



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE
BÜYÜME FAKTÖRÜ EKLENMİŞ BORİK
ASİT KATKILI PLCL DERİ İKAMESİ
ÜRETİMİ**

HABİP ORHAN

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ BENGİ YILMAZ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAZİRAN/2021**

İTHAF

“Bu tezi Türk Milleti’ne ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Bu çalışma S.B.Ü. BAP Koordinatörlüğü tarafından 2019/042 no'lu Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Bu süreçte bana yardım eden Biyomalzeme Anabilim Dalı Başkanı ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca ve tezimde bana yardımcı olan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Bengi Yılmaz'a;

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgilerini bana aktaran Dr. Öğr. Üyesi Aydın Tahmasebifar'a, Doku Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Erkan Türker Boran'a; laboratuvarı kullanmamıza imkan sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Katı'ya;

DETAUM Müdürü Prof. Dr. Şaban Tekin'e;

Bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma;

ve bana her zaman destek olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DERİ	3
2.1.1.Epidermis.....	4
2.1.2.Dermis	7
2.2. DERİDE YANIK VE DİĞER YARALAR	9
2.3.YARA İYİLEŞMESİ	12
2.4. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DERİ İKAMELERİ	17
2.4.1. Elektroğırme Yöntemi ile Deri İkamesi Üretimi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. MALZEMELER	31
3.2. ELEKTROĞİRME DÜZENEGİ.....	31
3.3. ÇÖZELTİ HAZIRLANMASI VE OLUŞTURULAN DENEY GRUPLARI	32
3.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)	34
3.5. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)	34
3.6. DERİ İKAMELERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ.....	35
3.7. BORİK ASİT SALIMINA BAĞLI PH DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ.....	35
3.8. DERİ İKAMELERİNİN MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....	36
3.9. DERİ İKAMELERİNİN SU BUHARI VE OKSİJEN GEÇİRGENLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	37
3.10. DERİ İKAMELERİN YÜZEY TEMAS AÇILARININ ÖLÇÜLMESİ	37
3.11. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ.....	38

3.12. DERİ İKAMELERİNİN <i>IN VITRO</i> SİTOTOKSİSİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	39
4. BULGULAR	42
4.1. ÜRETİLEN DERİ İKAMELERİNİN GÖRÜNÜMÜ	42
4.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)	42
4.3. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)	56
4.4. DERİ İKAMELERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME VE BOZUNMA DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ.....	59
4.5. BORİK ASİT SALIMINA BAĞLI PH DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ.....	60
4.6. DERİ İKAMELERİNİN MEKANİK DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ	61
4.7. DERİ İKAMELERİNİN SU BUHARI VE OKSİJEN GEÇİRGENLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	63
4.8. YÜZEY TEMAS AÇISI ÖLÇÜMÜ	65
4.9. ANTİBAKTERİYELLİK ANALİZİ	67
4.10. HÜCRE CANLILIĞI ANALİZİ.....	68
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Küresel piyasada ticari olarak mevcut deri ikamelerinden bazılarının karşılaştırılması	21
Tablo 2.2: Ticari olarak mevcut yara örtüsü malzemeleri	23
Tablo 2.3: Elektroğirme yöntemiyle üretilmiş deri doku mühendisliği ürünlerine yönelik literatürde yer alan çalışmalardan bazı örnekler	28
Tablo 3.1: Elektroğirmede çalışılan örnek numaraları ve açıklamaları	33
Tablo 4.1: Borik asit ve PLCL için dalga numarası tanımlamaları	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1:** Deri dokusunun organizasyonu, kalın, kıl içermeyen (plantar ve palmar) deride bulunan yapıların ince, kıl içeren cilt ile karşılaştırılması. Epidermis, birbirine bağlı dermal ve epidermal papillaları göstermek için kısmen yüzeyden kaldırılmış halde gösterilmiştir 4
- Şekil 2.2:** Cilt yapısına göre farklı derecelerde yanık yaraları 10
- Şekil 2.3:** Yara iyileşmesinin dört aşaması: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma veya yeniden şekillenme aşamaları 14
- Şekil 2.4:** Genel amaçlı, tek şırıngalı bir elektroëğirme cihazının ve polimer çözeltilsinin iğne ucunda oluşturduğu Taylor konisinin şematik gösterimi 27
- Şekil 3.1:** Laboratuvarımızda oluşturulan elelektroëğirme sistemi: a) Elektroëğirme düzeneğinin şematik gösterimi; b) doğru akım (DC) yüksek voltaj güç kaynağına sahip bir elektroëğirme cihazı.....32
- Şekil 4.1:** Öğütölmemiş (büyük çaplı) borik asit partiköllerinin 3% oranında eklenmiş olduğı %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltilsinde 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroëğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin EDS analizi 50
- Şekil 4.2:** Öğütölmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiköllerinin 5% oranında eklenmiş olduğı %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltilsinde 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroëğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin EDS analizi 54
- Şekil 4.3:** Üretilen deri ikamelerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumları: (a) saf PLCL; (b) ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL; (c) ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL 58
- Şekil 4.4:** Üretilen deri ikamelerinin PBS içerisinde 14 güne kadar şişme oranları: saf PLCL (mavi), ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL (kırmızı) ve ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL (siyah) 60
- Şekil 4.5:** Üretilen deri ikamelerinin 14 gün boyunca PBS içerisinde meydana getirmiş oldukları pH değışimleri: saf PLCL (mavi), ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL

(kırmızı) ve ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL (siyah). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3)	61
Şekil 4.6: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız saf PLCL örneklerin ortalama maksimum çekme gerilmesi değerleri. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=4)	62
Şekil 4.7: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız saf PLCL fiber yapıdaki örneklerin karşılaştırmalı gerilim/gerinim grafiği	62
Şekil 4.8: Fiber yapıdaki deri ikamelerinin 14 gün boyunca su buharı geçirgenlik oranları ($\text{g.m}^{-2}.\text{gün}^{-1}$). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3).....	64
Şekil 4.9: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL ve kontrol grubunun oksijen satürasyon yüzdeleri. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3)	64
Şekil 4.10: Borik asit katkılı ve saf PLCL deri ikamelerinin oksijen geçirgenliğini gösteren suda çözülmüş oksijen miktarı (mg/L). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3).....	65
Şekil 4.11: Young denklemi şematik açıklaması	66
Şekil 4.12: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL, borik katkısız PLCL ve kontrol grubunun 1.,3., ve 7. günün sonundaki PrestoBlue testi ile ölçülen absorbans (570-600 nm) değerleri. Hata çubukları değerlerin $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir (n=4)	69

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 3.1:** Borik asit katkısız (saf) PLCL fiber örtülerin mekanik test sırasındaki görüntüleri: (a) çekme deneyi sırasında; (b) çekme yükü altında kopma anı 36
- Resim 3.2:** Deri ikamelerin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel test görüntüsü 39
- Resim 4.1:** Üretilen deri ikamelerinin fotoğrafları: (a) saf PLCL fiber mat; (b) ağırlıkça %5 oranında borik asit içeren PLCL fiber mat 42
- Resim 4.2:** Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50 μ m; (b)20 μ m; (c) 5 μ m ve (d) 2 μ m 43
- Resim 4.3:** Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı ile elektroğirme süresince iğne ucunda oluşan damlacığın farklı zamanlarda alınan fotoğrafları: (a) 1. dakika; (b) 3. dakika..... 44
- Resim 4.4:** Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50 μ m; (b)20 μ m; (c) 5 μ m ve (d) 2 μ m..... 44
- Resim 4.5:** %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50 μ m; (b)20 μ m; (c) 5 μ m ve (d) 2 μ m..... 46
- Resim 4.6:** %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50 μ m; (b)20 μ m; (c) 5 μ m ve (d) 2 μ m..... 47
- Resim 4.7:** Öğütülmemiş (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 100 μ m; (b) 50 μ m; (c)20 μ m; (d) 5 μ m ve (e) 2 μ m..... 49
- Resim 4.8:** Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8 kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak

üretile fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm.....	51
Resim 4.9: Öğütölmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretile fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm.....	52
Resim 4.10: Öğütölmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin %5 oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretile fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm.....	53
Resim 4.11: Öğütölmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partikölünün %5 oranında eklenmiş olduğu 10% PLCL çözeltisiyle elektroğirmesi sonucunda fiberlerin partiköl ile etkileşimini gösteren SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 10µm; (b) 5µm	54
Resim 4.12: Öğütölmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin SEM görüntüleri için gösterge çubukları: (a) 200µm; (b) 100µm; (c) 50µm ve (d) ImageJ programı ile analiz edilen partiköl çapı dağılımını gösteren histogram.....	55
Resim 4.13: Öğütölmemiş (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin (a) SEM görüntüsü (Gösterge çubuğu: 200µm) ve (b) ImageJ programı ile analiz edilen partiköl çapı dağılımını gösteren histogram	56
Resim 4.14: Deri ikamelerin su ile yüzey temas açısı ölçümü deneyi görüntüleri: a) borik asit eklenmemiş; b) %3 borik asit eklenmiş; c) %5 borik asit eklenmiş PLCL fiber deri ikameleri	66
Resim 4.15: <i>E. coli</i> bakterilerinin fiber yapıll deri ikameleri üzerinde kültörlenmesinden sonra SEM sonra SEM görüntüleri: a ve b) saf PLCL; c ve d) %3 borik asitli PLCL; e ve f) %5 borik asitli PLCL. Gösterge çubukları a,c ve e) 30µm ve b, d ve f) 10µm	67
Resim 4.16: <i>E. coli</i> bakterilerinin deri ikameleri üzerinde kültörlenmesinden sonra yüksek büyütmede SEM görüntüleri: a) saf PLCL; b) %3 borik asitli PLCL; c) %5 borik asitli PLCL. Gösterge çubukları: 5µm.....	68

Resim 4.17: EGF içeren ve ağırlıkça %5 borik asitli PLCL örneklerin üzerinde 7 gün kültürlenmiş fibroblast hücrelerinin floresans mikroskop görüntüleri: a) FITC-phalloidin görüntüsü; b) DAPI görüntüsü c) FITC-phalloidin ve DAPI birlikte görüntüsü. Gösterge çubukları (a ve b)155,5 µm ve c)124,4 µm..... 70

Resim 4.18: Hücrelerin kültür ortamında 7. günden sonra FITC-phalloidin ve DAPI ile işaretlenmiş floresan mikroskobu görüntüleri: a) EGF'li %5 Borik Asitli PLCL; b) EGF'li %3 borik asitli PLCL; c) %5 borik asitli PLCL; d) %3 borik asitli PLCL; e) saf PLCL ve f) hücre kültür plakası. Gösterge çubukları: 124,4 µm..... 71

Resim 4.19: Hücrelerin örnekler üzerinde 7 günlük kültür sonrası SEM görüntüleri: a) EGF'li ve %5 borik asitli PLCL; b) EGF'li ve %3 borik asitli PLCL; c) EGF'li PLCL; d) %5 borik asitli PLCL; e) %3 borik asitli PLCL; ve f) saf PLCL. Gösterge çubukları 50µm 72

SİMGELER VE KISALTMALAR

B: Bor

BA: Borik Asit

DAPI: 4, 6, 6-Diamidino-2-fenilindol

DMF: N,N -Dimetilformamid

DCM: Diklorometan

EDX: Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)

FITC: Floresan İzotiyosiyanat

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

H₃BO₃: Borik Asit

HFIP: 1,1,1,3,3,3- Hekzafloro-2-propanol

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PCL: Polikaprolakton

PEG: Polietilen glikol

PLA: Polilaktik asit

PLCL: Poly(L-laktit-ko-ε-kaprolakton)

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

SBGO: Su Buharı Geçirgenlik Oranı

THF: Tetrahidrofuran

v/v: Hacim/Hacim Oranı

w/v: Ağırlık/Hacim Oranı

ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE BÜYÜME FAKTÖRÜ EKLENMİŞ BORİK ASİT KATKILI PLCL DERİ İKAMESİ ÜRETİMİ

ÖZET

Amaç: Bu tezde, hastalık ve kazalar sonucu oluşan deri kayıplarının onarımında kullanılabilecek, deri dokusuyla mekanik olarak uyumlu ve enfeksiyona karşı etkili bir yara örtüsünün elektroegirme yöntemiyle üretimi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Elektroegirme yöntemi ile, literatürde ilk defa, borik asit (BA) içeren poli(L-laktit-ko-ε-kaprolakton) (PLCL)'den bir deri ikamesi üretilmiştir. Fiber morfolojisi ve çapı taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) ve kimyasal bağlar Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisiyle (FTIR) incelenmiştir. Fiber yapının şişme oranı ve borik asit salınımına bağlı pH değişimi ve su ile yüzey temas açsısı belirlenmiştir. Çekme gerilimi altında mekanik davranış incelenmiştir. Sitotoksisite testleri 3T3 fare fibroblast hücre hattı ile uygulanmıştır. Numune yüzeylerindeki hücreler floresan mikroskop ve SEM ile incelenmiştir. *Escherichia coli* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite testleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: SEM mikrograflerinde boncuk içermeyen fiberler elde edildiği belirlenmiştir. Borik asit eklenmesiyle su emme oranı azalsa da PBS içerisinde 14.günün sonunda %5 borik asitli PLCL örneklerde yüksek (%100) şişme davranışı gösterilmiştir, buna rağmen önemli bir pH düşüşü yaşanmamıştır. Çekme gerilimi mukavemeti yapıya borik asit eklenmesiyle çok önemli ölçüde yükselmiştir. PLCL fiber yapının hidrofobik özelliği borik asit eklenmesiyle bir miktar azaltılmıştır. PrestoBlue testine göre, antibakteriyel etkiyi artırabilmek için, elektroegirme çözeltisine yüksek konsantrasyonda (%5) borik asit eklenmesi 3T3 fare fibroblastların canlılığında olumsuz etkiye yol açmamıştır ve hücrelerin yüzeyde çok iyi tutunum ve yayılma sergiledikleri görülmüştür.

Sonuç: Farklı konsantrasyonlarda borik asit eklenmesiyle üretilen PLCL fiber yapının yara bölgesinde eksüdayı emebilecek karakterde, katkısız fiberlere göre çok daha iyi mekanik özellik gösteren, iyi oksijen geçirgenliğine sahip ve fibroblast çoğalmasını destekleyici nitelikte bir yara örtüsü olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: anti-bakteriyel; borik asit; deri ikamesi; elektroegirme; PLCL.

PRODUCTION OF BORIC ACID AND GROWTH FACTOR ADDED PLCL SKIN SUBSTITUTES BY ELECTROSPINNING METHOD

ABSTRACT

Aim: The aim of this thesis is to produce a wound dressing that is mechanically compatible with the skin tissue and effective against infection and can be used in the repair of skin losses caused by diseases and accidents.

Materials and Methods: For the first time in the literature, a poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL)-based skin substitute containing boric acid (BA) was produced by using electrospinning. Fiber morphology and diameter were examined by scanning electron microscopy (SEM) and chemical bonds were determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The swelling rate of the fiber structure, the pH change due to boric acid release and water contact angle were determined. Mechanical behavior under tensile stress was investigated. Cytotoxicity tests were performed with the NIH/3T3 mouse fibroblast cell line. The cells on the sample surfaces were examined by fluorescence microscope and SEM. Antibacterial activity tests were performed against *Escherichia coli*.

Results: Bead-free fibers were confirmed in SEM micrographs. Although the water absorption rate decreases with the addition of boric acid, it has been shown that PLCL samples with 5% boric acid exhibit a very high (100%) swelling behavior at the end of the 14th day in PBS, although no significant pH decrease was seen. The tensile strength increased significantly with the addition of boric acid into the structure. The hydrophobicity has been slightly reduced by the addition of boric acid. According to PrestoBlue test, even adding a high concentration (5%) of boric acid to electrospinning solution to increase the antibacterial effect did not have a negative effect on the viability of 3T3 mouse fibroblasts and the cells exhibited very good adhesion and spreading on the surface.

Conclusion: It has been shown that the PLCL fiber structure produced by adding boric acid at different concentrations can be used as a wound dressing that can absorb exudate in the wound area, show much better mechanical properties than non-doped fibers, have good oxygen permeability and support fibroblast proliferation.

Keywords: anti-bacterial; boric acid; electrospinning; PLCL; skin substitute

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri insan vücudunun en büyük organıdır (1,2); vücut ağırlığının %9-15'ini oluşturur (1-3) ve bir insanda ortalama 1,5-2 m² alana sahip deri dokusu bulunmaktadır (2). Deri, insan vücudunu mekanik, termal, ultraviyole ışını gibi fiziksel stres kaynaklarına, çözücüler gibi kimyasal stres kaynaklarına ve çevresel koşullar dahil olmak üzere birçok dış etkene karşı koruyucu bir bariyer görevi görür ve vücut sıvılarının kaybedilmesini önemli ölçüde önler (4). Diğer yandan, yanık, trafik kazası, iş kazası, yara iyileşmesini bozan hastalıklar, kalıtsal hastalıklar ve ameliyatlara bağlı komplikasyonlar gibi çok çeşitli nedenlerle meydana gelen deri dokusu kaybı, hasarlı dokunun genişliğine, derinliğine, bulunduğu bölgeye göre farklı sonuçlara sebep olsa da nihai olarak insan hayatını tehlikeye atacak düzeyde olabilir. Bu nedenle, klinikte acilen çözüm bulması gereken bir sorun olan deri dokusu kayıplarında hastanın kendisinden alınan deri veya deri ile birlikte deri altı dokuları içeren flepler kullanılabilir, ancak bu yöntem, hastada yeterli donör bölgesi bulunmadığında veya bireyin eşlik eden hastalıklarının bulunması durumunda önemli bir sorun haline gelmektedir. Bunun yerine, doku mühendisliği ve biyomalzeme yaklaşımlarıyla üretilen deri ikamesi olabilecek ürünler (deri yaması veya yapay greftler) hastada yeni doku kaybına sebep olmamaları nedeniyle çok önemli bir avantaj sağlayarak alternatif oluşturmaktadır.

Doku mühendisliği, rejeneratif tıp, biyoloji, yaşam bilimleri temeli ile klinik problemleri mühendislik yöntemlerini kullanarak çözmeye odaklı bir bilim dalıdır (5). Kayıp veya hasarlı doku fonksiyonunu eski haline getirmek, korumak veya iyileştirmek için biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik olarak mühendislik ve yaşam bilimleri ilke ve yöntemlerinin uygulanmasını hedefler (6,7). Ayrıca, doku mühendisliği alanında, normal ve patolojik dokulardaki yapı-fonksiyon ilişkilerinin belirlenmesi için de çalışmalar yürütülmektedir.

Son yıllarda, doku mühendisliğinin gelişimi ve buna bağlı olarak, deri doku mühendisliği çalışmalarının hız kazanması deri hasarlarının iyileştirilmesi için bir umut olmuştur. Yanık ve diğer yaralar için deri doku mühendisliği ile üretilen yara örtüleri klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Deri doku mühendisliğinin hedefi, doğal dokunun özelliklerine yakın ve insan vücudunda toksisite veya bağışıklık

reaksiyonuna neden olmadan, cilt anatomisinin restorasyonunda, cilt pigmentasyonunun, sinir, vasküler sistemin yeniden kurumasını da içerecek şekilde yapısal mimarinin rehabilitasyonunu sağlamaktır.

Bu çalışmanın temel amacı, kayıp veya hasarlı deri dokusunun iyileştirilmesinde ve yara bölgesinde enfeksiyonun önlenmesinde kullanılmak üzere elektroğirme yöntemi ile borik asit katkılı poli(L-laktit-ko-ε-kaprolakton) (PLCL) deri ikamesi üretimi, üretilen deri ikamelerinin fiziko-kimyasal karakterizasyonlarının yapılarak fiber çapı, morfoloji, kimyasal bağlar vb. yönlerinden malzeme karakteristiklerinin belirlenmesi, daha sonrasında fare fibroblast hücre hattı ile *in vitro* çalışmalarla büyüme faktörü eklenmiş deri ikamesinin hücre uyumluluğunun gösterilmesi ve *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisine karşı antibakteriyel aktivite testlerinin gerçekleştirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DERİ

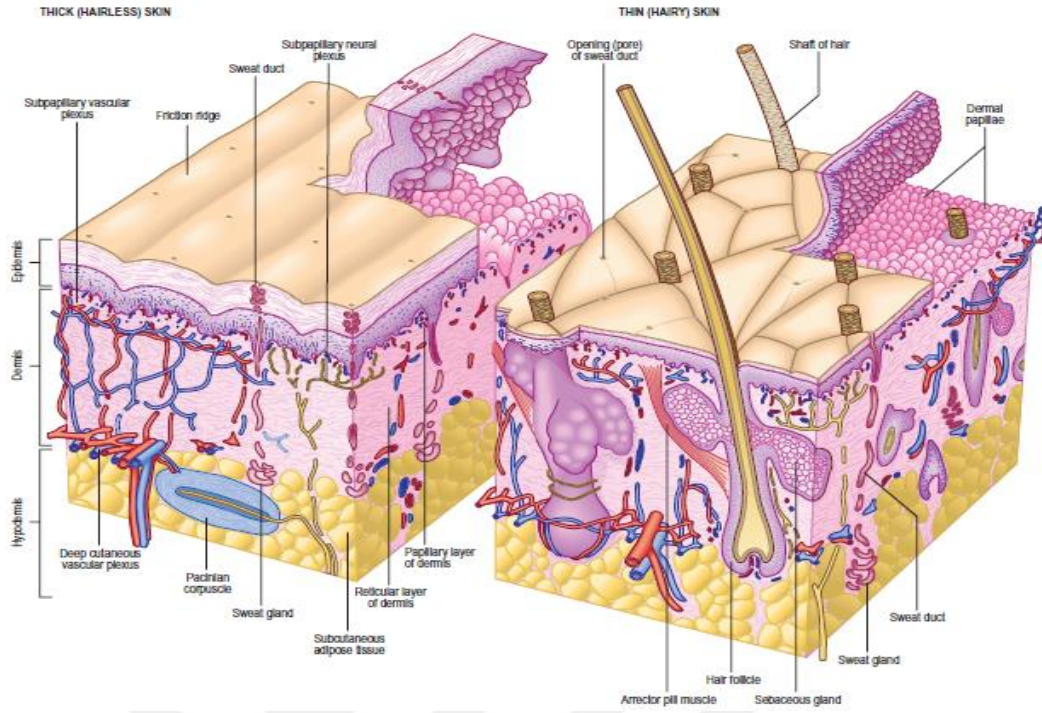
Deri insan ve hayvan vücudunun dışını kaplayan vücudun en büyük organı ve çok katmanlı bir yapıdır (1,8). Deri, homeostazın sürdürülmesi ve vücudun korunması için gerekli çeşitli hayati fonksiyonları olan metabolik olarak aktif bir organdır. Kimyasal ve fiziksel etkenlere bariyer oluşturur, vücut sıvılarının kaybını önler ve vücut sıcaklığının düzenlenmesine yardımcı olur. Deri ayrıca duyuşal bir organ görevi görür, D vitamini üretiminde hayati bir rol oynar ve antimikrobiyal peptitlerin üretiminde rol oynar. Ayrıca deri saç ve tırnak oluşumunda da görev yapar (9).

Derinin yapısı, işlevi ve eklentileri hakkındaki bilgiler, sağlıklı dokunun biyolojisini ve hastalıklarının patofizyolojisini anlamak için büyük önem taşımaktadır. Deri, çok katmanlı, epidermis, saç folikülleri, ter bezleri ve yağ bezleri gibi adneksiyal yapılar, kolajen ve elastik lifler içeren bir dermis ve altta yatan deri altı yağ içeren karmaşık bir epitelyal ve mezenkimal dokudur.

Genel hatlarıyla, epidermis adı verilen tabakalı bir skuamöz epitel, dermis adı verilen daha derin bir bağ dokusu tabakasından oluşur ve dermisin altında bulunan bir başka bağ dokusu olan hipodermis tabakasından oluşur (2). Deri dokusunun organizasyonunun bir şeması Şekil 2.1’de verilmiştir.

Deri dokusu uzun yıllardır doku mühendisliğinin ön saflarında yer alan konularından bir tanesidir ve doku mühendisliğinden gelen ilk ticari tıbbi ürünlerden bazılarını ortaya çıkarmıştır. Bu durum, deri hücrelerinin biyolojisi, hücre dışı matriks biyolojisi, kolajen doku iskeleleri, polimer iskeleler ve doku ikameleri gibi alanlarda son 40-50 yıldaki çalışmaların doğal bir sonucudur.

Bu bölümde vücut yüzeyinde hem koruma sağlayan hem de dış çevreden duyuşal uyarılar alan deri dokusunun organizasyonuna ve işlevine ait genel bilgiler sunulacaktır.



Şekil 2.1: Deri dokusunun organizasyonu, kalın, kıl içermeyen (plantar ve palmar) deride bulunan yapıların ince, kıl içeren cilt ile karşılaştırılması. Epidermis, birbirine bağlı dermal ve epidermal papillaları göstermek için kısmen yüzeyden kaldırılmış halde gösterilmiştir (10)

2.1.1.Epidermis

Derinin en dış katmanı epidermis olarak isimlendirilir ve %80-95 arasında keratinosit hücrelerinden oluşur (1,11). Keratinosit hücreler dışında epidermisteki diğer hücreler: melanositler (embriyonik sinir kret hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşan pigment üreten hücreler), Langerhans hücreleri (kemik iliğinden köken alan dendritik hücreler), lenfositler ve Merkel hücreleri bulunur (10,11).

Epidermin kalınlığı bulunduğu bölgeye göre değişir, örneğin, göz kapağında 0,05 mm avuç içi ve ayak tabanlarda 1,55 mm kalınlıktadır (9). Epidermisteki keratinosit hücrelerine ait popülasyon yaşam boyu sürekli olarak yenilenir. Keratinositlerin bu devrine epidermin bazal tabakasında bulunan kök hücreler aracılık eder. Bu bazal hücreler, epidermin çeşitli katmanlarını oluşturmak üzere cildin yüzeyine doğru göç ettiklerinde bir dizi biyokimyasal ve fiziksel değişikliğe uğrayan ek hücreler oluşturur (10).

Keratinositler epidermisteki hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturur. Keratinositlerin temel rolü, epidermisin koruyucu özelliklerini elde etmesine yardımcı olan fibröz protein olan keratini üretmektir (12). Desmosomlar tarafından birbirine sıkıca bağlanmış keratinositler, epidermisin en derin kısmında stratum bazale adı verilen bir hücre katmanından ortaya çıkar. Bu hücreler, vücuttaki çeşitli hücrelerin ürettiği bir peptit olan epidermal büyüme faktörünün yönlendirmesine yanıt olarak neredeyse sürekli mitoz geçirir. Bu hücreler altlarındaki yeni hücrelerin üretimiyle yukarı doğru itildiğinden, en sonunda hücre içeriğine hakim olan keratini yaparlar. Keratinositler cilt yüzeyine ulaştığında, ölürler (12).

Melanositler, her 10 bazal keratinosite 1 melanosit olacak şekilde oranlıdır ve stratum bazale içinde bulunan nöral krest hücre türevli hücrelerdir (13). Bu oran vücudun farklı bölgelerinde değişebilmektedir. Melanositler, pigment melanini sentezler. İnsan ten rengindeki renk farklılıkları, melanosit hücre miktarındaki farklılıklardan değil, melanin sentezi oranındaki farklılıklardan kaynaklanır ve melaninin keratinositler içinde ne kadar biriktiğine bağlıdır. Açık tende, melanin daha az miktarda bulunur ve çekirdeğin yakınında göreceli olarak kümelenerek hücrelere daha az renk verir (2).

Dendritik hücrelerin iki temel tipi vardır: (1) folliküler dentritik hücre-interdigitating hücre ve (2) Langerhans hücresi. Bunlardan, Langerhans hücreleri, mezenkimal kökenlidir. Epidermisin tüm tabakalarında olmakla beraber, özellikle spinosum'un üst bölümünde 1868'de tanımlanmıştır (14). Merkel hücreleri ise, epidermisin bazal tabakasında, tek tek veya gruplar halinde saydam oval hücreler halinde bulunur. Ayrıca bazı büyük saç köklerinin dış kök kılıflarında da bulunurlar. Merkel hücrelerinin, nöral kökenli olduğu düşünülmüş olmasına rağmen, epidermisten embriyolojik olarak türediği düşünülmektedir (10). Merkel hücrelerinin Friedrich S. Merkel tarafından 1875 yılında keşfedilmesinden bu yana, elektron ve lazer mikroskopisi ve immünohistokimyasal teknikler gibi yeni teknolojilerin ilerlemesi ile yapılarının bilgisi artmıştır (15). Histolojik olarak diğer açık hücrelerden (melanositler ve Langerhans hücreleri) sadece immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel kriterler ile ayırt edilebilirler (10). Merkel hücreleri, dokunma hücreleri de denen mekanoreseptörlerdir (2).

Epidermis birkaç katmandan oluşur: en içteki katman bazal katmandır (stratum bazale) ve sivri veya dikenli-prickle hücre katmanı (stratum spinosum), granül katman (stratum granulosum), berrak katman (stratum lucidum) ve en yüzeysel olan kornifiye tabaka (stratum corneum)'dır. Bu katmanların ilk üçü, hücrelerel farklılaşma geçirirken hücrelerin morfolojilerini geçtiği ve değıştirdiği metabolik olarak aktif bölümlerdir. Daha yüzeysel hücre katmanları, terminal keratinizasyona veya kornifikasyona uğrar, sadece keratinositlerdeki yapısal değışiklikleri değil, aynı zamanda hücrelerin ve çevrelerinin içindeki moleküler ve biyokimyasal değışiklikleri de içerir (10).

En derin epidermal tabaka olan stratum bazale, oluklu mukavvaları hatırlatan dalgalı bir sınır çizgisi boyunca altta yatan dermise bağlıdır. Çoğunlukla, en genç keratinositleri içeren tek bir kök hücre dizisinden (sürekli yenilenen hücre popölasyonu) oluşur. Bu katmanda görülen birçok mitotik çekirdek, bu hücrelerin hızlı bölünmesini yansıtır. Ayrıca stratum bazale stratum germinativum yani "filizlenme katmanı" olarak da adlandırılır (1,12).

Stratum spinosum birkaç keratinosit katmanından oluşur. En derindeki hücreler mitoz bölünme geçirir ve yüzeyden pul pul dökülen epidermal hücrelerin değıştirilmesine katkıda bulunur. Ancak daha yukarı doğru itildikçe, bölünmeyi bırakırlar. Bunun yerine, hücrelerin düzleşmesine neden olan daha fazla keratin filamenti üretirler. Deri, histolojik olarak fiksleendiğinde, keratinositler küçölür ve birbirlerinden uzaklaşırlar, ancak desmozamlarla komşularına bağlı kalırlar. Bunlar, bir keratinositin bir boşluktan diğerine uzandığı köprü benzeri uzantılar yaratır. Bu köprüler, hücrelere stratum spinosum isminin anlamındaki dikenli görünümü verir (spinos, dikenli anlamına gelmektedir) (2). Ayrıca bu tabaya skuamöz hücre katmanı da denir (1). Ayrıca stratum spinosum, epidermin en kalın tabakasıdır (16).

Stratum granulosum, kalın deride ince deriden daha fazla (iki ila beş kat) keratinosit içerir. Bu keratinositler, bu katmana adını veren iri, koyu renkli keratohyalin granülleri içerir. Bu granüller, hücre iskeletinin orta filamentleri ile birleşen ve bunları keratine dönüştüren bir proteinden oluşur. Stratum spinosum ve stratum granulosumdaki keratinositler ayrıca lipit dolu membran-kaplama veziküllerini de üretirler. Burada stratum granulozumda, bu veziküller ekzositoz olur ve keratinosit membranlarının üzerine yayılan ve cildi su geçirmez hale getiren bir glikolipit salgılar. Glikolipit ayrıca derinin yüzey hücreleri ve daha derin tabakalar

arasında bir bariyer oluşturur. Besin kaynağı kesildikten sonra, stratum granulosum'un üstündeki hücreler ölür (2).

Sadece kalın ciltte görünen stratum lucidum, stratum granulosumun hemen üstünde ince bir yarı saydam banttır. Yüzeysel stratum corneum'un bir alt bölümü olarak da kabul edilen (2,16), belirgin sınırları olan iki veya üç sıra açık, düz, ölü keratinositlerden oluşur. Burada veya yukarıdaki stratum korneumda, keratohyalin granüllerinin yapışkan maddesi, hücrelerdeki keratin filamentlerine yapışır, bu da tonofilamentler olarak adlandırılan ara filamentlerin geniş, kablo benzeri paralel dizilerinde birikmelerine neden olur (12).

Boynuzsu tabaka (horny cell layer), en dıştaki epidermal katmandır, epidermal kalınlığın dörtte üçünü oluşturan, 20 ila 30 hücre kalınlığındaki geniş bir bölgedir. Keratin ve bu tabakadaki hücrelerin kalınlaşmış plazma membranları cildi aşınmaya ve penetrasyona karşı korur ve hücreleri arasındaki glikolipit bu tabakayı neredeyse su geçirmez hale getirir. Bu nedenlerden dolayı, stratum corneum, vücudu dış ortamdan ve su kaybına karşı daha derindeki hücreleri koruyan ve vücudu biyolojik, kimyasal ve fiziksel saldırılara karşı nispeten duyarsız hale getiren, vücut için dayanıklı bir “üst kaplama” sağlar. Bazal hücrelerden stratum korneumun tipik hücrelerine olan farklılaşma, çekirdeğin ve diğer organellerin parçalandığı ve plazma zarının kalınlaştığı özel bir apoptoz şeklidir. Bu yüzden, terminal hücreler parçalanmazlar, ancak sonuçta cilt yüzeyinden dökülürler. Stratum corneum'un kiremit benzeri hücre kalıntılarına kornifiye hücreler denir. Ortalama bir insanın derisinden dakikada 50.000 ölü hücre ve ömür boyu 18 kg (40 lb) cilt pulu dökülür (12). Hücreler bir çekirdek ve membranöz organelden yoksundur ve yalnızca kısmen keratohyalin granüllerinden türetilmiş filajinden oluşan bir sitoplazmik matris içine gömülü yoğun bir keratin filament dizisinden oluşur (10).

2.1.2.Dermis

Dermis, derinin ikinci tabasıdır, güçlü ve esnek bir bağ dokusudur. Hücreleri, normal herhangi bir bağ dokusunda bulunanlara tipik hücrelerdir, fibroblastlar, makrofajlar ve nadiren mast hücreleri ve beyaz kan hücreleridir (12). Ayrıca dermisde, kolajen lifleri, elastik doku, öğütülmüş madde gibi interstisyel maddelerden oluşur. Dermis de yoğun miktarda kolajen bulunur.

Dermisin kuru ağırlığının yaklaşık %70'i, tip I ve III olan kolajenlerden oluşur. Kolajen lifleri dışında dermisde elastik lif de bulunur. Elastik lifler kolajenler kadar dayanıklı değildir ama deriye esneklik kazandırır (10). Kolajen ve elastik fiberler dışında deride bir de retiküler fiberler bulunur. Dermis, termoregülasyonda önemli arteriyovenöz anastomozlar dahil olmak üzere zengin bir kan ve lenfatik damar tabakasına sahiptir. Ayrıca çeşitli kutanöz duyu sinir reseptörleri dahil olmak üzere çok sayıda sinir ucu içerir (17). Saç köklerinin yanı sıra yağ ve ter bezlerinin büyük bölümleri epidermal dokudan kaynaklanır ancak dermiste bulunur (12). Ayrıca, dermisin kalınlığı vücut bölgesine bağlı olarak 0,5-5 mm civarında olabilir (11). En ince dermis katmanı göz kapaklarında (0,5 mm) ve en kalın ise sırtta (5 mm) bulunmaktadır (8).

Papiller tabaka dermisin üst tabakasıdır epidermisin altında bulunur (18). Papiller tabaka kolajen ve elastin liflerinin ve küçük kan damarlarının bulunduğu bir gevşek bağ dokusu yapısıdır. Bu bağ dokusunun gevşekliği fagositlerin ve diğer savunma hücrelerinin serbestçe dolaşmasını sağlar bu sayede deriyi geçmeye çalışan bakteriler için bir tevriye gibi görevi yapmasına yardım eder. Pek çok dermal papilla kılcak halkalar içerir. Ayrıca serbest sinir uçlarına (ağrı reseptörleri) ve dokunsal veya Meissner korpus kasları adı verilen dokunma reseptörlerine ev sahipliği yapar. Ellerin avuç içi ve ayak tabanları gibi kalın derilerde, bu papillar, dermal sırtlar denilen daha büyük tepecikler oluşturur. Bu da üstteki epidermisin epidermal sırtlar oluşturmaya neden olur. Bir araya geldiklerinde, parmakların kavrama kabiliyetini artırırlar. Bu çıkıntıların örüntüleri genetik olarak belirlenir, her bireye özgüdür ve parmak izinin oluşmasına neden olur (12).

Retiküler tabaka ise dermisin %80'i oluşturan tabakadır. Kalın, yoğun ve düzensiz fibröz bağ dokusudur. Retiküler tabaka mekanik etkilere karşı dayanıklılık sağlar. Bu tabakayı besleyen kan damarları ağı, kutanöz sinir ağı bu katman ve hipodermis arasında uzanır (12). Kolajen lifleri, papiller katmandakilere göre daha kalındır ve değişken sayıda elastik lif içeren güçlü fakat deforme olabilen üç boyutlu bir kafes oluşturur (10).

Derinin altında hipodermis, deri altı doku veya yüzeysel fasya denilen bir tabaka bulunur. Dermis ve hipodermis arasındaki sınır belirsizdir, her iki bölümün kalınlıkları ve geçiş özellikleri cinsiyete, yaşa, beslenme durumu ve yaşam

koşullarıyla, vücudun hangi bölgesinde olduğuna göre değişir. Hipodermis genellikle daha fazla gevşek bağ dokusuna ve yağ dokusuna sahiptir. Yağ dokusu hakim olduğunda hipodermise subkutan yağ denir. Hipodermis deriyi altta yatan dokulara bağlar, vücudu doldurur, enerji rezervuarı görevi görür ve ısı yalıtımı sağlar. Bebekler ve yaşlılar diğerlerine göre soğuğa karşı daha hassastır, çünkü bu tabakada daha az yağ bulunmaktadır. Derialtı yağ, kadınlarda erkeklerden yaklaşık %8 oranında daha kalındır (2).

2.2. DERİDE YANIK VE DİĞER YARALAR

Yaralar esas olarak şekli ve sebep olan madde temelinde farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır: (1) kapalı yaralar – kontüzyon, kapalı kırık, vb. ve (2) açık yaralar – keskin bir cisimle kesilme, yırtılma, aşınma, avulsiyon, ezilme yarası, delinme, ısırılma yarası ve yanık yarası (19). Yaraların hepsi patofizyolojide olduğu kadar tedavide de birbirinden farklıdır. Örneğin, ısırılma sonucu oluşan yaralar düzgün şekilli bir kesiye sebep olabilir, ancak büyük ölçüde kontamine olmuştur, diğer yandan bıçak veya cam tarafından meydana getirilen temiz kesilmiş yaradan farklı şekilde tedavi edilmelidir. Yanık yaraları diğer yaralardan oldukça farklıdır ve ayrı bir tıbbi uzmanlık gerektirir. Geniş yanıkların öncelikle deriyi etkilemesine rağmen; vücudun neredeyse tüm sistemleri bu sorundan etkilenir.

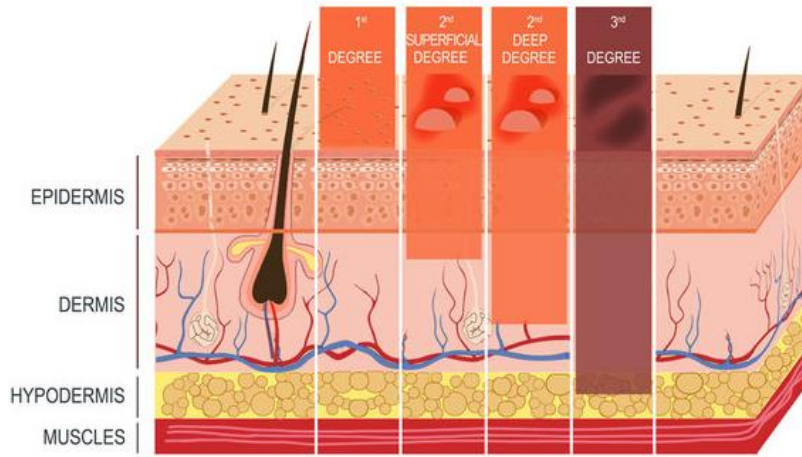
Yanık, derinin ya da diğer dokuların ısı, alev, sıcak cisimler ile temas, sıcak sıvıların dökülmesi, elektrik, kimyasal, sürtünme ya da radyasyon yüzünden hasar görmesidir (20). Yanıkların nedenleri ile ilgili Amerika Birleşik Devletleri'nin Utah eyaletinde yapılan bir araştırmada, 1997-2001 yılları arasında hastanelere 23.722 kişinin yanık vakası şikâyeti ile başvurduğu bildirilmiştir. Bunların neden olarak yüzde dağılımı şu şekilde raporlanmıştır: sıcak sıvılar ile yanma % 21,5, sıcak bir cisimle temas % 21,2, kimyasal yanık % 19,2, ateş veya alev % 18,7, diğer nedenler % 11,7 ve elektrik % 3,9(21).

Ekonomik durum ve coğrafi konumun yanı sıra, yanma riski ve yanık yaralanmalarının başlıca nedeni, yaş, meslek vb. faaliyetler ile ilgilidir. Sıcak bir sıvıya maruz kalma ile meydana gelen yanıklar, genel olarak en sık görülen yanık yaralanması şeklidir ve hastanede acil servislerde 100.000'den fazla hastanın tedavi görmesine neden olur, ancak hastaneye yatış gerektiren en sık yanık nedeni yangın veya alev yaranmalarıdır. Sıcak sıvılara bağlı yanıklar herhangi bir yaş grubunda

ortaya çıkabilir, ancak tüm sıcak sıvı ile ‘haşlanma’ vakalarının %77'sinin 3 yaşın altındaki çocuklarda meydana geldiği bildirilmiştir (21).

Amerika’da her yıl ortalama 1,25 milyon kişi yanık şikayetleri ile hastanelere başvurmaktadır (22,23). Bunların 40.000 kadarı hastaneye yatırılarak tedavi edilmektedir. Her yıl ortalama Amerika’da yaklaşık 3400 kişi yanık yüzünden hayatını kaybetmektedir (24). Yine ABD’de, her yıl 1000 kadar çocuk yanık yüzünden hayatını kaybetmektedir (22). Yanık vakaları kadar yanık tedavisi için yapılan finansal harcamalarda önemlidir. ABD’de, büyük bir yanık yaralanması olan tek bir hastanın bakımı için toplam tedavi maliyeti ortalama 200.000 doların üzerindedir. Tüm ABD’de yanık bakımı için yıllık maliyet 18 milyar doları aşmaktadır (25).

Yanıkların şiddetini beş faktör belirler: (1) derinlik (birinci, ikinci, üçüncü), (2) dokuzlar kuralı (yüzey miktarı), (3) kritik yanık bölgeleri, (4) hastanın yaşı (çok genç veya çok yaşlı) ve (5) hastanın genel sağlık durumu (diğer yaralanmalar veya hastalıklar) (26). Yanık şiddeti, genel olarak etkilenen yaranın derinliğine ve cilt katmanlarına göre sınıflandırılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Cilt yapısına göre farklı derecelerde yanık yaraları (27)

Birinci dereceden yanıklar yüzeysel yanıklardır. Epidermis hasar görür ama derinin diğer katmanları etkilenmez. Kızarıklık ve eritem (derinin kızarması) meydana gelir. Kaşıntı ve ağrıya neden olur (23,25). Birinci dereceden yanıklar kendiliğinden iyileşebilir. Güneş yanıkları en bilinen birinci dereceden yanıklardır. Birinci dereceden yanıklar toplam vücut yüzey alanı (total body surface area, TBSA) yüzde hesabına

dahil edilmez (25). Birinci derece yanık derinin sadece dış yüzeyini (epidermis) etkileyen yüzeysel bir yara olarak kabul edilir.

İkinci dereceden yanıklar da kısmi kalınlıktaki yaralardır , tüm epidermis ve dermisin üst kısmı nekrotik hale gelir (28). İkinci dereceden yanıklar, yüzeysel ve derin olarak ikiye ayrılır (23). Devitalize doku varlığı, nekrotik kalıntıları temizlemek için uzun süre makrofaj aktivitesi gerektirir. Nekrotik dermal dokunun altında granülasyon dokusu meydana gelir ve epidermal göç ölü doku tarafından oluşturulan skarın altında meydana gelir. Bu durum, epidermisin restorasyonuna ve dermal bağ dokusunun ince bir skar şeklinde üretilmesine yol açar (28). İkinci derece yanıkların yüzeysel olanlarında dermisin üst katmanı yanmıştır, ancak kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerinin büyük kısmı sağlam durumdadır (29). Kıl foliküllerinin derin kısımları canlı kalır ve folikülleri çevreleyen keratinositler göç eder ve göç eden hücrelerin arkasındaki mitoz bölünmeye uğrar ve sonunda kıl folikülünden türetilen yeni epidermlerle yüzey kaplanır (28). İyileşme süresi daha kısadır. İkinci derece yanıklardaki derin yanıklarda dermisin büyük bölümü hasar almıştır. Kıl kökleri ter ve yağ bezleri gibi yapılar da hasar görmüştür. İyileşme yavaş olur ve fonksiyon, cilt kaybı ve deride kalıcı iz olabilir.

Üçüncü dereceden yanıklar ise tam kalınlıktaki yanıklardır. Epidermisin ve dermisin tamamı tahrip olmuştur (25). En az 1cm'den büyük çapta oluşursa mutlaka cerrahi müdahale gerektirir, çünkü kendiliğinden iyileşmez (29). Sinir hücreleri hasar gördüğü için hastada ağrı hissi yoktur (23). Eğer yanık hasarı daha derinlere iner ve tendon, kas kemik gibi yapılara zarar verirse dördüncü dereceden yanık olarak adlandırılır (29). Canlılığını yitirmiş yani nekroz olmuş deriye eskar denir (23,29), bunlara deri greftleri yada cerrahi işlemler uygulanır. Ancak öncelikle eskar çıkarılmalıdır. Eğer hastanın o anki durumu ve kan kaybının miktarı buna izin vermiyor ise eksizyon yapılır ve bu işlem ertelenir ama eskar çıkarma işlemi 3 haftadan fazla ertelenirse, eskar kendiliğinden çıkar ve geriye granülasyon dokusu ile kaplı deri kalır (29).

Yanık dışındaki deri dokusu yaraları arasında bulunan venöz ülser, ise bacak toplardamarlarındaki yetmezlik nedeniyle genellikle ayak bileği çevresi ve bacakta açılan yaradır. Halk arasında varis yarası olarak da bilinmektedir. Bu yaralar genelde çok zor iyileşir ve tekrarlayabilir. Hastalığın genel olarak görülme sıklığı 1000'de 1

ile 4 arasında değişmektedir ancak yaşla görülme sıklığı da artar. Genç yaşlarda kadın ve erkeklerde eşit oranda görülse de 40 yaş üstünde kadınlarda daha sıktır (30,31). ABD, Japonya, Brezilya ve bazı Avrupa ve Afrika ülkelerini içeren önemli bir epidemiyolojik çalışmada kronik venöz yetmezlik yaygınlığı kadınlarda %3–7 erkeklerde %2–7, variköz damar yaygınlığı da kadınlarda %20–25, erkeklerde ise %10–15 olarak bildirilmiştir (32).

Diabetes mellitus (DM), sağlık sistemlerinde temel sorunlardan biri ve son yıllarda önemli ölçüde artan küresel bir halk sağlığı tehdididir (33). Epidemiyolojik çalışmalara göre, DM'li hastaların sayısı 1985'te yaklaşık 30 milyon vaka, 2000'de 177 milyon, 2010'da 285 milyon artmıştır ve durumun devam edeceği tahmin edilmiş, 2030 yılına kadar 360 milyondan fazla kişi DM'ye sahip olacağı düşünülmüştür (34,35). DM'li hastalar, diyabetik ayak ülseri gibi çoklu komplikasyonlara yatkındır. Diyabetik ayak ülseri, DM'nin önceki yıllara göre artan bir eğilim gösterdiği ortak bir komplikasyonudur (36,37). Toplamda, diyabetli hastaların %15'inin yaşam süreleri boyunca diyabetik ayak ülserinden muzdarip olduğu tahmin edilmektedir (33,38). Ayrıca, diyabetik ayak ülseri, yaşam kalitesini düşüren önemli duygusal ve fiziksel sıkıntıların yanı sıra verimlilik ve mali kayıplardan sorumludur (39). Literatür, tek ülserin iyileşmesinin maliyetinin yaklaşık olarak 17.500\$ (1998, ABD Doları) olduğunu göstermektedir. Alt ekstremité amputasyonunun gerekli olduğu durumlarda, sağlık bakımı 30.000-33.500 \$'dan daha pahalıdır (33,40). Bu maliyetler toplam ekonomik yükü temsil etmemektedir, çünkü verimlilik kayıpları, önleyici çabalar, rehabilitasyon ve evde bakım ile ilgili dolaylı maliyetler dikkate alınmalıdır. Bütün bunlar dikkate alındığında, Kuzey Amerika ve Avrupa'da diyabetle ilgili toplam harcamaların %7-20'si diyabetik ayak ülserine atfedilebilir (41). Bütün bu veriler, yara bakım sektörünün önemini ve yara deri/deri ikamesi/yara örtüsü ürünlerinin potansiyelini göstermektedir.

2.3.YARA İYİLEŞMESİ

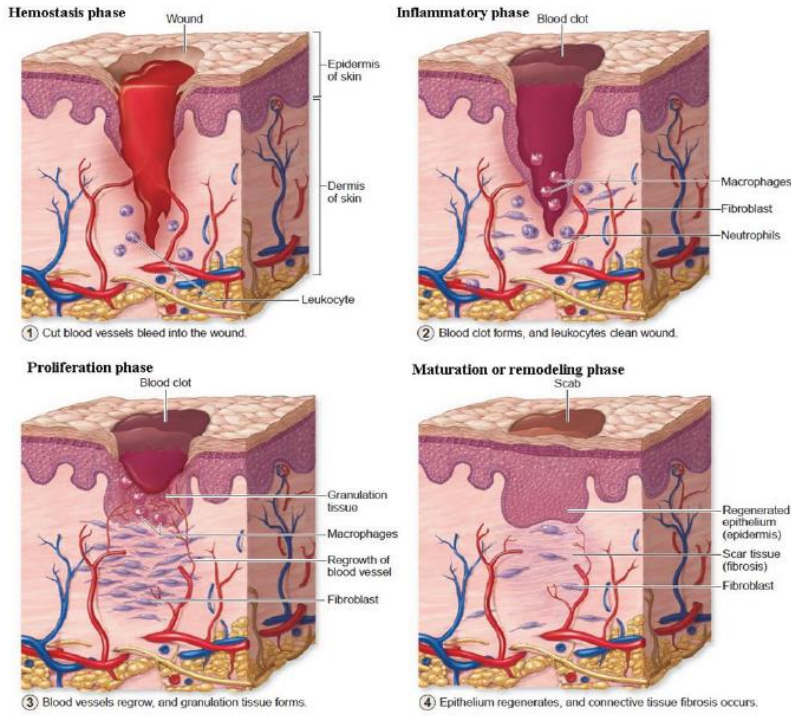
Deri, daha önce bahsedildiği gibi epidermis, dermis ve hipodermisten oluşan karmaşık bir yapıdır. Bir bariyer olarak görev yapar ve vücudu dış etkilere karşı korur. Deri çevresel etkileri, güneşten kaynaklanan zararlı UV ışınlarının nüfuz etmesini, zararlı patojenlerin istilasını engelleyen bir bariyerdir. Ayrıca vücuttaki suyun buharlaşması önlerken terlemede de görev yapar. Deri, ayrıca organizmanın hayatta

kalması için gerekli bir fonksiyon olan altta yatan organları da korur. Vücut için dış çevreye karşı koruyucu bir kalkan olarak, deri sürekli olarak potansiyel yaralanmalara maruz kalır (42) ve bu nedenle yara iyileşmesi hayatta kalma açısından büyük öneme sahip bir süreçtir.

Son 30 yılda, moleküler biyoloji ve diğer biyoteknolojilerin gelişimi, fiziksel, kimyasal, termal, biyolojik vb. dış faktörlerin zarar verdiği normal cilt üzerindeki yara iyileşmesini daha iyi anlamamıza yardımcı olmuştur. Derinin yaralanması üzerine, yara iyileşmesi süreci hemen başlar (43). Bu, hücrelerin, sitokinlerin, mekanik kuvvetlerin ve fonksiyonel bir iskeletonin etkileşimini gerektiren karmaşık bir süreçtir (44). Diğer bir deyişle, yara onarımı, filogistik olaylar tarafından salınan büyüme faktörlerinin parankimal hücre proliferasyonunu ve göçünü aktive ettiği basit bir doğrusal süreç değil, daha çok çözünür araçlar, oluşan kan elemanları, ekstraselüler matriks (ECM) ve parankimal hücreleri içeren dinamik etkileşimli süreçlerin bir entegrasyonudur (45).

Yara iyileşmesi, birbiriyle örtüşen dört fazda gruplanabilen karmaşık bir hücre ve biyoaktif molekül etkileşimlerini içerir. Hemostaz, inflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve yeniden şekillenme evresi dahil olmak üzere, sıralı fakat üst üste binen evreler tarafından yönetilen çok yönlü bir işlem içeren önemli fakat karmaşık bir süreçtir (43,46) (Şekil 2.3). Genel inflamasyon sürecine dahil olan birincil hücre tipleri trombositler, nötrofiller ve monositlerdir. Yaralanma üzerine, başarılı bir şekilde homeostazın yeniden kurulması, interstisyel bağ dokusuna trombosit yapışmasına bağlıdır, bu onların toplanmasına, pıhtılaşmasına ve aktivasyonuna yol açar (45).

Cildin yaralanması üzerine, onarım sürecine başlamak ve cildin koruyucu bariyerini eski haline getirmek için derhal yara iyileşmesi başlatılır. Bazı organizmalarda bu mekanizma yaralanan dokunun tam anlamıyla özdeş bir kopyasını oluştururken, yetişkin insanlarda yara iyileşme süreci sıklıkla fibroz doku ve skar oluşumuna yol açar (43). Her ne kadar skar oluşumu cildin enfeksiyon ve kurumayı önlemedeki temel işlevinin gereklerini yerine getirebilse de deriden belirgin bir şekilde farklıdır, kozmetik ve psikolojik açılardan bireyin yaşam kalitesini düşürür (47).



Şekil 2.3: Yara iyileşmesinin dört aşaması: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma veya yeniden şekillenme aşamaları (48)

Yara iyileşmesinin ilk aşaması olan hemostaz, yaralanmanın ardından ilk birkaç saat içinde gerçekleşir. Başarılı bir hemostaz süreci, kanamayı durdurmak için fibrin pıhtı oluşturur ve sonraki inflamatuvar mekanizmayı başlatır (43,49). Fibrin pıhtı oluşumu, von Willebrand faktörü açıkta kalan dokuya bağlandığında başlar, bu da trombosit agregasyonu ve trombosit tıkaçı oluşumu ile sonuçlanır. Bu tıkaç, yaralı dokudan salınan pıhtılaşma faktörlerine ek olarak, daha sonra fibrinojeni bir fibrin matrisine dönüştüren trombinin üretilmesinden sorumlu çeşitli pıhtılaşma yollarını aktive eder. Fibrin pıhtısındaki trombositler, lökositleri yaralanma bölgesine çağırmaktan sorumlu olan ve böylece inflamatuvar bağışıklık yanıtını başlatan kemotaksi ile ilgili faktörleri serbest bırakır (43). Yaralanma bölgesinde ortaya çıkan ilk hücreler olan nötrofiller, yara iyileşmesi için iyi bir ortam sağlamak için debri ve bakterileri temizler. Sonrasında makrofajlar, bakterilerin ve hasarlı dokuların fagositozunu sağlar. Hemostaz ve inflamatuvar fazın tamamlanması genellikle 72 saat sürer (46).

Yara iyileşme fazlarından inflamatuvar fazı, hemostaz ve pıhtılaşma fazı sırasında aktive olur ve kabaca nötrofil toplanmasını içeren erken faz ve monositlerin görünümü ve dönüşümünü içeren geç faz olmak üzere ikiye ayrılabilir (49).

Inflamasyon, nötrofillerin, enfeksiyon oluşmadığı sürece yaklaşık 2-5 gün boyunca mevcut olan yara bölgesine gelmesi ile başlar. Nötrofiller, immün tepkisini daha da arttırmak için tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β ve IL-6 gibi kimyasal mediatörleri serbest bırakırlar (43). Nötrofillerin çalışması, yaralanmadan sonraki ilk günlerde çok önemlidir, çünkü fagositoz ve proteaz sekresyonundaki yetenekleri, yerel bakterileri öldürür ve nekrotik dokunun bozunmasına yardımcı olur (49). Monositler yaklaşık 3 gün sonra yara bölgesine gelirler, burada makrofajlara farklılaşırlar ve patojenleri ve hücre kalıntıları içlerine alırlar.

Makrofajlar, konak savunması, inflamasyonun teşvik edilmesi, apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılması ve yaralanmanın ardından hücre proliferasyonu ve doku restorasyonunun desteklenmesi gibi birçok fonksiyona sahiptir. Makrofajların yara onarımı sırasında, antijen sunan hücreler ve fagositler olarak görev aldıkları immünolojik fonksiyonlarının yanı sıra, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), TGF- α , temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve hücre çoğalmasını ve ECM sentezini teşvik eden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok büyüme faktörünün sentezi yoluyla başarılı bir iyileşme yanıtı için önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (49).

Proliferasyon fazı, reepitelizasyon, neovaskülarizasyon ve granülasyon dokusu oluşumu ile karakterizedir. Reepitelizasyon, yaralanmadan sonraki saatler içinde gerçekleşir ve yara yüzeyini kapatmayı amaçlar. Yara kenarındaki hücreler, fibroblastları ve keratinositleri yara çevresinden yara yatağına geçmeye teşvik etmek için sitokinleri ve epidermal büyüme faktörü, keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve TGF-y gibi büyüme faktörlerini serbest bırakır. Ayrıca, kıl folikülünden elde edilen kök hücreler epidermal progenitör hücrelere farklılaşabilir, epidermin restorasyonuna katkıda bulunur, ancak sonuçta ortaya çıkan dokudan elimine edildikleri gerçeği, yalnızca yeniden epitelizasyon sürecinin başlatılmasında rol oynadığını gösterir. Ayrıca, kıl kökleri ve diğer cilt yapıları genellikle yaralanma sonrası yenilenmez, bu kök hücrelerin restorasyon potansiyelinin uygun kök hücre nişi eksikliği nedeniyle durduğunu gösterir (43).

Anjiyogenez olarak da bilinen neovaskülarizasyon, besin ve gaz değişimi sağlayarak yeni oluşan dokuyu korumak için çok önemlidir (28). Derinin vasküler sisteminin restorasyonu, dokuyu besleyici perfüzyona yeniden bağlayabilmek için

yara yatağındaki hücreler, humoral ve moleküler olayların karmaşık bir kademesidir. Anjiyogenezi başlatanlar, büyüme faktörleridir; VEGF, PDGF, b-FGF ve serin proteaz trombinidir. Yeni damar oluşumundaki ilk adım, büyüme faktörlerinin, mevcut damarların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasıdır, böylece hücre içi sinyal iletim basamaklarını aktive eder. Aktive endotel hücreleri, bazal laminayı çözen proteolitik enzimler salgırlar. Böylece, endotel hücreleri artık çoğalabilir ve yaraya göç edebilir. Ayrıca, devam eden endotel proliferasyonu için çevre dokunun parçalanması amacıyla matriks metaloproteinazları salgırlar. Yeni bir damar ilmeği oluşturmak üzere diğerleriyle bağlantı kuran küçük boru biçimli kanallar oluşur. Daha sonra, yeni damarlar arterlere ve venüllere farklılaşır. Perisitlerin ve düz kas hücrelerinin toplanması üzerine damar duvarlarının daha da stabilize edilmesiyle olgunlaşır (49). Son olarak, ilk kan akışı ile anjiyojenik süreç tamamlanır.

Proliferasyon fazındaki son adım, granülasyon dokusunun gelişimidir. Yaralanmadan 4 gün sonra yara yatağında granülasyon dokusu oluşmaya başlar (43) yüksek yoğunlukta fibroblastlar, granüositler, makrofajlar, kılcal damarlar ve gevşek şekilde düzenlenmiş kolajen demetleri ile oluşturulur (49). Ayrıca, anjiyogenezi henüz tamamen bitmediğinden, bu doku oldukça vaskülerdir, bu da ona karakteristik kırmızı bir renk verir. Sonuç olarak klasik bir kızarıklık ile görünür ve kolayca travmatize olabilir. Bununla birlikte, bu fazdaki baskın hücre, kolajen ve ECM maddelerinin üretimi (örneğin, fibronektin, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve hyalüronik asit) gibi farklı fonksiyonları yerine getiren fibroblasttır. ECM'nin oluşumu, hücre adezyonu için bir iskele sağladığı ve içindeki hücrelerin büyümesini, hareketini ve farklılaşmasını kritik bir şekilde düzenleyip organize ettiği için bir diğer önemli adımı temsil eder.

Yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden şekillenme (remodelling), 2 yıla kadar sürebilir ve normal epitel gelişimi ve skar dokusunun olgunlaşmasıyla sonuçlanır. Bu faz sentez ve bozunma arasında bir denge içerir, çünkü kolajen ve yarada biriken diğer proteinler giderek daha iyi organize olur (50,51). Yaranın olgunlaşması sırasında ECM'nin bileşenleri belirli değişikliklere uğrar. Proliferatif fazda üretilen kolajen-III, bu fazda güçlü kolajen-I ile değiştirilir (49,50). Tam kalınlıktaki yaraların kapanmasından sonra tamamen iyileşemeyecek bazı bileşenler

vardır. Kıl kökleri veya ter bezleri gibi subepidermal bileşenlerin ciddi yaralanmalardan sonra iyileşme veya geri büyüme potansiyeli yoktur. Yaralar doğal dokunun kuvvet seviyesine ulaşamayabilir; ortalama 3 ayda orijinal gerilme mukavemetinin %50'sine ulaşır ve uzun vade de ise sadece %80'e ulaşabilir. Skar geliştikçe, vaskülerite düzeyi azalır ve skar zamanla kırmızıdan pembeye değişir (50,51).

Ayrıca, fetal cilt ile erişkin cildi arasındaki yara iyileşme mekanizmalarında farklılıklar vardır. Yetişkin iyileşmesinin erken evresi, nötrofillerin ve makrofajların göçü ile inflamatuvar bir reaksiyon olur, ancak fetusta inflamasyon belirgin değildir. Çalışmalar, inflamatuvar hücrelerin fetal yarada erişkin yaradakilere göre daha az bulunduğunu göstermektedir (46,52). İnterlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) de dahil olmak üzere birçok sitokinlerin, yetişkin iyileşme sürecinde fetal iyileşme sürecine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (53). Aksine, interlökin-10'un (IL-10) fetal iyileşmede yetişkin iyileşmesinde olduğundan daha yüksektir (46). TGF- β 1 ve TGF- β 2 konsantrasyonları erişkin yarada daha yüksekken, TGF- β 3 erişkin yarada daha düşüktür. ECM'nin içeriği fetal ve erişkin yaraları arasında önemli ölçüde farklıdır. Fibroblastlar, fetal yarada ECM'yi daha yüksek oranda üretir, ve tip III'ün tip I kolajene oranı fetal yarada daha yüksektir. ECM'deki hyaluronik asit miktarı da fetal yarada yüksektir, ancak erişkin yarada düşüktür (53). Myofibroblastlar sadece erişkin yarada bulunur. Yetişkin yaranın mekanik gerilimi arttığında, erişkin yarada myofibroblastlar daha belirgin hale gelir. Buna karşılık, fetal yarada myofibroblast hiç yoktur veya çok az vardır (46).

2.4. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DERİ İKAMELERİ

Doku mühendisliği (DM) ve rejeneratif tıp, gelişimsel biyoloji, yaşam bilimleri ve klinik problemleri çözmek için verilen uğraşların bir birleşimidir. Doku mühendisliği 1988 yılında, normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı fonksiyon ilişkilerinin temel anlayışına yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilke ve yöntemlerinin uygulanması ve doku fonksiyonunu eski haline getirmek, korumak veya iyileştirmek için biyolojik ikamelerin geliştirilmesi olarak tanımlanmıştır (54).

Fra Angeliac'ın ünlü resmi "Healing of Justinian"da, Saints Damien ve Cosmos kardeşlerin yaralı bir askere bir homograft uzuv (bacak) nakletmeleri genellikle doku mühendisliğinin ilk tarihi referansı olarak anılır (55,56). Doku

mühendisliği kavramının yakın tarihte ilk kullanıldığı yerlerden biri 1980'lerin sonunda, Keystone, Colorado'da, Ulusal Bilim Vakfı tarafından desteklenen "Doku Mühendisliği" başlıklı bir toplantıdır. Ancak bu toplantı, bugünkü tanımıyla doku mühendisliği disipliniyle çok az ilgiliydi, daha çok canlı dokuları manipüle etme ve bunları protez malzemeleriyle potansiyel olarak birleştirme çabaları ele alınmış, tek başına ya da uygun doku iskelesi malzemesiyle birlikte biyolojik olarak gerçek doku üretimi toplantının odağı değildir. Bugünkü anlamıyla doku mühendisliği teriminin ilk kaydedildiği kullanım, 1991 yılında "Surgical Technology International" dergisinde "İşlevsel Organ Değişimi: Doku Mühendisliğinin Yeni Teknolojisi" adlı bir makalede yayınlanmıştır (55).

Günümüzde, doku mühendisliğinin amacı, hasarlı dokuları veya tüm organları yenileyen, koruyan veya iyileştiren fonksiyonel yapıları bir araya getirmektir. Doku mühendisliği doku benzeri yapılar oluşturmak için canlı hücreler, biyolojik olarak uyumlu malzemeler ve uygun biyokimyasal (örneğin, büyüme faktörleri) ve fiziksel (örneğin, döngüsel mekanik yükleme) faktörlerini ve bunların kombinasyonlarını kullanan alandır. Doku mühendisliğinin başlıca çalışma alanları deri, kemik, kıkırdak, sinir, göz, pankreas ve böbrek gibi organlardır. Ayrıca doku mühendisliği ilaç testlerinde toksikoloji etkisinin belirlenmesi için ve doku gelişimi ve morfolojisi araştırmaları için de kullanılır (57).

Yukarıda bahsedildiği gibi, deri dokusunun hasarı ile vücut, potansiyel olarak zararlı mikrobiyal, termal, mekanik ve kimyasal etkilere doğrudan maruz kalır (58). Basit ve kısmi yaralanmaları vücut kendisi iyileştirebilir. Ama tam kalınlıktaki yaralanmalarda, derin ve büyük yaralanmalarda vücut kendi kendini yenileyemez. 4 cm çapından daha fazla tam kalınlıktaki cilt kaybının tedavisi için greft uygulanması gerekmektedir (59).

Deri doku mühendisliğinin tarihteki ilk örneği ise bir deri grefti olarak yaklaşık 3000 yıl kadar önce Hindistan'da Hindu tilemaker kastında görülmüştür. Hırsızlık ve zina için ceza olarak kesilmiş burunların yerine gluteal bölgeden alınan deri greftlerini kullanılmıştır (60). Bu uygulama deri doku mühendisliğinin ilk örneği olarak düşünülebilir. 1869'da Jacques Reverdin'in küçük, ince insan derisi otograflarının başarılı bir şekilde kullanılmasını anlatan klasik makalesi, plastik cerrahide önemli bir klinik çağın habercisi olmuştur. Böylece Reverdin tarafından deri grefti

tanımlanmıştır (61,62). O zamanda beri çok çeşitli deri grefleri ortaya çıkmaya ve başarılı şekilde kullanılmaya devam etmiştir (63,64) ve zamanla cerrahi altın standartlar ortaya çıkmıştır.

Modern deri ikamelerinin geçmişi ise 1880 yılında Joseph Gamgee tarafından, gazlı bez katmanları arasına sıkıştırılmış pamuk yünden yapılmış emici bir örtü tanımlanmasına dayandırılabilir (64,65). O zamanlarda kullanılan sargının birincil işlevi, yara eksüdasını emmek ve bakteriyel enfeksiyonu önlemek için yarayı mümkün olduğunca kuru tutmaktır. 1895 yılında Mangoldt, kronik yaraları tedavi etmenin bir yolu olarak “epitel hücre tohumlaması” tekniğini tanımlamıştır. Yüzeysel epitelin deriden cerrahi bir bıçakla “fibrin yaradan sızıncaya kadar” sıyrılarak toplanmasıyla epitel hücreleri elde edilmiş, daha sonra bu hücreleri yaraların üzerine ekilmiştir (63,64). 1897’de Lunggren, oda sıcaklığında asidik sıvı (karın boşluğunda sıvı toplaması, asit) içinde deri parçalarının canlı tutulabileceğini göstermiştir (64).

1929’da Brown ve ark. bölünmüş kalınlıkta deri aşılama tekniklerini oluşturmuştur ve her birinin avantajlarını ve dezavantajlarını belirterek tam kalınlıkta, orta kalınlıkta ve epidermal (Thiersch) greftler arasında ayırım yapmıştır. Deri grefti ile ilgili bu temel prensipler bugün hala geçerlidir (61,62). Yanık tedavisinde split (ayrılmış) cilt greftlerinin kullanımı 1942’de Brown ve McDowell tarafından bildirilmiştir (66).

1975 yılında deri doku mühendisliği için önemli gelişmeler olmuştur. Rheinwald (Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, MIT) ve Green (Harvard Üniversitesi) tarafından insan epidermal keratinositlerinin *in vitro* olarak seri halinde başarılı bir şekilde geliştirildiği bildirilmiştir (67). Bundan daha önce, keratinositlerin sınırlı çoğalması, erken farklılaşması, sık kontaminasyonu ve fibroblastların aşırı büyümesi nedeniyle büyümesi zor olmuştur (65). Plastik yüzeylerde insan keratinositlerinin proliferasyonunu desteklemek için fibroblastların proliferasyonunu kontrol etmek üzere büyüme faktörleri ve ölümcül derecede ışınlanmış fare 3T3 fibroblastlarını doğru yoğunlukta birleştirmeyi başarmışlardır. Daha sonra bu teknolojik gelişme, Genzyme (Cambridge, MA) tarafından pazarlanan ilk hücre bazlı doku mühendisliği ürünü Epicel’in ortaya çıkmasına yol açmıştır (57). Söz konusu ürünün bir dermiş katmanı yoktur ve sadece birkaç hücre kalınlığındadır; bu nedenle, son derece kırılgandır ve yaygın olarak kullanılmamaktadır (yılda ortalama sadece yaklaşık 60-

70 hasta). Ayrıca ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA), Epicel'i, türünün ilk örneği olan (fare hücrelerinin bir besleyici katmanını kullandığı için), insan olmayan bir ksenojenik yani, başka bir türden türetilmiş bir ürün olarak kabul etmiştir.

1981'de, O'Conner ve grubu ilk kez yanık kusurlarını örtmek için kültürlü otolog epitel kullanmıştır. Canlı bir alternatif oluşturmak için, fibroblastlar gibi mezenkimal hücrelerle kolajen I jel bazlı bir deri ikamesi oluşturulmuştur. Bir epidermal katman eklendiğinde, bu yaklaşım “deri eşdeğeri”, “karma kültür” veya “organotipik kültür” olarak bilinir (64). Bir başka ürün de, MIT makine mühendisi Ioannis Yannas ile Boston Shriners Çocuk Hastanesi'nde yanık cerrahı John F. Burke'nin işbirliği ile ortaya çıkmıştır (57). Bu ürün, Integra® Life Sciences (Plainsboro, NJ) tarafından ‘dermal rejenerasyon şablonu’ adı altında piyasaya sürülmüştür. Integra iki katmanlı bir yapıya sahiptir; epidermal tabaka olarak silikon membran kullanılır ve dermal tabaka ise çapraz bağlanmış ve kontrollü dondurularak kurutma (freeze-drying) yoluyla gözenekli bir matrise dönüştürülen sığır kolajen-I ve köpekbalığı kondroitin 6-sülfat karışımından oluşur (57,64). Integra ile yaranın kaplanmasıyla sonra, 2-3 hafta içinde yara yeniden vaskülarize olur. Bu aşamada, yüzeysel silikon tabakası çıkarılır ve neo-dermis yatağına uygulanan çok ince bir split deri grefti ile değiştirilir. Integra'nın avantajları, neo-dermis oluşumu için zaman tanınması, iyi estetik sonuçlar vermesi ve anında bulunabilirliktir. Bununla birlikte, D-dezavantajları, iki aşamalı bir operasyona ihtiyaç duyulması, pahalı olması ve altında enfeksiyona yol açabilecek eksüda birikmesidir. Buna rağmen Integra, 10 Şubat 1996'da Hong Kong'da meydana gelen Pat Sin Range yangını kurbanlarının tedavisi gibi bazı afet durumlarında (64) olduğu gibi günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır. 1981 yılında MIT'de Eugene Bell tarafından FDA onayını alan canlı hücreleri içeren ilk tıbbi cihaz olarak icat edilen Apligraf (eski adıyla Graftskin), simüle edilmiş bir dermal faz ve bir epidermal katmandan oluşan bilaminar bir yapıdır. Dermal bileşen, canlı yenidoğan fibroblastı ekilmiş bir sığır kolajen ağıdır. Fibroblastlar, yenidoğan sünnet derisinden elde edilen saf bir hücre kültürüdür. Epidermal tabaka ise, yenidoğan sünnet derisinden benzer şekilde elde edilen saf bir keratinosit kültürüdür (68).

Günümüzde doku mühendisliği yöntemleriyle üretilmiş deri ikame ürünleri, hücre içeren ve aselüler (hücresiz) olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir. Hücre içeren ürünler, bir matris içine alınmış fibroblastlar ve keratinositler gibi canlı hücreleri içerirken, aselüler ürünler, yalnızca hyaluronik asit, kolajen, fibronektin ve bazı sentetik polimerler gibi malzemelerden oluşan matrisi içerir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Küresel piyasada ticari olarak mevcut deri ikamelerinden bazılarının karşılaştırılması (69)

Ürün	Şirket	Endikasyonları	Avantajları	Dezavantajları
AlloDerm	LifeCell Corp.	Yanıklar/tam kalınlıkta yaralar	>100.000 uygulama; 2 yıl raf ömrü	Asellüler
Apligraf	Organogenesis, Inc.	Kronik venöz ve diyabetik ayak ülseri	İki katmanlı, dermisin işlevini taklit eder	5 günlük raf ömrü
Biobrane	Bertek Pharmaceuticals	Kısmi kalınlıkta yanıklar, donör bölgeler	3 yıl raf ömrü, iyi bariyer işlevi ve su alış-verişi	Antimikrobiyal özellik yok, 7-10 gün sonra çıkarılması gerekir
Celaderm	Advanced BioHealing, Inc.	Kısmi kalınlıkta yanıklar veya venöz bacak ülserleri	> 6 aylık raf ömrü, nispeten ucuz	FDA onaylı değil
Dermagraft	Organogenesis, Inc.	Diyabetik ayak ülserleri	Dermis işlevini taklit eder, kriyo-dondurulmuş ürün	Kısa raf ömrü (kriyo-saklama olmadığı sürece)
Epicel	Genzyme Biosurgery	Derin dermal veya tam kalınlıkta yanıklar	Otolog hücreler, kalıcı alma sıklığı yüksek	FDA tarafından insani kullanım aracı olarak onaylanan hassas ürün- kanıtlanmış klinik çalışma yok, 24 saatlik raf ömrü

Tablo 2.1: (devam)

EZ Derm	Mölnlycke Health Care	Kısmi kalınlıkta yanıklar/venöz, diyabetik ve basınç ülserleri	Nispeten uzun raf ömrü	Potansiyel immün yanıt ve/veya hastalık aktarımı
Graftjacket	Wright Medical Technology, Inc.	Diyabetik ayak ülserleri	Sadece bir uygulama yeterli	Asellüler
Hyalograft 3D	Anika Therapeutics, Inc. (Fidia Advanced Biopolymers)	Diyabetik ayak ülserleri	Otolog hücreler, kalıcı alma sıklığı yüksek	2 günlük raf ömrü, özel hazırlık, iki ürünün greft edilmesi gerekir
Integra	Integra LifeSciences Corp.	Derin kısmı ve tam kalınlıkta yanıklar, basınç ülserleri, venöz ülserler, diyabetik ülserler	İki tabakalı matris, iyi bariyer işlevi, orta raf ömrü	Silikon tabakanın ameliyatla alınması ve otogreft gerekir
Laserskin	Anika Therapeutics, Inc.(Fidia Advanced Biopolymers)	Diyabetik ayak ülserleri	Otolog hücreler, reddedilme, kalıcı alma sıklığı	2 günlük raf ömrü, özel hazırlık, iki ürünün greft edilmesi gerekir
Matriderm	MedSkin Solutions Dr. Suwelack	Üçüncü derece yanıklar, cerrahi yaralar	Rehberli hücre aktivasyonu ve doku rejenerasyonu	Aselüler
Oasis	Healthpoint Biotherapeutics	Kısmi ve tam kalınlıkta basınç, venöz ve diyabetik yaralar/kısmi kalınlıkta yanıklar	1,5 yıllık raf ömrü	Potansiyel bağışıklık tepkisi

Tablo 2.1: (devam)

OrCel	Forticell Bioscience	Yanık hastalarının ayrı kalınlıktaki donör bölgeleri	İyileşen cildin sitokin ekspresyonunu taklit eder, 9 aylık raf ömrü	Kriyo-dondurarak saklama gerektirir
Strattice	LifeCell Corp.	Rekonstrüktif doku matrisi	Hızlı yeniden vaskülarizasyon, hücre repolülasyonu	Asellüler
TransCyte	Smith & Nephew, Inc.	Tam ve kısmi kalınlıkta yanıklar	1,5 yıl raf ömrü (donmuş)	Silikon membran kaldırılmalıdır
TeruDermis	Olympus Terumo Biomaterials Corp.	Yanık, travma, ameliyat yaraları ve yarık damak ameliyatında ciddi dermal veya mukozal bozuklukları onarma	Anjiyogenez geliştirme	Kısa raf ömrü

Ticari olarak mevcut bazı hücresiz yara örtüsü malzemelerinin karşılaştırmalı bir özeti ise (Tablo 2.2’de) verilmiştir

Tablo 2.2: Ticari olarak mevcut yara örtüsü malzemeleri (69)

Yara Örtüsü	Çeşidi	Üretici Firma	Malzeme
Bioclusive®	Film	Johnson & Johnson	Poliüretan (PU)
Cica-Care	Film	Smith & Nephew	Silikon
Mepiform®	Film	Mölnlycke Health Care	Silikon
Mepilex®	Film/form	Mölnlycke Health Care	Silikon /PU
Mefilm®	Film	Mölnlycke Health Care	PU
Mitraflex®	Film	Mölnlycke Health Care	PU
Spyrosorb®	Film	BritCair	PU

Tablo 2.2: (devam)

Tegaderm®	Film/pad/köpük	3M Health Care	Hidrokolloid/akrilik
Biatain®	Köpük/film	Coloplast	PU
PolyMem®	Köpük/film	Ferris Mfg. Corp.	PU
Contreet®	Köpük/film	Coloplast	Gümüş içeren PU
Cavi-care™	Köpük	Smith & Nephew	Silikon
Lyof foam®	Köpük	Seton Healthcare	PU
Allevyn®	Köpük	Smith & Nephew	PU
Tielle®	Köpük	Johnson & Johnson	PU
Actisorb plus®	Koku Giderici	Johnson & Johnson	Gümüş içeren aktif kömür bez
Carbonet®	Koku Giderici	Smith & Nephew	Aktif kömür bezi
Kaltocarb®	Koku Giderici	ConvaTec	Aljinat içeren aktif kömür bez
Alione	Biyoaktif	Coloplast	Hidrokolloid
Biofilm	Biyoaktif	Biotrol	Hidrokolloid
CombiDERM®	Biyoaktif	ConvaTec	Hidrokolloid
Yara Örtüsü	Çeşidi	Üretici Firma	Malzeme
Cutinova Hydro	Biyoaktif	Smith & Nephew	Hidrokolloid
GranuGel® Paste	Biyoaktif	ConvaTec	Hidrokolloid merhem

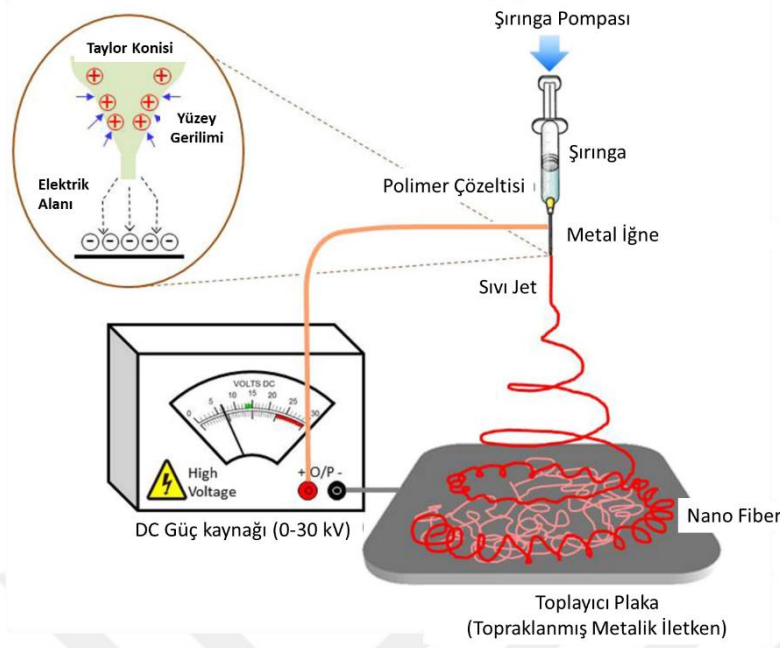
Tablo 2.2: (devam)

Granuflex®	Biyoaktif	ConvaTec	Hidrokolloid
Tegasorb®	Biyoaktif	3M Health Care	Hidrokolloid
Duoderm®	Biyoaktif	ConvaTec	Hidrokolloid
Mesitran®	Biyoaktif	Theo Manufacturing BV	Bal içeren Hidrokolloid
Aquacel®	Biyoaktif	ConvaTec	Hidrofiber
Versiva®	Biyoaktif	ConvaTec	Karboksimetil selüloz
Aquaform®	Biyoaktif	Aspen Medical	Hidrojel
Intrasite Gel®	Biyoaktif	Smith & Nephew	Hidrojel
Nu-Gel®	Biyoaktif	Johnson & Johnson	Hidrojel
Sterigel®	Biyoaktif	Seton	Hidrojel
Algisite®	Biyoaktif	Smith & Nephew	Aljinat
Algosteril®	Biyoaktif	Brothier	Aljinat
Melgisorb	Biyoaktif	Mölnlycke Health Care	Aljinat
SeaSorb®	Biyoaktif	Coloplast	Aljinat
Tegagen	Biyoaktif	3M Health Care	Aljinat
Mepore®	Geleneksel	Mölnlycke Health Care	Dokunmamış polyester kumaş

2.4.1. Elektroegirme Yöntemi ile Deri İkamesi Üretimi

Yaraların tedavisinde, hasarlı veya tahrip olmuş dokuların başarılı bir şekilde yenilenmesini veya değiştirilmesini sağlayan daha karmaşık malzemelerin ve kompozit yapıların kullanılması gerekmektedir. Buna paralel olarak, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında, elektroegirme kullanılmasıyla üretilen doku ürünlerinin oluşturulmasına gerek araştırmacılar gerek üretici firmalar tarafından önemli bir ilgi gösterilmektedir. Elektroegirme yöntemi ile biyolojik olarak uyumlu çok çeşitli malzemeler kullanarak, yöntemin nano ölçekli üretime izin verebilmesi sayesinde karmaşık geometrik yapılar üretilir. Elektroegirme, elektrostatik kuvvetler kullanarak çok ince lifler üretmek için basit, uygulanabilir ve ucuz bir tekniktir; dolayısıyla, günümüzde dünya genelinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Ayrıca, bu çok fonksiyonlu yöntem, daha küçük gözeneklere ve daha geniş yüzey alanına sahip fiber ağların üretilmesine olanak tanır ve 3D mühendislik yapıları için uygun bir seçimdir. Küçük gözenek boyutları hücre çoğalmasını arttırırken, büyük gözenek boyutları hücre dışı matrisin oluşumuna fayda sağlar.

Elektroegirme temel olarak, polimerik yüzeylerin karmaşık etkileşimlerine, moleküllerin şekillerine, solüsyonların reolojisine ve elektrostatik yük profillerine bağlı olarak polimer çözeltilerinin veya erimiş polimerlerin elektrikli jetleri oluşturmaktadır. Elektroegirme sırasında yüksek elektrik gerilimi altındaki polimer zincirleri birbirine karışır ve çözücü buharlaşırken dengeli fiberler oluşturur (Şekil 2.4). İğne ucunda damla oluşumu, yüzey yükleri ve harici elektrik alanı tarafından uygulanan Coulombik kuvvet arasında karşılıklı elektrostatik itme sayesinde gerçekleşir. Bu elektrostatik etkileşimlerden dolayı, sıvı damlası Taylor konisi olarak bilinen konik bir şekil alır. Elektrik alanın yoğunluğu belirli bir kritik değere ulaştığında, elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilimini aşar ve sıvı jetinin Taylor konisinin ucundan çıkmasını sağlar. Sıvı jeti sabit bir şekilde dışarı atılmaya devam eder ve yüzey gerilimi damlacık şeklinin tekrar gevşemesine neden olur. Kolektöre (toplayıcıya) ulaşmadan önce, sıvı jeti uzar ve çözücü buharlaşarak, kolektör üzerinde rastgele yönlendirilmiş, dokunmamış bir ince polimerik fiber örtü oluşmasına neden olur (70).



Şekil 2.4: Genel amaçlı, tek şırıngalı bir elektroğirme cihazının ve polimer çözeltisinin iğne ucunda oluşturduğu Taylor konisinin şematik gösterimi (71)

Metodun diğer metotlara kıyasla sadeliğine rağmen, elektroğirmeyi gerçekleştirmek zordur; istenen fiber boyut ve morfolojisine ulaşmak için kurulum ve deney koşullarıyla ilgili parametreler iyi ayarlanmış olmalıdır. Parametrelerin yanı sıra çevreleyen hava, bağıl nem, hava akımı, buhar basıncı ve önceden var olan gazlar gibi fiber çapı ve oluşan dokuyu etkileyen çevresel koşullar da vardır. Başarılı bir deneysel elektroğirme işlemi, çözücü sisteminin üç özelliğini ile olur: i) optimum aralıkta ortalama yük kapasitesi ile yarı iletkenlik, ii) polimerik fiberlerin hızlı katılaşmasını sağlamak için yüksek uçuculuk, iii) polimer zincirleri arasındaki moleküller arası ve molekül içi etkileşimi engelleyen yeterli çözünürlüktür. Gözenek büyüklüğü 500 ila 100 μm arasında olan nano-fiber yapıların, yaraları bakterilerden korumak için uygun olduğu bildirilmiştir (72).

Deri doku mühendisliğinde yaygın uygulama bulan elektroğirme yöntemiyle üretilmiş literatürde yer alan çalışmalardan bazı örnekler aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Elektroeğirme yöntemiyle üretilmiş deri doku mühendisliği ürünlerine yönelik literatürde yer alan çalışmalardan bazı örnekler

Kullanılan Polimer ve Çözücü	Elektroeğirme parametreleri	Hücre	Bulgular
Kolajen tip I, Çözücü: HFIP (73)	Voltaj 15-20kV iğne ucu toplama plakası arası uzaklık 8cm Oda sıcaklığında eğirme yapılmıştır.	Oral keratinosit (diş etinden izole edilmiştir.)	Kolajen nanofiberlerin insan keratinositlerinin davranışı ve erken evre yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve erken evrede yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir.
Polilaktik asit-ko- glikolik asit (PLGA) ve Çözücü: THF:DMF (74)	2ml/h akış hızında 1kV potansiyel gradyan eğirme yapılmıştır.	İnsan deri fibroblastları (CCD- 1059Sk) kullanılmıştır.	Bu çalışmada, değişik çaplarda fiberler incelenmiştir ve 350-1100 nm metre çaplı fiberlerde hücre çoğalmasının daha iyi olduğu ortaya çıkmıştır.
Kurkumin yüklü PCL- PEG Çözücü: DCM-DMF(9:1) (75)	8,5kV iğne ucu toplama plakası arası 16cm uzaklıkta 08ml/h akış hızında eğirme yapılmıştır.	Fare miyoblast hücre hattı (C2C12) kullanılmıştır.	Kurkumin antioksidan, antienflamatuar etki göstermiştir ve yüzeyde yüksek hücre tutunması sağlamıştır.
Üst katman: PLCL /Poloksamer Alt katman dektran/jelatin hidrojel Çözücü: THF/DMF 1:1 (v/v) (76)	İğne ucu toplama plakası arası 16cm uzaklıkta, 16 kV de 1ml/h hızda eğirme yapılmıştır.	Sıçanların bilateral kasık bölgesinden alınan abdominal adipoz dokusundan elde edilen kök hücre kullanılmıştır.	PLCL/poloksamer iyi mekanik mukavemet göstermiş ve dektran jelatin hidrojel ise hücre çoğalması ve hücre dışı matriks oluşturmaları için yeterli alan vermiştir.

Tablo 2.3: (devam)

PCL/Zein/Arap zankı (GA), Çözücüler: Asetik asit ve formik asit (77)	İğne ucu toplama plakası arası 15cm uzaklıkta 0,2ml/h akış hızında ve 18kV eğirme yapılmıştır.	L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır.	PCL / Zein / GA, GA'nın antibakteriyel özelliklerinden dolayı <i>E. coli</i> 'ye karşı antibakteriyel özelliği göstermiştir. Fibroblast hücreleri 14. güne kadar iyi çoğalmıştır ve PCL / Zein / GA iskelelerine yapışmıştır. Deri doku mühendisliği için kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.
Hatmi çiçeği katkılı PCL/jelatin Çözücüler: Formik asit /asetik asit 2:1 (78)	15-17kV, İğne ucu toplama plakası 10cm uzaklığında ve 0,3ml/h akış hızında eğirme yapılmıştır.	L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır.	Ağırlıkça %15 hatmi çiçeğinin elektroegirme açısından optimum olduğu ve hücre çoğalmasını artırdığı rapor edilmiştir.
Poliüretan, susam yağı, bal ve propolis Çözücü: DMF (79)	0,5ml/h akış hızında 20 cm uzaklıkta 10,5 kv voltajda eğirme yapılmıştır.	İnsan dermal fibroblast (1184, ECACC, Birleşik Krallık) kullanılmıştır.	PU molekülleri arasında susam yağı, bal ve propolis ile güçlü hidrojen bağlarının oluşumunu rapor edilmiştir. Geliştirilen kompozit sadece poliüretan ile karşılaştırılınca daha az toksisite göstermiş ve hücre canlılığı oranı artmıştır.
PCL, jelatin kitosan, Çözücüler: Metanol ve asetik asit (80)	22kV, iğne hedef arası mesafe 10cm, 0,1ml/h akış hızında eğirme yapılmıştır	L929 fare fibroblast hücresi kullanılmıştır.	Ekonomik polimer ve çözümler kullanılmış ve iyi hücre çoğalması ve yapışması gözlenmiştir.

Yukarıdaki tablodan da görülebileceği üzere elektroğirme yöntemi fiber yapıdaki yara örtülerinin üretiminde hem kullanılan malzemelerin çok çeşitli olmasına izin vermesi hem de üretim metodunun tekrarlanabilir, kolay, ekonomik olması ve elde edilen nihai ürünün mekanik ve fiziko-kimyasal özellikler açısından insan deri dokusuna benzer üretime izin vermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan en etkili üretim metotlarından biridir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

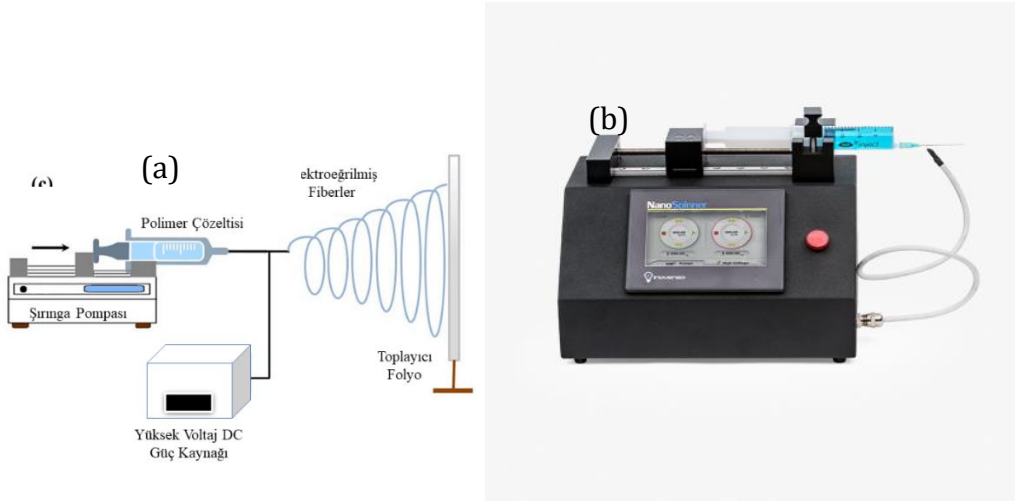
3.1. MALZEMELER

Poly(L-laktid-ko-kaprolakton) (PLCL) kopolimeri laktit:kaprolakton oranı 85:15 (Corbion Purac, Hollanda) olacak şekilde kullanılmıştır. Çözücü olarak, kloroform (CHCl_3 , saflık oranı $\geq 99\%$, Isolab GmbH, Almanya) ve 1,1,1,3,3,3-hekzafluoro-2-propanol (HFIP, saflık oranı $\geq 99\%$, Sigma, ABD) kullanılmıştır. Borik asit (H_3BO_3 , ACS reaktif, $\geq 99.5\%$), sodyum klorür (NaCl , ACS reaktif, $\geq 99.5\%$), potasyum klorür (KCl , ACS reaktif, 99.0-100.5%), Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4 , ACS reaktif, $\geq 99.0\%$), potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 , ACS reaktif, $\geq 99.0\%$) ve hidroklorik asit (HCl , ACS reaktif, 37%) Sigma Aldrich'ten (yeni adı ile Merck KGaA, Almanya) temin edilmiştir. *Escherichia coli* (ATCC® BAA-2471™, ABD) bakterileri ile antibakteriyellik analizi için Nutrient Broth No. 3 (SigmaAldrich, ABD) kullanılmıştır.

3.2. ELEKTROEĞİRME DÜZENEĞİ

Elektroeğirme yöntemi, polimer esaslı nanoliflerin üretimi için en etkin yöntemlerden biridir. Elektroeğirme ünitesi temel olarak şırınga pompası, yüksek voltaj güç kaynağı ve toplayıcı (iletken plaka) kullanılarak oluşturulmuş ve sistem pleksiglastan koruyucu bir kabin içerisine yerleştirilmiştir. Elektroeğirme cihazının şekli aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).

Elektroeğirme sisteminde, voltaj, çözeltinin pompalanma hızı (akış hızı), iğne ile hedef arasındaki mesafe değiştirilerek farklı fiber morfolojileri ve fiber çapları oluşturmak üzere çalışılmıştır. Ortam sıcaklığı ve havadaki nem endeksi, oda koşullarında ortalama 28°C ve 45% olarak raporlanmıştır.



Şekil 3.1: Laboratuvarımızda oluşturulan elektroğirme sistemi: a) Elektroğirme düzeneğinin şematik gösterimi; b) doğru akım (DC) yüksek voltaj güç kaynağına sahip bir elektroğirme cihazı

3.3. ÇÖZELTİ HAZIRLANMASI VE OLUŞTURULAN DENEY GRUPLARI

PLCL kopolimeri, öncelikle ağırlık/hacim oranı %10 (w/v) olacak şekilde kloroform içerisinde çözülmüştür. Bunun için, 0,3 g PLCL tartılmıştır ve 3 ml kloroform içinde cam şişede ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde (Isolab GmbH, Almanya) 800 rpm’de oda sıcaklığında 30 dakika süreyle karıştırılmıştır.

Daha sonra, elektroğirme sistemiyle üretilen fiberlerin morfolojisinin ve çaplarının optimizasyonu için karışım solvent sistemi (kloroform ve HFIP birlikte) kullanılmıştır. Bu amaçla, kloroform ve HFIP hacimce %80 kloroform %20 HFIP olacak şekilde karıştırılmıştır. 2,4 mL kloroform ve 0,6 mL HFIP toplamda 3ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu karışıma ağırlıkça %10 PLCL (0,3 g) eklenmiştir ve 800 rpm’de oda sıcaklığında 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Borik asit içeren PLCL çözeltileri hazırlanması için ise, öncelikle hacimce %80 kloroform ve %20 içeren karışıma %10 (w/v) olacak şekilde PLCL eklenmiştir. Daha sonra, bu karışıma %3 (w/v) borik asit eklenmiştir. Sigma, Almanya’dan temin edilen borik asit herhangi bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. Özetle bu karışım, 2,4 mL kloroform, 0,6 mL HFIP, 0,3 g PLCL ve 0,09 g büyük partiküllü (yani elenmemiş) borik asit içermektedir. Bu karışım 800 rpm’de 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır.

Ayrıca, üretilen fiberlerin içerisinde borik asit dağılımının, salım kinetiğinin ve fiber morfolojisine borik asit partikül boyutunun etkisinin araştırılması için tane boyutu düşürülerek ayrı bir deney grubu oluşturulmuştur. Bu amaçla, borik asit partikülleri öncelikle havanda ezilmiştir ve sonrasında 38 μ m büyüklüğündeki gözeneklere sahip paslanmaz çelik elekten (Koçintok, Ankara) geçirilerek tanecik boyutu düşürülmüştür. Aynı şekilde, oluşturulan karışım, 2,4 mL kloroform, 0,6 mL HFIP, 0,3 g PLCL ve 0,09 g küçük partiküllü (yani elekten geçirilmiş) borik asit içermektedir. Bu karışım 800 rpm’de 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Son olarak, borik asit miktarı %5’e (w/v) çıkarılarak başka bir elektroerme çözeltisi daha oluşturulmuştur. Oluşturulan deney grupları ve elektroerimde kullanılan parametreler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 3.1: Elektroerimde çalışılan örnek numaraları ve açıklamaları

No	Çözelti Kompozisyonu	Voltaaj (kV)	İğne-Hedef Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL/saat)
1	%10 (w/v) PLCL; kloroform içerisinde	10	15	1
2	%10 (w/v) PLCL; kloroform içerisinde	8	15	1
3	%10 (w/v) PLCL; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	8	15	1
4	%10 (w/v) PLCL; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	8	15	1,5
5	%10 (w/v) PLCL ve %3 (w/v) büyük partiküllü borik asit; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	10	15	1,5
6	%10 (w/v) PLCL ve %3 (w/v) küçük partiküllü ($\leq 38 \mu$ m) borik asit; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	8	15	1,5
7	%10 (w/v) PLCL ve %3 (w/v) küçük partiküllü ($\leq 38 \mu$ m) borik asit; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	10	15	1,5
8	%10 (w/v) PLCL ve %5 (w/v) küçük partiküllü ($\leq 38 \mu$ m) borik asit; 8:2 (v/v) kloroform/HFIP içerisinde	10	15	1,5

PLCL fiber örtü hazırlamak için öncelikle %10'luk ağırlık/hacim oranında PLCL kloroform çözeltisi ile elektroegirme işlemi başlatılmıştır. 10 kV voltajda 1 mL/saat akış hızında toplama yüzeyine uzaklık 15 cm olacak şekilde 5 dk süre ile egirme yapılmıştır. Egirme işlemi için 21G yeşil renkteki iğne ucu 5ml'lik şırınga ile kullanılmıştır. Toplama işleminden önce metal hedef üzerine alüminyum folyo kaplanmış ve fiberlerin bu folyo üzerinde birikmesi sağlanmıştır. Daha sonra sırası ile Tablo 3.1.'de verilen çözeltiler hazırlanmış ve elektroegirme ile polimerik veya borik asit partikülleri ile kompozit yapıda yara örtüsü katmanları oluşturulmuştur.

3.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)

Elektroegirme işlemi sonunda folyo hedeften ayrılmış ve fiber örtü taramalı elektron mikroskobu (SEM, Vega 3, Tescan, Brno, Çek Cumhuriyeti) ile fiber morfolojisi, yönelimi, borik asit partikül dağılımı ve boyutu açısından incelenmiştir. Bu amaçla, folyo üzerindeki fiberler elektrik iletkenliği sağlanabilmesi amacıyla altın/paladyum (Au/Pd) ile kaplanarak 10 kV hızlandırma voltajında incelenmiştir. Benzer şekilde jelatin fiberler de iletkenlik sağlanması için Au/Pd kaplanmıştır. Havanda ezilip elekten geçirilen boyutu düşürülmüş veya herhangi bir işleme tabi tutulmayan borik asit tozları ayrı ayrı stublar üzerinde yapışkan karbon bantlara döküldükten sonra yapışmayan partiküller N₂ gaz akışı ile uzaklaştırılmış ve SEM analizi öncesi aynı şekilde püskürtmeli kaplama yöntemi (sputter coating) ile Au/Pd kaplanmıştır.

Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDS), SEM ve geçirimli elektron mikroskopları (TEM) için çok farklı uygulamalarda kullanılmak üzere üretilmiş, malzemenin farklı bölgelerinde elemental kimyasal analiz, çizgi analizi, faz tespiti ve haritalaması, renkli kompozisyon görüntülemesi gibi tekniklere olanak sağlayan bir yöntemdir. Borik asit partikülü içeren numuneler, malzemelerin temel bileşimlerini belirlemek ve ölçmek için standart bir yöntem olan EDS ile incelenmiştir ancak bilindiği üzere düşük enerjili bor elementine ait piklerin (ve diğer hafif elementlerin yüzdelерinin) bu yöntemle ölçülmesi EDS tekniğinin kısıtlı olmasından dolayı beklenmemektedir.

3.5. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

Yapısında borik asidin bulunduğu numunelerde B-O kimyasal bağlarına ait kızılötesi spektrum bantları ve polimerik fiberlere ait bantlar, projede önerildiği gibi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Spectrum 100, Perkin-Elmer Inc.,

Norwalk, CT, ABD) ile incelenmiştir. Kullanılan cihaz üzerinde entegre zayıflatılmış toplam yansıma (attenuated total reflection, ATR) ünitesi bulunmaktadır. ATR kullanılarak, saf ve kompozit fiberlerin kızılötesi spektrumları $650-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.

3.6. DERİ İKAMELERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ

Fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi bir tampon çözelti olup, laboratuvar ortamında insan vücut sıvılarının iyon konsantrasyonunu, ozmolarite, ve pH açısından benzer ortam oluşturulması için özellikle değerlidir. 1 litre 1×PBS hazırlamak için, sırasıyla şu adımlar takip edilmiştir: 1) 800 ml distile su, 1 litrelik bir behere koyulmuştur ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. 2) 8 g NaCl eklenmiştir. 3) 0,2 g KCl eklenmiştir. 4) 1,44 g Na_2HPO_4 eklenmiştir. 5) 0,24 g KH_2PO_4 eklenmiştir. 6) HCl ile çözeltinin pH'ı 7.3'e ayarlanmıştır. 7) Toplam hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde çözeltiye distile su eklenmiştir.

Üretilen deri ikamelerinin şişme davranışı, dairesel numunelerde gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Her numune, farklı zaman aralıkları için bir fanlı fırın içerisinde 37°C 'de sabit tutulan PBS (pH = 7.3) içerisine daldırılmıştır. Her zaman noktasında, numunelerin üzerindeki fazla tampon çözeltisi bir filtre kağıdıyla alındıktan sonra hassas terazide (Axis, Gdańsk, Polonya) ağırlıkları ölçülmüştür. Şişme oranı (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (\text{Eş. 3.1})$$

burada W_s numunenin PBS'ye daldırıldıktan sonra şişmiş (swollen) haldeki ağırlığını ve W_d ise kuru haldeki numunenin ağırlığını belirtir. Şişme yüzdesi, her bir numune tipi için 3 defa tekrarlanan ($n=3$) bağımsız testin ortalamasına karşılık gelmektedir.

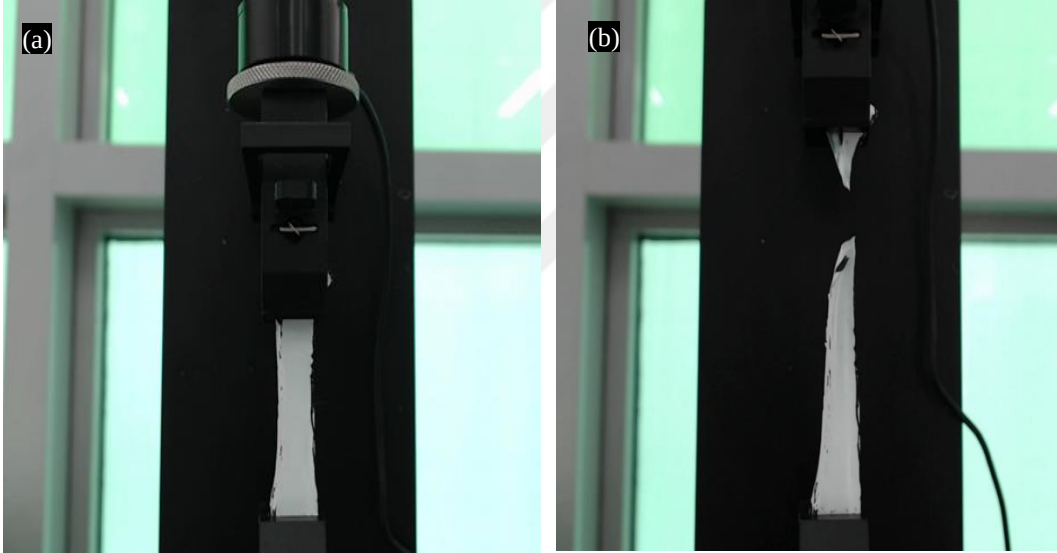
3.7. BORİK ASİT SALIMINA BAĞLI PH DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Deri ikamelerinin borik asit salımına bağlı sebep olduğu pH değişiminin belirlenmesi için her zaman noktasının sonunda, bütün numune gruplarından üçer örnek seçilmiş ($n=3$) ve numunelerin içerisinde bulundukları PBS'nin zaman içinde pH

değişimi ölçülmüştür. Kontrol olarak 0-14 gün boyunca içerisinde numune bulunmayan saf PBS'in (varsa) pH değişimi de ölçülmüş ve ölçüm yapılan zaman noktasındaki numune gruplarına ait değerlerden bu değer çıkarılarak normalize edilmiştir.

3.8. DERİ İKAMELERİNİN MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Deri ikamelerinin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için. CellScale BioTester 5000 cihazı kullanılmıştır (Resim 3.1). %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL ve borik asit katkısız PLCL fiber örtüleri için test yapılmıştır. Bu fiber örtüler köpek kemiği şeklinde kesilmiştir. %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL ve borik asit katkısız PLCL fiber örtüleri için her bir numuneden 4 tane olacak şekilde yapılmış ve fiber örtülerinin kalınlığı 0,1mm² olarak ayarlanmıştır.



Resim 3.1: Borik asit katkısız (saf) PLCL fiber örtülerin mekanik test sırasındaki görüntüleri: (a) çekme deneyi sırasında; (b) çekme yükü altında kopma anı

Test sırasında izlenen yük-yer değiştirme ilişkisine dayanarak, gerilim ve gerinim şu formüller kullanılarak değerlendirilmiştir: $\sigma=F/A$ ve $\epsilon=\Delta L/L$. Burada F, çekme deneyi altındaki kuvvettir, A kesitsel örnek alanıdır, L, ölçülen numunenin uzunluğudur ve ΔL yüklendikten sonra numunenin uzunluğundaki değişimdir.

3.9. DERİ İKAMELERİNİN SU BUHARI VE OKSİJEN GEÇİRGENLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Fiber yapıdaki yara örtülerinin ASTM Standart Test Yöntemlerine (E96-90) göre su buharı iletimi değerlendirilmiştir (81). Kısaca, buharlaştırma kaplarının (test şişeleri) kapağına 24mm çapında bir delik açılmıştır. Kaplar 20 g distile su ile doldurulmuştur (82). Delik açılmış kapaklar %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numuneleri için her birinden 3 örnek olacak şekilde hazırlanmıştır ve numuneler kenarlarından yapıştırıcı kullanılarak kapağa tutturulmuştur. Kontrol amacıyla, kapağında delik açılmamış (kapalı kapaklı) test şişesi ağırlığının sabit kaldığının takibi için kullanılmıştır. Numuneler ve buharlaştırma kapları bir hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Buharlaştırma kapları, nemin 55 ± 5 değerinde, sıcaklığın ise 37°C 'de 14 gün boyunca sabit tutulduğu, doymuş magnezyum klorür çözeltisi ve bir nem ölçer içeren, kapalı bir kap içerisinde bir fanlı fırına yerleştirilmiştir. Daha sonra 2. saat, 4. saat, 6. saat ve 8. saat ile 1.gün, 2.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün, 10.gün ve 14. gün hassas terazide örneklerin toplam ağırlıkları ölçülmüştür. Numunelerin bulunduğu şişelerin ne kadar su kaybettiği tespit ederek, numunelerin ne kadar su buharı geçirdiği tespit edilmiştir.

Fiber örtülerin için oksijen geçirgenliği test etmek için, öncesinde 100ml kaynatılmış ve kapalı kapta soğutulmuş distile su 250 ml'lik şişelerin içine yerleştirilerek kapaklarına %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL fiber örtülerden her birinden 3 numune olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak oksijenin şişeye girmesine ve suda çözünmesine izin veren açık kapaklı şişe kullanılmıştır. Oksijen deneyi ile fiber örtülerin ve negatif ve pozitif kontrol gruplarının oksijen geçirgenlikleri % satürasyon olarak oksijen metre (Hanna HI-2004 Edge DO, İngiltere) ile 1., 3., 5. ve 7. günde ölçülmüştür. Bulunan satürasyon değerleri daha sonra mg/L olarak çevrilmiştir.

3.10. DERİ İKAMELERİN YÜZEY TEMAS AÇILARININ ÖLÇÜLMESİ

Temas açısı ölçümü, biyomalzemelerin ıslanabilirlik karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir termodinamik yöntemdir. Biyomalzeme yüzeylerini araştırmak için kullanılan belki de en eski yöntemlerden biri olarak, biyomalzemelerin yüzey hidrofilikliği hücre yapışması ve yayılması gibi biyomalzemelerin işlevleri için çok önemli olduğundan çok faydalı bilgiler verir. Temas açısı ölçümü, katı numuneler için

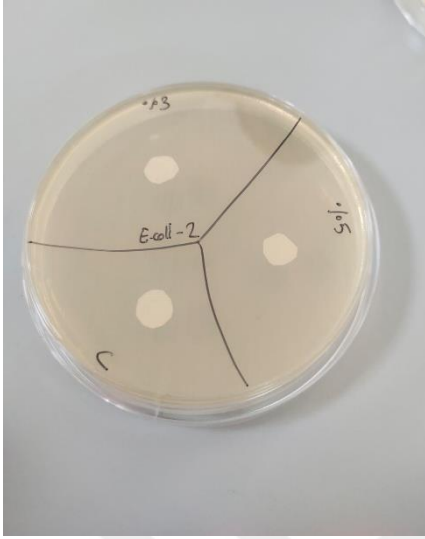
nispeten basit bir yöntemdir ve tipik olarak özel numune hazırlığı gerekmez. Karakterize edilen numuneler yeterince temiz olmalı ve test sıvısı içinde şişmemeli veya çözünmemelidir (83). Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL fiber deri ikamelerine 25°C oda sıcaklığında 5µl distile su damlatılarak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm için Dataphysics Instruments yüzey temas açısı ölçüm cihazı (OCA 15E, Almanya) kullanılmıştır. Suyun fiber deri ikameleri ile yayılması incelenmiş ve fiber deri ikameleri ile su arasındaki açının ölçümü yapılmıştır.

3.11. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ

Antibakteriyel aktivite testi yapmak amacı ile için %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numunelerinden 1cm çaplı olacak şekilde kesilmiştir. Antibakteriyel test öncesinde örnekler steril edilmek amacı ile %70 oranındaki etil alkolde 30dk bekletilmiştir. Daha sonra etil alkol çeker ocakta uzaklaştırıldıktan sonra numunelerin her iki tarafı da 20dk UV ışık altında bekletilmiştir. Antibakteriyel aktive testi disk difüzyon yöntemi uygun olacak şekilde yapılmıştır. Besi yeri olarak Mueller Hinton Agar (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. %3,8 oranında distile su içinde üreticinin bilgi notuna göre hazırlanmıştır (84) ve petri kabına dökülmüştür. Gram negatif bakteri olarak *E. coli* (ATCC® BAA-2471™, ABD) kullanılmıştır (85,86).

Bakterilerin süspanse edilmesi için %1,3 Nutrient Broth No. 3 (Sigma Aldrich, ABD) (1000 ml distile su içinde 13g) çözölmüş ve tamamen çözmek için kaynatılmıştır (87). Bakteriler bu çözelti içerisinde süspanse edilmiş ve 1 dakika boyunca vorteklenmiştir. Daha sonra bakteriler kuru ve steril bir eküvyon yardımı ile alınmıştır ve petri kablarına yayılmıştır (88). 1cm çapında kesilmiş olan fiber iskele örnekleri kontamine olmaması için %96'lık etil alkol ile temizlenip birkaç defa ateşten geçirilen cımbız yardımı ile alınıp laminar akış altında petri kaplarına konulmuştur (Resim 3.2). 37°C'de 24 saat süreyle oksijenli ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonra örnekler alınmış, hücre biyolojisi ve histopatolojisinde en yaygın kullanılan fiksasyon yöntemlerinden biri olan %2,5 oranında paraformaldehit içerisinde fikse edilmiştir (89). Daha sonra dehidrasyon için %50, %70, %80 ve %96 etanol ile her adımda 30dk muamele edilmiştir. Örnekler 3 kez PBS ile yıkanmıştır (90). Son aşama olarak örneklerin yüzeylerinde tutunan bakterilerin gözlemlenebilmesi için yüzeyler 5nm altın/paladyum

(Au/Pd) ile kaplama cihazı kullanılarak (sputter coater, Leica EM ACE600, Almanya) SEM (Hitachi SU7000, Japonya) cihazı ile incelenmiştir.



Resim 3.2: Deri ikamelerin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel test görüntüsü

3.12. DERİ İKAMELERİNİN *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Üretilen fiberler örtüler hücre kültürü deneyleri öncesinde sterilize edilmiştir. Fiber örtülerin sterilizasyonu için, hücre ekiminden önce %70 etil alkol kullanılmıştır. Biyogüvenlik kabini içinde fiber örtüler 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına koyulduktan sonra her birinin kuyucuğa 0,5ml %70 etil alkol eklenmiştir (91). 30dk sonra etil alkol aspire edilmiştir ve fiber örtüler kurumaları için 24 saat biyogüvenlik kabinde bırakılmıştır. Sonrasında fiber örtülerin her iki yüzü 20'şer dakika UV ışın altında sterilize edilmiştir (92). Bu örneklerin, 3T3 fare fibroblast hücreleri (NIH/3T3, ATCC CRL-1658) kullanılarak *in vitro* sitotoksosite testine tabi tutulması için, 6. pasaj sayısındaki 3T3 fibroblast hücreleri 37°C'de fetal sığır serumu (FBS, %10v/v) ve penisilin/streptomisin (%1v/v) ile takviye edilmiş, DMEM ortamında (DMEM yüksek glikoz-glutamin) inkübatörde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş, atmosferde inkübatöre koyulmuştur.

Hücre deneyleri için %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numunelerinin her biri için en az 9 örnek hazırlanmıştır. Ayrıca PLCL deri ikameleri oluşturmak için fiber örtülerin 9 tanesine fiber ağırlığı dikkate alındığında ağırlıkça %0,1 oranında rekombinat insan epidermal büyüme faktörü (EGF) (PBS

içerisinde) kimyasal olarak immobilize edilmeden eklenmiştir ve 12 saat süreyle bekletilmiştir. Böylece EGF eklenmiş %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numuneler ve EGF eklenmemiş %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numuneler olmak üzere 6 farklı grup oluşturulmuştur. Deri ikamelerinin sitotoksikite testleri, ISO 10993-5 protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü için daha önceden hazırlanan 3T3 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Bunun için, öncelikle T75 kültür şişelerinde inkübatörde tutulan hücreler tripsin ile muamele edilerek 5dk inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin hücre kültürü şişelerinde ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra, 2500rpm hızında 5 dk boyunca santrifüjlenen hücre süspansiyonundaki canlı hücre sayısı, Thoma lamında trypan mavisi eklenerek invert mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. Süspansiyondaki canlı hücre sayısının belirlenmesiyle 1ml’de ortalama 32×10^4 hücre var olduğu tespit edilmiştir.

Daha önceden hazırlanmış ve *in vitro* testlerin öncesinde EGF eklenmiş veya EGF eklenmemiş %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL fiberleri 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına uygun olacak şekilde 10mm çapında kesilmiştir. Hücre ekimi için üretilen fiberlerin alanı $0,7955\text{cm}^2$ ’dir. Fiberlerin üzerine 1cm^2 ’de 10.000 hücre olacak şekilde hesaplanmıştır. Bunun için 25,5µl hücre solüsyonu 24’lük hücre kültür plakalarına konulmuş örneklerin üzerine ekilmiştir. Kontrol grubu oluşturmak amacı ile fiber örtü konulmamış boş hücre kültür kuyucuklarına da (tissue culture plate, TCP) aynı oranda hücre ekimi yapılmıştır. Daha sonra hücrelerin fiberlere yapışması için hücreler, 37°C’de ve %5 CO₂ inkübatörde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 500µl fetal sığır serumu (FBS, %10, v/v) ve penisilin/streptomisin (10 U/ml) ile takviye edilmiş DMEM ortamı (DMEM yüksek glikoz-glutamin) eklenmiş ve inkübatörde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş atmosferde inkübe edilerek 24 saat beklemeye bırakılmıştır.

Hücre ekimin ardından birinci gün hücre PrestoBlue™ hücre canlılığı reaktifi 1/10 olacak şekilde olacak şekilde her bir örneğin bulunduğu kuyucuklara eklenmiştir. 4 saat inkübatörde bekletildikten sonra her bir örnekten ve kontrol grubundan PrestoBlue eklenmiş kültür ortamından 120µl alınıp 96’lık hücre kültür plakaların aktarılmıştır. Blank örnek olarak toplam hücre kültür ortamı kullanılmıştır. Mikroplaka okuyucu (Biotek ABD) ile 570nm (test) ve 600nm (referans) dalgaboylarında absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Daha sonra 24’lük hücre kültür plakalarına konulmuş fiberlerin

üzerindeki PrestoBlue aspire edilmiştir. Her bir hücre kültür plaka kuyucukları 500µl PBS ile yıkanmış ve tekrar FBS (%10v/v) ve penisilin/streptomisin (10 U/ml) ile takviye edilmiş DMEM eklenerek, 37°C’de ve %5 CO₂ inkübatöre alınmıştır. Aynı şekilde hücre sayımları 3 ve 7. günlerde de tekrar edilmiştir.

7. günün sonunda hücrelerin SEM ile görüntülenmesi için hücre kültür plaklarındaki hücre kültür ortamı aspire edilmiştir, PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında ise hücreler fiksasyon için %2,5 glutaraldehit ile oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra sırası ile %50, %70, %80 ve %96 alkol serisinde 30dk bekletilerek kurutulmuştur. Hücre ekilmiş örneklerin SEM (Hitachi SU7000, Japonya) ile görüntülenmesinden önce elektrik iletkenliğinin sağlanması için bir kaplama cihazı ile (sputter coater, Leica EM ACE600, Almanya) ile kaplanmıştır.

Hücrelerin floresan mikroskopunda görüntülenmesi içinse FITC-phalloidin (ab235137, Abcam) ve DAPI (ab22854, Abcam) hücre etiketleme boyaları kullanılmıştır. Öncelikle, FITC-phalloidin üreticinin protokolüne göre 1/1000 oranında PBS içinde seyreltilmiş ve içine %0,1 oranında sığır serum albümini (BSA) eklenmiştir. Fikse edilmiş hücrelerin üzerine uygulandıktan sonra 1 saat bekletilmiş ve sonrasında PBS ile yıkanmıştır. Çekirdek boyamak için ise DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür)) kullanılmıştır. 10 mM çözelti olarak temin edilen DAPI, 2,5µM olacak şekilde kuyucuklara eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra DAPI hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Son olarak ise hücreler, floresans mikroskopta (Thunder Imager, Leica, Almanya) her iki boya için uygun dalga boylarında (492/518 nm ve 358/461 nm) görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ÜRETİLEN DERİ İKAMELERİNİN GÖRÜNÜMÜ

Elektroegirme yöntemi ile üretilmiş deri ikamelerinden seçilen birer örneğin, deney sonunda toplayıcı plakadan alınan alüminyum folyo üzerindeki görüntüleri aşağıdaki şekilde verilmiştir. Resim 4.1’de 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat elektroegirme parametreleri kullanılarak üretilen %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden elde edilen saf PLCL fiber örtü ve (b)’de ise aynı parametrelerin kullanılması sonucunda ağırlıkça %5 oranında borik asit içeren PLCL çözeltisinden elde edilen fiber örtü gösterilmektedir.

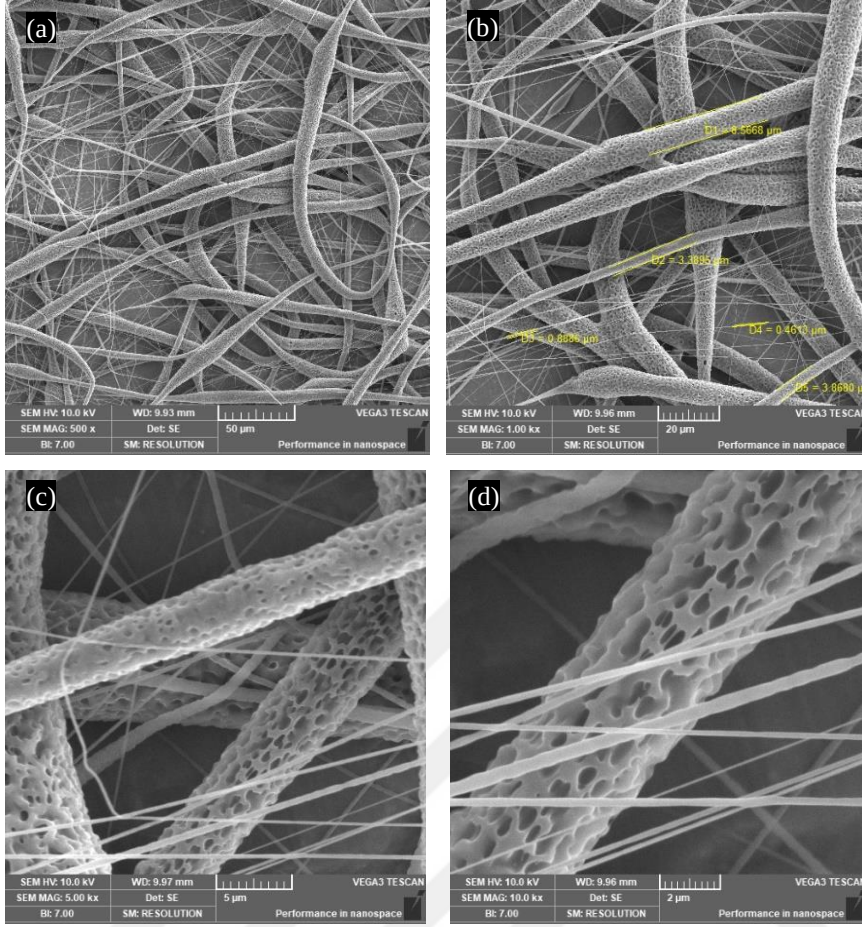


Resim 4.1: Üretilen deri ikamelerinin fotoğrafları: (a) saf PLCL fiber mat; (b) ağırlıkça %5 oranında borik asit içeren PLCL fiber mat

Hem borik asit partiküllerini içeren hem de saf haldeki PLCL deri ikamelerinin, bir penset yardımıyla kolaylıkla alüminyum folyo üzerinden ayrılabilirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, kısa süreli elektroegirme işlemlerinde dahi folyoda biriken yapının süngerimsi ve esnek bir hal aldığı görülmüştür.

4.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)

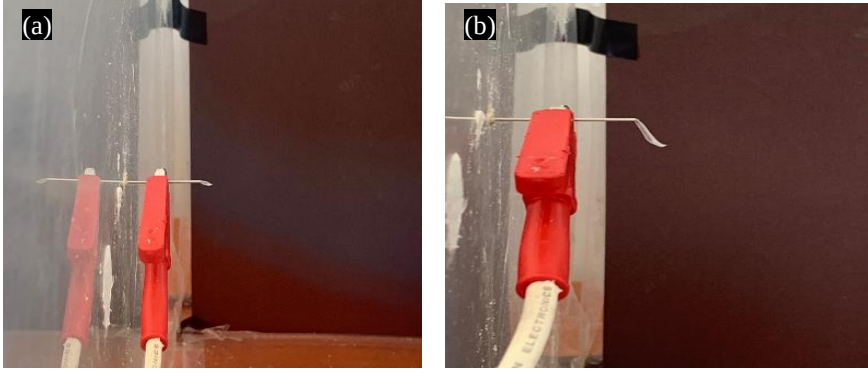
Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV, 15cm mesafede ve 1mL/saat akış hızı kullanılarak elektroegirme yöntemiyle hazırlanmış Örnek-1’e ait SEM görüntüleri Resim 4.2’de verilmiştir.



Resim 4.2: Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

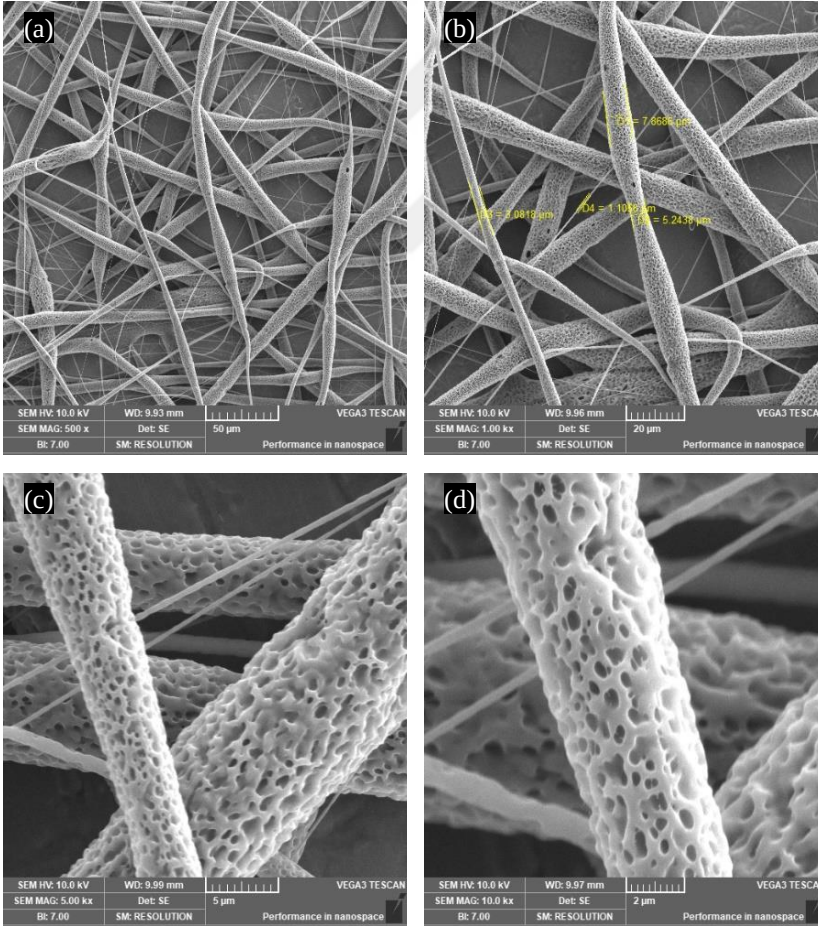
Yukarıdaki şekilde, kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL, 10kV, 15cm mesafede ve 1mL/saat akış hızı şartlarında üretilen fiberlerin çaplarının, rastgele alınan beş ölçümünün ortalamasının $\Phi=3,435\mu\text{m}$ olduğu, fiber morfolojisinin düz (dallanmamış) ve oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Fiberler üzerindeki gözenek çaplarının yaklaşık $1\mu\text{m}$ 'den küçük olduğu görülmektedir. Fiberler hem mikro hem nano boyutlarda heterojen kalınlıklarda üretilmiştir. Bu parametrelerle üretilen fiberlerde boncuk şekilli (bead) fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür.

Diğer yandan, kloroform ile gerçekleştirilen elektroğirme sürecinde, işlem boyunca stabil kalması istenen Taylor konisinin korunmasının zor olduğu (Resim 4.3) ve ayrıca iğne ucu ile hedef arasında kalan alandaki havada (mid-air) fiber oluştuğu gözlemlenmiştir.



Resim 4.3: Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı ile elektroğirme süresince iğne ucunda oluşan damlacığın farklı zamanlarda alınan fotoğrafları: (a) 1. dakika; (b) 3. dakika

Örnek-1’de kullanılan elektroğirme parametrelerinden voltaj 10 kV’den 8 kV’ye düşürüldüğünde elde edilen Örnek-2’ye ait SEM görüntüleri Resim 4.4’te verilmiştir.

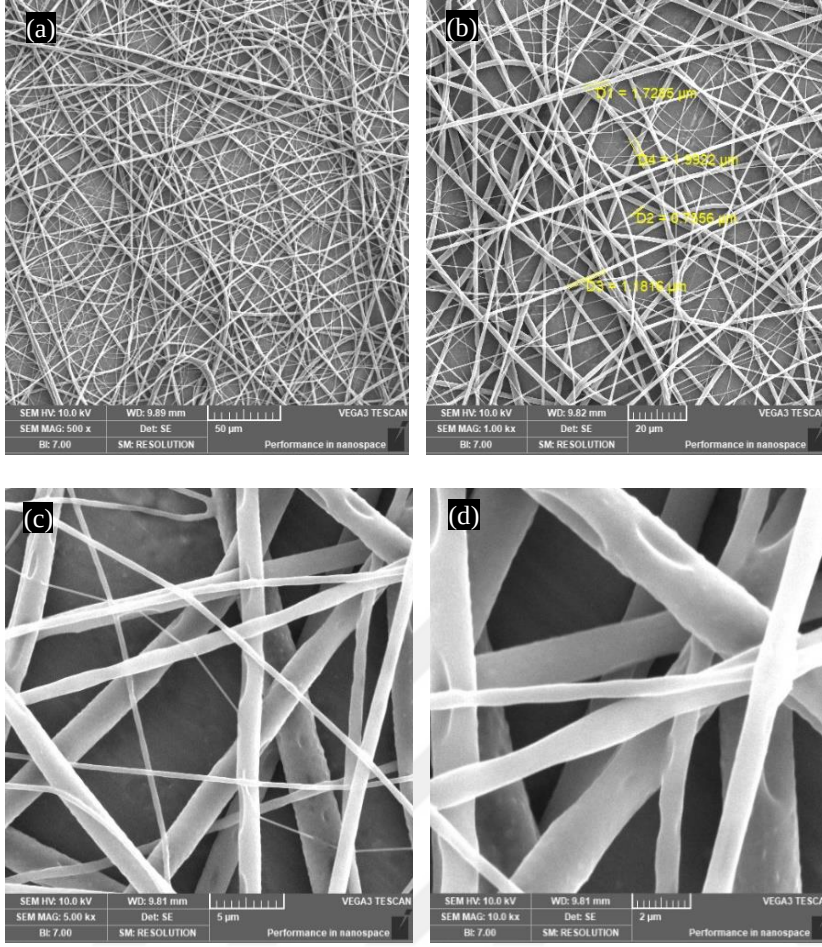


Resim 4.4: Kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b) 20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

Yukarıdaki resimde, kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL, 8kV, 15cm mesafede ve 1mL/saat akış hızı şartlarında üretilen fiberlerin çaplarının rastgele alınan dört ölçümünün ortalamasının $\Phi=4,325 \mu\text{m}$ olduğu, fiber morfolojisinin Örnek-1'e benzer şekilde dallanmamış ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu parametrelerle üretilen fiberlerde boncuk (bead) şekilli fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür. Fiberler, Örnek-1'de olduğu gibi hem mikro hem nano boyutlarda heterojen kalınlıklarda üretilmiştir. Kloroform içerisinde 10% PLCL'den hazırlanan çözeltinin elektroërilme mesafesi ve akış hızı sabit tutularak, voltajın 10 kV'den 8 kV'ye düşürülmesinin fiber çapı ve morfolojisinde önemli bir değişim yaratmadığı görülmüştür.

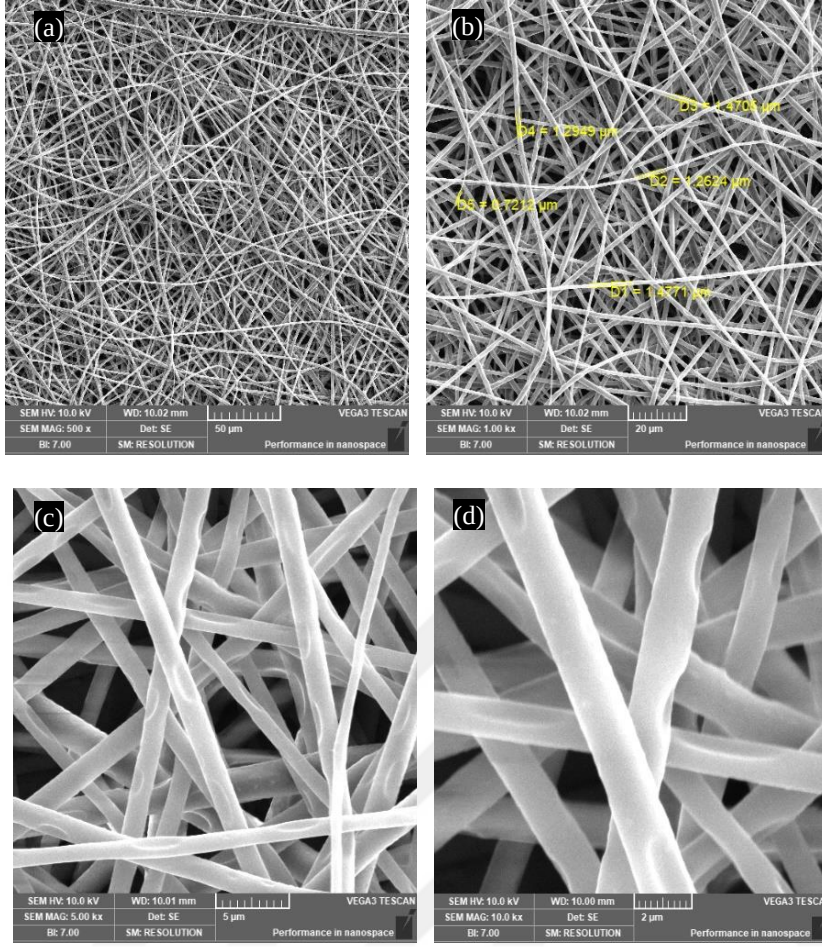
Elektroëirme işleminde, oluşturulan elektrik alan nedeniyle iğneden toplayıcı plakaya hareket etmekte olan polimer çözeltisi jeti çözücü bileşenlerin buharlaşması ile katılaşır ve böylelikle katılaşmış jetten bir nanofiber elde edilir. Bu nedenle işlem sırasında voltaj, akış hızı ve mesafe kadar çözücü (solvent) özelliklerinin de PLCL fiberlerinin boyut ve yüzey morfolojisi üzerine etkisi önem taşımaktadır. Bu amaçla örnek gruplarında bir başka iyi çözücü olan HFIP'nin çözeltiye eklenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan Örnek-3'e ait SEM görüntüleri Resim 4.5'te sunulmuştur.

Resim 4.5'te verilen SEM mikrograflarından, Örnek-2 ile elektroëirme çalışma parametreleri aynı olan ancak çözelti içerisine kloroformun yanı sıra HFIP eklenmesiyle fiber morfolojisinin oldukça değiştii anlaşılmaktadır. Fiber çapının azaldığı ve nispeten daha birbirine yakın çapta fiber üretildiği söylenebilir. Rastgele alınan dört ölçüme göre ortalama fiber çapının $\Phi=1,4145 \mu\text{m}$ olduğu görülmüştür.



Resim 4.5: %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1 mL/saat akış hızı elektroegirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

Elektroegirmede bir diğer parametre olan çözelti akış hızının değişmesi, birim zamanda iğne ucundan çıkan çözelti miktarını değiştirdiğinden, toplayıcı plaka üzerinde oluşan fiber morfolojisinde farklılık, boncuk (bead) oluşumu, fiber çapının değişmesi gibi önemli sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle, akış hızının etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla Örnek-3'ün üretilmesinde kullanılan elektroegirme parametrelerinden çözelti akış hızının 1mL/saat'ten 1,5 mL/saat'e çıkarılmış ve yapılan deneylerden elde edilen Örnek-4'e ait SEM görüntüleri Resim 4.6'da verilmiştir.



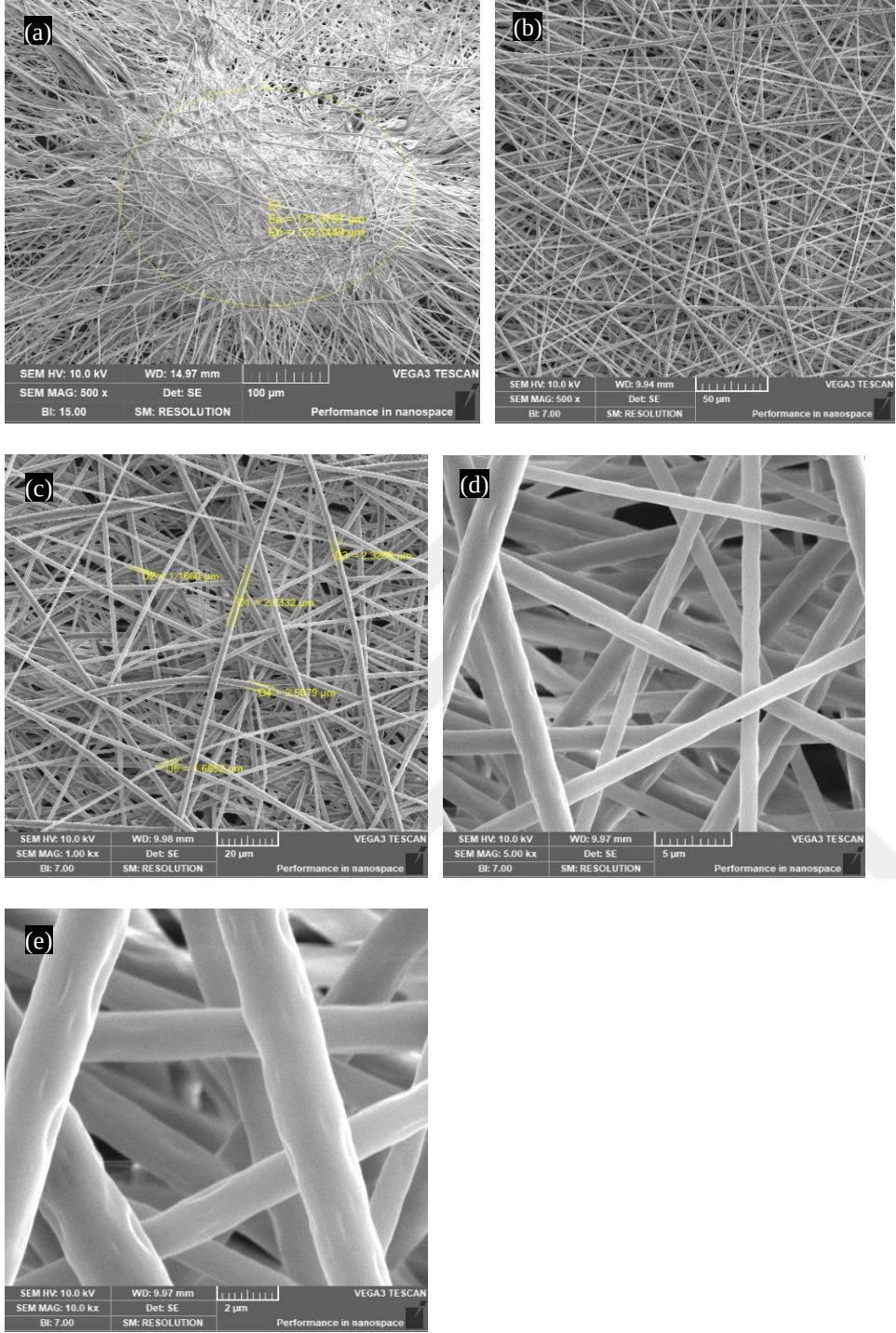
Resim 4.6: %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

Resim 4.6'dan, %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden, 8kV, 15cm mesafede ve 1,5 mL/saat akış hızı şartlarında üretilen fiberlerin çaplarının rastgele alınan beş ölçümünün ortalamasının $\Phi=1,2452 \mu\text{m}$ ve fiber morfolojisinin Örnek-3'e benzer şekilde olduğu, ayrıca birbirine oldukça yakın çapta (nispeten homojen boyutlarda) fiber üretildiği anlaşılmaktadır. Bu parametrelerle üretilen fiberlerde boncuk (bead) şekilli fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür. Burada sonuç olarak, akış hızının 1mL/saat'ten 1,5 mL/saat'e çıkarılmasının rastgele alınan beş ölçümden elde edilen ortalamalara göre büyük ölçüde bir fark yaratmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, yara enfeksiyonlarında önemli bir etken olan *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'a karşı etkili bir antibakteriyel ve antibiyofilm ajan olduğu bilinen borik asidin üretilen deri ikamesi yapısına eklenmesi hedeflenmiştir. Borik

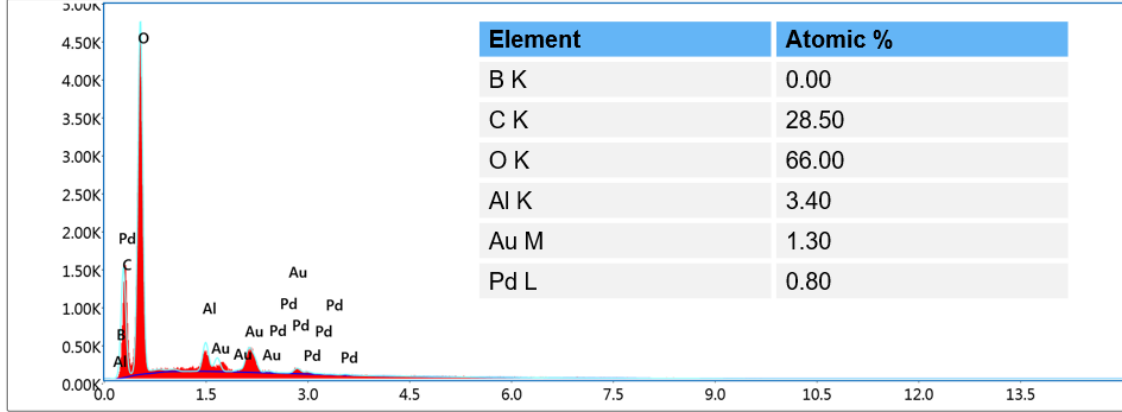
asit katkı oranı ağırlıkça %3 veya %5 olarak belirlenerek borik asidin PLCL ile birlikte elektroeğrilmesi çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla, üreticiden alındığı haliyle herhangi bir işlem uygulanmadan (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5mL/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak fiber üretilmiştir. Bu fiberlere ait (Örnek-5) SEM görüntüleri aşağıdaki şekilde verilmiştir (Resim 4.7).

Resim 4.7(a)'da sarı renk ile işaretlenen ve yarıçapı $\Phi_1=171,38\mu\text{m}$ ve $\Phi_2=124,35\mu\text{m}$ olarak ölçülen elips içerisinde kalan alanın, PLCL fiberler tarafından etrafı çevrilmiş borik asit partikülünü göstermekte olduğu düşünülmektedir. Borik asit partiküllerinin dışında kalan ve yalnızca PLCL fiberlerden oluşan kısmın SEM görüntüleri ayrıca alınarak fiber morfolojisi incelenmiştir (Resim 4.7(b-e)). %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5mL/saat akış hızında elektroeğrilen PLCL fiberlerden rastgele alınan beş ölçümün ortalaması sonucunda fiber çapı $\Phi=2,0844\mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Homojen kalınlıklı fiberlerde geniş gözenekli yapı korunmuştur.



Resim 4.7: Ögütülmemiş (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroegirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 100 µm; (b) 50µm; (c)20µm; (d) 5µm ve (e) 2µm

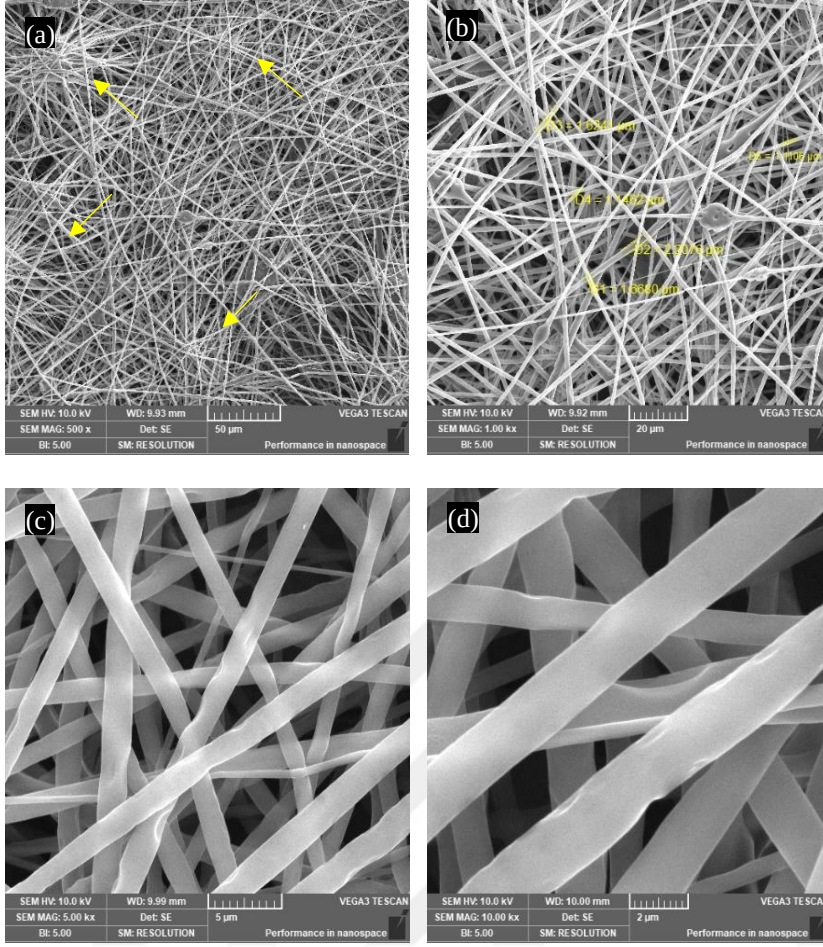
Yapıdaki borik asidin gösterilebilmesi için elektroğrılmış fiber yara örtüsü katmanının elemental analizi için EDS yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Öğütülmemiş (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin EDS analizi

Beklendiği gibi karbon elementinden daha hafif olan elementlerin EDS yöntemi ile tespit edilmesi zor olduğundan yapıdaki borik asit piki elde edilememiştir. Bu nedenle, FTIR analizi gerçekleştirilerek B-O bağlarının tespit edilmesi sağlanmıştır.

Yapıya eklenen antibakteriyel borik asidin yara örtüsünden salım davranışlarında, borik asit miktarı kadar partikül boyutu da önem taşıyabilir. Hem salım davranışının incelenmesi hem de PLCL ile birlikte elektroğirme sırasında oluşacak fiber yapıya etkilerinin araştırılması için borik asit partikülleri küçültülerek daha homojen dağılımlı bir partikül/fiber kompozit yapı sağlamak amaçlanmıştır. Bu amaçla, agat havanda öğütüldükten sonra, 38 µm gözenek boyutuna sahip elekten geçirilerek küçültülen borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8 kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri aşağıda verilmiştir (Resim 4.8).

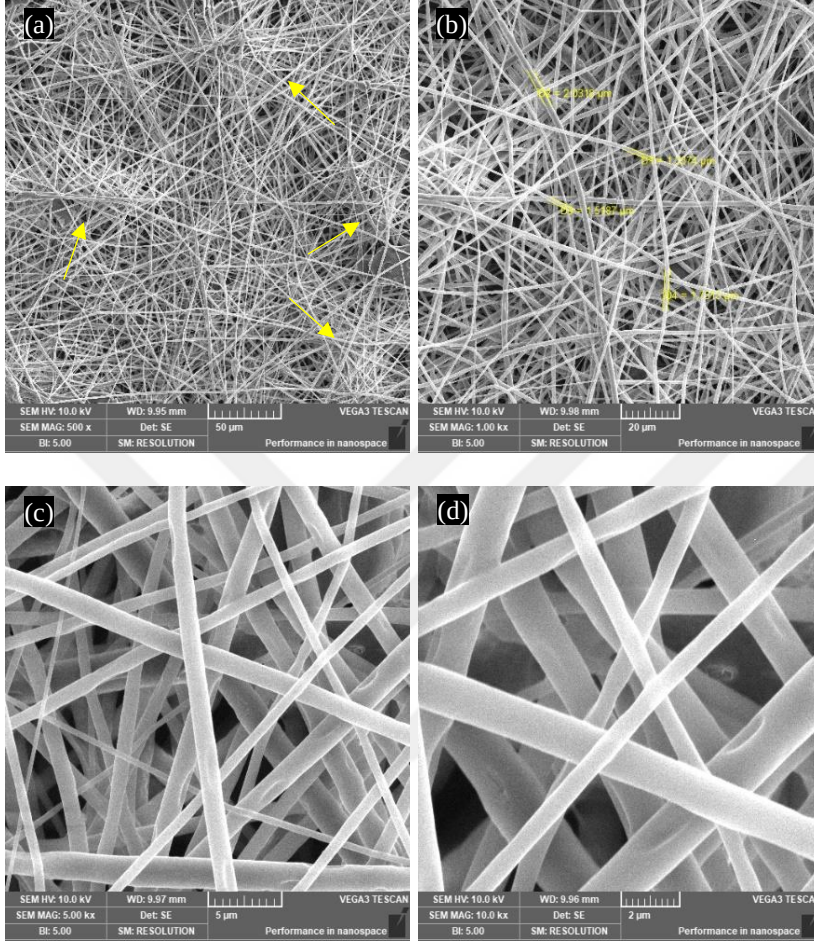


Resim 4.8: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 8 kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

Resim 4.8(a)'da Örnek-6'ya ait PLCL fiberler tarafından etrafı çevrilmiş çapları 50 µm'den küçük borik asit partikülleri olduğu düşünülen düğüm benzeri yapılar sarı renkli oklar ile işaretlenmiştir. Borik asit partiküllerinin dışında kalan ve yalnızca PLCL fiberlerden oluşan kısmın SEM görüntüleri Resim 4.8(b-d)'de verilmiştir. Oluşan fiberlerin çaplarının ortalama $\Phi=1,2452 \mu\text{m}$ olduğu, fiber morfolojisinin gözenek halinde girintili bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Borik asit partikülünün fiberlerin aralarında hapsoldüğü görülmüştür.

Örnek-7'ye ait SEM görüntüleri Resim 4.9'da sunulmuştur. Benzer şekilde, Resim 4.9(a)'da PLCL fiberler tarafından etrafı çevrilmiş ve çapları 50 µm'den küçük borik asit partikülleri olduğu düşünülen düğüm benzeri yapılar daha belirgin olarak fark

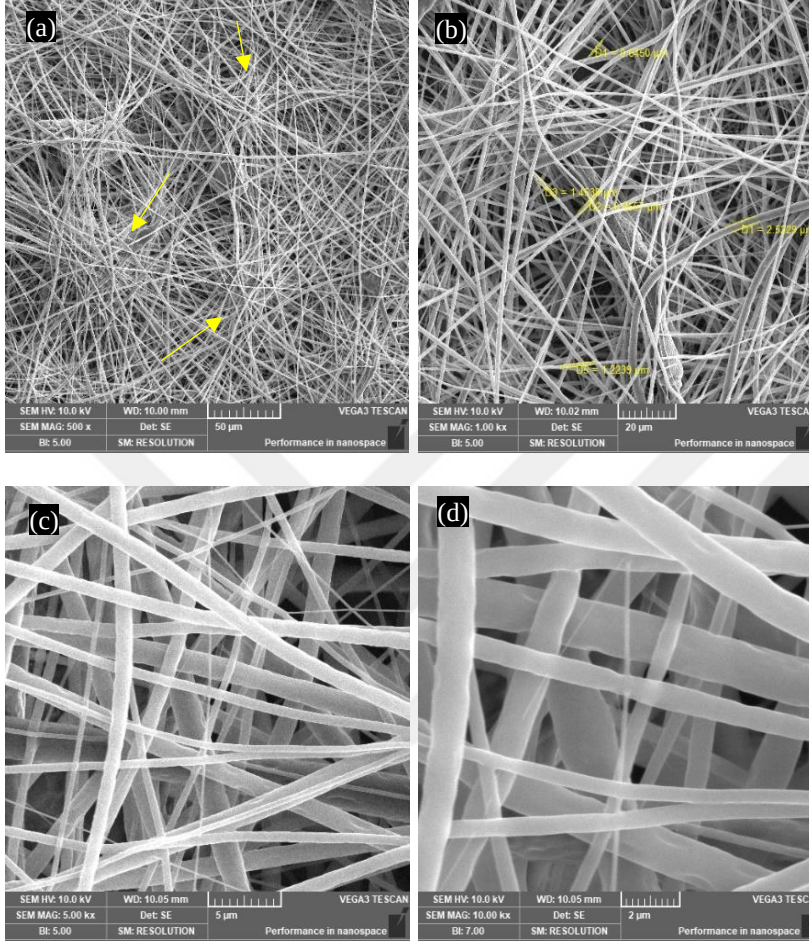
edilmektedir. Örnek-7'ye ait fiberlerin çaplarının ortalama $\Phi=1,6548 \mu\text{m}$ olduğu, fiber morfolojisinin değişmeden, bir önceki örnekte olduğu gibi, gözenek halinde girintili bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.



Resim 4.9: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin 3% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50 μm ; (b)20 μm ; (c) 5 μm ve (d) 2 μm

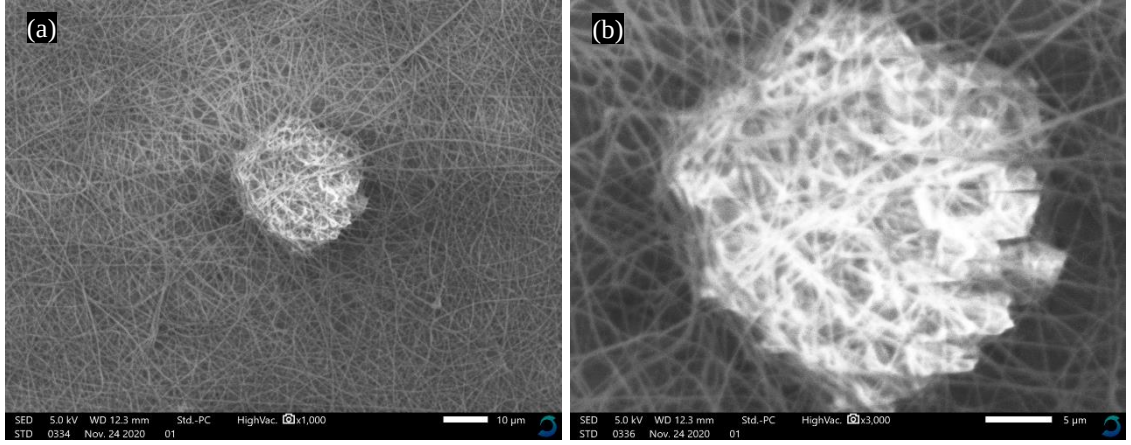
Son olarak, Örnek 8'de borik asit miktarı %3'ten %5'e çıkarılarak, Örnek-7 ile aynı parametrelerde elektroğirme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen fiberlere ait SEM görüntüleri (Resim 4.10) ve ilgili EDS analizi (Şekil 4.2) sunulmuştur. Resim 4.10(a) ve (b)'de, fiberler içerisine gömülü halde borik asit partikülleri olduğu düğümsü yapılar kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Üretilen fiberlerin çaplarının rastgele alınan beş ölçümünün ortalamasının $\Phi=1,3603 \mu\text{m}$ olduğu, ayrıca benzer şekilde nispeten homojen

boyutlarda fiber üretildiği anlaşılmaktadır. Bu parametrelerle üretilen fiberlerde boncuk (bead) şekilli fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür.

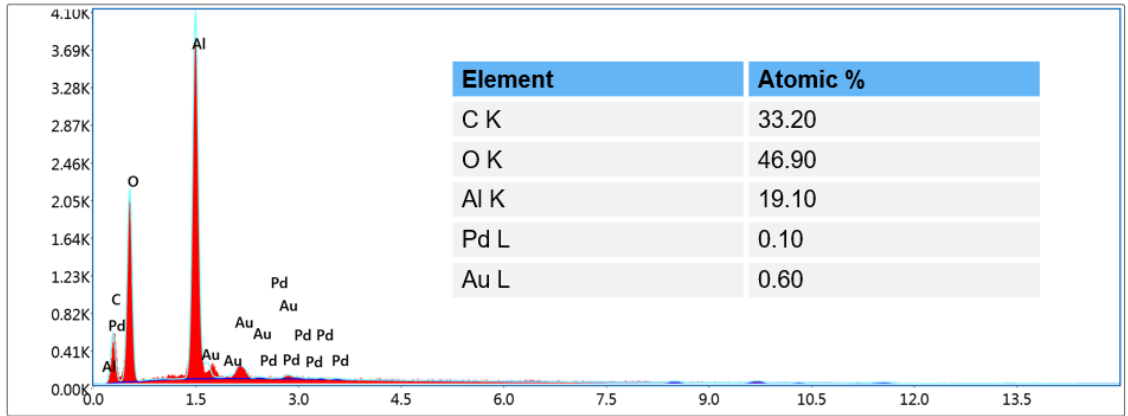


Resim 4.10: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin %5 oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 50µm; (b)20µm; (c) 5µm ve (d) 2µm

Borik asit partiküllerinin fiberler ile etkileşimini daha açık göstermek için tek bir parçacığa odaklanılarak elde edilen SEM görüntüleri Resim 4.11’de ayrıca sunulmuştur.



Resim 4.11: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partikülünün %5 oranında eklenmiş olduğu 10% PLCL çözeltisiyle elektroğrilmesi sonucunda fiberlerin partikül ile etkileşimini gösteren SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: (a) 10µm; (b) 5µm

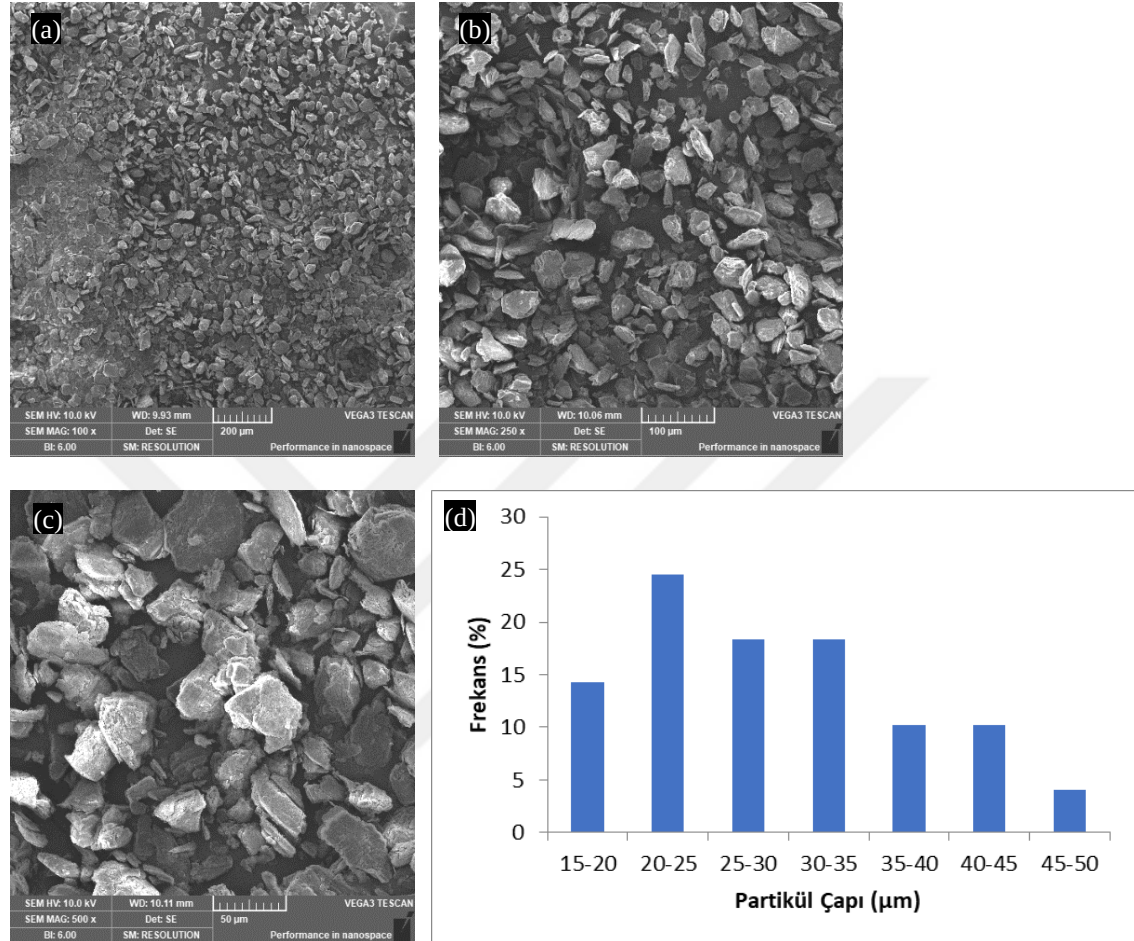


Şekil 4.2: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin 5% oranında eklenmiş olduğu %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden 10kV voltaj, 15cm mesafe ve 1,5 mL/saat akış hızı elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin EDS analizi

EDS analizlerinde ise (Şekil 4.2), yine borik asit miktarından bağımsız olarak bu teknik ile yapılan elemental analizin düşük atom ağırlıklı elementleri tespit etmedeki uyumsuzluğu sebebiyle borik asit piklerine rastlanmamıştır.

Borik asit partiküllerinin öğütüldükten ve 38 µm gözenek boyutlu elekten geçirildikten sonra incelenen SEM görüntüleri Resim 4.12(a-c)'de verilmiştir. Elde edilen görüntüler kullanılarak ve ücretsiz olarak temin edilen bir görüntü analizi programı olan

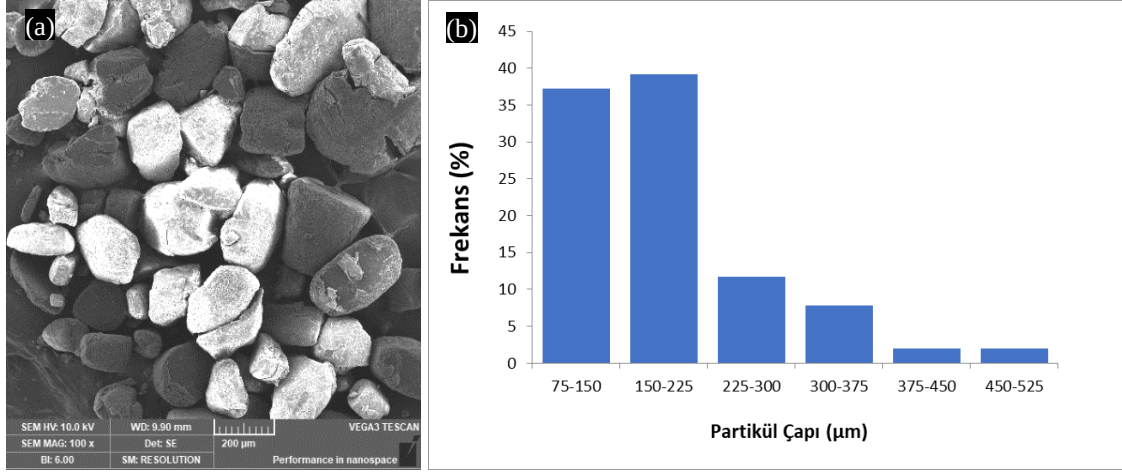
Image J’den faydalanılarak partikül boyutları ölçülmüştür. Elde edilen histogram Resim 4.12(d)’de sunulmuştur.



Resim 4.12: Öğütülmüş ve elenmiş (küçük çaplı) borik asit partiküllerinin SEM görüntüleri için gösterge çubukları: (a) 200µm; (b) 100µm; (c) 50µm ve (d) ImageJ programı ile analiz edilen partikül çapı dağılımını gösteren histogram

SEM analizinde Image J programı ile ortalama partikül boyutu 29,416µm (standart sapma $\pm$ 8,588µm) olarak hesaplanmıştır. Partiküllerin büyük çoğunluğunun (~%25) boyutu 20 ile 25µm aralığında kalmaktadır (Resim 4.12(d)). Elde edilen değerler, küçük partikül boyutlu borik asitlerin eklenmiş olduğu PLCL fiber örtülerdeki düğümsü yapıların içerisinde kalması ile uyumludur.

Büyük partiküllü öğütülmeden doğrudan kullanılan borik asit taneciklerinin de SEM görüntüleri alınmış ve karşılık gelen partikül boyut histogramı Resim 4.13’te verilmiştir.



Resim 4.13: Öğütülmemiş (büyük çaplı) borik asit partiküllerinin (a) SEM görüntüsü (Gösterge çubuğu: 200µm) ve (b) ImageJ programı ile analiz edilen partikül çapı dağılımını gösteren histogram

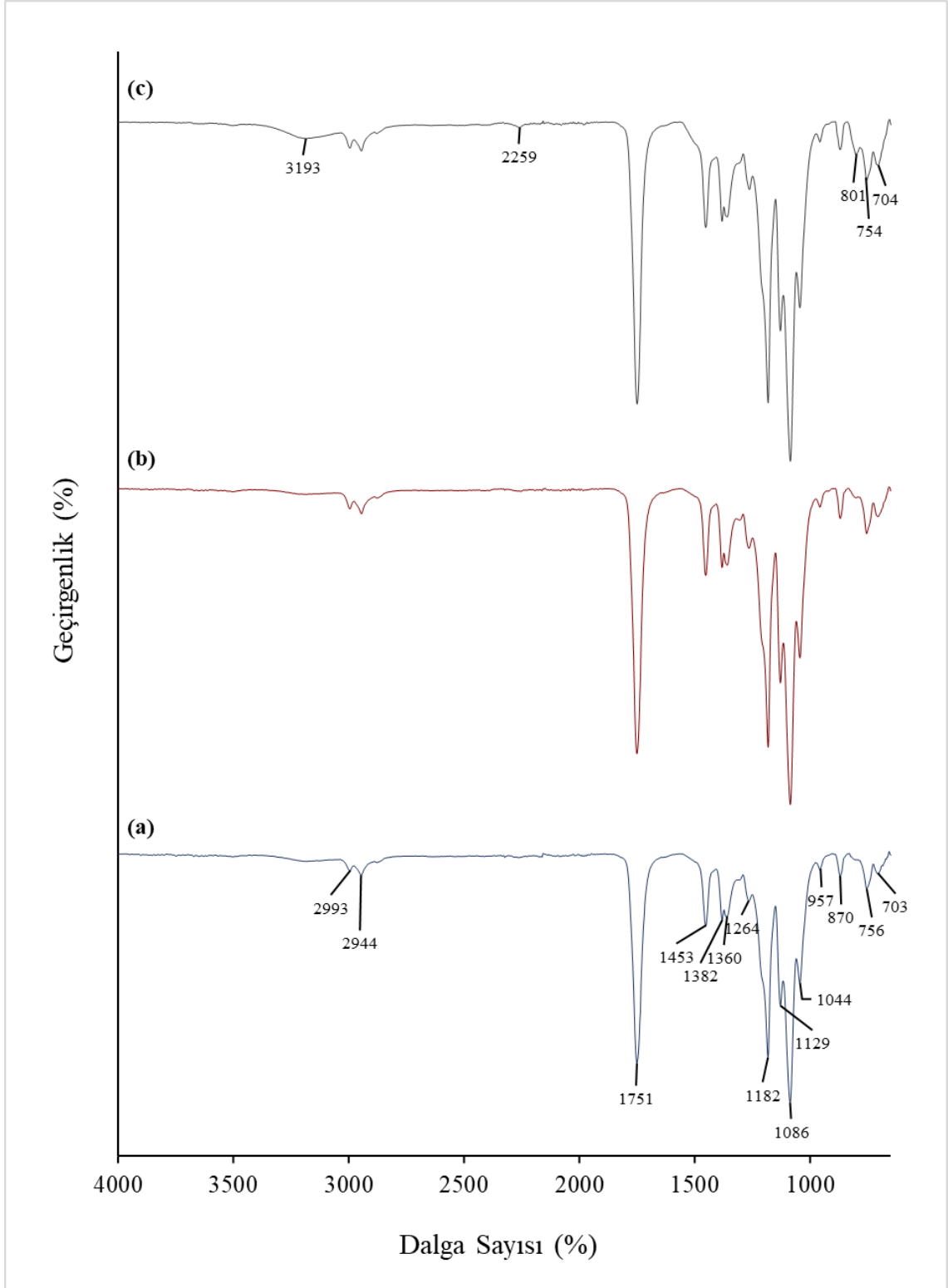
Öğütülmemiş, doğrudan kullanılan borik asit partiküllerin ortalama boyutu 191,56 µm (standart sapma $\pm 83,70\mu\text{m}$) olarak hesaplanmıştır. Partiküllerin büyük çoğunluğunun boyutu 225µm'den küçüktür (Resim 4.13(b)). Elde edilen değerler, büyük partikül boyutlu borik asitlerin eklenmiş olduğu PLCL fiber örtü içerisinde hapsolmuş düğümsü yapının SEM görüntüsü (Resim 7(a)) ile uyumludur.

4.3. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

Deri ikamelerindeki fonksiyonel grupların belirlenmesi için, saf PLCL ve farklı borik asit konsantrasyonuna sahip PLCL/borik asit kompozitleri FTIR spektrometresi kullanılarak karakterize edilmiştir. Ağırlıkça 3% ve 5% borik asit eklenmiş elektroeğrilmiş PLCL fiber deri ikamelerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmektedir ve ana bantlara ait kızılötesi dalga numarası (wavenumber) atamaları ve borik asidin ve PLCL'in normal titreşimlerinin açıklamaları Tablo 4.1'te verilmiştir.

Tablo 4.1: Borik asit ve PLCL için dalga numarası tanımlamaları

IR Bant	PLCL	PLCL-3% Borik Asit	PLCL-5% Borik Asit	Referans
O–H gerilmesi (H ₃ BO ₃ ’e ait)	-	3200	3193	(93,94)
C–H gerilme titreşimi	2944	2945	2945	(95)
O–H ve B–O gerilmeleri	-	-	2259	(96)
C=O (karbonil) gerilmesi	1751	1751	1750	(97)
CH ₂ bükülmesi	1453	1452	1452	(95,98)
B–O gerilmesi				(94)
CH ₂ deformasyon titreşimi (simetrik)	1382	1381	1381	(98)
C–O gerilme titreşimi (ester grubunda (–COO))	1182	1181	1182	(99–101)
C–O–C gerilme titreşimi	1128	1128	1128	(100)
C–O–C gerilme titreşimi	1086	1086	1085	(101)
B–OH bükülmesi	-	-	801	(102)



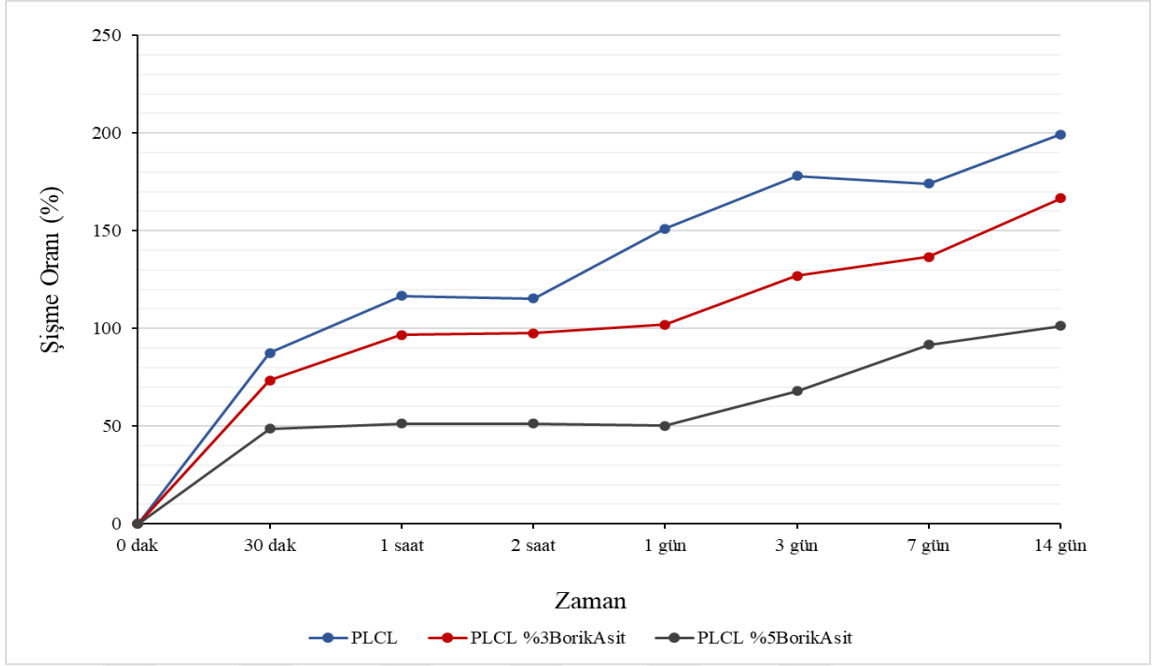
Şekil 4.3: Üretilen deri ikamelerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumları: (a) saf PLCL; (b) ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL; (c) ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL

Borik aside ait temel kızılötesi (IR) bantları 3200 cm^{-1} 'de O-H gerilimini (stretching, çok kuvvetli), 1450 cm^{-1} 'de B-O gerilimini (stretching, çok kuvvetli), ve 1190 cm^{-1} 'de B-O-H bükülme titreşimini (bending, kuvvetli), 824 cm^{-1} 'de O-H burulmasını (twisting, orta) (94) içerir. Yukarıdaki tabloda ifade edilen IR bantlarından deri ikamelerinin yapısında düşük konsantrasyonlarda (ağırlıkça %3 ve %5) eklenen borik aside ait moleküler bağların tespit edilebildiği görülmektedir. Ancak, örneğin 1190 cm^{-1} 'de B-O-H bükülme titreşimi gibi bazı bantlar PLCL'e ait bantlarla perdelenmiştir. Diğer yandan, örneğin 801 cm^{-1} 'de olduğu gibi borik asit ilavesinden dolayı meydana gelen yeni bantlar tespit edilmiştir. Ayrıca, 1450 cm^{-1} 'de B-O gerilimi ile 1453 cm^{-1} 'de CH_2 bükülmesi üst üste geldiğinden yapısında borik asit içeren deri ikamelerinde bu banda ait geçirgenlik şiddeti (intensity) artmıştır. Buna ek olarak, beklendiği gibi ağırlıkça %5 borik asit içeren deri ikamelerinde %3 borik asit içeren örneklerle kıyasla borik aside ait bantların daha keskin olduğu gözlemlenmiştir.

4.4. DERİ İKAMELERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME VE BOZUNMA DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ

Üretilen deri ikamelerine ait saf PLCL ve borik asit/PLCL kompozit numunelerinin 37°C 'de sabit tutulan PBS (pH = 7.3) içerisinde şişme yüzdeleri aşağıdaki grafikte verilmiştir. Kuru ağırlıklarına göre yüzde şişme hesaplandığından, grafikte deneyin başlatıldığı ilk anda (0. dakikada) şişme oranı sıfırdan başlamaktadır.

Borik asit ilave edilmiş PLCL fiber ağı yapısındaki deri ikamelerinin, sulu ortamda şişme oranlarının, saf PLCL örneklerle göre daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.4). Şişme oranındaki bu düşüş borik asit miktarı arttıkça düşmüştür. PBS içerisinde 24 saatin sonunda en yüksek şişme oranı %151 ile PLCL örneklerde kaydedilmiştir. Ancak, deney süresince örneklerin bozunması sebebiyle ortaya çıkabilecek önemli bir ağırlık kaybı görülmemiş ve örnekler deneyin sonuna kadar (14 gün boyunca) su alımı nedeniyle ağırlık kazanmaya devam etmiştir. Bu sebeple bozunma yerine şişme oranıyla ifade edilen ağırlık kazancı, 14. gün sonunda en çok saf PLCL örneklerde (%200) görülmüştür. Ancak kompozit örneklerde de deney sonuna kadar şişme davranışı devam etmiş olup, son şişme verileri %3 borik asit ve %5 borik asit katkılı PLCL deri ikamelerinde sırasıyla %167 ve %101 oranında ölçülmüştür.

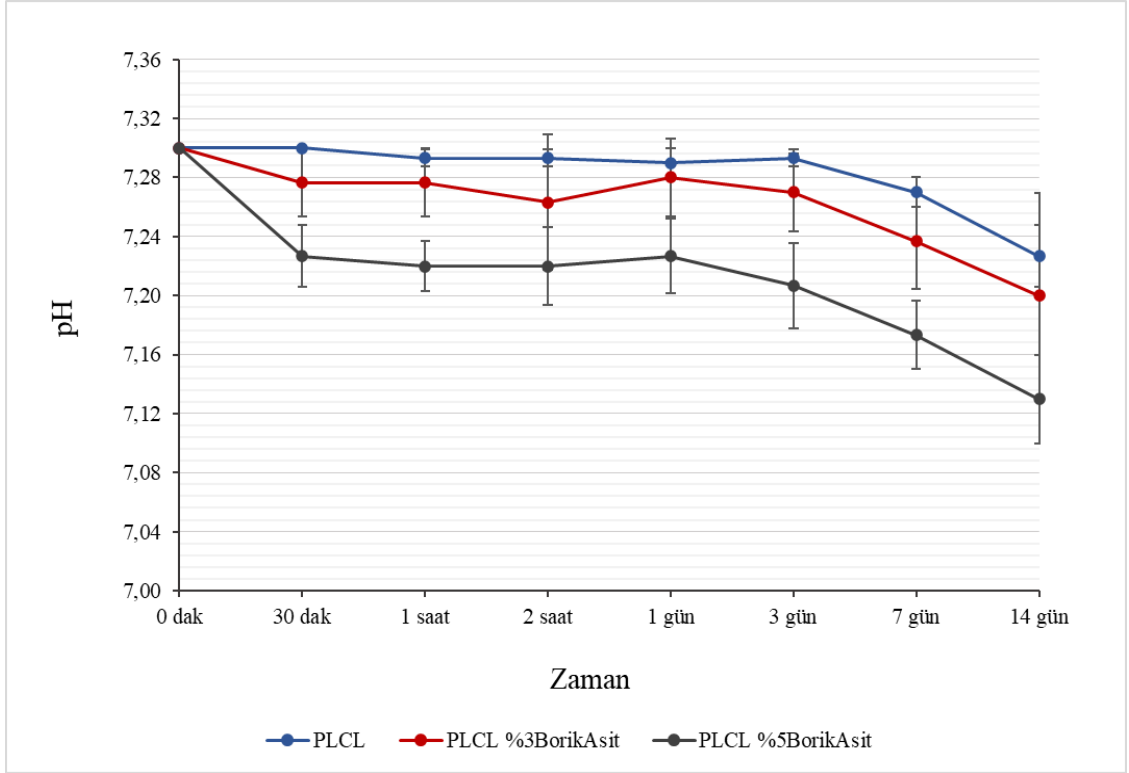


Şekil 4.4: Üretilen deri ikamelerinin PBS içerisinde 14 güne kadar şişme oranları: saf PLCL (mavi), ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL (kırmızı) ve ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL (siyah)

4.5. BORİK ASİT SALIMINA BAĞLI PH DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Üretilen deri ikamelerine ait saf PLCL ve borik asit/PLCL kompozit numunelerin 37°C’de sabit tutulan PBS (pH = 7.3) içerisinde zamanla neden oldukları pH değişimine ait grafik aşağıda (Şekil 4.5) verilmiştir.

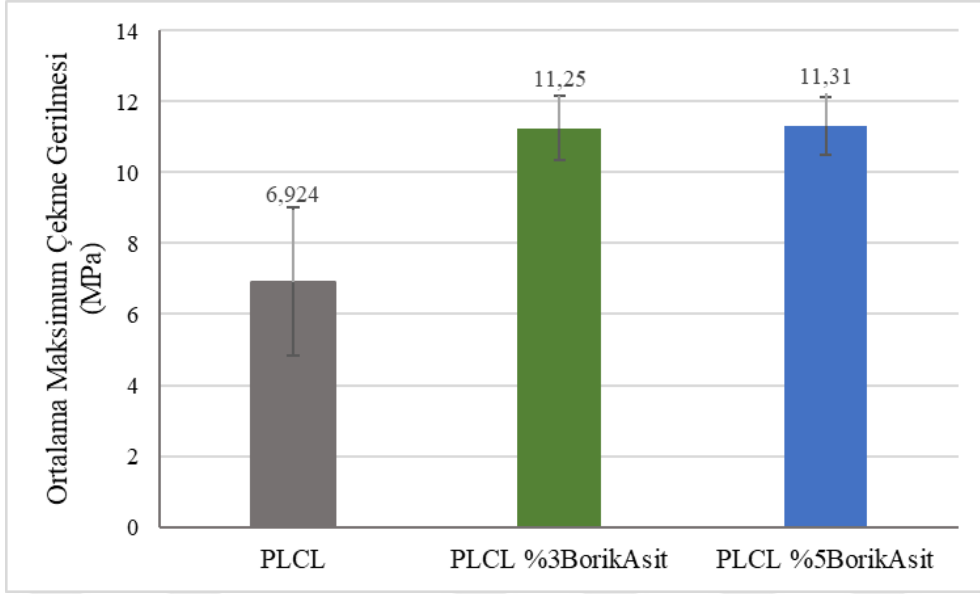
Üretilen deri ikamelerinin PBS içerisinde oluşturdukları pH değişiminin takip edildiği 14 gün boyunca genel olarak zamanla pH’ın düşüşü gözlemlenmiştir. Bununla beraber, tüm örnekler için pH değişimi fizyolojik sınırlar içerisinde kalmıştır. Deney sonuçlandırıldığında ölçülen en düşük pH değeri 7,13 ile ağırlıkça %5 borik asit içeren kompozit deri ikamesine aittir.



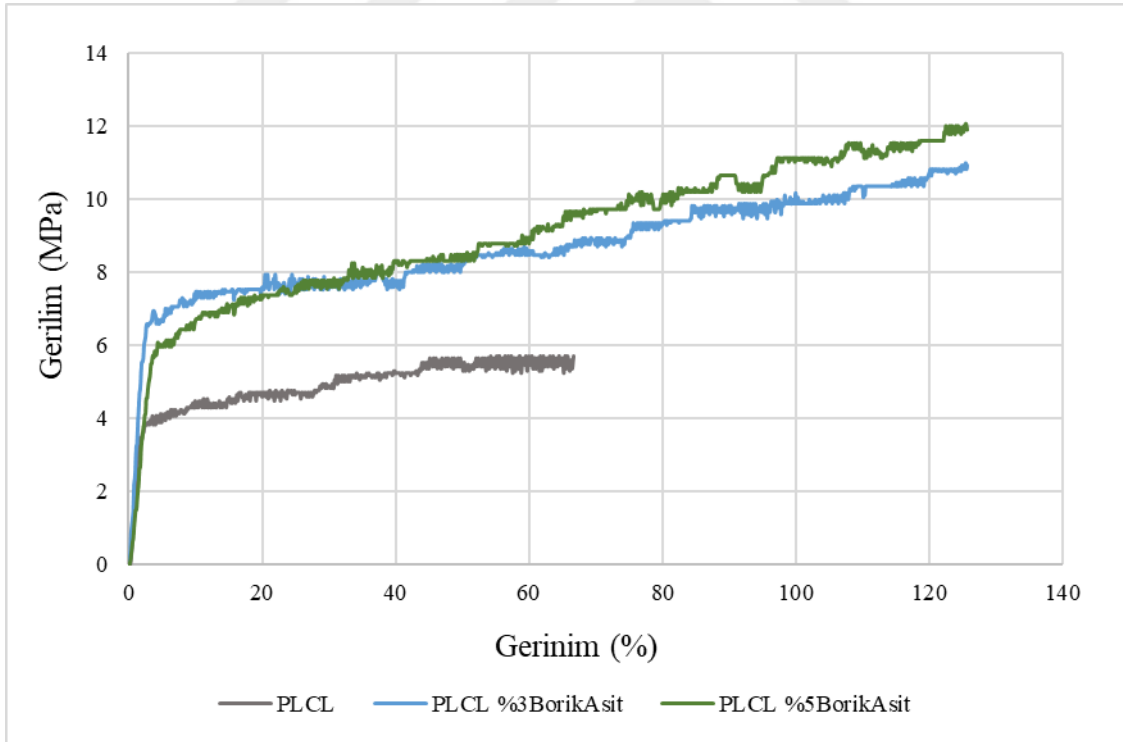
Şekil 4.5: Üretilen deri ikamelerinin 14 gün boyunca PBS içerisinde meydana getirmiş oldukları pH değişimleri: saf PLCL (mavi), ağırlıkça %3 oranında borik asit eklenmiş PLCL (kırmızı) ve ağırlıkça %5 oranında borik asit eklenmiş PLCL (siyah). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3)

4.6. DERİ İKAMELERİNİN MEKANİK DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ

Deri ikamelerinin çekme kuvveti altında mekanik davranışlarının belirlenmesi için çekme testi uygulanmıştır. Örneklerin çekme testinde gösterdikleri ortalama yüksek çekme gerilmesi ve her gruptan birer örneğin karşılaştırmalı gerilim/gerinim grafikleri sırasıyla aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) sunulmuştur.



Şekil 4.6: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız saf PLCL örneklerin ortalama maksimum çekme gerilmesi değerleri. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=4)



Şekil 4.7: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız saf PLCL fiber yapıdaki örneklerin karşılaştırmalı gerilim/gerinim grafiği

Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL numunelerinin her birinden en az 4 örnek olacak şekilde çekme deneyi yapılmıştır. Çekme deneyi sonucunda elde edilen en yüksek çekme dayanımını gösteren maksimum çekme gerilmelerinin ortalama değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6). Borik katkısız PLCL fiber numunelerinin geriliminin en küçük olduğu görülmüştür. Ağırlıkça %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL fiber yapıların ise birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca borik asit katkısız PLCL numunelerin çekme deneyi sırasında hepsi kopmuş ancak %5 borik asit katkılı PLCL fiber numuneler ise deney limitleri içerisinde tam olarak kopmamıştır ve uygulanan kuvvete dayanmışlardır. PLCL fiber yapıdaki deri ikamelerine borik asit partiküllerinin eklenmesiyle daha fazla çekme kuvvetine dayandığı ve gerinme değerlerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

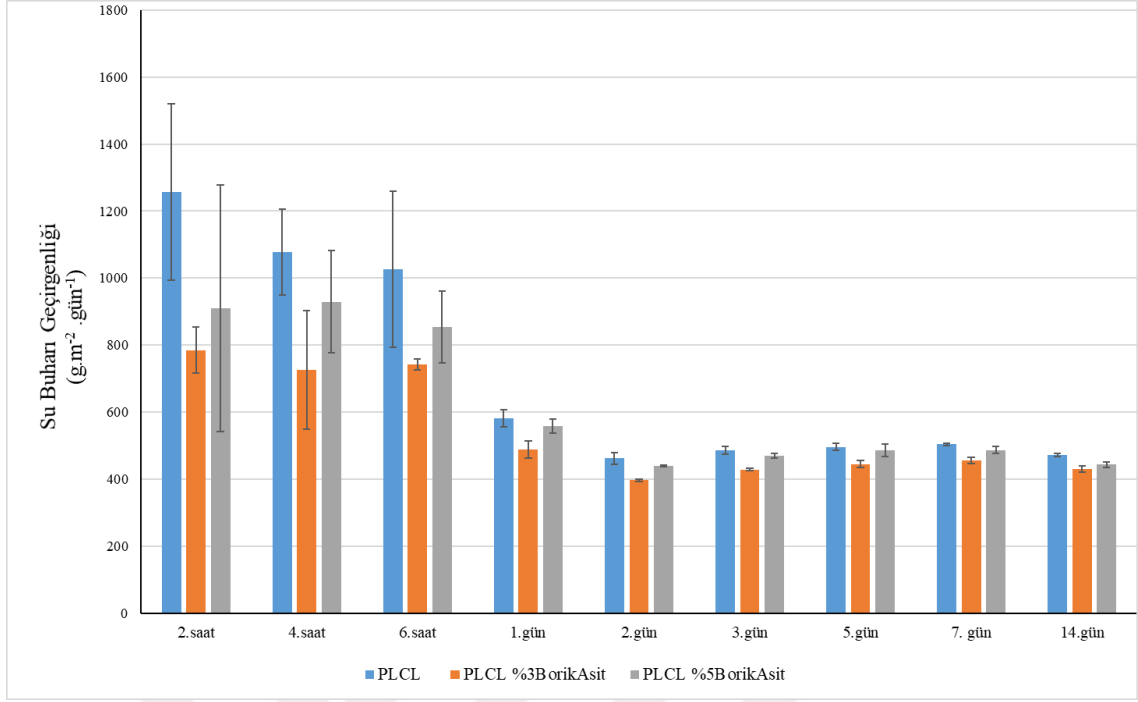
4.7. DERİ İKAMELERİNİN SU BUHARI VE OKSİJEN GEÇİRGENLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Üretilen deri ikamelerinin su buharı geçirgenlik özellikleri araştırılmıştır. Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL fiber örtülerin üzerinde bulunduğu kapların kaybettikleri su miktarları gravimetrik olarak takip edilmiştir. Su buharı geçirgenlik deneyinde fiber örtülerin alanları aynı ve çapları 2,3 cm olacak şekilde hazırlanmıştır. SBGO su buharı geçirgenlik oranını ifade etmektedir ve aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır. Burada, Δm = değişen ağırlık ve A = fiberlerin alanıdır.

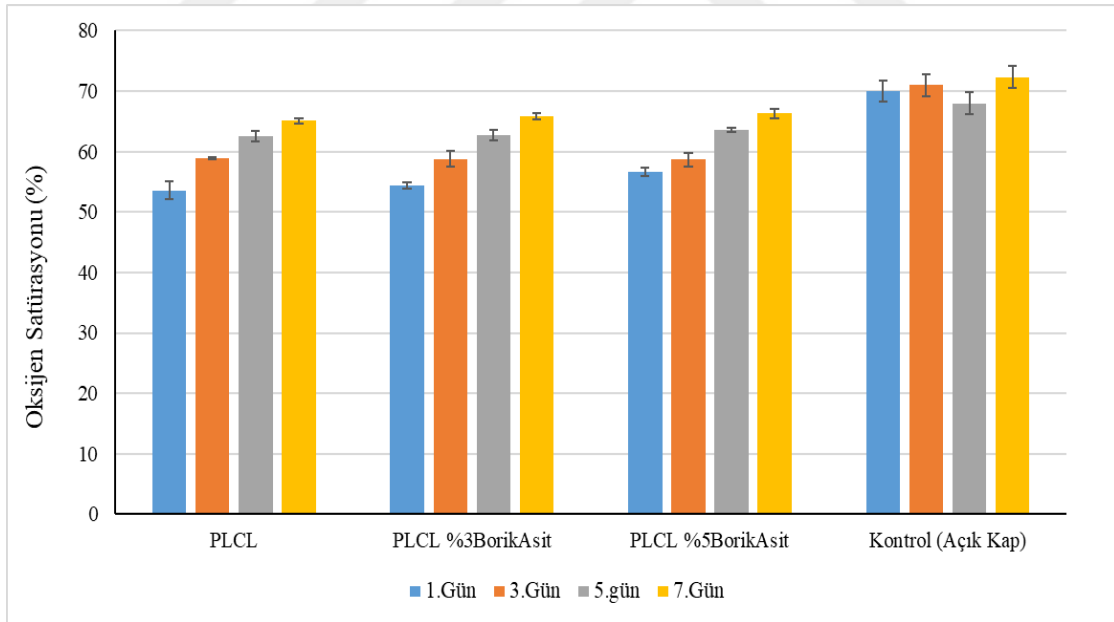
$$SBGO(g.m^{-2}.gün^{-1}) = \frac{\Delta m}{A \times \Delta zaman}$$

Üretilen deri ikamelerinin 14 gün boyunca su buharı geçirgenlik oranları ($g.m^{-2}.gün^{-1}$) aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 4.8).

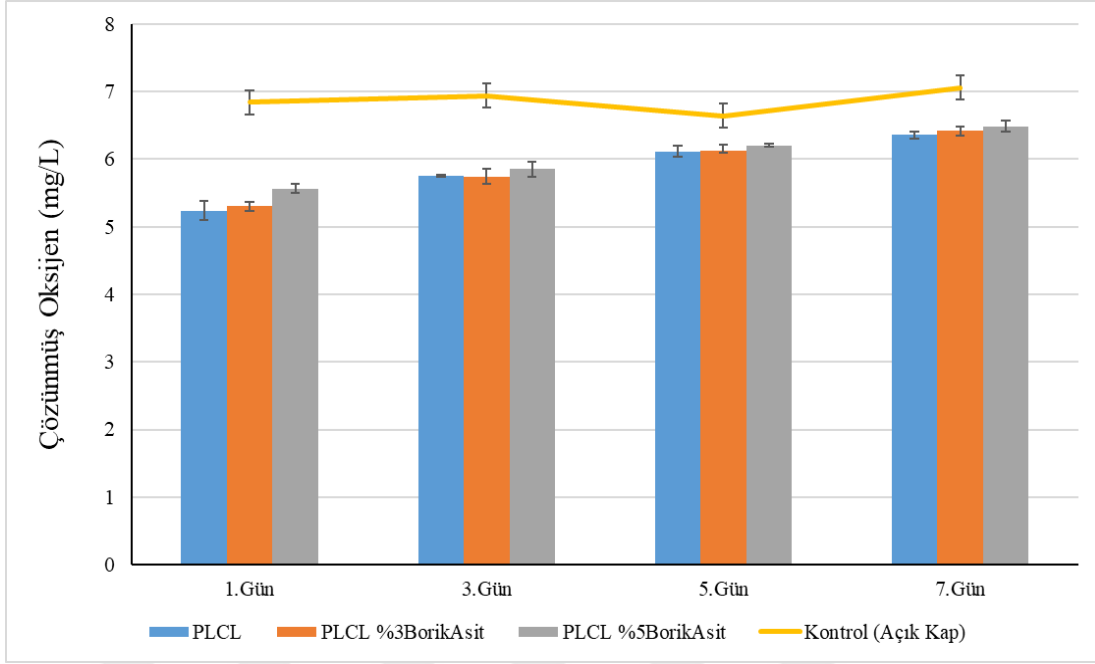
Oksijen geçirgenlik deneyi ile deri ikamelerinin ve kontrol gruplarının oksijen geçirgenlikleri yüzde satürasyon (doymuşluk) olarak oksijen metre ile ölçülmüştür (Şekil 4.9). Satürasyon değerleri daha sonra mg/L olarak çevrilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.8: Fiber yapıdaki deri ikamelerinin 14 gün boyunca su buharı geçirgenlik oranları ($\text{g.m}^{-2}.\text{gün}^{-1}$). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir ($n=3$)



Şekil 4.9: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL ve kontrol grubunun oksijen satürasyon yüzdeleri. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir ($n=3$)



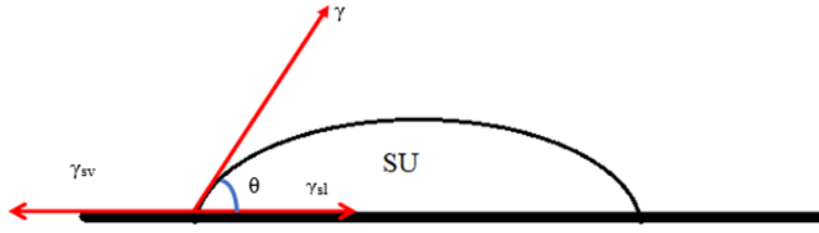
Şekil 4.10: Borik asit katkılı ve saf PLCL deri ikamelerinin oksijen geçirgenliğini gösteren suda çözünmüş oksijen miktarı (mg/L). Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir (n=3)

4.8. YÜZEY TEMAS AÇISI ÖLÇÜMÜ

Bir katı yüzey ile yüzeydeki bir sıvı damlası arasındaki temas açısı ölçülebilir. Daha düşük temas açısı değeri, malzemenin hidrofilik doğasını, yani su moleküllerinin alt tabakaya yüksek afinitesini belirtir. Hidrofilik kelimenin tam anlamıyla "su seven" anlamına gelir ve bu tür malzemeler, aktif polar fonksiyonel grupların varlığından dolayı su moleküllerini kolayca adsorbe eder (103). Daha yüksek temas açısı, yüzeyin hidrofobik doğasını gösterir. Bu özelliğe sahip hidrofobik malzemeler, hidrofilik malzemelere kıyasla su etkileşimine zıt tepkiye sahiptir. Hidrofobik malzemeler "suyu iten" yapıda olup suyla çok az etkileşime girme eğilimi gösterir veya hiç yoktur ve su yüzeylerinde "boncuklanma" eğilimi gösterir (103). Temas açısının ölçülmesi ilk olarak Thomas Young tarafından tanımlanmıştır (104). Temas açısı üç denge ara yüzey gerilimine enerjinin dengeli bir yaklaşımıdır ve denklem Young denklemi olarak türetilir ve şu şekilde verilir:

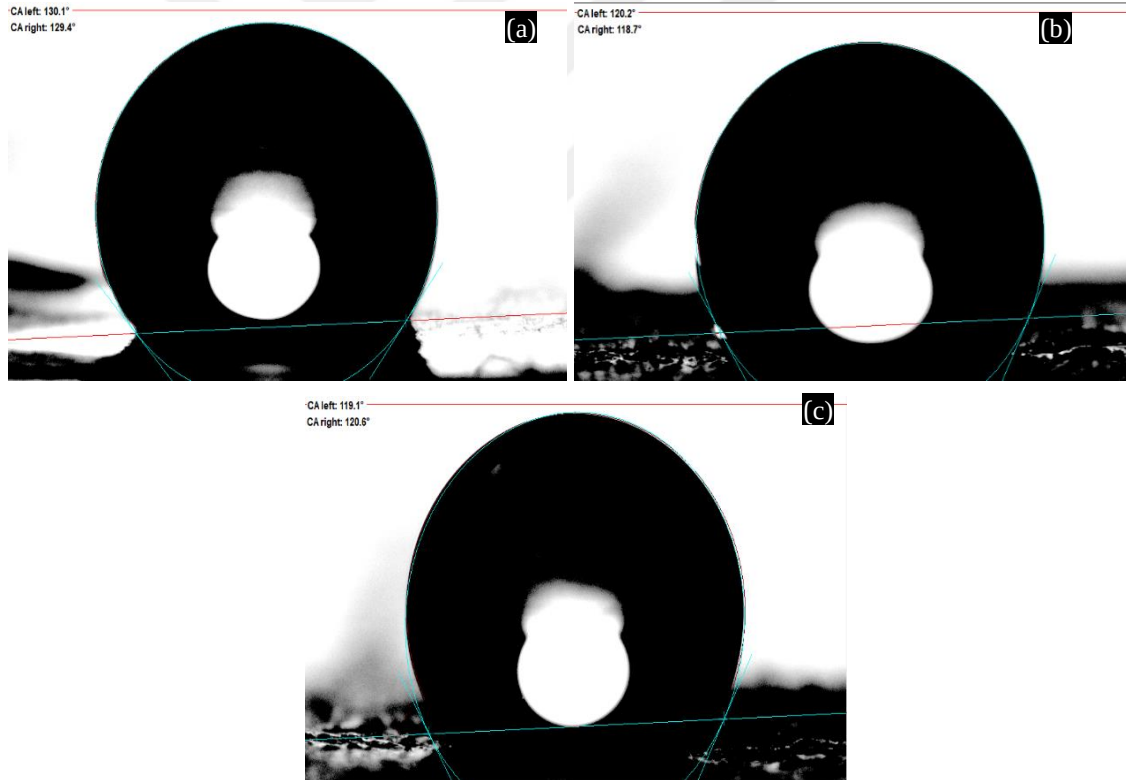
$$\cos\theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma$$

γ buhar ve sıvı arayüzey enerjisini, γ_{sl} katı sıvı arayüzey enerjisini ve γ_{sv} katı buhar ve katı sıvı arayüzey enerjisini ifade eder (103) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Young denklemi şematik açıklaması

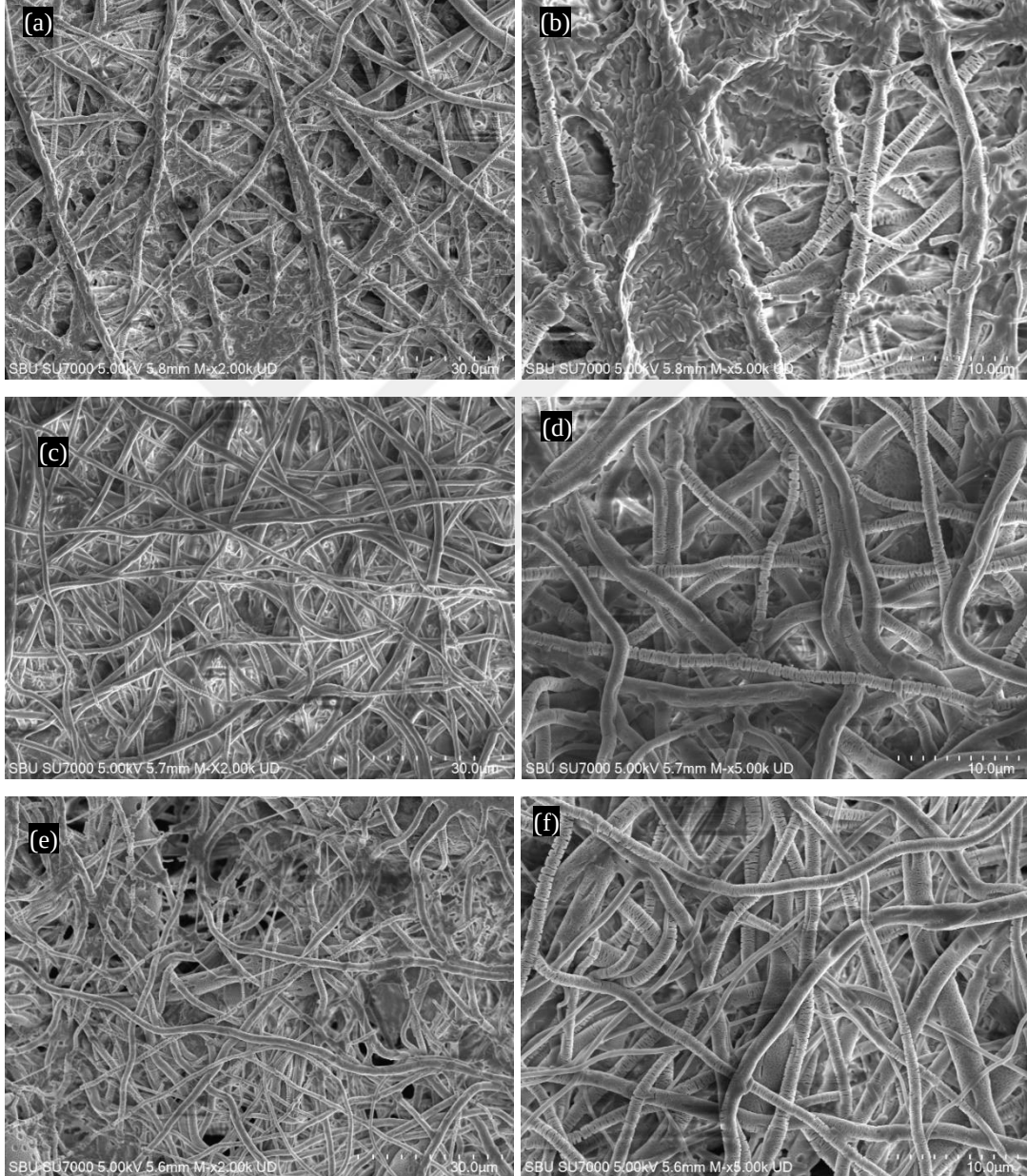
Bu tez çalışmasında, temas açıları numune yüzeyine dikey olarak bir saf su damlası bırakılması ile optik alt sistem kullanılarak bir temas açısı gonyometre ile ölçülmüştür. Borik asit katkısız PLCL fiber örtüler 130,1°; %3 borik asit katkılı PLCL fiber örtüler 120,2° ve %5 borik asit katkılı PLCL fiber örtüler 119,1° olarak ölçülmüştür (Resim 4.14).



Resim 4.14: Deri ikamelerin su ile yüzey temas açısı ölçümü deneyi görüntüleri: a) borik asit eklenmemiş; b) %3 borik asit eklenmiş; c) %5 borik asit eklenmiş PLCL fiber deri ikameleri

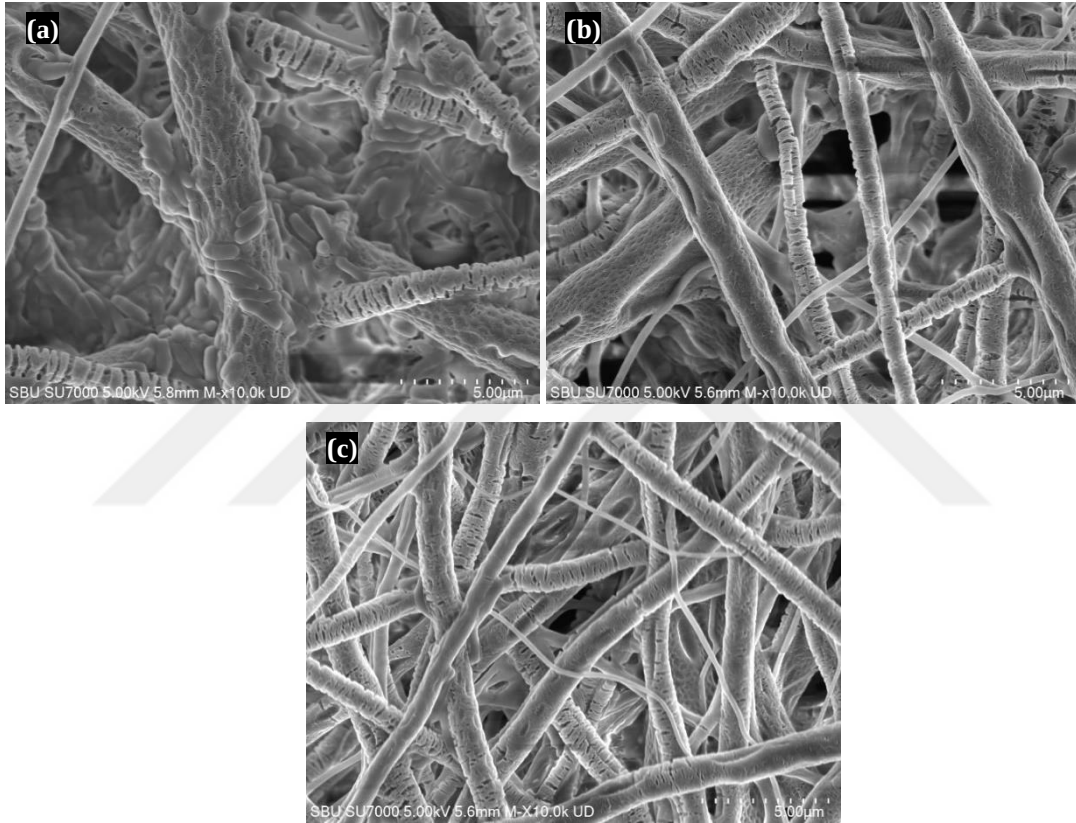
4.9. ANTİBAKTERİYELLİK ANALİZİ

PLCL deri ikameleri antibakteriyellik analizi yapıldıktan sonra SEM ile incelenmiş ve mikrografları çekilmiştir (Resim 4.15). *E. coli* bakterilerin fiberlerin üzerindeki çoğalması ve yayılımı incelenmiştir. Fiberlerin fiksasyon prosedürü ve numune kurutma şartları nedeniyle bir miktar bozunma sonucu yer yer parçalı yapıda olduğu görülmektedir.



Resim 4.15: *E. coli* bakterilerinin fiber yapılı deri ikameleri üzerinde kültürlenmesinden sonra SEM sonra SEM görüntüleri: a ve b) saf PLCL; c ve d) %3 borik asitli PLCL; e ve f) %5 borik asitli PLCL. Gösterge çubukları a,c ve e) 30µm ve b, d ve f) 10µm

Resim 4.15(b)'de saf PLCL üzerinde, silindirik çubuklar şeklindeki *E. coli* bakterisinin yoğun üremiş olduğu alan açıkça görülürken, %3 ve %5 borik asitli PLCL yüzeylerin taraması sırasında numunelerin yüzeylerinde nadiren bakteri hücrelerine rastlanmıştır. Saf PLCL üzerinde yoğunlaşan *E. coli* sayısı ve fiberler üzerindeki tutunumu daha iyi gösterebilmek için aşağıda daha yüksek büyütmede SEM görüntüleri (Resim 4.16) verilmiştir. Özellikle %5 borik asitli PLCL üzerinde nadiren tek tek bakteri hücrelerine rastlanabilmektedir.

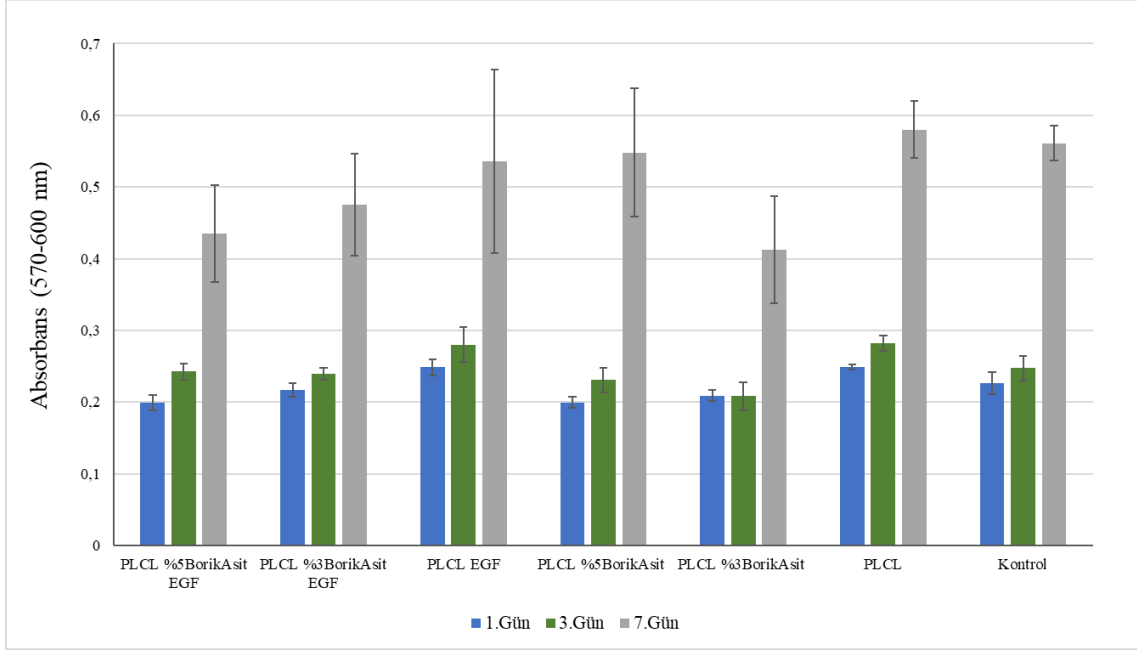


Resim 4.16: *E. coli* bakterilerinin deri ikameleri üzerinde kültürlenmesinden sonra yüksek büyütmede SEM görüntüleri: a) saf PLCL; b) %3 borik asitli PLCL; c) %5 borik asitli PLCL. Gösterge çubukları: 5µm

4.10. HÜCRE CANLILIĞI ANALİZİ

Hücre canlılığı ve hücre sayımı yapmak için 1,3 ve 7. günlerde PrestoBlue %10 oranında kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı için 570 absorbans değeri hücre sayımı için 600 absorbans değeri ise referans olarak kullanılmıştır. Sonuçlar grafik halinde gösterilmiştir (Şekil 4.12).

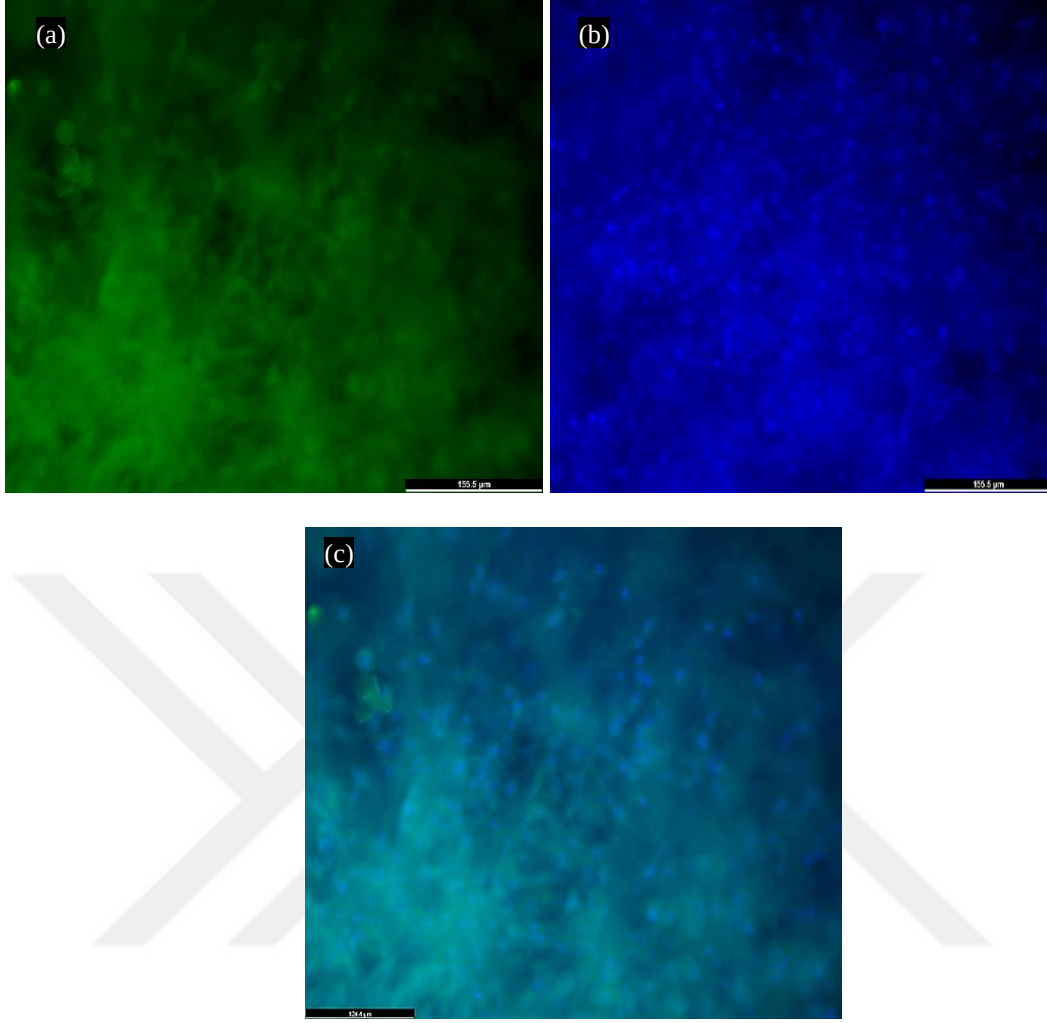
Mikroplaka okuyucudan elde edilen absorbans değerlerinin gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığının belirlenmesi için tek-yönlü ANOVA analizi yapıldıktan sonra kontrol grubuna göre farkları belirlemek için t-test yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.12: Ağırlıkça %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL, borik katkısız PLCL ve kontrol grubunun 1., 3., ve 7. günün sonundaki PrestoBlue testi ile ölçülen absorbans (570-600 nm) değerleri. Hata çubukları değerlerin $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir (n=4)

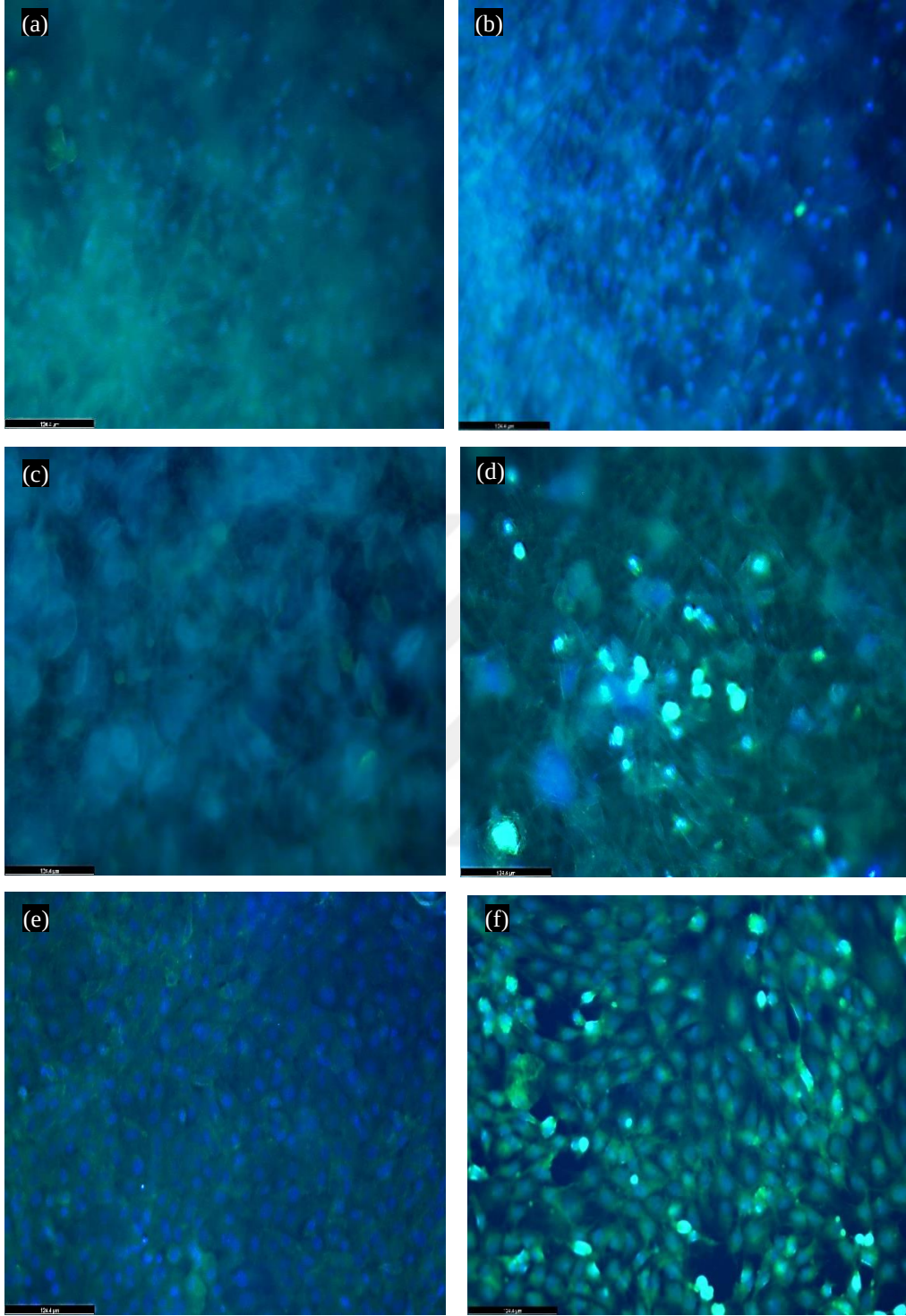
Elde edilen sonuçlara göre, tüm gruplarda hücre canlılığı açısından 1. günden 7. güne artış gözlemlenmiş olup, aynı zaman noktası için (aynı günlerde) test grupları ile kontrol arasında hücre canlılığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hücre kültür kuyucuklarına ekilen kontrol grubundaki canlılık değerleri tüm gruplar için (EGF eklenmesine gerek kalmaksızın) borik asit varlığından olumsuz etkilenmemiş ve antibakteriyel özelliğin yanı sıra mekanik özellikte artış sağlayan borik asidin hücre canlılığı üzerinde olumsuz hiçbir etkisi görülmemiş, kontrol grubu ile aynı sonuçlara yakın sonuçlar vermiştir.

Hücre kültüründe 7. günden sonra hücre iskeleti FITC-phalloidin ve hücre çekirdeği DAPI ile boyanan farklı numunelerin üzerindeki hücrelere ait floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.17 ve Resim 4.18’de sunulmuştur.



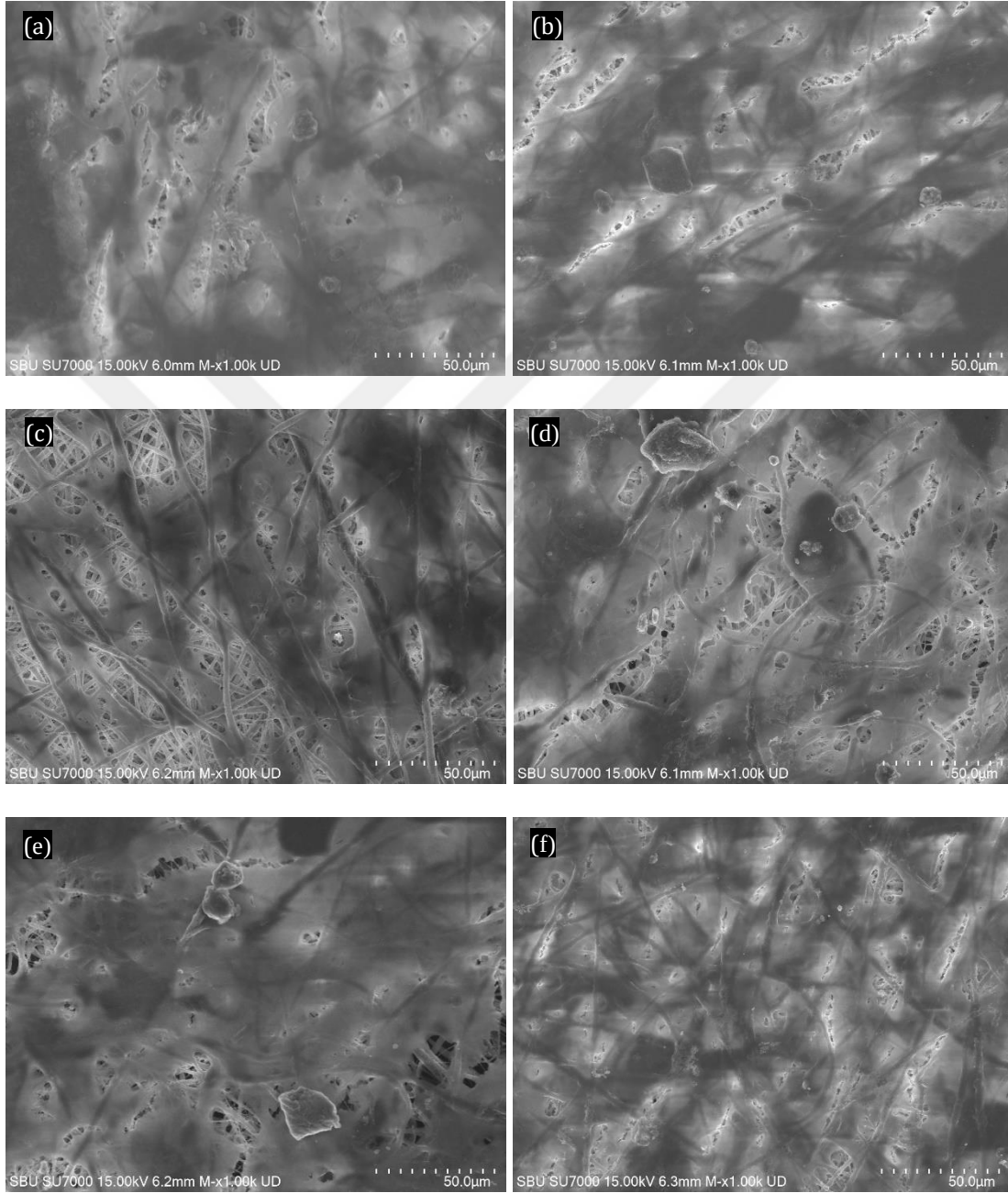
Resim 4.17: EGF içeren ve ağırlıkça %5 borik asitli PLCL örneklerin üzerinde 7 gün kültürlenmiş fibroblast hücrelerinin floresans mikroskop görüntüleri: a) FITC-phalloidin görüntüsü; b) DAPI görüntüsü c) FITC-phalloidin ve DAPI birlikte görüntüsü. Gösterge çubukları (a ve b)155,5 µm ve c)124,4 µm

%5 Borik asit katkılı EGF fiberlerdeki hücreleri tespit etmek için uygulanan FITC-phalloidin ve DAPI boyalarının ayrı ayrı ve birleştirilmiş görüntüsü yukarıda verilmiştir. Hücrelerin 7 günlük kültür süresi sonunda borik asidin yüksek konsantrasyonda varlığına rağmen yoğun şekilde çoğaldıkları PrestoBlue sonuçları ile uyumlu olarak gösterilmiştir. EGF eklenmiş ve eklenmemiş %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL fiberler üzerine ekilen hücrelerin floresans mikroskop görüntülerinin tamamında yaygın hücre popülasyonu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu oluşturmak üzere 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilen hücrelerin de floresans mikroskobu görüntülerinden 7. günde konfluense ulaştığı görülmüştür.



Resim 4.18: Hücrelerin kültür ortamında 7. günden sonra FITC-phalloidin ve DAPI ile işaretlenmiş floresan mikroskobu görüntüleri: a) EGF’li %5 Borik Asitli PLCL; b) EGF’li %3 borik asitli PLCL; c) %5 borik asitli PLCL; d) %3 borik asitli PLCL; e) saf PLCL ve f) hücre kültür plakası. Gösterge çubukları: 124,4 μm

Hücrelerin numuneler üzerinde 7 günlük inkübasyonunu takiben gluteraldehit ile fiksasyondan sonra SEM görüntüleri aşağıda (Resim 4.19) verilmiştir. Hücrelerin tüm yüzeyleri yoğun şekilde kaplanmış olması sebebiyle alttaki fiber yapı örtülü olarak görünmektedir.



Resim 4.19: Hücrelerin örnekler üzerinde 7 günlük kültür sonrası SEM görüntüleri: a) EGF’li ve %5 borik asitli PLCL; b) EGF’li ve %3 borik asitli PLCL; c) EGF’li PLCL; d) %5 borik asitli PLCL; e) %3 borik asitli PLCL; ve f) saf PLCL. Gösterge çubukları 50µm

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, deri doku mühendisliği uygulamaları için anti-bakteriyel özellikli bir deri ikamesi imal etmek amacıyla elektroeğrilmiş PLCL/borik asit kompozit biyomalzemenin özellikleri analiz edilmiştir. PLCL, hem yara kapatma hem de ortopedik uygulamalar için FDA tarafından onaylanan sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilir (biyobozunur) bir kopolimerdir (76). Sertlik ve kırılmalığa sahip biyolojik olarak bozunabilir çoğu polimerden farklı olarak, laktit ve ϵ -kaprolaktonun rasgele ko-polyesteri olan PLCL benzersiz elastikiyete sahiptir (105). Ayrıca PLCL kopolimeri, fiziksel olarak çapraz bağlı yapısında kauçuk benzeri (rubbery) bir esneklik sergileyen ve ayrıca monomer içeriğinin oranları değiştirilerek kontrol edilebilen mekanik özelliklere sahip olduğu bilinen kendine has bir biyomalzemedir (106). Diğer yandan elektroeğrilmiş mikro ve nano-fiberler, doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebilen gözenekli yapıya sahip olduklarından, doku mühendisliği iskeleleri olarak kullanılmaya başlandıkça daha fazla ilgi görmüştür. Elektroeğirme teknolojisini kullanarak, PLCL fiber yapıdaki membranlara dönüştürülebilmektedir. Bu projede, yara alanlarında sıkça görülen *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı etkili olduğu bilinen (107) bir anti-bakteriyel ajan olan borik asit, PLCL ile kompozit halinde, elektroeğrilmiş gözenekli yapıdaki deri ikamelerinin yapısına eklenmiştir. Bu proje ayrıca borik asit partiküllerinin bir biyobozunur polimerle elektroeğrilmiş gözenekli yapı oluşturmak üzere kullanıldığı literatürdeki bilinen ilk doku mühendisliği uygulamasıdır.

Bu tez çalışması kapsamında, yalnızca kloroform içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden üretilen fiberlerin oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu, gözenek çaplarının da yaklaşık 1 μm 'den küçük olduğu gözlemlenmiştir. Elektroeğirme yöntemiyle gözenekli (porlu) fiber üretimi araştırmacıların özellikle yüzey özelliklerinin hücre yapışması üzerine olumlu etkileri yüzünden çalışmalarını yönlendirdiği önemli konulardan birisidir. Ayrıca gözenekli fiberler, oluşturdukları yapıların içerisinde aktif maddelerin veya katalizörler gibi çeşitli bileşenlerin kapsüllenmesi için uygun olmalarını sağlamaları sebebiyle önemli ölçüde ilgi konusudur (108). Çözücü olarak yalnızca kloroform kullanılan PLCL çözeltilerinde verilen elektroeğirme parametreleriyle oluşturulan bu yapı oldukça ilgi çekicidir. Elektroeğirme yöntemi ile gözenekli fiber elde edebilmek için, polimer karışımlarının

birlikte elektroğrilmesi ve daha sonra polimerlerden birinin çıkarılması, fiberlerin bir banyo içerisinde toplanması (etanol banyosu gibi) ve çeşitli katkı maddelerinin kullanılması gibi çok çeşitli yöntemler çalışılmıştır (109). Burada kullanılan parametrelerle, bu yöntemlere ihtiyaç duyulmadan basit ve etkin bir şekilde gözenekli PLCL fiber örtüler üretildiği görülmektedir.

Elektroğirme işlemi sırasında oluşturulan fiberlerin morfolojisini etkileyebilecek elektrik alan kuvveti uygulanan gerilime (voltaj) bağlıdır. Uygulanan voltaj, elektroğirme jeti üzerindeki yüzey yükünü sağlar. Dolayısıyla, jetin kararsızlığı ve gerilmesi, uygulanan voltajın artırılmasıyla artar ve genellikle daha düşük fiber çaplarına yol açar. Ancak, fiber çapı ile gerilim arasındaki korelasyonunun çoğunlukla belirsiz olduğu raporlanmaktadır (110). Bu çalışmada, ağırlıkça kloroform içerisinde 10% PLCL'den hazırlanan çözeltinin elektroğrilmesi sürecinde mesafe ve akış hızı sabit tutularak, voltajın 10 kV'den 8 kV'ye düşürülmesinin fiber çapı ve morfolojisinde önemli bir değişim yaratmadığı görülmüştür (Resim 4.2 ve Resim 4.4).

Ayrıca, elektroğirme işleminde, polimer çözeltisi jeti, iğneden toplayıcı plakaya hareket ettiğinde, çözücünün (veya çözücülerin) buharlaşması ile katılaşır ve katılaşmış jet, bir nanofiber haline gelir. Elektroğirme sırasındaki çözücü buharlaşması, yalnızca şu koşullar sağlandığı zaman meydana gelir: (1) polimer jetinin, mikron veya mikron altı boyutlarda bir çapa sahip olması; (2) jetin, elektroğirmede kullanılan polimer çözeltisinin yüzey geriliminden daha fazla yük taşıması; (3) çözücünün (çözücülerin) güçlü bir elektrik alanının etkisi altında buharlaşması gerekmektedir (111). Bu nedenle çözücünün oluşturulan fiber yapılar üzerinde oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada, söz konusu etkinin araştırılması için çözeltiye, çözücü olarak kloroformun yanı sıra HFIP eklenmesiyle fiber morfolojisine etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak, fiber çapının azaldığı ve nispeten daha birbirine yakın (uniform) çapta fiber üretildiği, dolayısıyla, HFIP eklenmesinin oluşturulan fiber morfolojisini oldukça etkilediği görülmüştür.

Benzer şekilde, You ve ark.'nın (112), poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLA) ve poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA; L-laktid/glikolit 50/50) kullanarak elektroğirme yöntemi ile nanofiber matris elde etmeyi amaçladıkları çalışmalarında, çözücü olarak HFIP ve kloroform kullanılan fiberleri karşılaştırmış ve HFIP'nin kloroformdan daha ince fiber çapı sağladığını raporlamıştır. Çözelti

vizkozitesi gibi parametrelerin sabit tutulmasıyla elde edilen sonuçlarda gözlemlenen fiber çaplarındaki bu fark, çözücünün polaritesi, yani çözeltinin polaritesi ile ilişkilendirilmiştir. Diğer yandan HFIP'nin sisteme eklenmesi ile, fiber çapındaki incelmenin yanı sıra, gözenekliliğin azalarak gözenek çapının arttığı da ifade edilebilir.

Elektroeğirme işleminde akış hızı arttırıldığında genellikle lif çapı artar ve kritik bir değeri geçtiğinde boncuk (bead) oluşumu gözlemlenir. Taylor konisinin kararlı olduğu noktadaki akış hızı uygun kritik değer olarak alınabilir. Çok yüksek akış hızları, çözelti miktarı fazla olan fiberlerin toplayıcıya ulaşmadan önce kurumasına engel olabileceğinden lif yapısı bozulabilir. Diğer yandan, literatürde genel olarak elektroegirme işlemi sırasındaki deneysel gözlemler, düşük çaplı fiberlerin, düşük akış hızlarında oluştuğunu göstermektedir (113). Bu çalışmada yapılan denemeler sonucunda, %80 kloroform ve %20 HFIP içerisinde ağırlıkça 10% PLCL çözeltisinden, 8kV, 15cm mesafe sabit tutulurken akış hızının 1mL/saat'ten 1,5 mL/saat'e çıkarılmasının fiber morfolojisinde önemli bir fark yaratmadan daha hızlı üretim sağladığı anlaşılmıştır.

Bor (B, atom numarası 5), Grup IIIA'daki ilk elementtir ve gruptaki tek ametaldir. Hem metallerin hem de ametallerin bağ oluşturma ve yapısal özelliklerini gösterir. Doğada bor, elemental haliyle bulunmaz; borik asit (H_3BO_3) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer. Ayrıca bor, borik asidin tuzları veya esterleri olan boraks gibi boratları doğal olarak oluşturur (114). Bu tezde, daha önce bahsedildiği gibi, yara enfeksiyonlarında önemli bir etken olan *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili bir antibakteriyel ve antibiyofilm ajan olan borik asidin (115) yapıya eklenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla borik asit içeren yara örtüsü katmanlarının hazırlanması için çalışılmıştır. Borik asit için, 76/768/EEC sayılı Avrupa Komisyonu (EC) Direktifi, talk pudralarında %5, oral hijyen ürünlerinde %0,5 ve diğer ürünlerde %3'lük bir üst sınır belirlemiştir (116). Ağırlıkça %3 ve %5 oranında borik asit eklenmiş numunelerin SEM görüntülerinden, borik asit partikülerinin fiberlerin aralarında düğüm benzeri yapılar oluşturarak hapsoldüğü görülmüştür. EDS (veya EDX) yöntemi ile bu yapılar içerisinde borun varlığının tespiti üzerinde çalışılmış olsa da beklenildiği üzere, söz konusu tekniğin bor elementinin periyodik tablodaki yeri, diğer bir deyişle atom ağırlığı nedeniyle, tespitinde kullanılabilecek hassasiyete sahip

olmadığı görülmüştür. Bu teknik, numunenin yarı kantitatif kimyasal analizini sağlayan bir yüzey analiz yöntemidir. Bu yöntem, numunelerin yüksek enerjili elektronlara maruz bırakılması ve dolayısıyla elektronların numune ile etkileşiminden doğan X-ışını emisyonlarının gözlemlenmesine dayanır. Yayılan X-ışını enerjileri, her bir elementin kendine özgü bir atomik yapıya sahip olduğu düşünüldüğünde genellikle elementten elemente farklılık gösterir. Bu tekniğin nispeten zayıf spektral çözünürlüğe sahip olması ve tespit sınırlarının bulunması tekniğin kullanım alanlarını kısıtlamaktadır.

FTIR, biyomedikal numunelerde kimyasal analiz için yaygın olarak kullanılan bir titreşim spektroskopisi tekniğidir, çünkü çoğu inorganik ve organik bileşen, dipol momentlerine sahip oldukları için kızılötesi (IR) radyasyonda aktiftir. Bu spektroskopik teknik, IR radyasyonunun emilimine ve daha sonra düşük enerjili bir durumdan daha yüksek enerjili veya uyarılmış bir duruma geçişi destekleyen bir fotondan enerjinin emilmesine dayanır. Uyarılma, ışık spektrumunun IR bölgesinde değişen dalga boylarında (veya frekanslarda) meydana gelen moleküler bağların (yani gerilme, bükülme, bükülme, sallanma, sallanma ve düzlem dışı deformasyon) titreşimiyle sonuçlanır (117). Tez kapsamında elde edilen borik asit ilaveli PLCL deri ikamelerinin kimyasal analizi için kullanılan FTIR spektroskopisinden elde edilen sonuçlarda, membranların hem borik asit hem de PLCL bileşenleri içerdiğini gösterilmiştir. Ayrıca, ağırlıkça 5% borik asit içeren PLCL örneklerde borik aside ait karakteristik bantlar 3% borik asit içeren PLCL örneklere göre daha belirgindir.

Su alarak şişme kapasitesi, bir doku iskelesinin yapısal stabilitesini değerlendirmek için kullanılan önemli bir parametredir. Ayrıca, şişme davranışı doku mühendisliği ürünlerinin önemli bir özelliğidir, çünkü sinyal moleküllerinin ve besinlerin difüzyonu ile doğrudan ilgilidir (76). Bu projede elde edilen PLCL deri ikamelerinin de borik asit katkısı ile katkı miktarıyla ilişkili olarak şişme oranlarının azaldığı tespit edilmiştir. Deney süresince ağırlık kaybı yaşanmayıp tersine ağırlık artışı devam ettiğinden, bozunma yerine şişme oranıyla ifade edilen ağırlık kazancı, 28. gün sonunda saf PLCL örneklerde %200, %3 borik asit ve %5 borik asit katkılı PLCL deri ikamelerinde sırasıyla %155 ve %98 oranında ölçülmüştür. Diğer yandan, çapraz bağlanma, polimerik doku iskelelerinin hidrofilikliğini değiştirebilir ve iskelenin yapısal stabilitesinin daha uzun süre korunmasına katkıda bulunacak olan

şişme oranını azaltabilir (118). Borik asidin poli(vinil alkol) (PVA) gibi polimerler için iyi bir çapraz bağlama ajanı olduğu bilinmektedir (119). Ancak, bu çalışmada PBS içerisinde saf PLCL örneklerle göre borik asit katkılı PLCL örneklerde meydana gelen şişme oranındaki azalma, borik asitle çapraz bağlanma sonucu PLCL'deki su tutabilme kapasitesinin düşüşünden değil, deri ikamelerinden borik asit salımına bağlı ağırlık kaybının su emmeye bağlı ağırlık artışında azalma olarak yansımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapıdaki borik asit partiküllerinin PBS içerisinde erimesinden meydana gelen pH düşüşü de bu sonucu desteklemektedir. Bunun yanı sıra, her ne kadar borik asit eklenmesi PLCL'in şişme oranını bir miktar düşürse de tüm örneklerin su tutmaları halihazırda oldukça yüksek oranda gerçekleşmiştir. Wang ve ark. MEDPOR®, HydroColl®, DuoDERM® ve Tegaderm® dahil olmak üzere dört ticari deri ikamesinin şişme oranını ölçmüş ve sonuçlar %10'un altında rapor edilmiştir (120). İdeal bir yara örtüsünün normalde %100-900 aralığında su emme ve yüksek ıslanabilirlik sağlaması beklenir (121). Tüm yapı iskelelerinin şişme oranları, bir deri ikamesi olarak yara eksüdasyonunu emebilecek kadar yüksektir (Şekil 4.4); bu durum, büyük ölçüde üretilen deri ikamelerinin gözenekli yapısı ile ilişkilidir.

Yara iyileşmesi, bağ dokusunun ve epidermal tabakanın yeniden oluşturulması ve birleştirilmesi ile karakterize edilen karmaşık bir rejenerasyon işlemidir. Yara çevresindeki pH değeri, bu iyileşme sürecinde meydana gelen tüm biyokimyasal reaksiyonları dolaylı olarak ve doğrudan etkiler (122). Cildin doğal asidik ortamı, altta yatan dokunun ortaya çıktığı yaralarda vücudun iç pH ortamının (pH=7.4) değerinden dolayı bozulmaktadır. Deri üzerindeki doğal asidik ortamın eski haline getirilmesi, antibiyotiklere karşı çok dirençli olsalar bile, vücut yüzeyindeki mikrobiyal yükün azaltılmasına etkili bir şekilde yardımcı olabilir. Ayrıca, pH, alkali duruma yükseltildiğinde, yara iyileşmesi ilerlemesi azalır. Bu nedenle, borik asit, sitrik asit, asetik asit, askorbik asit ve algenik asit gibi asitlerin topikal olarak uygulanması, enfeksiyonu kontrol altına almak ve iyileşmeyi teşvik etmek için yaralara yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (123). Projede üretilen deri ikamelerinin PBS içerisinde oluşturdukları pH değişiminin takip edildiği 14 gün boyunca fizyolojik sınırlar içerisinde kalmakla beraber pH'ın düşüşü gözlemlenmiştir. Hücre dışı pH'ın yara iyileşmesinde 6.5'e ve tümör nekrozunda 5.8'e düşebileceği bilinmektedir (124). Ağırlıkça %5 borik asit içeren kompozit deri ikamesinin 28. gün sonundaki en düşük pH değeri 7,13 yara iyileşme sürecini olumsuz etkilemeyecek düzeydedir.

Nemli bir yara ortamı oluşturan ve böylece hücre göçünü ve dolayısıyla yara iyileşmesini destekleyen pansumanlar uzun zamandan beri arzu edilir olarak kabul edilmektedir (125). Yara iyileşmesi, nemin en önemli faktörlerden biri olduğu, arzu edilen bir mikro ortam gerektiren karmaşık bir patofizyolojik süreçtir. İnsan vücudunun tüm hücreleri kendi akışkan mikro ortamlarında yaşarlar. Yaralanmadan sonra, yara yüzeyinden buharlaşan su kaybı normal deriye göre yaklaşık yirmi kat daha fazla olabilir (126,127). Wenger, bir litre suyun buharlaşması üzerine 2,43 MJ enerji kaybedildiğini ve dolayısıyla önemli ölçüde buharlaşan su kaybının, bol miktarda ısı kaybıyla ilişkili olduğunu hesaplamıştır (126,128). Yara doğrudan havaya maruz kaldığında dehidre olur ve yarayı bakteriyel enfeksiyondan korumayı amaçlayan bir kabuk oluşur. Bununla birlikte, kuru veya düşük nemli mikro ortamdaki bir hücrenin canlılığını ve işlevini kaybedeceği ve hatta öleceği açıktır. Islak koşullarda iyileşmenin kuru kabuk koşullarından daha hızlı olduğu da bildirilmiştir (127,129). Yara örtülerinin temel işlevi ve gerekliliği, yarayı optimum nemde tutmaktır (109). Bir yara örtüsünün su buharı geçişini birçok faktör etkileyebilir. Bunlardan en önemli rolü yara örtüsünde kullanılan malzeme cinsi ve özellikleri oynar (125).

Xu ve ark. oluşturdukları yara örtülerinin su buharı geçiş oranını $2028.3 \pm 237.8 \text{ g/m}^2 \cdot 24\text{h}$ olduğunu tespit etmiştir (127). Bu çalışmada ise oluşturulan yara örtülerinin su buharı geçişlerinin borik asit katkısı nedeniyle örneklerin ilk 6. saatte farklı sonuçlar vermesine rağmen, sonrasında 14. güne kadar borik asit katkılı ve saf fiberlerin birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür.

Her uygulama için, en uygun iskele malzemesi belirlenirken mekanik, kimyasal ve fiziksel faktörler kadar oksijenin malzemeden ne kadar geçebildiği de önemlidir (130,131). Bir materyalin oksijen difüzivitesi, kalınlığı boyunca hücre büyümesini destekleme kabiliyetini etkiler. Cerrahi implantasyonun hemen ardından, bir iskele malzemesini dolduran hücreler, yeterli vaskülarizasyon gerçekleşene kadar gereken oksijenlenme için oksijen geçişine ihtiyaç duyar (131,132). Biyomalzemeler için çözünebilir oksijen geçirgenliği, malzeme içerisine hücre göçünü ve hücre canlılığını destekleme kabiliyetini açısından önemlidir (131).

Daha önce yapılan bir çalışmada, %0,50 w/w bakır aktif fojasit (bir zeolit) içeren liyofilize jelatin hücre iskelelerinin yaklaşık 8mg/L civarı oksijen

geçirgenliğine sahip olduğu gösterilmiştir (133). Yara örtülerinden elde edilen bu sonuca göre, yara iyileşmesi için önemli bir faktör olan oksijen geçirgenliğinin yüksek oranda hücre çoğalmasını destekleyici nitelikte olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise 7. günün sonunda %5 borik asit katkılı PLCL fiberler distile suda 6,49 mg/L oksijen geçirgenliği göstermiştir. Diğer yandan, literatürde oksijen difüzyonu ve yara bölgesinde enfeksiyonun önlenmesi arasındaki ilişki üzerine yapılan birçok çalışma da yer almaktadır (134).

Mekanik özellikler, yara pansumanları için uygulanabilirlikte en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Deri ikamelerinin işleme ve değiştirmeye dayanmak için yeterli gerilme mukavemetine ve esnekliğe ihtiyaçları vardır (135,136). Üretilen deri ikamelerinin mekanik dayanımının belirlenmesi için biyomalzemelerin çekme kuvveti altında dayanımını belirlemeye uygun hassasiyette, örneğin 100 N yük hücreli ve 1 mm/dakika (crosshead) hızına sahip, bir test cihazına ihtiyaç duyulmuştur. PLCL iskelelerin elastik mekanik özellikleri, tek eksenli çekme testleri ile incelenmiştir. Deri bükülme ve esneme hareketliğinden dolayı yüksek dinamik dokudur. Bu yüzden mekanik mukavemet deri ikameleri için çok önemlidir. Bu nedenle, deri gerilme özellikleri, deri doku mühendisliği uygulamaları için iskelelerin değerlendirilmesinde temel faktörlerdir.

Özellikle, yapı iskelelerinin gerilme mukavemeti, başarılı deri ikameleri için önemli unsurlardan biridir, çünkü vücudun bükme ve germe hareketleri karşı aşırı genişlemeye direnecek yeterli güce sahip olmalıdır. Özellikle deri ikameleri eklem yerlerinde ise daha fazla gerilmeye maruz kalırlar.

Bu çalışmada, PLCL-temelli fiber yapıdaki deri ikamelerinin yapısına borik asit partiküllerinin katılmasının çalışmanın başlangıcında öngörüldüğünden çok daha yüksek değerlerde mekanik mukavemet katmış olduğu gözlemlenmiştir. Yapıya %3 ve %5 borik asit eklenmesiyle örneklerin dayandığı ortalama maksimum çekme gerilmesi (Şekil 4.6) neredeyse iki katına çıkmıştır.

Literatüre göre, PLCL fiberler iyi bir mekanik mukavemete sahiptir (137). Jeong ve ark.'ın yaptığı çalışmada, PLCL'in PLGA'a göre daha iyi gerinim gerçekleştirdiği bulunmuş, PLCL'nin uzama ve elastik yeteneğin iyi olduğu raporlanmıştır (138). Bu tez çalışması kapsamında yapılan deney sırasında borik asit katkılı PLCL örneklerinin bazılarının deney düzeneğinin sınırları içerisinde

(maksimum çene açıklığı) kopmadığı görülmüştür. Borik asit katkısız olan PLCL fiberlerin ise hepsi çekme deneyi sırasında kopmuştur. Bu durum borik asit katkısının fiber örtülerde çekme mukavemetinin ve kopma anına kadar olan gerinimi artırdığını göstermektedir.

Biyolojik olarak zararlı maddelere maruz kalan hücreler morfolojide, hücre büyümesinde hızda, hücre ölümünde ve hücre parçalanmasında değişikliklere uğrayabilir. Bu nedenle, deneysel farmakolojide potansiyel ilgi konusu olan her bileşik için hücre canlılığının izlenmesi zorunlu olarak yapılmalıdır. İncelenen bileşiklerin veya ekstraktların hücre canlılığını ve sitotoksitesini değerlendirmenin çeşitli yolları vardır.

Biyomalzemeler, biyolojik hücrelerle bütünleşme kabiliyetine sahip doğal veya yapay bileşiklerdir. Biyomalzemeler inert veya aktif olabilir: inert biyomateryaller, çevreleyen doku veya organla reaksiyona girmezken, aktif biyomateryaller çevreleyen dokunun büyümesini ve implantasyonunu artırır. Biyomateryalin aktivitesi, implanta hücre yapışma düzeyine bağlıdır. Hücre yapışması, örneğin, implantın kemik dokusuna entegrasyonunun gerekli olduğu yapay eklem implantlarında özellikle iyi olmalıdır. Bununla birlikte, enfeksiyonlara neden olabilecek kontaminasyonları önlemek için bakteriyel hücre yapışması mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır (139). Bu konuda yüzeyin ıslanabilirliği önemli rol oynar ve temas açısı ölçümleri kullanılarak değerlendirilebilir. Yüzey temas açısı analizlerinde her zaman saf sıvılar kullanılmalıdır; yüzey aktif madde çözeltileri veya sıvı karışımları kullanılmamalıdır, çünkü bunlar tercihli adsorpsiyondan dolayı komplikasyonlara neden olur. Genel olarak, su temas açısı 90°'den küçükse, katı yüzeyi hidrofilik, su temas açısı 90°'den büyükse, katı yüzey hidrofobik olarak kabul edilir eğer temas açısı 150°'den büyük ise de süperhidrofobik olarak kabul edilir (139). Temas açılarının belirlenmesi üretilen fiber hücre iskelelerin hidrofobik ve hidrofilik olmasını belirlemek açısından önemlidir.

Nosar ve ark. yaptığı çalışmada, asetik asit içinde 1:1 oranında PCL/jelatin solüsyonuna farklı yüzdelerde seryum oksit eklenmiş ve temas açıları incelemesi çalışılmıştır. %1,5 CeO₂ eklenmiş PCL/jelatin solüsyonundan, %3 CeO₂ eklenmiş PCL/jelatin solüsyonundan ve %6 CeO₂ eklenmiş PCL/jelatin solüsyonundan elektroegirme ile üretilen hücre iskelelerin temas açıları ölçülmüş ve sırasıyla 78.43

$\pm 1.21^\circ$, $78.17 \pm 1.04^\circ$ ve $77.23 \pm 4.89^\circ$ olarak bulunmuştur (135). Bir diğer çalışmada ise, Felice ve ark. 4:1 oranındaki kloroform:DMF (dimetilformamid) içinde %8 ağırlık/hacim oranında PCL solüsyonu kullanılarak elektroğirme yöntemi ile hücre iskelelerin temas açısını yaklaşık 127° derece bulmuştur. Bu solüsyona %15 oranında HA (hidroksiapatit) eklemiş ve temas açısı ölçülmüştür ve yaklaşık 125° olarak bulunmuştur. Ayrıca PCL solüsyonuna sadece sırasıyla %1, %3 ve %6 ZnO_2 eklendikten sonra temas açıları ölçülmüş ve sırayla yaklaşık olarak 124° , 125° , $124,5^\circ$ bulunmuştur. PCL/hidroksiapatit solüsyonuna da sırasıyla %1, %3 ve %6 ZnO_2 eklenmiş ve temas açıları ölçülmüştür. Temas açıları sırası ile yaklaşık $122,5^\circ$, 123° ve 123° bulunmuştur (140).

Başka bir araştırmada Vázquez ve ark. HFIP içinde %18 ağırlık hacim oranında çözünmüş PLGA için temas açısını olarak $133,4^\circ$ olarak rapor etmiştir. PLGA solüsyonuna 9:1 oranındaki PLGA: jelatin olacak şekilde jelatin eklenince ise karışımın temas açısı 113.5° olarak rapor edilmiştir (141).

Bu tezde borik asit katkısız PLCL, %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL fiber örtüleri için test yapılmıştır. Tüm örneklerin hidrofobik olduğu tespit edilmiştir. Ancak, %5 borik asit katkılı PLCL fiber örtülerinin temas açısı, %3 borik asit katkılı PLCL fiber örtülerin temas açısından; %3 borik asit katkılı PLCL fiber örtülerin temas açısı ise borik asit katkısız PLCL fiber örtüleri temas açısından daha düşük çıkmıştır. Bu sonucun, bir katı maddenin ıslatma özelliklerinin ıslatılan yüzeyin pürüzlülüğüyle doğru orantılı olduğu teorisini ortaya koyan Wenzel modeli olarak adlandırılan modele uygun olduğu söylenebilir (142). Borik asit katkısıyla PLCL yüzeyin hidrofobik özelliği azalmıştır, bu durum fibroblast hücrelerinin yüzeye tutunması için olumlu etkiye neden olmaktadır.

Borik asit, elektro kaplama analitik kimya, tıp ve diğer endüstri dallarında yaygın olarak kullanılan tribazik asittir (143). Borik asit fungisidal etki ve herbisidal özellikler gösterir (144). Borik asit ve tuzları olan boratlar tıpta bakteri öldürücü, mantar ilacı ve antiseptik olarak 1860'lerden beri kullanılmaktadır (144). Bu tezde borik asidin antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Bunun için borik asit katkılı ve katkısız PLCL fiber deri ikameleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca borik asidin farklı konsantrasyonlarda antibakteriyel etkisini incelemek amacıyla %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL fiber deri ikameleri incelenmiştir. *E. coli* bakterilerin borik asit katkılı

PLCL fiber ikamelerinin yüzeylerinde borik asit katkısız PLCL fiber deri ikamelerine göre çok daha az çoğaldığı tespit edilmiştir. Saf PLCL üzerinde bakteri kolonileri rahatlıkla görülürken, özellikle %5 borik asit katkılı PLCL yüzeyinde SEM ile yapılan taramada nadiren tek tek bakteri hücrelerine rastlanmıştır.

In vitro sitotoksiteyi tespit etmek için PrestoBlue (PB) adı verilen bir reaktif geliştirilmiştir. PrestoBlue canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından indirgenmiş forma dönüştürülen resazurin bazlı bir bileşiktir (145). İndirgemenin bir sonucu olarak, reaktif bir renkte bir değişikliğin yanı sıra floresansında bir kayma sergiler ve bu nedenle florometrik veya spektrofotometrik yaklaşım kullanılarak ölçülebilir. PrestoBlue ticari olarak toksik olmayan, kullanıma hazır bir çözelti olarak hazırlanır. Üreticiye göre PB, 10 dakika kadar kısa bir inkübasyon adımıyla hücre canlılığını değerlendirmek için en hızlı testtir. Aynı zamanda, kuyucuk başına 12 hücreye kadar tespit edebilen çok hassas bir testtir (145). Bu nedenle, bu tez çalışmasında tercih edilmiştir.

Kültür ortamında 1.gün 3.gün ve 7. gün sonunda Prestoblue ile hücre canlılık testinde EGF eklenmiş ve EGF eklenmemiş %3 ve %5 oranlarında borik asit katkılı PLCL ve borik katkısız PLCL deri ikamelerinde birbirine benzer canlılık gözlemlenmiş ve hücre kültür plakalarına ekilen kontrol grubuna göre anlamlı fark görülmemiştir. 1.gün 3.gün ve 7. günler karşılaştırıldığında hücrelerin oldukça iyi çoğaldığı tüm gruplar için belirlenmiştir. Diğer yandan yapıya sonradan eklenmiş olan EGF'in hücre proliferasyonuna önemli bir katkısının gözlemlenmemiş olmasının EGF'in yüzeye adsorblanmasına rağmen kimyasal olarak kuvvetli bir bağ oluşturmadığı için ortamdan uzaklaştığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, EGF'in özellikle kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmada etkile olduğu düşünüldüğünde, Prestoblue testinde kullanılan fibroblast hücrelerinin kök hücre olmayışının da etkili olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tezde borik asit eklenmiş PLCL fiber yapıların yara iyileşmesinde kullanılmak üzere elektroëğirmeyle üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için PLCL kopolimeri kloroform HFIP içinde çözülmüş ve daha sonra %3 ve %5 oranlarında borik asit eklenmiştir. Böylece %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL ve borik asitsiz PLCL fiberler elde edilmiştir. Bu fiber örtülerin SEM görüntülerinde 3 boyutlu açık gözenekli bir fiber yapı oluşturduğu tespit edilmiştir. Elektroëğirme işleminde dar bir aralıkta değiştirilen voltajın (8kV-10kV) fiber morfolojisinde büyük bir fark ortaya çıkmadığı görülmüştür. EDS analizinde borun atom numarası küçük olduğu için tespit edilmesi mümkün olmamış bu yüzden FTIR spektroskopisi ile borik asidin yapıdaki varlığı kimyasal bağlarla gösterilmiştir. Borik asit katkılı fiberlerin, uygulanan çekme testlerinde maksimum çekme gerilimi ve kopma anındaki gerinimin, borik asitsiz PLCL fiberlere göre önemli ölçüde iyileştiği gözlemlenmiştir. PBS içinde yapılan şişme deneyinde borik asit katkısız PLCL fiberlerde borik asit katkılı fiberlere göre daha yüksek oranda ağırlık artışı gözlenmiş olsa da elde edilen değerler 5%borik asit katkılı fiber için bile 14.günün sonunda %100'ün üzerindedir. Bu durum, borik asit katkılı fiber deri ikamelerinin düşük ve orta düzeydeki yaralarda eksüdayı emebilecek kapasitede olabileceğini göstermiştir. Borik aside bağlı pH değişimi takip edildiğinde, %5 borik asit içeren PLCL fiber örtülerin bulunduğu PBS çözeltiğinde, borun zayıf bir asidi olan borik asitten dolayı, fizyolojik pH'ı önemli ölçüde değiştirecek bir pH düşüşü gözlemlenmemiştir. Mekanik özellikleri değerlendirmek için yapılan çekme testinde borik asit katkılı fiber örtüleri katkısızlara göre mekanik mukavemetin çok daha iyi olduğu, kopmadan önce çok daha fazla gerinim sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, borik asit partikül eklenmesiyle oluşturulan tekstil vb. diğer fiber uygulamaları için de önemli bir sonuçtur. Su buharı geçiş deneyinde, borik asit içeren deri ikamelerinin yara iyileşmesine destek olacak şekilde nem geçişine izin verdiği tespit edilmiştir. Üretilen fiber deri ikameleri, %3 ve %5 borik asit katkılı PLCL ve borik asit katkısız PLCL fiberlere üretim sonrası *in vitro* testlerin hemen öncesinde EGF emdirilmiştir ve bekletilmeden kullanılmıştır. EGF'li ve EGF'siz %3 ve %5

borik asit katkılı PLCL ve borik asit katkısız PLCL fiberler üzerinde 3T3 fare fibroblast hücrelerinin, kültür ortamında 1.gün, 3.gün, ve 7.gün sonrası ideal bir yapışma ve çoğalma yüzeyi sunan hücre kültür plakasına ekilen kontrol grubu ile eşdeğer sonuç vermesi olumlu bulgulardır. Bu durum, yüksek konsantrasyonda (%5) borik asit içeren çözeltilerden hazırlanan fiber yapıların bile hücre üzerinde toksik etki yaratmadığının hatta hücre çoğalmasında kontrol grubuna göre bir fark oluşturmadığının göstergesidir. Diğer yandan, *E.coli* bakterisinin borik asit katkısıyla yüzeyde tutunması ve çoğalmasının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasının sonrasında devam edilebilecek, özellikle *in vivo* testleri de içerebilecek çalışmalarda, yüksek (%5) ve düşük (%3) konsantrasyonlarda borik asit içeren çözeltilerden elde edilen fiber yapılarıdaki borik asit katkısının organizma üzerinde yara iyileşmesi etkisinin araştırılması ile biyomedikal alanda yeni, etkili ve endüstriyel üretime uygun düşük maliyetli antibakteriyel ve derinin mekanik özelliklerine uyumlu bir yara örtüsü olarak kullanım potansiyeli gösterilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C. (2011) Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 3 (4), 203–213.
2. Saladin, K.S., Gan, C.A., Cushman, H.N. (2018) Anatomy & physiology: the unity of form and function. Eighth edition McGraw-Hill Education, New York, NY.
3. Venus, M., Waterman, J., McNab, I. (2011) Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 29 (10), 471–474.
4. Darlenski, R., Fluhr, J.W. (2012) Influence of skin type, race, sex, and anatomic location on epidermal barrier function. *Clinics in Dermatology*. 30 (3), 269–273.
5. Langer, R. (2000) Tissue Engineering. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 1, 12–5.
6. Langer, R., Vacanti, J.P. (1993) Tissue engineering. *Science*. 260 (5110), 920–926.
7. Vacanti, J.P., Langer, R. (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*. 354 S32–S34.
8. Venus, M., Waterman, J., McNab, I. (2011) Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 29 (10), 471–474.
9. Fenner, J., Clark, R.A.F. (2016) Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. in: M.Z. Albanna, J.H. Holmes (Eds.), *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, pp. 1–17.
10. McGrath, J.A., Lai-Cheong, J.E. (2016) Skin and Its Appendages. in: S. Standring (Ed.), *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Forty-first edition, Elsevier Limited, New Yorkpp. 141–161.
11. Lai-Cheong, J.E., McGrath, J.A. (2017) Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. 45 (6), 347–351.
12. Marieb, E.N., Hoehn, K. (2013) Human anatomy & physiology. Pearson, Boston.
13. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., Tymińska, A. (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology*. 1 30–41.
14. Sevdar Söker (2005) Dendritik Hücreler. *Dicle Tıp Dergisi*. 32 (3), 158–160.
15. Lucarz, A., Brand, G. (2007) Current considerations about Merkel cells. *European Journal of Cell Biology*. 86 (5), 243–251.
16. Arda, O., Göksüğü, N., Tüzün, Y. (2014) Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*. 32 (1), 3–13.
17. Carroll, R.G. (2007) The Integument. in: Elsevier's Integrated Physiology, Elsevier, pp. 11–17.
18. Rizzo, D.C. (2010) Fundamentals of anatomy & physiology. 3rd ed Delmar, Cengage Learning, Clifton Park, NY.
19. Tiwari, V.K. (2012) Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian Journal of Plastic Surgery*. 45 (02), 364–373.
20. Hunt, J.L., Arnoldo, B.D., Purdue, G.F. (2012) Prevention of burn injuries. in: *Total Burn Care*, Elsevier, pp. 47-55.e2.
21. Pruitt, B.A., Wolf, S.E., Mason, A.D. (2012) Epidemiological, demographic, and outcome characteristics of burn injury*. in: *Total Burn Care*, Elsevier, pp. 15-45.e4.
22. Lee, J.O., Norbury, W.B., Herndon, D.N. (2012) Special considerations of age: the pediatric burned patient. in: *Total Burn Care*, Elsevier, pp. 405-414.e2.
23. Zor, F., Ersöz, N., Külahçı, Y., Kapı, E., Bozkurt, M. (2009) Birinci basamak yanık tedavisinde altın standartlar. *Dicle Tıp Dergisi*. 36 (3), 219–225.
24. Rowan, M.P., Cancio, L.C., Elster, E.A., Burmeister, D.M., Rose, L.F., Natesan, S., (2015) Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care*. 19 (1), 243.
25. Patel, P.P., Vasquez, S.A., Granick, M.S., Rhee, S.T. (2008) Topical Antimicrobials in Pediatric Burn Wound Management. *Journal of Craniofacial Surgery*. 19 (4), 913–922.
26. Owayolu, N., Türk, N., Uçan, Ö. (2006) Yanık nedeniyle acile gelen hastaların değerlendirilmesi ve hemşirelik yaklaşımı. *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*. 9, 4.
27. Abdel-Sayed, P., Michetti, M., Scaletta, C., Flahaut, M., Hirt-Burri, N., de Buys Roessingh, A., (2019) Cell therapies for skin regeneration: an overview of 40 years of experience in burn units. *Swiss Medical Weekly*. 149, w20079.
28. Hawkins, H.K., Finnerty, C.C. (2012) Pathophysiology of the burn scar. in: *Total Burn Care*, Elsevier, pp. 507-516.e3.

29. Çetinkale, O. (2001) Yanık Yarası ve Tedavisi. in: Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu, İstanbul, Türkiyepp. 89–103.
30. Yenidünya, M. o, Afandiyev, K., Demirseren, M. e (2005) Venöz bacak ülserleri: doğru tanının tedavideki yeri. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*. 11 (2), 85–92.
31. Scott, T.E., LaMorte, W.W., Gorin, D.R., Menzoian, J.O. (1995) Risk factors for chronic venous insufficiency: A dual case-control study. *Journal of Vascular Surgery*. 22 (5), 622–628.
32. Callam, M.J. (1994) Epidemiology of varicose veins. *British Journal of Surgery*. 81 (2), 167–173.
33. Yazdanpanah, L. (2015) Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World Journal of Diabetes*. 6 (1), 37.
34. Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87 (1), 4–14.
35. Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J. (2011) IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 94 (3), 311–321.
36. Aalaa, M., Malazy, O.T., Sanjari, M., Peimani, M., Mohajeri-Tehrani, M. (2012) Nurses' role in diabetic foot prevention and care: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 11 (1), 24.
37. Alavi, A., Sibbald, R.G., Mayer, D., Goodman, L., Botros, M., Armstrong, D.G., (2014) Diabetic foot ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 70 (1), 21.e1-21.e24.
38. Leone, S., Pascale, R., Vitale, M., Esposito, S. (2012) (Epidemiology of diabetic foot). *Le Infezioni in Medicina*. 20 Suppl 1 8–13.
39. Vileikyte, L. (2001) Diabetic foot ulcers: a quality of life issue. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 17 (4), 246–249.
40. Ragnarson Tennvall, G., Apelqvist, J. (2004) Health-Economic Consequences of Diabetic Foot Lesions. *Clinical Infectious Diseases*. 39 (Supplement 2), S132–S139.
41. Boulton, A.J.M. (2010) The diabetic foot. *Medicine*. 38 (12), 644–648.
42. Shakespeare, P. (2001) Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*. 27 (5), 517–522.
43. Sanon, S., Hart, D.A., Tredget, E.E. (2016) Molecular and Cellular Biology of Wound Healing and Skin Regeneration. in: *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, pp. 19–47.
44. Ennis, W.J., Hill, D. (2016) Wound Healing: A Comprehensive Wound Assessment and Treatment Approach. in: *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, pp. 239–263.
45. Clark, R.A.F. (2014) Wound Repair: Basic Biology to Tissue Engineering. in: Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, pp. 1595–1617.
46. Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., Chen, Y.-J. (2018) Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*. 81 (2), 94–101.
47. Takeo, M., Lee, W., Ito, M. (2015) Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 5 (1), a023267–a023267.
48. Bunman, S., Dumavibhat, N., Chatthanawaree, W., Intalaporn, S., Thuwachosuan, T., Thongchuan, C. (2017). Burn wound healing: pathophysiology and current managementof burn injury. *The Bangkok Medical Journal*, 13(2), 91-91.
49. Reinke, J.M., Sorg, H. (2012) Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*. 49 (1), 35–43.
50. Singh, S., Young, A., McNaught, C.-E. (2017) The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 35 (9), 473–477.
51. Young, A., McNaught, C.-E. (2011) The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 29 (10), 475–479.
52. Larson, B.J., Longaker, M.T., Lorenz, H.P. (2010) Scarless Fetal Wound Healing: A Basic Science Review: *Plastic and Reconstructive Surgery*. 126 (4), 1172–1180.
53. Leung, A., Crombleholme, T.M., Keswani, S.G. (2012) Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. *Current Opinion in Pediatrics*. 24 (3), 371–378.
54. Kamel, R.A., Ong, J.F., Eriksson, E., Junker, J.P.E., Caterson, E.J. (2013) Tissue Engineering of Skin. *Journal of the American College of Surgeons*. 217 (3), 533–555.
55. Vacanti, C.A. (2006) The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10 (3), 569–576.
56. Vacanti, J.P., Vacanti, C.A. (2014) The History and Scope of Tissue Engineering. in: *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, pp. 3–8.
57. Berthiaume, F., Maguire, T.J., Yarmush, M.L. (2011) Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2 (1), 403–430.

58. 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.
59. Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., (2017) Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (4), 789.
60. Le Cocq, H., Stanley, P.R.W. (2011) Closing the gap: skin grafts and flaps. *Surgery (Oxford)*. 29 (10), 502–506.
61. Solomon, D.E. (2013) A paradigm for a skin graft substitute. *Open Journal of Regenerative Medicine*. 02 (02), 28–30.
62. Shimizu, R., Kishi, K. (2012) Skin Graft. *Plastic Surgery International*. 2012 1–5.
63. Horch, R.E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, A.D. (2005) Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 9 (3), 592–608.
64. Alrubaiy, L., Al-Rubaiy, K.K. (2009) Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications. *Oman Medical Journal*. 24 (1), 4.
65. Ho, W.-S. (2002) Skin substitutes: An overview. *Annals of the College of Surgeons Hong Kong*. 6 (4), 102–108.
66. Brown, J.B., McDowell, F. (1942) Massive Repairs of Burns with Thick Split-Skin Grafts: Emergency “Dressings” with Homografts. *Annals of Surgery*. 115 (4), 658–674.
67. Rheinwald, J.G., Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6 (3), 331–343.
68. Pastor, C.J., Trovato, M.J., Granick, M.S., Tomaselli, N.L., Bates-Jensen, B.M. (2012) Management of the Wound Environment with Advanced Therapies. in: C. Sussman, B.M. Bates-Jensen (Eds.), *Wound Care: A Collaborative Practice Manual for Health Professionals*, 4th Edition, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MDpp. 522–534.
69. Paul, W., Sharma, C.P. (2015) *Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering*. Smithers Rapra Publishing.
70. Garg, K., Bowlin, G.L. (2011) Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 5 (1), 013403.
71. Ghosal, K., Chandra, A., G, P., S, S., Roy, S., Agatemor, C., (2018) Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes. *Scientific Reports*. 8 (1), 5058.
72. Mirjalili, M., Zohoori, S. (2016) Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 6 (3), 207–213.
73. Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.-M., Park, Y.J., Hong, S.-D., (2006) Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 27 (8), 1452–1461.
74. Kumbhar, S.G., Nukavarapu, S.P., James, R., Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2008) Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 29 (30), 4100–4107.
75. Bui, H.T., Chung, O.H., Dela Cruz, J., Park, J.S. (2014) Fabrication and characterization of electrospun curcumin-loaded polycaprolactone-polyethylene glycol nanofibers for enhanced wound healing. *Macromolecular Research*. 22 (12), 1288–1296.
76. Pan, J., Liu, N., Sun, H., Xu, F. (2014) Preparation and Characterization of Electrospun PLCL/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering. *PLoS ONE*. 9 (11), e112885.
77. Pedram Rad, Z., Mokhtari, J., Abbasi, M. (2018) Fabrication and characterization of PCL/zein/gum arabic electrospun nanocomposite scaffold for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 93 356–366.
78. Ghaseminezhad, K., Zare, M., Lashkarara, S., Yousefzadeh, M., Aghazadeh Mohandesi, J. (2020) Fabrication of althea officinalis loaded electrospun nanofibrous scaffold for potential application of skin tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*. 137 (16), 48587.
79. Jaganathan, S.K., Mani, M.P., Prabhakaran, P., Supriyanto, E., Ismail, A.F. (2019) Production, blood compatibility and cytotoxicity evaluation of a single stage non-woven multicomponent electrospun scaffold mixed with sesame oil, honey and propolis for skin tissue engineering. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 24 (5), 457–474.
80. Gautam, S., Chou, C.-F., Dinda, A.K., Potdar, P.D., Mishra, N.C. (2014) Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*. 49 (3), 1076–1089.
81. Le-Bail, A., Hamadami, N., Bahuaud, S. (2006) Effect of high-pressure processing on the mechanical and barrier properties of selected packagings. *Packaging Technology and Science*. 19 (4), 237–243.

82. Adekogbe, I., Ghanem, A. (2005) Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 26 (35), 7241–7250.
83. Wang, H., Chu, P.K. (2013) Surface Characterization of Biomaterials. in: *Characterization of Biomaterials*, Elsevier, pp. 105–174.
84. Sigma-Aldrich, Mueller Hinton Agar (70191), for microbiology, NutriSelect® Plus, Erişim 01.06.2021, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/70191>
85. Unalan, I., Endlein, S.J., Slavik, B., Buettner, A., Goldmann, W.H., Detsch, R., (2019) Evaluation of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber mats containing clove essential oil for antibacterial wound dressing. *Pharmaceutics*. 11 (11),.
86. Madhumathi, K., Sudheesh Kumar, P.T., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., (2010) Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21 (2), 807–813.
87. Sigma-Aldrich, Nutrient Broth No 3, Vegitone (16336), for microbiology, NutriSelect® Plus, Erişim 01.06.2021, https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/70149?gclid=Cj0KCQjw5PGFBhC2ARIsAIFIMNciZjBsF_oEZHuccQEYersGyr3ePD9smSlx8dwD6V9y15VnDoNds8caAjOkEALw_wcB
88. Hudzicki, J. (2009) *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. Erişim 01.06.2021, American Society for Microbiology: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
89. Baczewska, M., Eder, K., Ketelhut, S., Kemper, B., Kujawińska, M. (2021) Refractive Index Changes of Cells and Cellular Compartments Upon Paraformaldehyde Fixation Acquired by Tomographic Phase Microscopy. *Cytometry Part A*. 99 (4), 388–398.
90. Talbot, M.J., White, R.G. (2013) Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods*. 9 (1), 36.
91. Polívková, M., Siegel, J., Rimpelová, S., Hubáček, T., Kolská, Z., Švorčík, V. (2017) Cytotoxicity of Pd nanostructures supported on PEN: Influence of sterilization on Pd/PEN interface. *Materials Science and Engineering: C*. 70 479–486.
92. Redigueri, C.F., Sassonia, R.C., Dua, K., Kikuchi, I.S., de Jesus Andreoli Pinto, T. (2016) Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 82 181–195.
93. Cai, L., Lim, H., Fitzkee, N.C., Cosovic, B., Jeremic, D. (2020) Feasibility of manufacturing strand-based wood composite treated with β -cyclodextrin–boric acid for fungal decay resistance. *Polymers*. 12 (2), 274.
94. Parsons, J.L., Milberg, M.E. (1960) Vibrational Spectra of Vitreous $B_2O_3 \cdot xH_2O$. *Journal of the American Ceramic Society*. 43 (6), 326–330.
95. Inthanon, K., Daranarong, D., Techaikool, P., Punyodom, W., Khanaiyao, V., Bernstein, A.M., (2016) Biocompatibility Assessment of PLCL-Sericin Copolymer Membranes Using Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. 2016 1–16.
96. Ulu, A., Balcioglu, S., Birhanli, E., Sarimeseli, A., Keskin, R., Koytepe, S., (2018) Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/boric acid composite hydrogel as soft contact lens material: Thermal, optical, rheological, and enhanced antibacterial properties: Research Article. *Journal of Applied Polymer Science*. 135 (35), 46575.
97. Cho, H., Han, D., Matsumura, K., Tsutsumi, S., Hyon, S. (2008) The behavior of vascular smooth muscle cells and platelets onto epigallocatechin gallate-releasing poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) as stent-coating materials. *Biomaterials*. 29 (7), 884–893.
98. Khatri, Z., Jatoi, A.W., Ahmed, F., Kim, I.-S. (2016) Cell adhesion behavior of poly(ϵ -caprolactone)/poly(L-lactic acid) nanofibers scaffold. *Materials Letters*. 171 178–181.
99. Song, J., Sun, B., Liu, S., Chen, W., Zhang, Y., Wang, C., (2016) Polymerizing Pyrrole Coated Poly(l-lactic acid-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) Conductive Nanofibrous Conduit Combined with Electric Stimulation for Long-Range Peripheral Nerve Regeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 9 117.
100. Kijeńska, E., Prabhakaran, M.P., Swieszkowski, W., Kurzydowski, K.J., Ramakrishna, S. (2014) Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLCL core-shell nanofibers for nerve tissue engineering. *European Polymer Journal*. 50 30–38.
101. Zhao, J., Bai, L., Ren, X., Guo, J., Xia, S., Zhang, W., (2019) Co-immobilization of ACH11 antithrombotic peptide and CAG cell-adhesive peptide onto vascular grafts for improved hemocompatibility and endothelialization. *Acta Biomaterialia*. 97 344–359.
102. Budak, A., Gönen, M. (2014) Extraction of boric acid from colemanite mineral by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 92 183–189.

103. Hebbbar, R.S., Isloor, A.M., Ismail, A.F. (2017) Contact Angle Measurements. in: Membrane Characterization, Elsevier, pp. 219–255.
104. Young, T. (1805) III. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 95 65–87.
105. Jeong, S.I., Lee, A.-Y., Lee, Y.M., Shin, H. (2008) Electrospun gelatin/poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) nanofibers for mechanically functional tissue-engineering scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 19 (3), 339–357.
106. Jung, Y., Kim, S.H., You, H.J., Kim, S.-H., Ha Kim, Y., Min, B.G. (2008) Application of an elastic biodegradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffold for cartilage tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 19 (8), 1073–1085.
107. Gujral, S.S., Nand, P., Makhija, D. (n.d.) Formulation and characterization of boric acid topical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6 (9), 3885–3891.
108. McCann, J.T., Marquez, M., Xia, Y. (2006) Highly Porous Fibers by Electrospinning into a Cryogenic Liquid. *Journal of the American Chemical Society*. 128 (5), 1436–1437.
109. Katsogiannis, K.A.G., Vladislavljević, G.T., Georgiadou, S. (2015) Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *European Polymer Journal*. 69 284–295.
110. Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G. (2006) Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*. 12 (5), 1197–1211.
111. Yan, S., Xiaoqiang, L., Lianjiang, T., Chen, H., Xiumei, M. (2009) Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins. *Polymer*. 50 (17), 4212–4219.
112. You, Y., Min, B.-M., Lee, S.J., Lee, T.S., Park, W.H. (2005) In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Applied Polymer Science*. 95 (2), 193–200.
113. Fridrikh, S.V., Yu, J.H., Brenner, M.P., Rutledge, G.C. (2003) Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning. *Physical Review Letters*. 90 (14), 144502.
114. Yilmaz, B., Evis, Z. (2016) Boron-substituted bioceramics: A review. *Journal of Boron*. 1 (1), 6–14.
115. Sayin, Z., Ucan, U.S., Sakmanoglu, A. (2016) Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biological Trace Element Research*. 173 (1), 241–246.
116. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü (2018) Etiborik Asit Safety Data Sheet. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Türkiye.
117. Lopes, C. de C.A., Limirio, P.H.J.O., Novais, V.R., Dechichi, P. (2018) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews*. 53 (9), 747–769.
118. Bi, L., Cao, Z., Hu, Y., Song, Y., Yu, L., Yang, B., (2011) Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22 (1), 51–62.
119. Rouhi, M., Razavi, S.H., Mousavi, S.M. (2017) Optimization of crosslinked poly(vinyl alcohol) nanocomposite films for mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C*. 71 1052–1063.
120. Wang, H.-M., Chou, Y.-T., Wen, Z.-H., Wang, Z.-R., Chen, C.-H., Ho, M.-L. (2013) Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration. *PLoS ONE*. 8 (6), e56330.
121. Morgado, P.I., Aguiar-Ricardo, A., Correia, I.J. (2015) Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. *Journal of Membrane Science*. 490 139–151.
122. Schneider, L.A., Korber, A., Grabbe, S., Dissemond, J. (2007) Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Archives of Dermatological Research*. 298 (9), 413–420.
123. Nagoba, B.S., Suryawanshi, N.M., Wadher, B., Selkar, S. (2015) Acidic Environment and Wound Healing: A Review. 27 (1), 8.
124. You, J.-O., Rafat, M., Almeda, D., Maldonado, N., Guo, P., Nabzdyk, C.S., (2015) pH-responsive scaffolds generate a pro-healing response. *Biomaterials*. 57 22–32.
125. Wu, P., Fisher, A., Foo, P.P., Queen, D., Gaylor, J.D.S. (1995) In Vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings. 16 (3), 5.
126. Queen, D., Gaylor, J.D.S., Evans, J.H., Courtney, J.M., Reid, W.H. (1987) The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. *Biomaterials*. 8 (5), 367–371.
127. Xu, R., Xia, H., He, W., Li, Z., Zhao, J., Liu, B., (2016) Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. *Scientific Reports*. 6 (1), 24596.

128. Wenger, C.B. (1972) Heat of evaporation of sweat: thermodynamic considerations. *Journal of Applied Physiology*. 32 (4), 456–459.
129. Svensjö, T., Pomahac, B., Yao, F., Slama, J., Eriksson, E. (2000) Accelerated Healing of Full-Thickness Skin Wounds in a Wet Environment. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 106 (3), 602–612.
130. Malda, J., Rouwkema, J., Martens, D.E., Le Comte, E.P., Kooy, F.K., Tramper, J., (2004) Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs: measurement and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (1), 9–18.
131. Valentin, J.E., Freytes, D.O., Grasman, J.M., Pesyna, C., Freund, J., Gilbert, T.W., (2009) Oxygen diffusivity of biologic and synthetic scaffold materials for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 91A (4), 1010–1017.
132. Malda, J., Klein, T.J., Upton, Z. (2007) The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Engineering*. 13 (9), 2153–2162.
133. Ninan, N., Muthiah, M., Bt.Yahaya, N.A., Park, I.-K., Elain, A., Wong, T.W., (2014) Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 115 244–252.
134. Bishop, A. (2008) Role of oxygen in wound healing. 17 (9), 4.
135. Naseri-Nosar, M., Farzamfar, S., Sahrapeyma, H., Ghorbani, S., Bastami, F., Vaez, A., (2017) Cerium oxide nanoparticle-containing poly (ϵ -caprolactone)/gelatin electrospun film as a potential wound dressing material: In vitro and in vivo evaluation. *Materials Science and Engineering: C*. 81 366–372.
136. Unnithan, A.R., Gnanasekaran, G., Sathishkumar, Y., Lee, Y.S., Kim, C.S. (2014) Electrospun antibacterial polyurethane–cellulose acetate–zein composite mats for wound dressing. *Carbohydrate Polymers*. 102 884–892.
137. Kim, S.-H., Kwon, J.H., Chung, M.S., Chung, E., Jung, Y., Kim, S.H., (2006) Fabrication of a new tubular fibrous PLCL scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 17 (12), 1359–1374.
138. Jeong, S.I., Kim, S.H., Kim, Y.H., Jung, Y., Kwon, J.H., Kim, B.-S., (2004) Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 15 (5), 645–660.
139. Giridhar, G., Manepalli, R.K.N.R., Apparao, G. (2017) Contact Angle Measurement Techniques for Nanomaterials. in: *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, Elsevier, pp. 173–195.
140. Felice, B., Sánchez, M.A., Socci, M.C., Sappia, L.D., Gómez, M.I., Cruz, M.K., (2018) Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*. 93 724–738.
141. Vázquez, N., Sánchez-Arévalo, F., Maciel-Cerda, A., Garnica-Palafox, I., Ontiveros-Tlachi, R., Chaires-Rosas, C., (2019) Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings. *Biomedical Materials*. 14 (4), 045006.
142. Wenzel, R.N. (1936) Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry*. 28 (8), 988–994.
143. Perelygin, Yu.P., Chistyakov, D.Yu. (2006) Boric acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 79 (12), 2041–2042.
144. Zan, R., Hubbezoglu, I., Ozdemir, A.K., Tunc, T., Sumer, Z., Alici, O. (2013) Antibacterial Effect of Different Concentration of Boric acid against Enterococcus Faecalis Biofilms in Root Canal. *Marmara Dental Journal*. 5.
145. Boncler, M. (2014) Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 8.