbirine entegre olduğunu göstermektedir. Jel'e ait karakteristik bantlardan $3272,40$ cm^{-1} 'deki N-H gerilme titreşimi, PCL/Jel spektrumunda daha düşük şiddetle ve $3303,22$ cm^{-1} 'e kayarak tespit edilmiştir. Bu durum, Jel'in fiber mat içerisinde daha iç yapıya yerleştiğini ve FTIR sinyalinin zayıflamasına neden olabilecek bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, Jel'e özgü $1629,80$ cm^{-1} 'deki amid I bandının $1653,29$ cm^{-1} 'e kayarak zayıf şiddette gözlemlenmesi de bu yapısal bütünlüğü desteklemektedir. LL37-CSNP'nin PCL/Jel matrisine emdirilmesiyle oluşturulan LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat FTIR spektrumunda, özellikle LL37 peptidine ait α -helikal yapıyı temsil eden $1653-1654$ cm^{-1} aralığındaki belirgin amid I bandının $1655,10$ cm^{-1} civarında yer alması, peptidin başarılı şekilde fiber yapıya entegre edildiğini ve yapısal bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, LL37'nin enkapsülasyon sonrası yapısal kararlılığını

koruduğunu ve PCL/Jel iskeletine fonksiyonel olarak bağlandığını doğrulamaktadır. Genel olarak, FTIR analizi, PCL, Jel ve LL37-CSNP bileşenlerinin her birinin fiber mat içerisine başarıyla entegre edildiğini ve fiziksel etkileşim yoluyla stabil bir kompozit yapı oluşturulduğunu açıkça ortaya koymuştur. Bu durum, elde edilen kompozit fiberlerin biyomedikal uygulamalarda, özellikle de yara iyileşmesi ve antimikrobiyal platformlarda kullanılabilirliğini artıran önemli bir göstergedir.

Jel fiberlerin incelik uzayarak çap değerinin azalmasını sağlarken fiber mat dayanıklılığı üzerinde azalışa sebep olmaktadır. Jel'in dayanımının PCL'ye göre yeterli olmaması fiber mat ortam içeriğinde erken biyolojik bozunma kinetiği gösterebilmektedir. Bu açıdan PCL/Jel oranının optimize edilmesi önemlidir. Bu çalışmada PCL/Jel (60:40) oranı ideal olarak belirlenmiştir. Erken bozunma kinetiği Jel için dezavantaj olmasına rağmen PCL ile kompozit yapı hali doku mühendisliği uygulamaları için ideal malzeme konumuna getirmektedir. Hücrelerin benzer biyolojik materyal ile etkileşimi hücre tutunmasına katkıda bulunması yönünden oldukça anlamlıdır. Fiber matın 16. güne kadar ağırlık kaybı analizi sonuçları da bu hibrit fiber matın stablesini göstermektedir. PCL/Jel için ağırlık kaybı sırasıyla 8.günde %41,64, 16.günde %79,55, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel için ağırlık kaybı sırasıyla 8.günde %45, 16.günde %75,16 ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel için ağırlık kaybı sırasıyla 8.günde %43,53, 16.günde %74,79 olarak hesaplanmıştır. Fiber mat 16.güne kadar ortamda varlığını devam ettirmektedir. Bu süreç içerisinde özellikle ağırlık kaybı PCL/Jel mat bileşeninde Jel'in çözülerek ortama karışması dolayısıyladır. PCL, Jel'e göre fiber bileşeninde varlığını korumaya devam etmektedir. Biyoyumluluk analizinde Fiber-1 (boş-PCL/Jel), Fiber-2 (7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel), Fiber-3 (15-LL37-CSNP-PCL/Jel), Fiber-4 (7,5-LL37-PCL/Jel), Fiber-5 (15-LL37-PCL/Jel), Fiber-6 (CSNP-PCL/Jel) grupları 24, 48 ve 72 saat boyunca besiyeri içerisinde bekletilerek alınan ekstraktlar 24 saat ve 48 saat keratinosit için besiyeri olarak kullanıldı ve inkübasyon sonrası biyoyumlulukları değerlendirildi. 24 ve 48 saat sonra fiber ekstraktlarının keratinosit hücre proliferasyonu üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin bulunmadığı yani biyoyumlu olduğu MTT analiz grafiği ile ve mikroskop görüntüleriyle de desteklenmektedir. 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber matlarından 24 günlük LL37 salım kinetiği incelendiğinde sırasıyla %65,17 ve %93,16 olarak hesaplanmıştır. Salım kinetiğine göre 15.güne kadar doğrusal ve sürekli bir salım olduğu, 15.günden 24.güne kadar salımın tamamlandığı gösterilmiştir. Kinetik salım modelleri karşılaştırıldığında R^2 değerinin 1'e en yakın değer, en düşük RMSE, RSS, AIC

ve BIC değerleri ile uyumlu olan kinetik modelin birinci dereceden salım kinetiğine uyumlu olduğu bulunmuştur. Fiber matların temas açısı analizinde ortalama açı değerinin 10° olarak hesaplanması fiber örneğin hidrofilik özellikler sergilediğini göstermektedir. Hücrelerin iskelelere tutunma, çoğalma ve göç gibi davranışlar sergilemesi açısından önemlidir. Bu durum aslında hücre kültürü ve doku modelleri için yara modellerinde iyileşme ortamı için vazgeçilmez bir özelliktir. PCL içeriğine eklenen hidrofilik özellikli doğal biyomateryaller eklenmesi istenilen hidrofilik özelliğe erişilmesini sağlamaktadır. Bir çalışmaya göre yalnızca PCL fiberinin temas açısı $120,3 \pm 15,8$, PCL/Jel temas açısının $65,9 \pm 4,6$, Kurkumin yüklü CSNP ile fonksiyonlandırılmış PCL/Jel fiberinin temas açısı ise $48,9 \pm 5,4$ olarak hesaplanmıştır. Kurkumin yüklü CSNP ve Jel varlığı lifsel matların hidrofilik özelliğini arttırmıştır (Zahiri ve ark., 2020). Fiber mat örnekleri için antibakteriyel duyarlılık test sonuçlarına göre CSNP-PCL/Jel fiber örneğinde CS bileşeni tek başına kaydadeğer bir antibakteriyel etki göstermesine rağmen tek başına yeterli değildir. Bu yüzden 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber gruplarında LL37'nin varlığı antibakteriyel etkiyi oldukça arttırmıştır. Özellikle 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber örneğinde bu performans en iyi düzeydedir. Ayrıca her grup *S.aureus* türlerine göre *E.coli* türünde daha kuvvetli bir etki göstermektedir. Bu durum 7,5-LL37-CSNP ve 15-LL37-CSNP antibakteriyel duyarlılık test sonuçlarıyla desteklenmektedir. PCL/Jel mekanik analiz değerleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup % kopma gerilimi $100,03 \pm 20,35$ hesaplanmıştır. Hesaplanan % kopma gerilimi, malzemenin yüksek oranda elastik deformasyona uğrayabileceğini ve oldukça dayanıklı bir yapı sergilediğini göstermektedir. Bu değer, özellikle doku mühendisliği gibi biyomalzeme uygulamaları açısından değerlendirildiğinde, malzemenin mekanik stres altında bütünlüğünü koruyabilme potansiyeline işaret eder. Ayrıca, bu oranın yüksek olması, PCL ve Jel kombinasyonunun sinerjik bir etkiyle elastisiteyi artırdığını düşündürmektedir. PCL ve Jel'in mekanik davranışları doğalarını gözlemlemek için önemlidir. Saf PCL düşük kopma uzaması göstermekte olup Jel ise daha yüksek gerilim değerlerine izin veren bir esneklik kazandırmaktadır. 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğine ait SEM görüntü analizine göre hücrelerin lifler üzerine yayılması, substrat ile güçlü etkileşimi gösterir. Hücreler sadece yüzeye oturmamış, aynı zamanda uzantılarla lifler boyunca yayılmış, bu da aktif hücre-fiber etkileşimini göstermektedir. Farklı boyut ve morfolojilerdeki hücre yapıları, hücrelerin canlılığını ve metabolik aktivitesini işaret etmektedir. Hücre zarındaki bütünlük ve hücre yüzeyindeki çıkıntılar, biyoyumlu bir ortamda proliferasyonun sürdüğünü düşündürmektedir. Ayrıca lifler arasında homojen

hücre dağılımı, fiber mimarisinin hücre göçü ve yapışması için uygun bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir. Benzer şekilde 15-LL37-CSNP-PCL/Jel fiber mat örneğine ait lazer taramalı konfokal mikroskop görüntü analizine göre hücre iskeleti proteinlerinin yoğun boyanması (kırmızı), aktin filamentlerinin aktif şekilde organize ve hücrelerin yüzeye adapte olduğunu DAPI ile çekirdek boyanması ise, nükleer bütünlüğün korunduğunu ve canlı hücre popülasyonunun bulunduğunu göstermektedir. Konfokal veriler, hem yapışmış hem de hücre içi iskelet ve çekirdek yapısı açısından sağlıklı hücre varlığına işaret etmektedir. Bu da fiber yapının hücreler için proliferatif bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir. CSNP-PCL/Jel, 7,5-LL37-CSNP-PCL/Jel ve 15-LL37-CSNP-PCL/Jel gruplarında 2B'lu çizik testi için 0.gün, 1.gün, 7.gün ve 14.gün için çizik kapanma grafiği oluşturulmuştur. Hiçbir uygulama olmaksızın kendiliğinden çizik kapanma yüzdesi HK grubu için 7.günde %40'a, 14.günde %100'e yakın değerdedir. CSNP-PCL/Jel grubu için 7.günde %60'a, 14.günde %100'e yakın değerdedir. LL37 yüklü PCL/Jel fiber gruplarında LL37'nin varlığı hücreler üzerinde proliferatif etki göstererek çizik kapanma hızını oldukça arttırmış ve 7.güne kadar çizik alanının tamamıyla kapandığı gösterilmektedir.

Çalışmada oluşturulan 3B tam katmanlı cilt doku eşdeğeri modeli ve punch ile yaralanmış model yara iyileşmesi histolojik olarak H&E boyama ile değerlendirilmiş; epidermis ve dermis tabakalarının anatomik bütünlüğünün başarılı bir şekilde taklit edildiği gösterilmiştir. Epidermal katmanlarda bazal, spinozum, granülozum ve korneum yapılarının belirgin olarak izlenmesi, modelin insan cildi mimarisini histolojik düzeyde yansıttığını doğrulamaktadır. Dermal bölgede fibroblast içeriği ve hücre dışı matriks yoğunluğu, doğal dermal stromaya benzer bir doku organizasyonu sunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre geliştirilen modelin *in vitro* yara iyileşmesi çalışmalarında fizyolojik gerçekliğe sahip, güvenilir bir sistem sunduğunu ortaya koymaktadır.

IHC analizde involucrin, sitokeratin, laminin gibi belirteçlerin kombine kullanımı, tam katmanlı cilt modelini ayrıntılı olarak tanımlamayı sağlamaktadır. Örneğin, sitokeratin boyası bazal tabakayı ve spinözum tabakasını ayırırken involucrin boyası üst katmanları (stratum granulosum) vurgulamaktadır (Reijnders ve ark., 2015). Laminin boyası ise epidermin temel (bazal) sınırını belirleyerek bazal laminaları işaretlemektedir (Mulder ve ark., 2023). Bu sayede, bir FTSE'de bazal lamina laminin ile çizilirken; bazal keratinositler sitokeratin ile, suprabazal keratinositler sitokeratin ve involucrin ile belirlenmiştir. Bu üç belirteç bir arada kullanılarak FSE modelinin epidermal gelişimi ve katman yapısı detaylıca karakterize edilmiştir.

Tez çalışmasında LL-37 enkapsüle edilmiş CSNP'ler emdirilerek fonksiyonlandırılan PCL/Jel fiber mat geliştirilmiştir ve fiber matın antibakteriyel etkisi, keratinosit hücrelerine uyumluluğu, *in vitro* 2B ve 3B modellerde yara iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Geliştirilen fonksiyonel mat hem antibakteriyel özellik sergilemiş hem de insan keratinosit hücrelerine toksik bir etki göstermemiştir. Tez çalışmasında, geliştirilen fonksiyonel mat aynı zamanda keratinosit hücrelerinin tutunmasına olanak sağlayarak bir iskele görevi de sergilemiş, hücrelerin iskelede bölünerek çoğalma ve yara iyileştirici etkisi iki boyutlu kültür ortamında kantitatif olarak gösterilebilmiştir. *In vitro* üç boyutlu epidermal deri modelinde ise yara iyileştirici etkisi hücrelerin mata tutunarak bağlanması ve yapışmasından dolayı model üzerinde gösterilememişse de matın içeriğindeki 15-LL37-CSNP'nin uygulanarak tez çalışmasında geliştirilen üç boyutlu epidermal yara modeli üzerindeki iyileştirici etkisi hem mikroskopik hem de MTT analiziyle kantitatif olarak gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması yeni nesil bir biyofonksiyonel yara örtüsü geliştirmiş, bu örtünün kontrollü ilaç salım potansiyelini sağlam verilerle göstermiş ve aynı zamanda bu malzemenin etkisini ön değerlendirme olarak bir 2B çizik modelinde ardından fizyolojik yapıya en yakın bir 3B cilt yara modeli üzerinde validasyonla kanıtlamıştır. Bu üçlü yaklaşım (malzeme geliştirme – salım analizi – biyolojik doğrulama), literatüre yenilikçi katkı açısından bütüncül ve entegre şekilde ele alınmıştır. Bu yönüyle tez, sadece biyomalzeme bilimine değil, aynı zamanda yara iyileşmesi üzerine kurulu doku mühendisliği ve farmasötik taşıyıcı sistemler alanına önemli, yenilikçi ve model teşkil edecek bir katkı sunmaktadır.

5.2. Öneriler

CSNP üretiminde yaygın olarak istenmeyen durum partiküllerin agrega olmasıyla topaklaşma sorununu beraberinde getirmektedir. Partikül boyutunun nm boyutunda stabil olabilmesi açısından iyonik jelasyon aşamasında agrega oluşumunu engelleyerek küresel stabil görünümde partiküllerin üretimi için Tween 80 ajanının varlığı önem arz etmektedir. Tween 80 partiküller arasında bariyer görevi sağlayarak partiküllerin birbirine yapışmasını önlemektedir. Ancak yine de üretilen nanopartikül çözeltisinin beklemeye dayalı olarak nanopartiküllerin ağırlığı sebebiyle üst üste birikmesi durumu söz konusudur. Bu durumu önlemek için ultrasonik homojenizasyon işlemine tabi tutulması partiküllerin homojen dağılımını sağlamaktadır. Ultrasonik homojenizasyon işlemi agregasyon sorununa kesin bir çözüm oluşturmamaktadır. Gelecek çalışmalarda

nanopartiküllerin agregasyon sorununa çözüm bulabilmek açısından Triton-X, SDS benzeri ajanlar kullanılarak değerlendirme yapılması önerilir.

PCL/Jel (60:40) karışım oranlı polimer çözeltisi hazırlanarak üretilen fiber mat örnekleri keratinosit hücreleriyle biyouyumluluk testlerinde biyolojik açıdan biyouyumlu oldukları sonuçlarla doğrulandı. PCL sentetik bir polimer olup tek başına hücrelerin tutunabilmesi için yeterli olmayıp istenilen hücre tanıma bölgelerinin oluşturulabilmesi açısından Jel ile belirlenen oranlarda karışım çözeltisi hazırlandı. Karışım polimer çözeltisinden elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen PCL/Jel fiber mat fiziksel çapraz bağlama yani çözeltilerin birbirleriyle doğal olarak homojen karışımıyla elde edilmiştir. Fiziksel çapraz bağlama tercihi hücre ve doku örnekleri için en az sitotoksik etkinin gözlenmesi için gerekli olması dolayısıyladır. Ancak fiziksel çapraz bağlama ile üretilen fiber matların çeşitli sıvılarla (örneğin; PBS, DMEM gibi) etkileşimi bir süre sonra jelatinin çözülerek sıvılara geçişini beraberinde getirmektedir. Aslında fiberler arasında zamanla oluşan boşlukların hücre ile dolması istenilen bir durum olmasına rağmen bu sürecin biraz daha geciktirilmesi amacıyla kimyasal çapraz bağlama önerilebilir. Ek olarak kimyasal çapraz bağlayıcının hücre ile biyouyumlu olması, hücrelerin proliferatif etkinliğini etkilemeyen bir kimyasal olması önem arz etmektedir. Dezavantaj olarak kimyasal çapraz bağlayıcılar maliyet açısından yüksek olabilmektedir. Literatür incelendiğinde kimyasal çapraz bağlayıcı olarak Glutaraldehit PCL/Jel fiber matlarda hızlı ve güçlü bir çapraz bağ oluşturmaya rağmen artan hücre ölümü ve doku iritasyonu gibi istenmeyen olumsuz durumlara yol açtığı bildirilmiştir (Ghassemi ve Gymama, 2018). Genipin ise doğal olarak elde edilmesi düşük sitotoksik etkinliğinin yanı sıra maliyet bir miktar daha yüksek olabilmektedir (Ehrmann, A., 2021). İleriki çalışmalar için 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve takviye edici N-hidroksisüksinimid (NHS) kombinasyonu olarak EDC/NHS önerilmektedir ki, protein amino ve karboksil grupları arasında doğrudan amide bağ oluşturur; kimyasal ajan ürüne dahil olmaz, yan ürün olarak sadece suda-çözünür ürea açığa çıkmaktadır (Chen ve ark., 2019).

Gelecek çalışmalarda punch ile yaralanmış 3B insan cilt modeline ek olarak 3B insan cilt modelinde kronik yara ve yanık yara modeli oluşturularak ardından LL37-CSNP yüklü PCL/Jel fiber yara örtüsü uygulamalarıyla yara iyileşme ve yara kapanma analizleri değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılması gerçekleştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Sayed, P., Kaeppli, A., Siriwardena, T., Darbre, T., Perron, K., Jafari, P., ... & Applegate, L. A., 2016, Anti-microbial dendrimers against multidrug-resistant *P. aeruginosa* enhance the angiogenic effect of biological burn-wound bandages. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Albright, V., Xu, M., Palanisamy, A., Cheng, J., Stack, M., Zhang, B., ... & Wang, H., 2018, Micelle-coated, hierarchically structured nanofibers with dual-release capability for accelerated wound healing and infection control. *Advanced healthcare materials*, 7(11), 1800132.
- Agarwal, M., Agarwal, M. K., Shrivastav, N., Pandey, S., Das, R., & Gaur, P., 2018, Preparation of chitosan nanoparticles and their *in vitro* characterization. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 4(2), 1713-1720.
- Aldana, A. A., Malatto, L., Rehman, M. A. U., Boccaccini, A. R., & Abraham, G. A., 2019, Fabrication of gelatin methacrylate (GelMA) scaffolds with nano- and micro-topographical and morphological features. *Nanomaterials*, 9(1), 120.
- Algharib, S. A., Dawood, A., Zhou, K., Chen, D., Li, C., Meng, K., ... & Xie, S., 2022, Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and *in vitro* characterization. *Journal of Molecular Structure*, 1252, 132129.
- Almaaytah, A., Mohammed, G. K., Abualhajjaa, A., & Al-Balas, Q., 2017, Development of novel ultrashort antimicrobial peptide nanoparticles with potent antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant bacteria. *Drug design, development and therapy*, 3159-3170.
- Anjum, F., Agabalyan, N. A., Sparks, H. D., Rosin, N. L., Kallos, M. S., & Biernaskie, J., 2017, Biocomposite nanofiber matrices to support ECM remodeling by human dermal progenitors and enhanced wound closure. *Scientific reports*, 7(1), 1-17.
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F., 2015, Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137-146.
- Babaloo, H., Ebrahimi-Barough, S., Derakhshan, M. A., Yazdankhah, M., Lotfibakhshaiesh, N., Soleimani, M., ... & Ai, J., 2019, PCL/gelatin nanofibrous scaffolds with human endometrial stem cells/Schwann cells facilitate axon regeneration in spinal cord injury. *Journal of cellular physiology*, 234(7), 11060-11069.
- Bacakova, L., Zikmundova, M., Pajorova, J., Broz, A., Filova, E., Blanquer, A., ... & Sinica, A., 2019, Nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering and wound healing based on synthetic polymers. *Applications of nanobiotechnology*, 1.

- Bacakova, L., Pajorova, J., Bacakova, M., Skogberg, A., Kallio, P., Kolarova, K., & Svorcik, V., 2019a, Versatile application of nanocellulose: From industry to skin tissue engineering and wound healing. *Nanomaterials*, 9(2), 164.
- Bahar, D. U., 2021, Yara İyileştirme Özellikli Polimerlerin Yara Örtülerinde Kullanımı. *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (13), 157-181.
- Bahrami, A., Delshadi, R., & Jafari, S. M., 2020, Active delivery of antimicrobial nanoparticles into microbial cells through surface functionalization strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 217-228.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M., 2008, Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5), 585-601.
- Bawa, R., 2019, Drug delivery at the nanoscale: a guide for scientists, physicians and lawyers. In *The road from nanomedicine to precision medicine* (pp. 1-134). Jenny Stanford Publishing.
- Beck, K., Hunter, I., & Engel, J., 1990, Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *The FASEB journal*, 4(2), 148-160.
- Behere, I., & Ingavle, G., 2022, *In vitro* and *in vivo* advancement of multifunctional electrospun nanofiber scaffolds in wound healing applications: Innovative nanofiber designs, stem cell approaches, and future perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(2), 443-461.
- Briggaman, R. A., 1982, Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(1), 1-6.
- Briggaman, R. A., & Wheeler Jr, C. E. (1975). The epidermal-dermal junction. *Journal of investigative Dermatology*, 65(1), 71-84.
- Brohem, C. A., da Silva Cardeal, L. B., Tiago, M., Soengas, M. S., de Moraes Barros, S. B., & Maria-Engler, S. S., 2011, Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment cell & melanoma research*, 24(1), 35-50.
- Burgeson, R. E., 1982, Genetic heterogeneity of collagens. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1), 25-30.
- Ceozzo, K., Gaynor, A., Shaffer, L., Kojima, K., Vacanti, C. A., & Stahl, G. L., 2006, Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue engineering*, 12(2), 301-308.
- Chen, Z. J., Yang, J. P., Wu, B. M., & Tawil, B., 2014, A novel three-dimensional wound healing model. *Journal of Developmental Biology*, 2(4), 198-209.
- Chen, D., Zhu, T., Fu, W., & Zhang, H., 2019, Electrospun polycaprolactone/collagen nanofibers cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide and genipin facilitate endothelial cell regeneration and may be

- a promising candidate for vascular scaffolds. *International Journal of Nanomedicine*, 2127-2144.
- Chrastil, J., 1991, Gelation of calcium alginate. Influence of rice starch or rice flour on the gelation kinetics and on the final gel structure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(5), 874-876.
- Clark, R. A. F., 1999, Mechanisms of cutaneous wound repair. In I. M. Freedberg, A. Z. Eisen, K. Wolff, K. F. Austen, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, & T. B. Fitzpatrick (Eds.), *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* (5th ed., Vol. 1, pp. 326–341). McGraw-Hill.
- Cohen, S., & Elliott, G. A., 1963, The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J invest dermatol*, 40(1), 1-5.
- Commandeur, S., van Drongelen, V., de Gruijl, F. R., & El Ghalbzouri, A., 2012, Epidermal growth factor receptor activation and inhibition in 3 D *in vitro* models of normal skin and human cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 103(12), 2120-2126.
- Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M., & Poumay, Y., 1999, Differential expression and release of cytokines by an *in vitro* reconstructed human epidermis following exposure to skin irritant and sensitizing chemicals. *Toxicology in vitro*, 13(6), 867-877.
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M., 2001, Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133.
- Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M., 2023, Chitosan nanoparticles production: optimization of physical parameters, biochemical characterization, and stability upon storage. *Applied Sciences*, 13(3), 1900.
- Csaba, N., Köping-Höggård, M., & Alonso, M. J., 2009, Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International journal of pharmaceutics*, 382(1-2), 205-214.
- Dasari SS, Seelam N, Sowmya K, Renuka K, Praveen K, Prashanthievangelin M., 2020, Nano particles: a current review. *J Pharm Innov* 9(7):200–202.
- Debnath, S., Kumar, R. S., & Babu, M. N., 2011, Ionotropic gelation—a novel method to prepare chitosan nanoparticles. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 4(4), 492-495.
- Deng, A., Yang, Y., Du, S., & Yang, S., 2018, Electrospinning of in situ crosslinked recombinant human collagen peptide/chitosan nanofibers for wound healing. *Biomaterials science*, 6(8), 2197-2208.
- Deshayes, N., Bloas, F., Boissout, F., Lecardonnel, J., & Paris, M., 2018, 3D *In vitro* model of the re-epithelialization phase in the wound-healing process. *Experimental Dermatology*, 27(5), 460-462.

- Ding, J., Zhang, J., Li, J., Li, D., Xiao, C., Xiao, H., ... & Chen, X., 2019,, Electrospun polymer biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 90, 1-34.
- Dorschner, R. A., Pestonjamas, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., ... & Gallo, R. L., 2001, Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(1), 91-97.
- Ehrmann, A., 2021, Non-toxic crosslinking of electrospun gelatin nanofibers for tissue engineering and biomedicine—a review. *Polymers*, 13(12), 1973.
- Elbehairi, S. E. I., Ismail, L. A., Alfaifi, M. Y., Elshaarawy, R. F., & Hafez, H. S., 2020, Chitosan nano-vehicles as biocompatible delivering tools for a new Ag (I) curcuminoid-Gboxin analog complex in cancer and inflammation therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2750-2764.
- Elshaarawy, R. F., Ismail, L. A., Alfaifi, M. Y., Rizk, M. A., Eltamany, E. E., & Janiak, C., 2020, Inhibitory activity of biofunctionalized silver-capped N-methylated water-soluble chitosan thiomers for microbial and biofilm infections. *International journal of biological macromolecules*, 152, 709-717.
- Esentürk, İ., Erdal, M. S., & Güngör, S., 2016, Electrospinning method to produce drug-loaded nanofibers for topical/transdermal drug delivery applications. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 46(1), 49-69.
- Fahimirad, S., Ajallouei, F., & Ghorbanpour, M., 2019, Synthesis and therapeutic potential of silver nanomaterials derived from plant extracts. *Ecotoxicology and environmental safety*, 168, 260-278.
- Fahimirad S, Fahimirad Z, Sillanpaa M., 2020, Efficient removal of water bacteria and viruses using electrospun nanofibers. *Sci Total Environ* 751:141673
- Fahimirad, S., Ghaznavi-Rad, E., Abtahi, H., & Sarlak, N., 2021, Antimicrobial activity, stability and wound healing performances of chitosan nanoparticles loaded recombinant LL37 antimicrobial peptide. *International journal of peptide research and therapeutics*, 27(4), 2505-2515.
- Fahimirad, S., Khaki, M., Ghaznavi-Rad, E., & Abtahi, H., 2024, Investigation of a novel bilayered PCL/PVA electrospun nanofiber incorporated Chitosan-LL37 and Chitosan-VEGF nanoparticles as an advanced antibacterial cell growth-promoting wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 661, 124341.
- Fallah, M., Bahrami, S. H., & Ranjbar-Mohammadi, M., 2016, Fabrication and characterization of PCL/gelatin/curcumin nanofibers and their antibacterial properties. *Journal of industrial textiles*, 46(2), 562-577.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H., 2012, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.

- Farokhi, M., Mottaghitlab, F., Fatahi, Y., Khademhosseini, A., & Kaplan, D. L., 2018, Overview of silk fibroin use in wound dressings. *Trends in biotechnology*, 36(9), 907-922.
- Farzamfar, S., Aleahmad, M., Gholamreza, S. K., Majid, S., & Niloofar, N., 2020, Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 11, 11104-11115.
- Fleming, A., 1922, On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653), 306-317.
- Foxx, M., & Zilberman, M., 2015, Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert opinion on drug delivery*, 12(9), 1547-1563.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., ... & Tsukita, S., 2002, Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 156(6), 1099-1111.
- Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., Statkov, P. R., & Majno, G., 1972, Granulation tissue as a contractile organ a study of structure and function. *Journal of Experimental Medicine*, 135(4), 719-734.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & McCarron, P., 2005, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 65-73.
- Gao, W., Sun, L., Fu, X., Lin, Z., Xie, W., Zhang, W., ... & Chen, X., 2018, Enhanced diabetic wound healing by electrospun core-sheath fibers loaded with dimethylxalylglycine. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(2), 277-288.
- Gao, C., Zhang, L., Wang, J., Jin, M., Tang, Q., Chen, Z., ... & Zhao, G., 2021, Electrospun nanofibers promote wound healing: Theories, techniques, and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(14), 3106-3130.
- Ghassemi, Z., & Slaughter, G., 2018, Cross-linked electrospun gelatin nanofibers for cell-based assays. In *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* (pp. 6088-6091). IEEE.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., & Ramakrishna, S., 2008, Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34), 4532-4539.
- Gibas, I., & Janik, H., 2010, Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chemistry & chemical technology*, 4, 297-304.
- Gieringer, M., Gosepath, J., & Naim, R., 2011, Radiotherapy and wound healing: principles, management and prospects. *Oncology reports*, 26(2), 299-307.

- Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C., & Silva, J. C., 2017, Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 102, 1174-1185.
- Gomes, A., Teixeira, C., Ferraz, R., Prudêncio, C., & Gomes, P., 2017-a, Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries. *Molecules*, 22(10), 1743.
- Gottrup, F., Ågren, M. S., & Karlsmark, T., 2000, Models for use in wound healing research: a survey focusing on *in vitro* and *in vivo* adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 83-96.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., & Schenke-Layland, K., 2011, Skin tissue engineering—*in vivo* and *in vitro* applications. *Advanced drug delivery reviews*, 63(4-5), 352-366.
- Green, C. B., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M. A., & Hoyer, L. L., 2004, RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology*, 150(2), 267-275.
- Gschwandtner, M., Mildner, M., Mlitz, V., Eckhart, L., Werfel, T., Gutzmer, R., & Tschachler, E., 2012, Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs the inside-out barrier function of the epidermis – A new role for mast cells in inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(Suppl. 1), S58.
- Gürsu, E., 2019, Yanık tedavisinde kitosan yara örtüleri.
- Haake, A. R., 1999, The structure and development of skin. *Dermatology in general medicine*, 70-114.
- Harper, R. A., & Grove, G., 1979, Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential *in vitro*. *Science*, 204(4392), 526-527.
- Hassan, U. A., Hussein, M. Z., Alitheen, N. B., Yahya Ariff, S. A., & Masarudin, M. J., 2018, *In vitro* cellular localization and efficient accumulation of fluorescently tagged biomaterials from monodispersed chitosan nanoparticles for elucidation of controlled release pathways for drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 5075-5095.
- Hassan, Y. A., Khedr, A. I., Alkabli, J., Elshaarawy, R. F., & Nasr, A. M., 2021, Co-delivery of imidazolium Zn (II) salen and *Origanum Syriacum* essential oil by shrimp chitosan nanoparticles for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117834.
- He, X., Deng, H., Aker, W. G., & Hwang, H. M., 2019, Regulation and safety of nanotechnology in the food and agriculture industry. In *Food applications of nanotechnology* (pp. 525-536). CRC Press.
- Headington, J. T., & Cerio, R., 1990,

- Dendritic cells and the dermis: 1990. *The American Journal of Dermatopathology*, 12(3), 217-220.
- Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Sørensen, O., Ståhle-Bäckdahl, M., Kratz, G., Weber, G., & Borregaard, N., 2003, The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(3), 379-389.
- Ho, Y. H., Shah, P., Chen, Y. W., & Chen, C. S., 2016, Systematic analysis of intracellular-targeting antimicrobial peptides, bactenecin 7, hybrid of pleurocidin and dermasseptin, proline-arginine-rich peptide, and lactoferricin B, by using *Escherichia coli* proteome microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(6), 1837-1847.
- Homaieghar, S., & Boccaccini, A. R., 2020, Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta biomaterialia*, 107, 25-49.
- Houacine, C., Yousaf, S. S., Khan, I., Khurana, R. K., & Singh, K. K., 2018, Potential of natural biomaterials in nano-scale drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 24(43), 5188-5206.
- Huesca-Urióstegui, K., García-Valderrama, E. J., Gutierrez-Urbe, J. A., Antunes-Ricardo, M., & Guajardo-Flores, D., 2022, Nanofiber Systems as Herbal Bioactive Compounds Carriers: Current Applications in Healthcare. *Pharmaceutics*, 14(1), 191.
- Hussain, Z., & Sahudin, S., 2016, Preparation, characterisation and colloidal stability of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: optimisation of formulation and process parameters. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 8(3), 297-308.
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M., 2022, Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon*, 8(1).
- Huang, Y., & Lapitsky, Y., 2011, Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels. *Langmuir*, 27(17), 10392-10399.
- Huang, X., Zhang, Y., & Li, J., 2021, Microstructure and biological properties of electrospun in situ polymerization of polycaprolactone-graft-polyacrylic acid nanofibers and its composite nanofiber dressings. *Polymers*, 13(23), 4246.
- Hunt, T. K., Twomey, P., Zederfeldt, B., & Dunphy, J. E., 1967, Respiratory gas tensions and pH in healing wounds. *The American journal of surgery*, 114(2), 302-307.
- Hunt, T. K., Aslam, R., Hussain, Z., & Beckert, S., 2008, Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Oxygen Transport to Tissue XXIX*, 73-80.
- Iacob, A. T., Lupascu, F. G., Apotrosoaei, M., Vasincu, I. M., Tauser, R. G., Lupascu, D., ... & Profire, L., 2021, Recent biomedical approaches for chitosan based materials as drug delivery nanocarriers. *Pharmaceutics*, 13(4), 587.

- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H., 2012, Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials*, 2012(1), 632698.
- Jalali-Jivan, M., Garavand, F., & Jafari, S. M., 2020, Microemulsions as nano-reactors for the solubilization, separation, purification and encapsulation of bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science*, 283, 102227.
- Jannasch, M., Groeber, F., Brattig, N. W., Unger, C., Walles, H., & Hansmann, J., 2015, Development and application of three-dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Experimental parasitology*, 150, 22-30.
- Jiang, S., Ma, B. C., Reinholz, J., Li, Q., Wang, J., Zhang, K. A., ... & Crespy, D., 2016, Efficient nanofibrous membranes for antibacterial wound dressing and UV protection. *ACS applied materials & interfaces*, 8(44), 29915-29922.
- Jiang, S., Chen, Y., Duan, G., Mei, C., Greiner, A., & Agarwal, S., 2018, Electrospun nanofiber reinforced composites: A review. *Polymer Chemistry*, 9(20), 2685-2720.
- John, J. V., Sharma, N. S., Tang, G., Luo, Z., Su, Y., Weihs, S., ... & Xie, J., 2023, Nanofiber aerogels with precision macrochannels and LL-37-mimic peptides synergistically promote diabetic wound healing. *Advanced functional materials*, 33(1), 2206936.
- Jonassen, H., Kjoniksen, A. L., & Hiorth, M., 2012, Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 13(11), 3747-3756.
- Kamal, I., Khedr, A. I., Alfaifi, M. Y., Elbehairi, S. E. I., Elshaarawy, R. F., & Saad, A. S., 2021, Chemotherapeutic and chemopreventive potentials of *p*-coumaric acid–Squid chitosan nanogel loaded with *Syzygium aromaticum* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 523-533.
- Kefalides, N. A., 1973, Structure and biosynthesis of basement membranes. *International review of connective tissue research*, 6, 63-104.
- Keong, L. C., & Halim, A. S., 2009, *In vitro* models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International journal of molecular sciences*, 10(3), 1300-1313.
- Kishimoto, T., 1989, The biology of interleukin-6. *Blood*, 74(1), 1-10.
- Kolar, S. S., & McDermott, A. M., 2011, Role of host-defence peptides in eye diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2201-2213.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J., 2010, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.

- Kweon, D. K., Song, S. B., & Park, Y. Y., 2003, Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, 24(9), 1595-1601.
- Lasser, A., 1983, The mononuclear phagocytic system: a review. *Human pathology*, 14(2), 108-126.
- Laurie, G. W., Leblond, C. P., & Martin, G. R., 1983, Light microscopic immunolocalization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin in the basement membranes of a variety of rat organs. *American Journal of Anatomy*, 167(1), 71-82.
- Levenson, S. M., Geever, E. F., Crowley, L. V., Oates III, J. F., Berard, C. W., & Rosen, H., 1965, Healing of rat skin wounds. *Annals of surgery*, 161(2), 293.
- 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. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 60(4), 613-621.
- Li, L., Qian, Y., Jiang, C., Lv, Y., Liu, W., Zhong, L., ... & Yang, L., 2012, The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*, 33(12), 3428-3445.
- Li, F., Jin, H., Xiao, J., Yin, X., Liu, X., Li, D., & Huang, Q., 2018, The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. *Food research international*, 111, 351-360.
- Li, J. J., Yang, Y. Y., Yu, D. G., Du, Q., & Yang, X. L., 2018a, Fast dissolving drug delivery membrane based on the ultra-thin shell of electrospun core-shell nanofibers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 195-204.
- Li, W., Yu, Q., Yao, H., Zhu, Y., Topham, P. D., Yue, K., ... & Wang, L., 2019, Superhydrophobic hierarchical fiber/bead composite membranes for efficient treatment of burns. *Acta Biomaterialia*, 92, 60-70.
- Li, T., Sun, M., & Wu, S., 2022, State-of-the-art review of electrospun gelatin-based nanofiber dressings for wound healing applications. *Nanomaterials*, 12(5), 784.
- Lin, X., Wang, R., & Mai, S., 2020, Advances in delivery systems for the therapeutic application of LL37. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102016.
- Liu, Y., Li, T., Han, Y., Li, F., & Liu, Y., 2021, Recent development of electrospun wound dressing. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 17, 100247.
- Liverani, L., & Boccaccini, A. R., 2016, Versatile production of poly (epsilon-caprolactone) fibers by electrospinning using benign solvents. *Nanomaterials*, 6(4), 75.

- Longo, R., Catauro, M., Sorrentino, A., & Guadagno, L., 2022, Thermal and mechanical characterization of complex electrospun systems based on polycaprolactone and gelatin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(9), 5391-5399.
- López-Chávez, E., Martínez-Magadán, J. M., Oviedo-Roa, R., Guzmán, J., Ramírez-Salgado, J., & Marín-Cruz, J., 2005, Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes. *Polymer*, 46(18), 7519-7527.
- MacNeil, S., 2007, Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880.
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., VanDersarl, J. J., Mokarram, N., Hojjati-Emami, S., Dashtimoghadam, E., ... & Renaud, P., 2014, On-chip fabrication of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles for cancer therapeutics. *Advanced Functional Materials*, 24(4), 432-441.
- Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., & Statkov, P. R., 1971, Contraction of granulation tissue *in vitro*: similarity to smooth muscle. *Science*, 173(3996), 548-550.
- Manoukian, O. S., Matta, R., Letendre, J., Collins, P., Mazzocca, A. D., & Kumbar, S. G., 2017, Electrospun nanofiber scaffolds and their hydrogel composites for the engineering and regeneration of soft tissues. *Biomedical nanotechnology: Methods and protocols*, 261-278.
- Martin, C. W., & Muir, I. F. K., 1990, The role of lymphocytes in wound healing. *British journal of plastic surgery*, 43(6), 655-662.
- Martin-Serrano, Á., Gómez, R., Ortega, P., & de la Mata, F. J., 2019, Nanosystems as vehicles for the delivery of antimicrobial peptides (AMPs). *Pharmaceutics*, 11(9), 448.
- Memic, A., Abdullah, T., Mohammed, H. S., Joshi Navare, K., Colombani, T., & Bencherif, S. A., 2019, Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications. *ACS Applied Bio Materials*, 2(3), 952-969.
- Miguel, S. P., Figueira, D. R., Simões, D., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Ferreira, P., & Correia, I. J., 2018, Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 169, 60-71.
- Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C., & Sefadi, J. S., 2019, Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: A mini review. *Applied Sciences*, 9(11), 2205.
- Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & d'Ayala, G. G., 2020, Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate polymers*, 233, 115839.

- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., & Krepler, R., 1982, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24.
- Mondrinos, M. J., Dembzyński, R., Lu, L., Byrapogu, V. K., Wootton, D. M., Lelkes, P. I., & Zhou, J., 2006, Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone–calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 27(25), 4399-4408.
- Moulin, V., 1995, Growth factors in skin wound healing. *European journal of cell biology*, 68(1), 1-7.
- Moulin, V., Auger, F. A., Garrel, D., & Germain, L., 2000, Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns*, 26(1), 3-12.
- Mulder, P. P., Raktoc, R. S., Vlig, M., Elgersma, A., Middelkoop, E., & Boekema, B. K., 2023, Full skin equivalent models for simulation of burn wound healing, exploring skin regeneration and cytokine response. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(1), 29.
- Muzzarelli, C., & Muzzarelli, R. A., 2002, Natural and artificial chitosan–inorganic composites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(2), 89-94.
- Nagant, C., Pitts, B., Nazmi, K., Vandenbranden, M., Bolscher, J. G., Stewart, P. S., & Dehaye, J. P., 2012, Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 5698-5708.
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T., 2005, Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Tissue engineering I*, 47-90.
- Nair, R. S., Morris, A., Billa, N., & Leong, C. O., 2019, An evaluation of curcumin-encapsulated chitosan nanoparticles for transdermal delivery. *Aaps Pharmscitech*, 20(2), 69.
- Nasri, R., Hamdi, M., Touri, S., Li, S., Karra-Chaâbouni, M., & Nasri, M., 2021, Development of delivery system based on marine chitosan: Encapsulation and release kinetic study of antioxidant peptides from chitosan microparticle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1445-1451.
- Negut, I., Dorcioman, G., & Grumezescu, V., 2020, Scaffolds for wound healing applications. *Polymers*, 12(9), 2010.
- Neshani, A., Zare, H., Eidgahi, M. R. A., Kakhki, R. K., Safdari, H., Khaledi, A., & Ghazvini, K., 2019, LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens. *Gene Reports*, 100519.

- Nishiyama, T., Amano, S., Tsunenaga, M., Kadoya, K., Takeda, A., Adachi, E., & Burgeson, R. E., 2000, The importance of laminin 5 in the dermal–epidermal basement membrane. *Journal of dermatological science*, 24, S51-S59.
- Nissen, N. N., Polverini, P., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L., & DiPietro, L. A., 1998, Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American journal of pathology*, 152(6), 1445.
- Noore, J., Noore, A., & Li, B., 2013, Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra-and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1283-1290.
- Nuti, R., Goud, N. S., Saraswati, A. P., Alvala, R., & Alvala, M., 2017, Antimicrobial peptides: a promising therapeutic strategy in tackling antimicrobial resistance. *Current medicinal chemistry*, 24(38), 4303-4314.
- OECD. Test No. 431: *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. 2019, p. 26. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>.
- OECD. Test No. 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 2019, p. 21. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>.
- Ojeda-Hernández, D. D., Canales-Aguirre, A. A., Matias-Guiu, J., Gomez-Pinedo, U., & Mateos-Díaz, J. C., 2020, Potential of chitosan and its derivatives for biomedical applications in the central nervous system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 389.
- Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., & Shai, Y., 1999, Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochemical Journal*, 341(3), 501-513.
- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C., Rehm, B. H., & Hancock, R. E., 2008, Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and immunity*, 76(9), 4176-4182.
- Ozturk, K., Arslan, F. B., Tavukcuoglu, E., Esendagli, G., & Calis, S., 2020, Aggregation of chitosan nanoparticles in cell culture: Reasons and resolutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119119.
- Pageon, H., Zucchi, H., Rousset, F., Monnier, V. M., & Asselineau, D., 2014, Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(1), 169-174.
- Pal, P., Srivas, P. K., Dadhich, P., Das, B., Maulik, D., & Dhara, S., 2017, Nano-/microfibrous cotton-wool-like 3D scaffold with core–shell architecture by

- emulsion electrospinning for skin tissue regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(12), 3563-3575.
- Pal, I., Bhattacharyya, D., Kar, R. K., Zarena, D., Bhunia, A., & Atreya, H. S., 2019, A peptide-nanoparticle system with improved efficacy against multidrug resistant bacteria. *Scientific reports*, 9(1), 4485.
- Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Kharaziha, M., Ismail, A. F., Sharif, S., ... & Berto, F., 2022, Antimicrobial Synthetic and Natural Polymeric Nanofibers as Wound Dressing: A Review. *Advanced Engineering Materials*, 2101460.
- Park, J. S., Han, T. H., Lee, K. Y., Han, S. S., Hwang, J. J., Moon, D. H., ... & Cho, Y. W., 2006, N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: endocytosis, exocytosis and drug release. *Journal of Controlled Release*, 115(1), 37-45.
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O., 2015, Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417-426.
- Patrulea, V., Borchard, G., & Jordan, O., 2020, An update on antimicrobial peptides (AMPs) and their delivery strategies for wound infections. *Pharmaceutics*, 12(9), 840.
- Paul, W., & Sharma, C. P., 2004, Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, 18(1), 18-23.
- Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., ... & Tennikova, T., 2019, pH-sensitive chitosan-heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells. *Pharmaceutics*, 11(7), 317.
- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Gazzarri, M., Bartoli, C., Grassi, L., ... & Batoni, G., 2015, Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity *in vitro* against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in microbiology*, 6, 372.
- Ponec, M., 2002, Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Advanced drug delivery reviews*, 54, S19-S30.
- Porporato, P. E., Payen, V. L., De Saedeleer, C. J., Pr at, V., Thissen, J. P., Feron, O., & Sonveaux, P., 2012, Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis*, 15, 581-592.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M., 2008, The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 17(12), 1063-1072.
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G., 2018, Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in pharmacology*, 9, 281.

- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X., 2004, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.
- Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M. R., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M., 2021, Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117, 100721.
- Ramos, R., Silva, J. P., Rodrigues, A. C., Costa, R., Guardão, L., Schmitt, F., ... & Gama, M., 2011, Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides*, 32(7), 1469-1476.
- Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J., & Werb, Z., 1988, Wound macrophages express TGF- α and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241(4866), 708-712.
- Rashki, S., Safardoust-Hojaghan, H., Mirzaei, H., Abdulsahib, W. K., Mahdi, M. A., Salavati-Niasari, M., ... & Mousavi, S. G. A., 2022, Delivery LL37 by chitosan nanoparticles for enhanced antibacterial and antibiofilm efficacy. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119634.
- Rasouli, R., Barhoum, A., Bechelany, M., & Dufresne, A., 2019, Nanofibers for biomedical and healthcare applications. *Macromolecular bioscience*, 19(2), 1800256.
- Reijnders, C. M., van Lier, A., Roffel, S., Kramer, D., Scheper, R. J., & Gibbs, S., 2015, Development of a full-thickness human skin equivalent *in vitro* model derived from TERT-immortalized keratinocytes and fibroblasts. *Tissue Engineering Part A*, 21(17-18), 2448-2459. Replacement, refinement & reduction of animals in research, 2014. <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>. Accessed 14 Mayis 2025
- Reuter, C., Walles, H., & Groeber, F., 2017, Preparation of a three-dimensional full thickness skin equivalent. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, 191-198.
- Rheinwald, J. G., & Green, H., 1977, Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*, 265(5593), 421-424.
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., ... & Balcão, V. M., 2016, Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological research*, 191, 51-80.
- Rossi, A., Appelt-Menzel, A., Kurdyn, S., Walles, H., & Groeber, F., 2015, Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (96), 52576.
- Sage, H., 1982, Collagens of basement membranes. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1), 51-59.
- Semwal, A., Singh, R., & Dutta, P. K., 2013, Chitosan: a promising substrate for pharmaceuticals. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 1(2), 87-102.

- Serio, F., Miola, M., Vernè, E., Pisignano, D., Boccaccini, A. R., & Liverani, L., 2019, Electrospun filaments embedding bioactive glass particles with ion release and enhanced mineralization. *Nanomaterials*, 9(2), 182.
- Seppanen, E. J., Thornton, R. B., Corscadden, K. J., Granland, C. M., Hibbert, J., Fuery, A., ... & Kirkham, L. A. S., 2019, High concentrations of middle ear antimicrobial peptides and proteins and proinflammatory cytokines are associated with detection of middle ear pathogens in children with recurrent acute otitis media. *PLoS One*, 14(12), e0227080.
- Sezer, A. D., & Cevher, E., 2011, Biopolymers as wound healing materials: challenges and new strategies. *Biomaterials applications for nanomedicine*, 383-414.
- Schäffer, M., & Barbul, A., 1998, Lymphocyte function in wound healing and following injury. *British journal of surgery*, 85(4), 444-460.
- Schleicher, E. D., Wagner, E. M., Olgemöller, B., Nerlich, A. G., & Gerbitz, K. D., 1989, Characterization and localization of basement membrane-associated heparan sulfate proteoglycan in human tissues. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 61(3), 323-332.
- Schneider, A., Wang, X. Y., Kaplan, D. L., Garlick, J. A., & Egles, C., 2009, Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta biomaterialia*, 5(7), 2570-2578.
- Schrieber, R., & Gareis, H., 2007, *Gelatine handbook: theory and industrial practice*. John Wiley & Sons.
- Schultz, G., Clark, W., & Rotatori, D. S., 1991, EGF and TGF- α in wound healing and repair. *Journal of cellular biochemistry*, 45(4), 346-352.
- Shaykhiev, R., Beißwenger, C., Kändler, K., Senske, J., Püchner, A., Damm, T., ... & Bals, R., 2005, Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5), L842-L848.
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B., 2013, Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, 59, 46-58.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E., 1992, Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845.
- Singer, A. J., & Clark, R. A., 1999, Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.
- Singh, M., & Jonnalagadda, S., 2020, Advances in bioprinting using additive manufacturing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 143, 105167.

- Sørensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T., & Borregaard, N., 2003, Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5583-5589.
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R., 2018, Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific reports*, 8(1), 4695.
- Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I., 2016, *In vitro* wound healing assays—state of the art. *BioNanoMaterials*, 17(1-2), 79-87.
- Steinstraesser, L., Koehler, T., Jacobsen, F., Daigeler, A., Goertz, O., Langer, S., ... & Hirsch, T., 2008, Host defense peptides in wound healing. *Molecular medicine*, 14, 528-537.
- Steinstraesser, L., Hirsch, T., Schulte, M., Kueckelhaus, M., Jacobsen, F., Mersch, E. A., ... & Kindrachuk, J., 2012, Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection.
- Sukigara, S., Gandhi, M., Ayutsede, J., Micklus, M., & Ko, F., 2003, Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer*, 44(19), 5721-5727.
- Sun, L., Chen, Y., Zhou, Y., Guo, D., Fan, Y., Guo, F., ... & Chen, W., 2017, Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release *in vitro* and *in vivo*. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(5), 418-423.
- Sun, G., Qin, J., Chen, F., & Wu, P., 2022, Recent Advances in Bioengineered Scaffolds for Cutaneous Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 244.
- Takahashi, T., & Gallo, R. L., 2017, The critical and multifunctional roles of antimicrobial peptides in dermatology. *Dermatologic clinics*, 35(1), 39-50.
- Talapko, J., Meštrović, T., Juzbašić, M., Tomas, M., Erić, S., Horvat Aleksijević, L., ... & Škrlec, I., 2022, Antimicrobial peptides—mechanisms of action, antimicrobial effects and clinical applications. *Antibiotics*, 11(10), 1417.
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T., & Lavker, R. M., 2000, Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 102(4), 451-461.
- Thapa, R. K., Diep, D. B., & Tønnesen, H. H., 2020, Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects. *Acta biomaterialia*, 103, 52-67.
- Tıǧlı Aydın, R. S., & Pulat, M., 2012, 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*, 2012(1), 313961.

- Tonnesen, M. G., Scott Worthen, G., & Johnston Jr, R. B., 1988, Neutrophil emigration, activation, and tissue damage. In *The molecular and cellular biology of wound repair* (pp. 149-183). Boston, MA: Springer US.
- Tsirogianni, A. K., Moutsopoulos, N. M., & Moutsopoulos, H. M., 2006, Wound healing: immunological aspects. *Injury*, 37(1), S5-S12.
- Tüylek, Z., 2020, Sağlık Alanında Kullanılan Polimerik Biyomateryaller. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 3(2), 67-76.
- Tzeyung, A. S., Md, S., Bhattamisra, S. K., Madheswaran, T., Alhakamy, N. A., Aldawsari, H. M., & Radhakrishnan, A. K., 2019, Fabrication, optimization, and evaluation of rotigotine-loaded chitosan nanoparticles for nose-to-brain delivery. *Pharmaceutics*, 11(1), 26.
- Unnithan, A. R., Sasikala, A. R. K., Murugesan, P., Gurusamy, M., Wu, D., Park, C. H., & Kim, C. S., 2015, Electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats loaded with Estradiol for post-menopausal wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 77, 1-8.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V., 2009, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*, 37(5), 1528-1542.
- Wang, Y., Rodriguez-Perez, M. A., Reis, R. L., & Mano, J. F., 2005, Thermal and thermomechanical behaviour of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends for biomedical applications. *Macromolecular Materials and Engineering*, 290(8), 792-801.
- Wang, C., Sun, S., Zhang, L., Yin, J., Jiao, T., Zhang, L., ... & Peng, Q., 2019, Facile preparation and catalytic performance characterization of AuNPs-loaded hierarchical electrospun composite fibers by solvent vapor annealing treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 561, 283-291.
- Watt, F. M., 1983, Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 81(1), S100-S103.
- Watt, F. M., 2002, The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *Journal of dermatological science*, 28(3), 173-180.
- Wedmore, I., McManus, J. G., Pusateri, A. E., & Holcomb, J. B., 2006, A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 60(3), 655-658.
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W., 2010, The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in polymer science*, 35(10), 1217-1256.
- Wu, S., Liu, J., Cai, J., Zhao, J., Duan, B., & Chen, S., 2021b, Combining electrospinning with hot drawing process to fabricate high performance poly (L-lactic acid)

- nanofiber yarns for advanced nanostructured bio-textiles. *Biofabrication*, 13(4), 045018.
- Xie, Y., Rizzi, S. C., Dawson, R., Lynam, E., Richards, S., Leavesley, D. I., & Upton, Z., 2010, Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(5), 1111-1123.
- Xu, Y., & Du, Y., 2003, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 250(1), 215-226.
- Xu, T., Jin, W., Wang, Z., Cheng, H., Huang, X., Guo, X., ... & Yang, H., 2018, Electrospun CuO-nanoparticles-modified polycaprolactone@polypyrrole fibers: An application to sensing glucose in saliva. *Nanomaterials*, 8(3), 133.
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y., 2019, Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical reviews*, 119(8), 5298-5415.
- Zahiri, M., Khanmohammadi, M., Goodarzi, A., Ababzadeh, S., Farahani, M. S., Mohandesnezhad, S., ... & Ai, J., 2020, Encapsulation of curcumin loaded chitosan nanoparticle within poly (ϵ -caprolactone) and gelatin fiber mat for wound healing and layered dermal reconstitution. *International journal of biological macromolecules*, 153, 1241-1250.
- Zhang, Y., Ouyang, H., Lim, C. T., Ramakrishna, S., & Huang, Z. M., 2005, Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 72(1), 156-165.
- Zhao, J., & Wu, J., 2006, Preparation and characterization of the fluorescent chitosan nanoparticle probe. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34(11), 1555-1559.