



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

**DOKTORA
TEZİ**

**ELEKTRO-ÇEKİM YÖNTEMİYLE HAZIRLANAN
NANOLİF YARA ÖRTÜLERİNİN
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

SERDAR TORT

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2016



**ELEKTRO-ÇEKİM YÖNTEMİYLE HAZIRLANAN NANOLİF YARA
ÖRTÜLERİNİN İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Serdar TORT

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2016

Uzm. Ecz. Serdar Tort tarafından hazırlanan “Elektro-Çekim Yöntemiyle Hazırlanan Nanolif Yara Örtülerinin İn Vitro/İn Vivo Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Başkan :Prof. Dr.F. Nevin ÇELEBİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Üye :Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

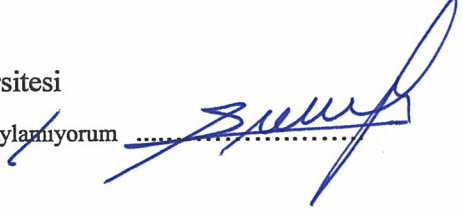
Üye :Prof. Dr. Erem BİLENSOY

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Üye :Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum 

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi durumda aleyhime olabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Serdar TORT

26/12/2016

ELEKTRO-ÇEKİM YÖNTEMİYLE HAZIRLANAN NANOLİF YARA ÖRTÜLERİNİN
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Serdar TORT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2016

ÖZET

Bu tezin amacı yara tedavisinde kullanmak üzere, elektro-çekim yöntemiyle üretilmiş yara örtüsü geliştirilmesi, in vitro karakterizasyonu ve in vivo etkinliğinin gösterilmesidir. Çalışmalarda kullanılan polimer çözeltilerinin viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi değerleri ölçülerek elektro-çekim işlemi açısından uygunluğu değerlendirilmiştir. Yara örtüsünün alt tabakasını oluşturan koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmı %1 polikaprolakton ve %4,5 kollajen, kabuk kısmı %2,5 doksisisiklin ve %2,5 polietilen oksit içermektedir. Orta tabaka kitozan, üst tabaka ise sodyum aljinat nanoliflerinden oluşmaktadır. Geliştirilen yara örtüsü paralel yerleşimli nanoliflerden oluşup, temas açısı 38° , sıçan derisinde biyoadezyon işi $0,485 \text{ mJ/cm}^2$, gerilme direnci $2,76 \text{ MPa}$, kopma uzaması %7,65, spesifik yüzey alanı $9,65 \text{ m}^2/\text{g}$ ve porozitesi %52,3'tür. İçerdiği doksisisiklin miktarı $260 \mu\text{g/cm}^2$ 'dir ve 15 dakikada etkin maddenin tamamı salınmaktadır. Yara örtüsünün alt ve üst yüzeyinin ayrı ayrı 2 saatlik UV radyasyonu ile sterilize edilmesi, mekanik, yapışma, ıslanabilirlik özelliklerini ve doksisisiklin miktarını etkilememiştir. Stabilitate çalışmaları sonucunda 4°C /ortam neminde 12 ay boyunca ortalama lif çapı, mekanik, biyoadezyon, temas açısı özellikleri ve doksisisiklin miktarı açısından stabil kaldığı bulunmuştur. Keratinosit hücre serileri kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmalarında sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Yara iyileşmesindeki etkinliği hem akut hem de diyabetik yara modeli oluşturulmuş sıçanlarda, ticari bir ürünle karşılaştırılarak gösterilmiştir. Yara örtüsü uygulanan grupların yara boyutu hem akut hem de diyabetik yara gruplarında 7. günde tedavisiz ve ticari ürün gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır. Hazırlanan yara örtüsü yara dokusunun malondialdehit ve nitrik oksit seviyelerini azaltarak iyileşmeye katkıda bulunmuştur. Ayrıca yara dokusunun glutatyon, askorbik asit ve süperoksit dismutaz seviyelerinin yükselmesini sağlayarak antioksidan kapasiteyi artırmıştır. Yara dokularında yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda doksisisiklin sayesinde matriks metalloproteinaz seviyelerinin azaldığı ve doku metalloproteinaz inhibitörü seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca vasküler endoteliyal büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü ve von Willebrand faktörü seviyelerinin artmasını sağlayarak anjiyogeneze yardımcı olmuştur. Yara örtüsünün hem inflamasyonu baskılayarak hem de kendisi bir antioksidan ajan olarak görev yaparak iyileşmeye katkıda bulunduğu, özellikle hiperglisemik sıçanlarda inflamatuvar fazın kısaltılması açısından ticari ürüne göre daha üstün olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma sonucunda hem akut hem de kronik yara tedavisinde kullanılabilecek etkin ve güvenli prototip bir yara örtüsü geliştirilmiştir.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Elektro-çekim, nanolif, kollajen, doksisisiklin, yara iyileşmesi
Sayfa Adedi : 260
Danışman : Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

IN VITRO/IN VIVO EVALUATION OF NANOFIBER WOUND DRESSINGS
PREPARED VIA ELECTROSPINNING METHOD

(Ph. D. Thesis)

Serdar TORT

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
December 2016

ABSTRACT

The purposes of this thesis are to develop a wound dressing by the electro-spinning method, and to determine the in vitro characteristics and to demonstrate in vivo efficacy. The viscosity, conductivity and the surface tension values of the polymer solutions used in the studies were measured and their suitability for electro-spinning was evaluated. The core of the coaxial nanofibers that constitutes the lower layer of the wound dressing contains 1% polycaprolactone and 4,5% collagen, the shell comprises 2,5% doxycycline and 2,5% polyethylene oxide. The middle and the top layer consist of chitosan and sodium alginate nanofibers, respectively. The developed wound dressing consists of aligned nanofibers, with a contact angle of 38°, a bioadhesion value of 0,485 mJ/cm² in rat skin, a tensile strength of 2,76 MPa, an elongation at break of 7,65%, a specific surface area of 9.65 m²/g and a porosity of 52,3%. The amount of doxycycline content was found to be 260 µg/cm² and the complete drug release was achieved in 15 minutes. Sterilization of the lower and the upper surface of the wound dressing separately with UV radiation for two hours did not affect the mechanical, bioadhesive, wettability properties and doxycycline content. As a result of the stability studies, it was found that the average fiber diameter, mechanical, bioadhesive, contact angle properties and the amount of doxycycline remained stable for a period of 12 months at 4°C/ambient humidity. No cytotoxic effect was shown in cell culture studies with keratinocyte cell lines. The efficacy in wound healing has been demonstrated in rats with both the acute and the diabetic wound models, compared to a commercial preparation. The wound size of the groups treated with wound dressing decreased significantly in both the acute and the diabetic wound groups on the 7th day, compared to the untreated group and the group treated with the commercial preparation. The prepared wound dressing was found to contribute to the healing process by decreasing malondialdehyde and nitric oxide levels. Furthermore, it increased the antioxidant capacity by rising glutathione, ascorbic acid and superoxide dismutase levels in the wound tissues. According to the immunohistochemical studies on wound tissues, it was found that doxycycline caused a decrease in matrix metalloproteinase levels and an increase in tissue inhibitor of metalloproteinase levels. It also improve angiogenesis by enhancing vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and von Willebrand factor levels. The wound dressing contributes to healing process probably by suppressing the inflammation and by acting as an antioxidant agent. Particularly, in hyperglycemic rats, it was found to be superior to the commercial preparation by shortening the inflammatory phase. In conclusion, an effective and safe prototype wound dressing has been developed that can be used in both acute and chronic wound treatment.

Science Code : 1020

Key Words : Electrospinning, nanofiber, collagen, doxycycline, wound healing

Page Number : 260

Supervisor : Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora ders ve tez dönemimde beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan; bilgisini ve desteğini esirgemeyen, akademi hayatımda her zaman örnek alacağım danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Füsün Acartürk**'e, ihtiyacım olduğu her zaman bana tecrübeleriyle yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Nevin Çelebi**'ye, doktora ders döneminde bilgi ve tecrübeleriyle tez döneminde ise ilgi ve destekleriyle yanımda olan Sayın **Prof. Dr. Sevgi Takka**'ya, Sayın **Prof. Dr. Figen Tırnaksız**'a ve Sayın **Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin**'e, emekli olsalar bile her zaman deneyimleriyle bana yol gösteren Sayın **Prof. Dr. Tuncer Değim** ve Sayın **Zelihağül Değim**'e, deneylerim sırasında yardımları beni yalnız hissettirmeyen **Arş. Gör. Dr. Ecz. Fatmanur Tuğcu Demiröz**'e, üniversitedeki ilk oda arkadaşım olduğu için kendimi şanslı hissettiğim ve beni her zaman sabırla dinleyip doğru kararlar vermemi sağlayan **Arş. Gör. Dr. Ecz. N.Başaran Mutlu Ağardan**'a, doktora dönemimde birçok başarıyı birlikte elde ettiğim ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayacağını bildiğim dostum **Arş. Gör. Alptuğ Eren Karaküçük**'e, doktora tezim boyunca her zaman yardımcı ve ilgili olan **Arş. Gör. Dr. Sibel İlbasmış Tamer**'e, **Arş. Gör. Dr. Tuba İnceçayır**'a ve **Arş. Gör. Dr. Şeyda Akkuş Arslan**'a, akademik hayatta uzun yıllar birlikte çalışmaktan gurur duyacağım bölümdeki diğer **asistan arkadaşlarıma**, bölüm sekretimiz **Fatma Çelik**'e, doktora tezimi “213M689” numaralı “Kronik yara tedavisinde etkili, elektro-çekim tekniği ile hazırlanmış nanolif yara örtülerinin geliştirilmesi” isimli proje kapsamında destekleyerek gerçekleşmesini sağlayan **TÜBİTAK**'a, projede in vivo deneylerde ve biyokimyasal çalışmalarda bilgi birikimi ve deneyimiyle yol gösteren Sayın **Prof. Dr. Şule Cevher**'e “Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi”, histolojik ve immunohistokimyasal çalışmaları birlikte tamamladığımız sayın **Prof. Dr. Candan Özoğul**'a “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi” ve hücre kültürü çalışmalarında yardımcı olan **Prof. Dr. Arzu Beşikci**'ye “Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi”, sterilizasyon testlerindeki yardımlarından dolayı **Prof. Dr. Sulhiye Yıldız**'a “Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi”, yüksek lisansa birlikte başladığım ve kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam **Prof. Dr. Tanver Doğanay**'a, en iyi şekilde yetişmemi sağlayan ve her zaman yanımda olan **aileme**, uzun ve zorlu bir süreçte tüm desteği ile yanımda olan **eşim Hilal**'e, doktorada başıma gelen en güzel olay olan **canım kızım Gülce**'ye ve **canım oğlum Mustafa Erdem**'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Elektro-Çekim Yöntemi	3
2.1.1. Elektro-çekim yöntemine etki eden parametreler	7
2.1.2. Polimer çözeltisinin özellikleri	7
2.1.3. İşlem koşulları.....	13
2.1.4. Ortam koşulları	15
2.2. Çekirdek/Kabuk Yapısındaki Koaksiyal Nanolifler	16
2.2.1. Koaksiyal elektro-çekim yöntemi.....	17
2.2.2. Emülsiyondan elektro-çekim yöntemi	21
2.3. Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları	21
2.3.1. Morfolojik özelliklerin incelenmesi.....	21
2.3.2. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	24
2.4. Nanoliflerin Farmasötik Teknoloji Açısından Avantajları	25
2.4.1. Çözünürlük/çözünme hızı artışı	29
2.4.2. Lokal uygulama	30

	Sayfa
2.4.3. Salım hızının ayarlanması.....	30
2.4.4. Stabilitede artış	33
2.5. Yara ve Evreleri	33
2.5.1. İnflamasyon evresi.....	34
2.5.2. Proliferasyon evresi	35
2.5.3. Yeniden şekillenme evresi	35
2.5.4. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve MMP doku inhibitörleri (TIMP).....	36
2.5.5. Yara iyileşmesinde rol oynayan diğer faktörler.....	37
2.5.6. Kronik yara	38
2.5.7. Doksisisiklin.....	39
2.6. Yara Modelleri	42
2.6.1. İnsizyonel yaralar.....	42
2.6.2. Eksizyonel yaralar.....	42
2.6.3. Yanık yaraları	43
2.6.4. Kronik yara modelleri.....	43
2.7. Yara İyileşmesinde İncelenen Oksidatif Parametreler	44
2.7.1. Malondialheit	44
2.7.2. Nitrik oksit	44
2.7.3. Glutatyon	44
2.7.4. Askorbik asit	45
2.7.5. Süperoksit dismutaz.....	45
2.8. Yara Örtüleri	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler	49
3.1.1. Kullanılan cihazlar	49

	Sayfa
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	49
3.1.3. İn vivo deneylerde kullanılan çözeltiler.....	50
3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları	51
3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri.....	51
3.2.2. İletkenlik ölçümleri.....	52
3.2.3. Viskozite ölçümleri.....	52
3.2.4. Yüzey gerilimi ölçümleri	53
3.3. Nanolif Üretimi Çalışmaları.....	54
3.3.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları.....	55
3.3.2. Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanması	61
3.3.3. Sonuç formülasyonların üretilmesi.....	65
3.4. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	66
3.4.1. FT-IR çalışması.....	66
3.4.2. Ortalama lif çapının hesaplanması.....	66
3.4.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	68
3.4.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi.....	69
3.4.5. Temas açılarının ölçülmesi	69
3.5. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	70
3.6. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	70
3.6.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri.....	70
3.6.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri.....	71
3.6.3. Doksisiklinin miktar tayini yöntemi ve analitik yöntem validasyonu	72
3.6.4. Doksisiklin salım hızı çalışmaları	73
3.7. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar	74
3.7.1. Nanoliflerde doksisiklin miktar tayini çalışmaları.....	74
3.7.2. UV sterilizasyon çalışmaları	75

	Sayfa
3.7.3. Stabilite çalışmaları.....	75
3.7.4. Hücre kültürü çalışmaları.....	77
3.8. İn Vivo Deneyler.....	78
3.8.1. Normoglisemik gruplar.....	80
3.8.2. Hiperglisemik gruplar	80
3.8.3. Yara modelinin oluşturulması.....	80
3.8.4. Yara örtülerinin uygulanması	83
3.8.5. Yara kapanması denetimi.....	85
3.8.6. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar	85
3.8.7. Doku örneklerinde histolojik çalışmalar.....	87
4. BULGULAR	91
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları	91
4.1.1. DSC çalışmaları	91
4.1.2. İletkenlik ölçümleri.....	94
4.1.3. Viskozite ölçümleri.....	95
4.1.4. Yüzey gerilimi ölçümleri	96
4.2. Nanolif Üretimi Çalışmaları.....	97
4.2.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları.....	97
4.2.2. Koaksiyal yapıda paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmaları	98
4.2.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi.....	101
4.2.4. PCL konsantrasyonunun belirlenmesi	106
4.2.5. Kitozan ve aljinat nanolif tabakalarının elde edilmesi.....	108
4.3. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	111
4.3.1. FT-IR çalışması.....	111
4.3.2. Ortalama lif çapının hesaplanması.....	113

	Sayfa
4.3.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	114
4.3.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi.....	115
4.3.5. Temas açılarının ölçülmesi	117
4.4. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	117
4.4.1. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	117
4.4.2. Yapışma özelliklerinin incelenmesi.....	118
4.4.3. Temas açılarının ölçülmesi	119
4.5. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	120
4.5.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri.....	120
4.5.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri.....	121
4.5.3. Doksisiklinin miktar tayini yöntem validasyonu	122
4.5.4. Doksisiklin salım hızı çalışmaları.....	127
4.6. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar	127
4.6.1. Miktar tayini çalışmaları.....	127
4.6.2. UV sterilizasyon çalışmaları.....	128
4.6.3. Stabilite çalışmaları.....	131
4.6.4. Hücre kültürü çalışmaları.....	135
4.7. İn Vivo Deneyler.....	136
4.7.1. Yara kapanması denetimi.....	136
4.7.2. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar	137
4.7.3. Doku örneklerinde histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar	160
5. TARTIŞMA	185
5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları	185
5.1.1. DSC çalışmaları	185
5.1.2. İletkenlik ölçümleri.....	185
5.1.3. Viskozite ölçümleri.....	187

	Sayfa
5.1.4. Yüzey gerilimi ölçümleri	188
5.2. Nanolif Üretim Çalışmaları.....	189
5.2.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları.....	189
5.2.2. Koaksiyal yapıda paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmaları	190
5.2.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi.....	190
5.2.4. PCL konsantrasyonunun belirlenmesi	191
5.2.5. Kitozan ve sodyum aljinat nanolif tabakalarının elde edilmesi	192
5.3. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	196
5.3.1. FT-IR çalışması.....	196
5.3.2. Ortalama lif çapının hesaplanması.....	196
5.3.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	197
5.3.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi.....	198
5.3.5. Temas açılarının ölçülmesi	199
5.4. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	199
5.4.1. Mekanik özelliklerin incelenmesi.....	199
5.4.2. Yapışma özelliklerinin ölçülmesi	200
5.4.3. Temas açılarının ölçülmesi	201
5.5. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	201
5.5.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri.....	201
5.5.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri.....	202
5.5.3. Doksisiklinin miktar tayini yöntem validasyonu	203
5.5.4. Doksisiklin salım hızı çalışmaları.....	203
5.6. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar	205
5.6.1. Nanoliflerde doksisiklin miktar tayini çalışması	205
5.6.2. UV sterilizasyon çalışmaları.....	205
5.6.3. Stabilite çalışmaları.....	207

	Sayfa
5.6.4. Hücre kültürü çalışmaları.....	209
5.7. İn Vivo Deneyler.....	209
5.7.1. Yara kapanması denetimi.....	209
5.7.2. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar	211
5.7.3. Histolojik ve immunohistokimyasal sonuçlar	221
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	227
KAYNAKLAR	231
EKLER.....	255
EK-1. Etik kurul onayı.....	256
ÖZGEÇMİŞ	257

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Elektro-çekim işleminde kullanılan bazı polimerler ve çözücülerі	8
Çizelge 2.2. Nanoliflere ilaç yükleme yöntemleri ve avantajları	26
Çizelge 2.3. İlaç yüklü nanolif uygulamalarına örnekler	28
Çizelge 3.1. Koaksiyal nanoliflerin işlem parametreleri	58
Çizelge 3.2. Paralel yerleşim çalışmalarında kullanılan hız parametreleri	60
Çizelge 3.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla hazırlanan koaksiyal nanolif formülasyonları	60
Çizelge 3.4. PCL konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla hazırlanan koaksiyal nanolif formülasyonları	61
Çizelge 3.5. PEO nanoliflerinin işlem parametreleri	63
Çizelge 3.6. Rasgele yerleşimli kitozan içeren nanolif formülasyonları	64
Çizelge 3.7. Rasgele yerleşimli sodyum aljinat içeren nanolif formülasyonları	64
Çizelge 3.8. Paralel yerleşimli sodyum aljinat ve kitozan nanoliflerinin işlem parametreleri	65
Çizelge 3.9. Sonuç formülasyonların bileşimi	65
Çizelge 3.10. İn vivo deney grupları	79
Çizelge 4.1. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının kondüktivite değerleri	94
Çizelge 4.2. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının viskozite değerleri	95
Çizelge 4.3. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının yüzey gerilimi değerleri	96
Çizelge 4.4. Hazırlanan formülasyonların ortalama lif çapları	113
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan doksisiklin çözeltilerinin geri elde çalışması sonuçları	125
Çizelge 4.6. Deney içi tekrarlanabilirlik sonuçları	125
Çizelge 4.7. Deneyler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	126
Çizelge 4.8. Farklı sterilizasyon sürelerinin B1 formülasyonu üzerine etkisi	130
Çizelge 4.9. 4°C/ortam neminde bekletilen B1 formülasyonunun stabilite test parametreleri	133

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. İki kat ambalajlanmış B1 formülasyonunun 25°C/%60 bağıl nemde stabilite test parametreleri	134
Çizelge 4.11. Normoglisemik sıçanlara ait biyokimyasal parametreler	138
Çizelge 4.12. Hiperglisemik sıçanlara ait biyokimyasal parametreler	149
Çizelge 4.13. Normoglisemik ve hiperglisemik gruplara ait immunohistokiyasal veriler	183

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı viskozitedeki PEO çözeltilerinden elde edilen nanolif görüntüleri.....	11
Şekil 2.2. Koaksiyal elektro-çekim işlemi (Li ve diğerleri, 2010).....	17
Şekil 2.3. Doksisiklin hiklatın kimyasal yapısı.....	40
Şekil 3.1. Üretilen yara örtüsünün şematik görüntüsü.....	54
Şekil 3.2. Koaksiyal nanoliflerin şematik görüntüsü.....	57
Şekil 3.3. Doku örneklerinin numaralandırılması.....	83
Şekil 4.1. Doksisiklin-PEO 1:1 karışımının DSC termogramı	91
Şekil 4.2. Doksisiklin-Kollajen 1:1 karışımının DSC termogramı	92
Şekil 4.3. Doksisiklin-PCL 1:1 karışımının DSC termogramı	92
Şekil 4.4. Doksisiklin-Sodyum aljinat 1:1 karışımının DSC termogramı	93
Şekil 4.5. Doksisiklin-Kitozan 1:1 karışımının DSC termogramı	93
Şekil 4.6. A22 formülasyonunun, etkin maddenin ve polimerlerin IR spektrumları.....	112
Şekil 4.7. Farklı kollajen konsantrasyonlarında kopma uzamasındaki değişim	114
Şekil 4.8. Farklı kollajen konsantrasyonlarında gerilme direncindeki değişim.....	114
Şekil 4.9. Farklı PCL konsantrasyonlarında kopma uzamasındaki değişim.....	115
Şekil 4.10. Farklı PCL konsantrasyonlarında gerilme direncindeki değişim	115
Şekil 4.11. Farklı PCL konsantrasyonlarının derinin iç kısmına yapışma özellikleri üzerine etkileri.....	116
Şekil 4.12. Farklı PCL konsantrasyonlarının derinin dış kısmına yapışma özellikleri üzerine etkileri.....	116
Şekil 4.13. Farklı PCL konsantrasyonlarının temas açısı özellikleri üzerine etkileri.....	117
Şekil 4.14. Farklı PCL oranlarında hazırlanmış formülasyonların kopma uzamasındaki değişim	118
Şekil 4.15. Farklı PCL oranlarında hazırlanmış formülasyonların gerilme direncindeki değişim	118
Şekil 4.16. Farklı PCL konsantrasyonlarındaki formülasyonların derinin iç kısmına yapışma özellikleri	119

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. B1 formülasyonunun tavşan ve sıçan derisinin iç kısmına yapışma özelliklerinin karşılaştırılması	119
Şekil 4.18. %1, %1,5 ve %2 oranında PCL içeren B1, B2 ve B3 formülasyonlarının temas açısı ölçümleri	120
Şekil 4.19. ImageJ programı kullanılarak hesaplanan porozite değerleri	120
Şekil 4.20. A24 ve B1 formülasyonlarının por çapı dağılımı ölçüm grafiği	121
Şekil 4.21. A23 ve B2 formülasyonlarının por çapı dağılımı ölçüm grafiği	121
Şekil 4.22. A23, A24, B1 ve B3 formülasyonlarının çok noktalı BET analizi sonuçları	122
Şekil 4.23. Seçicilik çalışmalarında elde edilen spektrumlar	123
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda (5-30 µg/ml) hazırlanan doksisisiklin çözeltilerinin UV spektrumları	124
Şekil 4.25. Doksisisiklin miktar tayini yöntemi doğrusallık çalışması	124
Şekil 4.26. Farklı formülasyonlardan doksisisiklinin salım grafikleri	127
Şekil 4.27. Miktar tayini çalışmasında elde edilen veriler	127
Şekil 4.28. Sitotoksisite çalışması sonuçları	135
Şekil 4.29. Normoglisemik sıçanlara ait yara kapanması değerleri	136
Şekil 4.30. Hiperglisemik sıçanlara ait yara kapanması değerleri	137
Şekil 4.31. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen MDA değerleri	139
Şekil 4.32. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen NO değerleri	141
Şekil 4.33. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen GSH değerleri	143
Şekil 4.34. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen AA değerleri	145
Şekil 4.35. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen SOD değerleri	147
Şekil 4.36. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen MDA değerleri	150
Şekil 4.37. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen NO değerleri	152
Şekil 4.38. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen GSH değerleri	154
Şekil 4.39. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen AA değerleri	156
Şekil 4.40. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen SOD değerleri	158

Şekil	Sayfa
Şekil 4.41. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (X40)	160
Şekil 4.42. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (X100); yara kabuğu (K), kanama bölgesi (P).....	161
Şekil 4.43. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (X40).....	163
Şekil 4.44. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (X100).....	163
Şekil 4.45. Normoglisemik gruplarda VEGF işaretlemesi	167
Şekil 4.46. Normoglisemik gruplarda vWF antikor işaretlemesi	168
Şekil 4.47. Normoglisemik gruplarda bFGF işaretlemesi	169
Şekil 4.48. Normoglisemik gruplarda MMP-2 işaretlemesi	170
Şekil 4.49. Normoglisemik gruplarda MMP-9 işaretlemesi	171
Şekil 4.50. Normoglisemik gruplarda TIMP-1 işaretlemesi.....	172
Şekil 4.51. Normoglisemik gruplarda TIMP-2 işaretlemesi.....	173
Şekil 4.52. Normoglisemik gruplarda IL-8 antikor işaretlemesi	174
Şekil 4.53. Hiperglisemik gruplarda VEGF işaretlemesi.....	175
Şekil 4.54. Hiperglisemik gruplarda vWF işaretlemesi	176
Şekil 4.55. Hiperglisemik gruplarda bFGF işaretlemesi.....	177
Şekil 4.56. Hiperglisemik gruplarda MMP-2 antikor işaretlemesi	178
Şekil 4.57. Hiperglisemik gruplarda MMP-9 işaretlemesi	179
Şekil 4.58. Hiperglisemik gruplarda TIMP-1 işaretlemesi	180
Şekil 4.59. Hiperglisemik gruplarda TIMP-2 işaretlemesi	181
Şekil 4.60. Hiperglisemik gruplarda IL-8 işaretlemesi.....	182

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. İğne ucundaki damlanın şeklinde artan voltajla görülen değişim	4
Resim 2.2. Jetin toplayıcı kısıma ilerlerken davranışı.....	4
Resim 2.3. Floresan işaretlenmiş albumin içeren nanoliflerin floresan mikroskop görüntüsü.....	6
Resim 2.4. PCL/PEO nanoliflerine yüklenmiş polen görüntüsü.....	7
Resim 2.5. Polimer konsantrasyonundaki artışın lif oluşumu üzerine etkileri.....	9
Resim 2.6. Molekül ağırlığındaki değişimin lif oluşumu üzerine etkileri.....	10
Resim 2.7. Farklı çözücülerle hazırlanmış PVP nanoliflerin SEM görüntüleri	12
Resim 2.8. Farklı voltaj değerlerinde hazırlanmış nanoliflerin SEM görüntüleri	13
Resim 2.9. Farklı akış hızında elde edilmiş nanoliflerin SEM görüntüleri	14
Resim 2.10. Farklı değerlerde toplayıcı kısım-enjektör ucu arasındaki mesafe ile elde edilen nanoliflerin SEM görüntüleri	15
Resim 3.1. Asılı damla metodu ile yüzey gerilimi ölçümü	53
Resim 3.2. Toplayıcı kısmı döner silindir olan koaksiyal elektro-çekim cihazı	56
Resim 3.3. TEM görüntüleri alınması amacıyla alüminyum folyoya grid uygulanması	59
Resim 3.4. Toplayıcı kısmı sabit plaka olan elektro-çekim cihazı.....	62
Resim 3.5. Elde edilen nanolif yara örtüleri.....	66
Resim 3.6. ImageJ programı ile skala ayarlanması	67
Resim 3.7. ImageJ programı ile nanolif çap ölçümü.....	68
Resim 3.8. Hazırlanan formülasyonların mekanik özelliklerinin Texture Analyzer cihazı ile incelenmesi	68
Resim 3.9. Temas açısı ölçüm cihazı	70
Resim 3.10. ImageJ programı ile porozite ölçümü	71
Resim 3.11. Salım hızı çalışmalarında kullanılan disk üzerinde palet yöntemi.....	74
Resim 3.12. Miktar tayini çalışmalarında alınan kesitler	75

Resim	Sayfa
Resim 3.13. Stabilite testleri için tek kat ambalajlanmış B1 formülasyonu.....	76
Resim 3.14. Stabilite testleri için iki kat ambalajlanmış B1 formülasyonu	77
Resim 3.15. Anestezi sağlanan hayvanlarda tam kalınlıkta eksizyonel yara oluşturulması	81
Resim 3.16. Punch yardımıyla kesilen derinin çıkartılması	81
Resim 3.17. Tam kalınlıkta eksizyonel yaraların yakından görünümü	82
Resim 3.18. Nanolif yara örtüsü uygulanmış sıçan görüntüsü - 1	84
Resim 3.19. Nanolif yara örtüsü uygulanmış sıçan görüntüsü - 2	84
Resim 3.20. Ticari piyasa preparatı uygulanmış sıçan	85
Resim 3.21. Sağlıklı deri histolojisi	88
Resim 3.22. Örnek reepitelizasyon skorlaması.....	89
Resim 4.1. A1 formülasyonu TEM görüntüsü.....	97
Resim 4.2. A2 formülasyonu TEM görüntüsü.....	97
Resim 4.3. A3 formülasyonu TEM görüntüsü.....	97
Resim 4.4. A4 formülasyonu TEM görüntüsü.....	98
Resim 4.5. A5 formülasyonu TEM görüntüsü.....	98
Resim 4.6. A5-1 formülasyonuna ait SEM görüntüsü.....	99
Resim 4.7. A5-2 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	99
Resim 4.8. A5-3 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	100
Resim 4.9. A5-4 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	100
Resim 4.10. A5-5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	101
Resim 4.11. A6 formülasyonu TEM görüntüsü.....	101
Resim 4.12. A7 formülasyonu TEM görüntüsü.....	102
Resim 4.13. A8 formülasyonu TEM görüntüsü.....	102
Resim 4.14. A9 formülasyonu TEM görüntüsü.....	102
Resim 4.15. A10 formülasyonu TEM görüntüsü.....	103
Resim 4.16. A11 formülasyonu TEM görüntüsü.....	103

Resim	Sayfa
Resim 4.17. A12 formülasyonu TEM görüntüsü.....	103
Resim 4.18. A13 formülasyonu TEM görüntüsü.....	104
Resim 4.19. A14 formülasyonu TEM görüntüsü.....	104
Resim 4.20. A15 formülasyonu TEM görüntüsü.....	104
Resim 4.21. A16 formülasyonu TEM görüntüsü.....	105
Resim 4.22. A17 formülasyonu TEM görüntüsü.....	105
Resim 4.23. A18 formülasyonu TEM görüntüsü.....	105
Resim 4.24. A19 formülasyonu TEM görüntüsü.....	106
Resim 4.25. A20 formülasyonu TEM görüntüsü.....	106
Resim 4.26. A21 formülasyonu TEM görüntüsü.....	106
Resim 4.27. A22 formülasyonu TEM görüntüsü.....	107
Resim 4.28. A23 formülasyonu TEM görüntüsü.....	107
Resim 4.29. A24 formülasyonu TEM görüntüsü.....	107
Resim 4.30. PEO1 formülasyonunun SEM görüntüleri.....	108
Resim 4.31. PEO2 formülasyonunun SEM görüntüleri.....	108
Resim 4.32. PEO3 formülasyonunun SEM görüntüleri.....	108
Resim 4.33. PEO-CH1 formülasyonunun SEM görüntüleri.....	109
Resim 4.34. PEO-CH2 formülasyonunun SEM görüntüleri.....	109
Resim 4.35. PEO-SA1 formülasyonunun SEM görüntüleri	110
Resim 4.36. PEO-SA2 formülasyonunun SEM görüntüleri	110
Resim 4.37. Paralel yerleşimli PEO-CH1 nanoliflerinin SEM görüntüsü.....	111
Resim 4.38. Paralel yerleşimli PEO-SA1 nanoliflerinin SEM görüntüsü	111
Resim 4.39. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 1 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri	128
Resim 4.40. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 2 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri	129

Resim	Sayfa
Resim 4.41. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 3 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri	130
Resim 4.42. Farklı koşullarda bekletilen B1 formülasyonunun 3 ay sonundaki görüntüsü.....	131
Resim 4.43. Farklı ortamlarda bekletilen B1 formülasyonunun 3 ay sonundaki SEM görüntüsü.....	132
Resim 4.44. 4°C/ortam neminde bekletilen B1 formülasyonunun SEM görüntüleri	133
Resim 4.45. İki kat paketlenmiş B1 formülasyonunun farklı ortamlarda 3 ay bekledikten sonra görüntüsü	134
Resim 4.46. İki kat paketlenmiş B1 formülasyonunun 25°C/%60 bağıl nemde 3 ay ve 6 ay bekledikten sonra SEM görüntüsü	135
Resim 4.47. Normoglisemik sıçanlara ait yara görüntüleri	136
Resim 4.48. Hiperglisemik sıçanlara ait yara görüntüleri.....	137

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μS	Mikrosiemens
a/h	Ağırlık/hacim
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
cPs	Santipoise
dl	Desilitre
kV	Kilovolt
mg	Miligram
mJ	Milijoule
ml	Mililitre
MPa	Megapaskal
N	Newton
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
rpm	1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı
s	Saat
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
AA	Askorbik asit
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
DCM	Diklorometan

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
Doks	Doksisiklin
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
ECM	Ekstraselüler matris
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GAA	Glasiyal asetik asit
GSH	Glutasyon
H&E	Hemotoksilen eozin boyama
HFIP	Hekzafloro-2-propanol
IL	İnterlökin
iv	İntravenöz
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriks metalloproteinaz
NO	Nitrik oksit
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil prolidon
ROS	Spesifik oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TIMP	Doku metalloproteinaz inhibitörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
USP	Amerikan Farmakopesi

Kısaltmalar**Açıklamalar****UV**

Ultraviyole

VEGF

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

vWF

von Willebrand faktörü

1. GİRİŞ

Nanolifler, çapları 1 mikronun altında olan liflere verilen isimdir. Nanolifler kalınlık açısından insan saç teli ile karşılaştırıldığında yaklaşık onbin kat daha incedir. Bu nedenle sentetik veya doğal polimerlerden elde edilen nanolifler, kullanıldığı ürünlere geniş yüzey alanı, yüksek gözeneklilik ve permeabilite gibi özellikler kazandırmaktadır. Nanoliflerle hazırlanan ürünlerin filtrasyon, tekstil mühendisliği, doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri, yara örtüleri, optoelektronik, manyetik cihazlar gibi farklı alanlarda geniş uygulama olanağı bulunmaktadır.

Polimerlerden nanolif üretimi farklı yöntemlerle yapılabilmektedir. Elektro-çekim (elektro eğirme) yöntemi, nanoliflerin tek basamakta, düşük maliyetle kısa sürede elde edilmesine imkan vermektedir. Bu yöntemde temel olarak bir polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanarak elektriksel alanda jetler oluşturulur ve oluşan jetlerin topraklanmış bir toplayıcıya hareketi esnasında çözücüsünün buharlaşması ile nanolif yapısı elde edilir. Klasik elektro-çekim yönteminden farklı olarak koaksiyal başlık kullanımı ile çekirdek-kabuk yapısında koaksiyal yapıda nanoliflerin elde edilmesi mümkündür.

Yara iyileşmesi bozulan doku bütünlüğünün iç içe geçmiş süreçlerle yeniden sağlanmasıdır. İyileşmenin devamlı ve normal süreçlerde gerçekleştiği yaralar akut yara olarak adlandırılırken, iyileşmenin lokal veya sistemik bir faktör nedeniyle geciktiği veya olmadığı yaralar kronik yara olarak adlandırılır. Hem akut hem de kronik yaralarda uygun yara örtülerinin kullanılması ile iyileşme hızlandırılmaktadır.

Nanoliflerden oluşan yara örtüleri klasik yara bakım ürünlerine kıyasla bazı avantajlara sahiptirler. Nanolifler oluşumlarına bağlı olarak geniş yüzey alanı ve 3 boyutlu mikroporöz yapıya sahiptirler. Bu sayede memeli dokuları içindeki hücrelerin arasında bulunan ve onları destekleyen kompleks bir yapı olan ekstraselüler matrisi (ECM) taklit edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca nanolif yara örtüleri mikroporöz yapıda oldukları için oksijene geçirgendirler. Ancak bu porlar ekzojen bakterilerin yaraya penetrasyonunu engelleyecek ölçüde de küçüktür ve bu sayede yarayı bakteriyel penetrasyondan ve dehidratasyondan koruyabilirler. Nanolifler spesifik yüzey alanının yüksek olması sayesinde yara sıvısının drenajını ve adsorbe olmasını sağlar. Elde edilen nanoliflerin esnek ve kesilip şekillendirilebilir olması bölgeye özgü uygulamalar için avantaj sağlar. Yara örtüsü için

uygun olan dokunmamış (non-woven) formda üretilirler. Yaranın korunmasının yanısıra terapötik ajanların lokal uygulanması sağlanır.

Doksisiklinin antibakteriyel etkisinden bağımsız olarak yara iyileştirici etkisi bulunmaktadır. Bu yara iyileştirici etkisi temel olarak çift değerlikli metal iyonlarına bağlanarak yara bölgesinde matriks metalloproteinazlardan (MMP) çinkoyu ayırması ve aktif MMP'lerin doğrudan inhibisyonunu sağlaması ile ilişkilidir. Özellikle kronik yaralarda, yara iyileşmesinde temel oluşturan matriks proteinleri ile büyüme faktörlerini parçalayan MMP enzim miktarı artar, buna karşın doku metalloproteinaz inhibitör (TIMP) enzim seviyeleri azalır. Yüksek MMP seviyesi ve MMP/TIMP oranının bozulması yaranın kronikleşmesine neden olmaktadır.

Çalışmanın amacı, elektro-çekim yöntemi kullanılarak nanolif yapısında yara örtüsü geliştirilmesidir. Üç tabakalı olarak hazırlanan nanoliflerin, koaksiyal nanoliflerden oluşan alt tabakasının çekirdek kısmında ECM proteinlerinden kollajen, kabuk kısmında ise bir MMP inhibitörü olan doksisiklin yer almaktadır. Yara örtüsünün orta tabakasını kitozan, üst tabakasını ise sodyum aljinat nanolifleri oluşturmaktadır. Yara üzerine uygulandığı zaman önce yara iyileştirici polimerlerin (sodyum aljinat ve kitozan) yara sıvısına karışacağı, daha sonra doksisiklinin MMP inhibisyonu yaparak kollajen yıkımını önleyeceği düşünülmektedir. Koaksiyal nanolifin çekirdek kısmında bulunan kollajenin ise yara dokusunda ECM benzeri yapı oluşturarak hücre çoğalması için uygun bir ortam yaratacağı düşünülmektedir. Hazırlanan yara örtüsünün in vitro karakterizasyon çalışmalarından sonra, in vivo çalışmalarla hem akut ve hem de kronik yarada etkinliği değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

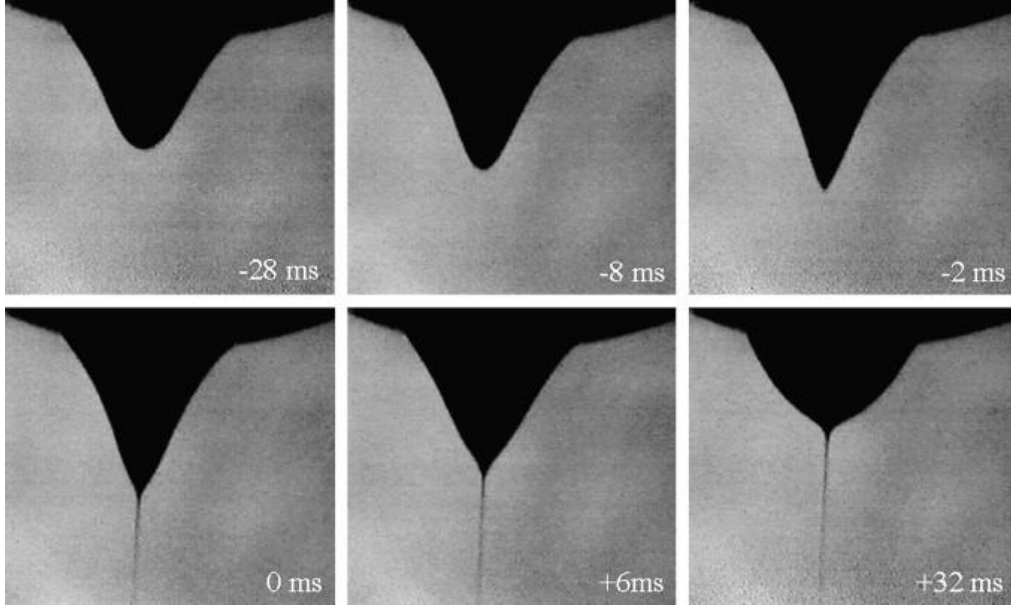
2.1. Elektro-Çekim Yöntemi

Elektro-çekim yöntemi, doğal ya da sentetik polimerlerden lif elde edilmesi için elektriksel kuvvetlerin kullanıldığı bir üretim yöntemidir (Chronakis, 2010). Mekanik kuvvetler yardımıyla elde edilen liflerin çapları 5-500 mikron arasında değişirken, elektro-çekim yöntemi ile elde edilen liflerin çapları 100 nm ile 1 mikron arasında değişir ve nanolif olarak adlandırılır (Kozanoğlu, 2006; Lin ve diğerleri, 2012). Nanoliflerin temel avantajı kütle başına düşen yüzey alanı oranının yüksek olmasıdır. Elektro-çekim yöntemiyle elde edilen nanolifler, diğer yöntemlerden farklı olarak kullanıldığı ürünlere daha geniş yüzey alanı, daha çok gözeneklilik, ayarlanabilir gözenek boyutu ve yüzey özellikleri, yüksek permeabilite ve elektriksel yükleri tutma kabiliyeti verebilmektedir (Li ve diğerleri, 2005; Luong-Van ve diğerleri, 2006; Natsu ve diğerleri, 2010; Aduba ve diğerleri, 2013; Gautam ve diğerleri, 2013). Bu özelliklerinden dolayı nanoliflerden elde edilen yüzeyler doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri, filtrasyon, yara örtüleri, optoelektronik, manyetik cihazlar gibi farklı alanlarda geniş uygulama olanağı bulmaktadır.

Elektro-çekim yöntemi birçok polimerle laboratuvar ölçeğinde üretime elverişlidir ve pahalı olmayan cihazlarla üretime olanak sağlamaktadır. Elektro-çekim düzeneği temel olarak 3 kısımdan oluşur: (Huang ve diğerleri, 2003; Chung ve Park, 2007)

1. Alternatif veya doğru akım yüksek voltaj güç kaynağı,
2. Metal ya da plastik enjektör bağlanmış besleme ünitesi,
3. Toplayıcı kısım.

Elektro-çekim işleminde farklı yollarla oluşan etkileşmeler sonucu polimer çözeltisinden elektriklenmiş jetler meydana gelmektedir. Bu etkileşmeler yüzeylerarası kuvvetlerin ve elektriksel yüklerin birbirleri ile karşılıklı etkileşmesi ile gerçekleşmektedir. Polimer çözeltisinin yüzeyinde elektrik potansiyeli yeterli yüksek seviyeye ulaştığında, elektriksel kuvvetlerin yüzey gerilimini baskılayacak şekilde davranırlar. Kritik voltaj seviyesine ulaşıldığında iğne ucunda küresel şekilde oluşan polimer çözeltisi damlası Taylor konisi şeklini alır (Resim 2.1).



Resim 2.1. İğne ucundaki damlanın şeklinde artan voltajla görülen değişim (Reneker ve Yarin, 2008)

Bu durumda voltajdaki en küçük artışla yüklenmiş jet, toplayıcı kısma doğru harekete geçer. İğnenin ucundan ayrılan jet, Coulomb kuvvetleri ile hızlanır. Jet havada ilerlerken çözücünün buharlaşması ile toplayıcı üzerine nanoliflerin katı durumda yerleşmesi sağlanır (Resim 2.2).



Resim 2.2. Jetin toplayıcı kısma ilerlerken davranışı (Reneker ve Yarin, 2008)

Nanolifin azalan çapıyla ters orantılı olarak yüzey alanında artış söz konusudur. Geleneksel yöntemlerle elde edilen nanoliflerin yüzey alanı 1 gram polimer için 1 m^2 iken, elektroçekim yöntemiyle $600 \text{ m}^2/\text{g}$ 'a kadar çıkabilmektedir (Ko, 2004:1-18). Nanoliflerin oluşması oldukça hızlı bir şekilde, milisaniye ölçeğinde gerçekleşmektedir.

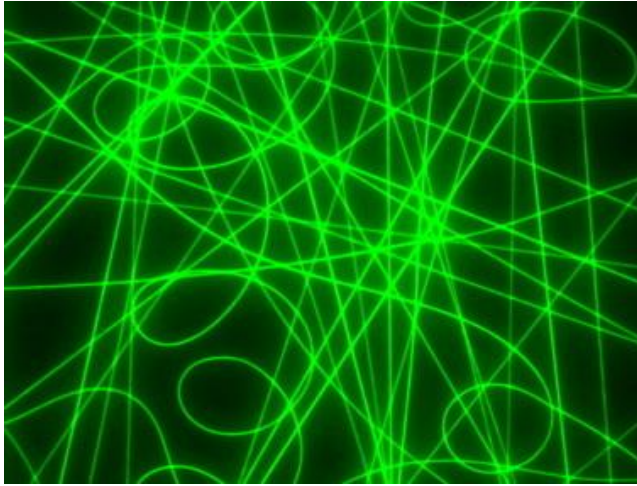
Elektro-çekim işleminde elektriksel yükler pozitif/negatif iyonlar halindedir ve iyonların fazla ya da dengesiz olması elektro-çekim işleminin aksamasına yol açabilir. Bütün iyonik çözeltiler yüklü molekül veya iyon içermesine rağmen çözeltideki pozitif ve negatif iyon sayısı eşit olduğu için elektriksel açıdan nötrdür. Elektro-çekim işlemini sağlayan iyonlar genellikle metalik toplayıcı ile çözeltideki moleküllerin arasındaki elektriksel alanda oluşturulur. Önce çözeltiden metal toplayıcıya doğru hareket eden elektronlar tarafından fazla negatif iyonlar oluşturulur. Çözeltiden metal toplayıcıya jet oluşumu ile hareket eden elektronlar pozitif iyonları çözeltide bırakırlar. Bu olay bir kere başlatılırsa iyonların, benzer yüklenmiş fazla iyonlar arasındaki itici etkileşimi azaltmak ve bu elektriksel potansiyeli sıvının tüm yüzeylerinde sağlamak için hareketi ve iletimi devamlı olur. Bu da elektro-çekim işleminin sürekli olmasını sağlamaktadır.

Elektro-çekim sistemi kurulumu basit olmasına rağmen üretim esnasında gerçekleşen Taylor konisi teorisi, eğirme kararsızlığı teorisi (Bending Instability Theory) ve elektriksel kuvvet jeti-stabilite teorileri (Electrically Forced Jet-Stability Theory) gibi elektro-çekim teorileri oldukça karmaşıktır (Reneker ve diğerleri, 2000; Hohman ve diğerleri, 2001a, 2001b; Shin ve diğerleri, 2001; Yarin ve diğerleri, 2001; Feng, 2003). Bu teoriler elektro-çekim işleminin mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamakta, ayrıca araştırmacılara yeni elektro-çekim cihazları ve ekipmanları geliştirerek nanolif yapısının performansının kontrol edilmesinde kolaylık sağlamaktadır.

Nanoliflerin hazırlanması için genellikle polimer çözeltileri veya polimer çözeltilerinin karışımları kullanılır. Bunun haricinde polimer eriyiğinden de elektro-çekim işlemi yapılabilir. Birçok polimer eriyiğinin buhar basıncının çok düşük olması vakum altında elektro-çekim işleminin mümkün olmasını sağlamıştır. Hava yerine vakum altında daha yüksek değerlerde elektriksel alan elde edilebilir. Hava ortamında 30 kV/cm değerinin üzerine çıkıldığında kıvılcım oluşabilirken vakum altında kıvılcım gözlenmez. Daha yüksek elektriksel alan elektriksel kuvvetlerin polimer eriyiğinin yüksek viskozitesinin ve elastisitesinin üstesinden gelmesini sağlayacaktır. Çözeltiden elde edilen jetler gibi eriyik jetleri de Taylor konisi oluştururlar. Polimer eriyiğinden çıkan jetlerin toplayıcı levhaya hareket ederken hızı, çözeltiden çıkan jetlere kıyasla daha yavaştır. Vakum ortamında oluşan jetlerin katılaşması çözeltiden elde edilen jetlere kıyasla daha yavaştır. Polimer eriyiği ile elektro-çekim işleminde çözücüye ihtiyaç duyulmaması bir avantaj oluşturmaya rağmen, literatürdeki nanolif üretim çalışmalarının çok azı polimer eriyiği

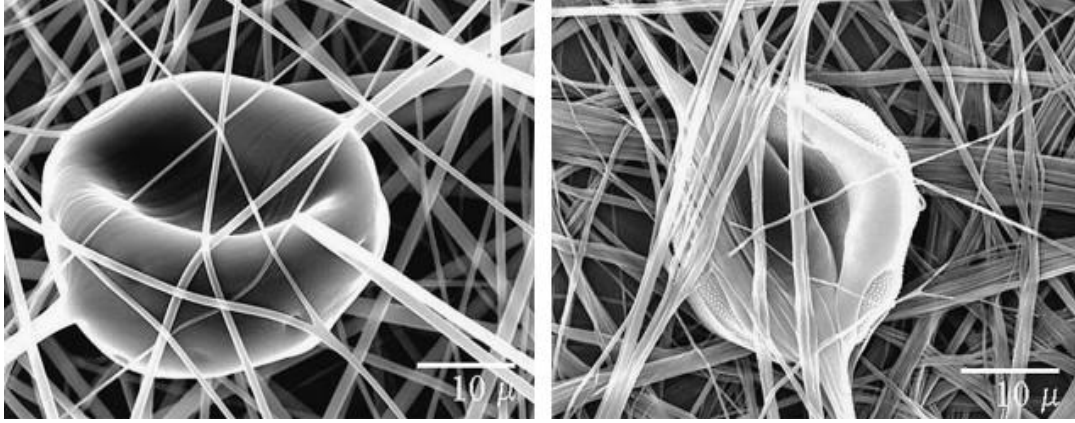
kullanılarak yapılmıştır. Bunun nedenleri polimer eriyiğinden nanolif üretiminin düşük verimli olması, daha karmaşık cihazlara ihtiyaç duyulması, az sayıda polimerin test edilmiş olması ve birçok polimerin termal stabilitesinin olmamasıdır.

Polimer nanolifleri çok ince olmalarına karşılık, birçok polimer molekülünü çeşitli morfolojik formlarda içerirler. Birçok biyolojik kolloidal partikül ve kimyasal ajan, polimer, polimer karışımı ya da kopolimer nanolifleri ile kaplanabilir. Polimer çözeltisinde disperse olan ya da çözünen birçok madde jetin içinde jetle birlikte hareket eder ve çözücü buharlaşınca nanolifin içinde yer alır. Yeşil floresan ile işaretlenmiş albumin moleküllerini içeren polietilen oksazolin nanolifleri ile yapılmış bir çalışmada floresan mikroskop altında albuminin nanoliflerde homojen dağıldığı gözlenmiştir (Resim 2.3) (Reneker ve Yarin, 2008).



Resim 2.3. Floresan işaretlenmiş albumin içeren nanoliflerin floresan mikroskop görüntüsü

Polimer çözeltisinde çözünebilen ya da süspande edilebilen her madde elektro-çekim işlemi için uygundur. Eğer partikülün boyutu nanolifin çapından daha büyükse jet anlık olarak partikülü enkapsüle etmek için genişler ve tekrar nano ölçekli boyutuna geri döner. Örneğin, polikaprolakton ve polietilen oksazolinin alkoldeki çözeltisinde polen karışımı hazırlanmış ve nanolifler elde edilmiştir. Bu çalışmada 10 mikrometre büyüklüğündeki polenler, çapı 100 nm olan nanolifler tarafından enkapsüle edilmiştir (Reneker ve Yarin, 2008) (Resim 2.4).



Resim 2.4. PCL/PEO nanoliflerine yüklenmiş polen görüntüsü (Reneker ve Yarin, 2008)

Bu nedenle elektro-çekim yöntemi partikülleri korumak, hücreleri, organelleri, molekülleri, virüsleri, kolloidal partikülleri, sıvı damlacıkları, polenleri, sporları ve diğer birçok biyolojik maddeleri polimer içine enkapsüle etmek için uygun bir yöntemdir.

2.1.1. Elektro-çekim yöntemine etki eden parametreler

Elektro-çekim yöntemiyle elde edilen nanoliflerin morfolojilerine etki eden parametreleri genel olarak üç kısma ayırabiliriz. Bunlar polimer çözeltisinin özellikleri, işlem koşulları ve ortam koşullarıdır (Chronakis, 2010:264-266; Kanani ve Bahrami, 2010). Bu parametrelerin hepsi liflerin morfolojilerine etki etmektedir. Dolayısıyla bu parametrelerin kontrol altında tutulması ile istenilen özellikte ve çapta nanolifler elde edilebilecektir.

2.1.2. Polimer çözeltisinin özellikleri

Elektro-çekim yöntemi ile nanoliflerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. Bu amaçla sıkça kullanılan bazı polimerler ve çözücüler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Elektro-çekim işleminde kullanılan bazı polimerler ve çözücüler

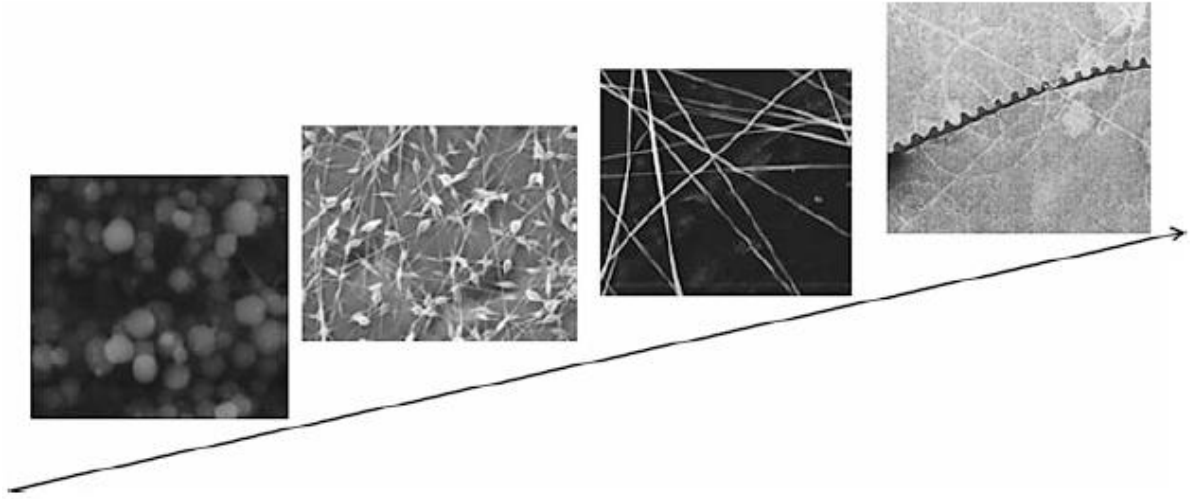
Polimer	Çözücü
Polistiren	Dimetil formamit (DMF)
Poli (3-hidroksibütirat-ko-poli (3-hidroksivalerat))	Kloroform
Polikaprolakton	Diklorometan/DMF
Polietilen oksit	Su/kloroform
Poli (metil metakrilat)	Toluen/DMF
Selüloz asetat	Aseton
Naylon 6	DMF, m-krezol, formik asit
Polivinil klorür	DMF, tetrahidrofuran (THF)
Jelatin	Glasiyal asetik asit
Polikarbonat ve poli ürean	İsopropil alkol, DMF, THF
Poliakrilonitril	DMF
Polietilen teraftalat	Diklorometan/trifloro asetik asit
Polietilen naftalat	o-klorofenol/o-klorobenzen
Poli (etilen-ko-vinil asetat)	Kloroform
Polilaktik asit	Kloroform
Dekstran	Su
Poli-l-laktit	Diklorometan
İpek	Formik asit/heksafloro izoprapanol
Polivinil alkol	Su
Kitozan	Trifloroasetik asit
Polibenzimidazol	N,N-dimetil asetamid
Poli (laktik asit)/poli (glikolik asit)	Diklorometan

Konsantrasyon

Polimer çözeltisinin konsantrasyonu lif oluşumu sırasında oldukça önemli role sahiptir. Düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona gidildiği zaman aşağıdaki durumlar oluşacaktır: (Li ve Wang, 2013:15-28) (Resim 2.5)

1. Konsantrasyon çok düşük olursa polimerik mikro/nano-partiküller oluşabilir. Bu da elektro-çekim yerine elektro-püskürtme işleminin gerçekleşmesine neden olacaktır.
2. Konsantrasyon biraz daha yüksek olursa boncuk ve liflerden oluşan bir karışım meydana gelecektir.
3. Konsantrasyon uygun hale geldiğinde nanolifler oluşacaktır.

Eğer konsantrasyon çok yüksek olursa nano-ölçekli değil heliks-yapılı mikro-şeritler oluşabilecektir.

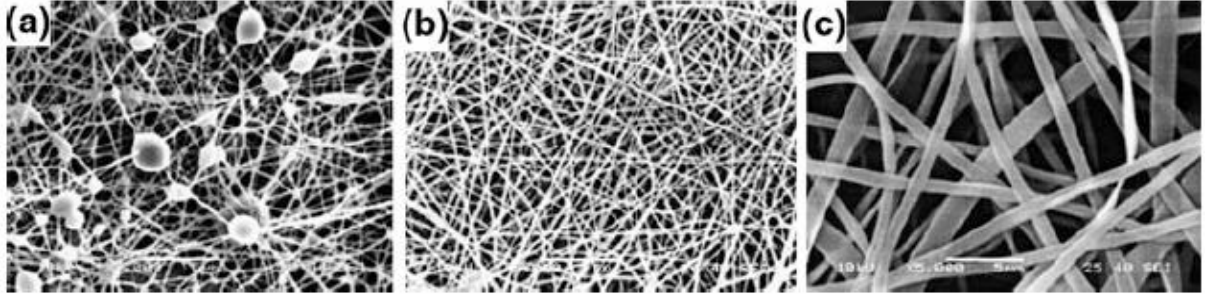


Resim 2.5. Polimer konsantrasyonundaki artışın lif oluşumu üzerine etkileri (Li ve Wang, 2013:15-28)

Genellikle polimer çözeltisinin konsantrasyonundaki artış lifin yapısına giren madde miktarını artıracığı için lif çapında artışa neden olmaktadır. Ancak polimer konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak viskozitenin artması ile akışın yavaşlaması söz konusu olabilmektedir. Bu da iğne ucunda damlanın kurumasına ve akışın durmasına neden olabilir.

Molekül ağırlığı

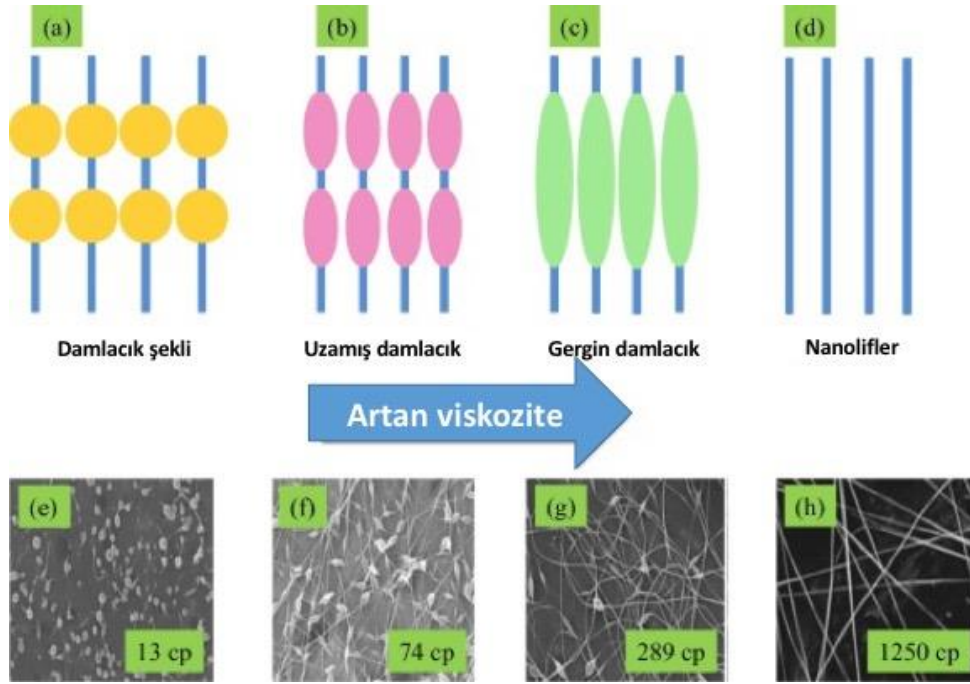
Polimerin molekül ağırlığının liflerin morfolojileri üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Molekül ağırlığı çözeltideki polimer zincirlerinin karmaşılaşmasını yansıtmaktadır. Çözeltinin konsantrasyonunun sabit tutulduğu varsayılırsa polimerin molekül ağırlığındaki azalma ile oluşan yapı, düzgün lif yapısından boncuklu yapıya dönüşecektir. Molekül ağırlığındaki artış düzgün lif yapısının oluşmasına, ancak yüksek orandaki artış ise mikrosferit yapısının oluşmasına neden olacaktır. Resim 2.6'da PVA'nın farklı molekül ağırlığındaki tiplerinden %25 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden elde edilen nanolif yapıları görülmektedir (Koski ve diğerleri, 2004; Zhao ve diğerleri, 2005).



Resim 2.6. Molekül ağırlığındaki değişimin lif oluşumu üzerine etkileri a) 9000-10000g/mol b) 13000-23000g/mol c) 31000-50000g/mol (Koski ve diğerleri, 2004)

Viskozite

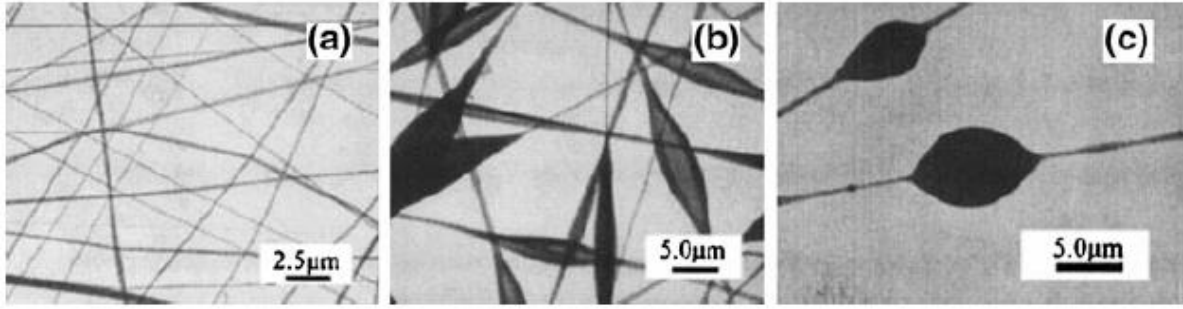
Çözeltinin viskozitesi lif morfolojisinde kritik bir parametredir (Sukigara ve diğerleri, 2003). Devamlı ve düzgün yapılı lifler çok düşük viskozitede oluşmazlar. Ayrıca çok yüksek viskozite de çözeltinin akışını zorlaştıracaktır. Dolayısıyla polimer çözeltisinin uygun viskoziteye sahip olması gerekmektedir. Genellikle çözeltinin viskozitesi polimer konsantrasyonu ile ayarlanabilmektedir. Polimer çözeltisinin viskozitesinin düşük olduğu durumlarda elektro-çekim işleminde oluşan jetlerde boncuk yapısı gözlenmektedir. Ancak polimer çözeltisinin viskozitesindeki artışa bağlı olarak nanolif yapısı boncuksuz ve daha homojen hale dönüşmektedir (Şekil 2.1). Bununla ilgili PEO nanolifleri üzerinde yapılmış bir çalışmada 13 cps viskoziteye sahip çözeltiden boncuklu nanolifler elde edilirken viskozite 1250 cps'ye çıktığında düzgün yapıda nanolifler elde edilmiştir (Haider ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.1. Farklı viskozitedeki PEO çözeltilerinden elde edilen nanolif görüntüleri (Haider ve diğerleri, 2015)

Yüzey gerilimi

Polimer çözeltisinin yüzey gerilimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak elektro-çekim işleminde önemli bir role sahiptir. Farklı çözücüler kullanılarak farklı yüzey gerilimleri elde edilebilir. Genellikle jet oluşumu için polimer çözeltisinin yüzey geriliminin düşük olması beklenmektedir. Yüzey gerilimini düşürmek için surfaktanlar kullanılabilir. Çözeltinin konsantrasyonunun sabit tutulduğu varsayılırsa çözeltinin yüzey gerilimindeki azalmayla boncuklu lif yapısı düzgün lif yapısına dönüşebilecektir. Farklı çözücülerde %4 konsantrasyonda hazırlanan PVP nanolifleri Resim 2.7’de görülmektedir (Yang ve diğerleri, 2004).



Resim 2.7. Farklı çözücülerle hazırlanmış PVP nanoliflerin SEM görüntüleri a) Etanol b) Metilen klorür c) Dimetil formamid (Yang ve diğerleri, 2004)

İletkenlik

Çözeltinin iletkenliği (kondüktivite), hem Taylor konisinin oluşumunda hem de lif çapının kontrolünde etkilidir. Düşük iletkenliğe sahip polimer çözeltisi ile damla yapısından Taylor konisi şekline geçiş sağlanamaz ve elektro-çekim işlemi gerçekleşmez. İletkenliğin artması hem damla üzerindeki yükün artmasına hem de oluşan nanolif çapında azalmaya neden olmaktadır. Kritik değerin üzerindeki iletkenlik değerlerinde de yine Taylor konisi oluşumu engellenmektedir. Çözeltinin iletkenliği genellikle polimer çeşidi, çözücü türü ve tuz ilavesi ile değişmektedir. İyonik tuzların ilavesiyle çözeltinin elektriksel iletkenliği ayarlanabilmektedir. İyonik tuzların ilavesiyle iletkenlikte artış ve lif çapında azalma görülebilir (Son ve diğerleri, 2004). İyonik tuzların elektro-çekim işlemine etkisi iki yolla olmaktadır: i) polimer çözeltisindeki iyon sayısını artırır ve bu da sıvının yüzey yükü yoğunluğunu artırarak elektriksel alanda elektriksel kuvvet oluşumunu sağlar. ii) çözeltinin iletkenliğini artırarak yüzey boyunca teğetsel elektriksel alanın azalmasına neden olur. Ancak bu teğetsel elektriksel alan çok azalırsa, sıvı üzerindeki elektriksel kuvvetler de azalacak ve Taylor konisi oluşumu aksi yönde etkilenecektir. Birçok çalışmada iletkenliği artırmak için NaCl kullanılsa da sodyum fosfat, potasyum fosfat, benziltrialkilamonyum klorür gibi farklı tuzlarla yapılan çalışmalar da mevcuttur (Haider ve diğerleri, 2015).

Çözücü seçimi

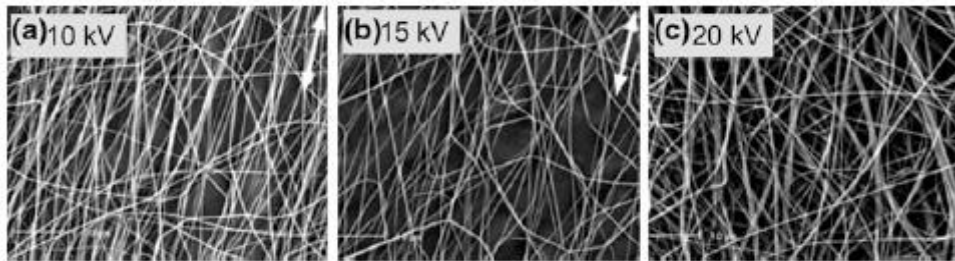
Düzgün yapıda ve boncuksuz nanoliflerin elde edilebilmesi için önemli bir nokta da polimer için çözücü seçimidir. Çözücü seçiminde iki temel durumun karşılanması gerekmektedir. İlki polimerin çözücüde tamamen çözünabiliyor olması, ikincisi ise çözücünün buharlaşma noktasının yüksek olmamasıdır. Çözücünün toplayıcı levhaya

gidene kadar hızla buharlaşması aranan bir özelliktir. Ancak çok hızlı buharlaşabilen çözücülerle yapılan elektro-çekim işleminde çözeltilerin iğne ucunda kuruması söz konusu olmaktadır. Bu da iğnenin tıkanmasına yol açmaktadır. Yavaş buharlaşan çözücülerle ise jetin toplayıcı levhaya ulaşana kadar kurumadığı gözlenmektedir. Çözücü içeren nanoliflerin toplayıcı üzerinde birikmesi nanolif yapısını bozmaktadır.

2.1.3. İşlem koşulları

Uygulanan voltaj

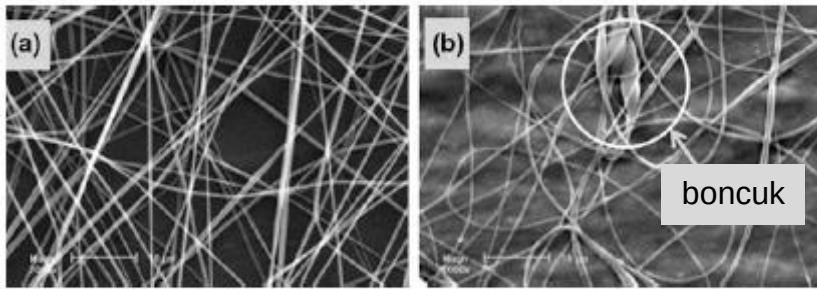
Elektro-çekim işleminde uygulanan voltaj çok önemli bir faktördür. Polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulandığı zaman iğne ucundaki küresel damla formu biçimi bozulur ve Taylor konisi şekline dönüşerek kritik voltaj değerinde jetler oluşur (Bkz. Resim 2.1). Bu kritik voltaj değeri her polimer ve polimer karışımı için farklıdır. Uygulanan voltajın lif çapına etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda polietilenoksit nanoliflerinin çapına voltajın etkisinin olduğu bildirilmezken, bazı çalışmalarda artan voltaj değerinin lif çapını artırdığı gösterilmiştir (Li ve Wang, 2013). Yapılmış başka bir çalışmada ise lif çapının voltaj değeri ile azaldığı bulunmuştur (Haider ve diğerleri, 2015). Lif çapının azalmasının nedeni polimer jetindeki yüklerin birbirini itmesi ve lifin uzamasının artan voltajla doğru orantılı olmasıdır (Resim 2.8). Bazı araştırmacılar ise yüksek voltajın boncuk ve boncuklu nanolif oluşma riskini artırdığını göstermişlerdir (Li ve Wang, 2013). Artan voltajla lif çapının artması veya boncuk oluşması Taylor konisi boyutunun küçülmesi ve aynı akış hızında jet hızının artmasına bağlı gelişen olaylardır.



Resim 2.8. Farklı voltaj değerlerinde hazırlanmış nanoliflerin SEM görüntüleri (Li ve Wang, 2013)

Polimer çözeltisi akış hızı

Polimer çözeltisi akış hızı nanoliflerin morfolojisinde bir başka önemli işlem parametresidir. Tekdüze ve boncuksuz nanolifler polimer çözeltisinin kritik akış hızı değerinde oluşmaktadır. Genellikle polimer çözeltisinin yüklenme süresinin uzaması için daha düşük akış hızı önerilmektedir. Akış hızı çok yüksekse liflerin toplayıcı levhaya doğru giderken kuruma süresi kısılacacağı için düzgün lif yapısı yerine boncuk oluşma ihtimali artacaktır. Yapılmış bir çalışmada akış hızının 0,40 ml/s yerine 0,66 ml/s olması sonucunda boncuk oluşumu gözlenmektedir (Li ve Wang, 2013) (Resim 2.9). Başka bir çalışmada da polistiren nanoliflerinin 0,10 ml/dak akış hızında boncuklu, 0,07 ml/dak akış hızında boncuksuz nanolif yapısında olduğu gösterilmiştir (Haider ve diğerleri, 2015). Akış hızında artış ve azalış nanolif yapısını ve çapını etkileyeceğinden genellikle yeni jet oluşumunu sağlayabilen minimum akış hızı tercih edilmelidir. Bu sayede Taylor konisi yapısının bozulmaması sağlanır. Akış hızının az olması durumunda iğne ucunda Taylor konisi oluşmadan, jetin iğnenin içinde oluşması söz konusudur. Bu şekilde oluşan nanoliflerin çapında artış gözlenmektedir. Artan akış hızlarında boncuk oluşma ihtimalinin yanısıra şerit benzeri yapıların oluşması da söz konusu olmaktadır. Bu olay da yine buharlaşmanın tam olmaması ve jetin uzamasının yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır.



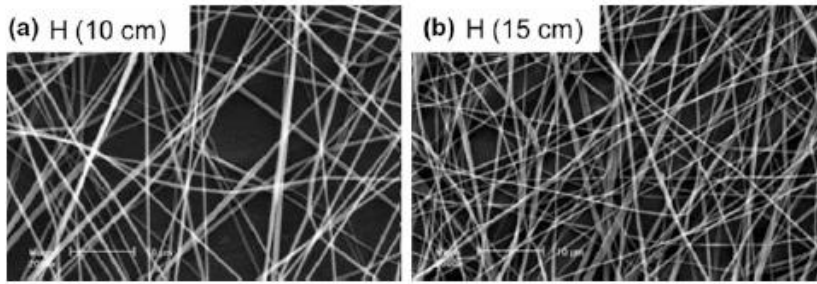
Resim 2.9. Farklı akış hızında elde edilmiş nanoliflerin SEM görüntüleri a) 0.40 ml/s b) 0.66 ml/s (Li ve Wang, 2013)

Toplayıcı kısım

Toplayıcı kısımlar genellikle yüklenmiş liflerin nötralizasyonunu sağlamaktadırlar. Toplayıcı kısmın üzerine çoğunlukla alüminyum folyo kaplanmaktadır. Düz plaka haricinde döner silindir, döner disk ya da ızgara kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur (Kozanoğlu, 2006).

Toplayıcı kısım ile enjektör ucu arasındaki mesafe

Toplayıcı kısım ile enjektör ucu arasındaki mesafenin kısa olması durumunda liflerin katılaşması için yeterli süre olmayacak ve boncuklu nanolif yapılar oluşabilecektir. Yapılmış bir çalışmada mesafenin biraz uzaması ile daha ince liflerin oluştuğu gösterilmiştir (Yuan ve diğerleri, 2004) (Resim 2.10). Bazı çalışmalarda ise mesafenin nanolif morfolojisine etkisi olmadığı bildirilirken bazı çalışmalarda ise mesafenin kısa tutulması ile büyük çaplı ve yapısı bozulmuş nanoliflerin oluştuğu gözlenmiştir (Li ve Wang, 2013; Haider ve diğerleri, 2015).



Resim 2.10. Farklı değerlerde toplayıcı kısım-enjektör ucu arasındaki mesafe ile elde edilen nanoliflerin SEM görüntüleri (Yuan ve diğerleri, 2004)

2.1.4. Ortam koşulları

Elektro-çekim işlemine etki eden ortam koşullarından en önemlileri sıcaklık ve nemdir (Li ve Wang, 2013). Sıcaklık polimer çözeltisinin viskozitesine etki edebileceğinden oluşan liflerin morfolojisi ve çapları da değişebilecektir.

Düşük nem, ortamda çözücünün tamamen buharlaşmasını sağlayabilir. Buna karşın yüksek nem ortamında jet üzerindeki yüklerin nötralizasyonu sonucunda daha kalın lif çapı oluşabilecektir. Ancak literatürde tam tersi sonuçlara da rastlanmıştır. PVA ve PEO nanolifleri ile yapılmış bir çalışmada nem oranının %4'ten %60'a çıkmasıyla lif çapının PVA için 667 nm'den 161 nm'ye, PEO içinse 252 nm'den 75 nm'ye indiği gözlenmiştir (Haider ve diğerleri, 2015). İkili çözücü karışımları kullanılarak poröz nanoliflerin elde edilmesinde de nem koşulları önemli rol oynamaktadır. Bae ve diğerlerinin (2013) yaptığı bir çalışmada ikili çözücü karışımı olarak diklorometan:dimetilformamid (8:2) kullanılmış ve poröz yapıda nanolifler elde edilmiştir. Nanolifler üzerinde porların oluşması çözücülerin farklı buharlaşma derecesine sahip olmasına bağlıdır. Diklorometan daha hızlı

buharlaşması nedeniyle nanolifler üzerinde terlemeye benzer soğuma etkisi yaratmaktadır. Sıcaklığın nanoliflerin çapı üzerine birbirine ters etki yaratan iki etkisi söz konusudur: i) Çözücünün buharlaşması hızlanır. ii) Çözeltinin viskozitesi azalır. Her iki olay da lif çapında azalmaya yol açacaktır.

2.2. Çekirdek/Kabuk Yapısındaki Koaksiyal Nanolifler

İki farklı polimerin tek bir karışımdan elektro-çekimi yapılamıyorsa çekirdek/kabuk yapısında koaksiyal nanoliflerin hazırlanması düşünülebilir. Çekirdek/kabuk yapısında hazırlanan koaksiyal nanoliflerde tek işlem basamağı ile çekirdekteki polimerin yüzeyi, modifiye edilmiş ya da kaplanmış olarak elde edilir. Bazı maddeler molekül ağırlığının düşük, çözünürlüğünün sınırlı ve viskoelastik özelliklerinin istenilen düzeyde olmaması nedeniyle elektro-çekim işlemi ile nanolif üretimine uygun değildir. İletken polimerlerin, metallerin ve bazı doğal polimerlerin tek başlarına nanolif üretimi sağlanamaz. Bu maddelerin nanoliflerinin hazırlanmasında şu yöntem kullanılabilir. Önce elektro-çekim işlemi yapılamayan veya lif oluşturmamayan materyallerin çekirdek kısmında yer alacak şekilde çekirdek/kabuk yapısındaki nanolifleri hazırlanır. Daha sonra kabuktaki polimeri çözebilen, fakat çekirdekteki polimeri çözmeyen bir çözücü ile kabuk kısmındaki polimer uzaklaştırılır. Bu sayede elektro-çekim işlemi yapılamayan veya lif oluşturmamayan maddelerin saf nanolifleri elde edilmiş olur.

Çekirdek/kabuk yapısındaki nanoliflerin hazırlanmasında iki farklı yöntem kullanılmaktadır.

1. Koaksiyal elektro-çekim yöntemi
2. Emülsiyon elektro-çekim yöntemi

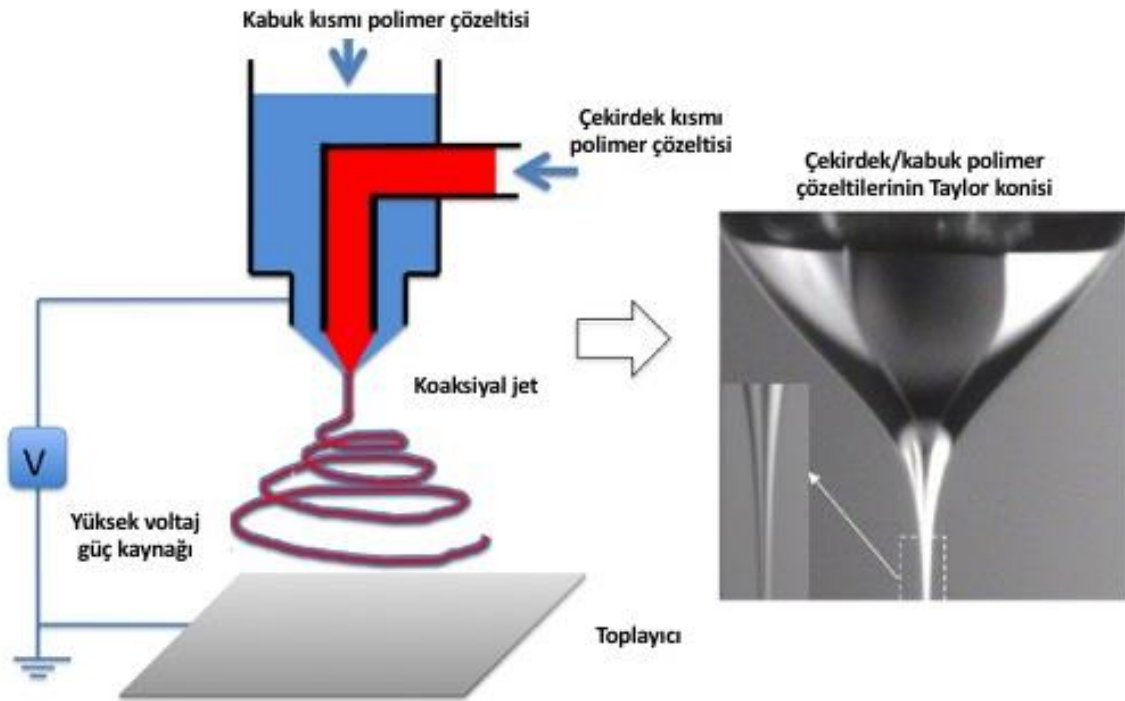
Bu yöntemler kullanılarak,

- i) Çekirdek/kabuk yapısında iki bileşenli nanolifler,
- ii) Elektro-çekimi yapılamayan maddelerin nanolifleri,
- iii) İçi boş (hollow) nanolifler,
- iv) Mikropartikül enkapsüle edilmiş nanolifler elde edilmektedir.

Koaksiyal nanolifler ilaçların enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Bu sayede çekirdek içerisine yüklenen ilacın kabuktan kontrollü salımı sağlanabilir, yüzeyden ani salım engellenebilir veya ilacın stabilitesinin artırılması sağlanabilir. Kabuk materyalinden kontrollü salımın sağlanması amacıyla suda çözünabilir polimerler ilave edilerek por ve kanal oluşumu sağlanabilir.

2.2.1. Koaksiyal elektro-çekim yöntemi

Koaksiyal elektro-çekim yöntemi ile çekirdek/kabuk yapısında koaksiyal nanoliflerin elde edilmesine 2003 yılında başlanmıştır (Sun ve diğerleri, 2003). Koaksiyal elektro-çekim yönteminde klasik elektro-çekim yönteminden farklı olarak iki ayrı besleme ünitesi ve iki kompartmanlı koaksiyal başlık bulunmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Koaksiyal elektro-çekim işlemi (Li ve diğerleri, 2010)

Klasik elektro-çekim yöntemine benzer olarak koaksiyal elektro-çekim yönteminde de elektriksel kuvvetler yardımıyla çekirdek/kabuk yapısında nanolifler oluşmaktadır. Ayrı ayrı beslenen çekirdek ve kabuk çözeltileri koaksiyal başlığın uç kısmında çekirdek/kabuk yapısında damla oluşturur. Voltaj uygulanması ile elektriksel alan oluşturulur ve bu sayede damlanın, özellikle kabuk kısmını oluşturan polimer çözeltisinin yüzeyinde yük birikmesi

sağlanır. Yük miktarındaki değişime bağlı olarak oluşan damla Taylor konisi şeklini alır ve kritik voltaj değerinin üzerine çıkılmasıyla oluşan jet, iç kısmında çekirdek çözeltisini de sürükleyerek toplayıcı levhaya hareket eder (Şekil 2.2). Koaksiyal başlık üzerinde oluşan çekirdek/kabuk yapısındaki damla ne kadar stabil oluşmaya devam ederse, oluşan koaksiyal nanolifler de o kadar düzgün yapıda olur. Çekirdek/kabuk yapısında oluşan jetler, toplayıcı levhaya doğru hareket ederken çekirdek ve kabuk kısmının çözücülerinin buharlaşmasıyla toplayıcıda koaksiyal nanolifler toplanır.

Klasik yöntemde üretimin kalitesine ve nanoliflerin morfolojisine etki eden aynı parametreler koaksiyal üretim yönteminde de etkilidir (Greiner ve diğerleri 2006; Barnes ve diğerleri, 2007). Ancak koaksiyal nanolif oluşumu klasik yöntemle göre daha karmaşıktır. Çekirdek ve kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilerinin iğne ucunda temas halinde olmaları ve aynı jet ile hareket etmek zorunda oldukları için birbirleriyle geçimsizlik dereceleri, fiziksel ve reolojik özellikleri çok önemli parametrelerdir. Koaksiyal elektro-çekim işlemi için şu koşulların sağlanmış olması gereklidir:

- i) Kabuk çözeltisinin elektro-çekiminin yapılabilir olması
- ii) Kabuk çözeltisinin viskozitesinin daha yüksek olması
- iii) Kabuk çözeltisinin iletkenliğinin daha yüksek olması
- iv) Kabuk ve çekirdek çözeltileri arasında yüzeylerarası gerilimin düşük olması
- v) Düşük buhar basıncına sahip çözücüler kullanılması

Koaksiyal elektro-çekim işlemine etki eden parametreler

Konsantrasyon

Klasik elektro-çekim yönteminde konsantrasyonun artması oluşan jete giren madde miktarını artırdığı için lif çapını artırması beklenir. Aynı nedenle koaksiyal elektro-çekim yönteminde de lif çapının artması beklenir. Zhang, Huang, Xu, Lim ve Ramakrishna (2004) yaptıkları bir çalışmada, kabuk çözeltisinin konsantrasyonu sabit tutulurken çekirdek çözeltisinin konsantrasyonunun artmasının, hem lif çapını hem de nanolifin çekirdek kısmının çapını artırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada da çekirdek çözeltisinin konsantrasyonu sabit tutulurken, kabuk çözeltisinin konsantrasyonunun artması lif çapında artışa neden olmuştur (He ve diğerleri, 2006).

Viskozite

Koaksiyal nanolif üretiminde kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisi çekirdeğin etrafını sarar ve ona kılavuzluk eder. Kabuk çözeltisinin viskozitesinin, Taylor konisi oluşurken çekirdek çözeltisi üzerine viskoz stres yaratarak onun da şeklini değiştirecek değerde olması gereklidir (Diaz ve diğerleri, 2006). Bu nedenle kabuk çözeltisinin viskozitesi kritik bir parametredir.

İletkenlik

Çekirdek ve kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilerinin iletkenlik değerlerindeki farklılıklar koaksiyal nanoliflerin oluşmasına etki eden parametrelerdendir. Çekirdek çözeltisinin iletkenliğinin kabuğa göre daha yüksek olması, elektriksel alanda daha hızlı hareket etmesine neden olacağından, çekirdek/kabuk yapının bozulmasına yol açacaktır (Yu ve diğerleri, 2004). Kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinin iletkenliğinin yüksek olması ise çekirdek/kabuk yapıyı bozmayacak ama çekirdek üzerindeki kayma geriliminin artmasından dolayı daha ince çapta çekirdek yapının oluşmasına neden olacaktır (Li ve Xia, 2004). Ayrıca çekirdek kısmı oluşturan çözeltinin iletkenliği elektro-çekim işlemine engel oluşturacak şekilde çok düşükse, yüksek iletkenliğe sahip kabuk kısmı çözeltisi ile koaksiyal nanolif üretimi gerçekleştirilebilecektir.

Çözücü seçimi

Başarılı bir elektro-çekim işlemi için koaksiyal başlığın ucunda iki polimer çözeltisi karşılaştığında polimerin geçimsiz olduğu çözücünde çökmemesi/katılaşmaması gereklidir (Yu ve diğerleri, 2004). Ayrıca çekirdek ve kabuk çözeltileri arasındaki yüzeylerarası gerilimin, Taylor konisi oluşumu için düşük olması istenir. Bazı araştırmacılar iki sıvının birbirini ile teması halinde karışmaları için gereken sürenin elektro-çekim işleminin gerçekleştiği süreden çok kısa olduğunu savunmaktadır (Sun ve diğerleri, 2003). Örneğin, aynı çözücü içerisinde PEO'nun farklı konsantrasyondaki çözeltileri çekirdek ve kabuk kısmın polimer çözeltileri olarak kullanılmış ve koaksiyal nanolifler elde edilmiştir (Sun ve diğerleri, 2003). Buradaki nanolif oluşum mekanizması, çekirdekte ve kabukta aynı çözücü kullanılması nedeniyle yüzeylerarası gerilimin düşük olmasına bağlanmıştır. Buna karşılık başka bir grup araştırmacı çekirdek ve kabuk polimerlerinin karışabileceği ve

koaksiyal yapı oluşamayacağını gösteren çalışmalar yapmışlardır (Li ve Xia, 2004). Ancak bazı çalışmalarda çekirdek ve kabuk kısmı için aynı polimer çözeltisi kullanılsa ya da polimer çözeltileri karışabilir özellikte olsa bile koaksiyal nanolifler oluşabileceği gösterilmiştir (Huang ve diğerleri, 2005; Li ve diğerleri, 2005; He ve diğerleri, 2006; Wang ve diğerleri, 2006). Koaksiyal üretim yönteminde ilaç ve polimerin etkileşiminin iyi olması şart değilken, ayrışma olmaması için yüzeylerarası uyumun iyi olması gerekmektedir (Tiwari ve diğerleri, 2010; Zupancic ve diğerleri, 2016). Polimerlerin diğer çözücü ile karşılaştığında katılaşması ya da çökmesi nanolif üretimini engelleyecek bir durumdur. Bu nedenle çözücü ve polimer sistemlerinin seçiminde dikkatli olunmalıdır.

Uygulanan voltaj

Çekirdeği oluşturan polimer çözeltisine, kabuğu oluşturan polimer çözeltisine göre daha düşük voltaj uygulandığında nanolif üretimi sağlanabiliyorsa, üretim esnasında koaksiyal damla yapısı oluşmadan doğrudan çekirdek kısmın polimer çözeltisinden jetlerin oluşumu gerçekleşebilir. Bu durumda koaksiyal nanolifin kabuk kısmında yer alacak polimer, yapıya giremeyecektir. Literatürde uygulanan voltajın çekirdek/kabuk yapısına etkisi üzerine yapılmış sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Li ve Xia (2004) tarafından yapılan çalışmada uygulanan voltajın artmasıyla lif çapının azaldığı gösterilmiştir.

Polimer çözeltisi akış hızı

Polimer çözeltilerinin akış hızlarının uyumlu olması da çekirdek/kabuk yapının oluşmasında en önemli parametrelerdendir. Her iki çözeltinin de viskozite değerlerine uygun olarak birbiri ile uyumlu akış hızında beslenmesi şarttır (Yu ve diğerleri, 2004; Wang ve diğerleri, 2006). Çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızının kabuğa göre çok yavaş olması durumunda koaksiyal nanoliflerin homojen oluşması sağlanamayacaktır. Çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızının kabuğa göre çok hızlı olması durumunda ise Taylor konisi yapısının boyutu büyüyeceğinden iğne ucunda karakteristik damla yapısı oluşamayacak ve iki sıvının birbirine karışması söz konusu olacaktır. Bu nedenlerden dolayı çekirdek çözeltisinin akış hızının kabuğa göre daha az olması tercih edilmektedir.

2.2.2. Emülsiyondan elektro-çekim yöntemi

Koaksiyal elektro-çekim yöntemi dışında, polimer çözeltileri yerine emülsiyon kullanılarak klasik yöntemle koaksiyal nanoliflerin elde edilmesi de mümkündür (Xu ve diğerleri, 2005).

2.3. Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları

Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları temel olarak morfolojik ve mekanik özellikleri incelenerek yapılmaktadır. Bu parametreler, özellikle nanoliflerin biyomedikal alandaki uygulamalarında anahtar role sahiptir.

2.3.1. Morfolojik özelliklerin incelenmesi

Nanoliflerin morfolojik özellikleri temel olarak görüntüleri incelenerek, temas açısı, porozitesi - por çapı ve spesifik yüzey alanı ölçümleri yapılarak belirlenmektedir. Nanoliflerin görüntülemesi ışık mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak yapılmaktadır. Nanoliflerin görüntüleme işlemlerinde farklı bölgelerin görüntülerinin alınabilmesi, farklı bölgeler arasında karşılaştırma yapılabilmesine imkan verir.

Işık mikroskobu

Nanoliflerin ışık mikroskobu ile görüntülenmesinin avantajları şunlardır:

- Örnek hazırlaması kolaydır.
- Kullanılan cihaz diğer görüntüleme cihazlarına göre daha ucuzdur.
- Görüntüleme atmosferik basınç altında yapılmaktadır.
- Örneklerin kuru olmasına ihtiyaç yoktur. Bu nedenle polimer örneklerinin şişme durumlarının takibi açısından uygundur.
- Üretim sırasında nanoliflerin ön incelemesi açısından uygundur (Amiraliyan ve diğerleri, 2009).

Işık mikroskobu kullanılmasının dezavantajı ise uygun cihazlarda en fazla 200 nm'ye kadar görüntü alınabilmesi nedeniyle detaylı olarak incelemeye imkan vermemesidir.

Elektron mikroskobu

Elektron mikroskobu görüntüleri nanoliflerin elektron ışını ile etkileşimi sonucu elde edilmektedir. Bu etkileşime elektron enerjisi, örnek yoğunluğu, örnek yüzeyinin topografisi gibi birçok faktör etki etmektedir. Nanoliflerin yapısı iki farklı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu

Nanoliflerin SEM görüntüleri alınarak ortalama lif çapı hesaplanması ve lif yerleşiminin incelenmesi (rasgele, paralel) yapılabilmektedir. SEM görüntülemesi nanoliflerin keskin resimlerini alabildiği için yapı ve lif çapı ölçümleri hakkında detaylı bilgiler vermektedir. Literatürde farklı üretim parametrelerinin lif çapına etkisi genellikle 100 farklı lif çapının ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması ile araştırılmaktadır. SEM ile çapraz kesit görüntülerinin alınması ile nanolif kalınlık ölçümleri de yapılabilmektedir. SEM cihazında enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) aparatı bulunuyorsa nanoliflerin yapısındaki elementlerin yüzdelerinin hesaplanması da mümkündür.

SEM görüntülemesinin en önemli dezavantajı işlemin vakum altında gerçekleşmesidir. Örneğin kuruma esnasında yapıda önemli değişikliklere yol açabilir. Buna karşılık düşük basınç altında yapılan SEM görüntülenmesi ile bunun önüne geçilebilmektedir.

Transmisyon elektron mikroskobu

Nanoliflerin TEM görüntüleri grid (özel bir ızgara) üzerine toplanan nanoliflerden elde edilmektedir. Grid üzerine toplanan nanolif miktarının çok az ve ince olması gerekmektedir. TEM görüntüleri genellikle nanoliflere inorganik madde yüklendiğinde ya da çekirdek/kabuk yapısındaki nanoliflerin görüntülerinin alınmasında kullanılmaktadır.

Atomik kuvvet mikroskobu

Nanoliflerin atomik kuvvet mikroskobundaki görüntüleri yüzeye çok yakın mesafede hareket eden tip yardımı ile elde edilmektedir. AFM ile diğer yöntemlere kıyasla çok yüksek çözünürlükte görüntüler elde edilebilmektedir. Elektron mikroskobu yöntemlerinden farklı olarak, nanoliflerin suda ve diğer organik çözücülerdeki davranışları vakum uygulanmadan ve ıslak numunelerin görüntüleri alınarak incelenebilmektedir. (Stachewicz ve Barber, 2011).

Civa porozimetrisi

Civanın katı materyalleri ıslatmamasına dayalı bir ölçüm yöntemi olan civa porozimetrisi düşük (maks. 50 psi) ya da yüksek basınç uygulanarak yapılmaktadır. Uygulanan basınç nanoliflerin porlarına penetre olan civa miktarını etkilemektedir. Ölçüm sırasında uygulanan basınç ve nanoliflerin içine giren civa hacminden hareketle toplam gözeneklilik ölçümleri yapılabilmektedir. Uygulanan basıncın artması civanın daha küçük porlara girmesini sağlamaktadır. Ancak yöntemin dezavantajı nanolif örneğinin ölçüm sırasında katı olması ve şekil değiştirmemesi gerekliliğidir. Ancak nanoliflerin içyapısı diğer nanofibröz materyallere göre düşük civa basıncında bile şekil değiştirebilecek kadar dayanıksızdır. Bu nedenle ölçümler arası farklılıklar gözlenebilmektedir. Ancak literatürde civa porozimetrisi ile gözenekliliğin ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur (Ryu ve diğerleri, 2003; Kwon ve diğerleri, 2005; Ko ve diğerleri, 2006).

BET yüzey alanı ölçümleri

BET yüzey alanı ölçümleri poröz materyallerin spesifik yüzey alanı ölçümleri için Brunauer, Emmett ve Teller isimli araştırmacıların buldukları bir yöntemdir. Ölçümlerin temelinde örnek yüzeyine gaz moleküllerinin fiziksel adsorbsiyonu söz konusudur. BET yöntemi ile spesifik yüzey alanı ölçümleri dışında nanoliflerin yüzeyine inorganik ya da organik madde adsorbsiyonunun etkileri araştırılabilmektedir. Civa porozimetrisi ile hatalı ölçümler söz konusu olduğu için por çapı dağılımı için BET yöntemi daha çok kullanılmaktadır (Ryu ve diğerleri, 2003; Pham ve diğerleri, 2006).

Temas açısı ölçümleri

Temas açısı ölçümleri nanoliflerin özellikle doku mühendisliği ve filtrasyon alanlarında kullanımı söz konusu olduğunda ön plana çıkmaktadır. Nanolif yüzeyinin hidrofilik/hidrofobik karakteri canlı doku ile etkileşimini etkilemektedir. Yüzeyin hidrofilikliğini ölçmek için en çok kullanılan yöntem temas açısı yöntemidir. Nanolif yüzeyinin temas açısı derecesi nanolifin kimyasal bileşimi ve yüzey yapısı ile de ilgilidir. Literatürde temas açısı ölçümleri ile nanoliflerin yüzey özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır (Sirc ve diğerleri, 2012). Wenzel modeline göre nanoliflerin geniş yüzey alanı nedeniyle damlatılan su ile katı arasında daha fazla yüzeylerarası enerji oluşması suyun daha çok boşluğa yayılmasına neden olacaktır. Cassie-Baxter modeline göre porlardaki hava boşlukları nedeniyle su porların içine girmeyecektir. Her iki nedenden dolayı aynı nanolif örneğinin temas açısı ölçümleri arasında farklılık oluşabilir. Dolayısıyla poröz, su ile şişebilen, deforme olabilen nanoliflerin temas açısı ölçümleri yapılırken daha dikkatli olunmalıdır.

2.3.2. Mekanik özelliklerin incelenmesi

Nanoliflerin mekanik özelliklerinin kullanım amaçlarına bağlı olarak belli değerlerde olması gerekmektedir. Nanoliflerin mekanik özellikleri hem kimyasal bileşimine hem de lif çapı, lif yerleşimi ve porozite gibi özelliklerine bağlıdır. Küçük çaplı liflerin mekanik özelliklerinin artmış olması moleküler zincirlerin düzenli olmasına ve kristaliniteye bağlıdır. Küçük lif çapında fibriler yapı kendisini eksenle aynı hizaya getirmekte ve bu da mekanik yapının kuvvetlenmesinde rol oynamaktadır. Lif çapının artmasına bağlı olarak fibriler yapı tekrar yönlenir ve eksen hizasında bozunmalar başlar. Bu da mekanik özelliklerin azalmasına yol açabilmektedir (Baji ve diğerleri, 2010). Elektro-çekim işleminde çok kısa sürede gerçekleşen bu olaylar zinciri polimer konsantrasyonu, çözücü seçimi, çözeltinin iletkenliği ve çözeltinin akış hızı parametreleri ile kontrol altına alınabilir.

Genel olarak rasgele yerleşmiş nanoliflerin gerilme kuvveti paralel yerleşmiş nanoliflere göre daha düşüktür. Nanoliflerin yerleşiminde paralellik derecesinin artırılması toplayıcının dönüş hızının artırılması, iğne ucu-toplayıcı mesafesinin artırılması ve düşük akış hızında sağlanabilir. Yapılmış bir çalışmada PCL nanoliflerinin gerilim kuvvetinin

rasgele yerleşimde 2,21 MPa, paralel yerleşim durumunda ise 3000 rpm’de 4,21 MPa ve 6000 rpm’de 9,58 MPa olduğu bulunmuştur (Thomas ve diğerleri, 2006).

Por çapı ve porozitenin nanoliflerin mekanik kuvveti üzerine etkisi ters orantılıdır. Yüksek poroziteye sahip nanoliflerin mekanik özellikleri daha kötüdür (Rnjak-Kovacina ve diğerleri, 2011).

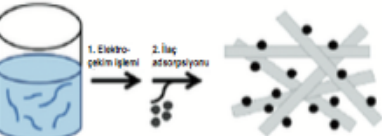
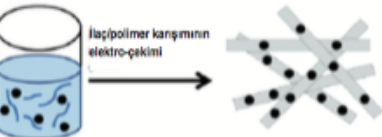
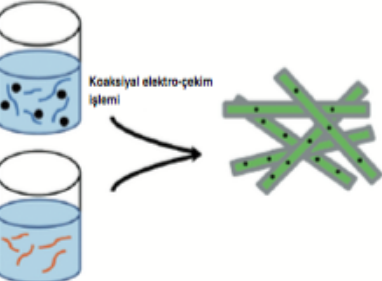
Nanoliflerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için çekme testi (tensile test) ya da bükme testi (bending test) yapılmaktadır. Çekme testleri mekanik özelliklerin incelenmesinde en etkili yöntemdir. Bu yöntemle elde edilen gerilme-şekil değiştirme eğrileri (stress-strain curve) sayesinde gerilim kuvveti, Youngs modulus, kopma uzaması gibi parametreler hesaplanmaktadır.

2.4. Nanoliflerin Farmasötik Teknoloji Açısından Avantajları

İlaç taşıyıcı sistemlerde elektro-çekim yöntemi ile elde edilen nanoliflerin kullanılmasına yönelik ilk çalışma 2002 yılında Kenawy ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada PLA ve PEVA polimerlerine tetrasiklin yüklenerek piyasa preparatı ile karşılaştırma yapılmıştır (Kenawy ve diğerleri, 2002). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise elektro-çekim yöntemi ile hazırlanan nanolifler oral, sublingual, hızlı dağılabilen, transdermal ve implant ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmıştır (Yu ve diğerleri, 2009a).

İlaç yüklü nanolifler temel olarak polimer/ilâç karışımı hazırlanarak, fiziksel adsorbsiyon ve koaksiyal elektro-çekim işlemleri ile elde edilmektedir. Bu yöntemlerin avantajları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Bu yöntemlerin dışında ilâç yüklü nanoliflerin polimer çözeltisi yerine emülsiyondan elde edilmesi de mümkündür (Xu ve diğerleri, 2005).

Çizelge 2.2. Nanoliflere ilaç yükleme yöntemleri ve avantajları (Tort ve Acartürk, 2015)

Elektro-çekim sonrası modifikasyon	İlaç yükleme tekniği	Avantajları
 1. Elektro-çekim işlemi 2. İlaç adsorpsiyonu	- İlk önce polimer çözeltisinin elektro-çekimi işlemi gerçekleştirilir. Nanolif matris oluştuktan sonra ilaç yükleme basamağına geçilebilir - Nanolif matrise ilaç kovalent bağlarla yüklenebilir - Kovalent modifikasyon ilaç adsorpsiyonundan sonra gerçekleştirilebilir	- Aynı matrise farklı farklı ilaçların yüklenebilmesi sağlanabilir - İlaç elektro-çekim işleminden etkilenmez - Daha az kayıp sağlanabilir - Uzatılmış ilaç salımı sağlanabilir - Matris-ilâç etkileşimi ile farklı salım profilleri oluşturulabilir
İlaç/polimer karışımının elektro-çekimi	 İlaç/polimer karışımının elektro-çekimi - İlaç çözeltisinin, emülsiyonunun ya da süspansiyonunun ya da süspansiyonunun, polimer çözeltisi ile karıştırılarak elektro-çekim işlemi gerçekleştirilebilir - İlaç ve polimerin elektro-çekim işleminden önce kovalent bağlanması sağlanabilir	- Modifiye ilaç salımı sağlanabilir - Elektro-çekim işlemi doğrudan etki görülmesi istenen bölgede gerçekleştirilebilir - Uzatılmış ilaç salımı sağlanabilir
Çekirdek-kabuk elektro-çekim Koaksiyel elektro-çekim ile ilaç/polimer çekirdek ve polimer kabuk	Elektro-çekim işleminde ilaç/polimer çekirdek yapısını oluştururken, iç kısım başka bir polimer ile kabuk şeklinde kaplanabilir	- Modifiye ilaç salımı sağlanabilir - İlaç elektro-çekim işleminde korunmaktadır - Elektro-çekim işlemine uygun olmayan ilaçlar çekirdek kısmına yüklenerek elektro-çekimi sağlanabilir
 Koaksiyel elektro-çekim işlemi		

Fiziksel yüzey adsorbsiyonu nanoliflere ilaç yüklemede kullanılabilecek en basit uygulamadır. Yüzey adsorbsiyonunda genellikle elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri rol oynamaktadır (Yoshida ve diğerleri, 2006). Çeşitli protein moleküllerinin nanoliflere adsorbsiyonu amacıyla heparin yüklü nanolifler kullanılmıştır (Joung ve diğerleri, 2008; Yoo ve diğerleri, 2009; Lee ve diğerleri, 2012; Wang ve diğerleri, 2013).

İlaç-polimer karışımından nanoliflerin elektro-çekimi en çok kullanılan ilaç yükleme yöntemidir. Bu yöntemde ilaç ve polimer çözeltisinden yapılan elektro-çekim işlemi ile ilaç yüklenmiş nanolifler elde edilmektedir (Akduman ve diğerleri, 2016). Bu yöntemde polimer çözeltisine ilaç yüklenmesi polimer çözeltisinin fizikokimyasal özelliklerini değiştirdiği için saf polimer nanoliflerinin özelliklerinin değişmesi söz konusu olmaktadır. Örneğin asetik asit içindeki poli (maleik anhidr-alt-2-metoksietilvinileter) çözeltisine diklofenak sodyum eklenmesi çözeltinin elektriksel iletkenliği azaltmış ve bu da nanoliflerin çapında azalmaya yol açmıştır (Piras ve diğerleri, 2006). Polivinil alkol çözeltisine meloksikam ilavesi viskoziteyi artırdığı için nanolif çapında artış söz konusu olmuştur (Ngawhirunpat ve diğerleri, 2006). Bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha kolay olmasına karşılık bazı dezavantajları vardır. Polimerin fizikokimyasal özellikleri ve ilaç molekülleri ile etkileşimi ilaç yükleme kapasitesini, ilacın nanoliflerde dağılımını ve ilaç salım kinetiğini etkileyebilir (Zamani ve diğerleri, 2013). Örneğin etkin maddenin ve polimerin geçimsiz olması ilacın nanoliflerin yüzeyine itilmesine ve ani salım (burst effect) gözlenmesine neden olabilir (Zeng ve diğerleri, 2005). Polimer karışımı ile nanoliflerin hazırlanmasında kontrollü salım elde edilmesi isteniyorsa hidrofilik-hidrofobik polimer karışımları önerilmektedir. Hidrofilik polimer olarak jelatin, PEG veya PVA kullanılabilir (Xu ve diğerleri, 2009; Jannesari ve diğerleri, 2011; Meng ve diğerleri, 2011a).

Koaksiyal elektro-çekim yöntemi özellikle kontrollü salım istendiğinde veya etkin maddenin dış ortamdan korunması istendiğinde uygulanabilen ilaç yükleme yöntemlerindendir (Saraf ve diğerleri, 2010). Bu yöntemin ilaç yüklemede asıl avantajı birbiriyle karışmayan iki polimer çözeltisinin aynı anda kullanılmasına imkan vermesidir. Koaksiyal üretim yöntemi ile gen ve büyüme faktörleri, antibiyotikler, antioksidan ilaçlar, steroidlerle yapılmış çalışmalar mevcuttur (He ve diğerleri, 2006; Huang ve diğerleri, 2006; He ve diğerleri, 2009; Xu ve diğerleri, 2013).

Bu yöntemlerin dışında elektro-çekim işlemi sonrası kimyasal immobilizasyon yapılarak ilaçların nanoliflere yüklenmesi de mümkündür. Polimer bazlı nanoliflere ilaç yüklemeyle ilgili çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir (Çizelge 2.3) (Goonoo ve diğerleri, 2014).

Çizelge 2.3. İlaç yüklü nanolif uygulamalarına örnekler (Goonoo ve diğerleri, 2014)

Polimer	İlaç	Yükleme Yöntemi	Hayvan Modeli	Uygulama
PCL	Ornidazol	Polimer/İlaç karışımı	Sıçan	Abdominal adhezyondan korunma
Poli-l-laktid	İbuprofen	Polimer/İlaç karışımı	Ligorin tavuk	Peritendinöz adhezyondan korunma
PLGA ve PEG-b-PLA karışımı	Mefoxin	Polimer/İlaç karışımı	Sıçan	Abdominal adhezyondan korunma
PLA	Dikloroasetat	Polimer/İlaç karışımı	Fare	Servikal karsinom
PLA	Hidroksikamfotesin	Polimer/İlaç karışımı	Fare	Kanser tedavisi
PGA/Jelatin	Oksaliplatin, lökovorin, irinotekan, florourasil	Polimer/İlaç karışımı	Sıçan	Kanser tedavisi
Kitozan/PLA	Doksorubisin	Polimer/İlaç karışımı	Hamster	Kanser tedavisi
PLGA	Paklitaksel	Polimer/İlaç karışımı	Fare	Kanser tedavisi
PCL	Paklitaksel	Polimer/İlaç karışımı	Köpek	Kardiyak daralma tedavisi
PCL-b-PEG	Epidermal büyüme faktörü	Yüzey modifikasyonu	Fare	Diyabetik ülser
Kitozan/PVA	Lizozim	Polimer/İlaç karışımı	Sıçan	Yara iyileşmesi
PCL-b-PEG/PCL	Epidermal büyüme faktörü	Yüzey modifikasyonu	Fare	Yara iyileşmesi
PVA	Neomisin	Fiziksel adsorbsiyon	Sıçan	Yara iyileşmesi
PLGA	Fusidik asit	Polimer/İlaç karışımı	Sıçan	Yara iyileşmesi
PVA/PCL	Timolol ve dorzolamid	Polimer/İlaç karışımı	Albino tavşan	Glokom
PLGA	Fusidik asit ve rifampisin	Polimer/İlaç karışımı	Fare/sıçan	Enfeksiyondan korunma

Farmasötik teknolojide nanoliflerin başlıca avantajları ilacın çözünürlük/çözünme hızında artış sağlaması, lokal uygulamaya elverişli olması, salım hızının ayarlanabilir olması ve ilacın stabilitesini artırmasıdır.

2.4.1. Çözünürlük/çözünme hızı artışı

Çözünürlüğü düşük olan birçok ilacın biyoyararlanımı da düşük olmaktadır. Elektro-çekim işlemi ile hidrofilik polimerler kullanılarak hidrofobik ilaç içeren nanolifler hazırlanabilir. Elektro-çekim işlemi çok hızlı gerçekleştiği için etkin madde moleküler boyutta dağılmaya ve amorf durumda olmaya zorlanacaktır (Kenawy ve diğerleri, 2009). Birçok çalışmada elektro-çekim işleminin ilacın çözünürlüğünde artış sağladığı gösterilmiştir. Yu ve diğerlerinin (2009a, 2009b) yaptıkları çalışmalarda polivinil piroolidon nanoliflerine yüklenen ibuprofenin amorf durumda olduğu gösterilmiştir. Hazırlanan nanolifler suda 8 saniye içerisinde dağılmıştır. İbuprofen/PVP oranı değiştirilerek, %60-85 oranında yüklenen ibuprofenin 20 saniye içerisinde salımı gerçekleşmiştir. Bir başka çalışmada ise PVP'ye yüklenen ketoprofenin suda 30 saniye içerisinde salındığı gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2010a). Antiinflatuvar ilaçlar dışında antibiyotikler de düşük çözünürlüğe sahiptir. Metronidazolün, poli (etilen glikol-ko-laktit) polimerine yüklenmesi ile çözünürlüğünde artış sağlanmıştır (Yang ve diğerleri, 2009). Suda çözünürlüğü olmayan shikonin isimli bitki ekstresinin polikaprolakton/poli (trimetilen karbonat) polimerine yüklenmesi ile yüklenen ilacın 30 dakikada %20'den fazlasının salımının olduğu gösterilmiştir (Han ve diğerleri, 2009). Ayrıca kurkumin, kuersetin, helsit ve ursolik asit gibi başka maddelerle yapılmış çözünürlük artırma çalışmaları da mevcuttur (Yu ve diğerleri, 2010b; Peng ve diğerleri, 2011, Birer ve diğerleri, 2015).

Oral yoldan kullanılabilecek ilaç yüklü nanolifler çözünürlük ve etkinin hızlı başlaması gibi avantajlar sunmaktadır (Seager, 1998, Liang ve Chen, 2001; Yu ve diğerleri, 2009a; Ignatious ve diğerleri, 2010; Nagy ve diğerleri, 2010; Kapahi ve diğerleri, 2015). Ağızda hızla dağılabilen nanolif uygulamalarına PVA/kafein ve PVA/riboflavin nanolifleri örnek verilebilir (Li ve diğerleri, 2013). Bu nanoliflerin ıslanma süresi yaklaşık 4,5 saniyedir. Çözünme hızı çalışmalarında kafeinin 60 saniyede tamamının, riboflavinin ise %40'ının çözündüğü gösterilmiştir. İbuprofen yüklü nanoliflerle yapılmış başka bir çalışmada ise ilaç polimer oranı 1:2 ve 1:4 iken ilk 20 saniyede % salım oranı 84,9'dan 58,7'ye düşmüştür (Yu ve diğerleri, 2009a).

2.4.2. Lokal uygulama

Topikal yoldan ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasının artırılmış hasta uyuncu, gastrik iritasyon olmaması, ilk geçiş etkisinin bulunmaması gibi avantajları bulunmaktadır (Monkhouse ve Huq, 1988). Nanoliflerin topikal yoldan uygulamaları ile ilgili vitamin, antioksidan, büyüme faktörü, antibiyotik ve antiinflamatuvar ajanların yüklenerek yapıldığı çalışmalar mevcuttur (Xie ve diğerleri, 2005; Kim ve diğerleri, 2006; Shi ve diğerleri, 2013). Choi, Leong ve Yoo (2008) yaptıkları bir çalışmada EGF yüklü nanoliflerin EGF çözeltisine göre yara iyileştirici etkisinin daha iyi olduğu gösterilmiştir.

Yara iyileşmesinde nanoliflerin lokal yoldan kullanılmasının amaçları yaranın eksojen mikroorganizmalardan korunması, eksüda absorpsiyonu, nem oluşturmaları ve gaz alışverişine imkan sağlaması, kozmetik açıdan uygun olması, yara iyileşmesini hızlandırması nedeniyledir (Zhang ve diğerleri, 2005a). İnert yara örtülerinin enfeksiyonlardan korumayı tam olarak sağlamaması nedeniyle antibiyotik içeren yara örtülerinin kullanılması daha uygundur. Nanolifler yüksek yüzey alanı sayesinde eksüdanın absorpsiyonunda oldukça etkilidir. Yüksek porozite hava alışverişini sağlar ve por boyutunun küçük olması bakteriyal enfeksiyonlara karşı yarayı korur. Thakur, Florek, Kohn ve Michniak (2008) yaptıkları bir çalışmada hem lidokain hem de mupirosin içeren nanolifler hazırlanmıştır. Lidokain 1 saatte %80 civarında ani salım yaparak ağrı hissini azaltmaya yardımcı olmuştur. Mupirosin ise daha yavaş salım göstererek antibiyotik aktivitesini sağlamıştır.

Dış hekimliğinde antibiyotik içeren nanoliflerin lokal uygulanması ile operasyon sonrası oluşabilecek enfeksiyonlarından korumada kullanılabileceği gösterilmiştir (Chaturvedi ve diğerleri, 2013; Tort ve diğerleri, 2016). Son yıllarda yapılmış bir çalışmada aortik anevrizmanın doksisisiklin yüklü PLA nanolifleri ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir (Yamawaki-Ogata ve diğerleri, 2010). Doksisisiklin MMP inhibe edici etkilerinden dolayı hastalığı baskılayabilmektedir.

2.4.3. Salım hızının ayarlanması

Nanoliflerden ilaç salımı yüzeyden salım, por veya kanallardan ilacın difüzyonu veya matris degradasyonu ile gerçekleşir (Pillay ve diğerleri, 2013). Dolayısıyla polimerin

degradasyonuna etki eden tüm parametreler aslında ilacın salımını da etkilemektedir. Nanoliflerden ilaç salım kinetiği, polimer seçimi, lif çapı ve porozite ayarlanması yapılarak modifiye edilebilmektedir. Ayrıca üretim tekniği değiştirilerek te (koaksiyal elektro-çekim gibi) salım süresi ve hızının ayarlanması mümkündür.

Nanoliflerden ilaç salımı hidrolitik ya da enzimatik yollarla degrade olan polimer oranlarının ayarlanması ile kontrol edilebilmektedir (Ranganath ve Wang, 2008). Nanoliflere yüklenen ilacın ani salımı hidrofilik/hidrofobik polimer karışım oranı ayarlanarak engellenebilir. Jelatin, polietilen glikol, PVA gibi hidrofilik polimerler veya PEG-b-PLA gibi amfifilik polimerlerin nanoliflere eklenmesiyle ilaç yükleme etkinliğinin artırılacağı bildirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2004; Cao ve diğerleri, 2010; Jannesari ve diğerleri, 2011; Meng ve diğerleri, 2011a). PCL/PEO nanoliflerine lizozim yüklenmiş bir çalışmada kümülatif lizozim salım hızının PEO oranının artmasıyla arttığı bildirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2007). Kraitzer, Ofek, Schreiber ve Zilberman (2008) tarafından yapılmış bir çalışmada, paklitaksel yüklenmiş poliglikonat/PDLGA nanoliflerinden paklitaksel salım profilleri incelenmiştir. Bu çalışmada polimer oranı 50/50 olduğunda ilacın %70'i, 75/25 olduğunda ise sadece %13'ü salınmıştır. Salım hızı iki polimerin degradasyon hızı ve nanoliflerin hidrofilik/hidrofobik karakteri ile ilişkilendirilmiştir.

Genellikle küçük çaplı nanolifler büyük yarıçaplı olanlara göre daha hızlı degrade olurlar. Bunun temel nedeni lif çapının küçük olması, daha yüksek yüzey alanına sahip olması ve buna bağlı olarak ta suyun penetrasyonunun artışı ile degradasyon hızının artmış olmasıdır (Cui ve diğerleri, 2006). Bir çalışmada PCL/jelatin nanoliflerine yüklenmiş platelet kaynaklı büyüme faktörünün salımının lif çapına bağlı olduğu ve küçük lif çapı ile daha hızlı salım elde edildiği gösterilmiştir (Lee ve diğerleri, 2012). Yine başka bir çalışmada da lif çapı büyük ama daha poröz nanoliflerden, daha küçük ama daha az poröz olanlara göre daha hızlı salım gerçekleştiği gösterilmiştir (Buschle-Diller ve diğerleri, 2007)

Nanoliflerin paralel yapıda olması da nanoliflerden ilaç salımını etkileyen bir parametredir. Meng, Zheng, Li ve Zheng (2011b) yaptıkları bir çalışmada PLGA/kitozan nanoliflerine fenbufen etkin maddesi yüklenmiş ve nanolifler rasgele ve paralel yapıda elde edilerek salım profilleri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarında paralel yapıdaki nanoliflerden salımın daha yavaş olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni liflerin paralel toplanması sonucunda por boyutunda azalma ve suyun girişinin engellenmesidir.

Polimer kristalinitesi de nanoliflerden ilaç salımını etkileyen bir parametredir. Yarı-kristal polimerlerden başlangıçta ilacın nanoliflerin yüzeyinde olmasına bağlı olarak ani salım gözlemlenebilir. Daha sonra ise salımın yarı-kristal bölgelere su girişinin kısıtlı olmasına bağlı olarak yavaşlaması söz konusudur (Ku ve Dulin, 2012). Nanoliflerde kristal bölgelere yüklenmiş alanlara su girişi sınırlı olduğu için ilaç salımı bu bölgelerden yavaş olur.

Yapılmış çalışmalarda nanoliflere yüklenen etkin madde miktarı artması daha hızlı salıma neden olmuştur (Cui ve diğerleri, 2006; Luong-Van ve diğerleri, 2006; Xu ve diğerleri, 2006; Xie ve Buschle-Diller, 2010; Wang ve diğerleri, 2010).

Kristal yapıdaki ilaçların nanoliflerin yüzeyine, amorf yapıdaki ilaçlarınsa nanoliflerin iç bölgelerine yüklendiği gösterilmiştir (Xie ve Wang, 2006; Thakur ve diğerleri, 2008; Natu ve diğerleri, 2010; Zamani ve diğerleri, 2010). Bu da ilacın salım profilini değiştirebilmektedir.

İlacın molekül ağırlığı da nanoliflerden ilaç salımını etkileyen bir parametredir. Düşük molekül ağırlıklı olan ilaçlar degradasyon sonucu oluşan porlardan daha kolay difüze olacağı için salım hızları daha yüksek olacaktır. Yapılmış bir çalışmada PVA nanoliflerine yüklenen naproksen (230 g/mol), diklofenak sodyum (318 g/mol) ve indometazin (357 g/mol) etkin maddelerinin toplam salım miktarları %98, %76 ve %42 olarak bulunmuştur (Taepaiboon ve diğerleri, 2006).

İlaç-polimer-çözücü etkileşiminin bulunması da ilacın nanolifin iç ya da yüzeyde bulunmasına neden olacağından salımı etkileyen bir diğer parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

Nanoliflerin mekanik özellikleri, ilaç salımını etkilemektedir. Nanoliflerin mekanik özellikleri ise başlıca lif çapı, liflerin yerleşimi ve poroziteden etkilenmektedir.

Koaksiyal nanoliflerde çekirdekteki veya kabuktaki ilaç-polimer konsantrasyonları, çekirdek veya kabuk polimer çözeltisinin akış hızı, başarılı bir ilaç enkapsülasyonunu ve salım hızını etkileyecek parametrelerdendir. Tetrasiklin yüklenmiş PLA koaksiyal nanolifleri ile yapılmış bir çalışmada, kabuk çözeltisinin konsantrasyonu ayarlanarak lif çapının ve salım profilinin değiştirilebileceği gösterilmiştir (He ve diğerleri, 2006).

2.4.4. Stabilitede artış

Elektro-çekim işlemi, etkin maddenin degradasyonunu önleyebilmektedir. Nanoliflere yüklenen etkin maddenin sıcaklık ve ışığa bağlı meydana gelebilecek degradasyondan korunması mümkün olabilmektedir (Kenawy ve diğerleri, 2009). Proteinlerin ve diğer biyolojik maddelerin oda sıcaklığında saklanmaları için koruyucu bir polimer matrisi ile nanoliflerinin hazırlanması da gelecek vaadeden bir uygulamadır. Bir çalışmada tripsin protein molekülleri içeren nanoliflerin 8 hafta oda sıcaklığında bekledikten sonra bile aktif olduğu gözlenmiştir (Jun ve diğerleri, 2010).

Koaksiyal nanoliflerde çekirdek kısmına yüklenen etkin maddenin dış ortamdan korunması mümkündür. Yapılmış bir çalışmada koaksiyal nanoliflere yüklenen büyüme faktörlerinin taze büyüme faktörleri ile aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Liao ve Leong, 2011).

2.5. Yara ve Evreleri

Doku veya organların çeşitli etkenler nedeniyle bütünlüğünün ve fonksiyonlarının bozulmasına yara, bu bütünlüğün iç içe geçmiş süreçlerle yeniden sağlanmasına yara iyileşmesi denilmektedir. İnsan vücudunun yüksek kapasiteli iyileşme mekanizmaları vardır. Herhangi bir doku hasarı ya da hastalığını takiben vücut tarafından hasarlı dokunun tamiri için immün cevap başlatılır (Lim, 2015). Yara oluştuktan sonra yaranın kapatılması ve enfeksiyonlara karşı korunması için vücut tarafından çok hızlı yanıt verilmektedir. Yara iyileşmesi dinamik ve kompleks bir süreçtir (Gönül ve diğerleri, 1998).

Bir yaralanmayı takiben yara bölgesinde hızla kanamanın durması (hemostaz) için pıhtılaşma başlar. Hemostaz sırasında kan damarlarında akış yavaşlar ve kan kaybı azaltılmaya çalışılır. Kanamayı durdurmak için plateletler agrege olurlar ve kanda fibrine dönüşerek pıhtılaşmaya devam eder. Bu işlemler karmaşık moleküler sinyaller tarafından yönetilir. Bu sırada plateletler degranülasyona uğrarlar, içerikleri kan dolaşımına ve doku matrisine salınır. Buna bağlı olarak ta büyüme faktörleri, sitokinler ve vazodilatörlerin salımı başlar. Büyüme faktörleri ve sitokinler şunlardan oluşur: Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü B (TGF-B), fibroblast büyüme faktörü (FBF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), bağ doku

büyüme faktörü (CTGF), tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin molekülleri (IL-1 ve IL-8) gibi (Martin ve Leibovich, 2005). Bu moleküller fibroblastları aktive eder ve bölgesel iyileşme cevabı başlatılır. Genellikle dakikalar süren hemostaz evresinden sonra fizyolojik iyileşme evreleri başlar. İyileşme 3 evreden oluşur: i) inflamasyon, ii) proliferasyon, iii) yeniden şekillenme (remodeling, yeniden oluşum).

2.5.1. İnflamasyon evresi

İnflamasyon aslında negatif bir anlam çağırırsa da iyileşme evrelerinin temel fazıdır. İnflamasyon genelde ağrı, şişme, kızarıklık gibi olaylarla ilişkili olsa da bu olaylar vücudun hasara karşı verdiği doğal bir cevaptır ve beyaz kan hücrelerinin dokuya sızması ile gerçekleşir.

İnflamasyon evresi yaralanmadan hemen sonra başlar ve saatler ya da günler sürebilir. Bu evre yaralanmadan sonra hasarlı hücreler ve degranüle plateletlerden salınan moleküller tarafından başlatılır. Bu evrede ayrıca hasarlı bölgenin ve etrafının hassas ve kırmızı olmasına neden olan sıvı birikmesi gerçekleşir. Hücreler ve plateletler, yaraya lökosit migrasyonunu kolaylaştıran kimyasal maddeler salgırlar. Kan dolaşımında bulunan ve bütün vücutta sirküle olan beyaz kan hücrelerinden lökositler hasarlı dokuya sızmaya başlar. Yarada biriken lokal inflamatuvar hücreler nekrotik dokunun uzaklaştırılmasından, enfeksiyonla mücadeleden, pıhtıyı önlemeden, yeni fibroblastların yaraya göçünden, iyileşmeye yardımdan ve yeni damar oluşumundan (anjyogenez) sorumludurlar. Yaralanmaya ilk yanıt veren immün hücreler nötrofiller, mast hücreleri, özelleşmiş dendritik hücreler ve monositlerdir (Park ve Barbul, 2004). Nötrofiller ayrıca saatler içinde yaranın içini kaplar ve temel olarak bakteriler ve nekrotik dokunun fagositozunu sağlarlar (Martin ve Leibovich, 2005). Nötrofiller serbest radikaller (serbest oksijen bileşikleri) salgılayarak enfeksiyona neden olabilecek ajanları yok ederek enfeksiyonu baskırlar. Serbest radikaller biyolojik moleküllerle etkileşime girerek fonksiyonsuz hale getirirler. Nötrofiller ayrıca pro ve anti inflamatuvar immnumodülatör sitokinler salgırlar. Bunlar arasında TNF- α , TNF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-3, IL-12, interferon gamma, kolon uyarıcı faktör (MCSF) ve granülosit makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GC-CSF) bulunur. Nötrofiller ayrıca daha fazla hücrenin IL-8 gibi sitokinler salgılayarak yara bölgesinde yeni damar oluşumunu hızlandırmaya çalışırlar. Bu moleküllerin hepsi yara iyileşmesinde rol oynar ve nötrofil miktarı 3 gün sonrasında azalmaya başlar. Ancak kronik yaralarda

nötrofiller ortamda daha uzun sürelerde bulunmaktadır. Mast hücreleri histamin ve heparinden zengin granüller içerirler. Mast hücreleri alerjik cevapla ilişkili olsalar da, iyileşmenin başlangıç aşamalarında histamin ve heparin salgılayarak kan koagülasyonunu azaltır ve damarlardan sızıntıya karşı önlem alırlar. Bu da akut yaranın karakteristik işaretleri olan kızarıklık, ısı artışı, şişme ve ağrıya neden olur (Monaco ve Lawrence, 2003).

2.5.2. Proliferasyon evresi

Proliferasyon evresi yaklaşık 6 hafta sürer. Bu evrede makrofajlar ve nötrofiller tarafından yara yatağı temizlenmiş ve sayıları azalmaya başlamıştır. Deri dokusundaki fibroblastlar ve kök hücreler hasarlı dokuya gelir ve çoğalmaya başlar. Bu hücreler ekstraselüler matrisi başlıca tip-3 kollajen, fibronektin ve hiyaluronan ile doldurmaya başlayarak granülasyon dokusu oluştururlar (Singer ve Clark, 1999). Bu evrede bazı matriks metalloproteinaz enzimleri dokuyu bozmak için salınsa da doku sentezi daha baskındır. Yeni oluşan kan damarları granülasyon dokusuna oksijen ve enerji sağlar, artık maddelerin uzaklaşmasını temin eder. İnflamatuvar makrofajlar bazı anjiyojenik faktörler salgılayarak vasküler endotelial hücreleri harekete geçirir ve damar oluşumunu stimüle eder. Keratinositler granülasyon dokusunun kenarlarına göç ederek reepitelizasyonun başlamasını sağlarlar. Dermal fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşür ve yara kenarlarına adhere olarak yaranın küçülmesini sağlarlar.

2.5.3. Yeniden şekillenme evresi

Son evre olan yeniden şekillenme evresi haftalar ya da aylar sürebilir. Hücreler geçici granülasyon dokusu matrisini biçimlendirerek skar dokusunu uzaklaştırır ve doku fonksiyonları devam ettirilir (Lu ve diğerleri, 2011). Hücreler ECM yapımını yavaşlatırlar ve doku sentezi ile MMP'ler tarafından degradasyon dengelenir. Kollajenöz dokuda düzensiz olan tip 3 kollajen, daha düzenli olan kollajen tip 1 fibrillerine dönüştürülür. Yeniden şekillenme evresi, skar dokusu oluşumunu önlemek için önemli bir evredir. Yeniden şekillenme evresi sonunda mekanik olarak güçlü ve organize olmuş bir doku meydana getirilir. Ancak iyileşmiş olan dokunun yara gerilim kuvveti, sağlam dokunun gerilim kuvvetinin en fazla %80'ine ulaşmaktadır (Diegelmann ve Evans, 2004).

2.5.4. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve MMP doku inhibitörleri (TIMP)

MMP'ler ve onların inhibitörleri olan TIMP'ler doku rejenerasyonu ve yeniden şekillenme fazlarında önemli rol oynarlar. Vücuttaki tüm hücre tipleri çeşitli miktarlarda MMP içermektedir. Bunun nedeni hasarlı ECM'nin uzaklaştırılarak yeni sentezlenmiş doku ile yer değiştirebilmesinin sağlanmasıdır. MMP'lerin normal aktivitesi 3 farklı yoldan kontrol edilmektedir. Bunlardan ilki gen düzeyinde transkripsiyonal kontroldür. Örnek olarak epidermal büyüme faktörleri, platelet kaynaklı büyüme faktörleri, IL-1 ve TNF-a MMP genlerinin transkripsiyonunu uyarak mRNA'ların artmasına neden olurlar. İkinci yol moleküler düzeydedir. MMP'ler inaktif formda proenzim olarak sentezlenirler ve propeptid kısımlarının proteolitik yıkımı ile aktive olurlar. Üçüncü yol ise MMP'lerin doğal inhibitör ya da doku inhibitörlerine bağlanarak stabil inaktif MMP/TIMP kompleksleri oluşturulmasıdır.

MMP'ler 4 alt gruba ayrılırlar. Bunlar kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler ve membran tipi MMP'lerdir. MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 kollajenaz grubunun üyeleridir ve tip-1 ve tip-3 kollajenin denatürasyonundan sorumludurlar. Fibriler kollajenin üçlü heliks yapısının bozulması sonucu oluşan küçük peptidler ise jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) tarafından parçalanırlar. Jelatinazlar ayrıca matriks yeniden şekillenme ve skar oluşumunda da rol oynarlar. MMP-2 vasküler endotelial hücrelerin etrafındaki membranı degrade ederek anjiyogenezis ve matriks yeniden şekillenme fazlarında anahtar rol oynarlar. Bu degradasyon kapillerlerin tekrar oluşmasına ECM içine doğru kanal açmalarına neden olur. Bu da yeni kapiller oluşmasını tetiklemektedir. MMP-9 ise doku yenilenmesinde ECM proteinlerinden jelatin, kollajen ve elastin gibi proteinleri çözerek yardımcı olmaktadır. Buna ek olarak MMP'ler proliferasyon, değişim, hücre iletişimi ve anjiyogenez gibi olayları kolaylaştırmak amacıyla hücreler tarafından doğal olarak üretilen maddelerdir (Lu ve diğerleri, 2011; Löffek ve diğerleri, 2011).

TIMP-1 keratinositler, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerde sentezlenir. Bütün MMP'leri inhibe etme özelliğine sahiptir. TIMP-2 bazal keratinositler tarafından sentezlenir ve bütün MMP'leri özellikle de MMP-2'leri inhibe etme özelliğine sahiptir. MMP ve TIMP arasındaki denge yeni doku sentezi ve doku rejenerasyonu için mutlaka sağlanmalıdır. Örneğin kronik yarada TIMP-1 yoktur ya da normal dokuya göre çok az seviyede bulunmaktadır. Proliferasyon evresinde MMP'ler hasarlı dokunun yıkımında

görev alırlar. Bu esnada hasarlı doku yıkımının yanı sıra yeni doku oluşumu da gerçekleştiği için yeni doku sentezi çok miktarda gerçekleşerek skar dokusu birikmesine yol açar. Proliferasyon evresinde MMP'ler doku yıkımı görevine devam eder ve skar dokusunu bozarak organize matris oluşumuna yardımcı olurlar. Bu olaylar dokunun sağlıklı bir şekilde görevini yürütmeye başlamasına kadar devam eder (Lu ve diğerleri, 2011; Löffek ve diğerleri, 2011).

2.5.5. Yara iyileşmesinde rol oynayan diğer faktörler

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

Yara iyileşmesinde plateletler, makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositler VEGF salgırlar ve bu sayede yarada anjiyogeneze yardımcı olurlar. VEGF ayrıca monosit göçünden, düz kas hücreleri tarafından MMP üretiminden ve vasküler permeabilitenin artmasından sorumludur. Bu nedenle kronik yarada tek başına VEGF uygulanması ile oluşan damarların kontrolsüz büyümesi söz konusudur. Kronik yarada VEGF mRNA seviyesinde artış olmasına karşılık, yara yatağında proteolitik aktivitenin artmasından dolayı VEGF proteinlerinde azalma söz konusudur. Kronik yara eksojen VEGF uygulaması ile yapılmış çalışmalarda faz 1'de başarı sağlanmış olsa da faz 2 başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bunun nedeni olarak ta proteazca zengin yara sıvısında VEGF'nin dayanıksız olmasına bağlanmıştır. Bunu aşmak içinse proteazlara dirençli VEGF izoformlarının kullanılması düşünülmüştür.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri inflamatuvar hücrelerden, vasküler endotelial hücrelerden, fibroblastlardan ve keratinositlerden salgılanırlar. FGF-1 asidik, FGF-2 ise baziktir ve bFGF olarak ta bilinir. bFGF normal yara iyileşmesinde ECM oluşumunda rol oynayan enzimlerin üretilmesini uyarmaktadır. Kronik yaralarda FGF iletiminin bozulduğu kabul edilmektedir. Ayrıca kronik yarada FGF üretiminin azalması ve bFGF'nin olağandışı baskılanması söz konusudur. bFGF fibroblastların uyarılmasını sağlayan sitokinlerdendir. bFGF skar dokusu oluşumunda, iyileşme süresinin kısalmasında, derinin normal rengine kavuşmasında rol oynayan bir glikoproteindir. Yeni damar oluşumuna katkıda bulunur ve

tip-1 kollajen yapımını baskılar. bFGF, mitojenik ve anjiyojenik özelliğinden dolayı, doku yeniden şekillenme, yara iyileşmesi ve yeni damar oluşumunu indükleyebilir.

von Willebrand Faktörü (vWF)

vWF kanamanın durmasında rol oynayan önemli bir proteindir. vWF yara dokusunda kanama bölgesinde trombositlerin adezyonu ve agregasyonuna yardım eder ve FVIII i taşır. Yaralanmalarda primer hemostazın sağlanmasında önemli rol oynar. Primer hemostaz oluşumunda vWF ile taşınan FVIII'in yara gölgesinde fibrin oluşumu için kolaylık sağlar. Yara bölgesinde artması yara iyileşmesini hızlandırmaktadır.

2.5.6. Kronik yara

Dokulara kan akımının bozulduğu hastalıklarda (ör. diyabetli hastalar), iskemik doku meydana gelir ve hücrelerin beslenmesini, oksijenlenmesini ve tamir mekanizmalarını bozar. Bu olay genellikle vücudun tüm ağırlığını taşıyan ve kalbe uzak olan alt ekstremitelerde gözlenmektedir (Lim, 2015). Bu dokularda meydana gelen yaralanmalarda normal doku tamir mekanizmaları sağlıklı olarak yürütülemez ve yara kronikleşir. Kan akımının bozulmasıyla yara gerekli olan sinyalleri tam alamaz ve iyileşme gecikir. Ayrıca kan dolaşımı kötü olduğundan kan dolaşımındaki kök hücrelerden tam faydalanılamaz (Lim, 2015).

Kök hücreler, immün hücreler gibi tamir edici görevi olan hücrelerin yara bölgesinde birikememesi de iyileşmeyi geciktirmektedir. Ayrıca diyabet gibi hastalık durumlarında, immünsüpresif ve kemoterapötik ilaç kullanımı sonrasında dokuların verdiği yanıtlar bozulmaktadır. Bozulan inflamatuvar cevap sonrasında bağışıklığın düzenlenmesi ve dengesi bozulmaktadır. Bunun sonucu olarak iyileşme süresi uzar ve dokulardaki MMP, proteaz ve reaktif oksijen bileşiklerinde artış meydana gelir. Kronik yaraların yaklaşık %30'unda MMP seviyelerinde artış söz konusudur (Lim, 2015).

Kronik yaralarda inflamasyon evresi uzamış ve genellikle yara enfekte olmuştur. İnflamasyon evresinin uzaması proliferasyon ve yeniden şekillenme evrelerine geçişi baskılamaktadır. Nötrofiller kronik yarada akut yaraya göre uzun süre ortamda kalmaktadır. Bu nötrofiller MMP-8, elastaz, jelatinaz gibi matrisi parçalayabilen enzimler

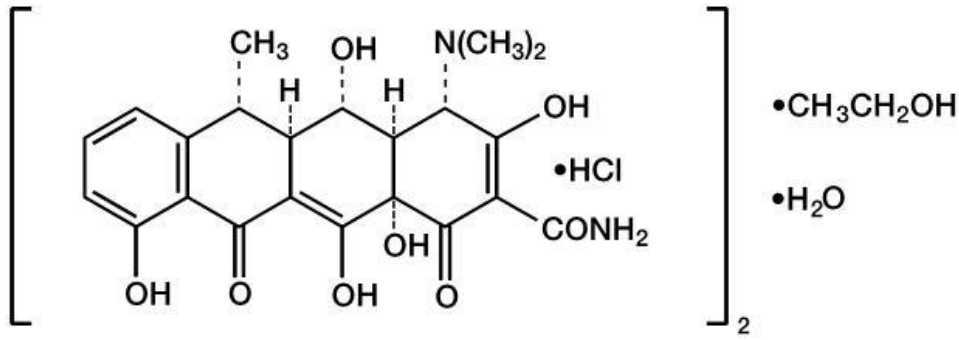
üretmeye devam etmektedir. MMP aktivasyonunun TIMP ile dengesi bozulmuş durumdadır (Menke ve diğerleri, 2007). Makrofajlar da inflamasyon evresinde yara ortamında daha uzun süre bulunmaktadır. Bu hücrelerden MMP 1, 2, 3, 9,13 ve reaktif oksijen türleri yara ortamına salınarak, ortam yüksek oksidatif hale getirilmiştir. Reaktif oksijen türleri, hücreleri ve ECM'yi parçalayabilecek yüksek reaktif moleküllerdir. Proliferasyonu ve ECM yapımını destekleyen PDGF ve TGF-B yara ortamında baskılanırken, inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın yara ortamındaki miktarı çok artmıştır (Menke ve diğerleri, 2007).

Ayrıca diyabette oluşan hiperglisemi hidrostatik basıncın artmasına, dokularda hipoksiye, pH'nın değişmesine neden olarak kronik yarada inflamatuvar cevabın ve doku hasarının sürekli olmasına neden olur. Diyabetik ayak yaralarının tedavisinde büyüme faktörleri ya da MMP inhibitörlerinin kullanılması tedavinin etkinliği açısından önem taşımaktadır.

2.5.7. Doksisiklin

Doksisiklin II. kuşak tetrasiklinler (uzun yarı ömürlü) grubundan yarı sentetik bir antibiyotiktir. FDA tarafından 1967'de onaylanmıştır (Anumolu ve diğerleri, 2010). Tetrasiklinler bakteriyal 30S ribozomuna bağlanarak bakteriyal protein sentezini inhibe ederler ve bu etkileri nedeniyle çoğunlukla enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar (Kogawa ve Salgado, 2012). Birçok gram (+) ve gram (-) bakteriye karşı etkilidir. Solunum yolu, idrar yolu, yumuşak doku enfeksiyonları gibi enfeksiyon hastalıkları yanında malarya ve akne tedavisinde de kullanılmaktadır. Doksisiklinin kapsül formülasyonları ticari olarak piyasada bulunmaktadır.

Doksisiklinin monohidrat, hidroklorür ve hiklat olmak üzere üç farklı formu bulunmaktadır. Doksisiklin katı halde sarı renkli toz halde kristal partiküllerden oluşmaktadır. Kimyasal formülü $(C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl)_2.C_2H_6O.H_2O$ (Şekil 2.3) olan doksisiklin hiklatın molekül ağırlığı 1025,89 g/mol'dür ve sudaki çözünürlüğü 50 mg/ml'dir. Doksisiklin hiklat metanolde çözünür, etanolde az çözünür, kloroform ve eterde ise çözünmez özelliktedir.



Şekil 2.3. Doksisiklin hiklatın kimyasal yapısı

Doksisiklinin kronik yarada etkisi

Son çalışmalar, doksisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin güçlü MMP inhibitörü olduklarını, antibiyotik etkileri dışında birçok hücresel fonksiyonu etkileyen pluripotent ilaçlar olduğunu göstermiştir (Akalin ve diğerleri, 2004; Liu ve diğerleri, 2013). Doksisiklinin antibakteriyel etkisinden bağımsız olarak yara iyileştirici etkisi bulunmaktadır. Doksisiklin yara iyileştirici etkisini şu yollarla göstermektedir (Stechmiller ve diğerleri, 2010):

- 1) Doksisiklinin çift değerlikli metal iyonlarına bağlanma kabiliyeti vardır. Bu sayede yara bölgesinde MMP'lerden çinkoyu ayırarak aktif MMP'lerin doğrudan inhibisyonunu sağlar.
- 2) Doksisiklin hücresel mekanizmalara etki ederek TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) inhibitörü olarak etki gösterir.
- 3) Doksisiklin α 1-proteinaz inhibitörünün parçalanmasını engelleyerek serin proteazların (nötrofil elastaz) dolaylı inhibisyonunu yapar. Ayrıca doksisiklin ucuz, güvenli ve kolay uygulanabilen bir ajandır.

Doksisiklinin topikal yoldan uygulanması ile yara tedavisindeki etkinliği (MMP, TNF- α , serin proteaz seviyelerinde azalma) literatürde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir (Solorzano ve diğerleri, 1997; Anumolu ve diğerleri, 2011).

İnsanlarda kronik yarada doksisiklin kullanımı üzerine yapılmış 3 önemli çalışma mevcuttur.

1. Kronik alt ekstremitte ülseri olan diyabetli 7 farklı hastaya %1 doksisisiklin içeren ve doksisisiklin içermeyen karboksimetil selüloz hidrojel uygulaması yapılmıştır (Chin ve diğerleri). Doksisisiklinle tedavi edilen 4 farklı hastanın tamamında iyileşme gerçekleşirken, kontrol grubunda ise sadece bir yarada iyileşme gözlenmiştir. Kontrol grubunda yaraları iyileşmeyen iki hastaya doksisisiklinle tedavi önerilmiş ve bu tedaviye başladıktan sonra 12 hafta içinde yara boyutunda %60 oranında küçülme gerçekleşmiştir. Topikal doksisisiklinle tedavi edilen gruplarda 30 hafta sonunda granülasyon dokusu oluşmuş ve epitelizasyon gerçekleşmiştir. İlaç içermeyen hidrojel ile karşılaştırıldığında doksisisiklinin iyileşme hızını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. Her iki tedavi grubunda da advers etki bildirilmemiştir.

2. İyileşmeyen venöz ayak ülseri bulunan 20 hasta ile kompresyon tedavisine alternatif olarak oral doksisisiklinin etkinliği üzerine çalışma yapılmıştır (Sadler ve diğerleri, 2012). 10 hasta oral yoldan günde iki kez 20 mg doksisisiklin, diğer 10 hasta ise oral yoldan günde iki kez 100 mg doksisisiklin kullanmışlardır. 4 hafta sonra yapılan ölçümlerde yüksek doz uygulanan grupta yara bölgesi %48 oranında küçülürken yara sıvısında MMP miktarında azalma söz konusu olmuştur.

3. Kronik periodontiti olan 45 hasta ile oral ve topikal doksisisiklinin etkisi araştırılmıştır (Akalin ve diğerleri, 2004). Hastalar sistemik doksisisiklin, topikal doksisisiklin ve kontrol gruplarına rasgele seçilmişlerdir. Lokal doksisisiklin uygulaması anlamlı olarak iyileşmeyi hızlandırırken oral doksisisiklin uygulanan gruplarda görülen advers etkiler görülmemiştir. Dolayısıyla topikal doksisisiklin oral yola kıyasla tercih edilebilir olduğunu gösterilmiştir.

Doksisisiklinin elektro-çekim yöntemiyle polikaprolakton polimeriyle hazırlanmış nanoliflerinin, antibakteriyel özelliğinden dolayı periodontal enfeksiyonların tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Chaturvedi ve diğerleri, 2013). Koaksiyal elektro-çekim yönteminin kullanıldığı bir çalışmada doksisisiklinin bu yöntemle nanoliflere yüklenebilmiştir (Song ve diğerleri, 2013).

2.6. Yara Modelleri

İn vivo hayvan çalışmaları geliştirilen tıbbi ürünün etki mekanizması ve güvenliği hakkında bilgiler veren çalışmalardır. Yara iyileşmesine yönelik in vitro çalışmalarda bazı parametrelerin etkisi araştırılabilir olsa da hayvan modelleri ile dinamik, üç boyutlu ve canlı bir organizmadan çok daha önemli bilgiler elde edilmektedir. Kemirgenlerle yapılan çalışmalarda doku ve organlarının küçük olması nedeniyle insanlarla kıyaslanma yapılması zordur (Dorsett-Martin, 2004). Ayrıca yüksek kalp atım hızından dolayı dokuların daha fazla kanlanması, yara iyileşmesinin çok daha hızlı olmasını sağlamaktadır. Ancak insanlarda yara iyileşmesinde görülen çatlama, iskemi, ülserleşme, enfeksiyon ve skarlaşma gibi benzer sorunlar hayvanlarda yapılan yaralarda görülmektedir. Tüm dezavantajlarına rağmen yara iyileştirici bir ürünün in vivo çalışma sonuçları temel biyolojik karakteristikleri hakkında bilgiler verecektir (Dorsett-Martin, 2004).

2.6.1. İnsizyonel yaralar

Derinin veya dokunun keskin bir bıçakla kesilmesi ile oluşturulur. Dokunun hızla bozulması gerçekleşir, oluşan boşluğa plazma ve kan hücreleri birikerek hızlıca hemostaz ve fibrin oluşumu sağlanır. Elektrokoter ya da cerrahi lazer ile daha az kanayan fakat daha hasarlı yaralar yapılabilir. Genellikle yara oluşturulduktan sonra cerrahi ipliklerle dikilerek hasarlı doku birleştirilmeye ve epitelizasyonun daha hızlı olması sağlanmaya çalışılır. Bu şekilde oluşturulan yaralar yara gerilimi ile ilgili biyomekanik analizler için oldukça uygundur, ancak doku biyokimyası ve epitelizasyonunun değerlendirilmesi için çok uygun değildir.

2.6.2. Eksizyonel yaralar

Bu modelde subkutan yağ tabakasına kadar epidermis ve dermisin tamamının alınmasıyla yara oluşturulur. Biyokimyasal ve histolojik parametrelerin tayini için daha fazla dokuyu almaya imkan sağlar. Daha fazla doku alındığı için yeni oluşan alanda daha fazla hücre, doku, RNA, eksüda ve histolojik bölgeler mevcuttur. Eksizyonel yara oluşturmada en sık kullanılan yöntem tam kalınlıkta yara (full-thickness wound) modelidir. Yaraların standart olması için biyopsi punchları ya da dermatom bıçakları kullanılır (Özler ve diğerleri, 2009). Yara iyileşmesinde hemostazdan başlayarak görülen tüm evreler gerçekleşir.

Yaranın iyileşme hızını ölçmek için, oluşan granülasyon dokusunun alanı hesaplanır, bağ dokunun histolojik yapısı incelenir ve biyokimyasal kollajen miktarı ölçülür.

2.6.3. Yanık yaraları

Yanık yaraları sıcak (ısıtılmış metal), soğuk (kuru buz ya da sıvı azotta bekletilmiş metal) ya da kimyasal ajanlar kullanılarak yapılmaktadır. Deri ve diğer dokular kimyasal, termal ya da radyasyon yanıklarında diğer yaralardan daha farklı yanıt verirler. 1. ve 2. derece yanık yaralarında epitel tam hasarlanmamış ve nekrotik doku yaratılmıştır. Dolayısıyla yanık yaralarının iyileşmesi bu nekrotik dokunun uzaklaştırılması nedeniyle biraz daha geç olmaktadır. Termal yanıkta, hücresel düzeyde sitoplazma ve hücre zarında protein denatürasyonu meydana gelmektedir. Yanık sonrasında gelişen doku harabiyeti lökosit ve endotel hücrelerinden salınan sitokinler aracılığıyla hem lokal hem de sistemik inflamatuvar yanıtı neden olur.

2.6.4. Kronik yara modelleri

Akut yara modelleri genellikle travmatik yaralanmalara benzerdir. Yara iyileşmesinin evreleri düzenli ve zamanında gerçekleşmektedir. Kronik yaralarda ise düzenli ve zamanında onarım olmadığı için anatomik ve fonksiyonel düzelme olmamaktadır (Harding ve diğerleri, 2002). Kronik yaralarda iyileşmeyi engelleyen bir çok sistemik ve lokal faktör olduğundan dolayı yara sıklıkla tekrar eder (Nunan ve diğerleri, 2014). İnsanlarda yara iyileşmesine genellikle dolaşımın bozulması, kötü beslenme, ilerlemiş yaş, azalmış fiziksel aktivite, kronik ve fizyolojik dengenin bozulması gibi faktörler eşlik eder. Hayvanlarda ise kronik yara oluşturmak oldukça kompleks ve zorlu bir süreçtir. Dolayısıyla hayvanlarda kronik yara oluşturmada uygulanan klasik yöntem metabolik hasara (diyabet gibi) yol açmaktır (Nunan ve diğerleri, 2014).

Deney hayvanlarında diyabet modelleri fare, sıçan, hamster, kobay, tavşan, kedi, köpek, domuz ve maymunlarda oluşturulabilmektedir (Öntürk ve Özbek, 2007; Furman, 2008). Tip 1 diyabet kimyasallarla (alloksan, streptozotosin, çinko şelatörleri), spontan, virüsle ya da transgenik hayvanlarda oluşturulabilmektedir (Oldstone ve diğerleri, 1991; Kurçer ve Karaoğlu, 2012). Streptozotosin (STZ) pankreas β hücrelerine doğrudan toksik etkilidir. Glukozla uyarılan insülin salımını bloke eder (insüline bağımlı diyabet) (Furman, 2008).

Ayrıca böbrek ve karaciğerde de hasar oluşturur. STZ; 50-100 mg/kg, i.p / i.v. (tek doz) enjekte edilerek diyabet oluşturulabilir. Bir gece önce aç bırakılan sıçanlara 0.1 M sitrat tamponu içerisinde (pH: 4.5) 50-100 mg/kg dozda uygulanarak, 72 saat sonra açlık kan şekeri 250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabetli kabul edilebilir (Kurçer ve Karaoğlu, 2012). Tip II diyabet ise spontan, deneysel (kimyasal modeller, cerrahi, diyet, hormonlar, anne karnında malnütrisyon) ya da transgenik hayvanlarla elde edilir.

2.7. Yara İyileşmesinde İncelenen Oksidatif Parametreler

2.7.1. Malondialheit

Yara bölgesinde serbest radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu sonucu doymamış yağ asitleri oksidasyona uğrar ve membran lipid yapısı değişerek fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bir ara ürün olan MDA, tiyobarbütirik asitle ölçülebilmektedir. MDA sitotoksik bir lipid radikalidir ve hem hücre içinde hem hücre dışında birçok molekülle etkileşime girerek doku hasarına yol açar (Karataş ve diğerleri, 2011). Dokularda yüksek MDA seviyeleri oksidatif stresin ya da lipid peroksidasyonunun arttığının göstergesidir (Coşkun ve diğerleri, 2005). Diyabetik yaralarda yara dokusunda serbest radikal aracılı hasara bağlı olarak daha yüksek MDA düzeyleri görülmektedir.

2.7.2. Nitrik oksit

Nitrik oksit L-arjinin ve oksijenden sentezlenen, fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda önemli role sahip bir serbest radikaldir. Önemli fizyolojik etkilerinden birisi vazodilatör etkisinden dolayı kan basıncı üzerine olan etkisidir. NO süperoksit radikali ile etkileşmesi sonucu oluşan peroksinitrit, oksidatif etkiye sahiptir (Karataş ve diğerleri, 2011). NO toksisitesinin başlıca sorumlusu proteinlere doğrudan zararlı etkisi olan peroksinitrittir. Peroksinitrit daha sonra NO radikalının son ürünleri olan nitrit ve nitrata dönüşür.

2.7.3. Glutasyon

Glutasyon dokuyu oksidatif strese karşı koruyan önemli bir antioksidan moleküldür (Kılıç ve diğerleri, 2013). Glutasyon oksitlenmiş tiyol oluşturmak için elektron alıcısı gibi hareket ederek özellikle hidrojen peroksidi hedef alır. Glutasyon tiyolü degrade ederek hücreden

atılmasını sağlar. Yaralanma durumunda glutasyon seviyeleri normal dokuya kıyasla anlamlı ölçüde azalmaktadır. Bunun nedeni yara bölgesinde glutasyonun oksidatif hasara karşı sürekli kullanılmasındandır. Bir çalışmada diyabetik ülserli hastaların yara olan dokularında ortalama glutasyon seviyesi 53,4 pmol/mg iken, kontrol dokularında 150,6 pmol/mg bulunmuştur (Mudge ve diğerleri, 2002). Aynı çalışmada topikal glutasyon ile tedavi edilen grubun daha hızlı iyileştiği gösterilmiştir.

2.7.4. Askorbik asit

Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit (Vitamin C) güçlü indirgeyici aktivitesi olan güçlü bir antioksidandır. Sulu ortamda serbest radikallerle reaksiyona girebilir, E vitamininin geri eldesinde rol oynar ve vücuttaki hidroksilasyon olaylarında indirgeyici görev alır. Kemik, deri ve kapiler dokuların intraselüler matrislerinde görev yapan kollajen ve glikozaminoglikanların sentezi için önemli bir moleküldür.

2.7.5. Süperoksit dismutaz

Süperoksit anyonları moleküler oksijen tarafından üretilen birincil reaktif oksijen bileşikleridir. Süperoksit anyonları ilk olarak yakınlarında nitrik oksit sentaz tarafından üretilen nitrik oksit varsa reaksiyona girerler ve bunun sonucunda peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit yara bölgesinde bakterilerin oksidatif yoldan öldürülmesini sağlar ancak yara bölgesi için güçlü ve toksik bir oksitleyici maddedir. Bu maddelerin görevlerini yaptıktan sonra nötralize olmaları ve yara iyileşme evrelerini etkilememeleri gerekir. Bu etkilerinden korunmak için süperoksit anyonları SOD tarafından hidrojen peroksit'e çevrilir (Kurahashi ve Fujii, 2015). Hidrojen peroksit daha sonra glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığıyla etkisiz hale getirilir. Böylece lipid peroksidasyonu inhibe edilmiş olur.

2.8. Yara Örtüleri

Yara iyileşmesi sürecinde uygun yara örtülerinin kullanımı önemli rol oynamaktadır (Türsen, 2013). Yara örtülerinin görevleri; enfeksiyona ve mikroorganizmalara karşı koruyucu özellik sağlamak, kan ve yara sıvısını absorblamak, yara iyileşmesini sağlamak ve bazı durumlarda yara üzerine ilaç tedavisi uygulamaktır. Yara örtülerinin diğer görevleri arasında sıvı kontrolü, koku giderilmesi, mikrobiyal kontrol, fiziksel bariyer, boşluk

doldurucu etki, yaradaki yabancı cisimlerle, hasarlı ve enfekte olmuş dokuların tamamen temizlenmesi (debridman) bulunmaktadır (Anumolu ve diğerleri, 2011). Yara örtüsü üretiminde genellikle hidrokolloidler, aljinatlar ve hidrojel kullanılmaktadır (Civelek ve diğerleri, 2007; Snyder ve diğerleri, 2012). Aljinat yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman yara proteazları için substrat olmaktadır. Yara örtüsüne yara sıvısı absorbe olduğu zaman proteazlar aljinat moleküllerine bağlanmakta ve tekrar yaraya dönerek kollejenleri parçalaması engellenmektedir. Gümüş, çinko, rubidyum, sitrik asit, kalsiyum, potasyum veya büyüme hormonu içeren ticari yara örtüsü matrisleri (TegadermTM, Dermagraft[®], Apligraf[®], Epicel[®], TransCyte) tedavide kullanılmaktadır. Ancak bu ürünlerin ortak dezavantajları ithalat yoluyla gelmeleri nedeniyle yüksek maliyetleri ve piyasada yaygın olarak bulunmamalarıdır (Civelek ve diğerleri, 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yara örtülerinin üretiminde elektro-çekim yöntemi literatürde önem kazanmıştır. Çünkü bu yöntemle hazırlanan yara örtüleri diğer yöntemlere göre birçok üstünlük sağlamaktadır. Elektro-çekim yöntemiyle hazırlanan nanolif yapısındaki yara örtülerinin avantajları şöyle sıralanabilir (Chen ve diğerleri, 2008; Cai ve diğerleri, 2010; Kanani ve Bahrami, 2010; Kim ve Yoo, 2013; Çalamak ve diğerleri, 2014):

- 1) Nanolifler oluşumlarına bağlı olarak geniş yüzey alanı ve 3 boyutlu mikroporöz yapıya sahiptirler. ECM yapısını taklit edebilme yeteneğine sahiptir. ECM memeli dokuları içindeki hücrelerin arasında bulunan ve onları destekleyen kompleks bir yapıdır. Deri, tendonlar, kıkırdak ve kemikte yaygın olarak bulunur ve temel bileşenleri kollajendir.
- 2) Mikroporöz yapıda oldukları için oksijene geçirgendirler. Ancak bu porlar ekzojen bakterilerin yaraya penetrasyonunu engelleyecek ölçüde de küçüktür.
- 3) İyileşme için sinyal yolu hızla başlatılarak fibroblastlar dermal tabakaya çekilir. Bu sayede ECM'deki kollajen ve çeşitli sitokinlerin (büyüme faktörleri, anjiyogenik faktörler) hasarlı dokuyu onarımı için salgılanması başlatılır.
- 4) Yarayı bakteriyel penetrasyondan ve dehidratasyondan korur.
- 5) Spesifik yüzey alanının yüksek olması ($>5\text{m}^2/\text{g}$) sayesinde yara sıvısının drenajını ve adsorbe olmasını sağlar.
- 6) Elde edilen nanoliflerin esnek ve kesilip şekillendirilebilir olması bölgeye özgü uygulamalar için avantaj sağlar.
- 7) Yara örtüsü için uygun olan dokunmamış (non-woven) formda üretilirler.
- 8) Yaranın korunmasının yanı sıra terapötik ajanların lokal uygulanması sağlanır.

Patent araştırmalarında doksisiklin hiklatın süspansiyon (CN 102440998 A), liyofilize enjeksiyonluk toz (CN 105078905), lipozom (CN 1853640 B), enterik kaplı pellet (CN 101596162 A) formölasyonları için alınmış patentler olmasına rağmen doksisiklin ve kollajenin birlikte kullanıldığı koaksiyel elektro-çekim tekniğıyle hazırlanmış nanolif yara örtüsü çalışmasına rastlanmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Toplayıcı kısmı döner silindir ve koaksiyal nanolif üretimine uygun elektro-çekim cihazı (NE-300, İnovenso, Türkiye)
- Toplayıcı kısmı sabit plaka elektro-çekim cihazı (NE-100, İnovenso, Türkiye)
- Diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC 60, Shimadzu, Japonya)
- Fourier transform infrared spektrofotometri cihazı (Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD)
- İletkenlik ölçüm cihazı (HI-9033, Hanna Instruments, ABD)
- Rotasyonel viskometre (DV-III Rheometer, Brookfield, ABD)
- Yüzey gerilimi ve temas açısı ölçüm cihazı (Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scientific, Attension, Finlandiya)
- Taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400, Fei, ABD)
- Yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu (Tecnai G2 Spirit BioTwin, Fei, ABD)
- Tekstür analiz (Texture Analyzer) cihazı (TA-XT Plus, Texture Analyser, İngiltere)
- Yüzey karakterizasyon cihazı (Autosorb-6B, Quantachrome Instruments, ABD)
- UV spektrofotometre cihazı (UV-1700, Shimadzu, Japonya)
- Çözünme hızı test cihazı (VK-7000, Vankel, ABD)
- UV lambalı (253 nm) laminar hava akışlı test kabini (Euroflow Class IIA, Clean Air Techniek, Hollanda)
- Stabilite test kabinleri (TK-252, Nüve, Türkiye)
- Bilgisayar destekli görüntüleme sistemi (DM-4000, Leica, Almanya)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Tip-1 kollajen (from calf skin, Bornstein and Traub Type I, Sigma Aldrich, ABD)
- Doksisisiklin hiklat (>%98, Sigma Aldrich, ABD)
- Polikaprolakton (MA:80 kDa, Sigma Aldrich, ABD)
- Polietilen oksit (MA:600 kDa, Colorcon, İngiltere)

- Kitozan (visk. 129 cPs, Golden Shell Pharmaceutical, Çin)
- Sodyum aljinat (Protanal LF 10/60, FMC Biopolymer, Norveç)
- Glasiyal asetik asit (%100, Sigma Aldrich, ABD)
- 1,1,1,3,3,3 hekzafloro-2-propanol (Sigma Aldrich, ABD)
- Tiyoglikolatlı besi yeri (Oxoid, İngiltere)
- Soya-kazein ekstresi besi yeri (Sigma Aldrich, ABD)
- İnsan keratinosit hücre serisi (HaCaT, CLS Cell Lines, 300493, Almanya)
- UltraV block (TA-125-UB, Lot: AUB150113AC, Lab Vision, ABD)
- VEGF primer antikor (bs-1665R, Rabbit Polyclonal, Lot: 980699W, Bioss, ABD)
- bFGF primer antikor (bs-0217R, Rabbit Polyclonal, Lot: 9G23N9, Bioss, ABD)
- vWF primer antikor (bs-0586R, Rabbit Polyclonal, Lot: 9G30N12, Bioss, ABD)
- IL-8 primer antikor (ab7747, Rabbit Polyclonal, Lot: GR233253-1, Abcam, ABD)
- MMP2 primer antikor (bs-0412R, Rabbit Polyclonal, Lot: 9E29M21, Bioss, ABD)
- MMP-9 primer antikor (bs-0397R, Rabbit Polyclonal, Lot: AE042901, Bioss, ABD)
- TIMP-1 primer antikor (bs-0415R, Rabbit Polyclonal, Lot: AE092115, Bioss, ABD)
- TIMP-2 primer antikor (bs-0416R, Rabbit Polyclonal, Lot: 980709W, Bioss, ABD)
- Biotinli sekonder antikor (TP-125-BN, Lot: PBN141111AE, Lab Vision, ABD)
- Streptavidin peroksidaz enzim kompleksi (TS-125-HR, Lot: SHR150121AA, Lab Vision, ABD)
- Diaminobenzedin içeren (DAB) substrat (TA-125-HD, Lot: HD31722, Lab Vision, ABD)

3.1.3. İn vivo deneylerde kullanılan çözeltiler

Nitrik oksit tayininde kullanılan

Griess I reaktifi:

%2'lik N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür çözeltisi

Griess II reaktifi:

%5'lik H₃PO₄ içinde %2'lik sülfanilamit çözeltisi

Askorbik asit tayininde kullanılan

Renk reaktifi:

%0,6'lık CuSO_4 , %5'lik tiyöüre ve 9 N H_2SO_4 içinde %2,2'lik dinitrofenilhidrazin sırasıyla 1:1:20 (h/h/h) oranında karıştırılır.

Glutasyon tayininde kullanılan

Reaktif karışım:

NaCl.....30 g
 Metafosforik asit.....1,67 g
 EDTA.....0,2 g
 Distile su.....ym 100 ml

3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri

Önformülasyon çalışmalarında DSC termogramlarının incelenmesi, etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimliliğin yorumlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda kullandığımız kollajen, doksisisiklin ve polimerlerin DSC termogramları alınarak erime noktaları tayin edildi. Ayrıca etkin madde ve polimerlerin 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının da DSC termogramları alınarak geçimsizlik olup olmadığı incelendi.

DSC analizlerinde önce doksisisiklin ve polimerlerin ayrı ayrı, azot gazı altında $10^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında, $25-250^\circ\text{C}$ arasında termogramları alındı. Bunun için 2 mg madde 0,1 mg duyarlılıkta hassas terazide tartıldıktan sonra alüminyum örnek kabına alınarak basınç altında sıkıştırıldı. Daha sonra doksisisiklinin diğer maddelerle 1:1 oranındaki karışımlarının aynı koşullarda termogramları alınarak etkin madde-yardımcı madde geçimsizliği kontrol edildi.

3.2.2. İletkenlik ölçümleri

Elektro-çekim işleminde düşük iletkenliğe sahip polimer çözeltisi ile damla yapısından Taylor konisi şekline geçiş sağlanamaz ve lif oluşumu gerçekleşmez. Bu nedenle çalışmalarda kullanılacak polimer çözeltilerinin ve karışımlarının iletkenlik değerleri incelenmiştir. İletkenlik bir metalin veya bir gazın kısaca tüm malzemelerin elektrik akımını geçirebilme özelliğidir. Çözeltilerde akım anyonlar ve katyonlar tarafından taşınırken, metallerde elektronlar tarafından taşınır. Bir çözeltinin elektriği ne kadar iyi iletmediği konsantrasyona, iyonların hareketliliğine, iyonların değerliğine ve sıcaklığa bağlıdır. Tüm maddeler bir miktar iletkenliğe sahiptir. Hazırlanan çözeltilerin ve karışımların iletkenlik özellikleri tayin edilirken önce yaklaşık 10 ml çözelti ya da karışım, 20 ml'lik mezüre konuldu. Daha sonra kondüktivimetre cihazının probu mezürün içine daldırıldı. İletkenlik ölçerin iki aktif elektrotuna optimum bir frekansta alternatif akım uygulanarak potansiyel ölçümü yapıldı. İletkenliği hesaplamak için hem potansiyel hem de akım kullanılarak cihaz tarafından çözeltilerin ve karışımların $\mu\text{S}/\text{cm}$ cinsinden kondüktivite değerleri ölçüldü ve değerlendirildi. Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

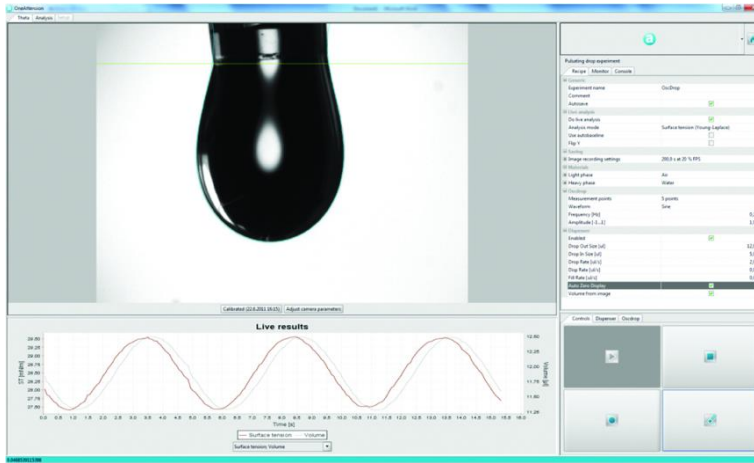
3.2.3. Viskozite ölçümleri

Elektro-çekim işleminde çok düşük viskoziteli polimer çözeltilerinden devamlı ve düzgün yapılı lifler oluşmazken, çok yüksek viskozite değerlerine çıkıldığında çözeltinin akışı zorlaşacak ve üretimin durmasına neden olabilecektir. Bu nedenle çalışmalarda kullanılacak polimer çözeltilerinin ve karışımlarının viskozite değerleri incelenmiştir. Sıvıların viskozitesi, akışkan üzerine uygulanan kaydırma kuvvetinin karşılaştığı sürtünme direncinin bir ölçüsüdür. Sürtünme direnci arttıkça, sıvıyı hareket ettirmek için gerekli olan kayma kuvveti artacaktır. Çözeltilerin ve karışımların viskozite ölçümlerinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda polimer çözeltilerinin ve karışımlarının viskozite ölçümleri, düşük hacimdeki örneklerde çalışmaya imkan veren koni/tabla viskometresi kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde sabit tabla üzerinde dönen koninin (spindle), akışkan içindeki relatif hareketinden ortaya çıkan kuvvetlerin yol açtığı tork ve kayma geriliminden viskozite hesaplanmaktadır. Oda sıcaklığında yapılan deneylerde, hazırlanan polimer çözeltisi ve karışımları cihazın tabla kısmına (0,5 ml) konularak farklı

kayma hızlarında (10-100 rpm) kayma gerilimi ve viskozite ölçümleri yapıldı. Elde edilen viskozite ve kayma gerilimleri değerlendirildi.

3.2.4. Yüzey gerilimi ölçümleri

Elektro-çekim işleminde jet oluşumu için polimer çözeltisinin yüzey geriliminin düşük olması beklenmektedir. Bu nedenle çalışmalarda kullanılacak polimer çözeltilerinin ve karışımlarının yüzey gerilimi değerleri incelenmiştir. Yüzey gerilimi yüzeyin 1 cm² artırılması için birim uzunluğa uygulanan kuvvettir ve birimi mN/cm ya da dyn/cm'dir. Sıvıların yüzey gerilimi kapiler yükselme, Wilhelmy levha yöntemi, halka yöntemi, damla hacmi ve ağırlığı metodu, asılı damla gibi farklı yöntemler kullanılarak hesaplanabilir. Çalışmalarımızda yüzey gerilimi ölçümleri asılı damla (pendant drop) metodu kullanılarak yapıldı. Bu yöntemle göre polimer karışımının iğne ucunda asılı duran damlasının şekli cihaz tarafından resim olarak kaydedildi (Resim 3.1).



Resim 3.1. Asılı damla metodu ile yüzey gerilimi ölçümü

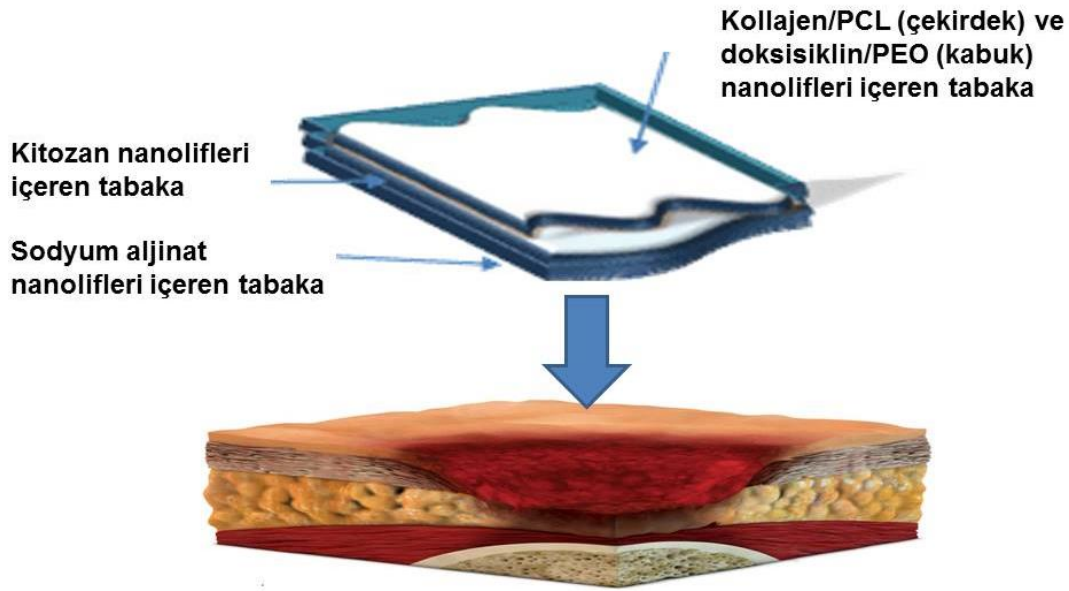
Damla iğne ucundan kopmaksızın asılı kaldığında, yer çekimi kuvveti ile sıvının yüzey gerilimi arasındaki dengenin sonucu olarak Resim 3.1'de gösterildiği gibi damla profili oluşur. Bu profilden polimer karışımlarının yüzey gerilimi, Young Laplace eşitliği (Eş. 3.1) kullanılarak damlanın geometrik ölçülerine göre cihazın yazılımı tarafından hesaplandı (Stalder ve diğerleri, 2010). Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

$$\gamma = \frac{\Delta P \cdot G \cdot R_0^2}{\beta} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, γ : yüzey gerilimi, ΔP : yüzeyler arasındaki yoğunluk farkı, G : yerçekimi sabiti, R : damla ucundaki eğim eğriliği yarıçapı, β : şekil faktörünü simgelemektedir.

3.3. Nanolif Üretimi Çalışmaları

Yara örtüsü olarak görev yapacak nanoliflerin etkin maddeyi ve farklı polimerleri içerecek şekilde üç katmanlı olması planlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Üretilen yara örtüsünün şematik görüntüsü

Tasarlanan yara örtüsünün en alt katmanını oluşturan aljinat ve kitozanın yara iyileştirici etki ve biyoadeziv özellik göstermesi beklenmektedir. Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmında bulunan doksisisiklinin hızla yara sıvısına karışması, sonrasında ise çekirdek kısmında bulunan PCL ve kollajenin yeni doku oluşumunda doku iskelesi görevi yapacağı düşünülmüştür (Şekil 3.1).

Buna göre üç katmanlı olan koaksiyal nanolif yapısındaki yara örtüsünün üretiminde;

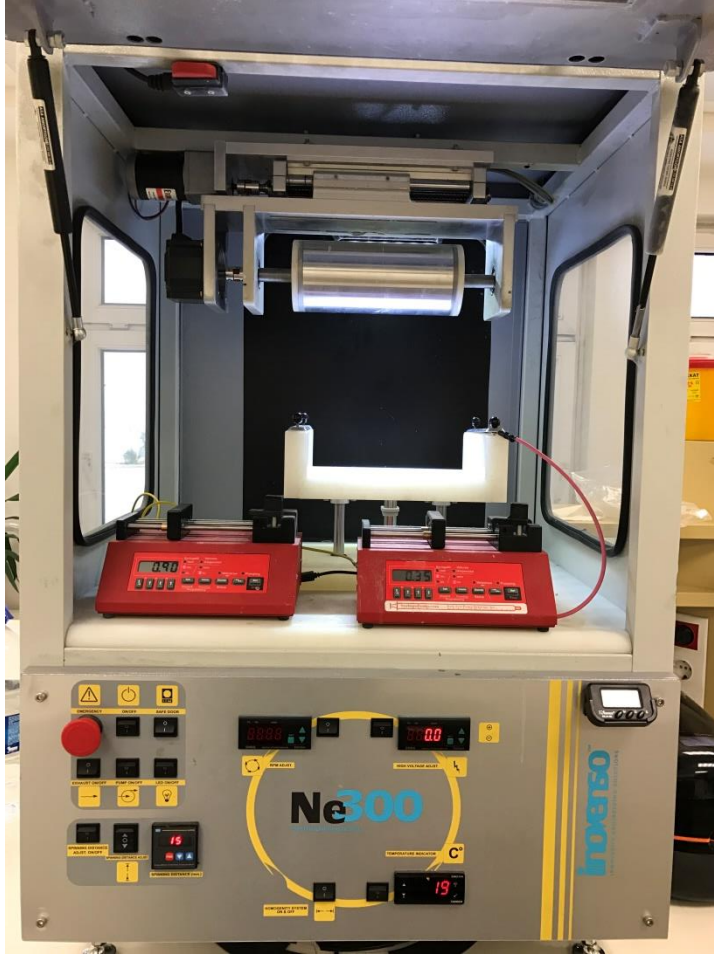
- İlk olarak iç (çekirdek) kısmında kollajen ve PCL, dış (kabuk) kısmında PEO ve doksisisiklin içeren koaksiyal nanolifler, en alt katmanda paralel yerleşimli olarak döner silindire toplanmıştır.

- Koaksiyal yapıdaki yara örtüsü tabakası elde edildikten sonra polimer karışımı değiştirilerek bu tabakanın üzerine önce kitozan içeren nanolifler paralel yerleşimli olarak toplanmıştır.
- Daha sonra sodyum aljinat içeren nanolifler yara örtüsünün en üst katmanını oluşturacak şekilde paralel yerleşimli olarak toplanmıştır.

Nanolif üretim çalışmalarında işlem parametrelerini saptamak amacıyla, önce doksiziklin/kollajen içeren koaksiyal nanoliflerin, daha sonra ise kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerin üretilmesi için çalışmalar ayrı ayrı yapılmıştır.

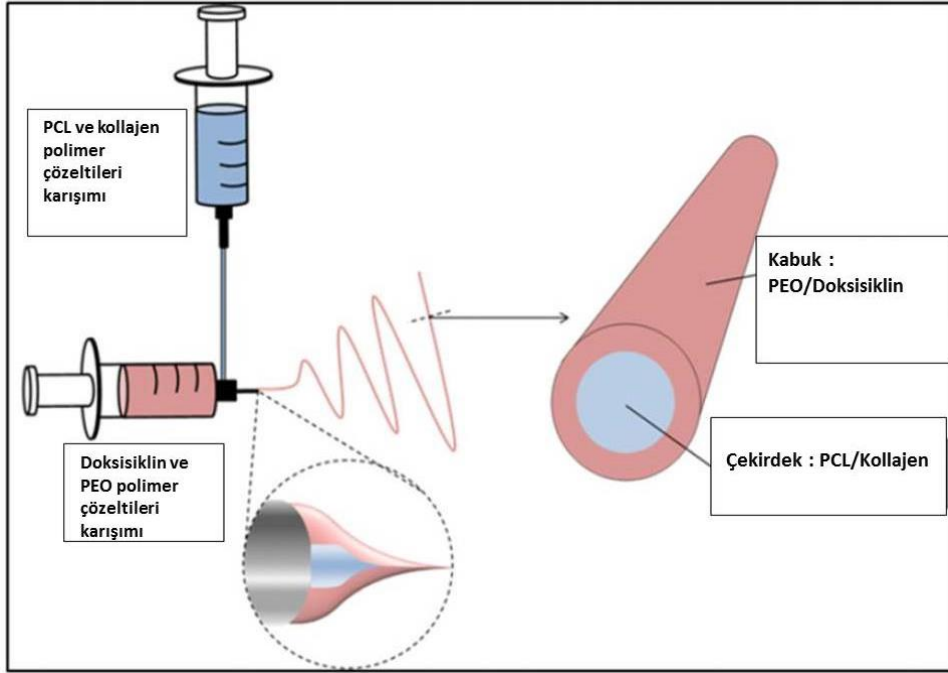
3.3.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları

Yara örtüsünün en alt katmanını oluşturan koaksiyal nanoliflerin paralel yerleşimli üretilmesi için yapılan önformülasyon çalışmaları koaksiyal başlıktan döner silindire toplama yapılan elektro-çekim cihazında gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2).



Resim 3.2. Toplayıcı kısmı döner silindir olan koaksiyal elektro-çekim cihazı

Koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmında PCL/kollajen, kabuk kısmında PEO/doksisiklin içerecek şekilde üretilmesi planlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Koaksiyal nanoliflerin şematik görüntüsü

Çekirdek kısımdaki PCL hidrofobik özelliktedir. Bu nedenle kabuk kısımindaki polimerlerin çözücüsünün su olması durumunda koaksiyal başlığın uç kısmında PCL su ile reaksiyona girerek koaksiyal başlığın tıkanmasına yol açacaktır. Bu nedenle kabuk kısmında çözücü olarak asetik asit kullanılmıştır.

A1-A4 formülasyonlarında çekirdek kısmı için polimer çözeltisi hazırlanırken önce PCL ve kollajen yeterli miktarda tartıldıktan sonra yeterli miktar glasiyal asetik asite eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılarak maddelerin iyice çözünmesi sağlandı. Ancak kollajenin glasiyal asetik asitte tam çözünmemesi ve elektro-üretim yapılırken başlığın tıkanmasına yol açması nedeniyle sonraki formülasyonlarda HFIP'deki çözeltisi kullanıldı. Örneğin kollajen:PCL (2,5:5) karışımının elde edilmesi için, kollajen %5 oranda HFIP'de, PCL %10 oranda GAA içinde çözündü. Daha sonra bu iki çözelti eşit hacimde karıştırılarak sonuç karışımında %2,5 kollajen, %5 PCL olması sağlandı.

Kabuk kısmı için polimer çözeltisi hazırlanırken önce 250 mg doksisiklin 1 ml distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü. 250 mg PEO, 9 ml glasiyal asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve üzerine doksisiklinin 1 ml sulu çözeltisi eklendi. Sonuç karışım ultrasonik banyoda bekletildikten sonra elektro-çekim işlemine geçildi.

Koaksiyal nanoliflerin üretiminde 10-25 kV aralığındaki voltaj değerleri denenmiş ve jet oluşumunu sağlayabilen değerlerle (11-12 kV) çalışmalara devam edilmiştir. İğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe için de 10-23 cm aralığında değerler denenmiş ve en uzak mesafe olan 23 cm uygun bulunmuştur. 23 cm'den daha yakın değerlerde jetlerden çözücünün buharlaşması tam sağlanamadığı için folyo üzerindeki nanolif tabakasını ıslatarak zarar verdiği gözlenmiştir. Bu nedenle bu iki değer çalışmalarda sabit tutulmuştur.

Koaksiyal yapının oluşup oluşmadığını kontrol amacıyla yapılan nanolif üretim çalışmaları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Koaksiyal nanoliflerin işlem parametreleri

Formülasyon Kodu	Çekirdek kısmı	Çekirdek kısmı kons. (%)	Çekirdek kısmı çözücü	Kabuk kısmı	Kabuk kısmı kons. (%)	Kabuk kısmı çözücü	Çekirdek kısmı akış hızı (ml/s)	Kabuk kısmı akış hızı (ml/s)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)
A1	PCL:Kollajen	5:2,5	GAA	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,15	0,25	11	23
A2	PCL:Kollajen	5:2,5	GAA	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23
A3	PCL:Kollajen	5:2,5	GAA	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,15	11	23
A4	PCL:Kollajen	5:1,5	GAA	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	11	23
A5	PCL:Kollajen	5:1,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23

Çizelge 3.1'de yer alan formülasyonların TEM görüntüleri alındı. TEM görüntülerini almak için nanolifler gridlerin (karbon lacey) üzerine toplandı. Üzerine toplama yapılacak grid, alüminyum folyo üzerine kenarlarından yapıştırılıp sabitlendikten sonra alüminyum folyo döner silindire yerleştirildi (Resim 3.3). Bir dakikalık nanolif üretiminden sonra alüminyum folyo üzerinden grid alındı.¹

¹ Koaksiyal nanoliflerin TEM görüntüleri ODTÜ Merlab'da alınmıştır.



Resim 3.3. TEM görüntüleri alınması amacıyla alüminyum folyoya grid uygulanması

Koaksiyal yapı elde etme ön çalışmalarında kabuk kısmını oluşturan polimer çözeltisinin akış hızının koaksiyal yapı oluşumuna doğrudan etkili olduğu belirlendi. TEM görüntüleri incelendiğinde kabuk ve çekirdek kısımlarını oluşturan polimer çözeltilerinin akış hızlarına göre 3 farklı durum olduğu gözlemlendi:

- Kabuk ve çekirdek fazlarının akış hızı aynı olursa koaksiyal yapı oluşumu nadir gözlenmekte,
- Kabuk fazın akış hızı çekirdek fazından düşük olursa koaksiyal başlıkta damlacık oluşumu bozulmakta nanolif oluşumu gerçekleşmemekte,
- Kabuk fazın akış hızı çekirdek fazından yüksek olursa koaksiyal yapı nanoliflerin çoğunda oluşmaktadır.

Koaksiyal yapıda paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmaları

Koaksiyal yapının olduğu TEM görüntüleri ile kanıtlandıktan sonra nanoliflerin birbirine paralel yerleşmesi için çalışmalar yapıldı. Paralel yapıda yerleşmiş nanoliflerin elde edilmesi döner silindirin dönüş hızına bağlıdır. Nanoliflerin paralel elde edilmesi amacıyla A5 formülasyonu sabit üretim parametreleri kullanılarak sadece farklı dönüş hızlarında alüminyum folyoya toplandı ve SEM görüntüleri alındı.¹ Çalışmalarda denenilen farklı dönüş hızları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

¹ Nanoliflerin SEM görüntüleri ODTÜ Merlab’da alınmıştır.

Çizelge 3.2. Paralel yerleşim çalışmalarında kullanılan hız parametreleri

Formülasyon Kodu	Dönüş Hızı (rpm)
A5-1	500
A5-2	1500
A5-3	2000
A5-4	2500
A5-5	3000

Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi

Koaksiyal nanoliflerin paralel yerleşimli elde edilmesinden sonra çekirdek kısmına yüklenen kollajen miktarını artırmak amacıyla yeni formülasyonlar hazırlandı. Hazırlanan bu formülasyonlarda işlem parametreleri kabuk fazın akış hızı haricinde sabit tutulmuştur (Çizelge 3.3). Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda iki farklı akış hızı denendi. Her formülasyon iki ayrı akış hızında hazırlanarak TEM görüntüleri alındı.

Çizelge 3.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla hazırlanan koaksiyal nanolif formülasyonları

Form. Kodu	Çekirdek kısmı	Çekirdek kısmı kons. (%)	Çekirdek kısmı çözücü	Kabuk kısmı	Kabuk kısmı kons. (%)	Kabuk kısmı çözücü	Çekirdek kısmı akış hızı (ml/s)	Kabuk kısmı akış hızı (ml/s)	Voltaaj (kV)	Mesafe (cm)	Dönüş hızı (rpm)
A6	PCL:Kollajen	5:2	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A7	PCL:Kollajen	5:2	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A8	PCL:Kollajen	5:2,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A9	PCL:Kollajen	5:2,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A10	PCL:Kollajen	5:3	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A11	PCL:Kollajen	5:3	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A12	PCL:Kollajen	5:3,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A13	PCL:Kollajen	5:3,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A14	PCL:Kollajen	5:4	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A15	PCL:Kollajen	5:4	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A16	PCL:Kollajen	5:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A17	PCL:Kollajen	5:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500
A18	PCL:Kollajen	5:5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A19	PCL:Kollajen	5:5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,25	12	23	1500

PCL konsantrasyonunun belirlenmesi

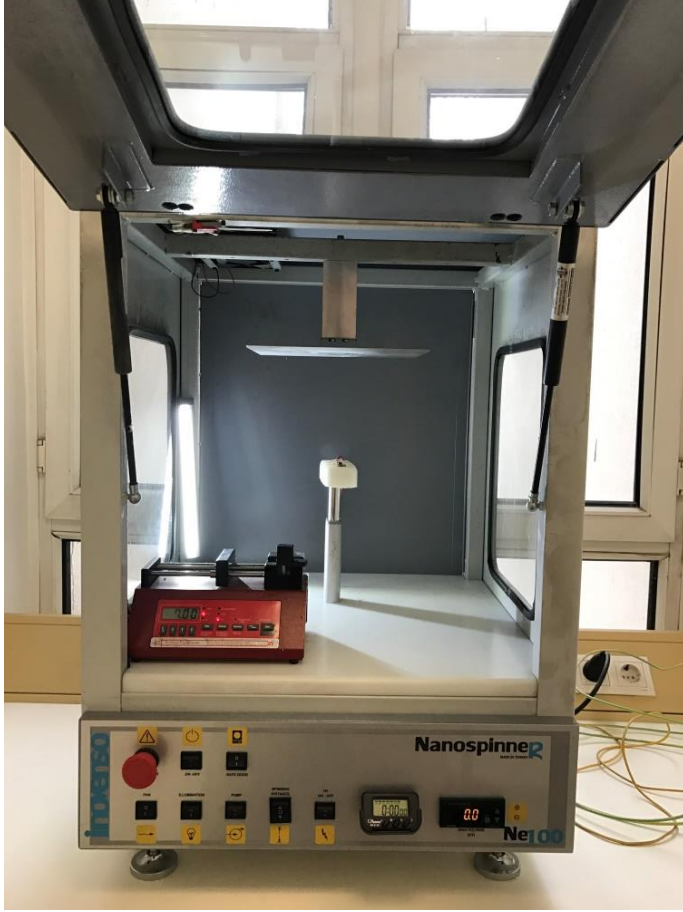
Yara örtüsünde hidrofobik yapıdaki PCL'nin nanolif yapısında en az oranda bulunması ıslanmasını kolaylaştıracaktır. TEM görüntüleri incelendiğinde koaksiyal yapıdaki nanolifler çekirdek kısımda % 4,5 kollajen ve % 5 PCL içeren formülasyonlarda (A15, A16) homojen olarak elde edilmiştir. Bu veriler ışığında PCL konsantrasyonu azaltılarak yeni formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. PCL konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla hazırlanan koaksiyal nanolif formülasyonları

Form. Kodu	Çekirdek kısmı	Çekirdek kısmı kons. (%)	Çekirdek kısmı çözücü	Kabuk kısmı	Kabuk kısmı kons. (%)	Kabuk kısmı çözücü	Çekirdek kısmı akış hızı (ml/s)	Kabuk kısmı akış hızı (ml/s)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Dönüş hızı (rpm)
A20	PCL:Kollajen	4:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A21	PCL:Kollajen	3:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A22	PCL:Kollajen	2:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A23	PCL:Kollajen	1,5:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500
A24	PCL:Kollajen	1:4,5	GAA:HFIP	PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	0,25	0,35	12	23	1500

3.3.2. Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanması

Doğal polimerler olan kitozan ve aljinat, yara örtüsüne yara iyileştirici ve biyoadeziv etkiyi artırması amacıyla eklenmiştir. Yara örtüsünün üst katmanlarını oluşturan kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin önformülasyon çalışmalarında, nanolifler önce rasgele yerleşimli olarak tek iğneden sabit plakaya toplama yapılan elektro-çekim cihazında (NE-100, İnovenso) elde edilmiştir (Resim 3.4). Bu çalışmalarla uygun olan polimer konsantrasyonları ve işlem parametreleri belirlendikten sonra, nanoliflerin döner silindire toplama yapılan elektro-çekim cihazında (NE-300, İnovenso) paralel yerleşimli elde edilmesi gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.4. Toplayıcı kısmı sabit plaka olan elektro-çekim cihazı

Kitozan ve sodyum aljinat polielektrolit yapıda oldukları için polimer çözeltilerinin iletkenlik değerleri çok yüksektir ve bu polimer çözeltileri elektro-çekim işlemi için uygun değildir. Saf polimer çözeltilerinden nanolif üretimi için farklı işlem parametreleri denenmiş fakat nanolif elde edilememiştir. Literatürde de saf polimer çözeltilerinden nanolif elde edilemediği görülmüştür (Safi ve diğerleri, 2007). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde sodyum aljinat ve kitozan nanoliflerinin PEO ya da PVA gibi polimerlerle karışımlarından hareketle hazırlandığı görülmektedir (Hu ve diğerleri, 2015). Dolayısıyla kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin PEO ile hazırlanan polimer karışımlarından elde edilmesine karar verildi. Bu amaçla çalışmalarda kitozan ve sodyum nanoliflerin üretilmesinde kullanılacak PEO konsantrasyonlarına karar vermek için önce sadece PEO içeren nanoliflerin üretilmesi için çalışmalar yapılmıştır.

Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerin üretiminde 10-25 kV aralığındaki voltaj değerleri denenmiş ve jet oluşumunu sağlayabilen değerlerle çalışmalara devam edilmiştir. İğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe için de 10-15 cm aralığında değerler denenmiştir. İşlem

parametrelerinden biri olan polimer çözeltilerinin akış hızını saptamak amacıyla 0,1-0,5 ml/s aralığında farklı değerler denenmiştir. İğne ucundan damlanın akmadığı ve Taylor konisinin düzgün bir şekilde oluştuğu uygun akış hızları seçilmiştir.

PEO nanoliflerinin hazırlanması

Literatürde PEO nanolifleri ile yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurularak üç farklı konsantrasyondaki (% 5-7) PEO çözeltilerinden Çizelge 3.5'teki işlem parametreleri kullanılarak kesintisiz ve tekrarlanabilir şekilde nanolifler elde edildi. PEO çözeltileri hazırlanırken uygun miktarda tartılan polimer, bidistile suya eklendi ve manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı.

Çizelge 3.5. PEO nanoliflerinin işlem parametreleri

Formülasyon Kodu	PEO çözeltisi konsantrasyonu (%)	Akış Hızı (ml/s)	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)
PEO1	5	0,1	10	13
PEO2	6	0,1	10	13
PEO3	7	0,1	15	12

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PEO çözeltilerinden elde edilen nanoliflerin SEM görüntüleri alındı ve morfolojileri incelendi. Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanmasında % 6 ve % 7'lik PEO çözeltilerinin kullanılmasına karar verildi.

Rasgele yerleşimli kitozan nanoliflerinin elde edilmesi

Kitozanın % 2'lik çözeltisinin hazırlanması için önce 50 ml bidistile suya 0,7 ml glasiyel asetik asit ve 2 gram kitozan eklendi. 1 saat mekanik karıştırıcıda düşük devirde karıştırıldı. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra 100 mL'ye bidistile su ile tamamlandı. Bu çözelti üzerine % 6 veya % 7 konsantrasyonda PEO çözeltisi eklendi ve karıştırmaya devam edildi. Karışımın içindeki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için elektro-çekim işleminden önce ultrasonik banyoda 5 dk bekletildi.

PEO ile farklı oranlarda hazırlanan kitozan polimer karışımlarından PEO:kitozan oranı 90:10 ve 80:20 olduğunda nanolif üretimi sağlanırken, 70:30 ve üzerindeki kitozan

oranlarında nanolif üretimi gerçekleştirilememiştir. Farklı konsantrasyonda PEO kullanılarak elde edilen kitozan nanoliflerinin işlem parametreleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Rasgele yerleşimli kitozan içeren nanolif formülasyonları

Formülasyon Kodu	%2'lik Kitozan oranı	%6'lık PEO oranı	%7'lik PEO oranı	Akış hızı (ml/s)	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)
PEO-CH1	20	80	-	0,3	15	16
PEO-CH2	20	-	80	0,4	10	12

Rasgele yerleşimli sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanması

Sodyum aljinat çözeltileri hazırlanması için uygun miktarda tartılan polimer bidistile suya eklendi ve manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı. Bu çözelti üzerine % 6 veya % 7 konsantrasyonda PEO çözeltisi eklendi ve karıştırmaya devam edildi. Karışımın içindeki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için elektro-çekim işleminden önce ultrasonik banyoda 5 dk bekletildi.

PEO ile farklı oranlarda hazırlanan polimer karışımlarından PEO:sodyum aljinat oranı 90:10; 80:20 ve 70:30 olduğunda nanolif üretimi sağlanırken, 60:40 olduğunda nanolif üretimi gerçekleştirilememiştir. Farklı konsantrasyonda PEO kullanılarak elde edilen sodyum aljinat nanoliflerinin işlem parametreleri Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Rasgele yerleşimli sodyum aljinat içeren nanolif formülasyonları

Formülasyon Kodu	%2'lik Aljinat oranı	%6'lık PEO oranı	%7'lik PEO oranı	Akış hızı (ml/s)	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)
PEO-SA1	30	70	-	0,3	15	10
PEO-SA2	30	-	70	0,5	15	11

Paralel yerleşimli kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin elde edilmesi

Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin döner silindir toplayıcısı olan elektro-çekim cihazı ile yapılacak çalışmalarında PEO-CH1 ve PEO-SA1 formülasyonları kullanıldı. Koaksiyal nanoliflerle yapılan çalışma sonuçlarına göre 1500 rpm’de nanolifler paralel yerleşimli olarak elde edilmişti. Bu sonuç göz önünde bulundurularak elde edilen karışımlardan paralel yerleşimli nanolifler elektro-çekim cihazında Çizelge 3.8’de gösterilen parametreler uygulanarak elde edildi ve SEM görüntüleri alındı.

Çizelge 3.8. Paralel yerleşimli sodyum aljinat ve kitozan nanoliflerinin işlem parametreleri

Formülasyon Kodu	Akış hızı (ml/s)	Mesafe (cm)	Voltaaj (kV)	Dönüş hızı (rpm)
PEO-CH1	0,3	17	14	1500
PEO-SA1	0,3	17	13	1500

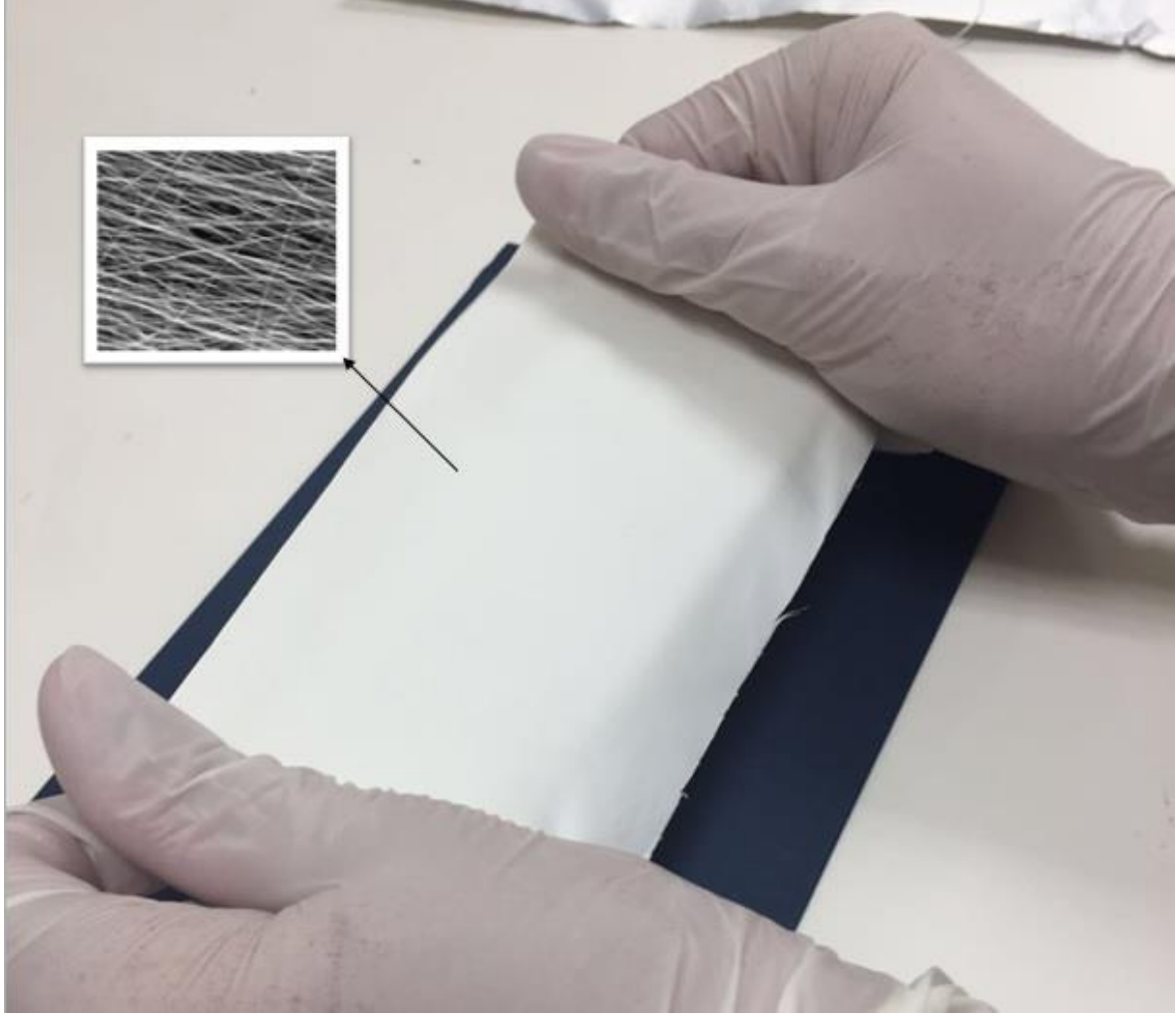
3.3.3. Sonuç formülasyonların üretilmesi

Yapılan nanolif üretim çalışmaları sonucunda;

- Kabuk kısmında doksisiklin/PEO ve çekirdek kısmında kollajen/PCL olan koaksiyal nanolifler elde edildi.
- Hazırlanan koaksiyal nanolifler döner silindire 1500 rpm’de paralel yerleşimli olarak toplandı.
- A22, A23 ve A24 formülasyonları üzerine önce kitozan sonra aljinat nanolifleri paralel yerleşimli olarak toplandı (Resim 3.5). Bu formülasyonların bileşimi Çizelge 3.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. Sonuç formülasyonların bileşimi

Sonuç Formülasyon Kodu	Koaksiyal nanolilerin çekirdek kısmı		Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmı		Koaksiyal nanolif formülasyonu	Kitozan nanolifleri	Aljinat nanolifleri
	PCL kons. (%)	Kollajen kons. (%)	Doksisiklin kons. (%)	PEO kons. (%)			
B1	1	4,5	2,5	2,5	A24	PEO-CH1	PEO-SA1
B2	1,5	4,5	2,5	2,5	A23	PEO-CH1	PEO-SA1
B3	2	4,5	2,5	2,5	A22	PEO-CH1	PEO-SA1



Resim 3.5. Elde edilen nanolif yara örtüleri

3.4. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları

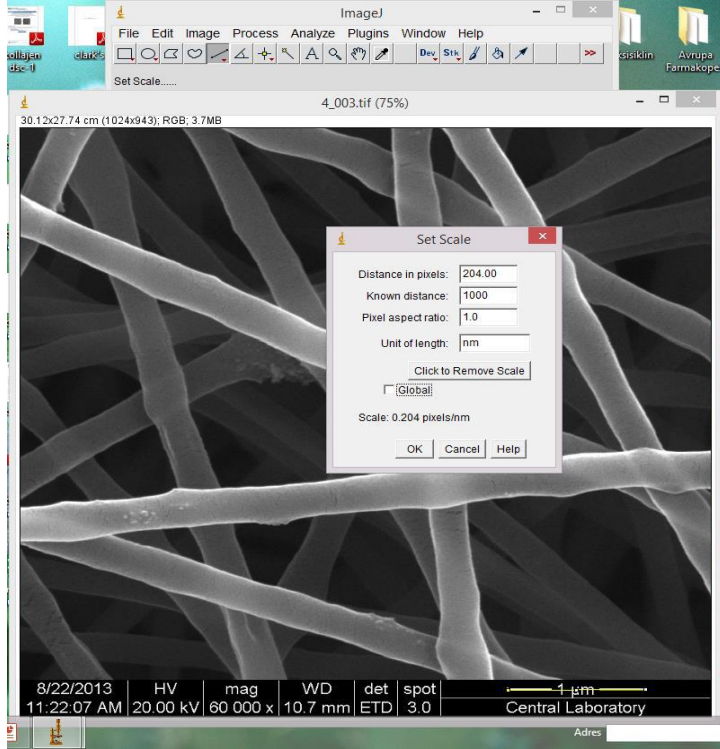
3.4.1. FT-IR çalışması

Ön çalışmalarda hazırlanan koaksiyal nanoliflerin, etkin maddenin ve koaksiyal nanolif yapısına giren diğer polimerlerin (kollajen, PCL, PEO) FT-IR spektrumları alınarak maddelerin karakteristik pikleri incelenmiştir.

3.4.2. Ortalama lif çapının hesaplanması

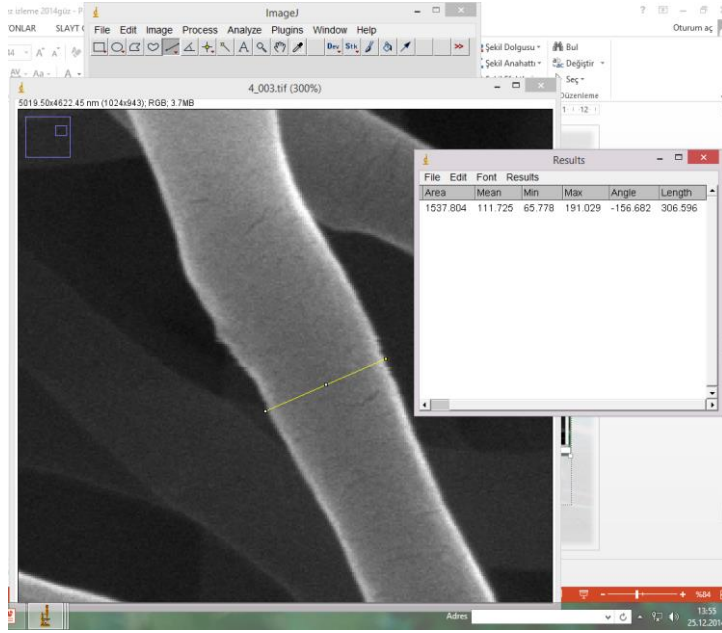
Hazırlanan nanolif yara örtülerinin alınan SEM görüntüleri yardımıyla ortalama lif çapı ve dağılımı ImageJ programı kullanılarak hesaplandı. ImageJ bir görüntü analiz programıdır

ve nanoliflerin karakterizasyonunda da kullanılmaktadır. Programı kullanırken öncelikle SEM görüntüsünün skalası programa tanıtılmıştır (Resim 3.6).



Resim 3.6. ImageJ programı ile skala ayarlanması

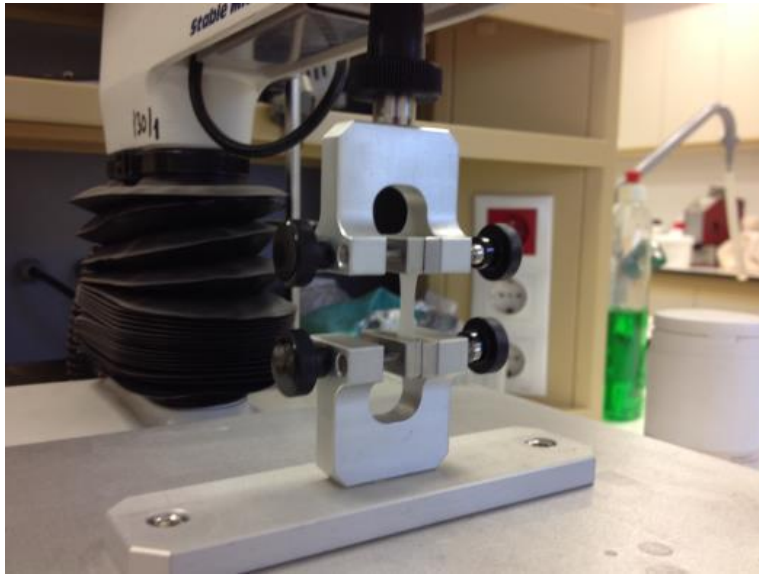
Daha sonra liflere yakın çekim yapılarak lif çapları işaretlenmiştir. Program, skalaya göre lif çapının değerini vermiştir (Resim 3.7). Elde edilen lif çaplarının ortalaması ve dağılımı da program tarafından belirlenmiştir.



Resim 3.7. ImageJ programı ile nanolif çap ölçümü

3.4.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi

Hazırladığımız yara örtülerinin hem yara bölgesinin şeklini alabilecek seviyede esnek hem de yeterli dirence sahip olması gereklidir. Alüminyum levhaya toplanan nanolifler 3 cm x 1 cm boyutunda kesildi ve alt ve üst tutacak kısımlarına sıkıştırıldı (Resim 3.8). Alt tutacak kısmı sabit olan aparatın, üst tutacak kısmı 5 mm/dk hızında yukarı doğru hareket ederken kopma uzaması ve gerilme direnci hesaplandı.



Resim 3.8. Hazırlanan formülasyonların mekanik özelliklerinin Texture Analyzer cihazı ile incelenmesi

3.4.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi

Yara örtülerinin yapışma özelliklerinin incelenmesi amacıyla Texture Analyzer cihazı ile yapılan çalışmalarda;

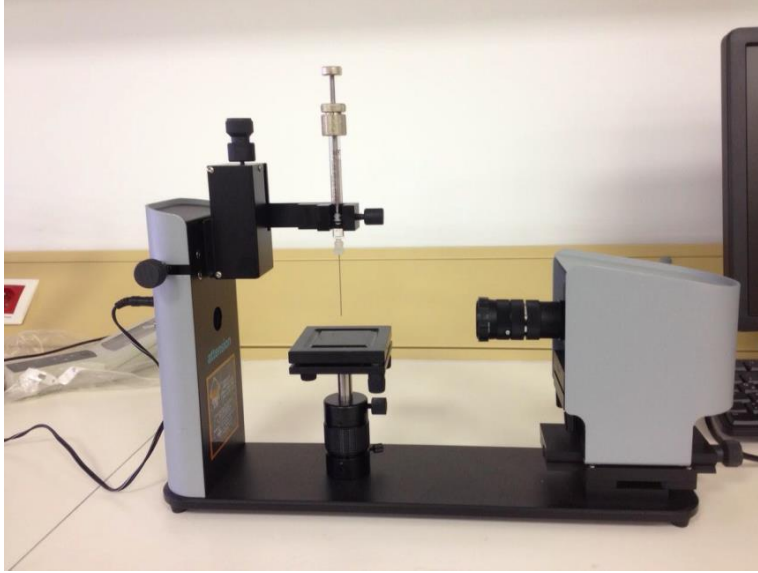
- 1 cm çapında yuvarlak nanolif kesitleri alındı,
- Alınan kesitler cihazın üst probuna yapıştırıldı,
- Alt kısımda tavşan derisi hareket etmeyecek şekilde sabitleştirildi,
- İşlem parametreleri: Prob hızı 1,0 mm/sn; probun uyguladığı kuvvet 0,2 N; örnek ile temas süresi 150 sn.
- Temas süresi sonunda üst probun dokudan ayrılırken oluşturduğu grafik yardımıyla biyoadezyon işi değeri yazılım tarafından hesaplandı.

Çalışmalarda tam kalınlıkta eksizyonel tavşan derisi, yüzey alanının geniş olması nedeniyle model doku olarak kullanıldı (Renuka ve diğerleri, 2012). Tavşan derisinin traşlanmış üst kısmı kullanılarak yara örtülerinin sağlam derideki biyoadezyonu da incelendi. Ayrıca sonuç formülasyonun tam kalınlıkta eksizyonel sıçan derisi kullanılarak tavşan derisi ile karşılaştırılması da yapılmıştır.

3.4.5. Temas açılarının ölçülmesi

Temas açısı ölçümleri bir materyalin üzerine bir damla sıvı konularak çeşitli optik sistemlerin yardımıyla belli bir süre sonra damlanın boyutlarına göre değerlendirilmesidir. Temas açısının küçük olması (0-90°) ıslanabilirliğin iyi, büyük olması (90-180°) ise yetersiz olduğunun göstergesidir.

Ölçümlerde nanolif yüzeyine 5 µl distile su damlatıldı ve 30 saniye boyunca temas açısındaki değişim gözlemlendi (Resim 3.9). Nanoliflerin kamerada düzgün şekil alabilmesi için “convex sample holder” kullanıldı. Bu aparat sayesinde nanolif yüzeyi gerdirilerek pürüzsüz ve düzgün bir şekil alması sağlanmaktadır. Nanolif yüzeyinde 6 farklı noktada ölçümler yapılarak ortalama değerler hesaplandı.



Resim 3.9. Temas açısı ölçüm cihazı

3.5. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

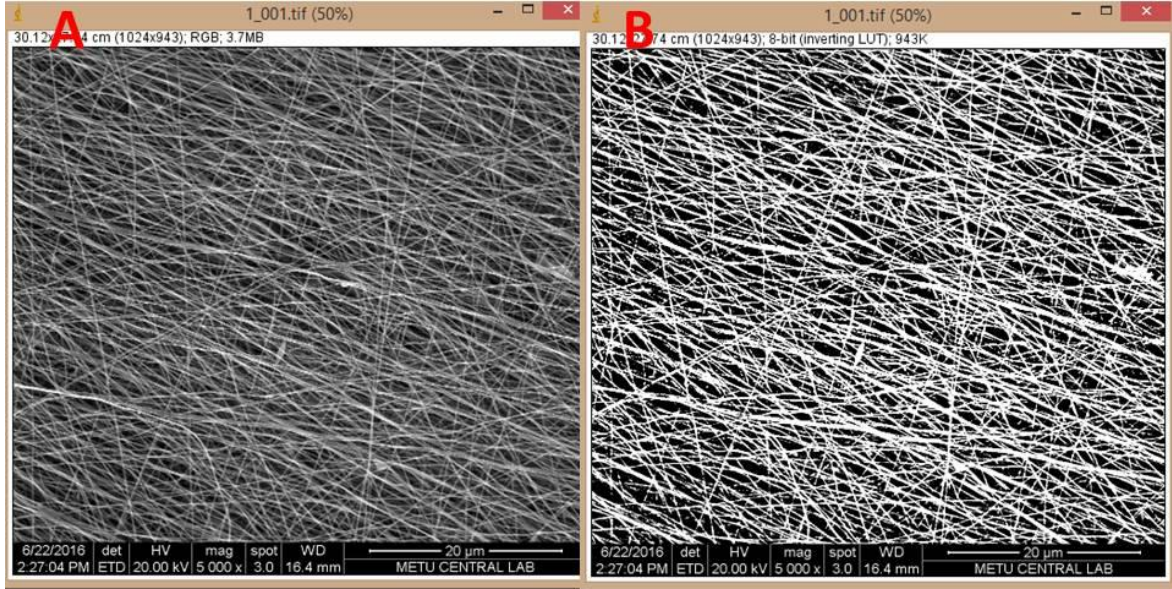
B1, B2 ve B3 formülasyonlarında mekanik, yapışma ve temas açısı özelliklerinin incelenmesi için yapılan çalışmalar Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi koaksiyal nanoliflerle aynı koşullarda yapılmıştır.

3.6. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda PCL konsantrasyonunun %2'den daha düşük olduğu B1 ve B2 formülasyonları ile çalışmalara devam edilmesine karar verildi ve daha ileri karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.6.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri

Nanoliflerin porozite ölçümleri ImageJ kullanılarak yapılmıştır. Literatürde de ImageJ programı kullanılarak porozite ölçümleri yapılan çalışmalar mevcuttur. (Venkataraman ve diğerleri, 2007; Rnjak-Kovacina ve diğerleri, 2011; Marklein ve diğerleri, 2012). Bu yöntemde önce program nanoliflerin orijinal görüntüsünü (Resim 3.10A) siyah/beyaz olarak tekrar renklendirir (Resim 3.10B).



Resim 3.10. ImageJ programı ile porozite ölçümü

Nanolifler siyah, boşluk kısmı ise beyaz olarak renklendirildikten sonra iki farklı rengin kendi alanları hesaplanır. Nanoliflerin alanı, toplam alana oranlanır ve bu oran % porozite olarak kabul edilir. Ayrıca ODTÜ Merlab’da gerçekleştirilen deneylerde civa porozimetrisi kullanılarak düşük basınç altında nanoliflerin por çapı dağılımı verileri de elde edilmiştir.

3.6.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri

Nanoliflerin spesifik yüzey alanının geniş olması sayesinde yara iyileşmesinde hemostazı desteklemekte ve sıvı emiliminde de rol oynamaktadırlar. Yara örtüsü olarak kullanılacak nanoliflerin yüzey alanlarının $5 \text{ m}^2/\text{g}$ ’dan yüksek olması istenmektedir. Bu nedenle hazırlanan nanoliflerin spesifik yüzey alanı ölçümleri çok noktalı BET analizi kullanılarak yapılmıştır.¹ Deney öncesinde nanolifler saflaştırma ve sudan arıtma işlemi için vakumlu ısıtma yapan (350°C ’ye kadar) degaze ünitesine yerleştirilir. Bu işlemin ardından, örnekler sıvı azot sıcaklığında adsorbat olarak kullanılan azot gazıyla analize tabi tutulur. Bu deneyler sonucunda maddenin hangi basınçta ne kadar azot tuttuğunu gösteren adsorpsiyon izotermi elde edilir.

¹ Spesifik yüzey alanı ölçümleri ODTÜ Merlab’da yapılmıştır.

3.6.3. Doksisiklinin miktar tayini yöntemi ve analitik yöntem validasyonu

Literatürde doksisiklinin miktar tayini için UV spektrofotometre ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılmaktadır (Kogawa ve Salgado, 2012). Doksisiklinin miktar tayini ve salım hızı çalışmalarında UV spektrofotometre yöntemi tercih edilmiştir. Doksisiklinin sudaki çözeltisinin iki farklı dalga boyunda (274, 346 nm) maksimum absorbans verdiği görülmüştür. 346 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiğinin r^2 değerinin daha yüksek olması ve USP36’da da 346 nm’de çalışılmasının önerilmesi nedeniyle deneylerde bu dalga boyu kullanılmıştır. Doksisiklinin miktar tayini yöntem validasyonu çalışmalarında seçicilik, doğrusalılık, geri elde, deney içi ve deneyler arası kesinlik ve algılama sınırı (limit of detection) ile kantitatif ölçme sınırı (limit of quantification) hesaplamaları yapıldı.

Seçicilik çalışmaları

Yöntemin sadece etkin maddeye özgü olduğunu göstermek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmaktadır. Doksisiklin miktar tayini yönteminin seçiciliğinin araştırılması amacıyla PEO, aljinat, kitozan, kollajen ve bu dört maddenin karışımının sudaki çözeltileri hazırlandı ve 400-200 nm arasında UV dalga boyu taraması yapıldı. Bu dalga boylarında absorbanslarının olup olmadığı incelendi.

Doğrusallık çalışması

Örnek içindeki etkin madde derişimi ile ölçülen absorbans değeri arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunun gösterilmesidir. Doksisiklinin kalibrasyon denklemini hesaplamak amacıyla 9 farklı konsantrasyonda (5-30 µg/ml) hazırlanmış çözeltilerin UV absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.

Geri elde çalışmaları

Analiz yönteminin doğruluğu geri kazanım ile hesaplanır ve % bağıl standart sapma ile ifade edilir. Doksisiklinin geri elde çalışmalarında bilinen üç farklı derişimindeki stok çözeltisinin absorbansı 346 nm’de 3 kez ölçüldü. Bu absorbanslar, hesaplanan kalibrasyon denkleminde yerine konularak derişimler, yüzde geri kazanımlar ve % bağıl hata hesaplandı.

Tekrarlanabilirlik çalışmaları

Yöntemin farklı zamanlarda farklı kişiler tarafından yapıldığında aynı sonucu verdiğinin gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Deney içi tekrarlanabilirlik çalışmalarında doksisisiklinin 100 mg/l derişimindeki stok çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 20 µg/ml derişimde hazırlanan çözeltinin absorbansı 346 nm’de 10 kez ölçüldü ve ortalama doksisisiklin miktarı hesaplandı. Deneyler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise stok çözeltiden 10 farklı 20 µg/ml derişimde hazırlanan çözeltiyle 3 farklı günde ölçüm yapıldı ve ortalama doksisisiklin miktarları ölçüldü. Elde edilen absorbansların ortalamaları, ortalamaların standart sapması ve % bağıl standart sapmaları hesaplandı. Tekrarlanabilirliğin göstergesi olarak % bağıl standart sapma % 2’den küçük olmalıdır.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Doksisisiklin miktar tayini yönteminin güvenilir şekilde analiz edebildiği en küçük derişimi saptamak için duyarlılık sınırı ve saptama sınırı belirlendi. Bu amaçla kullanılan denklemler aşağıdaki şekildedir:

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ : Kalibrasyon aralığındaki en küçük derişimin standart sapması

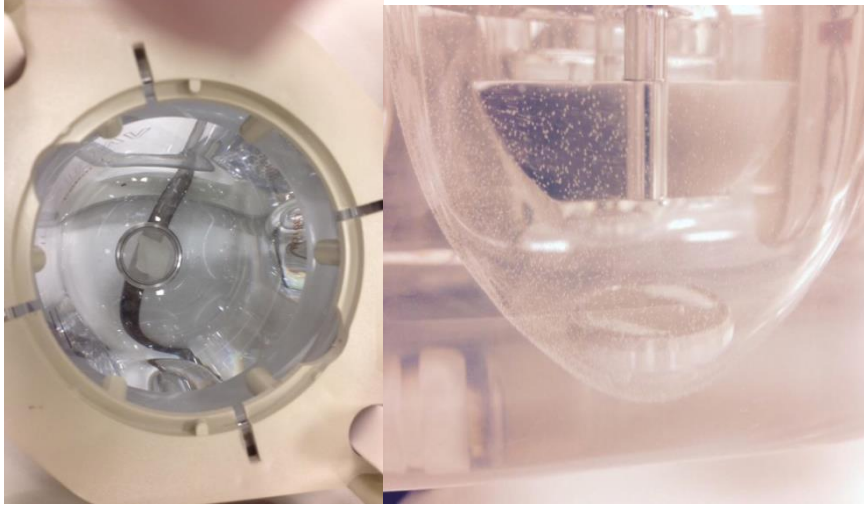
S : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.6.4. Doksisisiklin salım hızı çalışmaları

Yapılan literatür araştırmalarında yara örtüsü olarak üretilen formülasyonlarda salım hızı çalışmalarında distile suyun kullanıldığı görüldü ve salım hızı çalışmalarımızda distile su kullanılmasına karar verildi (Mehta ve diğerleri, 2013; Maver ve diğerleri, 2015; Singh ve diğerleri, 2016).

Doksisisiklinin in vitro ortamda salım hızı çalışmaları 32°C’de distile suda yapıldı. Bu çalışmalarda disk üzerinde palet (USP Apparatus-5) yöntemi kullanıldı. Diskler çözünme kaplarının dip kısmına yerleştirildikten sonra disklerin altına nanolifler yerleştirildi ve paletler disk üzerinden 2,5 cm yukarıda olacak şekilde ayarlandı (Resim 3.11). Daha sonra 32 °C’deki

distile su eklendi ve paletlerin dönü hızı 50 rpm'e ayarlandı. 5., 10., 15., 30., 45., 60., 90., 120. ve 180. dakikalarda örnekler alınarak UV spektrofotometre cihazında numunelerin 346 nm'deki absorbanları ölçüldü. Elde edilen veriler zamana karşı grafiğe geçirildi.



Resim 3.11. Salım hızı çalışmalarında kullanılan disk üzerinde palet yöntemi

3.7. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

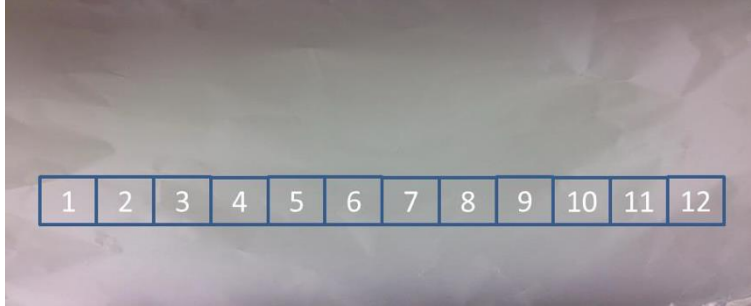
Bölüm 3.6'da yapılan deneyler sonucunda in vivo deneylerde kullanılacak sonuç formülasyonun B1 olmasına karar verilmiştir. B1 formülasyonu seçilirken PCL konsantrasyonunun en az, mekanik ve yapışma özelliklerinin yüksek, temas açısının düşük, porozitenin ve spesifik yüzey alanının yeterli, doksisisiklin salım hızının yüksek olması göz önünde bulundurulmuştur. B1 formülasyonunda miktar tayini çalışmaları, UV sterilizasyonun etkinliği, stabilite ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

3.7.1. Nanoliflerde doksisisiklin miktar tayini çalışmaları

Elektro-çekim işleminde nanolifler toplayıcı levhaya doğru giderken lif yoğunluğu orta kısımlarda kenar bölgelere göre daha yoğundur. Bu nedenle üretim sonunda kenar bölgelerin kalınlığı ince orta kısımlar ise daha kalın olmaktadır (Akduman ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla nanoliflere ilaç yüklendiğinde etkin madde miktarı nanolif tabakasının orta kısmında daha fazla olmaktadır.

Nanoliflerin bir bölgede yoğun olarak toplanmasını en aza indirmek için toplayıcı levha üretim esnasında devamlı olarak sağa-sola yatay hareket etmektedir. İn vivo deneylerde

kullanılacak nanoliflerde etkin maddenin homojen olarak hangi bölgede olduğunu tespit edebilmek amacıyla nanolifler yatay bir hat üzerinde eşit ölçülerde (1x1 cm) kesildi (Resim 3.12).



Resim 3.12. Miktar tayini çalışmalarında alınan kesitler

Alınan kesitler 24 saat 5 ml distile suda karıştırıldı ve 24 saat sonunda membran filtreden süzülerek UV spektrofotometrede doksisisiklin miktar tayini yapıldı.

3.7.2. UV sterilizasyon çalışmaları

Çalışmalarımızda yara örtülerinin laminar akışlı kabinde UV sterilizasyonu yapılmış ve etkinliği kanıtlanmıştır. Sterilizasyon işlemi laminar akışlı kabinde, UV lambanın (253 nm) 5 cm altında bekletilerek yapıldı. Sterilizasyonun etkinliğini denetlemek amacıyla alt ve üst yüzeylerine ayrı ayrı 1, 2 ve 3 saatlik UV sterilizasyon uygulanmış formülasyonlar, uygun sıvı besiyerinde (tiyoglikolatlı besi yeri ve soya-kazein ekstresi besi yeri) 14 gün bekletilerek üreme olup olmadığı incelendi.¹ Sterilizasyon süresinin nanoliflerin morfolojisine etkisi SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Ayrıca sterilizasyon süresinin yara örtüsünün mekanik, yapışma ve temas açısı özellikleri ve doksisisiklin miktarı üzerine etkisi de araştırılmıştır.

3.7.3. Stabilité çalışmaları

B1 formülasyonunun ICH Q1A(R2) stabilite kılavuzu doğrultusunda 3 farklı ortamda stabilitesinin incelenmesi planlandı.

¹ Sterilizasyon etkinliğini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Prof. Dr. Sulhiye Yıldız ile yapılmıştır, kendisine teşekkür ederiz.

- 4°C/ortam nemi
- 25°C/%60 bağıl nem
- 40°C/%75 bağıl nem

Hazırlanan B1 formülasyonları otoklav poşeti (polyester/polipropilen) ile poşetlenerek sıcaklığı ve bağıl nemi ayarlı stabilite kabinlerine yerleştirildi.

Stabilite çalışmaları kapsamında 3., 6., 9. ve 12. aylarda otoklav poşetlerine konulan B1 formülasyonunun SEM görüntüleri incelendi, doksisiklin miktar tayini, mekanik testler, yapışma testleri ve temas açısı ölçümleri yapıldı (Resim 3.13).



Resim 3.13. Stabilite testleri için tek kat ambalajlanmış B1 formülasyonu

Ancak 25°C/%60 bağıl nemde ve 40°C/%75 bağıl nemde karşılaşılan stabilite sorunu nedeniyle:

- İki kat poşetlenen yeni serilerin 2 farklı koşulda stabilite çalışmaları tekrar yapıldı (Resim 3.14).



Resim 3.14. Stabilité testleri için iki kat ambalajlanmış B1 formülasyonu

3.7.4. Hücre kültürü çalışmaları

MTT testi, in vitro koşullarda hücrelerin canlılığına dayanan ve sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif, kolorimetrik bir testtir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller (formazan kristalleri) oluşmaktadır. Kristaller, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Çözünmüş olan bu kristal, konsantrasyona bağlı olarak görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbanı vermektir.

Epidermiste en fazla bulunan hücre tipi olan keratinosit hücreleri ile yapılan çalışmalarda, kültür ortamı olarak 2 mM L-glutamin, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin karışımı (10.000 U/ml penisilin - 10.000 µg/ml streptomisin) içeren (4,5 mM) DMEM kullanıldı.¹

¹ Hücre kültürü çalışmaları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Prof. Dr. Arzu Beşikci ile yapılmıştır, kendisine teşekkür ederiz.

Sitotoksisite çalışmaları

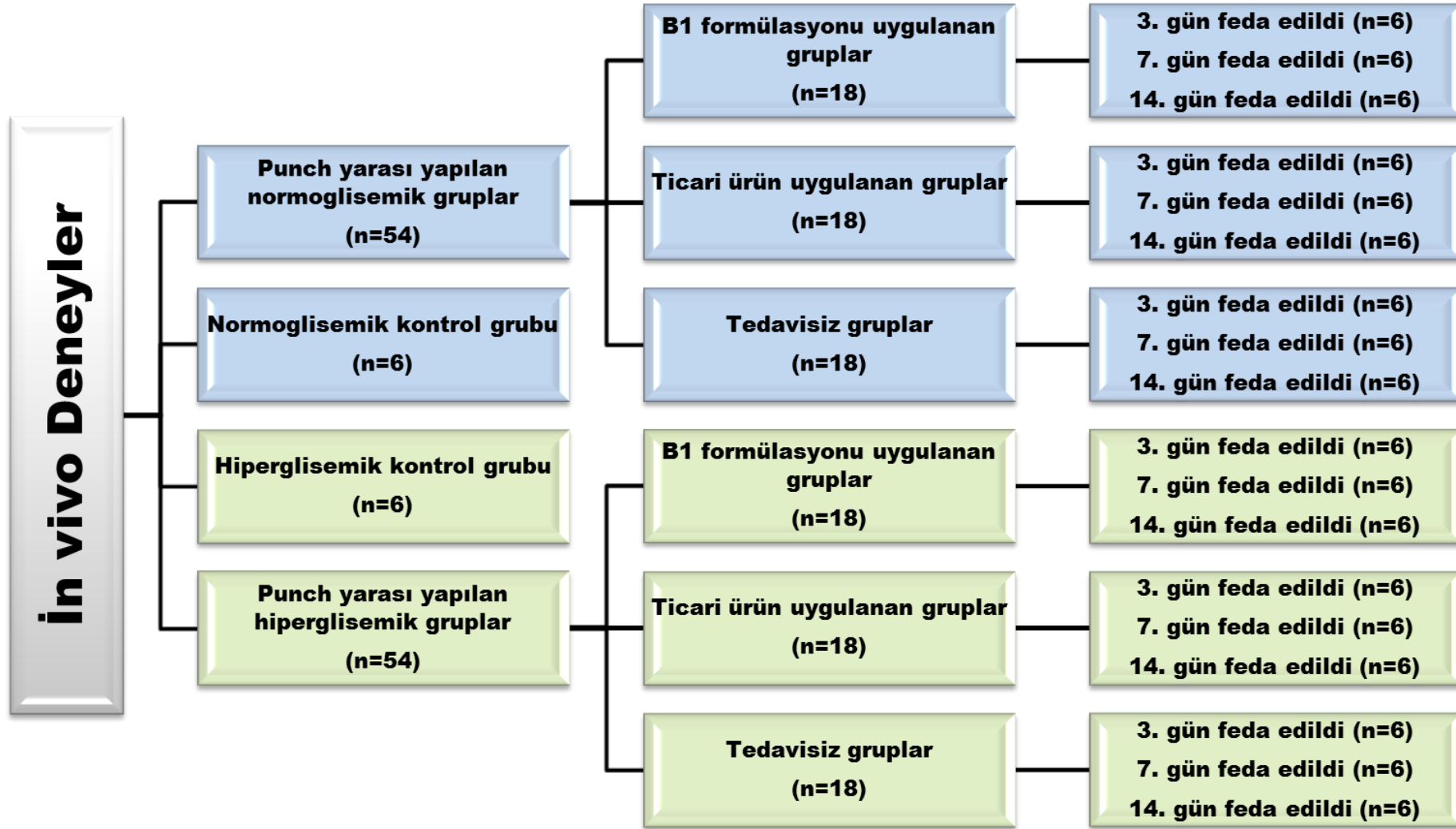
Keratinosit hücrelerinin sitotoksisite çalışmaları için hazırlanması amacıyla, -80 °C'de muhafaza edilen hücreler, laminar hava akımlı kültür kabininde, içinde kültür ortamı bulunan 2,5 cm²'lik kaplara alınarak çoğaltıldı, mikroskop altında incelenen hücre serilerinden kabin dibinin %80'ini kaplamış seriler daha sonra %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre yerleştirildi. Sterilize edilmiş B1 formülasyonu laminar hava akımlı kabin içerisinde hücrelere ilave edildi. Kültür plakları 37°C'de inkübatörde yara iyileşme evrelerinin göstergesi olan 3 ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin 3 ve 7 gün olarak belirlenmesinin amacı, in vivo deneylerdeki sürelerle uyumlu olması açısından dır. İnkübasyondan sonra fosfat tamponunda 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT çözeltisinden 400 µl kuyulara eklenerek 2 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonra oluşan kristaller DMSO ilavesi ile çözüldü ve oluşan çözeltilerin absorbansı ELISA okuyucuda 550 nm dalga boyunda belirlendi. Aynı şartlarda yara örtüsü ilave edilmeden inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. Kontrol grubu ve yara örtüleri eklenmiş hücrelerden elde edilen optik dansite değerleri belirlendi.

3.8. İn Vivo Deneyler

İn vivo deneyler Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylanan 28/11/2013 tarihli 206-26505 sayılı kararı doğrultusunda, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde yapıldı (EK 1).

İn vivo deneylerde Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney öncesi ve deney sırasında ad libitum olarak beslenen hayvanlar, deney süresince tek tek kafeslerde olmak üzere gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakıldı. Deneylerde B1 formülasyonunun normoglisemik (diyabet olmayan) sıçanlarda akut yarada ve hiperglisemik (diyabet oluşturulmuş) sıçanlarda kronik yarada etkinliği araştırıldı. Deney grupları Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. İn vivo deney grupları



3.8.1. Normoglisemik gruplar

Normoglisemik gruplar, diyabet oluşturulmamış sıçanlarla yapılan deney gruplarıdır. Bu hayvanlara deney öncesi herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Bu gruptaki hayvanlar 200-250 g arasındaki sıçanlardan seçilmiş ve yara modeli (akut yara) oluşturulmuştur.

3.8.2. Hiperglisemik gruplar

Hiperglisemik gruplarda diyabet oluşturulmuş sıçanlar kullanılmıştır. Diyabet oluşturmak için ağırlığı 200 gramın altında olan sıçanlara pH 4.5 sitrat tamponu içinde tek doz 65 mg/kg streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p.) yolla enjekte edildi. 7 gün sonra kan glukoz seviyeleri şeker ölçüm cihazı ile ölçüldü ve 300 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olmuş olarak kabul edildi. Diyabet oluşan hiperglisemik sıçanlarda, yara modeli (kronik yara) oluşturuldu.

Diyabet oluşmayan sıçanlarda 3 gün sonra tekrar kan glukoz ölçümü yapıldı. Eğer kan glukoz seviyesi yine 300 mg/dl'nin altındaysa aynı dozda ikinci STZ uygulaması yapıldı. 7 gün sonra yapılan kan glukoz seviyesi ölçümlerinde kan glukoz seviyesi yine 300 mg/dl'nin altındaysa çalışmadan çıkartıldı.

3.8.3. Yara modelinin oluşturulması

Deney hayvanları sabah saat 10:00'da standart terazide tartıldı. İntramusküler olarak ketamin (Alfamine 50 mg/kg) ve ksilazin (Alfazyne 5 mg/kg) enjekte edilerek genel anestezi sağlandı.

Hayvanların sırtları traş edildi ve PVP-iyot kompleksi içeren antiseptik çözelti sürüldü. Hayvanların dorsalinde, omurganın her iki yanında 1 cm çapında olacak şekilde 6 adet tam kalınlıkta punch yarası yapıldı (Resim 3.15-3.17). Yara büyüklüklerinin her hayvanda standart olması için tek kullanımlık ve steril olan Acuderm biopsi punchları kullanıldı.



Resim 3.15. Anestezi sağlanan hayvanlarda tam kalınlıkta eksizyonel yara oluşturulması



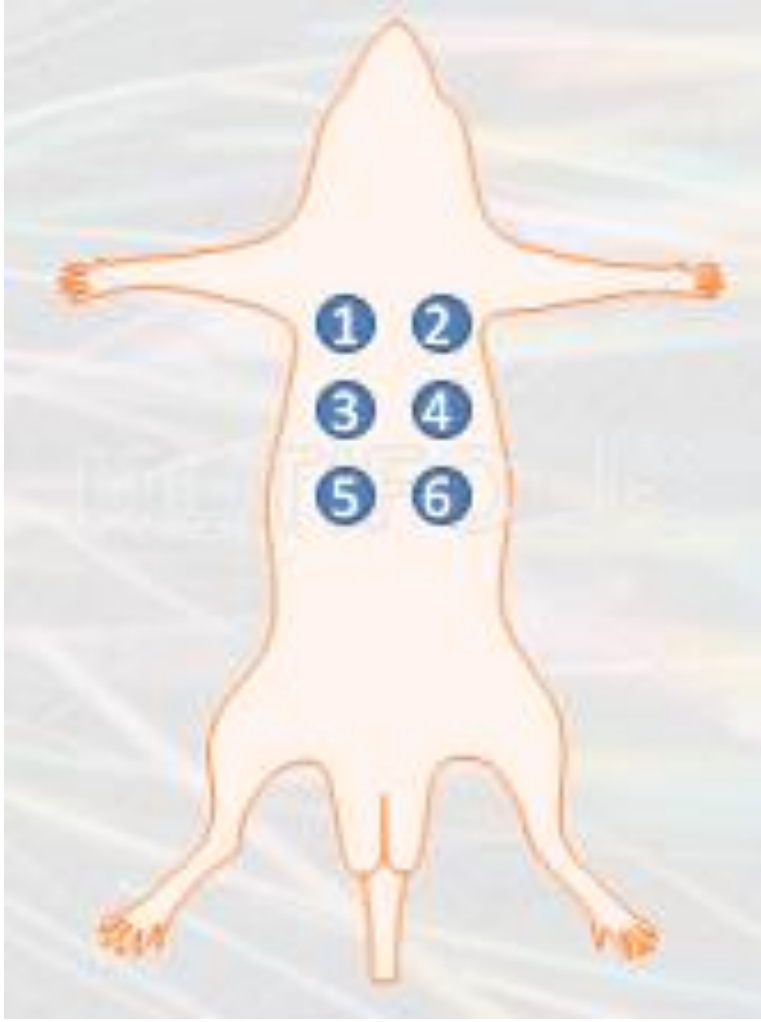
Resim 3.16. Punch yardımıyla kesilen derinin ıkartılması



Resim 3.17. Tam kalınlıkta eksizyonel yaraların yakından görünümü

Yara modelinde bölgeler arası farklılığı en aza indirmek amacıyla Şekil 3.3'deki numaralandırmaya göre her hayvandan doku örneği alındı. Alınan doku örnekleri her seferinde aynı sıralama gözetilerek aşağıdaki deneylerde kullanıldı:

- 1 nolu doku örneği: Histolojik çalışmalar
- 2 nolu doku örneği: MDA ve glutatyon tayini
- 3 nolu doku örneği: Askorbik asit tayini
- 4 nolu doku örneği: Nitrik oksit tayini
- 5 nolu doku örneği: Süperoksit dismutaz tayini
- 6 nolu doku örneği: İmmunohistokimyasal çalışmalar



Şekil 3.3. Doku örneklerinin numaralandırılması

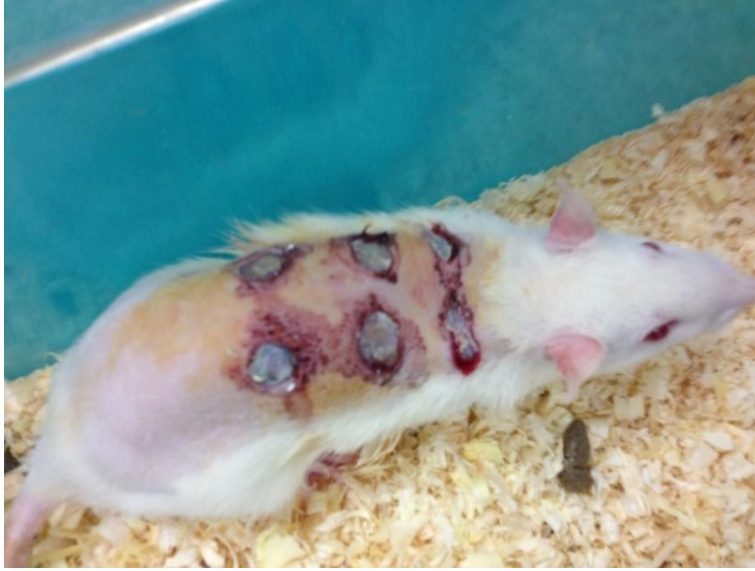
Sıçanlara yara örtüleri uygulandıktan sonra iyileşme evreleri gözönüne alınarak inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarını temsilen sırasıyla 3., 7. ve 14. günlerde yara dokuları alındı. Bu amaçla deney gruplarındaki sıçanlar, kronobiyolojik sıraya uygun olacak şekilde anestezi altındayken kalplerinden kan çekilmek suretiyle feda edildi ve yara dokusu hemen çıkarılıp alüminyum folyoya sarıldıktan sonra sıvı azot içerisinde konularak donduruldu. Yara dokuları -80°C 'de muhafaza edildi.

3.8.4. Yara örtülerinin uygulanması

Sterilize edilmiş yara örtülerinin tedavi sürecinde hergün aynı saatte uygulanması planlanmıştı. Ancak 3 günlük gruplarda yapılan ön çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde hergün yara örtüsü uygulanmasında kafese müdahale nedeniyle hayvanın strese girdiği, yara örtüsü uygulaması sırasında hayvanın kasılması nedeniyle

kapanmaya başlayan yaranın kanayarak tekrar açıldığı gözlemlendi. Bu nedenle steril yara örtülerinin sonraki deneylerde sadece yara oluşturulduktan sonra hemen ve tek sefer uygulanmasına karar verildi.

Tam kalınlıkta punch yarası yapılan hayvanlara 1 cm çapında kesilen ve $260\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doksisisiklin içeren B1 formülasyonu uygulanmıştır (Resim 3.18 ve 3.19).



Resim 3.18. Nanolif yara örtüsü uygulanmış sıçan görüntüsü - 1



Resim 3.19. Nanolif yara örtüsü uygulanmış sıçan görüntüsü - 2

B1 formülasyonunu, piyasa preparatı ile karşılaştırmak amacıyla ABD’de üretilen ve doksisisiklin içermeyen ancak kollajen içeren bir yara örtüsü olan Promogran ile çalışıldı.

Promogran yara ile temas ettiğinde yumuşak jel kıvamına gelen bir yara örtüsüdür. Sıçanlara uygulanmadan önce Promogran, biopsi punchla 1 cm çapında kesildi ve tam yarayı kaplayacak şekilde uygulandı (Resim 3.20).



Resim 3.20. Ticari ürün uygulanmış sıçan

3.8.5. Yara kapanması denetimi

Normoglisemik ve hiperglisemik gruplarda 3., 7. ve 14. günlerde yara dokuları alınmadan önce sıçanlar anestezi altındayken bütün yaraların boyutları ölçülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir. Son yara alanlarının ortalaması hesaplanarak ve başlangıç yarasına göre % kapanması Eş. 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$Yara\ kapanma\ yüzdesi = \frac{Başlangıç\ yara\ alanı - Son\ yara\ alanı}{Başlangıç\ yara\ alanı} \times 100 \quad (3.2)$$

3.8.6. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar¹

Dokuda MDA tayini

Doku örnekleri tartıldıktan sonra ağırlığının 9 katı kadar KCl ile homojenize edildi. 1 ml homojenata 0,5 ml trikloroasetik asit eklendi. Bu karışım 3000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 1 ml süpernatana 0,5 ml tiyobarbitürik asit ve 10 µl bütildihidroksi toluen eklendi.

¹ Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nde Prof. Dr. Şule Cevher ile yapılmıştır, kendisine teşekkür ederiz.

Benmaride 10 dk kaynatıldı. Numuneler soğutulup köre karşı optik dansitesi 535 nm’de okundu.

Dokuda NO tayini

Dokulardaki nitrik oksit konsantrasyonu Griess yöntemi ile tayin edildi (Miranda ve diğerleri, 2001). Dokular sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile homojenize edildikten sonra, 3500 rpm’ de 15 dk santrifüj edildi ve NaOH eklenerek inkübe edildi. 200 µl süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda vanadyum(III) klorür (VCl_3) eklendi ve 37°C’ de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37°C’de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm’de okundu. 6,4 mM’lık stok sodyum nitrit ($NaNO_2$) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Hazırlanan standart eğriden dokulardaki NO konsantrasyonu µmol/g doku olarak hesaplandı.

Dokuda GSH tayini

Dokuda GSH tayini için modifiye Elman yöntemi kullanıldı (Aykaç ve diğerleri, 1985). Doku örnekleri tartıldıktan sonra ağırlığının 9 katı KCl içinde 4°C’de 5 dk homojenize edildi. 0,5 ml homojenata 0,75 ml reaktif karışımı ilave edildi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dk süre ile 4000 rpm’de, 4°C’de santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatana alınarak üstüne 2 ml 0,3 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ve 0,2 ml ditiyoobisnitrobenzoik asit (DTNB, 0,4 mg/ml %1 sodyum sitrat) ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 412 nm’de köre karşı okundu. Doku GSH düzeyleri µmol/g doku olarak hesaplandı.

Dokuda AA tayini

Roe ve Kuether’in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı (Berger ve diğerleri, 1989). Dokular perklorik asit içinde 5 dk. homojenize edildi. Homojenat 15000g devirde 3 dk 4°C’de santrifüj edildi. Bir tüpe standart askorbik asit (AA) çözeltisi, başka bir tüpe kör için perklorik asit çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere süpernatana

konuldu. Her bir tüpe renk reaktifi eklenip vorteksle karıştırılıp 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Numuneler soğutulup her bir tüpe H₂SO₄ eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 45 dk bekletildikten sonra numuneler 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Dokulardaki AA konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplandı.

Dokuda SOD tayini

Dokulardaki SOD tayini için Sigma SOD kiti ve *E.Coli*'den elde edilmiş SOD standartı kullanıldı. SOD süperoksit anyonunun hidrojen peroksit dönüşmesinde rol oynayan bir enzimdir. Süperoksit anyonunun formazan boyası ile etkileşimi kolorimetrik olarak tayin edilerek SOD aktivitesi hesaplanmaktadır. Dokular önce izotonik sodyum klorürle yıkanarak üzerindeki kan uzaklaştırıldı. Yıkanıp kurutulan dokular sükröz tamponunda 5dk homojenize edildikten sonra 10000g'de 5 dk santrifüj edildi. 20 µl süpernatant 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Daha sonra süpernatant üzerine kit prosedürüne uygun hazırlanmış enzim ve boya çözeltileri eklendi. Plaka 37°C'de 20 dakika inkübe edildi ve 450 nm'de absorbanslar okundu. SOD standartı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda SOD çözeltileri hazırlandı ve %inhibisyon/SOD konsantrasyon grafiği elde edildi. Doku örneklerinden elde edilen %inhibisyon değerleri bu grafikte yerine konularak SOD miktarları tayin edildi.

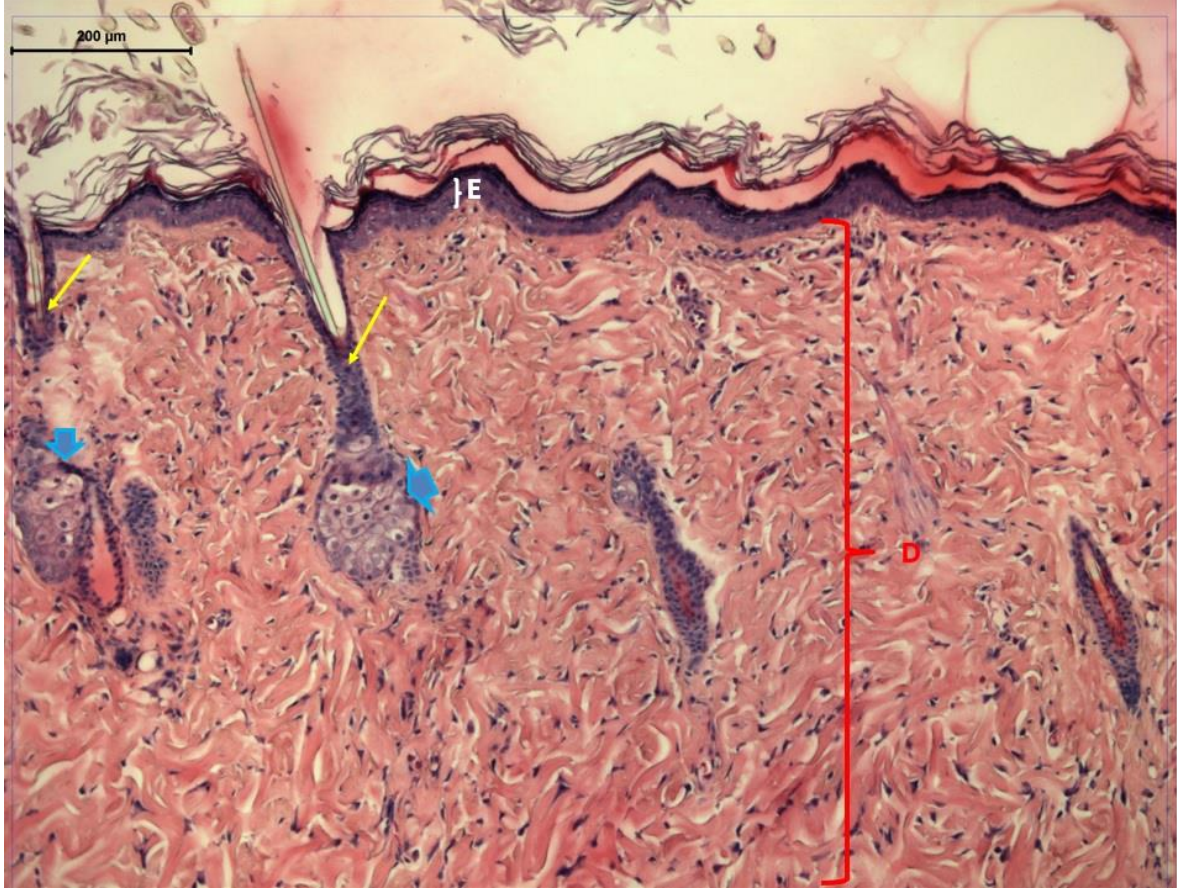
3.8.7. Doku örneklerinde histolojik çalışmalar¹

Histokimyasal takip ve yöntem

Tüm deneklerden elde edilen deri dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak en az 72 saat süresince % 10' luk formaldehit çözeltisinde tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akarsu altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildi. Sonrasında dokular, parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilip ardından erimiş parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere tüm gruplardaki her hayvana ait örnekler için Hematoksilen-Eozin

¹ Doku örneklerinde histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Prof. Dr. Candan Özoğul ile yapılmıştır, kendisine teşekkür ederiz.

(H&E) boyamaları yapıldı ve yara bölgesi histolojik olarak belirlendi. Kesitlerin bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında resimleri çekildi. Histolojik değerlendirmelerde gözlenmesi beklenen yapılar Resim 3.21’de gösterilmiştir.

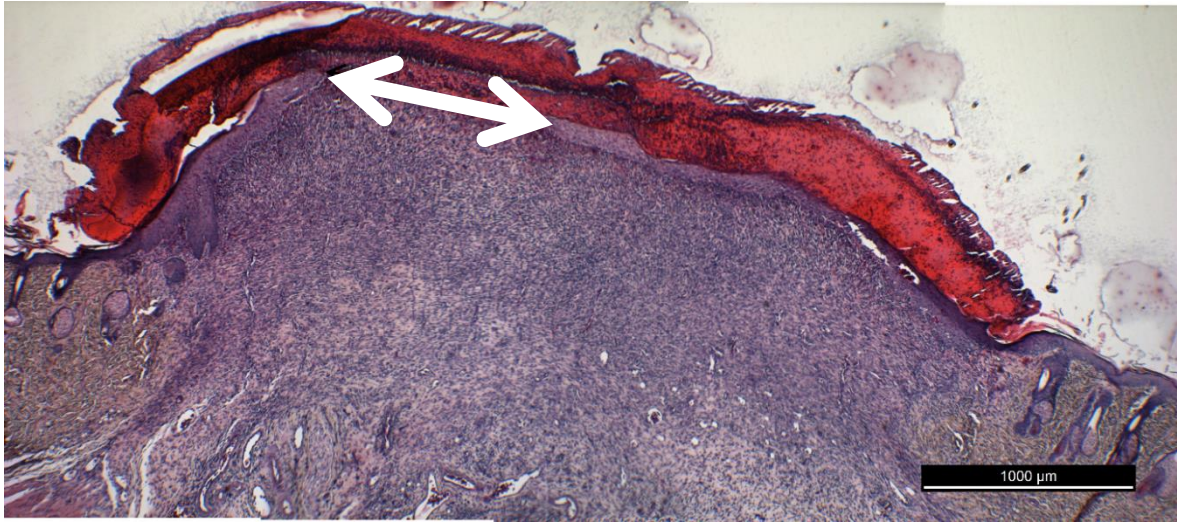


Resim 3.21. Sağlıklı deri histolojisi; Epidermis E, Dermis (D), kıl follikülleri (sarı oklar), Yağ bezleri (mavi ok başları)

H&E boyamalar histolojik ve morfometrik değerlendirmeler için yapıldı. Bu amaçla 3 günlük gruplarda inflamasyon skorlamaları, 7 günlük gruplarda reepitelizasyon farklılıkları, 14 günlük gruplarda ise iyileşen yara bölgeleri histolojik olarak değerlendirilerek karşılaştırıldı.

Üçüncü günde normoglisemik ve hiperglisemik sıçan gruplarında nötrofilik infiltrasyon yoğunluğunu belirlemek için her denekten elde edilen H&E ile boyanmış kesitlerde az (1), orta (2) ve yoğun (3) olmak üzere skorlama yapıldı. Elde edilen verilerden nötrofilik infiltrasyon yoğunluğunu tanımlamak için ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı. Normoglisemik ve hiperglisemik grupları kendi içerisinde karşılaştırmak için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı.

7 günlük gruplarda yara kenarlarından gelişmekte olan epidermis dudakları arasındaki mesafenin hesaplanmasında Leica Q Vin 3 programı kullanıldı (Resim 3.22). Reepitelizasyon skorlamaları yapılan 7 günlük gruplarda epitelizasyonun tamamlanmadığı aralığı tanımlamak için ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı. Bu parametre için normoglisemik ve hiperglisemik grupları kendi içerisinde karşılaştırmak için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı.



Resim 3.22. Örnek reepitelizasyon skorlaması

14. günde normoglisemik ve hiperglisemik gruplarda anjiyogenez yoğunluğunu belirlemek için her denekten elde edilen HE ile boyanmış kesitlerde 400x büyültmede alanlar belirlendi. Her alanda görülen damar sayısı belirlenerek skorlama yapıldı. Alanda damar sayısı 1-2 damar (1), alanda 3-6 damar (2), alanda 7-10 damar (3) ve alanda 10'dan fazla damar (4) olmak üzere skorlama yapıldı. Elde edilen verilerden vaskülarizasyon yoğunluğunu tanımlamak için ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı.

İmmunohistokimyasal yöntem

Bloklarda yara bölgesinin histolojik olarak uygunluk seviyesi tespit edildikten sonra immunohistokimyasal boyamalar için kontrollü kesitler alınmaya devam edildi. Oluşturulan parafin bloklardan immünohistokimyasal boyamalar için polilizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 37°C'deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, sonrasında 61 °C' de 20 dakika bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2

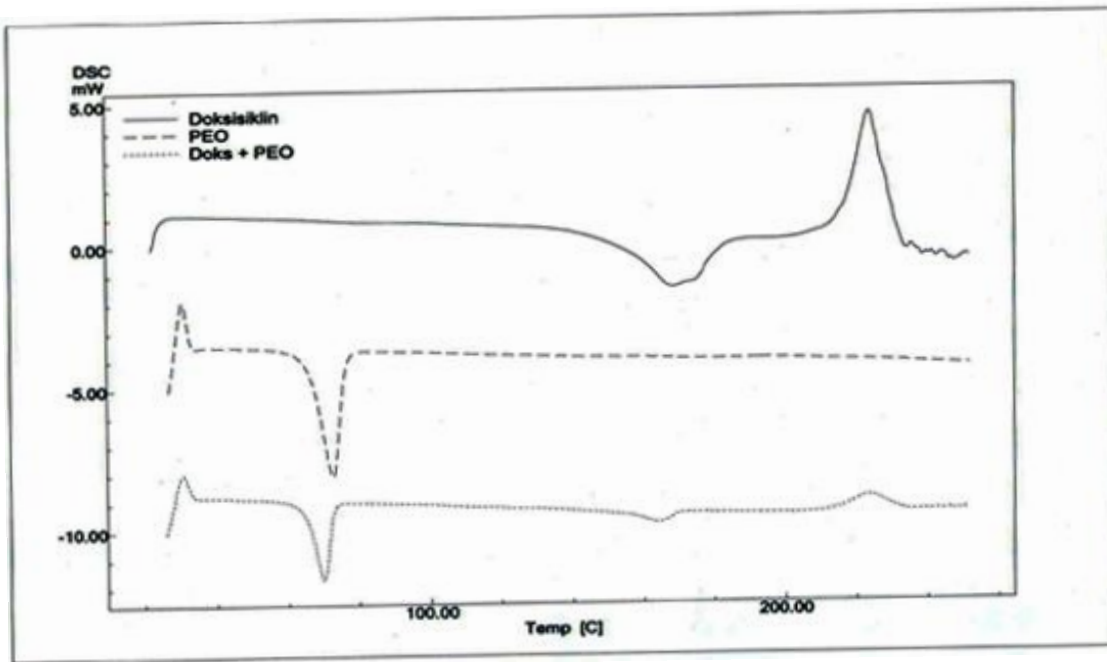
kez 20'şer dakika ksilole etkin bırakıldı. Daha sonra kesitler 5'er dakika sırasıyla % 100, % 96, % 90, % 80 ve % 70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi. Dehidrate edilen kesitleri alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara Tris-EDTA antijen çözeltisi (pH: 9.0) ile mikrodalga fırında retriever işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan kesitler 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilip, dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika Tris Buffer Saline (TBS, pH:7.6) ile yıkandıktan sonra, 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi sağlandı. İşlem sonrasında TBS ile yıkanan kesitlere 5 dakika UltraV block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, uygun dilusyonda VEGF (1:200), bFGF (1:200), vWF (1:200), IL8 (1:100), MMP-2 (1:200), MMP-9 (1:200), TIMP-1 (1:200) ve TIMP-2 (1:200) primer antikörlerine etkin bırakılarak 1 gece +4°C inkübasyonları sağlandı. Ertesi gün işlemlere devam edildi. Primer antikoru dokudan uzaklaştırmak için kesitler 3 kez 3'er dakika TBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika biotinli sekonder antikör uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar TBS ile yıkandıktan sonra kesitler enzimin biotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonunda kesitler yine 3 kez 3'er dakika TBS ile yıkandı. Son olarak ortama diaminobenzedin (DAB) içeren substratı eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletilip mikroskop altında gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandıktan sonra zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı. DAB ile işaretlenip zemin boyaması yapılan lamalar azalan alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi. Sonrasında kesitlerin üzeri lamel ile Entellan ortamı kullanılarak kapatıldı. Kesitler bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekildi. Her primer antikör için immünohistokimyasal tutulum yoğunlukları değerlendirildi.

4. BULGULAR

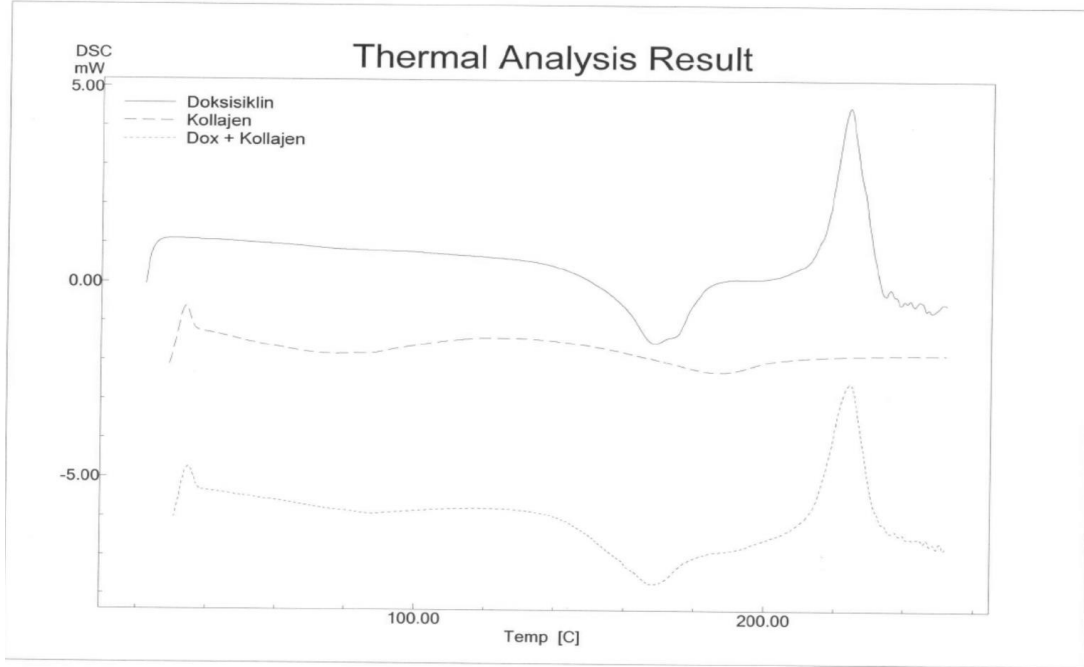
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. DSC çalışmaları

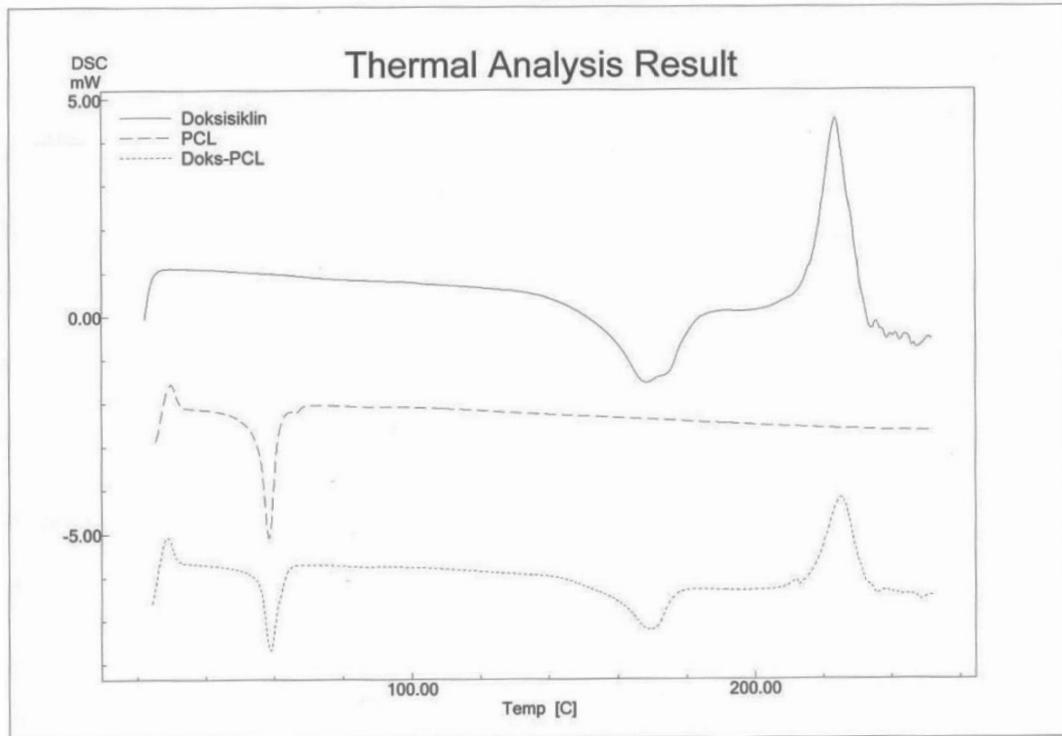
Etkin maddenin, polimerlerin ve karışımlarının DSC çalışmaları Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen termogramlar Şekil 4.1-4.5’de gösterilmektedir.



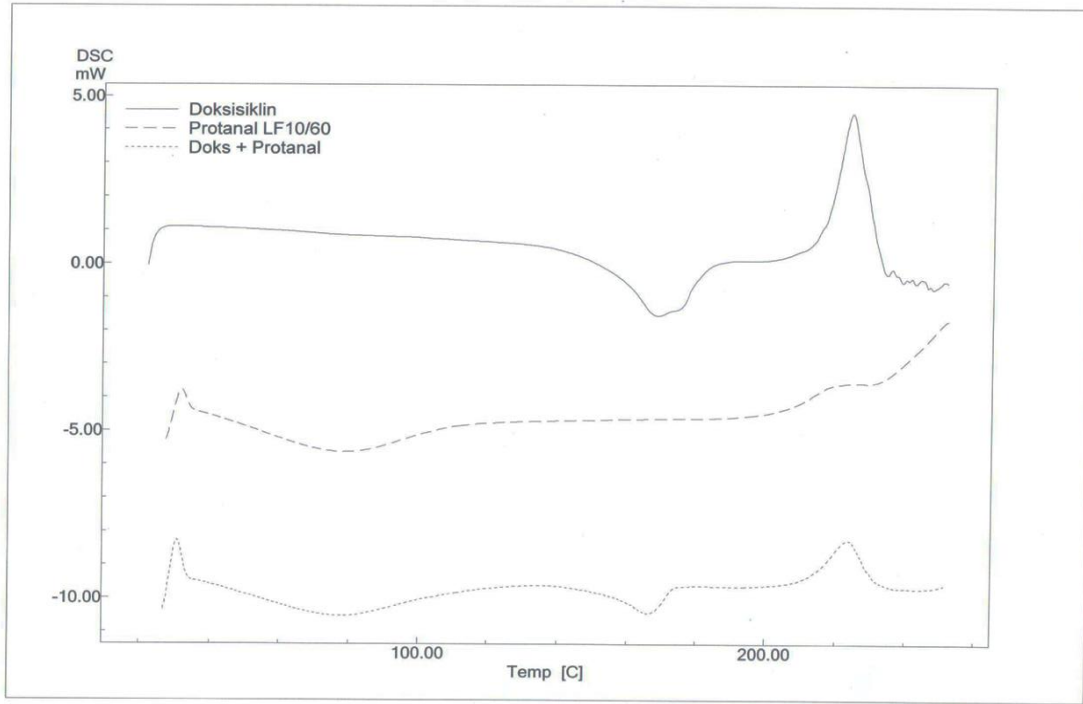
Şekil 4.1. Doksisiklin-PEO 1:1 karışımının DSC termogramı



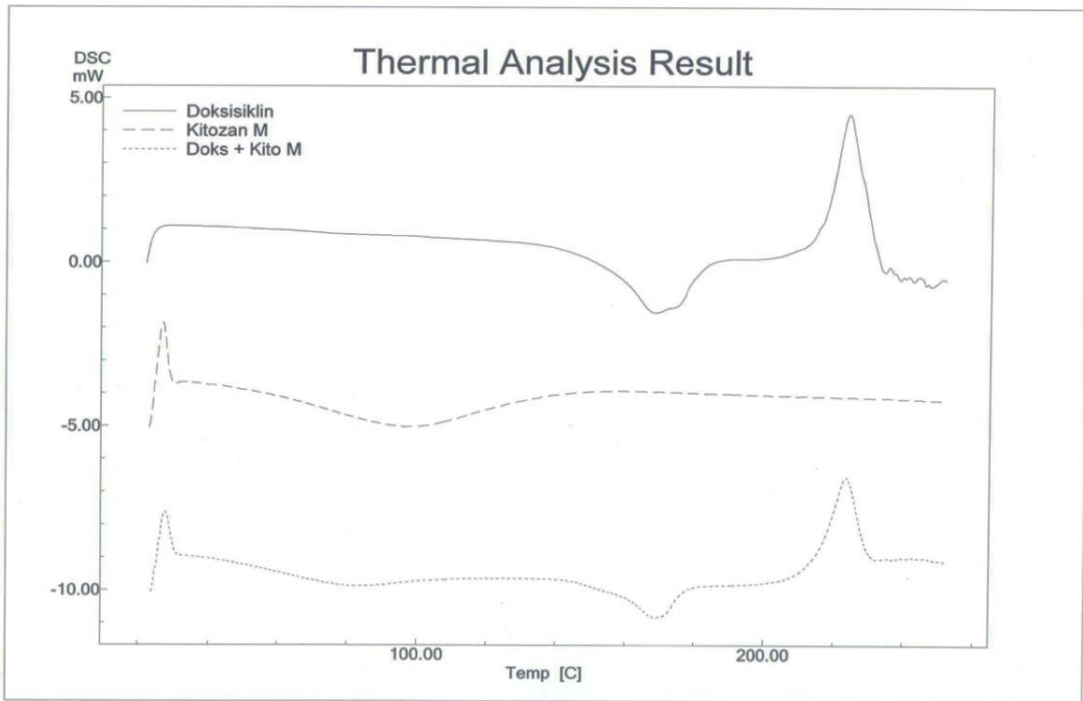
Şekil 4.2. Doksisiklin-Kollajen 1:1 karışımının DSC termogramı



Şekil 4.3. Doksisiklin-PCL 1:1 karışımının DSC termogramı



Şekil 4.4. Doksisisiklin-Sodyum aljinat 1:1 karışımının DSC termogramı



Şekil 4.5. Doksisisiklin-Kitozan 1:1 karışımının DSC termogramı

4.1.2. İletkenlik ölçümleri

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde yapılan polimer çözeltilerinin ve karışımlarının kondüktivilerinin ölçüm sonuçları Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının iletkenlik değerleri

Polimer	Konsantrasyon	Çözücü	İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmına yönelik ölçümler			
PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	374
Koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmına yönelik ölçümler			
PCL:Kollajen	1:4,5	GAA:HFIP	14,4
Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerine yönelik ölçümler			
PEO	5	Distile su	148
PEO	6	Distile su	155
PEO	7	Distile su	162
Aljinat	2	Distile su	3870
Kitozan	2	Distile su	4210
PEO (%6) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	808
PEO (%7) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	850
PEO (%6) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	891
PEO (%7) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	980

4.1.3. Viskozite ölçümleri

Viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde yapıldı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının viskozite değerleri

Polimer	Konsantrasyon	Çözücü	Viskozite (mPas)
Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmına yönelik ölçümler			
PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	887,6
Koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmına yönelik ölçümler			
PCL:Kollajen	5:5	GAA:HFIP	649,1
PCL:Kollajen	5:4,5	GAA:HFIP	624,2
PCL:Kollajen	5:4	GAA:HFIP	636,2
PCL:Kollajen	5:3,5	GAA:HFIP	586,5
PCL:Kollajen	5:3	GAA:HFIP	580,5
PCL:Kollajen	5:2,5	GAA:HFIP	566,6
PCL:Kollajen	5:2	GAA:HFIP	502,9
PCL:Kollajen	5:1,5	GAA:HFIP	417,5
PCL:Kollajen	1:4,5	GAA:HFIP	387,3
PCL:Kollajen	1,5:4,5	GAA:HFIP	395,3
PCL:Kollajen	2:4,5	GAA:HFIP	403,2
PCL:Kollajen	3:4,5	GAA:HFIP	476,2
PCL:Kollajen	4:4,5	GAA:HFIP	617,5
Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerine yönelik ölçümler			
PEO	5	Distile su	3009
PEO	6	Distile su	6524
PEO	7	Distile su	8770
Aljinat	2	Distile su	636
Kitozan	2	Distile su	2906
PEO (%6) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	1547
PEO (%7) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	3797
PEO (%6) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	3777
PEO (%7) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	6849

4.1.4. Yüzey gerilimi ölçümleri

Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı gibi yapılan yüzey gerilimi ölçümleri sonuçları Çizelge 4.3’te gösterilmektedir.

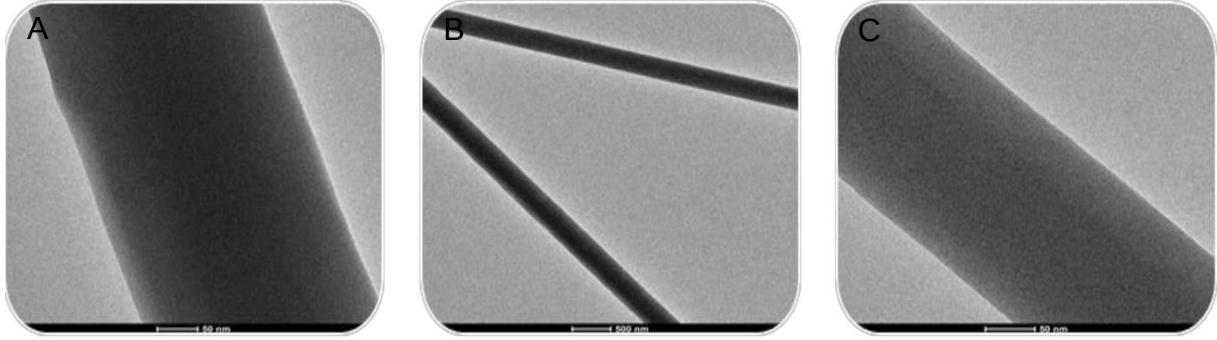
Çizelge 4.3. Polimer çözeltilerinin ve karışımlarının yüzey gerilimi değerleri

Polimer	Konsantrasyon	Çözücü	Yüzey Gerilimi (mN/m)
Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmına yönelik ölçümler			
PEO:Doks	2,5:2,5	%90 AA	38,2
Koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmına yönelik ölçümler			
PCL:Kollajen	5:5	GAA:HFIP	17,9
PCL:Kollajen	5:4,5	GAA:HFIP	17,7
PCL:Kollajen	5:4	GAA:HFIP	17,4
PCL:Kollajen	5:3,5	GAA:HFIP	17,3
PCL:Kollajen	5:3	GAA:HFIP	17,3
PCL:Kollajen	5:2,5	GAA:HFIP	17,2
PCL:Kollajen	5:2	GAA:HFIP	17,2
PCL:Kollajen	5:1,5	GAA:HFIP	17,0
PCL:Kollajen	1:4,5	GAA:HFIP	16,6
PCL:Kollajen	1,5:4,5	GAA:HFIP	16,8
PCL:Kollajen	2:4,5	GAA:HFIP	16,9
PCL:Kollajen	3:4,5	GAA:HFIP	17,2
PCL:Kollajen	4:4,5	GAA:HFIP	17,4
Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerine yönelik ölçümler			
PEO	5	Distile su	65,80
PEO	6	Distile su	59,30
PEO	7	Distile su	57,01
Aljinat	2	Distile su	59,90
Kitozan	2	Distile su	73,16
PEO (%6) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	58,67
PEO (%7) : Aljinat (%2)	7:3	Distile su	58,94
PEO (%6) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	56,93
PEO (%7) : Kitozan (%2)	8:2	Distile su	54,08

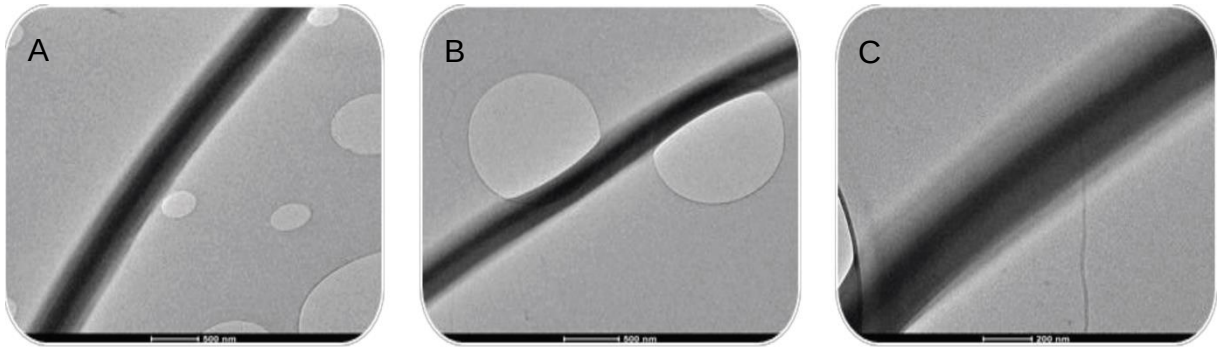
4.2. Nanolif Üretimi Çalışmaları

4.2.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları

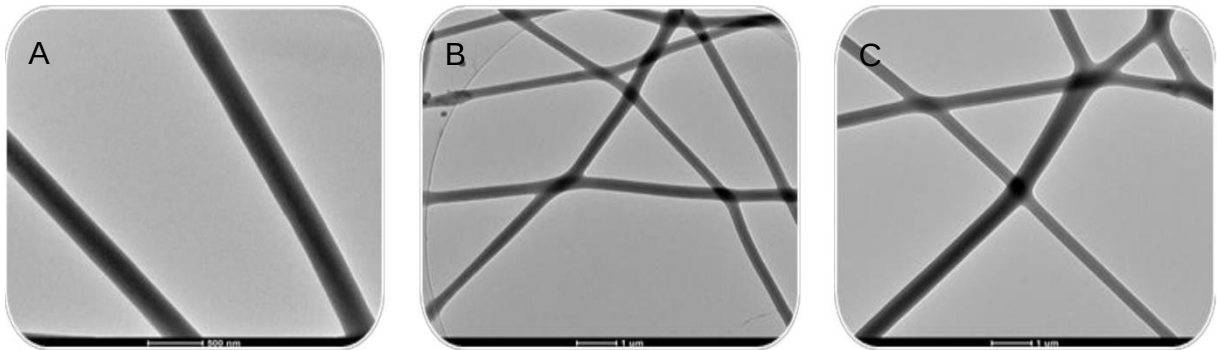
Koaksiyal nanoliflerle yapılan ön çalışmalarda Çizelge 3.1'deki işlem parametreleri ile hazırlanan formülasyonların TEM görüntüleri Resim 4.1-4.5'da gösterilmektedir.



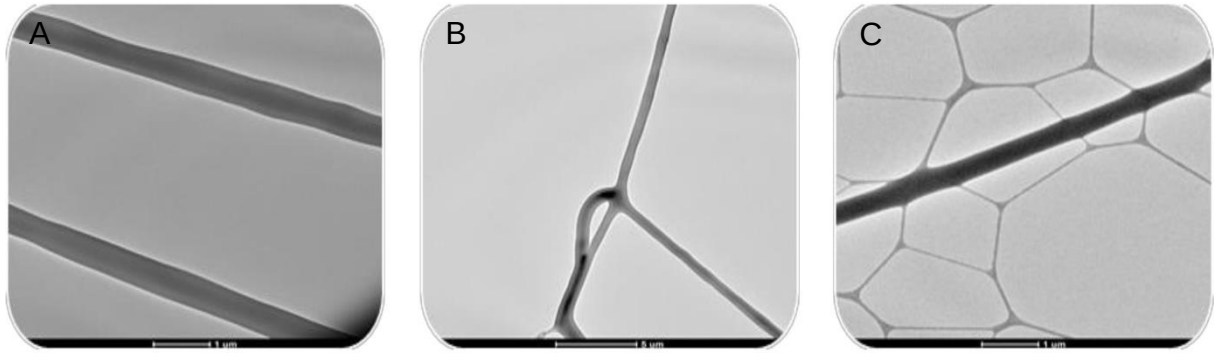
Resim 4.1. A1 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:50 nm, B:500 nm, C:50 nm)



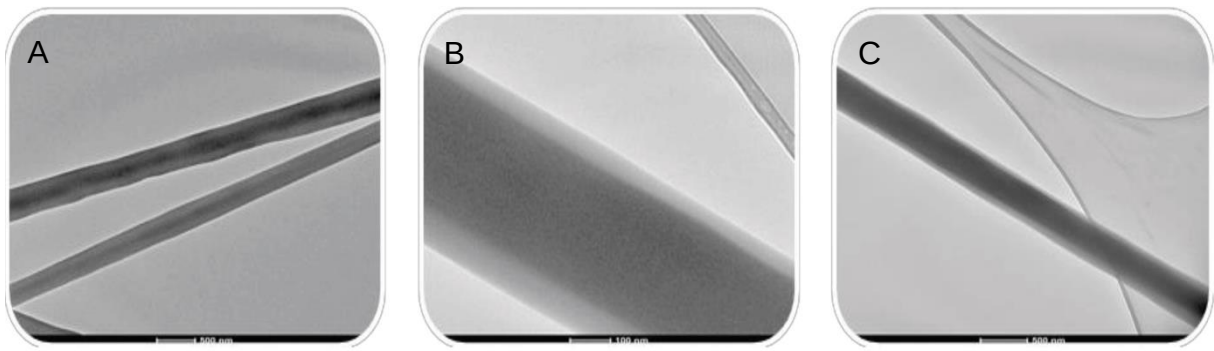
Resim 4.2. A2 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:200 nm)



Resim 4.3. A3 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:1000 nm, C:1000 nm)



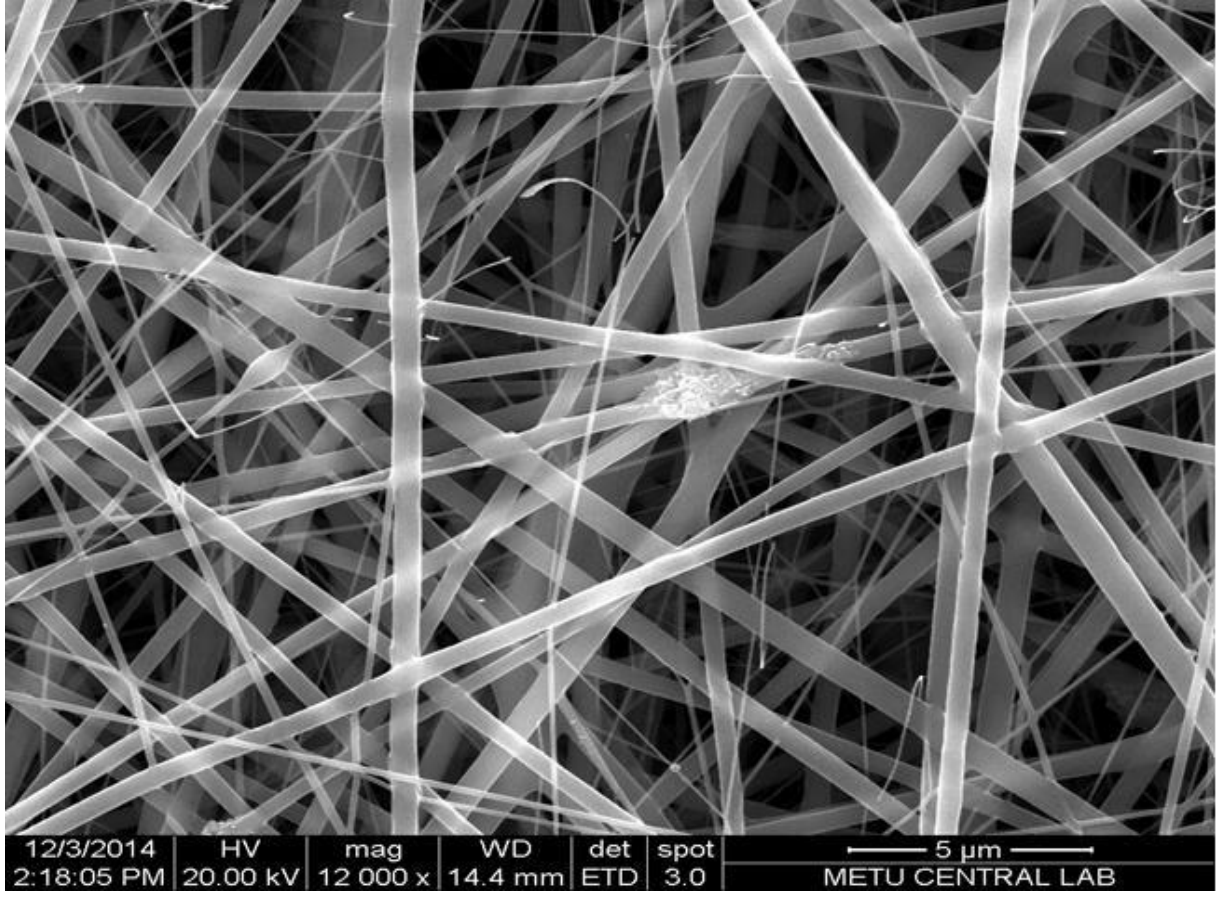
Resim 4.4. A4 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:1000 nm, B:5000 nm, C:1000 nm)



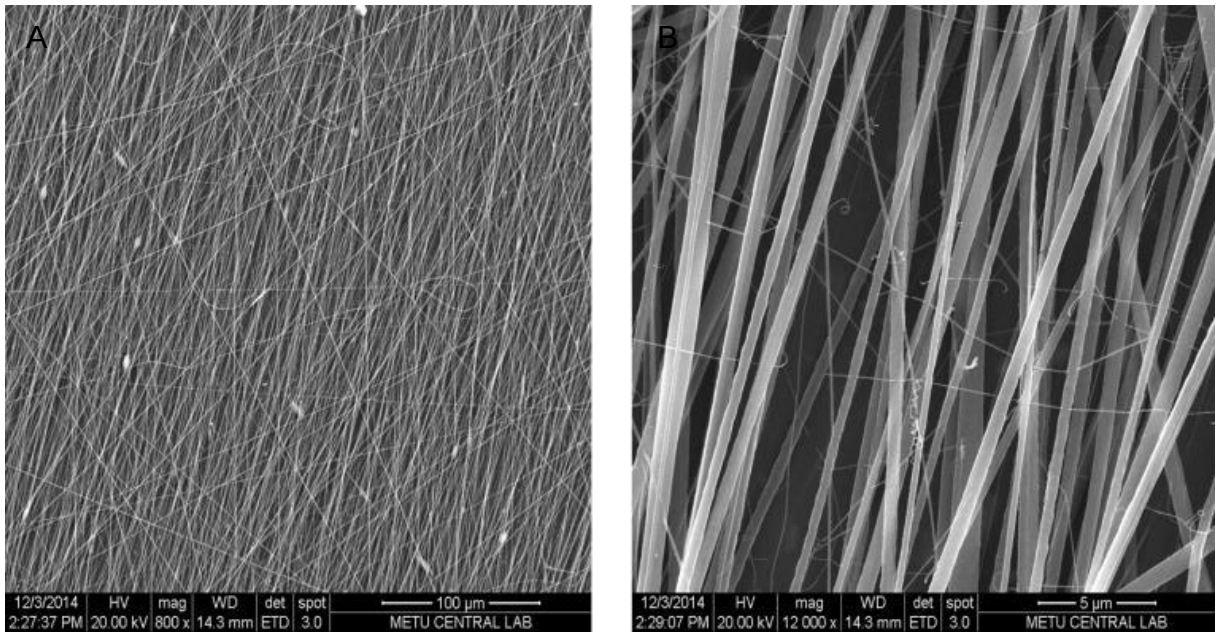
Resim 4.5. A5 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:100 nm, C:500 nm)

4.2.2. Koaksiyal yapıda paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmaları

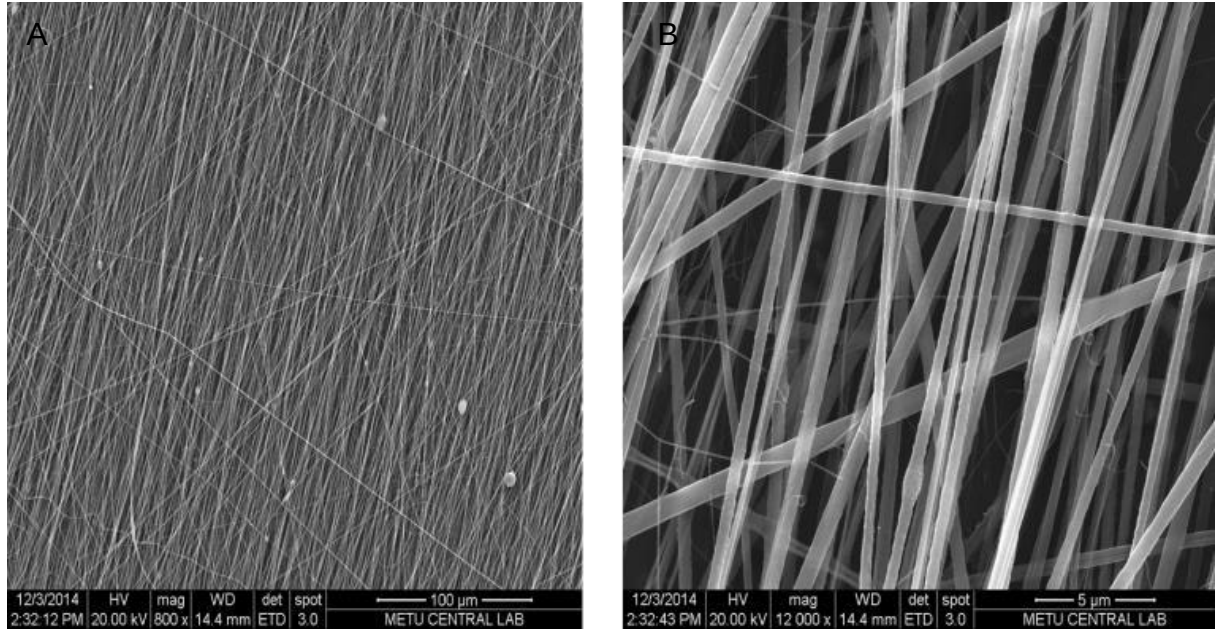
Çizelge 3.2'deki dönüş hızlarında gerçekleştirilen deneylerde A5-1–A5-5 formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Resim 4.6-4.10'te gösterilmektedir.



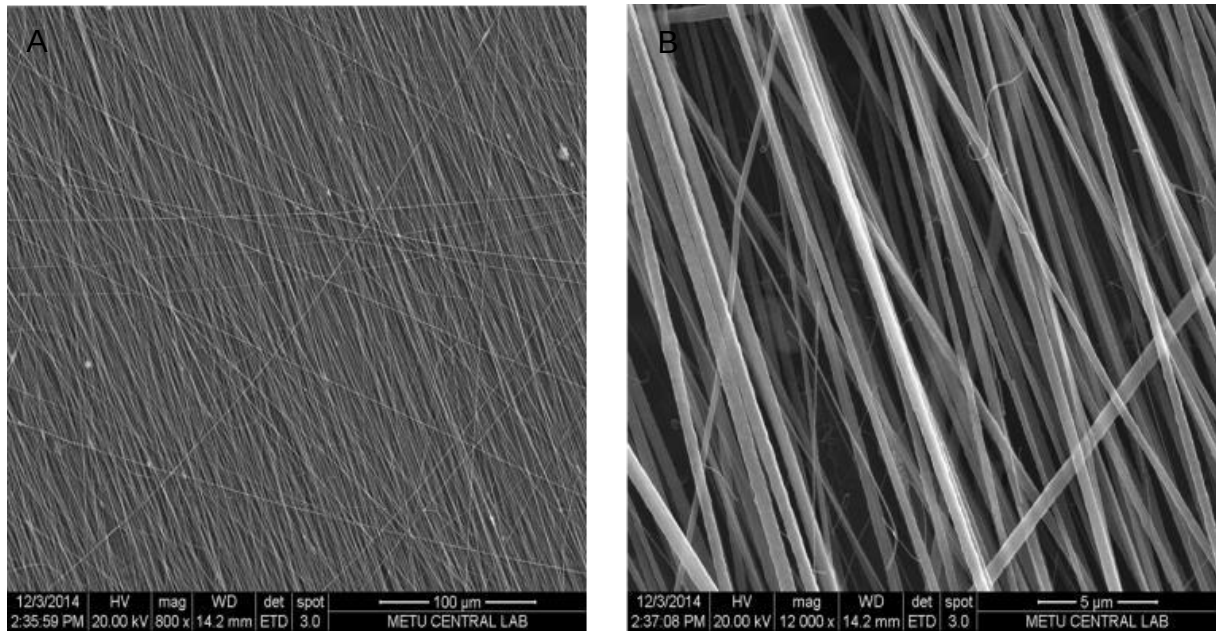
Resim 4.6. A5-1 formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Silindirin dönüş hızı 500 rpm, 12000x)



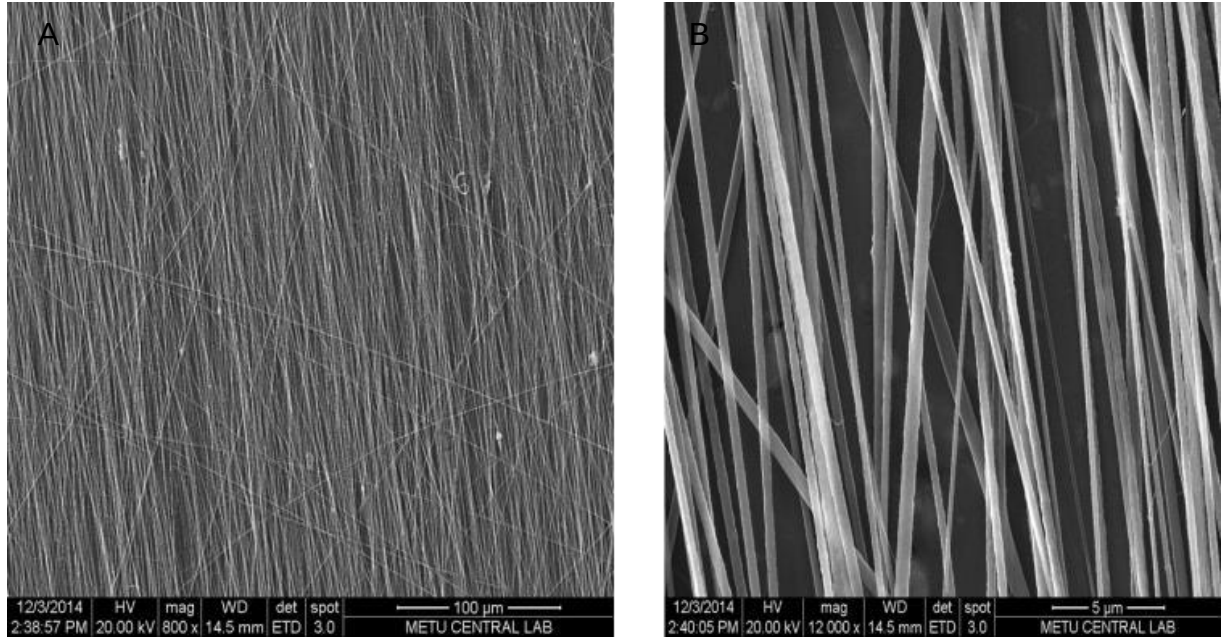
Resim 4.7. A5-2 formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Silindirin dönüş hızı 1500 rpm, A:800x, B:12000x)



Resim 4.8. A5-3 formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Silindirin dönüş hızı 2000 rpm, A:800x, B:12000x)



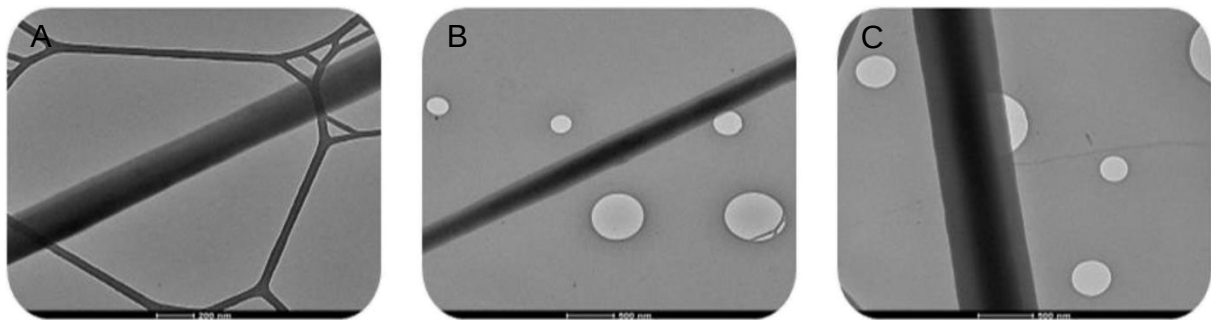
Resim 4.9. A5-4 formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Silindirin dönüş hızı 2500 rpm, A:800x, B:12000x)



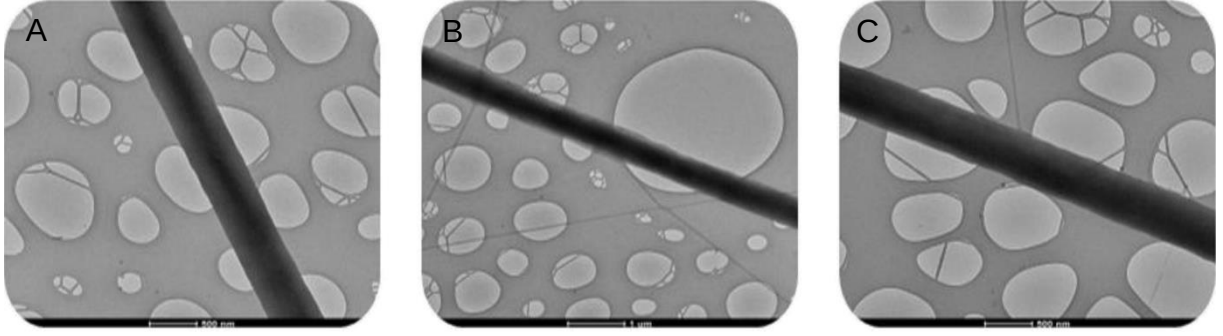
Resim 4.10. A5-5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Silindirin dönüş hızı 3000 rpm, A:800x, B:12000x)

4.2.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi

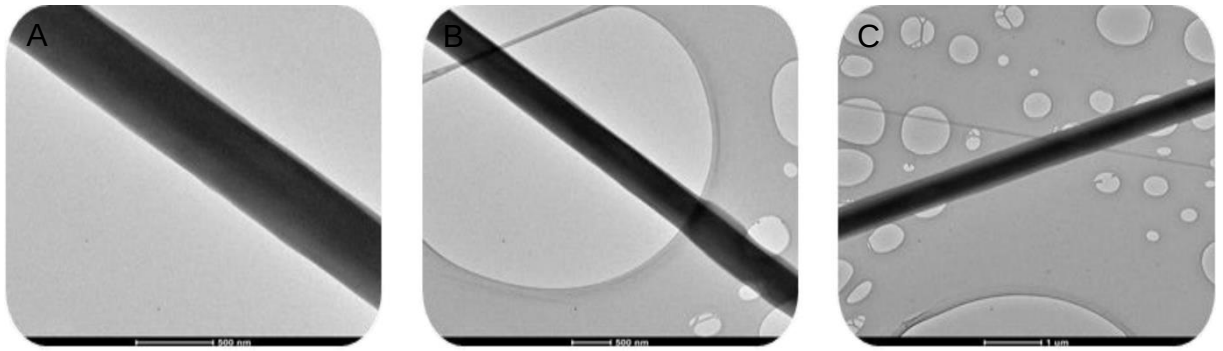
PCL konsantrasyonu %5'te sabit tutulup farklı kollajen konsantrasyonlarında ve iki farklı akış hızında elde edilen nanoliflerin TEM görüntüleri Resim 4.11-4.24'te gösterilmiştir.



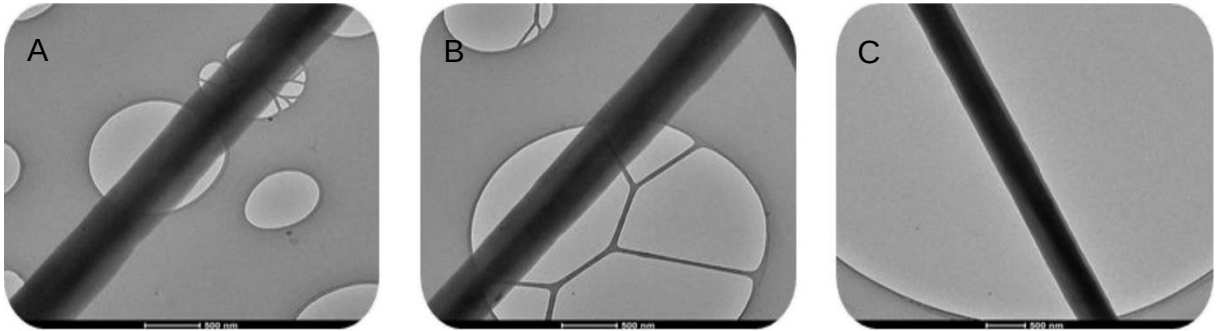
Resim 4.11. A6 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:200 nm, B:500 nm, C:500 nm)



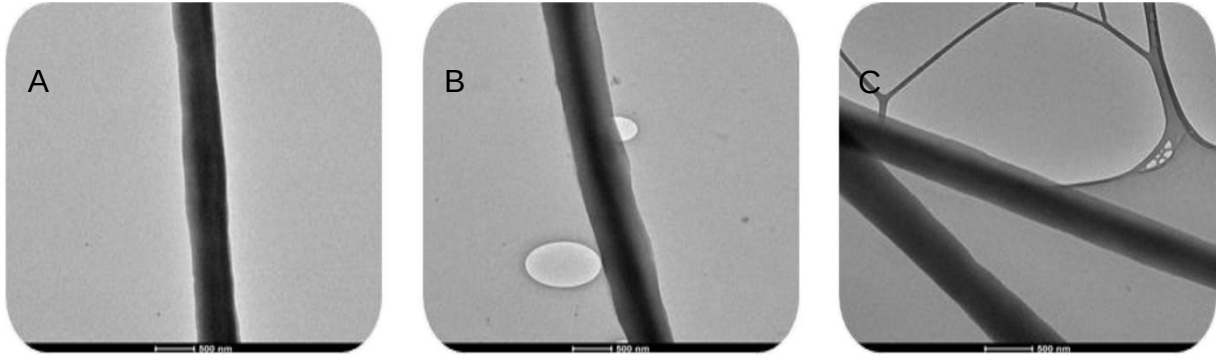
Resim 4.12. A7 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:1000 nm, C:500 nm)



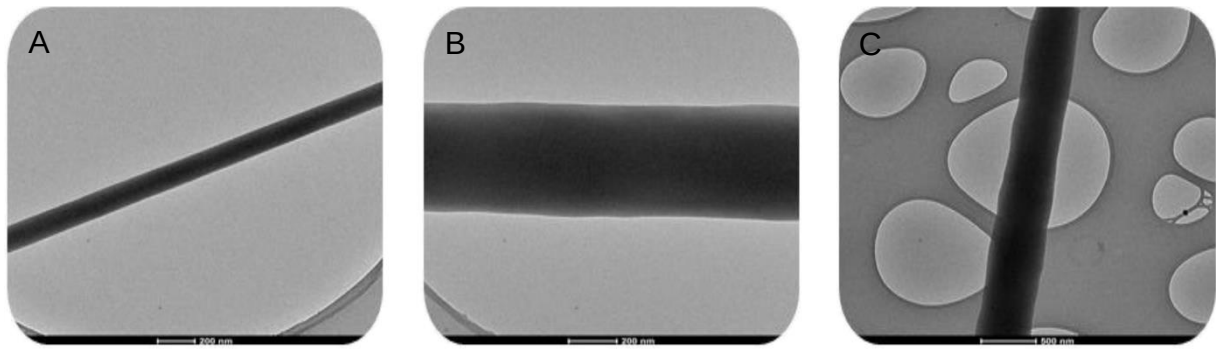
Resim 4.13. A8 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:1000 nm)



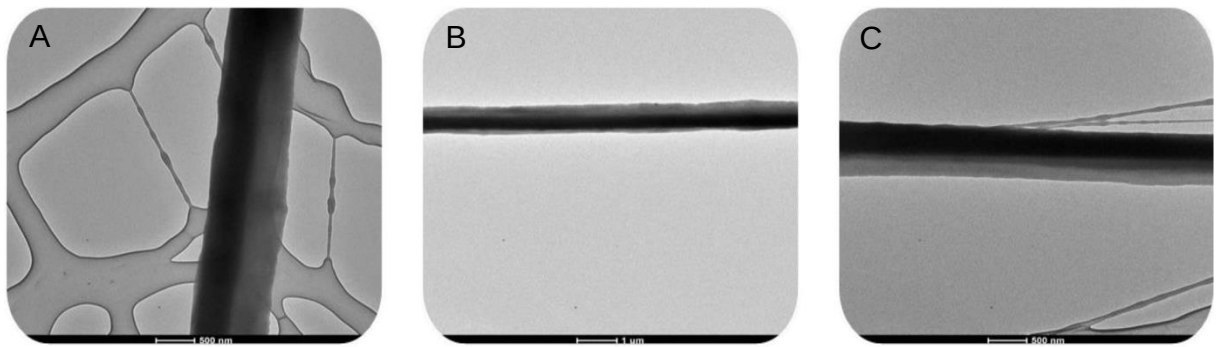
Resim 4.14. A9 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)



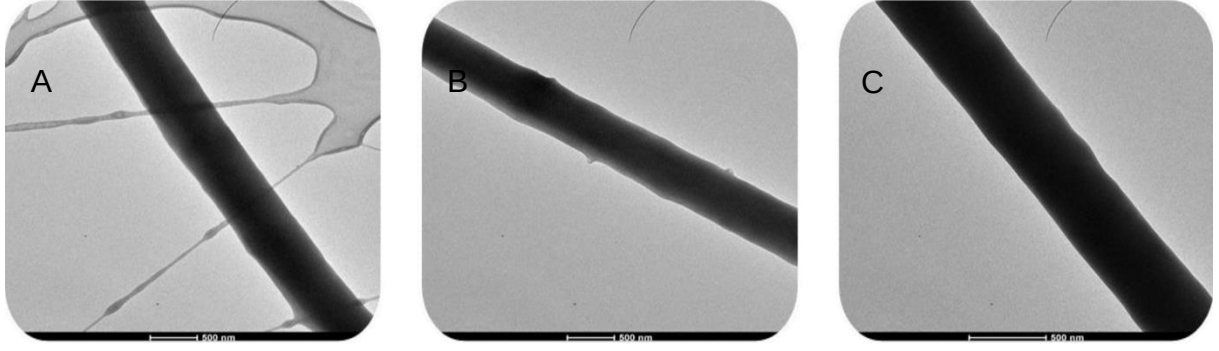
Resim 4.15. A10 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)



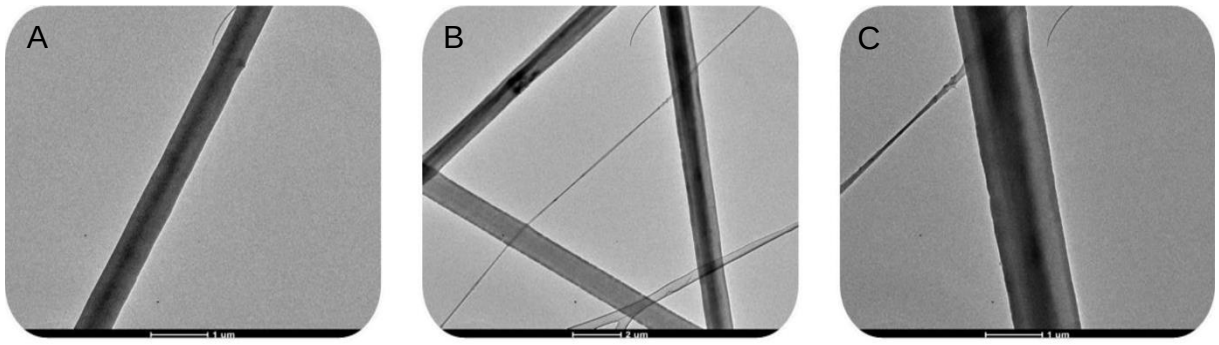
Resim 4.16. A11 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:200 nm, B:200 nm, C:500 nm)



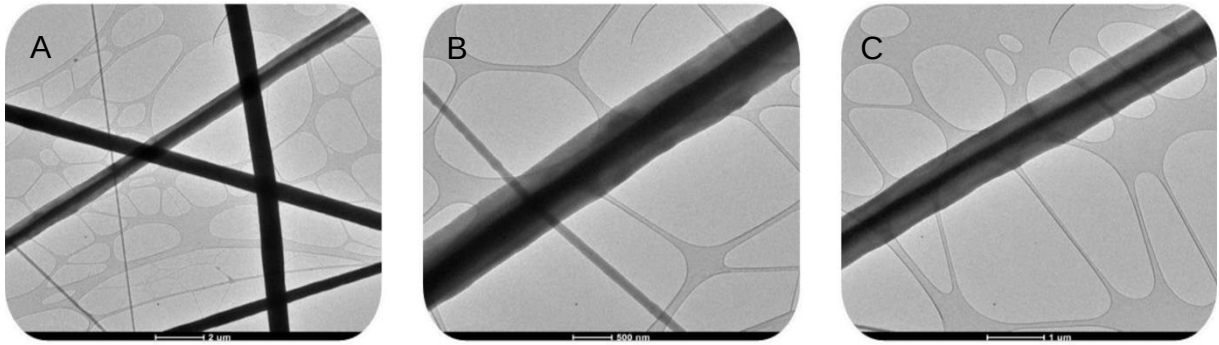
Resim 4.17. A12 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:1000 nm, C:500 nm)



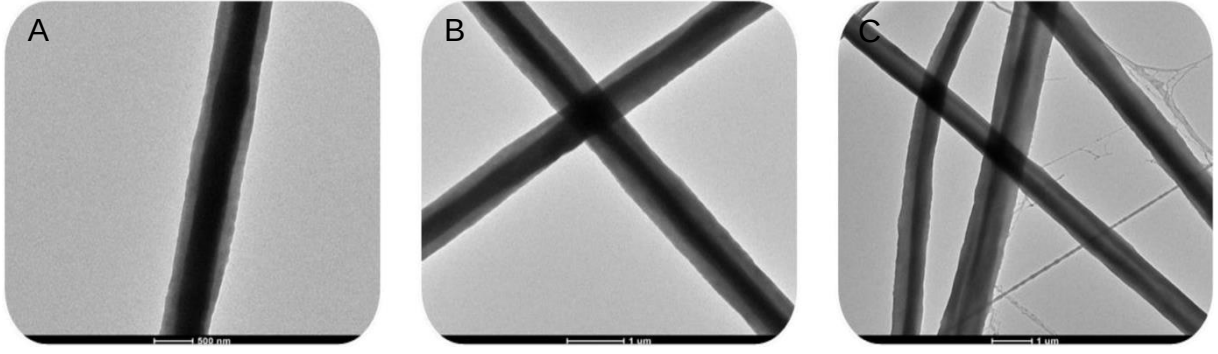
Resim 4.18. A13 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)



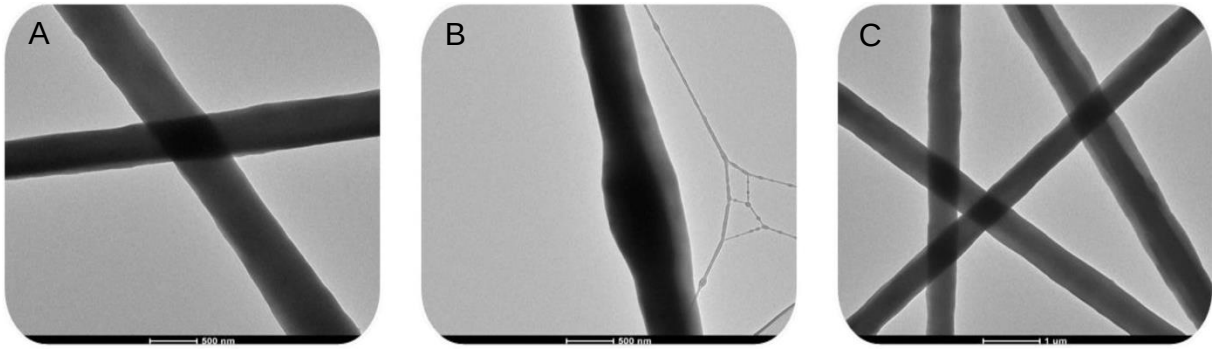
Resim 4.19. A14 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:1000 nm, B:2000 nm, C:1000 nm)



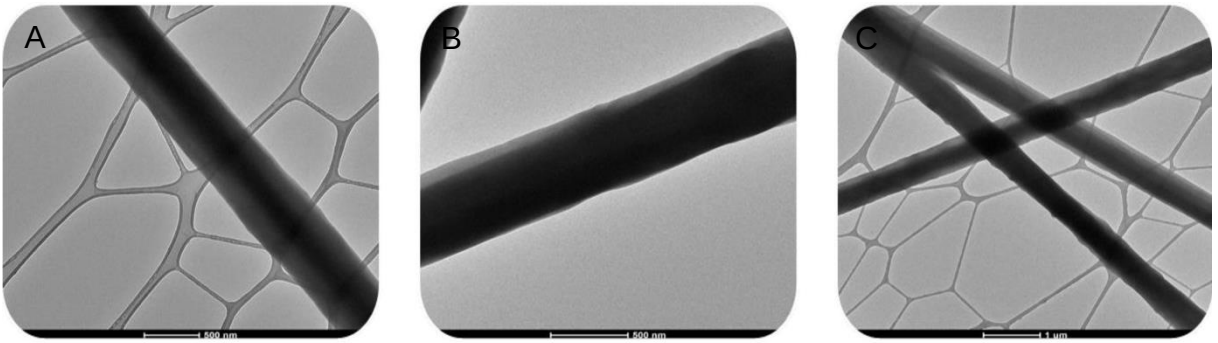
Resim 4.20. A15 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:2000 nm, B:500 nm, C:1000 nm)



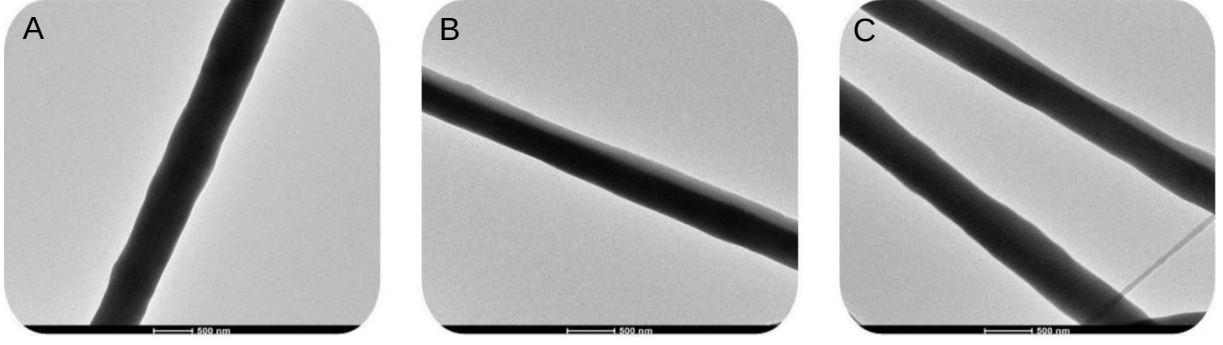
Resim 4.21. A16 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:1000 nm, C:1000 nm)



Resim 4.22. A17 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:1000 nm)



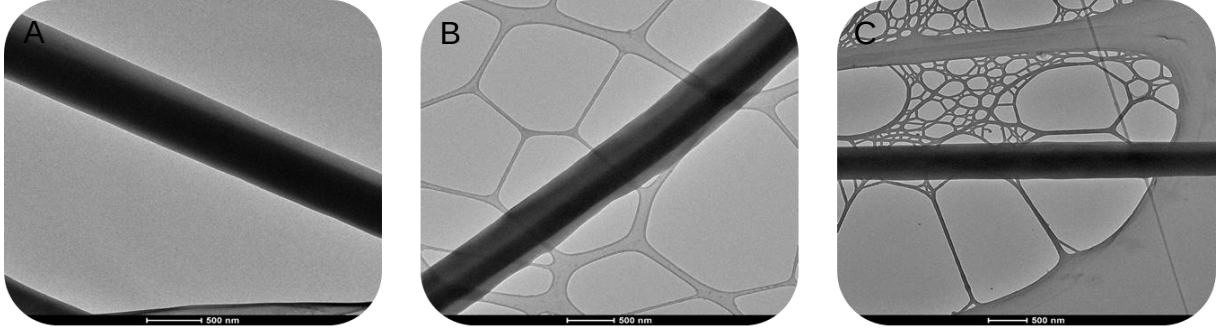
Resim 4.23. A18 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:1000 nm)



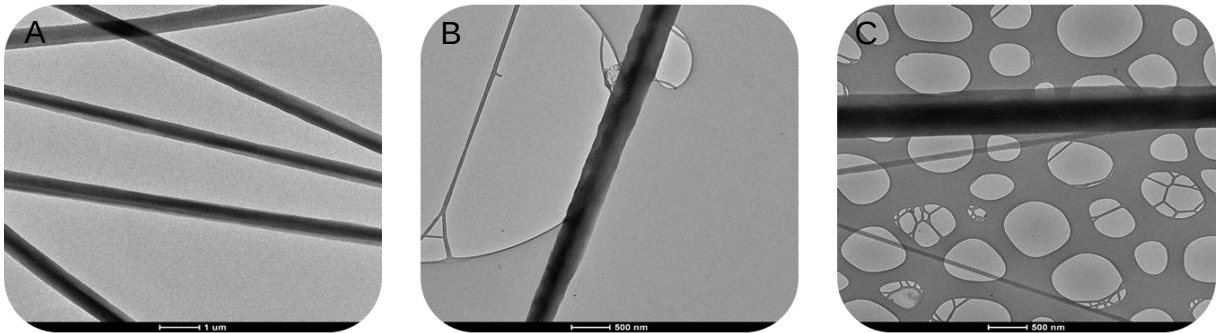
Resim 4.24. A19 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)

4.2.4. PCL konsantrasyonunun belirlenmesi

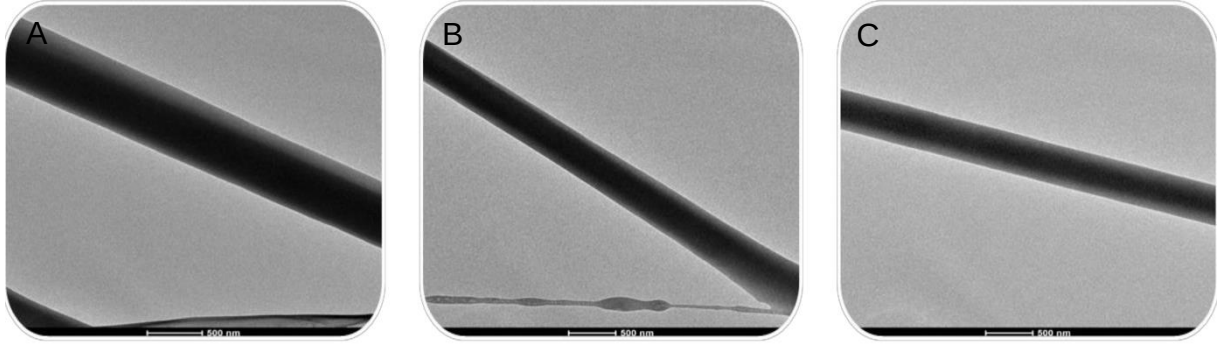
Bölüm 3.3.1’de belirtildiği gibi kollajen konsantrasyonu %4,5’te sabit tutulup azalan PCL konsantrasyonlarında ve akış hızlarında elde edilen nanoliflerin TEM görüntüleri Resim 4.25-4.29’da gösterilmiştir.



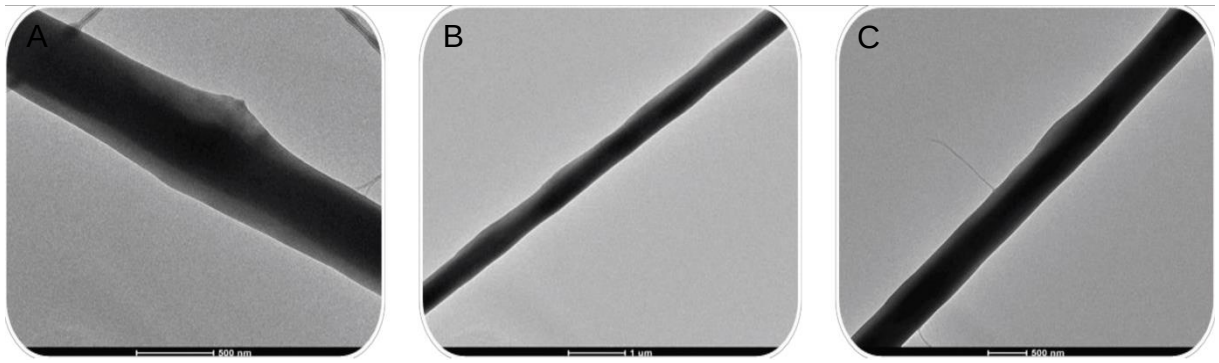
Resim 4.25. A20 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)



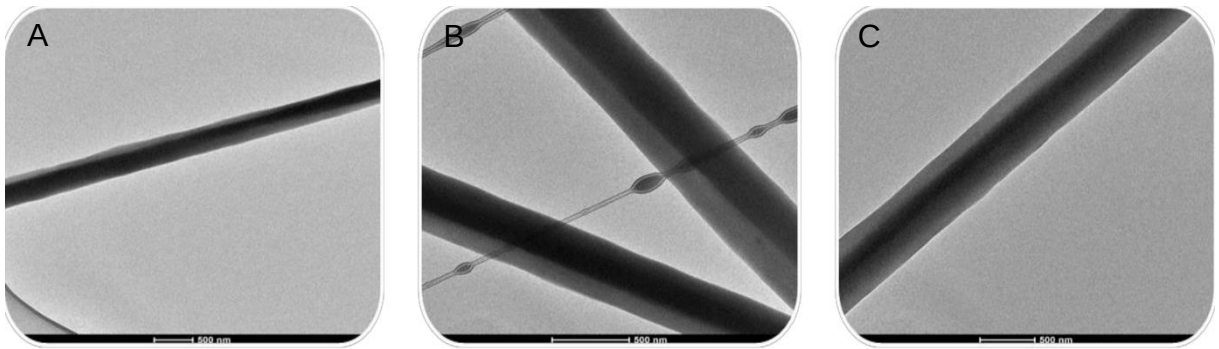
Resim 4.26. A21 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu:A: 1000 nm, B:500 nm, C:500 nm)



Resim 4.27. A22 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)



Resim 4.28. A23 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:1000 nm, C:500 nm)

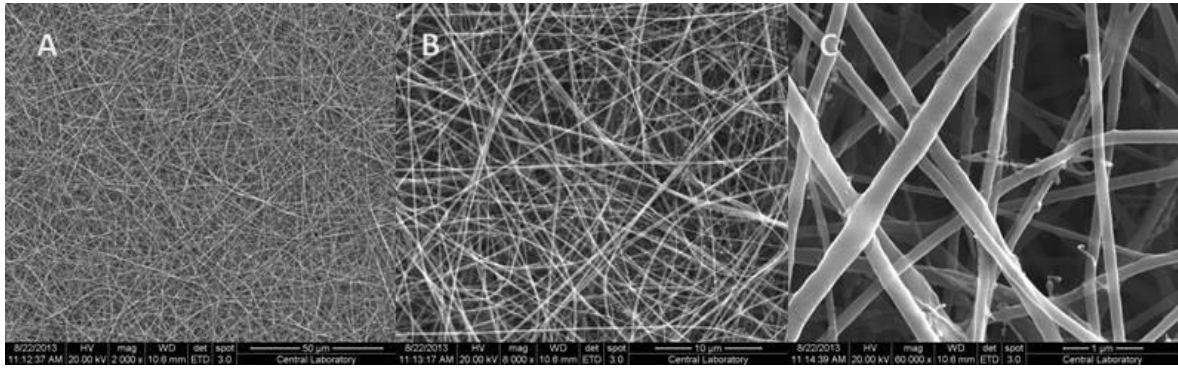


Resim 4.29. A24 formülasyonu TEM görüntüsü (Ölçek çubuğu: A:500 nm, B:500 nm, C:500 nm)

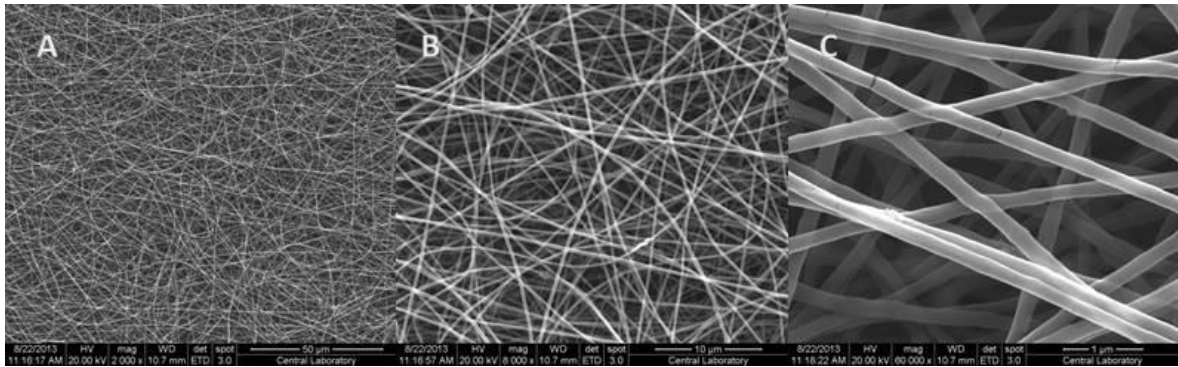
4.2.5. Kitozan ve aljinat nanolif tabakalarının elde edilmesi

PEO nanoliflerinin hazırlanması

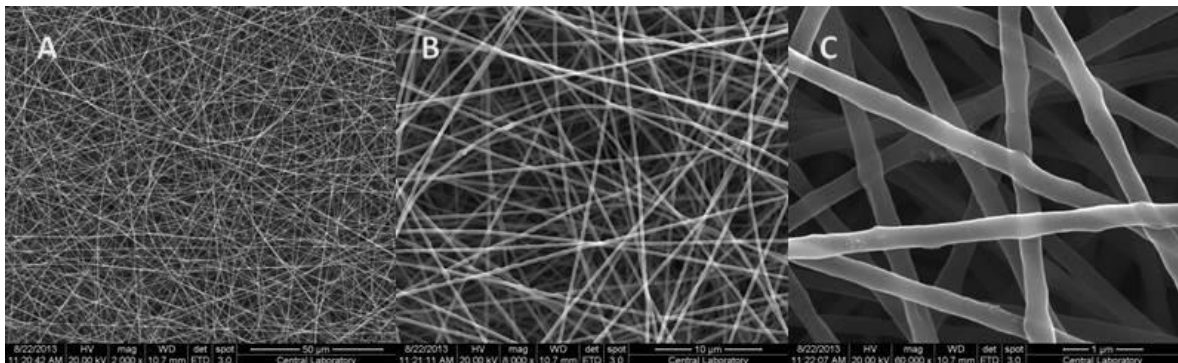
Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanmasında kullanılacak olan PEO çözeltilerinin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PEO nanoliflerinin SEM görüntüleri Resim 4.30-4.32’de görülmektedir.



Resim 4.30. PEO1 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)



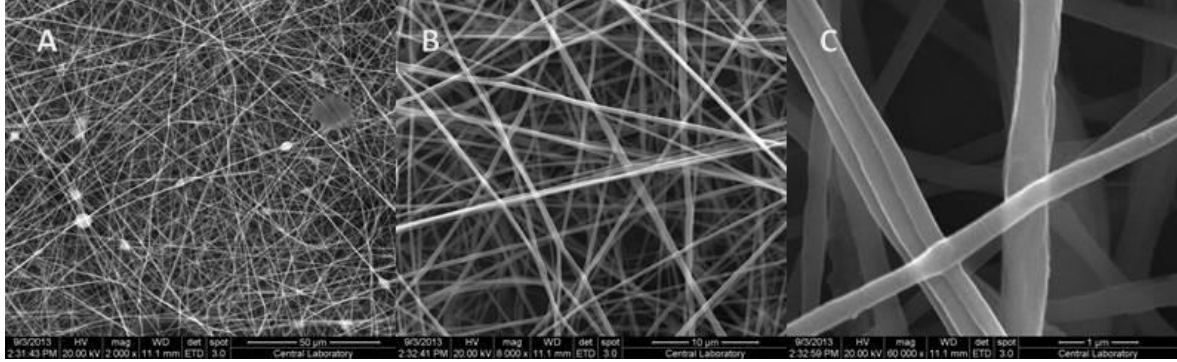
Resim 4.31. PEO2 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)



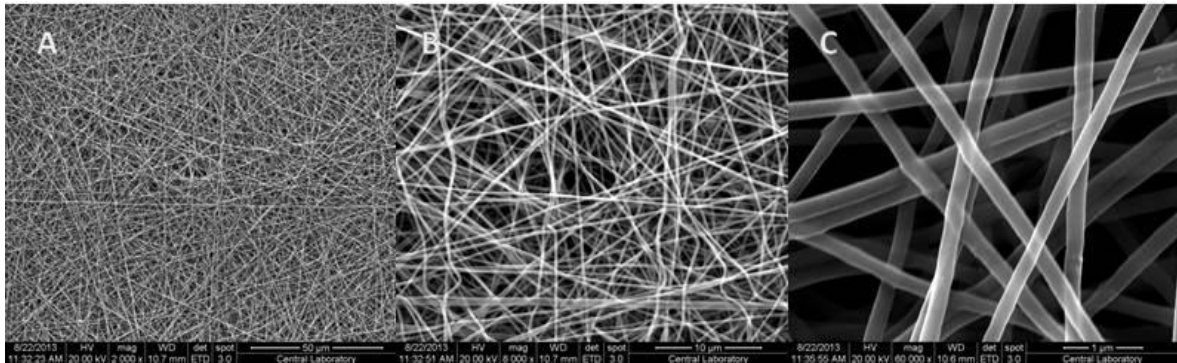
Resim 4.32. PEO3 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)

Rasgele yerleşimli kitozan nanoliflerinin elde edilmesi

İki farklı konsantrasyonda (%6 ve %7) hazırlanan PEO çözeltisi ve %2'lik kitozan çözeltilerinin 80:20 oranındaki karışımlarından Çizelge 3.6'daki üretim parametreleri ile hazırlanan rasgele yerleşimli nanoliflerin SEM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Resim 4.33 ve 4.34).



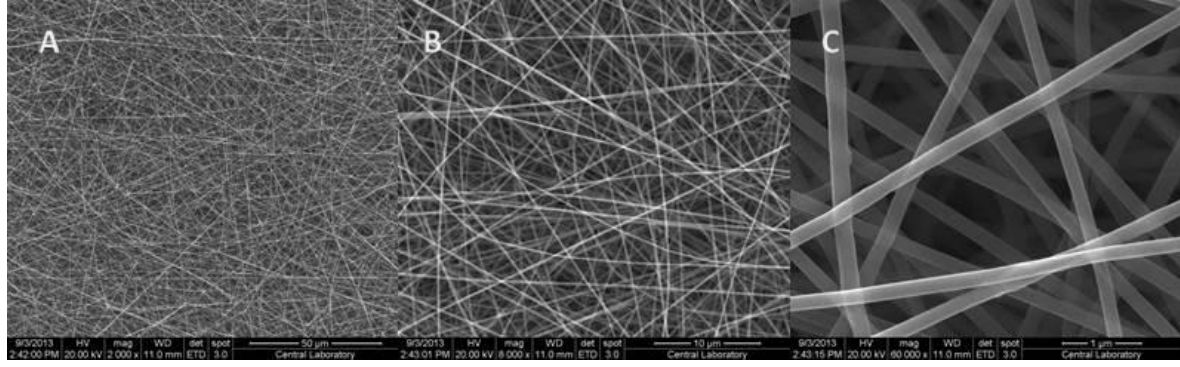
Resim 4.33. PEO-CH1 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)



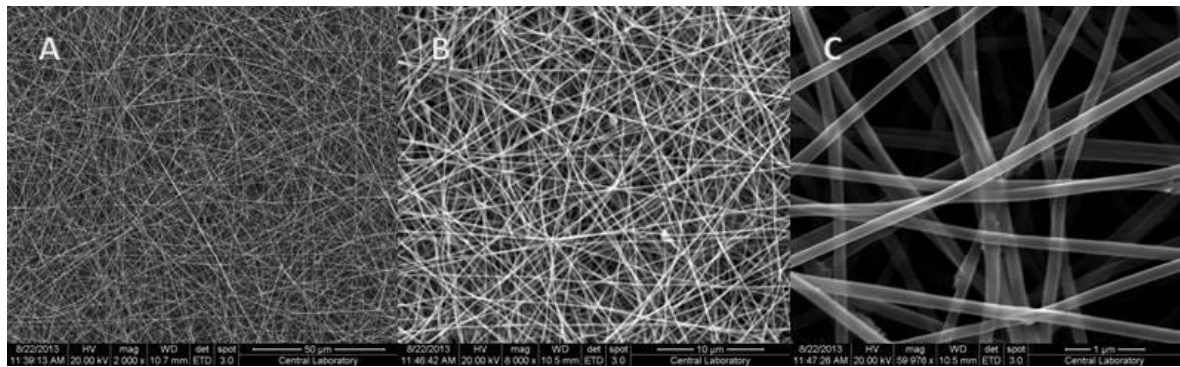
Resim 4.34. PEO-CH2 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)

Rasgele yerleşimli sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanması

İki farklı konsantrasyonda (%6 ve %7) hazırlanan PEO çözeltisi ve %2'lik sodyum aljinat çözeltilerinin 70:30 oranındaki karışımlarından Çizelge 3.7'deki üretim parametreleri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri Resim 4.35 ve 4.36'da gösterilmiştir.



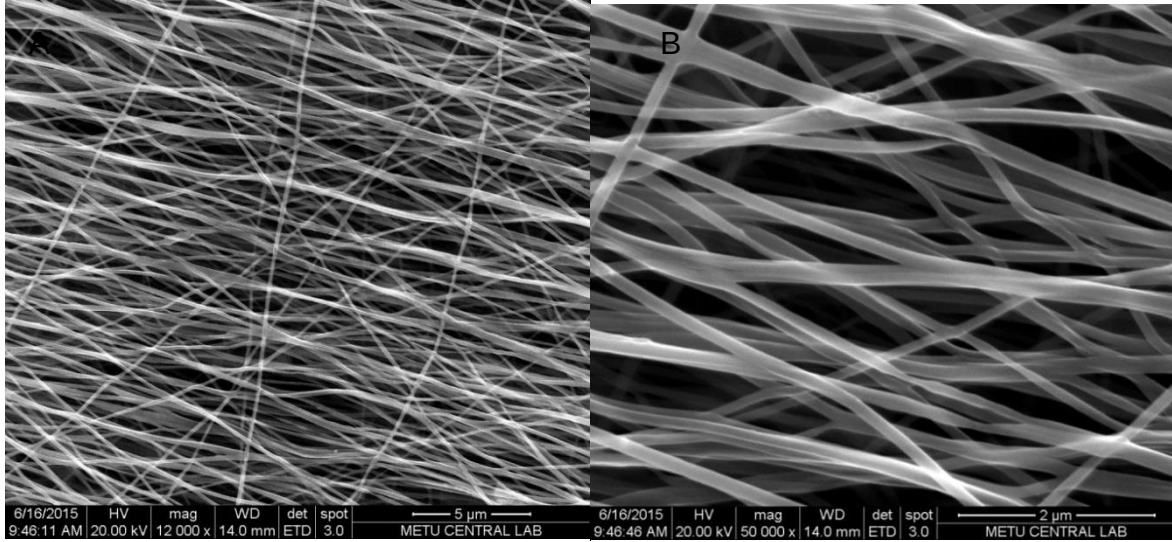
Resim 4.35. PEO-SA1 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)



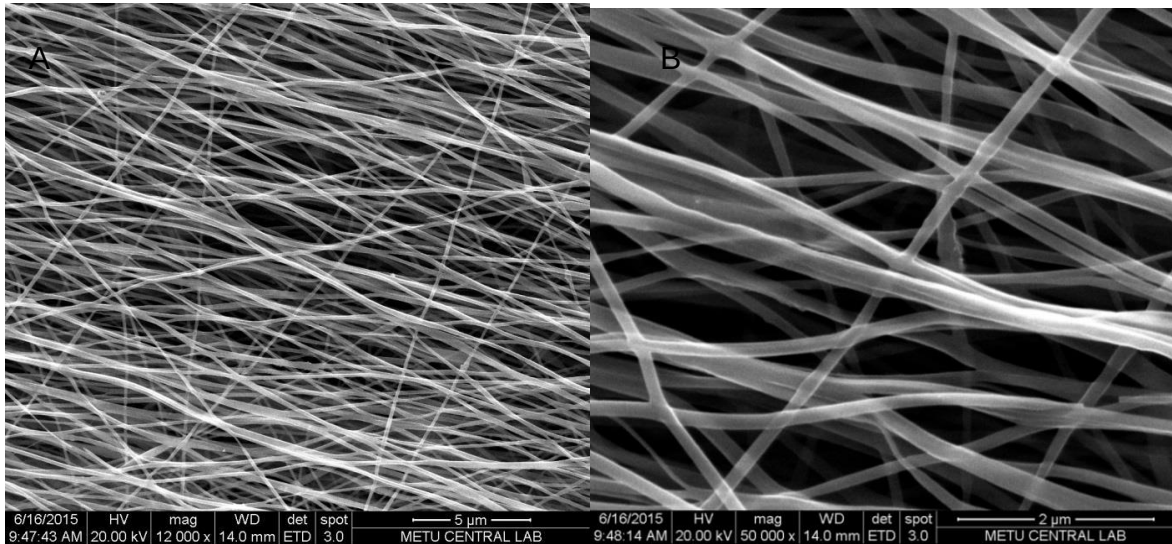
Resim 4.36. PEO-SA2 formülasyonunun SEM görüntüleri (A:2000x, B:8000x, C:60000x)

Paralel yerleşimli kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin elde edilmesi

PEO-CH1 ve PEO-SA1 formülasyonlarından 1500 rpm dönüş hızı ile elde edilen paralel yerleşimli nanoliflerin SEM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Resim 4.37 ve 4.38).



Resim 4.37. Paralel yerleşimli PEO-CH1 nanoliflerinin SEM görüntüsü (A:12000x, B:50000x)

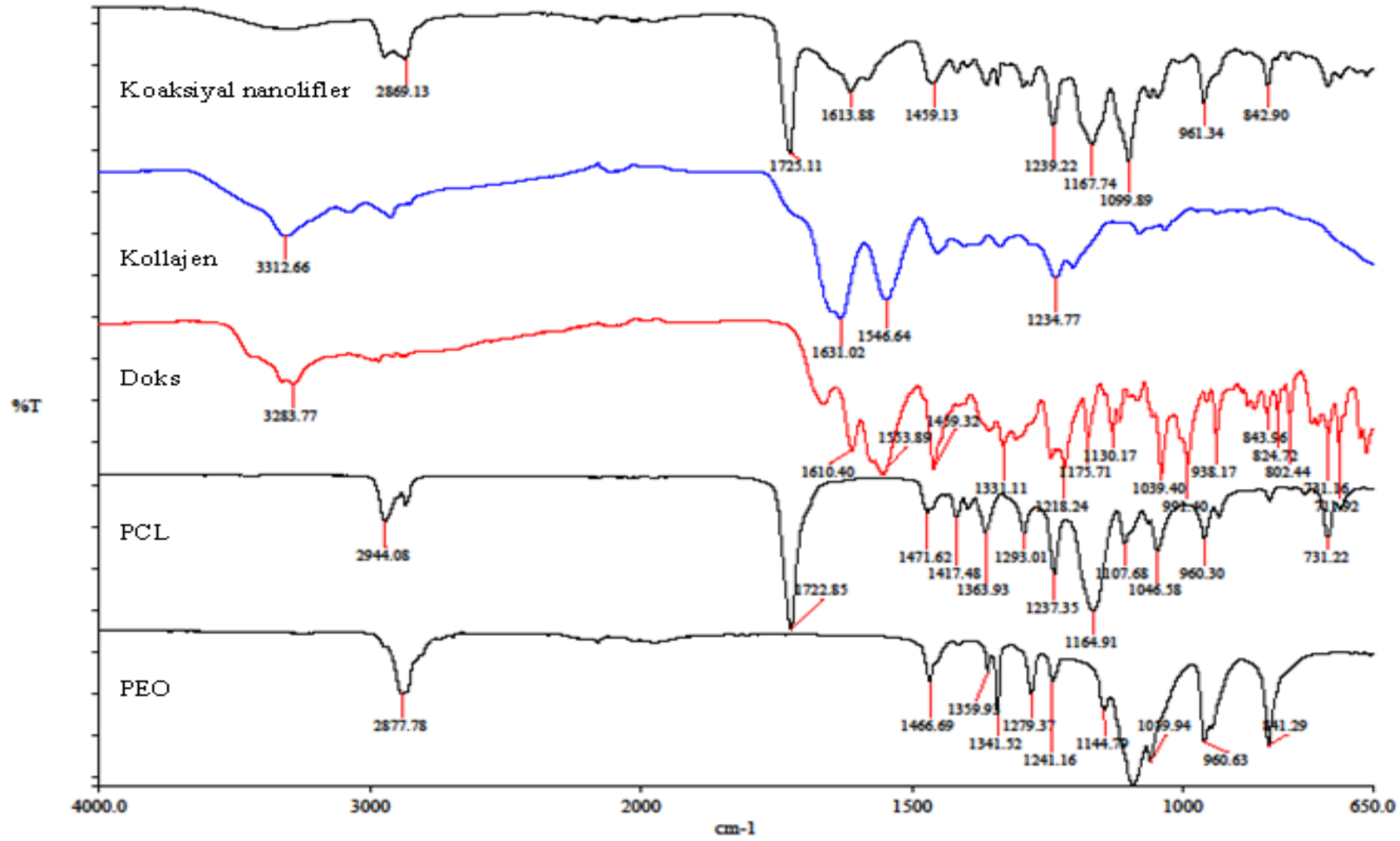


Resim 4.38. Paralel yerleşimli PEO-SA1 nanoliflerinin SEM görüntüsü (A:12000x, B:50000x)

4.3. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1. FT-IR çalışması

Bölüm 3.5.1’de belirtildiği gibi koaksiyal nanoliflerin yapısının araştırılması amacıyla yapılan FT-IR analizinde elde edilen spektrum Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. A22 formülasyonunun, etkin maddenin ve polimerlerin IR spektrumları

4.3.2. Ortalama lif çapının hesaplanması

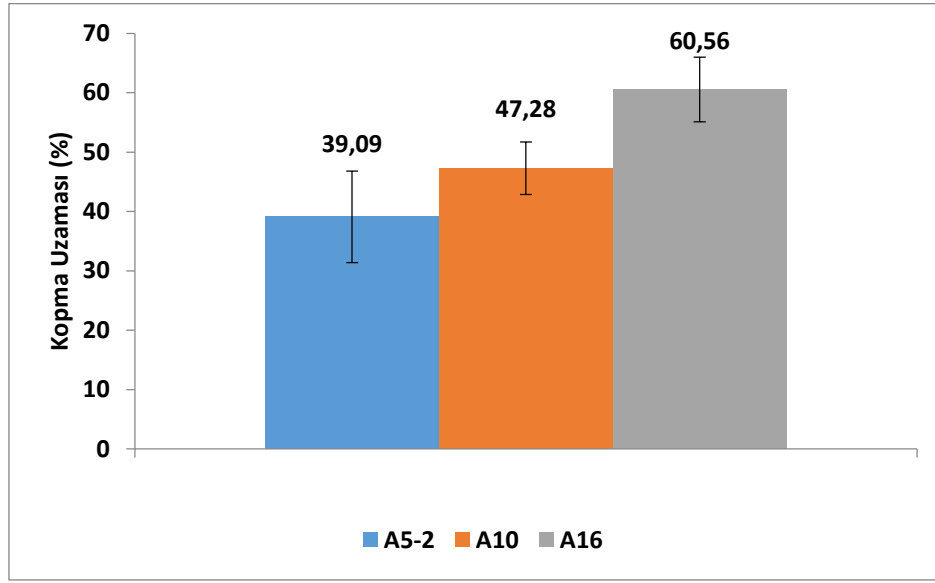
Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi ImageJ programı kullanılarak formülasyonların nanolif çapları hesaplanarak Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Hazırlanan formülasyonların ortalama lif çapları

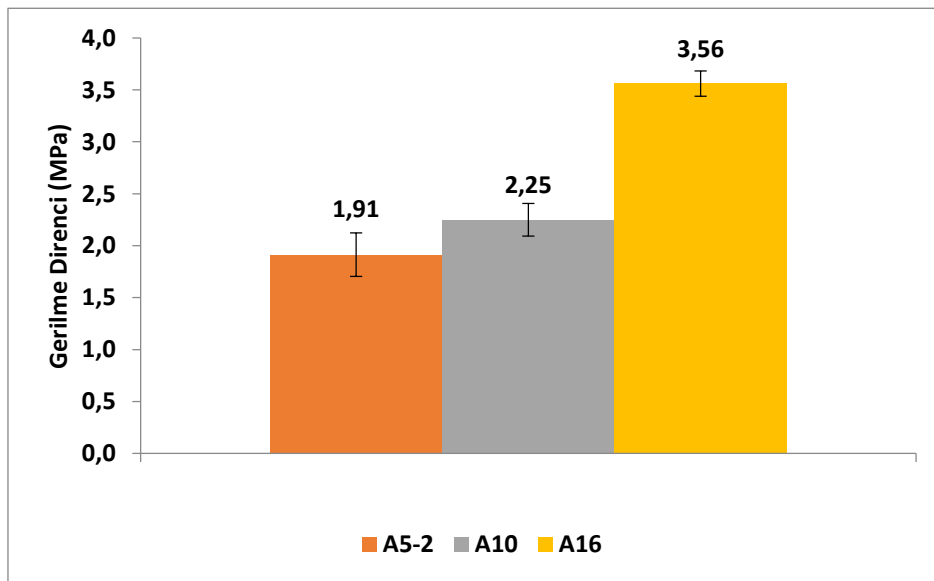
Formülasyon Kodu	PCL konsantrasyonu (%)	Kollajen konsantrasyonu (%)	Çekirdek/Kabuk polimer çöz. akış hızı (ml/saat)	Ortalama Çap (nm)
A5-2	5	1,5	0,25/0,35	393
A6	5	2	0,25/0,35	540
A7	5	2	0,25/0,25	602
A8	5	2,5	0,25/0,35	776
A9	5	2,5	0,25/0,25	568
A10	5	3	0,25/0,35	576
A11	5	3	0,25/0,25	498
A12	5	3,5	0,25/0,35	1033
A13	5	3,5	0,25/0,25	564
A14	5	4	0,25/0,35	705
A15	5	4	0,25/0,25	913
A16	5	4,5	0,25/0,35	817
A17	5	4,5	0,25/0,25	694
A18	5	5	0,25/0,35	734
A19	5	5	0,25/0,25	600
A22	2	4,5	0,25/0,35	452
A23	1,5	4,5	0,25/0,35	420
A24	1	4,5	0,25/0,35	380

4.3.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi

Formülasyonların mekanik özellikleri Bölüm 3.5.3’de belirtildiği gibi yapıldı. PCL miktarı sabitken kollajen konsantrasyonunun artışının nanoliflerin mekanik özellikleri üzerine etkileri Şekil 4.7 ve 4.8’de gösterilmiştir.

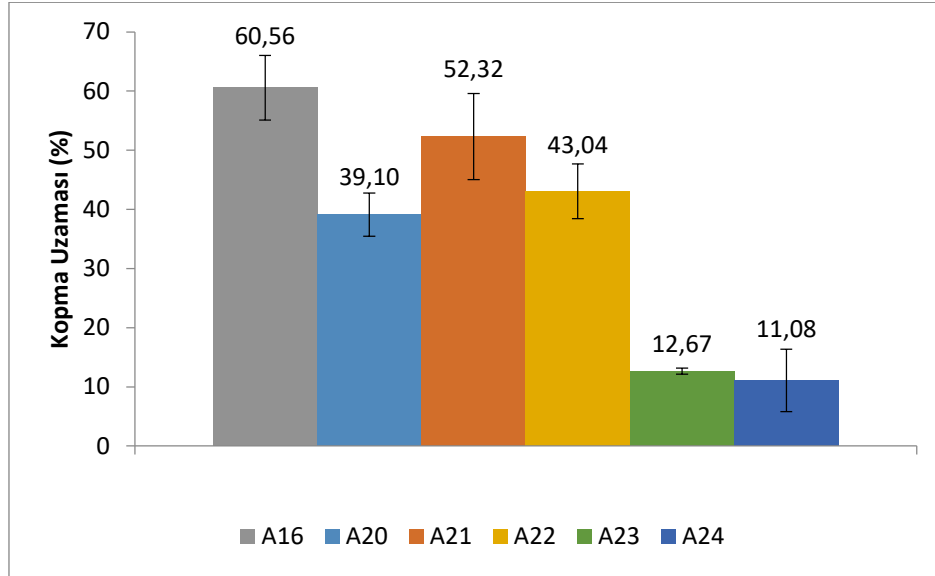


Şekil 4.7. Farklı kollajen konsantrasyonlarında kopma uzamasındaki değişim (A5-2 %1,5; A10 %3 ve A16 %4,5 kollajen içermektedir)

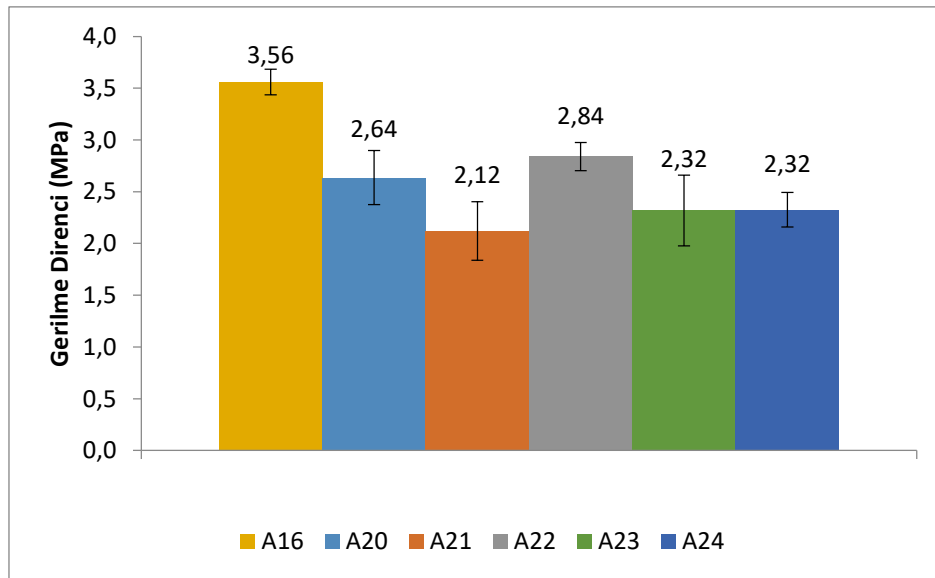


Şekil 4.8. Farklı kollajen konsantrasyonlarında gerilme direncindeki değişim (A5-2 %1,5; A10 %3 ve A16 %4,5 kollajen içermektedir)

Kollajen konsantrasyonu %4,5'ta sabitken farklı PCL konsantrasyonlarında hazırlanan formülasyonların mekanik özellikleri Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı PCL konsantrasyonlarında kopma uzamasındaki değişim (A16 %5; A20 %4; A21 %3; A22 %2; A23 %1,5; A24 %1 PCL içermektedir)

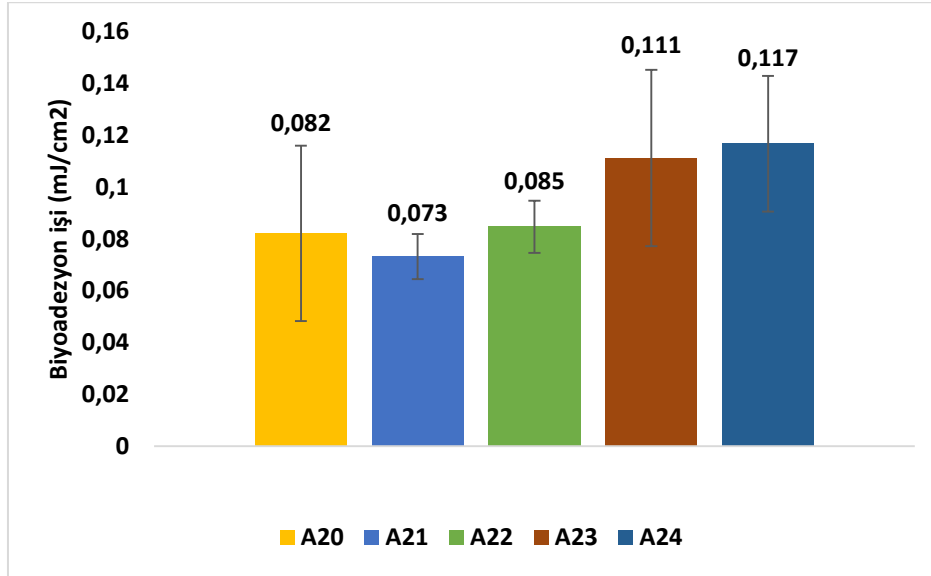


Şekil 4.10. Farklı PCL konsantrasyonlarında gerilme direncindeki değişim (A16 %5; A20 %4; A21 %3; A22 %2; A23 %1,5; A24 %1 PCL içermektedir)

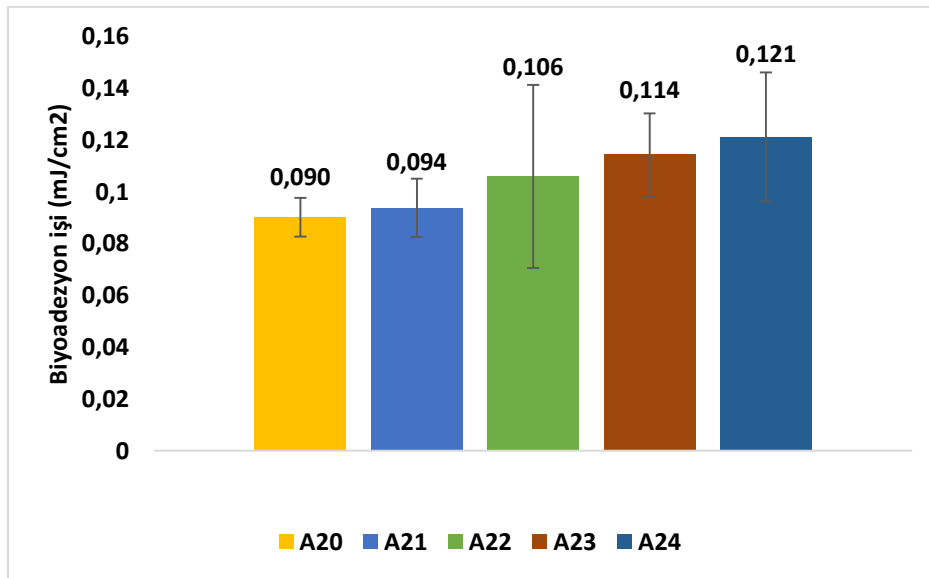
4.3.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi

Yapışma özelliklerinin incelenmesi çalışmaları Bölüm 3.5.4'te belirtildiği şekilde yapıldı. PCL konsantrasyonunun nanoliflerin yapışma özellikleri üzerine etkilerini araştırmak

amacıyla derinin iç ve dış kısmında yapılan çalışmalarda elde edilen veriler Şekil 4.11 ve 4.12’de gösterilmiştir.



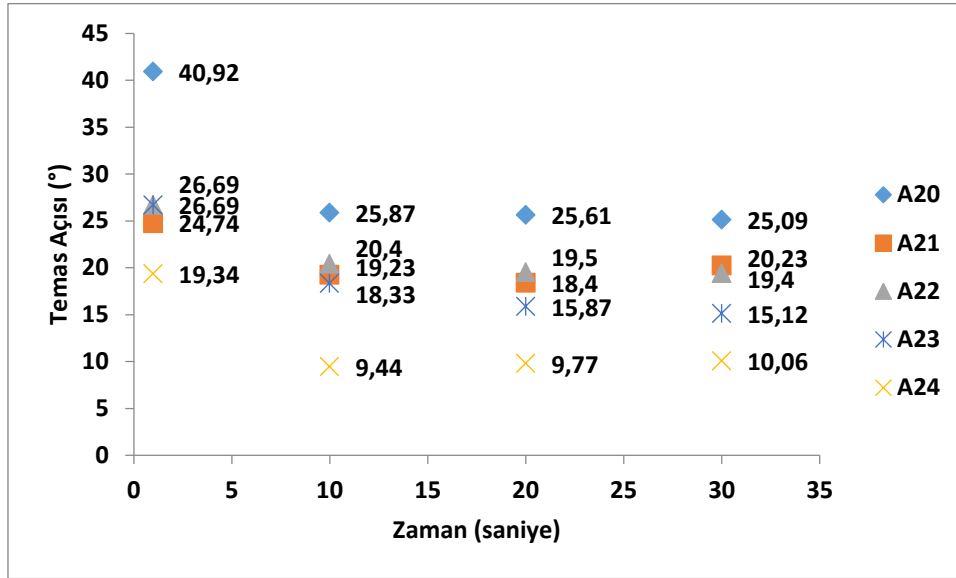
Şekil 4.11. Farklı PCL konsantrasyonlarının derinin iç kısmına yapışma özellikleri üzerine etkileri (A20 %4; A21 %3; A22 %2; A23 %1,5; A24 %1 PCL içermektedir)



Şekil 4.12. Farklı PCL konsantrasyonlarının derinin dış kısmına yapışma özellikleri üzerine etkileri (A20 %4; A21 %3; A22 %2; A23 %1,5; A24 %1 PCL içermektedir)

4.3.5. Temas açılarının ölçülmesi

Hazırlanan nanoliflerin temas açısı ölçümleri Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı gibi yapıldı. Çalışmalarda PCL konsantrasyonundaki (A20, A21, A22, A23, A24) değişimin nanoliflerin temas açısı üzerine etkileri araştırıldı (Şekil 4.13).

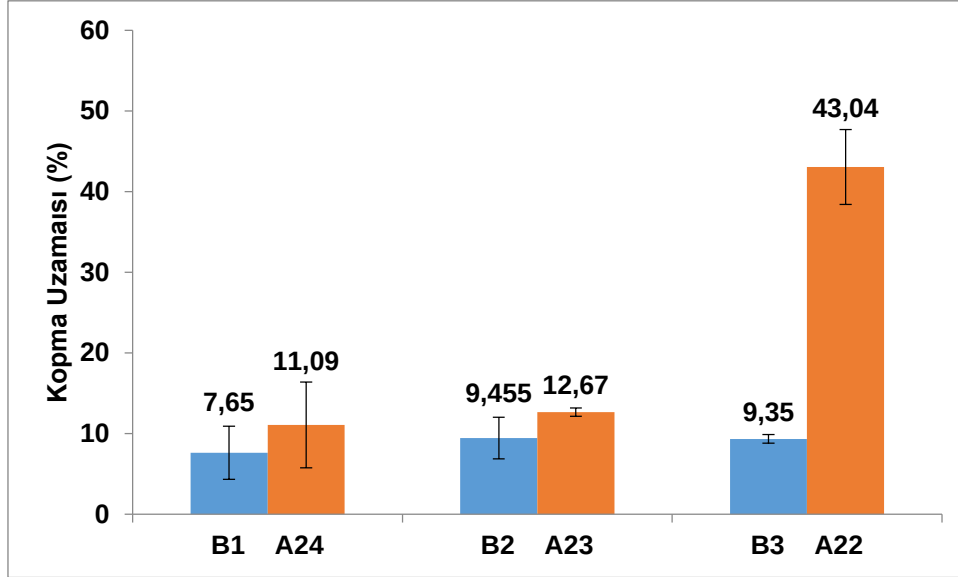


Şekil 4.13. Farklı PCL konsantrasyonlarının temas açısı özellikleri üzerine etkileri (A20 %4; A21 %3; A22 %2; A23 %1,5; A24 %1 PCL içermektedir)

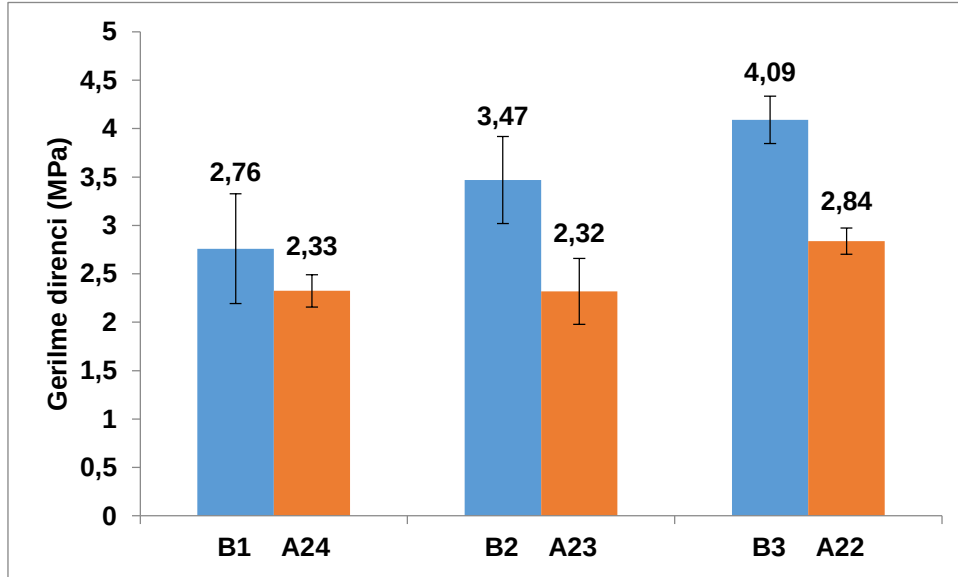
4.4. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.4.1. Mekanik özelliklerin incelenmesi

%2, %1,5 ve %1 PCL içeren formülasyonların (A22, A23, A24) kitozan ve aljinat nanolifleri ile birlikte (B1, B2, B3) hazırlandığında mekanik özellikleri incelenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15).



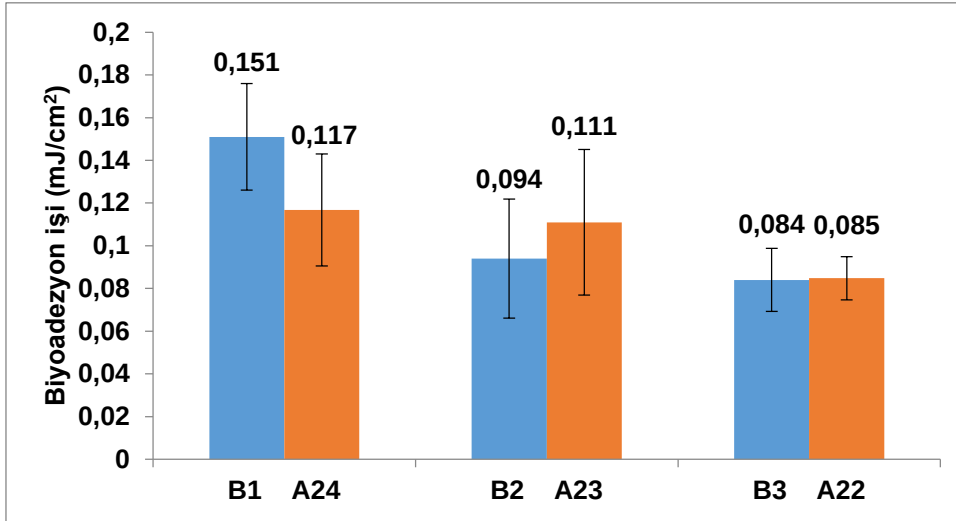
Şekil 4.14. Farklı PCL oranlarında hazırlanmış formülasyonların kopma uzamasındaki değişim



Şekil 4.15. Farklı PCL oranlarında hazırlanmış formülasyonların gerilme direncindeki değişim

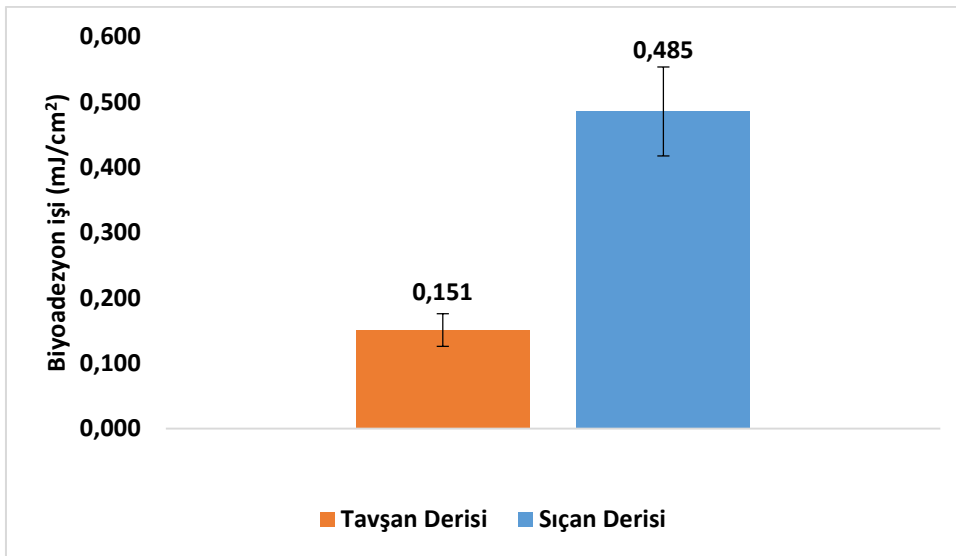
4.4.2. Yapışma özelliklerinin incelenmesi

B1, B2 ve B3 formülasyonlarının yapışma özelliklerinin incelenmesi çalışmaları Bölüm 3.5.4'te belirtildiği şekilde yapıldı. Bu çalışmalarda elde edilen veriler Şekil 4.16 ve 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Farklı PCL konsantrasyonlarındaki formülasyonların derinin iç kısmına yapışma özellikleri

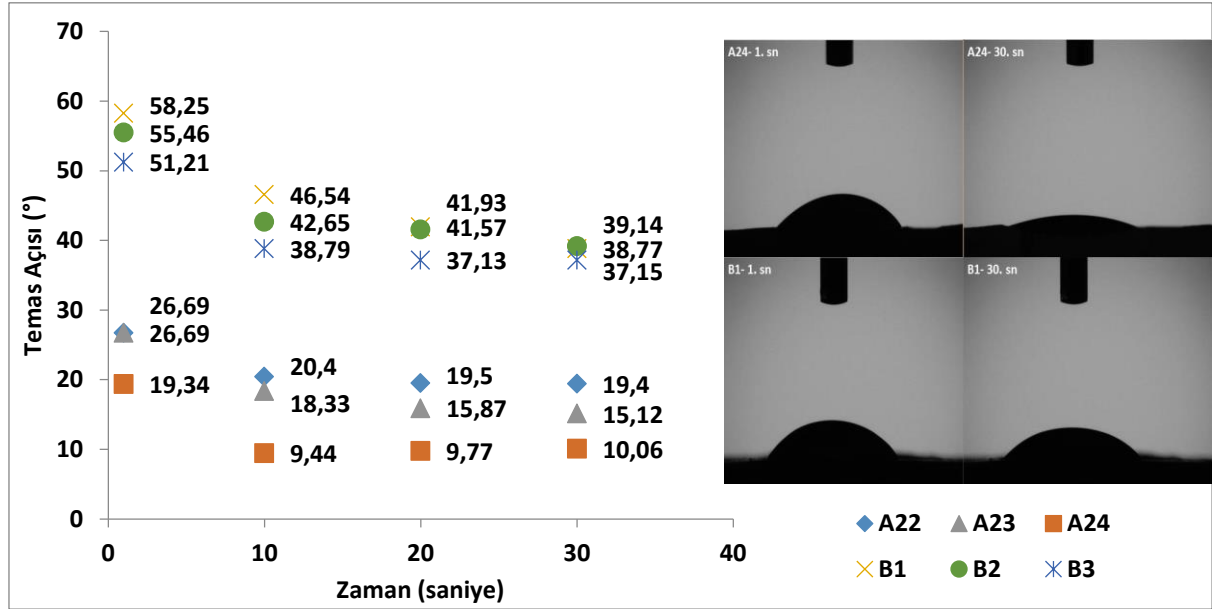
Sonuç formülasyon olarak seçilen B1 formülasyonunun sıçan derisi ve tavşan derisi ile yapılan karşılaştırmalı yapışma deneyi sonuçları Şekil 4.17’te gösterilmiştir



Şekil 4.17. B1 formülasyonunun tavşan ve sıçan derisinin iç kısmına yapışma özelliklerinin karşılaştırılması

4.4.3. Temas açılarının ölçülmesi

B1, B2, B3 formülasyonlarının temas açısı değerleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir.

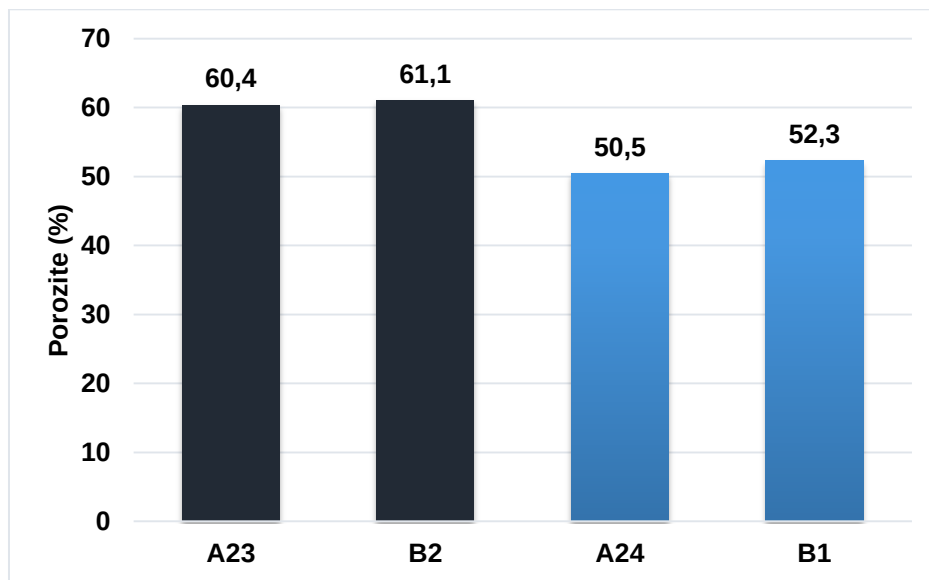


Şekil 4.18. %1, %1,5 ve %2 oranında PCL içeren B1, B2 ve B3 formülasyonlarının temas açısı ölçümleri

4.5. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

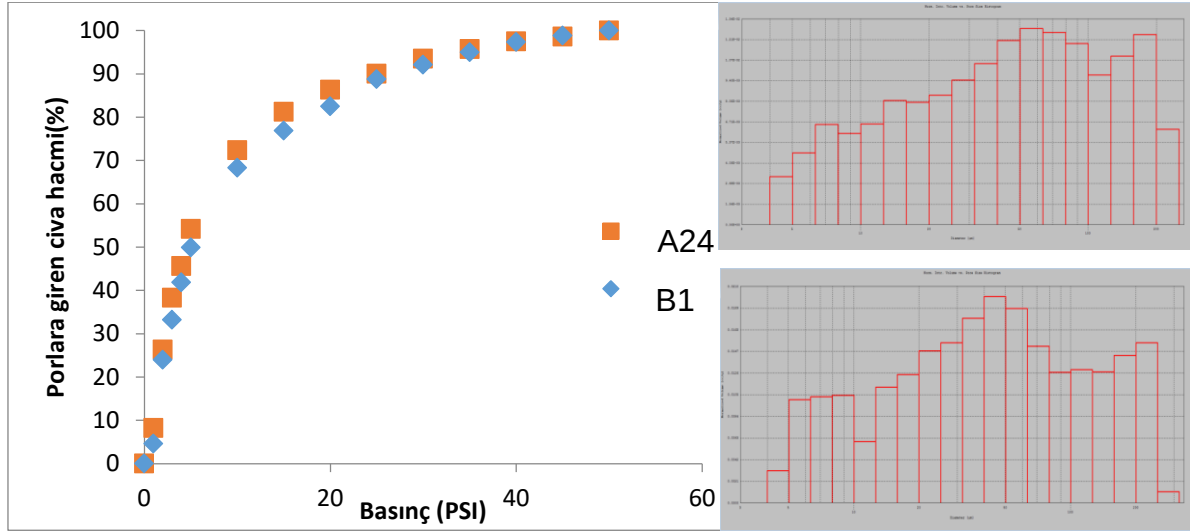
4.5.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri

ImageJ programı ile SEM görüntülerinden elde edilen verilerle hesaplanan porozite verileri Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

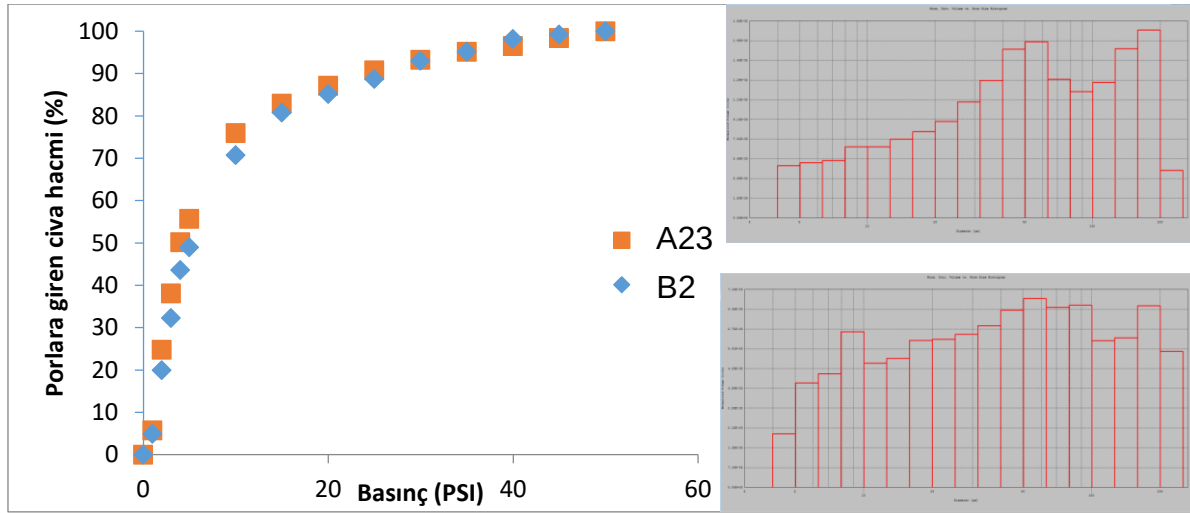


Şekil 4.19. ImageJ programı kullanılarak hesaplanan porozite değerleri

Düşük basınçlı civa porozimetrisinde yapılan por çapı dağılımı ölçümleri sonuçları Şekil 4.20 ve 4.21’de gösterilmiştir.



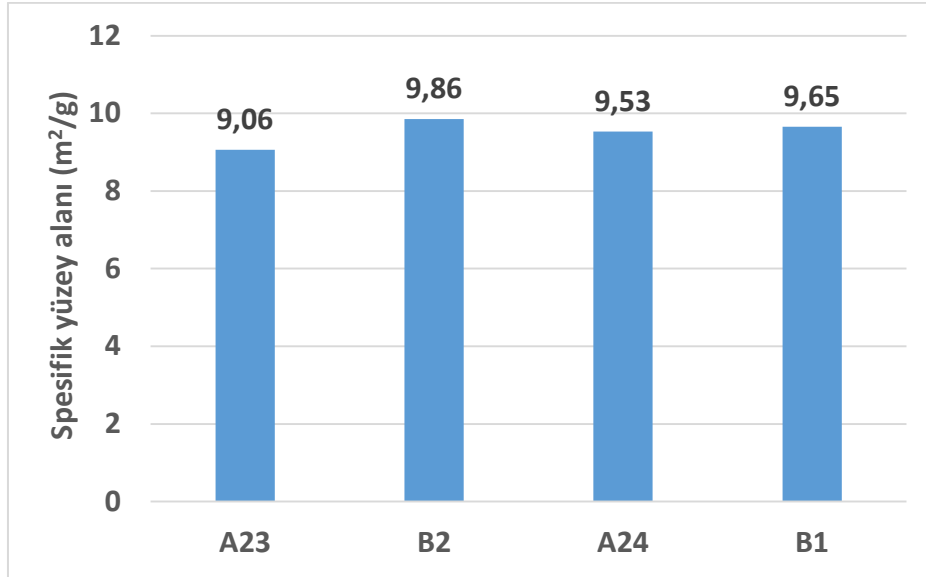
Şekil 4.20. A24 ve B1 formülasyonlarının por çapı dağılımı ölçüm grafiği



Şekil 4.21. A23 ve B2 formülasyonlarının por çapı dağılımı ölçüm grafiği

4.5.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri

BET analizi ile Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı gibi yapılan spesifik yüzey alanı ölçümleri sonuçları Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. A23, A24, B1 ve B3 formülasyonlarının çok noktalı BET analizi sonuçları

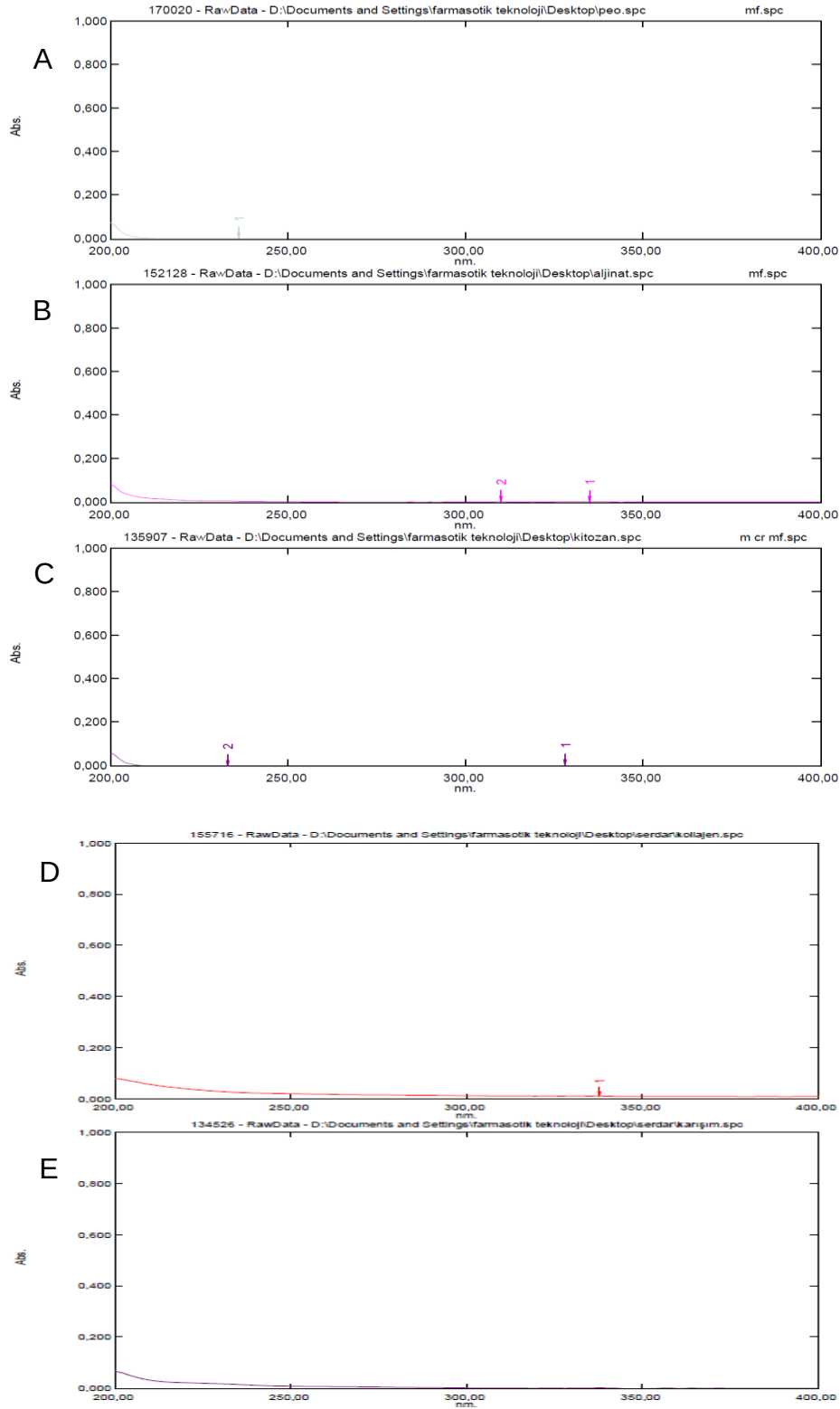
4.5.3. Doksisiklinin miktar tayini yöntem validasyonu

Seçicilik çalışmaları

Bölüm 3.7.3’de anlatıldığı gibi yapılan çalışmada PEO, aljinat ve kitozan çözeltilerinin 400-200 nm arasında herhangi bir pik vermediği görüldü (Şekil 4.23).

Stacked Spectrum Graph Report

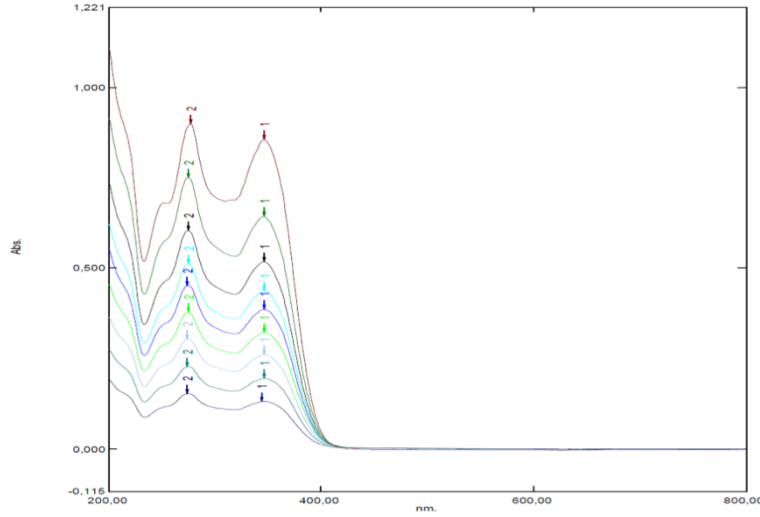
06.06.2014 16:14:49



Şekil 4.23. Seçicilik çalışmalarında elde edilen spektrumlar (A: PEO, B:Sodyum aljinat, C:Kitozan, D:Kollajen, E:Polimerlerin karışımı)

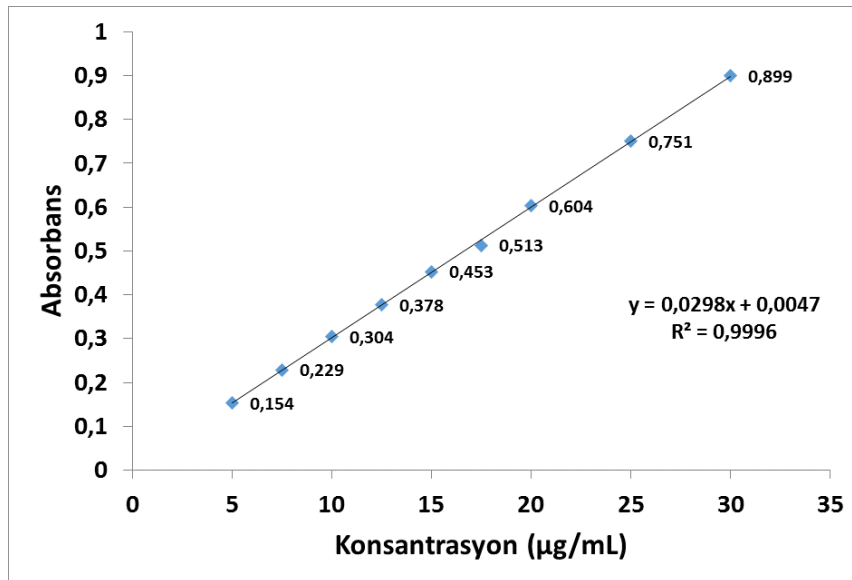
Doğrusallık çalışması

Doksisiklinin UV’de yapılan spektrum taramasında 274 ve 346 nm’de iki farklı pik verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda (5-30 µg/ml) hazırlanan doksisiklin çözeltilerinin UV spektrumları

Bunlardan 346 nm’deki dalga boyunun kalibrasyon grafiğinin r^2 değeri daha yüksek bulunduğu için bu değerin kullanılmasına karar verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (5-30 µg/ml) hazırlanmış çözeltilerin UV absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Doksisiklin miktar tayini yöntemi doğrusallık çalışması

Geri elde çalışmaları

Üç farklı derişimdeki stok çözeltisinin absorbansı 346 nm’de 3 kez ölçüldü ve kalibrasyon denkleminde bulunan değerlerle karşılaştırıldı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan doksisisiklin çözeltilerinin geri elde çalışması sonuçları

	Çözeltildeki Doksisisiklin Miktarı (mg/l)	Hesapla Bulunan Doksisisiklin Miktarı (mg/l)	Bağıl Hata (%)
%80	16	16,0	0,231
%100	20	20,3	1,29
%120	24	24,4	1,47

Tekrarlanabilirlik çalışmaları

Doksisisiklinin deneyiçi ve deneylerarası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.6 ve 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Deney içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek No	Doksisisiklin Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/l)	Hesapla Bulunan Derişim (mg/l)
1	20	20,3
2	20	20,1
3	20	20,3
4	20	20,2
5	20	20,3
6	20	20,4
7	20	20,0
8	20	20,1
9	20	20,2
10	20	20,3
	Ortalama	20,2
	Standart Sapma	0,1
	Bağıl Sapma	0,602

Çizelge 4.7. Deneyler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

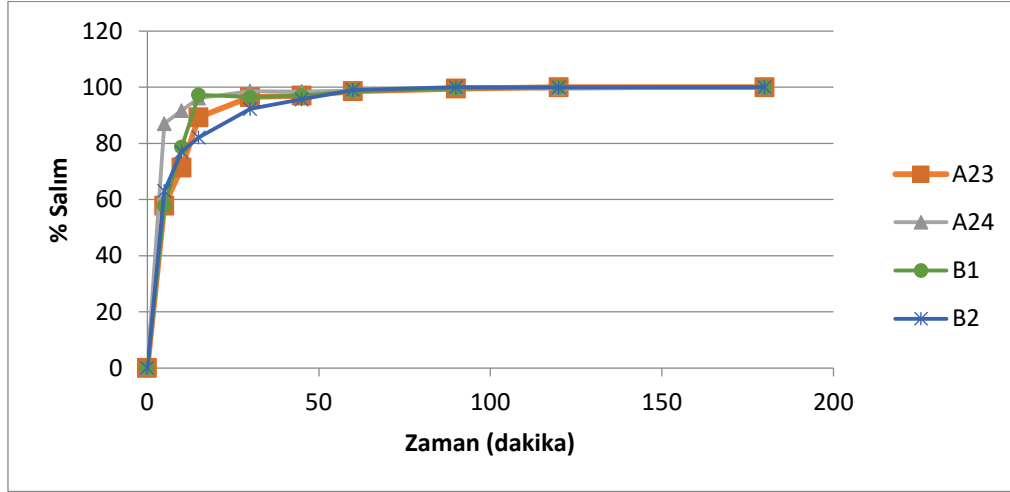
Örnek No	1.Gün Doksisiklin Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/l)	2.Gün Doksisiklin Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/l)	3.Gün Doksisiklin Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/l)
1	20,1	20,1	20,3
2	20,1	20,2	20,4
3	20,2	20	20,2
4	20,1	20,4	20,3
5	20	20,3	20,3
6	20,2	20,1	20,4
7	20,2	20,1	20,1
8	20,1	20,4	20,3
9	20,1	20	20,3
10	20,2	20,1	20,2
Ortalama	20,1	20,2	20,3
Standart Sapma	0,1	0,2	0,1
Bağıl Sapma	0,335	0,741	0,453

Duyarlılık ve saptama sınırı

Doksisiklinin UV miktar tayini yönteminin algılama sınırı (Limit of Detection) ve kantitatif ölçme sınırı (Limit of Quantificative Measurement) hesaplamaları bölüm 3.7.3'teki denklemler kullanılarak hesaplandı. Buna göre yöntemin algılama sınırı 0,577 µg/ml, kantitatif ölçme sınırı 1,749 µg/ml olarak hesaplandı.

4.5.4. Doksisisiklin salım hızı çalışmaları

Doksisisiklin salım hızı çalışmaları Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Doksisisiklinin yara örtülerinden salım profilleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.

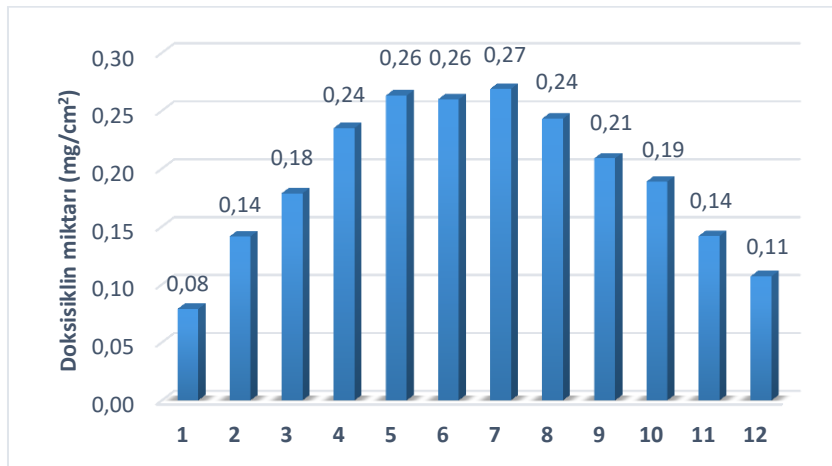


Şekil 4.26. Farklı formülasyonlardan doksisisiklinin salım grafikleri

4.6. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.6.1. Miktar tayini çalışmaları

Doksisisiklinin miktar tayini çalışmaları sonucunda etkin maddenin alüminyum folyo üzerinde 3 cm'lik bir bölgede homojen dağıldığı tespit edildi (Şekil 4.27). Orta kısımdaki 3 cm'lik bu bölgede doksisisiklin miktarı $260 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulunmuştur.

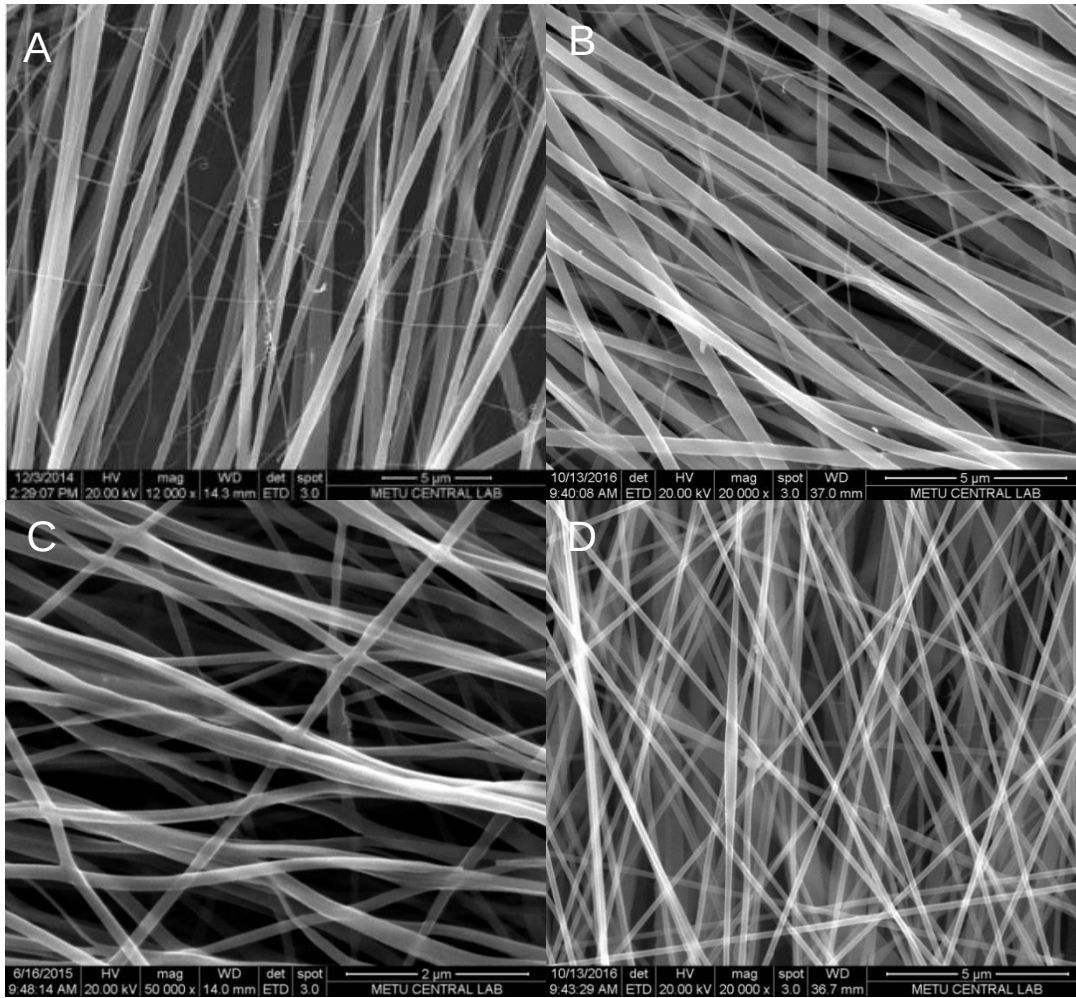


Şekil 4.27. Miktar tayini çalışmasında elde edilen veriler

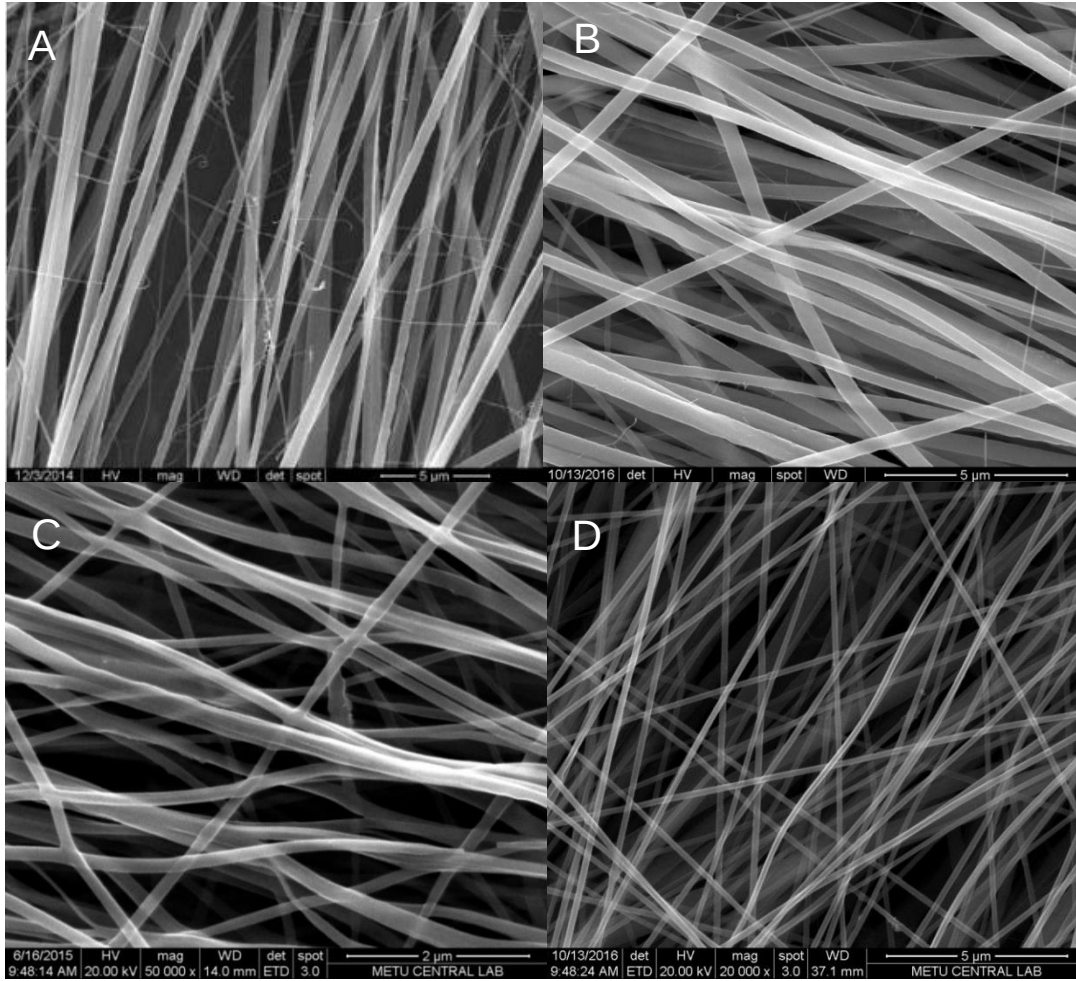
4.6.2. UV sterilizasyon çalışmaları

Bölüm 3.8.2’de belirtildiği gibi yapılan çalışmalarda 1 saatlik UV sterilizasyonu yapılan numunelerin hem tiyogallat ve hem de soya-kazein besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra 5. günde üreme görülmüştür. Ancak 2 ve 3 saatlik UV sterilizasyonu yapılan numunelerde 14 gün boyunca üreme olmadığı saptanmıştır.

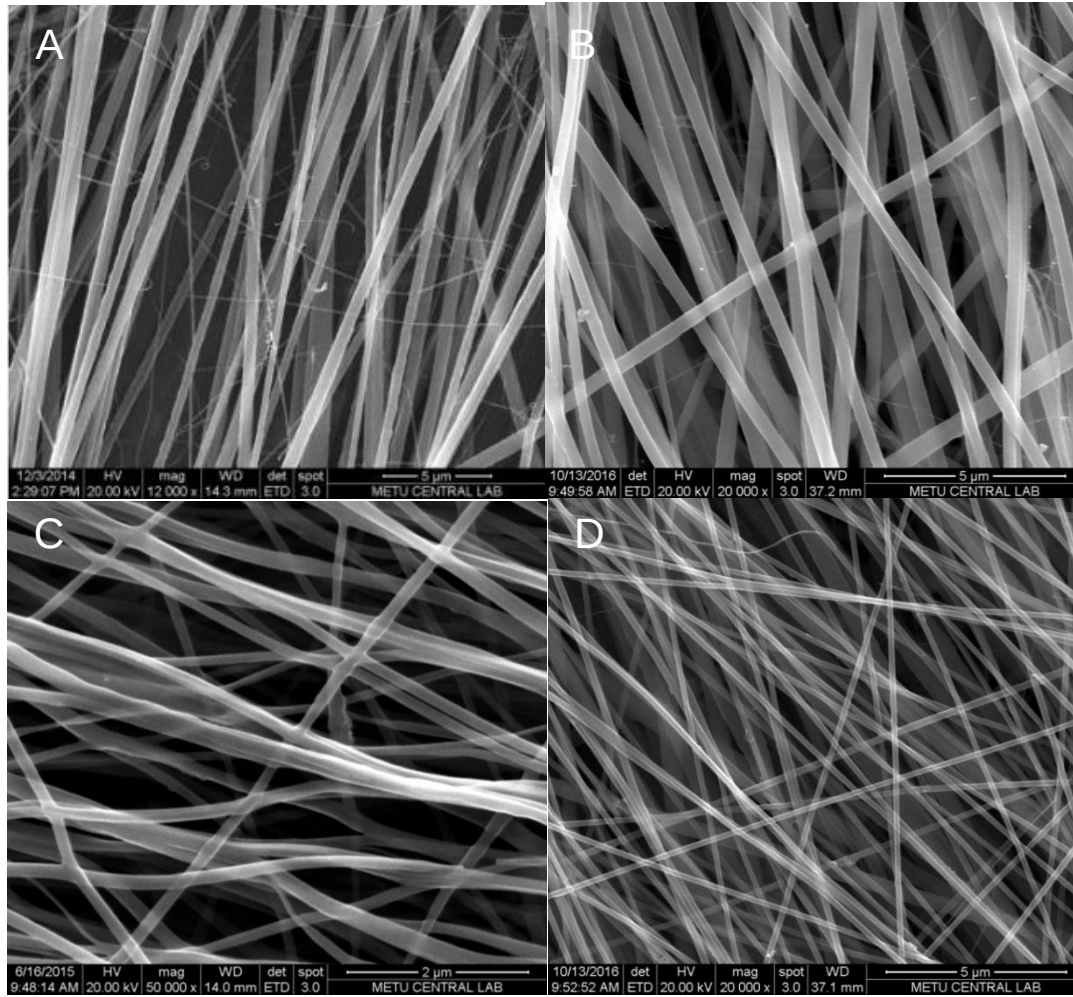
Farklı sterilizasyon sürelerinin nanoliflerin morfolojileri üzerine etkilerini araştırmak amacıyla alınan SEM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Resim 4.39-4.41).



Resim 4.39. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 1 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (A: Sterilizasyon öncesi koaksiyal nanolifler,12000x; B: Sterilizasyon sonrası koaksiyal nanolifler,20000x; C: Sterilizasyon öncesi sodyum aljinat nanolifleri, 50000x; D: C: Sterilizasyon sonrası sodyum aljinat nanolifleri, 20000x)



Resim 4.40. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 2 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (A: Sterilizasyon öncesi koaksiyal nanolifler,12000x; B: Sterilizasyon sonrası koaksiyal nanolifler,20000x; C: Sterilizasyon öncesi sodyum aljinat nanolifleri, 50000x; D: C: Sterilizasyon sonrası sodyum aljinat nanolifleri, 20000x)



Resim 4.41. B1 formülasyonunun koaksiyal ve sodyum aljinat nanolif yüzeylerinin 3 saat UV sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (A: Sterilizasyon öncesi koaksiyal nanolifler, 12000x; B: Sterilizasyon sonrası koaksiyal nanolifler, 20000x; C: Sterilizasyon öncesi sodyum aljinat nanolifleri, 50000x; D: Sterilizasyon sonrası sodyum aljinat nanolifleri, 20000x)

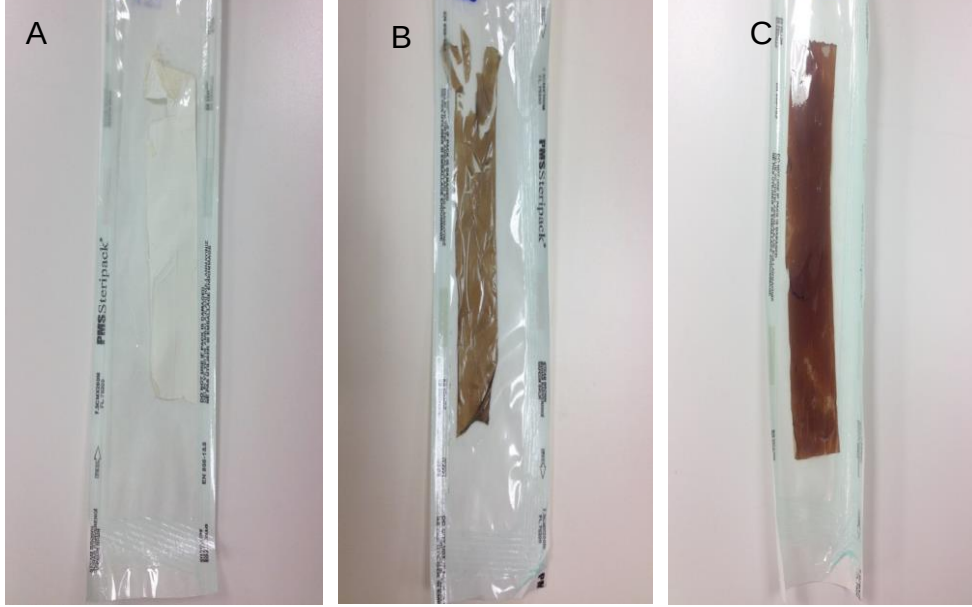
Farklı sterilizasyon sürelerinin nanoliflerin mekanik, yapışma ve temas açısı özellikleri üzerine etkileri Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı sterilizasyon sürelerinin B1 formülasyonu üzerine etkisi

Bir yüzün sterilizasyon süresi (saat)	Kopma uzaması (%)	Gerilme direnci (MPa)	Biyadezyon işi (mJ/cm ²)	Temas açısı (°)	Ortalama lif çapı (nm)	Doks miktarı (%)
Başlangıç	7,65	2,76	0,485	39	380	100
1	8,41	2,54	0,467	37	365	100,2
2	8,34	2,44	0,472	35,8	366	99,1
3	7,84	2,05	0,458	30,5	353	99,1

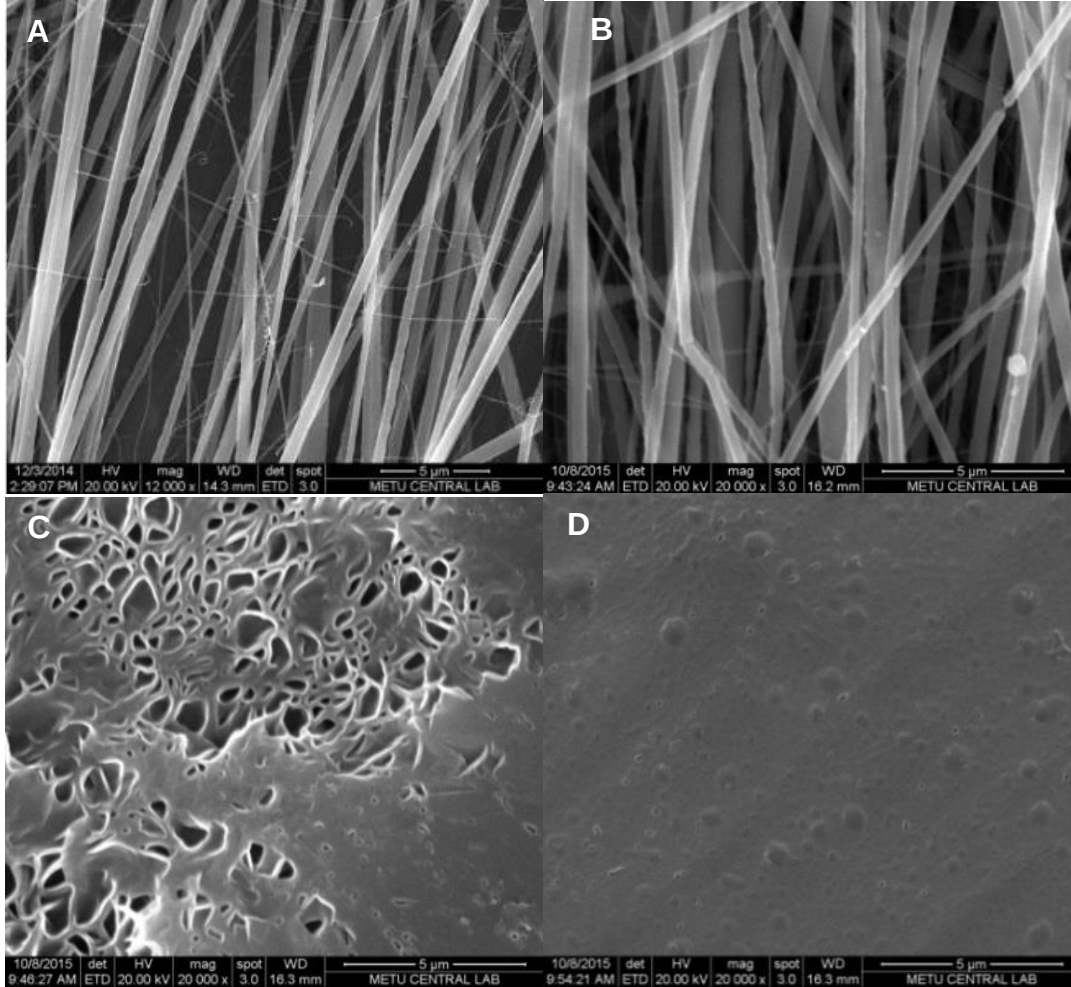
4.6.3. Stabilite çalışmaları

B1 formülasyonunun stabilite çalışmalarında 3. ay sonunda 3 farklı koşulda bekletildikten sonraki görünüşleri Resim 4.42’de görülmektedir.



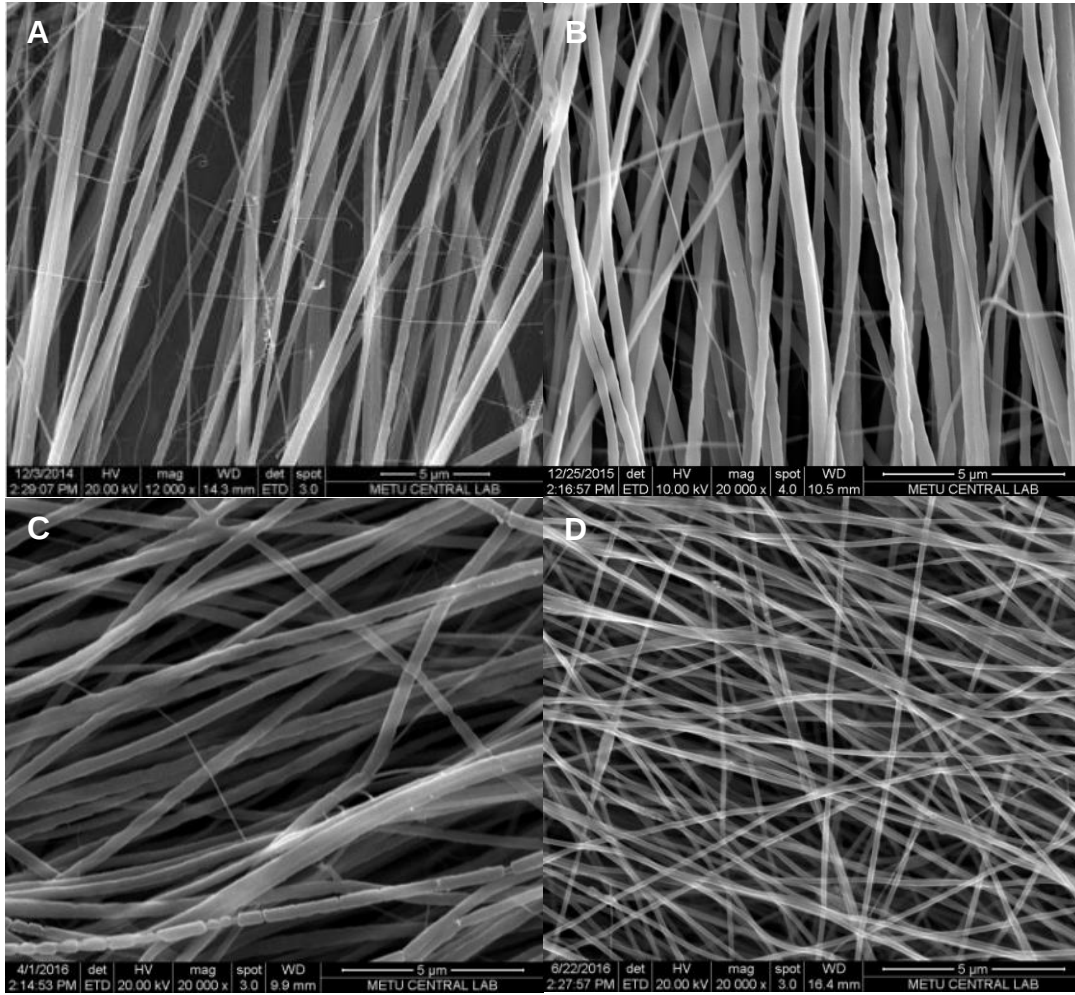
Resim 4.42. Farklı koşullarda bekletilen B1 formülasyonunun 3 ay sonundaki görüntüsü (A: 4°C/ortam nemi, B: 25°C/%60 bağıl nem, C: 40°C/%75 bağıl nem)

3 farklı ortamda bekletilen B1 formülasyonunun 3.ay sonundaki SEM görüntüleri Resim 4.43-4.45’de gösterilmiştir.



Resim 4.43. Farklı ortamlarda bekletilen B1 formülasyonunun 3 ay sonundaki SEM görüntüsü (A: Başlangıç B: 4°C/ortam nemi, C: 25°C/%60 bağıl nem, D: 40°C/%75 bağıl nem) (A:12000x, B,C,D:20000x)

B1 formülasyonunun 4°C/ortam neminde 6., 9. ve 12. ay sonundaki SEM görüntüleri Resim 4.45’deki gibidir.

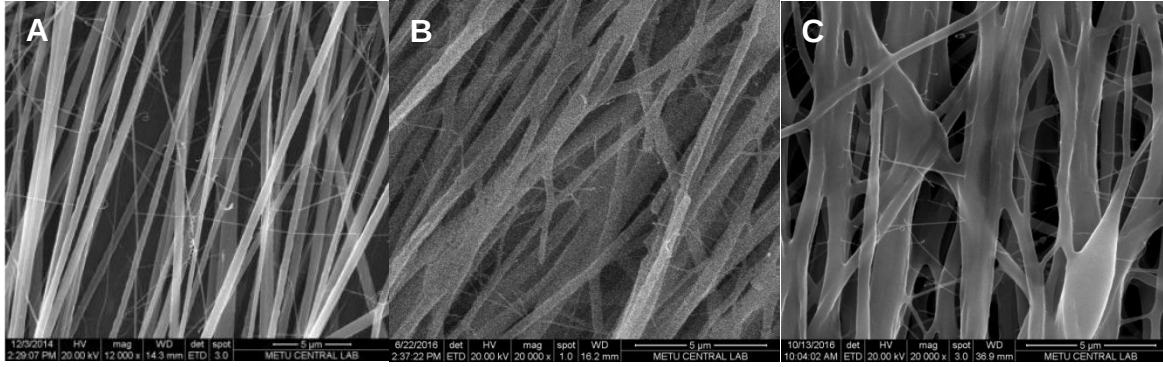


Resim 4.44. 4°C/ortam neminde bekletilen B1 formülasyonunun SEM görüntüleri (A: Başlangıç B:6.ay, C: 9.ay, D: 12.ay) (A:12000x, B,C,D:20000x)

4°C/ortam neminde 12. ay boyunca bekletilen B1 formülasyonunun stabilite test parametrelerine ait bulgular Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. 4°C/ortam neminde bekletilen B1 formülasyonunun stabilite test parametreleri

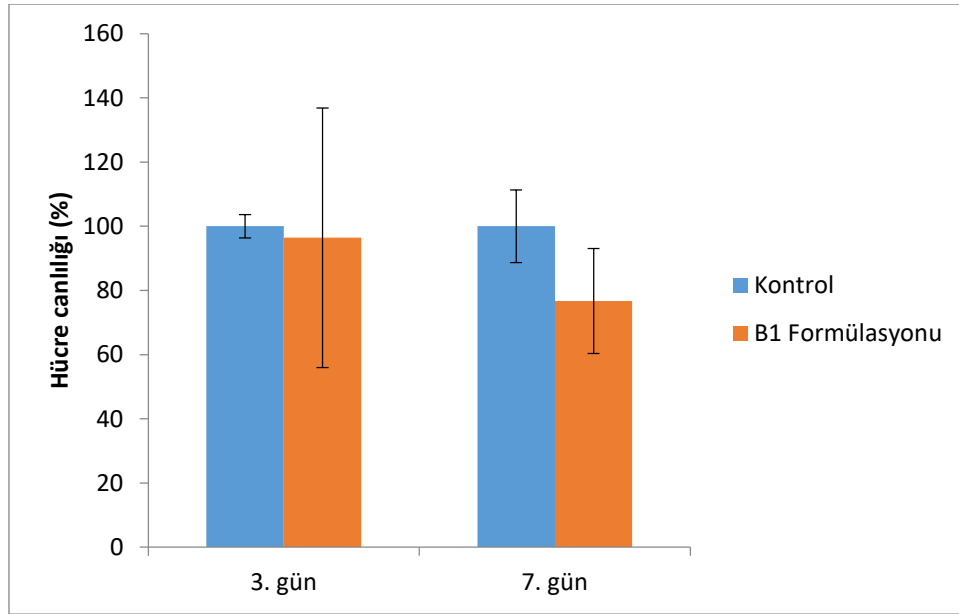
	Kopma uzaması (%)	Gerilme direnci (MPa)	Biyoadesyon iş (mJ/cm ²)	Temas açısı (°)	Miktar tayini (µg/cm ²)	Ortalama lif çapı (nm)
Başlangıç	7,65	2,76	0,485	39,1	259	380
3. ay	9,10	2,64	0,369	39,3	260	348
6. ay	11,18	2,22	0,351	38,7	259	360
9. ay	11,93	2,15	0,406	38,8	257	352
12. ay	10,60	2,20	0,439	37,6	254	260



Resim 4.46. İki kat paketlenmiş B1 formülasyonunun 25°C/%60 bağıl nemde 3 ay ve 6 ay bekleddikten sonra SEM görüntüleri (A: Başlangıç B:3.ay, C: 6.ay) (20000x)

4.6.4. Hücre kültürü çalışmaları

Keratinosit hücre serilerinde yapılan sitotoksosite testlerinde 3. ve 7. günlerde hücre canlılığı kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Elde edilen hücre canlılığı (%) değerleri Şekil 4.28’de gösterilmiştir.

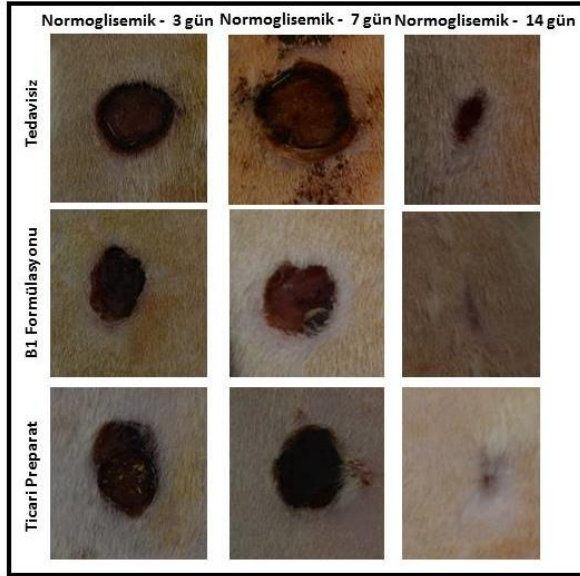


Şekil 4.28. Sitotoksosite çalışması sonuçları

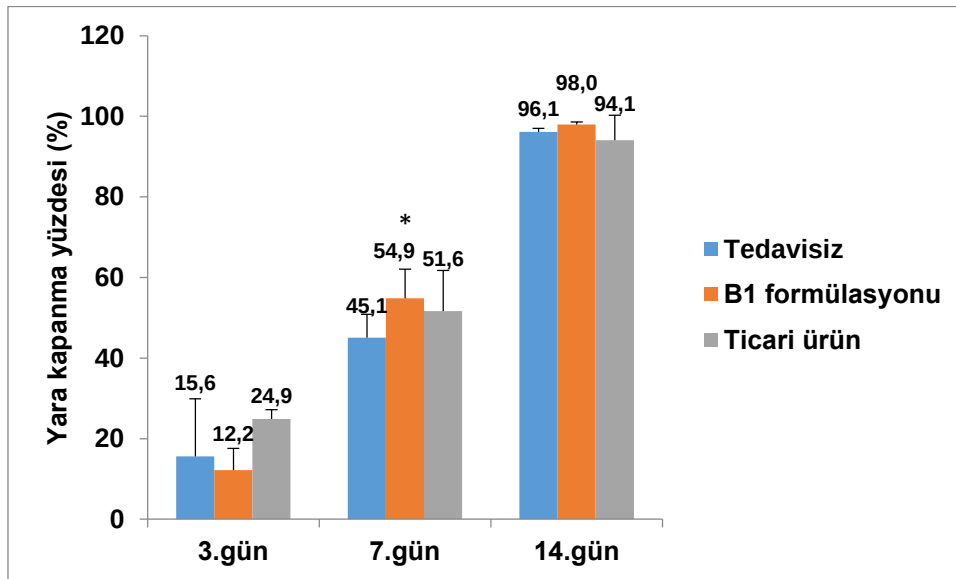
4.7. İn Vivo Deneyler

4.7.1. Yara kapanması denetimi

Normoglisemik sıçan gruplarında farklı günlerde çekilen yara görüntüleri Resim 4.47’de, yara kapanma yüzdeleri Şekil 4.29’da gösterilmiştir.

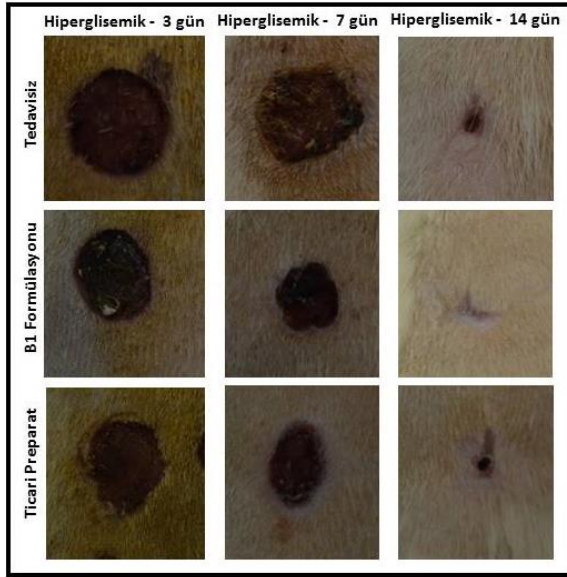


Resim 4.47. Normoglisemik sıçanlara ait yara görüntüleri

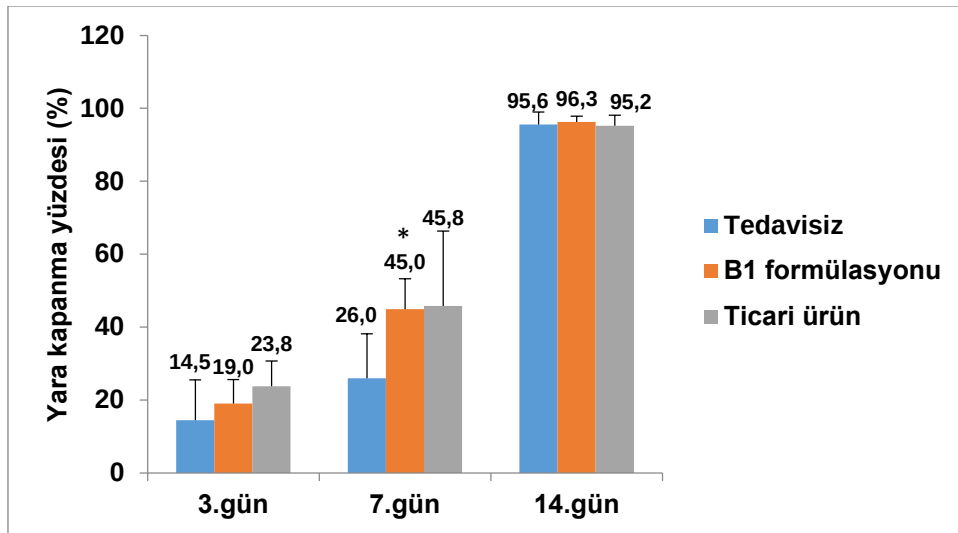


Şekil 4.29. Normoglisemik sıçanlara ait yara kapanması değerleri

Normoglisemik sıçan gruplarında farklı günlerde çekilen yara görüntüleri Resim 4.48’de, yara kapanma yüzdeleri Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



Resim 4.48. Hiperglisemik sıçanlara ait yara görüntüleri



Şekil 4.30. Hiperglisemik sıçanlara ait yara kapanması değerleri

4.7.2. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar

Normoglisemik Gruplar

Normoglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde Bölüm 3.8.6 belirtildiği gibi yapılan MDA, NO, GSH, AA ve SOD tayinleri sonuçları Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Normoglisemik sıçanlara ait biyokimyasal parametreler

Biyokimyasal Parametreler		MDA (nmol/g doku)	NO (μ mol/g doku)	GSH (μ mol/g doku)	AA (mg/g doku)	SOD (U/ml)
Kontrol (n=6)		5,91 $\pm$ 0,96	3,52 $\pm$ 1,46	0,548 $\pm$ 0,229	12,57 $\pm$ 2,61	1,64 $\pm$ 0,13
B1 Formülasyonu Uygulanan Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	13,7 $\pm$ 4,6	15,75 $\pm$ 6,59 ^{a,b}	1,66 $\pm$ 0,53 ^{*,e}	24,17 $\pm$ 4,02 ^b	1,48 $\pm$ 0,37 ^{a,e}
	7.gün (n=6)	7,69 $\pm$ 2,03 ^{b,e}	7,20 $\pm$ 0,20	1,12 $\pm$ 0,47 ^{c,*,e}	20,50 $\pm$ 3,74 ^{c,*,e}	2,18 $\pm$ 0,35 ^c
	14.gün (n=6)	7,55 $\pm$ 2,16 [*]	6,19 $\pm$ 1,84 [*]	1,80 $\pm$ 0,41 [*]	9,99 $\pm$ 2,64 ^{*,e}	1,42 $\pm$ 0,22
Ticari ürün Uygulanan Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	11,6 $\pm$ 3,0	14,38 $\pm$ 2,34 ^b	0,790 $\pm$ 0,298 ^{a,b,d}	20,87 $\pm$ 4,89 ^b	2,10 $\pm$ 0,13 ^d
	7.gün (n=6)	12,7 $\pm$ 2,4 ^d	11,36 $\pm$ 2,83 ^c	1,62 $\pm$ 0,04 ^{*,d}	23,40 $\pm$ 4,77 ^{c,*,e}	1,81 $\pm$ 0,36
	14.gün (n=6)	15,9 $\pm$ 5,6	5,39 $\pm$ 1,04 [*]	1,46 $\pm$ 0,71 [*]	13,35 $\pm$ 1,53 ^d	1,61 $\pm$ 0,26
Tedavisiz Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	9,44 $\pm$ 1,75 ^b	11,16 $\pm$ 2,99	0,815 $\pm$ 0,135 ^{a,d}	18,62 $\pm$ 1,17 ^{a,b}	1,87 $\pm$ 0,23
	7.gün (n=6)	11,1 $\pm$ 1,3 ^c	10,73 $\pm$ 3,61	0,527 $\pm$ 0,045 ^{c,d,e}	12,30 $\pm$ 1,54 ^{d,e}	1,76 $\pm$ 0,30
	14.gün (n=6)	21,7 $\pm$ 7,0 ^d	12,31 $\pm$ 2,11 ^{d,e}	0,726 $\pm$ 0,094 ^{d,e}	13,13 $\pm$ 1,92 ^d	1,74 $\pm$ 0,47

a: p<0,05 Grup içi 3.gün ile 7.gün karşılaştırıldığında

b: p<0,05 Grup içi 3.gün ile 14.gün karşılaştırıldığında

c: p<0,05 Grup içi 7.gün ile 14.gün karşılaştırıldığında

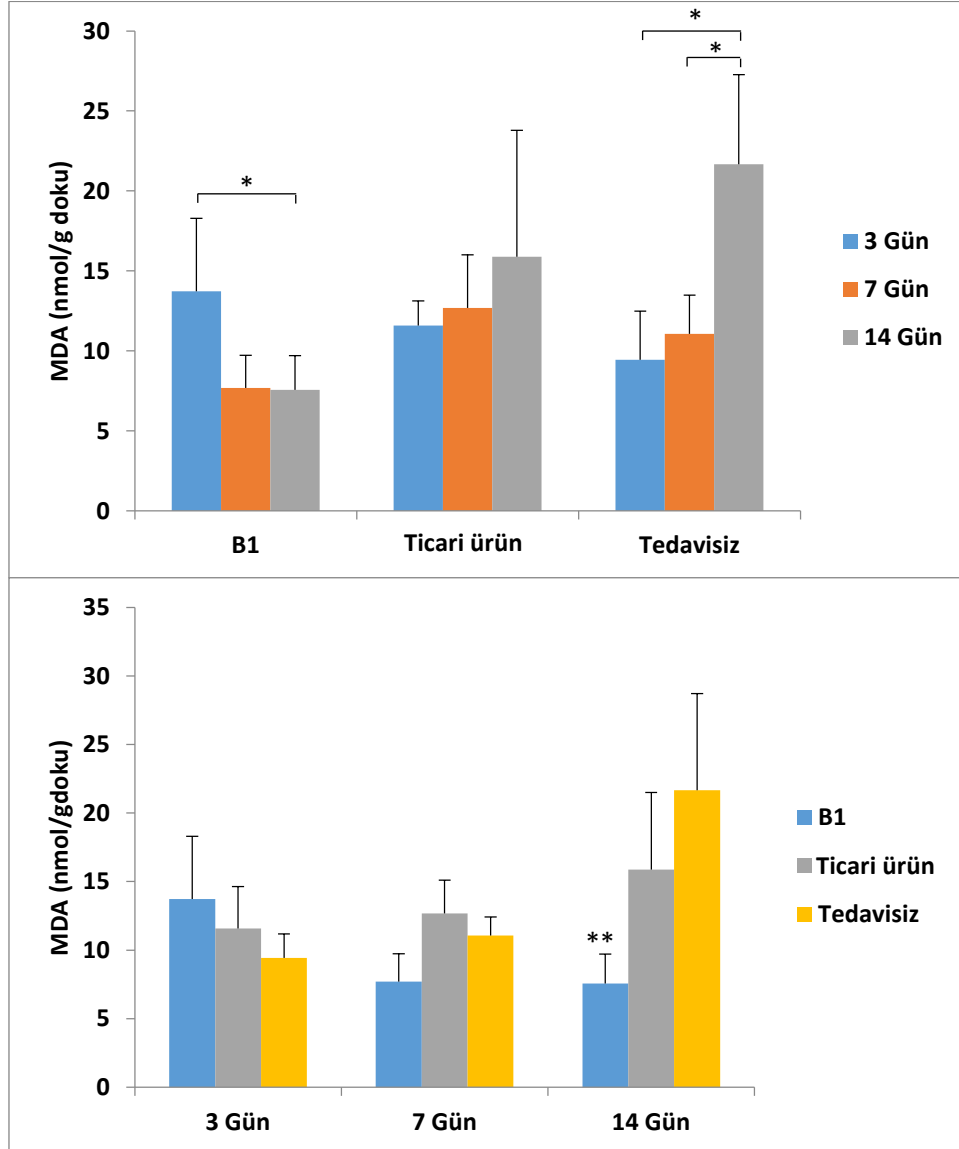
*: p<0,05 Uygulama yapılan grupların tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

d: p<0,05 Uygulama yapılan grupların B1 formülasyonu uygulanan gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

e: p<0,05 Uygulama yapılan grupların ticari ürün uygulanan gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

Yara dokusu MDA düzeyleri

Normoglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen MDA değerleri Şekil 4.31’de gösterilmiştir.

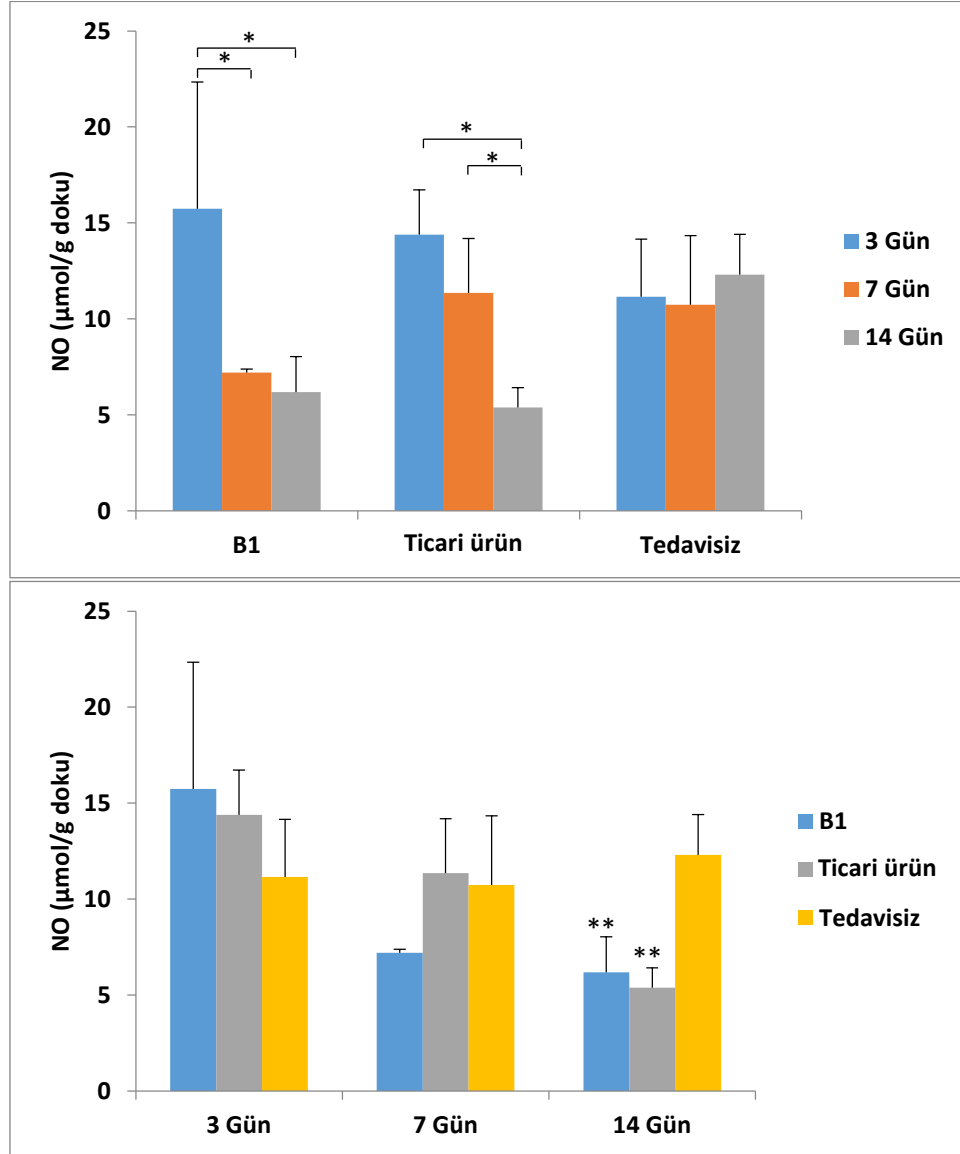


Şekil 4.31. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen MDA değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin 14. günü MDA düzeyleri 3. ve 7. günlere kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında, yara iyileşmesinin 7. ve 14. günlerinde MDA düzeyleri 3. güne göre azalmıştır ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulaması yara iyileşmesinin 14. gününde MDA düzeyini azaltmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde günler bazında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulanan MDA düzeyi 7. günde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Yara dokusu NO düzeyleri

Normoglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen NO değerleri Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

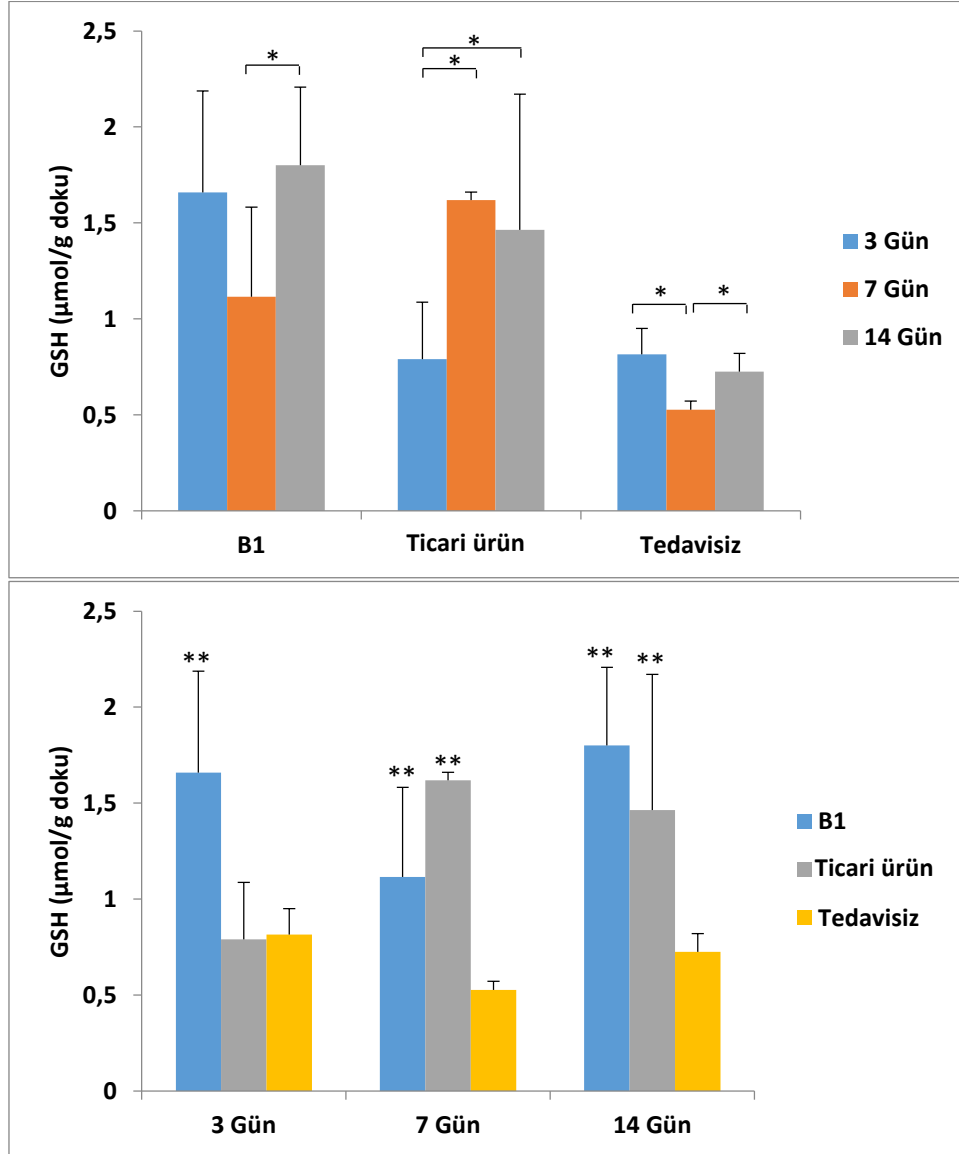


Şekil 4.32. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen NO değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin tüm günlerinde NO düzeyleri bakımından bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin hem 7. günü hem de 14. gününde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$).
- B1 formülasyonu uygulamaları, tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, yara iyileşmesinin 14. gününde tedavisiz gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmaktadır ($p<0.05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında 14. gündeki doku NO düzeyi 3. ve 7. günlere göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).
- B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar günler bazında yara dokusu NO düzeyleri bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı gruplar tedavisiz grup ile karşılaştırıldığında doku NO düzeyinin, sadece 14. günde anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ($p<0.05$).

Yara dokusu GSH düzeyleri

Normoglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen GSH değerleri Şekil 4.33’de gösterilmiştir.

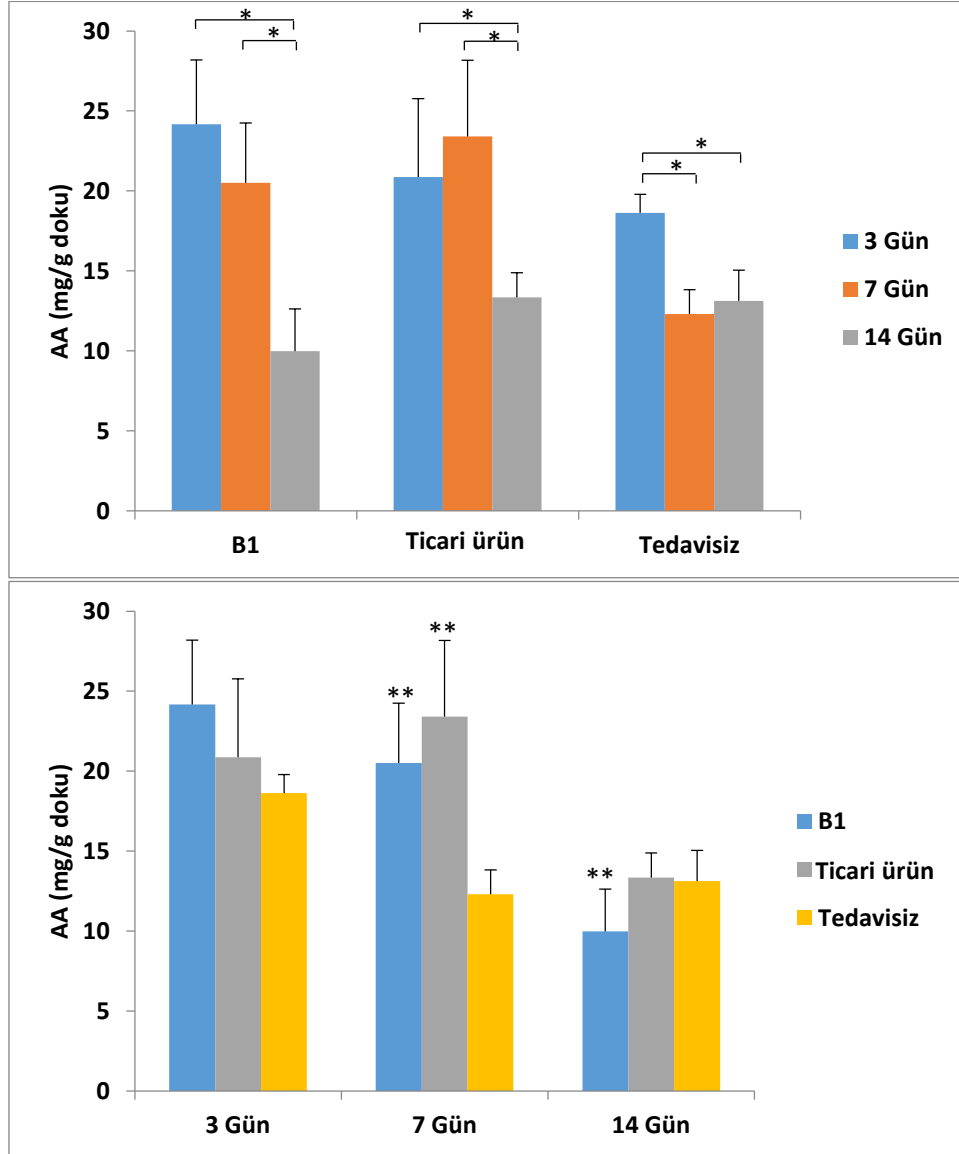


Şekil 4.33. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen GSH değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin 7. gününe ait GSH düzeyleri hem 3. gün hem de 14. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Doku GSH düzeyi yara iyileşmesinin 7. gününde azalmıştır. Kontrol değeri ile aynı düzeye gelmiştir.
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin 7. günü ve 14. günü karşılaştırıldığında, 14. günde GSH düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, 3., 7. ve 14. günlerde GSH düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, GSH düzeyinin hem 7. günde hem de 14. günde 3.güne göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulamasının 7. gününde GSH değerleri diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- Ticari ürün B1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulaması yara iyileşmesinin 3. ve 14. günlerinde GSH düzeylerini piyasa preparatına göre anlamlı olarak artırmaktadır ($p<0,05$).

Yara dokusu AA düzeyleri

Normoglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen AA değerleri Şekil 4.34’de gösterilmiştir.

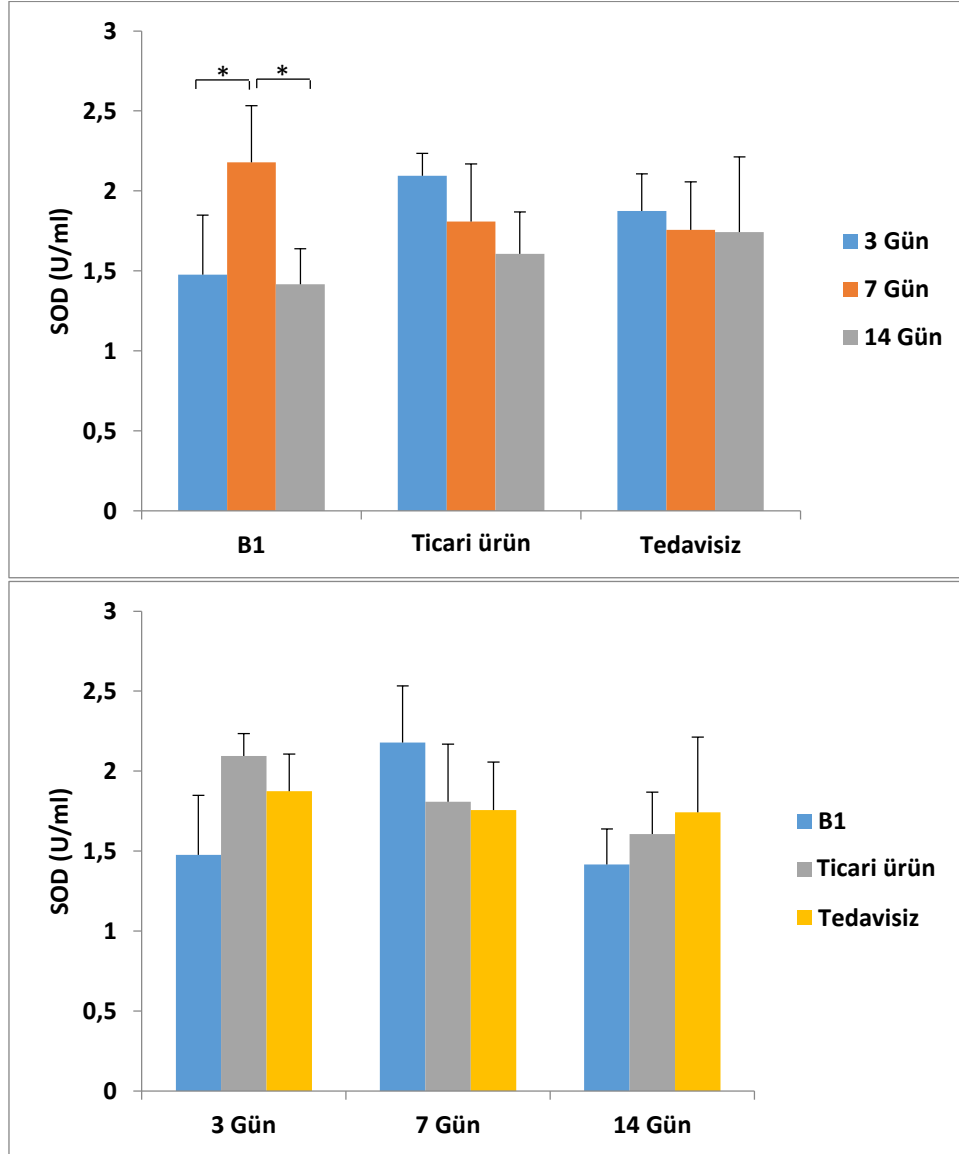


Şekil 4.34. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen AA değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, AA düzeyleri bakımından 7. ve 14. günlerde 3. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmektedir ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında, AA düzeyinin 14. günde, 3. ve 7. günlere kıyasla azalmış olduğu görülmektedir ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan grup, tedavisiz gruplarla karşılaştırıldığında, AA düzeyi 7. günde yüksek 14. günde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, 14. gün AA düzeyi, 3. ve 7. güne kıyasla azalmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, AA düzeyi 7. günde tedavisiz gruba kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, 14. günde doku AA düzeyi yüksektir ($p<0,05$).

Yara dokusu SOD düzeyleri

Normoglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen SOD değerleri Şekil 4.35’de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen SOD değerleri (*:p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde yara iyileşmesinin tüm günlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, 7. gündeki SOD aktivitesi, 3. ve 14. güne kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, günler bazında SOD aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün, B1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında, 3. günde SOD aktivitesi her iki gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Hiperglisemik Gruplar

Hiperglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde Bölüm 3.8.6'da belirtildiği gibi yapılan MDA, NO, GSH, AA ve SOD tayinleri sonuçları Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Hiperglisemik sıçanlara ait biyokimyasal parametreler

		MDA (nmol/ g doku)	NO (μ mol/ g doku)	GSH (μ mol/ g doku)	AA (mg/g doku)	SOD (U/ml)
Hiperglisemik Kontrol (n=6)		39,7 $\pm$ 15,6	7,83 $\pm$ 1,53	0,482 $\pm$ 0,119	18,3 $\pm$ 5,9	1,83 $\pm$ 0,25
B1 Formülasyonu Uygulanan Hiperglisemik Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	12,2 $\pm$ 1,5 ^{a,b}	8,91 $\pm$ 2,83	0,601 $\pm$ 0,067 ^{a,*}	24,51 $\pm$ 3,04 ^{a,b,*}	1,21 $\pm$ 0,56 ^b
	7.gün (n=6)	24,0 $\pm$ 2,3 ^{c,*e}	11,32 $\pm$ 2,31 ^{c,*}	0,920 $\pm$ 0,178 ^{c,*e}	20,96 $\pm$ 1,58 ^{c,*e}	1,41 $\pm$ 0,35 ^{c,*}
	14.gün (n=6)	5,76 $\pm$ 1,18 [*]	6,24 $\pm$ 1,46 [*]	0,592 $\pm$ 0,163 ^e	13,75 $\pm$ 1,29	2,22 $\pm$ 0,33
Ticari ürün Uygulanan Hiperglisemik Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	8,61 $\pm$ 0,47 ^{a,*}	10,86 $\pm$ 1,95 ^{a,b}	0,541 $\pm$ 0,165 ^b	22,88 $\pm$ 4,30 ^{a,b,*}	1,03 $\pm$ 0,33 ^{a,b}
	7.gün (n=6)	30,6 $\pm$ 1,9 ^{c,*d}	6,28 $\pm$ 0,58 ^{*e}	0,495 $\pm$ 0,07 ^{c,d}	15,82 $\pm$ 1,87 ^{c,d}	2,33 $\pm$ 0,17 ^d
	14.gün (n=6)	7,30 $\pm$ 5,09 [*]	5,47 $\pm$ 1,10 [*]	1,61 $\pm$ 0,25 ^{*d}	12,09 $\pm$ 1,13	2,32 $\pm$ 0,21
Hiperglisemik Tedavisiz Gruplar (n=18)	3.gün (n=6)	14,1 $\pm$ 5,0 ^{b,d,e}	9,68 $\pm$ 2,05 ^a	0,419 $\pm$ 0,066 ^d	16,51 $\pm$ 1,62 ^{b,d,e}	1,03 $\pm$ 0,61 ^{a,b}
	7.gün (n=6)	9,09 $\pm$ 3,61 ^{c,d,e}	16,33 $\pm$ 2,38 ^{c,d,e}	0,421 $\pm$ 0,066 ^d	17,54 $\pm$ 1,03 ^{c,d}	2,33 $\pm$ 0,17 ^d
	14.gün (n=6)	32,9 $\pm$ 6,7 ^{d,e}	10,44 $\pm$ 1,44 ^{d,e}	0,663 $\pm$ 0,217 ^e	13,08 $\pm$ 1,92	2,32 $\pm$ 0,19

a: p<0,05 Grup içi 3.gün ile 7.gün karşılaştırıldığında

b: p<0,05 Grup içi 3.gün ile 14.gün karşılaştırıldığında

c: p<0,05 Grup içi 7.gün ile 14.gün karşılaştırıldığında

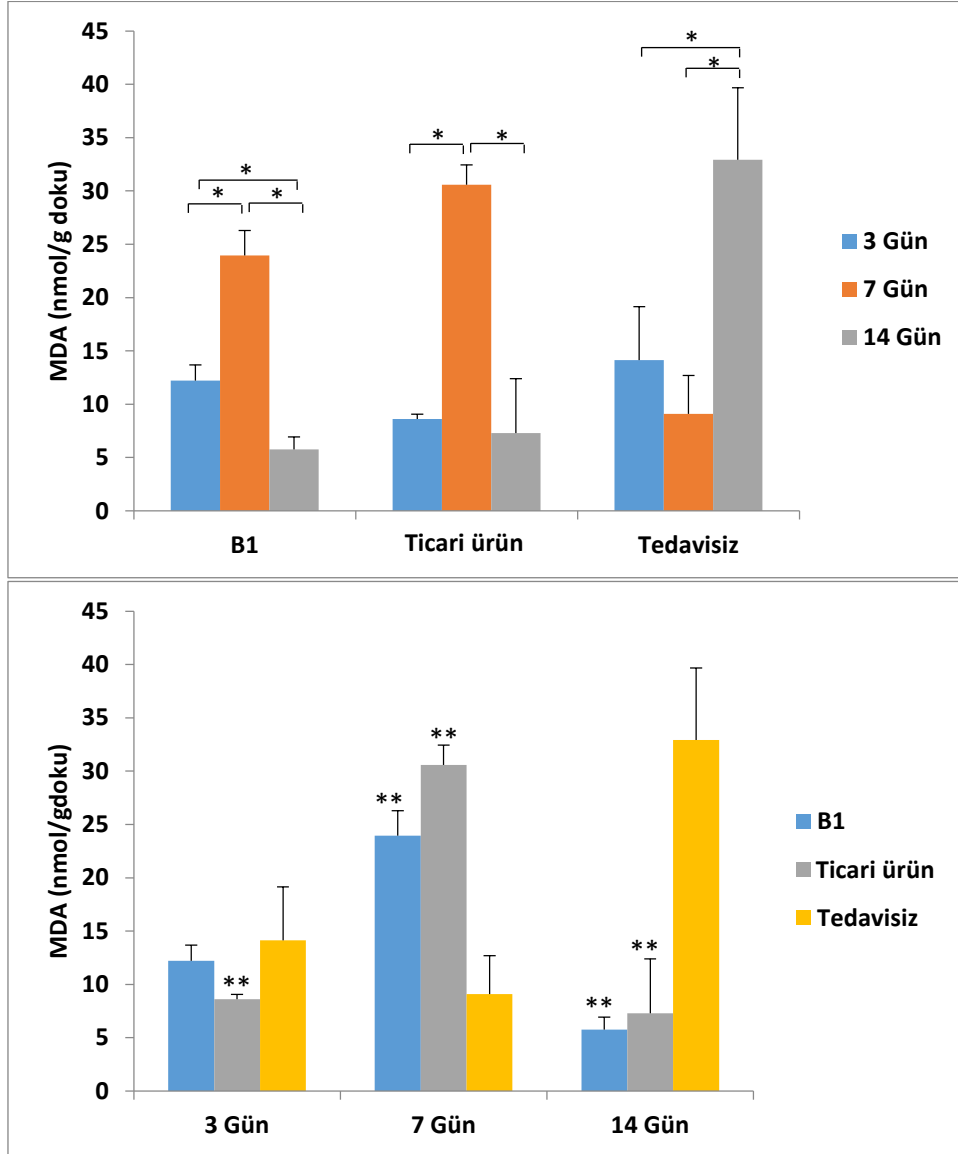
*: p<0,05 Uygulama yapılan grupların tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

d: p<0,05 Uygulama yapılan grupların B1 formülasyonu uygulanan gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

e: p<0,05 Uygulama yapılan grupların ticari ürün uygulanan gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında

Yara dokusu MDA düzeyleri

Hiperglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen MDA değerleri Şekil 4.36’da gösterilmiştir.

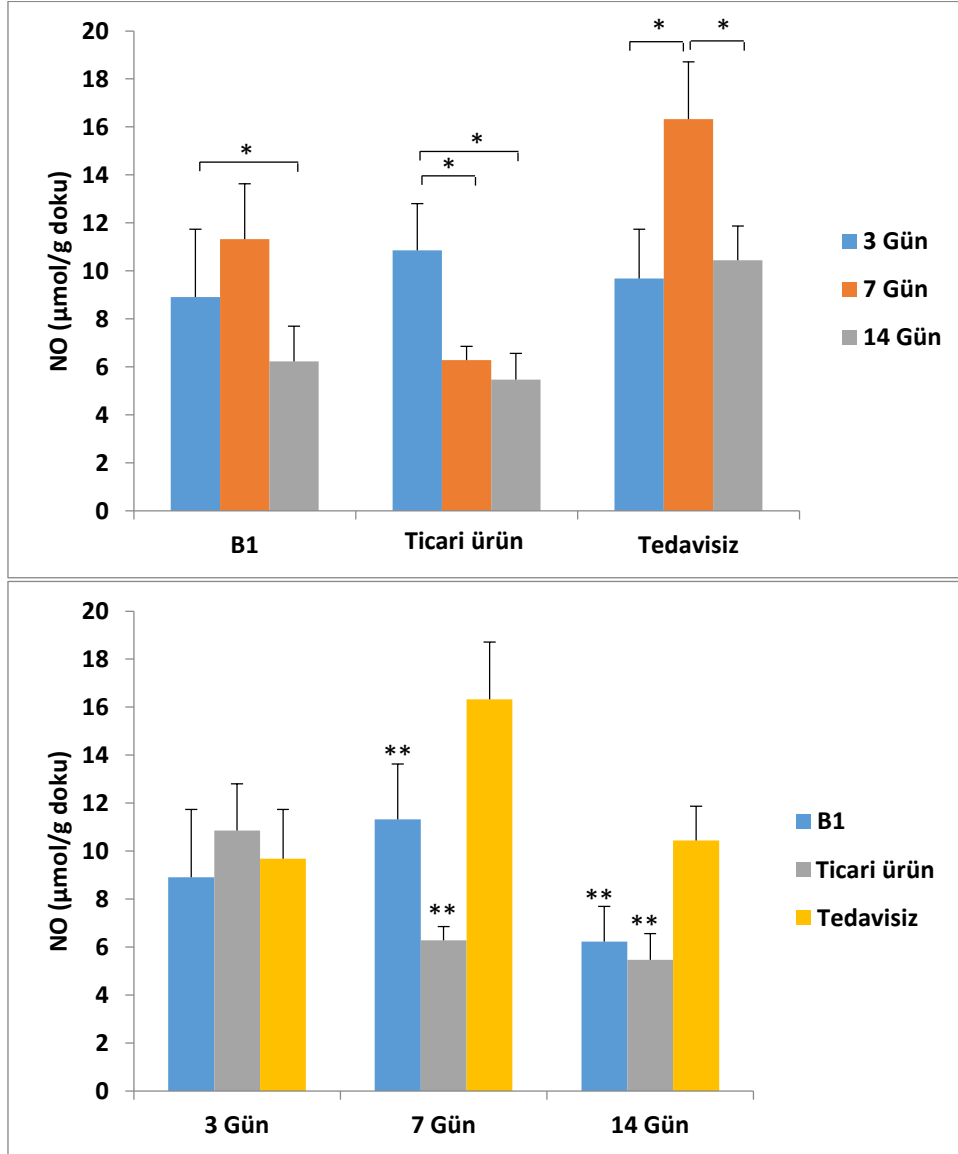


Şekil 4.36. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen MDA değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, doku MDA düzeyleri 3. güne kıyasla 7. gün düşük, 14. gün ise yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, MDA düzeyleri 7. günde 3. ve 14. günlere kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonları uygulanan grupların MDA düzeyleri 7. gün yüksek, 14. gün ise düşük olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, 7. gün MDA düzeyleri 3. ve 14. günlere kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- Ticari ürün, tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, MDA düzeyleri bakımından 3., 7. ve 14. günlerde anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün, B1 formülasyonu uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında, ticari ürün uygulanan grupların MDA düzeyi 7. gün yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Yara dokusu NO düzeyleri

Hiperglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen NO değerleri Şekil 4.37’de gösterilmiştir.

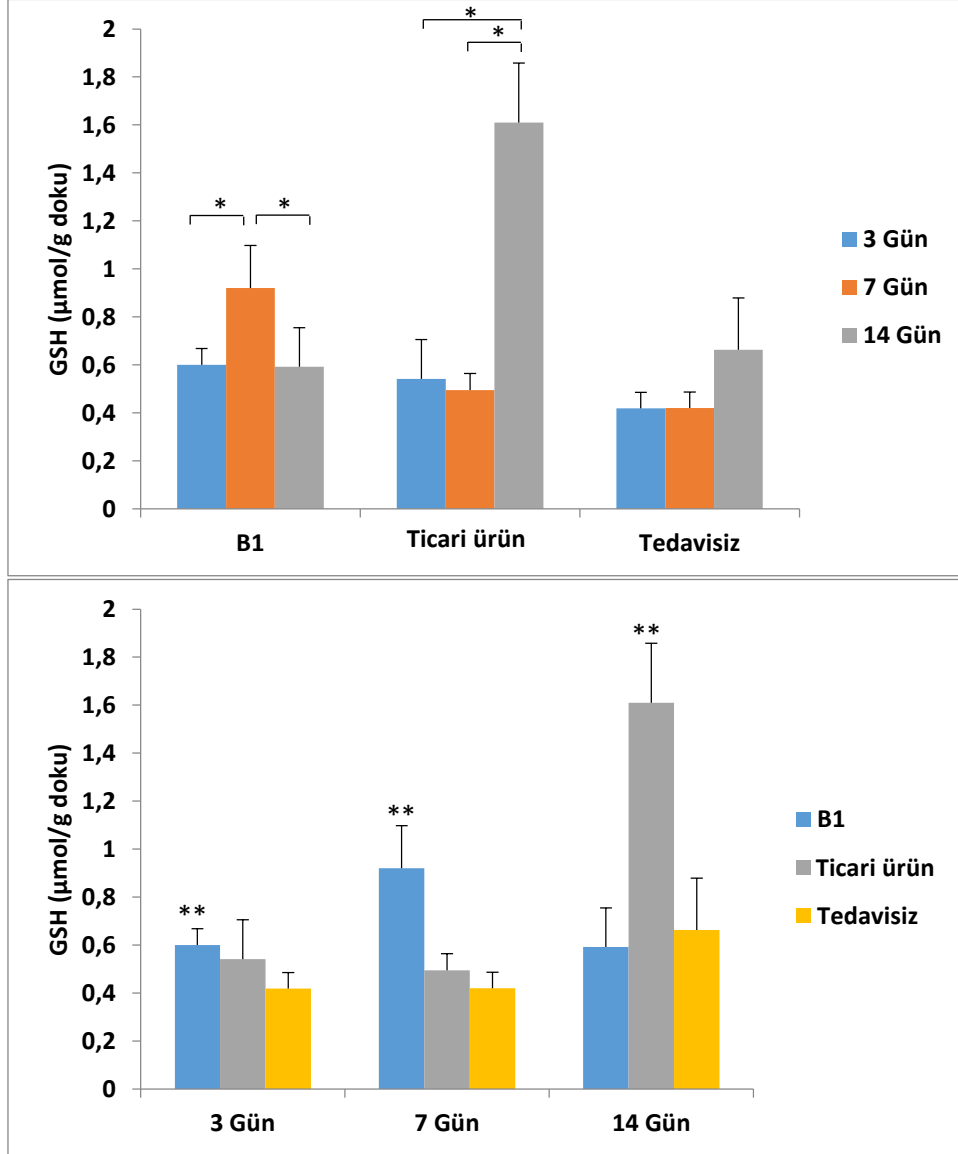


Şekil 4.37. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen NO değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, NO düzeyi 7. günde, 3. ve 14. güne kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, 14. günde 7. güne oranla azalma bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulamasının doku NO düzeyini 7. ve 14. günde istatistiksel olarak azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, 7. ve 14. günlerde doku NO düzeyi 3. güne kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, ticari ürün uygulamasının 7. ve 14. günlerde NO düzeyini istatistiksel olarak azalttığı görülmektedir ($p<0,05$).
- Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar mukayase edildiğinde, B1 formülasyonu uygulaması ile 7. günde NO düzeylerinin yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Yara dokusu GSH düzeyleri

Hiperglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen GSH değerleri Şekil 4.38’de gösterilmiştir.

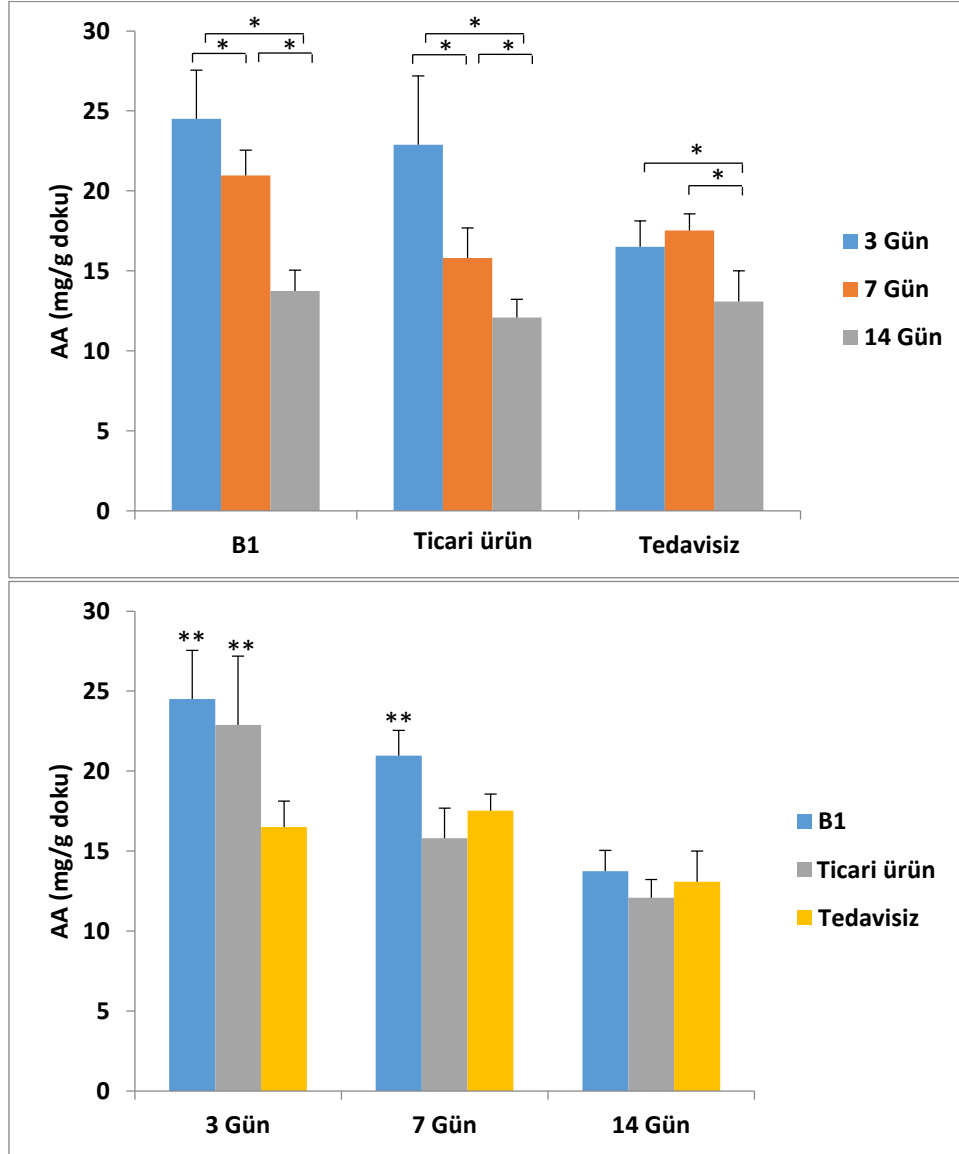


Şekil 4.38. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen GSH değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, doku GSH düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, GSH düzeyi 7. günde 3. ve 14. günlere göre yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulaması yapılan gruplar ile tedavisiz gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulamasının 3. ve 7. günlerde GSH düzeyini artırdığı görülmektedir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde 14. günde GSH düzeyleri 3. ve 7. güne kıyasla artmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar hiperglisemik tedavisiz gruplar ile kıyas edildiğinde, ticari ürünün 14. günde etkili olarak hiperglisemik tedavisiz gruba oranla doku GSH düzeylerini istatistiksel olarak artırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar B1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulaması ile GSH düzeyi 7. gün yüksek, 14. gün düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Yara dokusu AA düzeyleri

Hiperglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen AA değerleri Şekil 4.39’da gösterilmiştir.

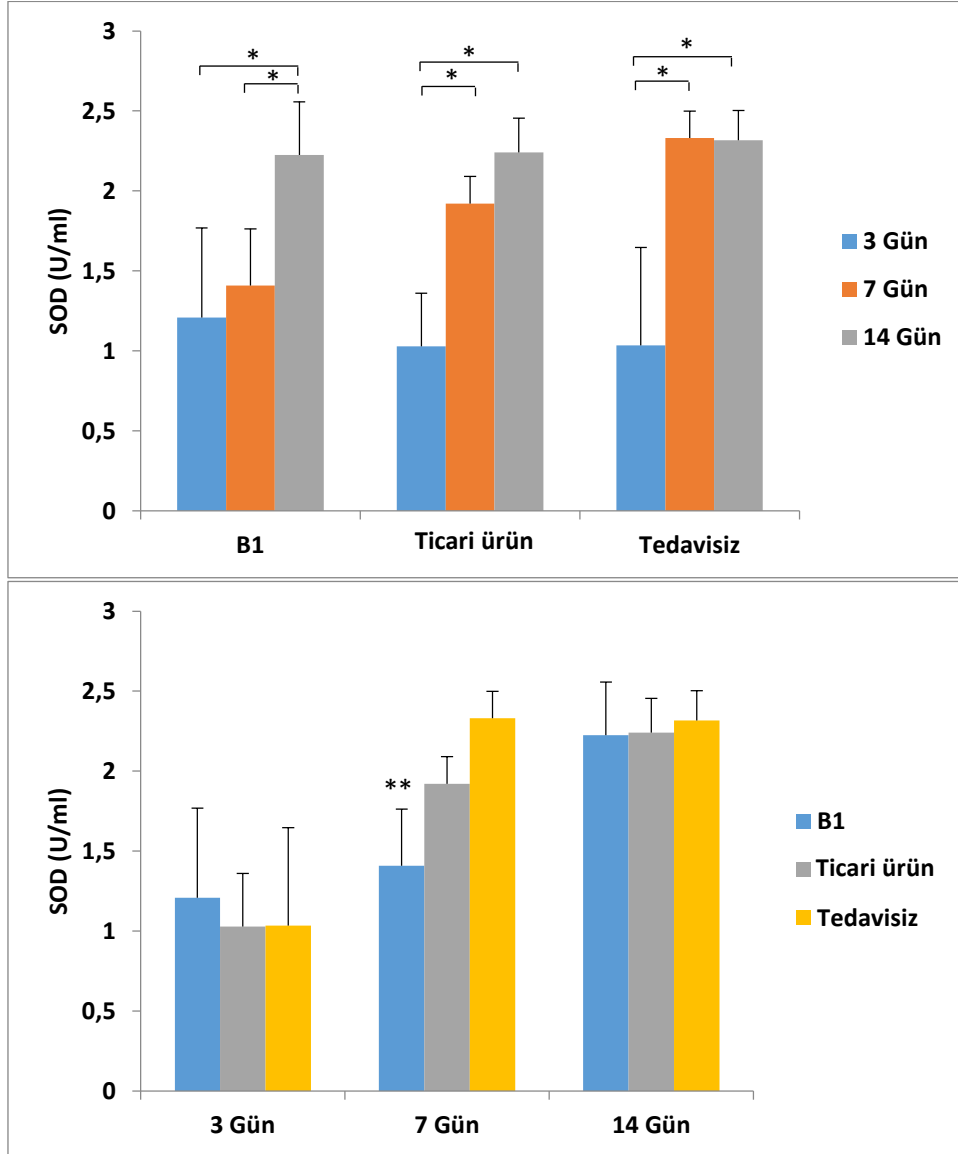


Şekil 4.39. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen AA değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, 14. gün AA düzeyleri 3. ve 7. günlere göre azalmıştır ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde doku AA düzeyi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulanması ile doku AA düzeyleri 3. ve 7. günlerde artmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, doku AA düzeyleri günler bazında istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile mukayase edildiğinde, ticari ürün 3. günde doku AA düzeyini artırdığı görülmektedir ($p<0,05$).
- Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulaması ile doku AA düzeyleri 7. günde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Yara dokusu SOD düzeyleri

Hiperglisemik gruplarda 3.8.6’da anlatıldığı gibi yapılan deneylerde farklı günlerde farklı gruplarda elde edilen SOD değerleri Şekil 4.40’da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde elde edilen SOD değerleri (*:p<0,05
**:Tedavisiz gruptaki aynı günün değeri ile karşılaştırıldığında p<0,05)

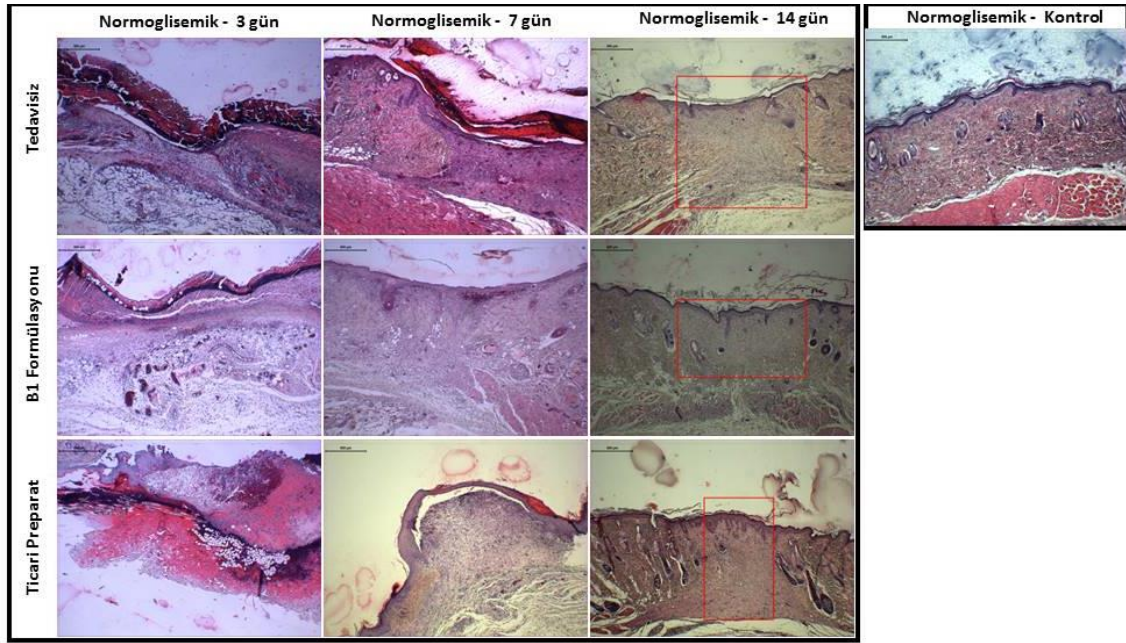
- Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, yara iyileşmesinin 7. ve 14 günlerinde 3. güne oranla yara dokusu SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, 14. gündeki yara dokusu SOD aktivitesi, 3. ve 7. günlere kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
- B1 formülasyonu uygulanan gruplar ile tedavisiz gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulamasıyla yara iyileşmesinin 7. gününde SOD aktivitesinin istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, 7. ve 14. günlerde 3. güne kıyasla SOD aktivitesi artmıştır ($p<0,05$).
- Ticari ürün uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile mukayese edildiğinde doku SOD aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).
- Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulamasının yara iyileşmesinin 7. gününde doku SOD aktivitesini azalttığı bulunmuştur ($p<0,05$).

4.7.3. Doku örneklerinde histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar

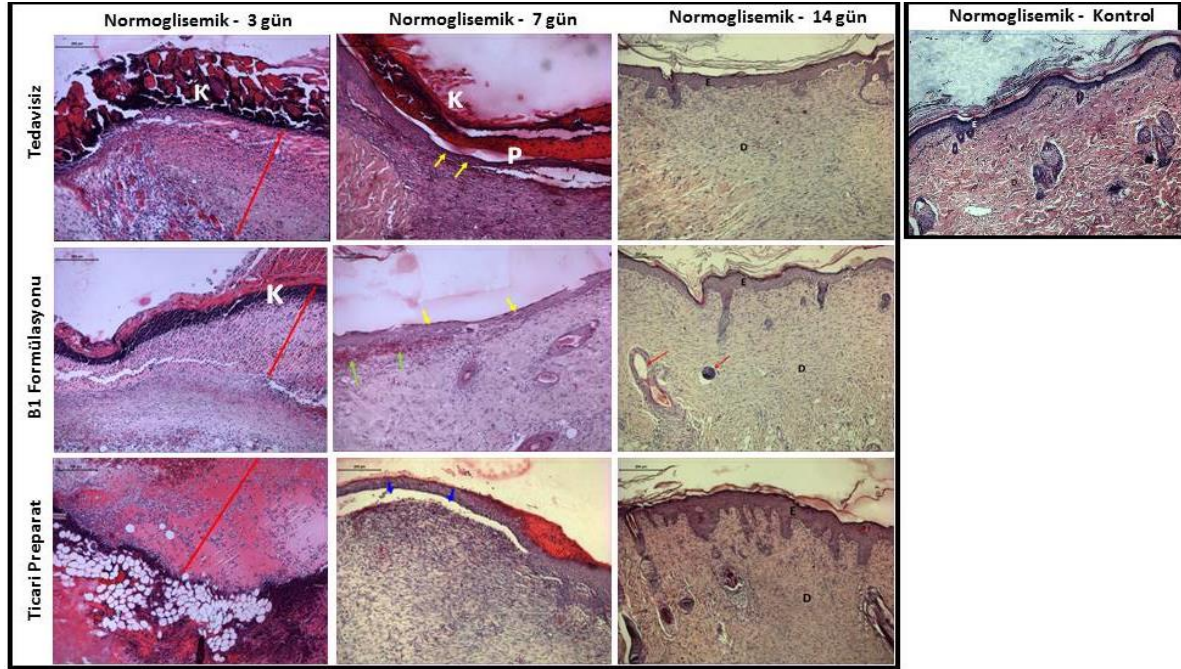
Histomorfolojik çalışmalar

Normoglisemik gruplar

Normoglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde yapılan histomorfolojik çalışma bulguları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.41 ve 4.42).



Şekil 4.41. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (40x)



Şekil 4.42. Normoglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (100x); yara kabuğu (K), kanama bölgesi (P)

- Kontrol grubu deri örneklerinin tüm histolojik katmanlarıyla normal görünümde histolojik yapı sergilediği görülmüştür.

3. gün bulguları

- Normoglisemik sıçanlardan tedavisiz grupta 3. gün alınan kesitlerde yara bölgesi, yara kabuğu ve kabuk altında inflamasyon alanı içeriyordu. Yara kenarları arasında reepitelizasyon gözlenmedi.
- Normoglisemik sıçanlarda B1 formülasyonu uygulanan grupta 3. günde histolojik bulgular tedavisiz gruba benzerdi.
- Normoglisemik sıçanlarda ticari ürün uygulanan grupta 3. gün ise yara kabuğu ve inflamatuvar alan oldukça kalın olarak izlendi, yara kenarları arasında reepitelizasyon gözlenmedi.

7. gün bulguları

- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. gün yara bölgesi 3 günlük gruplarda olduğu gibi geniş bir alan oluşturmaktaydı ve yara kabuğu ve pıhtı alanı 3 günlük gruba göre incelmekle birlikte mevcuttu. Yara bölgesini kaplayan ince bir epidermis tabakası

gelişmişti. Epidermal-dermal bileşkenin yeterli organizasyonu gerçekleşmediği için iki tabaka birbirinden kolaylıkla ayrılıyordu.

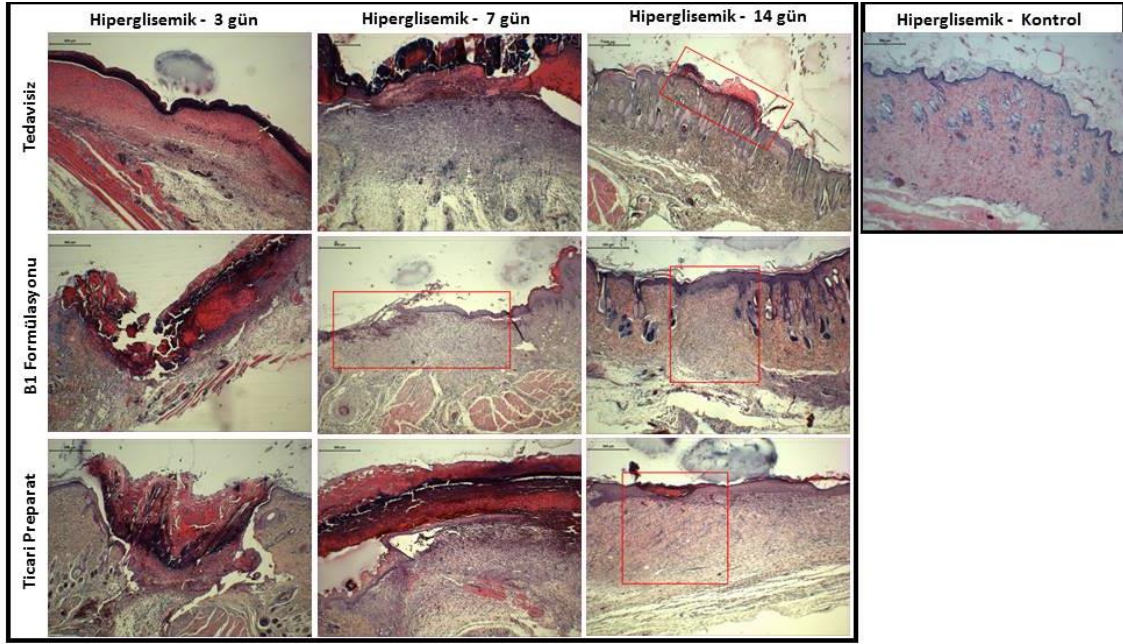
- Normoglisemik sıçanlarda B1 formülasyonu uygulanan gruplarda az sayıdaki denekte yara bölgesinin 3 günlük gruplarda olduğu gibi geniş olduğu, yara kabuğunun ve inflamasyon alanının da belirgin olduğu ve reepitelizasyonun hiç oluşmadığı gözlemlendi. Ancak bu gruptaki örneklerin çoğunda yara kabuğu tamamen ayrılmıştı.
- Normoglisemik sıçanlarda ticari ürün uygulanan grupta 7. gün histolojik olarak epiderminin geliştiği ancak moleküler organizasyonun tam olarak tamamlanmaması nedeniyle bazal membran dermisten ayrılıyordu.

14. gün bulguları

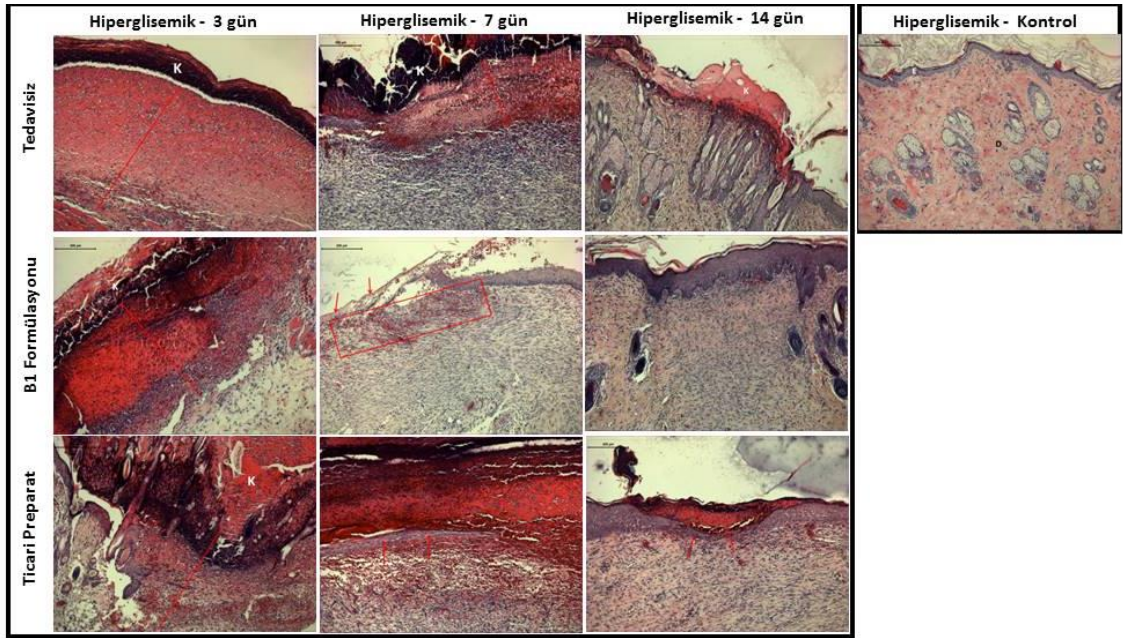
- Normoglisemik tedavisiz grupta 14. gün iyi onarılmış bir epidermis ve dermis gözlemlendi. Epidermal-dermal bileşkede bağlantı birimleri organizasyonunu tamamlamıştı. Ancak dermal bölgede kıl follikülleri ve ekleri gözlenmezken yaygın vaskülarizasyon belirgindi.
- Normoglisemik sıçanlarda 14 günlük B1 formülasyonu uygulanan grupta dar yara bölgesi sağlıklı deri bölgesinden güçlükle ayırt ediliyordu. Kıl follikülleri ve folliküllere açılan yağ bezleri onarılmıştı. Kapiller dağılımı normal histolojik dermis özelliğindeydi.
- Normoglisemik sıçanlarda ticari ürün uygulanan grubun 14. gün bulguları B1 formülasyonu uygulanan gruplara benzer histolojik görünüm sergilemekteydi.

Hiperglisemik gruplar

Hiperglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde yapılan histomorfolojik çalışma bulguları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.43 ve 4.44).



Şekil 4.43. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (40x)



Şekil 4.44. Hiperglisemik gruplarda farklı günlerde yara bölgeleri, (H&E), (100x)

Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubu deri örnekleri normal histolojik yapı sergilemekteydi.

3. gün bulguları

- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda yara kabuğu ve kalın ve geniş inflamasyon alanı gözlendi. Yara kenarları arasında reepitelizasyon gözlenmedi.

7. gün bulguları

- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. gün kalın yara kabuğu, yaygın inflamasyon alanı ve reepitelizasyonun gerçekleşmemesiyle 3 günlük hiperglisemik gruplara benzer histolojik yapıya sahipti.
- Hiperglisemik sıçanlarda B1 formülasyonu uygulanan gruplarda 7. gün yara bölgesini kaplayan tam bir epidermis geliştiği ancak epidermal-dermal bileşkenin fragil olduğu gözlendi. Sub epidermal alanda hemoraji mevcuttur.
- Hiperglisemik sıçanlarda ticari ürün uygulanan grupta 7. gün ise yara kabuğu ve inflamasyon bölgesinin altında ilerleyen epidermis dokusu gözlendi.

14. gün bulguları

- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta ve ticari ürün uygulanan grupta 14. gün yara bölgesinde küçük bir yara kabuğu ve ince bir inflamasyon bölgesi gözlendi, bu alanda epidermis gelişimi tamamlanmamıştı.
- Hiperglisemik sıçanlarda B1 formülasyonu uygulanan gruplarda 14. gün yara bölgesinde derinin histolojik katmanlarıyla gelişmişti, dermiste tam bir skar dokusu vardı, bu bölgede kıl folikülleri gelişmemişti.

Histomorfometrik çalışmalar

Anjiyogenez skorları

- Normoglisemik sıçanlarda kontrol grubunda anjiyogenez skor ortalaması $1,83 \pm 0,17$ iken hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda $1,00 \pm 0,00$ olarak belirlendi.

- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 14. gün anjiyogenez skor ortalaması $2,00 \pm 0,26$ iken B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar için bu değerler sırasıyla ortalama $2,33 \pm 0,21$ ve $2,33 \pm 0,21$ olarak belirlenmiştir.
- Normoglisemik grupları kendi içerisinde Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,216$).
- Ancak hiperglisemik gruplar kendi içerisinde kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,003$). Farkın kaynaklandığı grubu belirleyebilmek için Mann-Whitney testi ile grupların ikili karşılaştırılmaları yapıldı.
- Hiperglisemik tedavi gruplarının ikili karşılaştırılmalarında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0,05$); hiperglisemik kontrol ile tedavisiz grup kıyaslandığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,021$). Ayrıca hiperglisemik kontrol ile tedavili grupların (B1 formülasyonu uygulanan grup, ticari ürün uygulanan grup) ikili kıyaslamasında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0,002$; $p=0,001$). Tedavisiz ve tedavili grupların anjiyogenez skorlama ortalamaları hiperglisemik kontrol grubuna göre yüksekti.

Reepitelizasyon skorları

- Yedinci günde normoglisemik ve hiperglisemik gruplarda reepitalizasyonu belirlemek için her sıçandan elde edilen H&E ile boyanmış kesitlerde reepitelize dudaklar arasındaki uzaklık ölçüldü. Elde edilen verilerden epitelizasyonun tamamlanmadığı aralığı tanımlamak için ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanıldı.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. günde epitalizasyon göstermeyen bölge ortalaması $1480,17 \pm 843,98$ μm boyutunda iken B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar için bu değerler sırasıyla ortalama $1135,83 \pm 585,16$ μm ve $1104 \pm 510,63$ μm olarak ölçülmüştür.
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. günde epitalizasyon göstermeyen bölge ortalaması $1541,75 \pm 620,54$ μm boyutunda iken B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar için değerler sırasıyla ortalama $1494,25 \pm 561,06$ μm ve $1455,5 \pm 655,9$ μm olarak ölçülmüştür.
- Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar kendi içerisinde Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,965$; $p=0,889$).

- Ancak, normoglisemik ve hiperglisemik grupların her ikisinde de en az reepitelize olan grubun tedavi uygulanmayan gruplar olduğu belirlenmiştir.

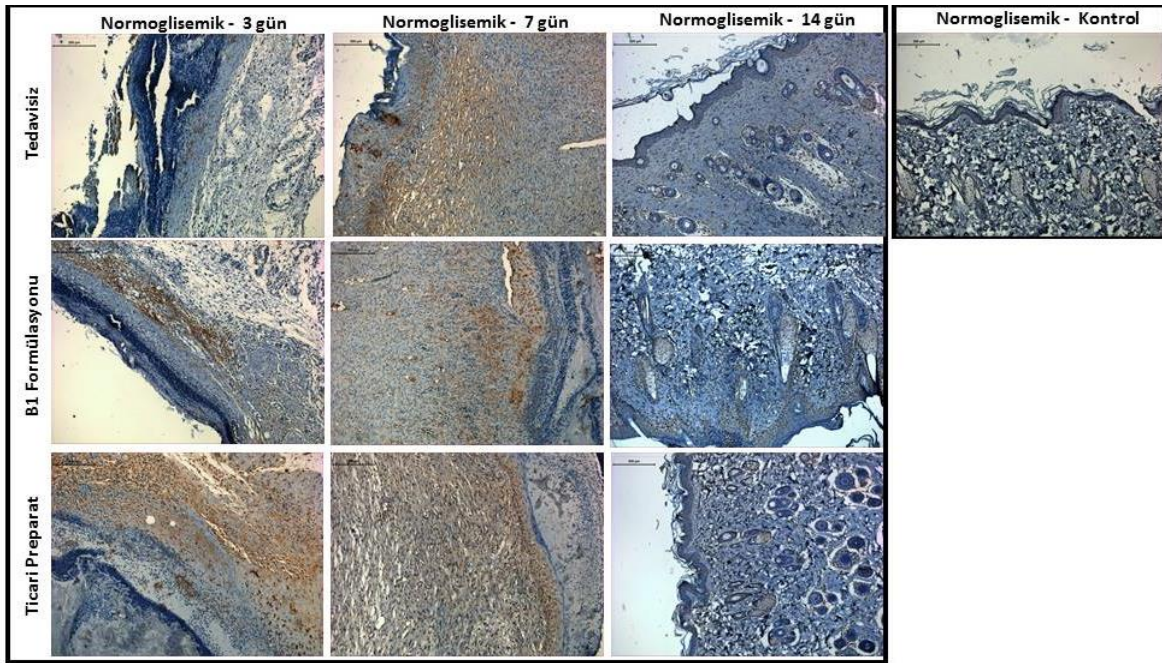
Nötrofilik infiltrasyon skorları

- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3 günlük nötrofilik infiltrasyon skor ortalaması $2,17 \pm 0,17$ iken B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar için değerler sırasıyla ortalama $2,50 \pm 0,22$ ve $2,33 \pm 0,21$ olarak belirlendi.
- Normoglisemik grupları kendi içerisinde karşılaştırmak için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı. Normoglisemik gruplar kendi içerisinde kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,350$).
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. günde nötrofilik infiltrasyon skor ortalaması $1,33 \pm 0,21$ iken B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplar için değerler sırasıyla ortalama $2,33 \pm 0,33$ ve $1,50 \pm 0,22$ olarak belirlenmiştir.
- Hiperglisemik grupları kendi içerisinde karşılaştırmak için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı. Hiperglisemik gruplar kendi içerisinde kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,119$).
- Normoglisemik ve hiperglisemik grupların tedavisiz gruplarında nötrofilik inflamasyon skortama ortalaması en düşük seviyelerdeyken tedavi gruplarında yüksek bulunmuştur.

İmmunohistokimyasal çalışmalar

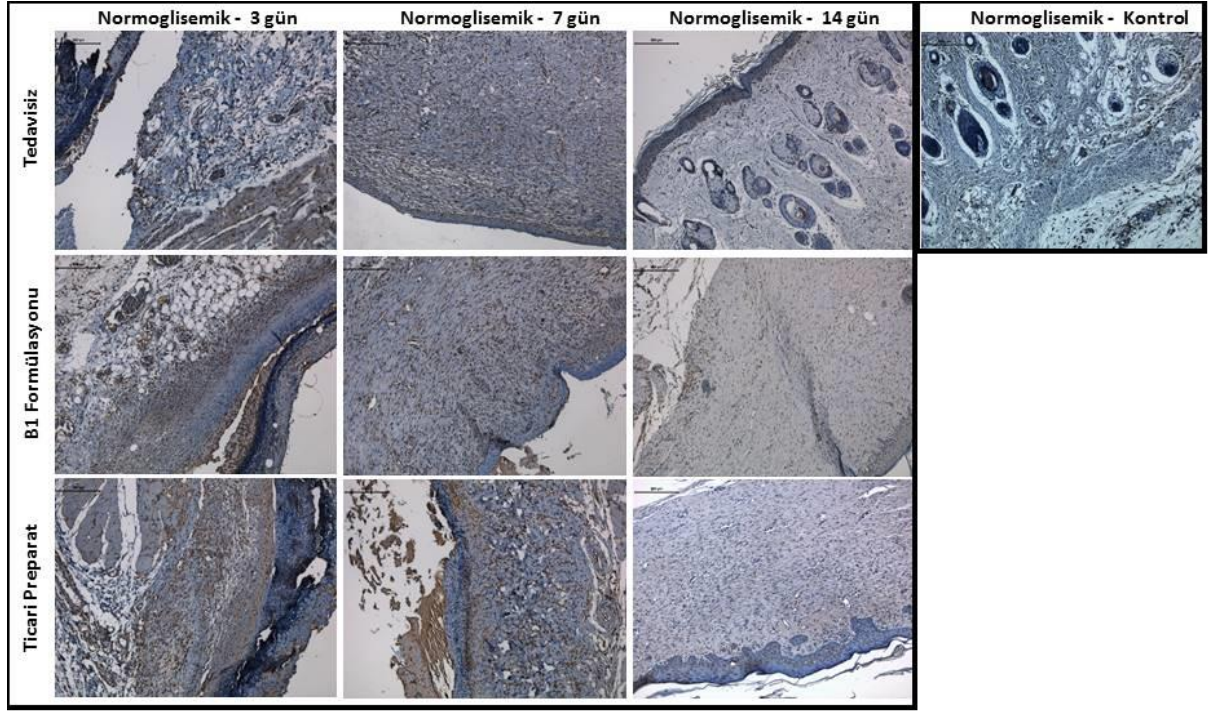
Normoglisemik gruplar

Normoglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde Bölüm 3.8.7’de belirtildiği gibi yapılan VEGF, vWF, bFGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve IL-8 antikorlarına ait immunohistokimyasal çalışma sonuçları Şekil 4.45 – 4.52’de gösterilmiştir.



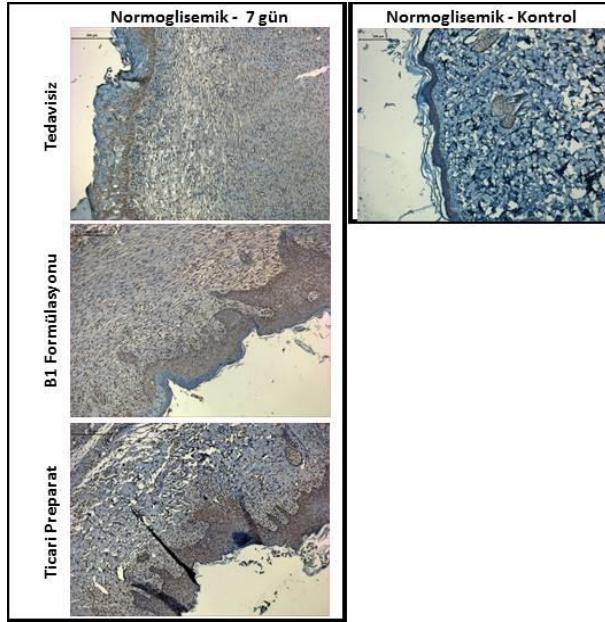
Şekil 4.45. Normoglisemik gruplarda VEGF işaretleme

- Normoglisemik sıçanlarda kontrol grubunda epidermiste yer alan keratinositlerde immüntutulum gözlenmedi.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. günde yara bölgesinde az sayıda makrofajın VEGF pozitif olduğu, bu hücrelerin yaygın olmadığı gözlemlendi.
- B1 formülasyonu uygulanan grupta, tedavisiz gruptan daha fazla olmak üzere pozitif inflamatuvar hücreler yer almaktaydı ve bu hücreler yara bölgesinde yaygındı.
- Ticari ürün uygulanan grubun bulguları B1 formülasyonu uygulanan gruba yakın değerlerdeydi.
- Normoglisemik sıçanlarda 7. günde tüm gruplar birbirinin aynısıydı. Az sayıda keratinositlerde ve subepidermal bölgedeki makrofajlarda hücreye göre değişen orta ve zayıf tutulum vardı.
- Normoglisemik sıçanlarda 14 günlük tüm gruplarda immün boyanma gözlenmedi.



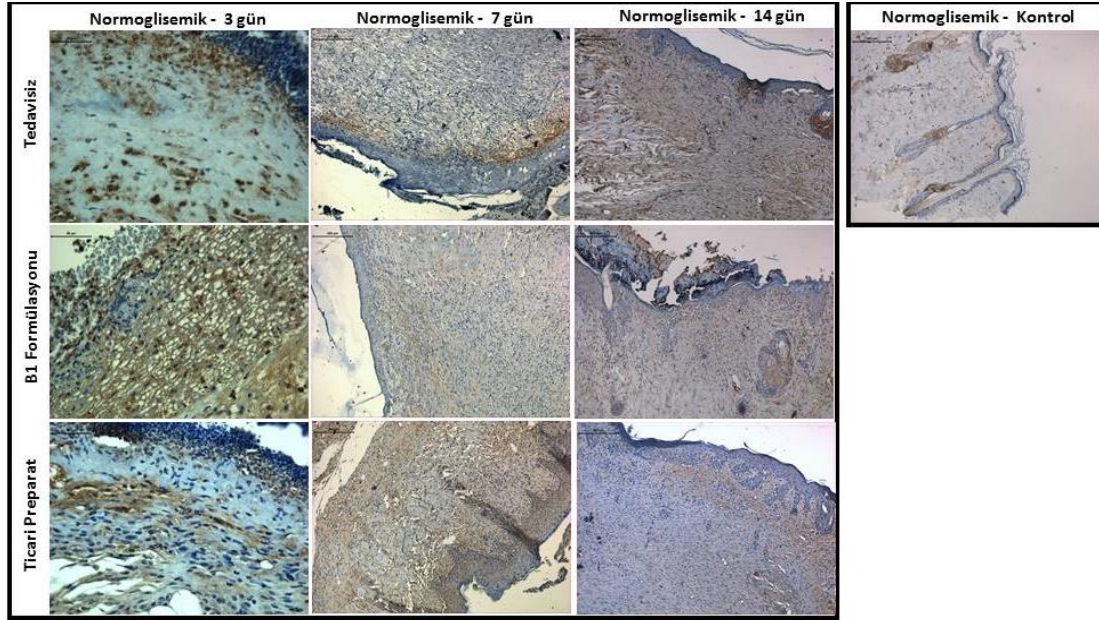
Şekil 4.46. Normoglisemik gruplarda vWF antikor işaretleme

- Anjiyogenetik faktörlerden vWF değerlendirildiğinde normoglisemik sıçanlarda kontrol grubunda damar endotel hücrelerinde (+) orta derecede immünreaktivite vardı.
- Normoglisemik sıçanlarda 3. günde tüm gruplarda yara bölgesinin periferindeki bağ dokuda yer alan damar endotel hücrelerinde çok yoğun (+++) vWF ekspresyonu gözlemlendi.
- 7. günde tedavisiz grupta sayıca az olan damarlarda orta derecede (+) vWF tutulumu gösteren endotel hücreleri vardı. Ancak B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplardaki damar endotel hücrelerinin yoğun tutulum (++) gösterdiği belirlendi.
- Normoglisemik sıçanlarda 14. günde tüm gruplarda zayıf (+/-) vWF immünreaktivitesi gözlemlendi.



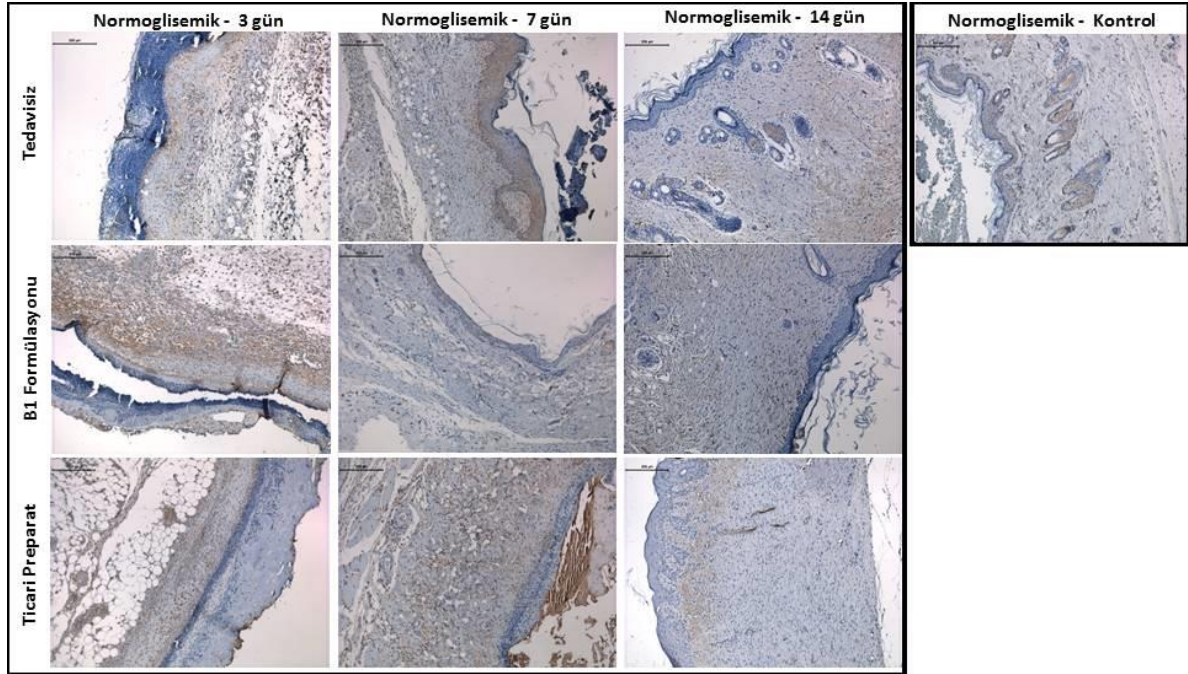
Şekil 4.47. Normoglisemik gruplarda bFGF işaretleme

- Yara tamamen epidermisten yoksun olduğu sağlam epidermis dokusu bulunmadığı için 3 günlük gruplarda keratinosit değerlendirmesi yapılmamıştır.
- Kontrol grubunda keratinositlere yoğun sitoplazmik tutulum gözlemlendi.
- 7. günde tedavisiz grupta sadece bazal keratinositlerde, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda ise epidermiste çeşitli seviyelerdeki keratinositlerde zayıf bFGF tutulumu gözlemlendi.
- 14. günde ise tüm gruplarda keratinositlerde hiç bFGF tutulumu gözlemlenmedi.



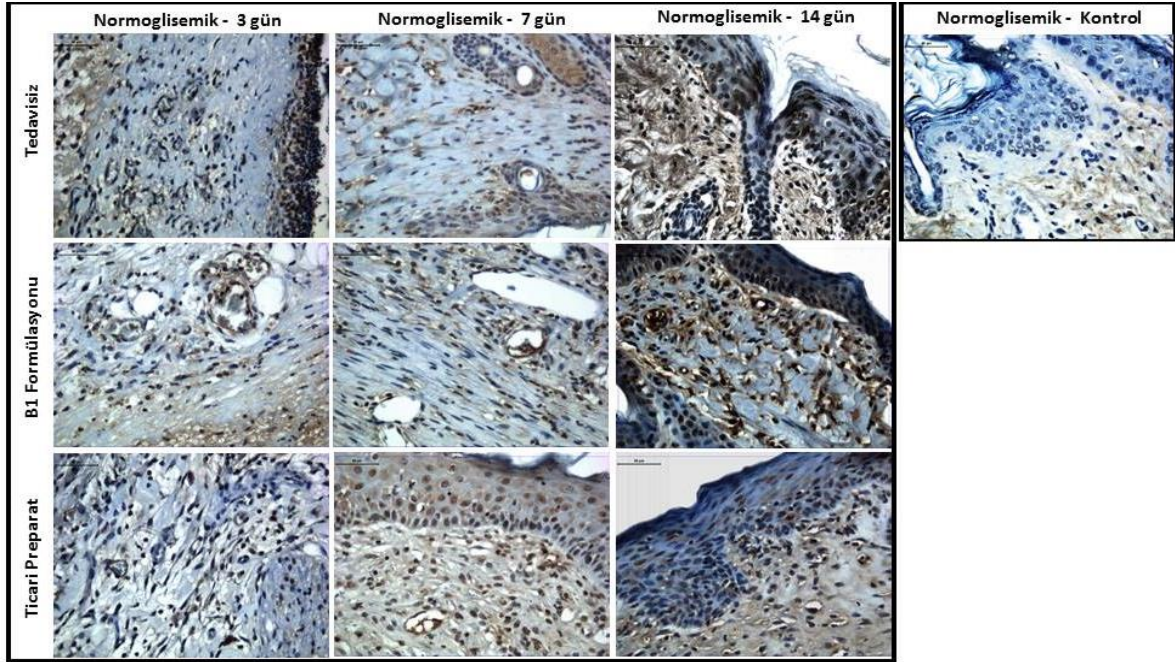
Şekil 4.48. Normoglisemik gruplarda MMP-2 işaretleme

- Normoglisemik sıçanlarda kontrol grubundaki çok az sayıdaki keratinosit ve fibroblastlarda negatif (-) MMP-2 tutulumu gözlemlendi.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz ve tedavili tüm gruplarda 3. günde derin yara bölgesinde ve yara periferindeki fibroblastlar ve inflamatuvar bölgedeki hücreler reaktifti. Ancak tedavisiz grupta yer alan fibroblastlar çok yoğun (+++) MMP-2 tutulumu gösterirken tedavi grupları 3. günde kuvvetli tutulum (++) göstermekteydi ve bu gruplar arasında farklılık yoktu.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda 7. günde subepidermal bölgedeki fibroblastlarda orta derecede (+) tutulum gözlenmiştir.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda 14. günde zayıf tutulum gösteren fibroblastlar gözlenmiştir (+/-).



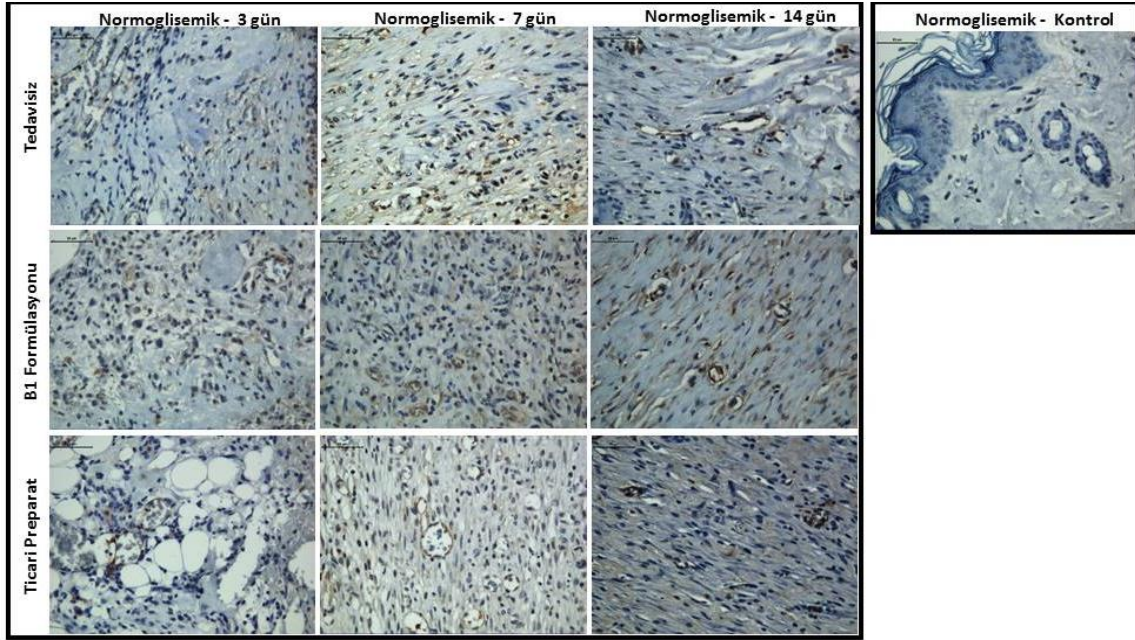
Şekil 4.49. Normoglisemik gruplarda MMP-9 işaretlemesi

- Normoglisemik sıçanlarda kontrol grubunda MMP-9 ekspresyonu fibroblastlarda negatif, az sayıdaki keratinositlerde zayıf tutulum göstermekteydi.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. gün yara bölgesinde yara kabuğu altındaki bağ dokuda yer alan fibroblastlarda çok yoğun (+++) MMP-9 tutulumu gözlemlendi. Tedavi gruplarında B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda kuvvetli (++) immün tutulum gözlemlendi.
- Normoglisemik sıçanlarda 7. günde tedavisiz grupta yara bölgesinde yara kabuğu altındaki bağ dokuda yer alan fibroblastlarda kuvvetli (++) MMP-9 tutulumu gözlemlendi. Tedavi gruplarında B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede (+) immün tutulum gözlemlendi.
- Normoglisemik sıçanlarda tüm gruplarda 14. günde subepidermal fibroblastlarda zayıf tutulum gözlenirken, derin dermisteki fibroblastlarda orta derecede immün tutulum gözlemlendi.



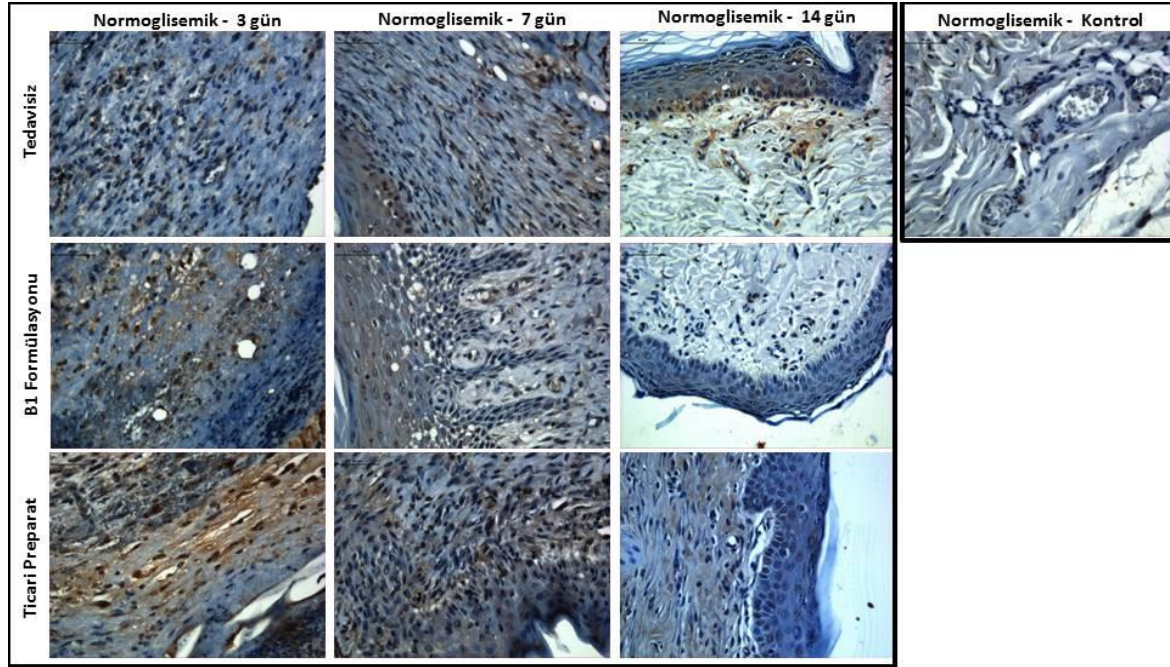
Şekil 4.50. Normoglisemik gruplarda TIMP-1 işaretleme

- Normoglisemik kontrol grubunda damar endotel hücrelerinde TIMP-1 tutulumu zayıftı.
- 3. günde normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta zayıf (+/-) immünytutulum gözlenirken tedavi gruplarının hepsi orta derecede immün tutulum göstermekteydi.
- Normoglisemik sıçanlarda 7. günde tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede (+) reaksiyon vardı.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavili ve tedavisiz tüm gruplarda 14. günde 3. ve 7. günlere göre TIMP-1 tutulumu artmaktadır. Bu gruplarda kendi içerisinde en yüksek tutulum B1 formülasyonu (+++) uygulanan gruplarda gözlenmektedir. Tedavisiz ve ticari ürün uygulanan grupta kuvvetli tutulum vardır (++)



Şekil 4.51. Normoglisemik gruplarda TIMP-2 işaretleme

- MMP-2 nin inhibitörü olan TIMP-2 ekspresyonu normoglisemik sıçanlarda kontrol grubunda negatifti. Bu grupta MMP-2 ekspresyonu da yoktu.
- Normoglisemik sıçanlarda 3. günde tedavisiz grupta, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda zayıf derecede tutulum gözlemlendi.
- Normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. gün zayıf, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede tutulum vardı.
- Normoglisemik sıçanlarda 14. günde MMP-2 inhibisyonu 3. ve 7. güne göre maksimum düzeye çıktığı için orta derecede tutulum vardı ve 14. günde tedavisiz ve tedavi grupları arasında fark yoktu.

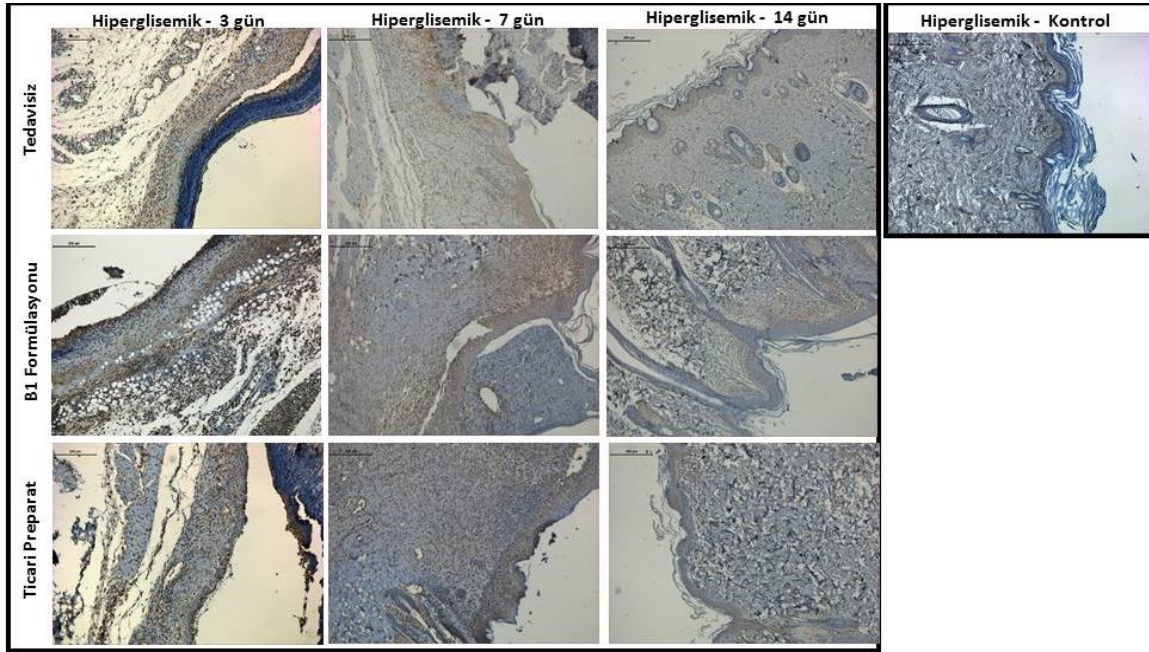


Şekil 4.52. Normoglisemik gruplarda IL-8 antikor işaretleme

- İnflamatuvar hücrelerden eksprese edilen IL-8 ilk 3 günde normoglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta damar endotelinde yoğun pozitiflik gösterirken (++) , B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda 3. günde IL-8 tutulumu tedavisiz grupta benzerdi (++) .
- 7. günde tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede yoğun tutulum vardı (+).
- 14. günde ise tedavisiz grupta, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda negatif tutulum gözlemlendi.

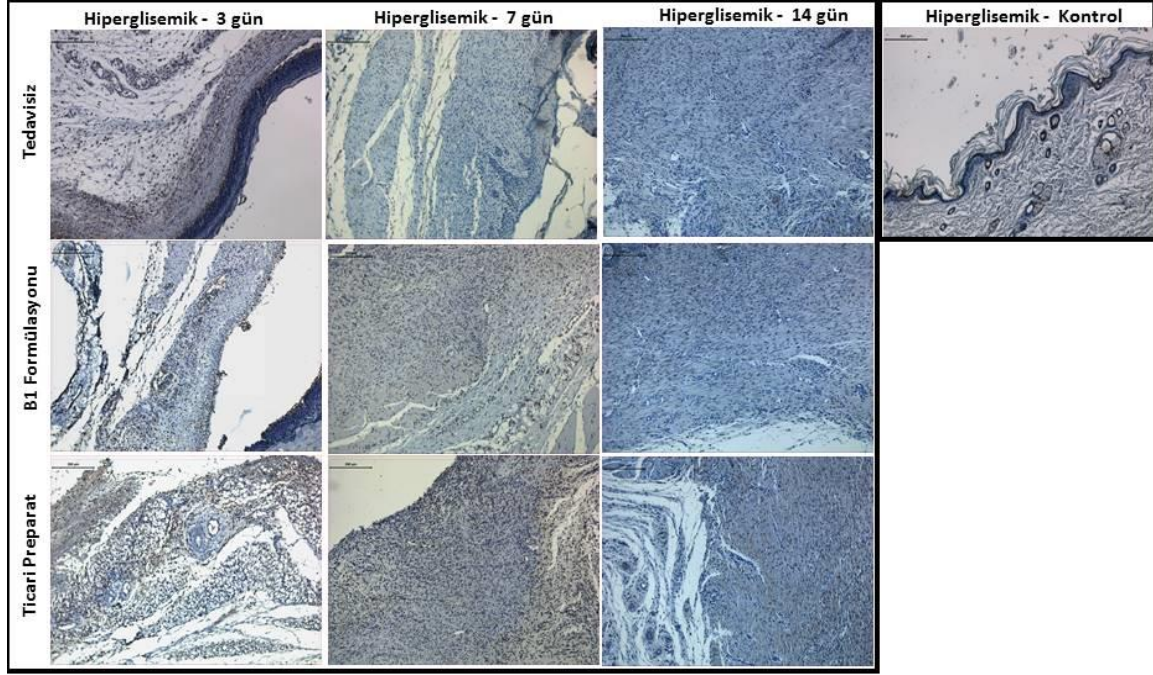
Hiperglisemik gruplar

Hiperglisemik sıçanlara ait doku örneklerinde Bölüm 3.8.7’de belirtildiği gibi yapılan VEGF, vWF, bFGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve IL-8 antikorlarına ait immunohistokimyasal çalışma sonuçları Şekil 4.52 - 4.60’de gösterilmiştir.



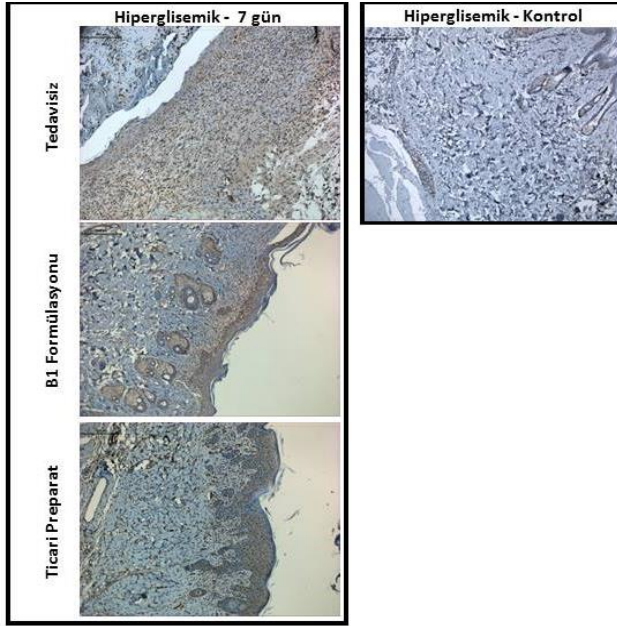
Şekil 4.53. Hiperglisemik gruplarda VEGF işaretlemesi

- Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda VEGF immünreaksiyonu gözlenmedi.
- Hiperglisemik gruplarda 3. gündeki tüm bulgular, normoglisemik gruplardaki bulgularla azalmak koşuluyla özdeşti.
- Hiperglisemik 7 ve 14 günlük gruplardaki bulgular normoglisemik 7 ve 14 günlük bulgularla özdeşti.



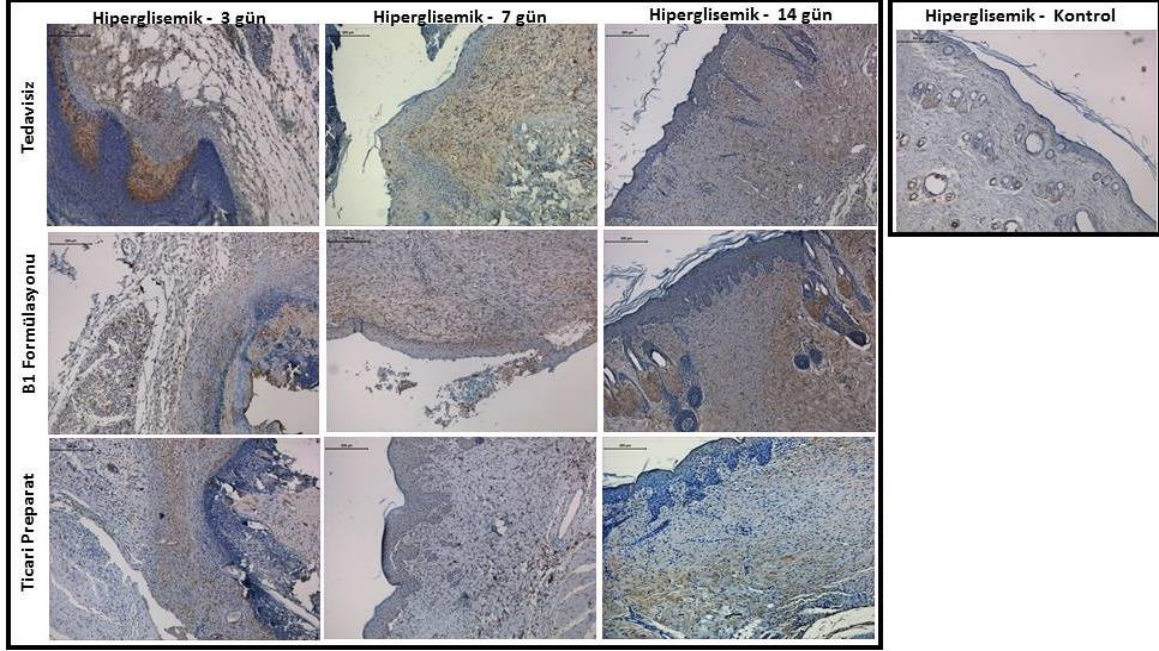
Şekil 4.54. Hiperglisemik gruplarda vWF işaretlemesi

- Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda endotel hücrelerinde zayıf tutulum (+/-) vardı.
- 3. günde tedavisiz grupta endotel hücreleri zayıf reaksiyon (+/-) göstermekteydi, ancak tedavi grupları birbirine benzer özellikteydi. Hücreler, orta derecede (+) immünreaktivite göstermekteydi.
- 7. günde tedavisiz grupta ve ticari ürün uygulanan grupta endotel hücreleri zayıf reaksiyon (+/-) göstermekteydi, ancak B1 formülasyonu uygulanan gruplarda orta derecede (+) immünreaktivite vardı.
- Hiperglisemik sıçanlarda 14. günde tüm gruplarda negatif (-) vWF immünreaktivitesi gözlemlendi.
- Bu bulgular anjiyogenik faktörlerden biri olan vWF' nin yara oluşumundan itibaren endotel hücrelerinden hızla ve yoğun olarak eksprese edildiğini 7. günde ekspresyonun azaldığı ve yara iyileşmesinin tamamlandığı 14. günde ise vWF ekspresyonunun tamamen azaldığı belirlendi.



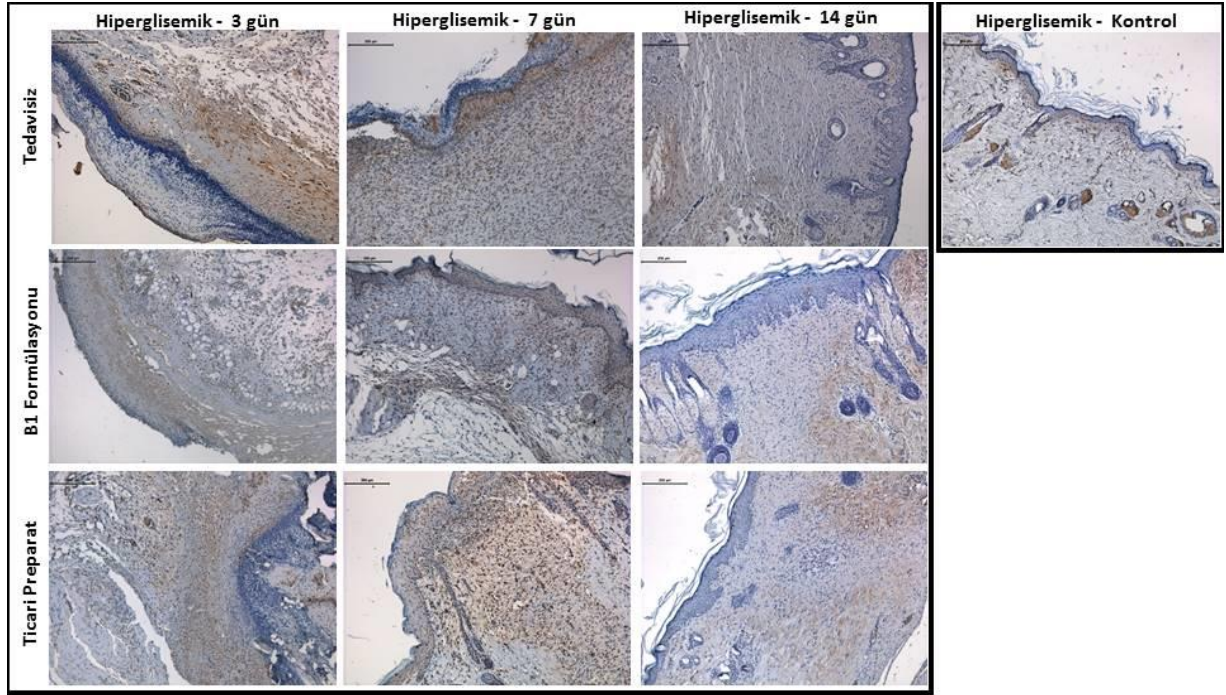
Şekil 4.55. Hiperglisemik gruplarda bFGF işaretlemesi

- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz ve tedavili gruplarda 7. günde epidermiste çeşitli seviyelerdeki keratinositlerde zayıf bFGF tutulumu gözlemlendi.
- Hiperglisemik 14 günlük gruplarda ise keratinositlerde hiç bFGF tutulumu gözlenmedi.
- Bu bulgular ışığında 7. günde normoglisemik gruplarda anjiyogenezis sürecinin sağlıklı olarak devam ettiğini ancak hiperglisemik gruplarda bu sürece katkı sağlayan bFGF ekspresyonunun zayıf olduğu görülmektedir.



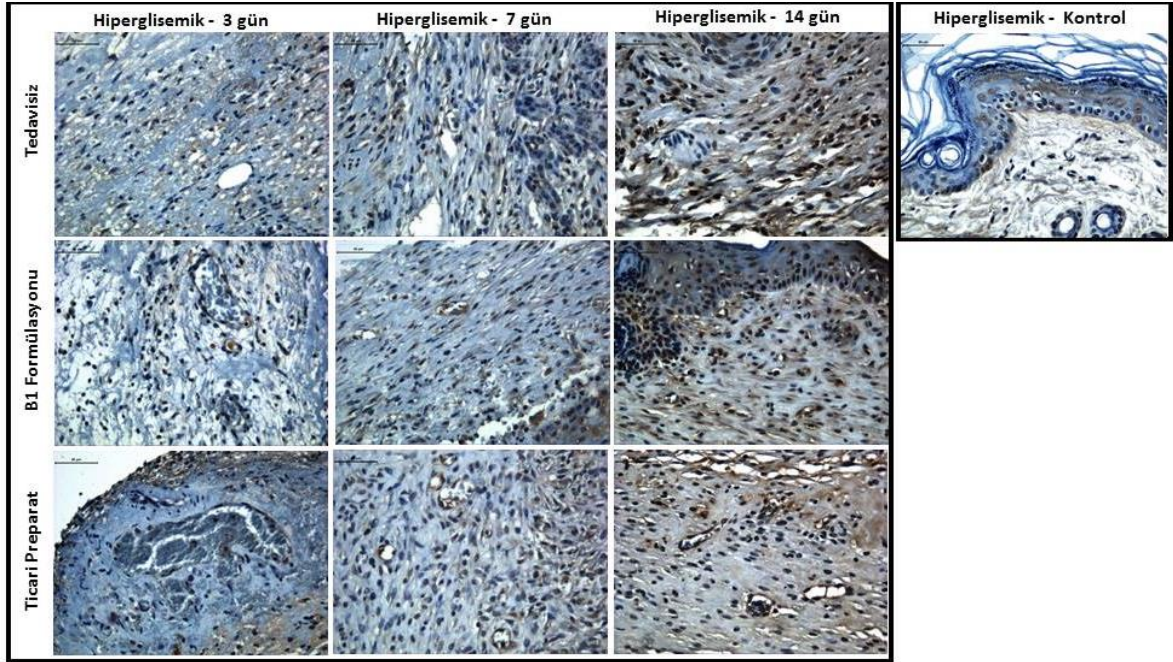
Şekil 4.56. Hiperglisemik gruplarda MMP-2 antikor işaretleme

- Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda çok az sayıdaki keratinosit ve fibroblastlarda zayıf (+/-) MMP-2 tutulumu gözlemlendi.
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. günde kümeler halinde ya da tek tek çok kuvvetli (+++) pozitif sitoplazmik tutulum gösteren fibroblastlar gözlemlendi. Ayrıca inflamatuvar alanda çok sayıda makrofajların, polimorfonükleer lökositlerin sitoplazmik (++) kuvvetli pozitiflik gösterdiği belirlendi. B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda ise inflamatuvar hücrelerden daha çok fibroblastların MMP-2 eksprese ettiği dikkati çekmekteydi. Bu gruplardaki fibroblastlar çok yoğun (+++) tutulum göstermekteydi.
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 7. günde subepidermal bölgede yer alan fibroblastlarda orta derecede (+) MMP-2 reaksiyonu gösteren bağ doku hücreleri mevcuttu. B1 formülasyonu uygulanan gruplarda orta derecede tutulum (+) varken ticari ürün uygulanan grupta az sayıda hücrede zayıf (+/-) MMP-2 tutulumu vardı.
- Hiperglisemik 14 günlük tüm gruplarda MMP-2 ekspresyonu negatif (-).



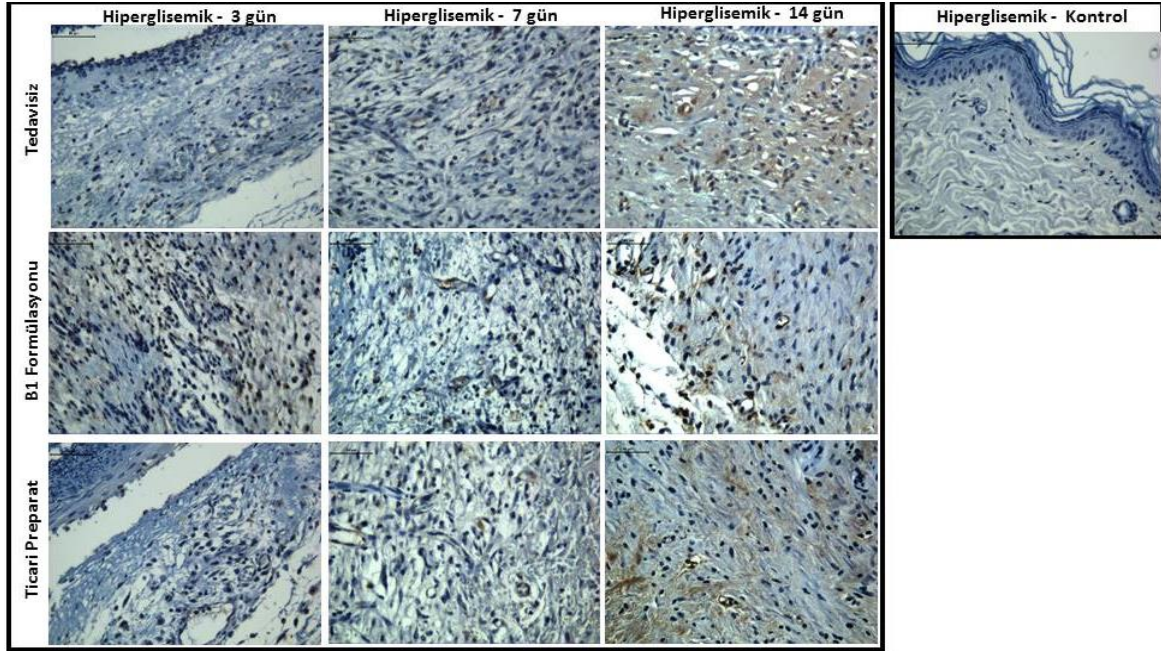
Şekil 4.57. Hiperglisemik gruplarda MMP-9 işaretleme

- Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda MMP-9 ekspresyonu subepidermal fibroblastlarda zayıf tutulum göstermekteydi.
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. günde yara bölgesinde yara kabuğu altındaki bağ dokuda yer alan fibroblastlarda kuvvetli (++) MMP-9 tutulumu gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede (+) immün tutulum gözlemlendi.
- 7. günde tedavisiz grupta yara bölgesinde yara kabuğu altındaki bağ dokuda yer alan fibroblastlarda çok yoğun kuvvetli (+++) MMP-9 tutulumu gözlemlendi. B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda yoğun(++) immün tutulum gözlemlendi.
- 14. günde tüm gruplarda subepidermal fibroblastlarda zayıf tutulum gözlenirken derin dermisteki fibroblastlarda orta derecede immüntutulum gözlemlendi.



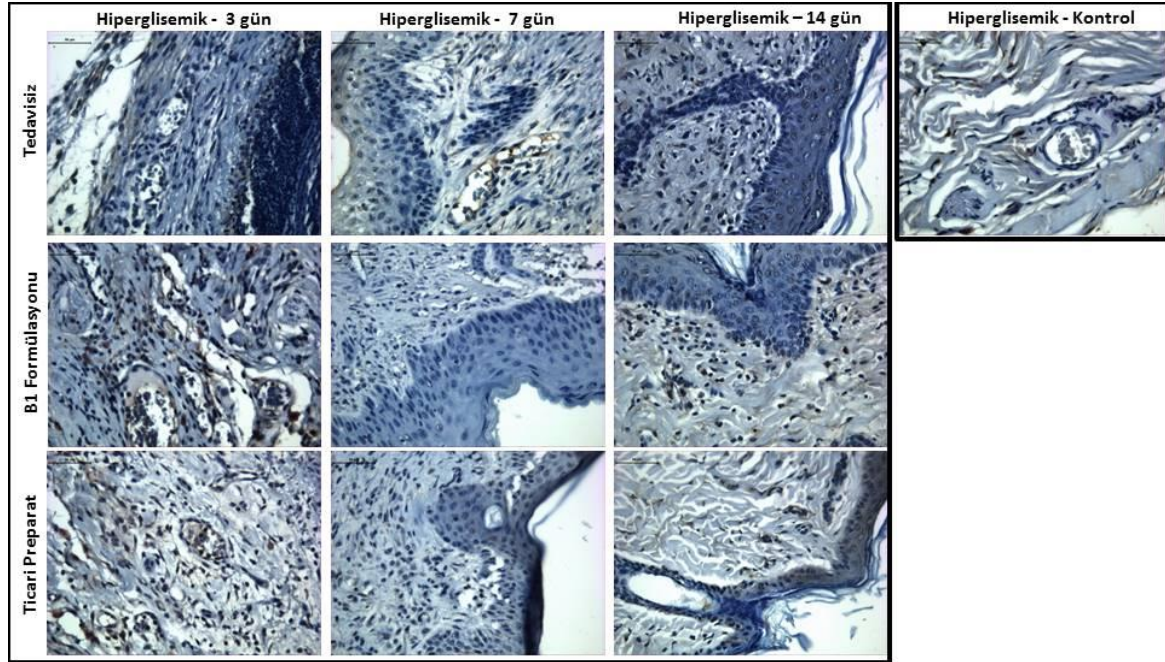
Şekil 4.58. Hiperglisemik gruplarda TIMP-1 işaretleme

- Hiperglisemik sıçanlarda kontrol grubunda endotel hücrelerinde zayıf TIMP-1 tutulumu gözlemlendi.
- Hiperglisemik sıçanlarda 3. günde tedavisiz grupta zayıf (+/-) immünytutulum gözlenirken tedavi gruplarının hepsi orta derecede immün tutulum göstermekteydi.
- 7. günde tedavisiz, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda orta derecede (+) reaksiyon vardı.
- 14. günde tüm gruplarda 3. ve 7. günlere göre TIMP-1 tutulumu artmaktadır. Bu grupların hepsinde TIMP-1 tutulumu (++) kuvvetlidir.



Şekil 4.59. Hiperglisemik gruplarda TIMP-2 işaretleme

- MMP-2'nin inhibitörü olan TIMP-2 ekspresyonu hiperglisemik kontrol grubunda negatifti. Bu grupta MMP-2 ekspresyonu zayıftı.
- Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz grupta 3. gün negatif tutulum varken tedavi gruplarında zayıf tutulum gözlemlendi.
- 7. günde tedavisiz grupta zayıf tutulum varken tedavi gruplarından B1 formülasyonu gruplarda grubunda orta derecede ticari ürün grubunda ise zayıf tutulum vardı.
- 14. günde MMP-2 inhibisyonu 3. ve 7. güne göre maksimum düzeye çıktığı için orta derecede tutulum vardı ve 14. günde tedavisiz ve tedavili gruplar arasında fark yoktu.
- MMP-2 ekspresyonu normoglisemik gruplarda hiperglisemik gruplara göre daha düşük olduğu gibi aynı şekilde TIMP-2 ekspresyonu da inhibitör olduğu için hiperglisemik gruplarda daha düşük normoglisemik gruplarda daha yüksekti.



Şekil 4.60. Hiperlisemik gruplarda IL-8 işaretlemesi

- Hiperlisemik sıçanlarda 3. günde tedavisiz ve ticari ürün gruplarında orta derecede (+) tutulum gözlenirken, B1 formülasyonu uygulanan gruplarda (++) kuvvetli pozitif tutulum vardı.
- 7. günde IL-8 tutulumu tedavisiz grup, B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda zayıf tutulum (+/-) göstermekteydi.
- 14. günde tüm gruplarda damar endotel hücreleri negatif (-) IL-8 tutulumu gösterdi.

Normoglisemik ve hiperlisemik gruplara ait immunohistokiyasal veriler Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. Sarı renkle gösterilen tutulumlar tedavisiz gruba göre farklılık göstermektedir.

Çizelge 4.13. Normoglisemik ve hiperglisemik gruplara ait immunohistokiyasal veriler

Normoglisemik gruplar										
	Kontrol	Tedavisiz			B1 formülasyonu			Piyasa preparatı		
		3 gün	7 gün	14 gün	3 gün	7 gün	14 gün	3 gün	7 gün	14 gün
VEGF	-	+	orta/zayıf	-	++	orta/zayıf	-	++	orta/zayıf	-
vWF	+	+++	+	zayıf	+++	++	zayıf	+++	++	zayıf
bFGF	Yoğun sitoplazmik tutulum	Değerlendirme yok	sadece bazal keratinosit	-	Değerlendirme yok	epidermiste çeşitli seviyelerde	-	Değerlendirme yok	epidermiste çeşitli seviyelerde	-
MMP2	-	+++	+	zayıf	++	+	zayıf	++	+	zayıf
MMP9	-	+++	++	orta/zayıf	++	+	orta/zayıf	++	+	orta/zayıf
TIMP1	zayıf	zayıf	+	++	+	+	+++	+	+	++
TIMP2	-	zayıf	zayıf	+	Zayıf	+	+	zayıf	+	+
IL-8		++	+	-	++	+	-	++	+	-

Hiperglisemik gruplar										
	Kontrol	Tedavisiz			B1 formülasyonu			Piyasa preparatı		
		3 gün	7 gün	14 gün	3 gün	7 gün	14 gün	3 gün	7 gün	14 gün
VEGF	-	+	orta/zayıf	-	++	orta/zayıf	-	++	orta/zayıf	-
vWF	orta/zayıf	zayıf	zayıf	-	+	+	-	+	zayıf	-
bFGF	-	Değerlendirme yok	zayıf	-	Değerlendirme yok	zayıf	-	Değerlendirme yok	zayıf	-
MMP2	zayıf	+++	+	-	+++	+	-	+++	zayıf	-
MMP9	zayıf	++	+++	zayıf	+	++	zayıf	+	++	zayıf
TIMP1	Zayıf	zayıf	+	++	+	+	++	+	+	++
TIMP2	-	-	zayıf	+	Zayıf	+	+	zayıf	zayıf	+
IL-8	-	+	zayıf	-	++	zayıf	-	+	zayıf	-

-: Negatif
+: Orta
+: Yoğun
+: Çok yoğun

5. TARTIŞMA

Tez kapsamında elektro-çekim yöntemiyle doksisisiklin ve farklı polimerlerden oluşan koaksiyal nanolif yapısında yara örtüsü formülasyonu geliştirilmiştir. Optimum bir formülasyon geliştirilmesi amacıyla nanoliflerin oluşumunu etkileyen parametreler incelenmiş ve hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En uygun bulunan yara örtüsü formülasyonunun etkinliği hücre kültürü çalışmaları ve in vivo olarak sıçanlarda oluşturulmuş akut ve kronik yara modellerinde incelenmiştir.

5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

5.1.1. DSC çalışmaları

Formülasyonlarda kullanılacak etkin madde ve yardımcı maddeler arasında herhangi bir geçimsizlik ya da etkileşim olup olmadığının belirlenmesi amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. Etkin madde ve polimerlerin tek başına alınan termogramları ile fiziksel karışımlarının termogramları karşılaştırılmıştır. Doksisisiklinin DSC termogramı incelendiğinde iki ayrı pik verdiği görülmektedir (Şekil 4.1). 165°C’de görülen endotermik pik doksisisiklinin erime pikidir. 220°C’de ise kristalizasyon nedeniyle ekzotermik pik oluşmuştur. Her iki pik literatürle uyumludur (Mishra ve Mishra 2011) . Doksisisiklinin PEO, kollajen, PCL, sodyum aljinat ve kitozanla 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarından elde edilen DSC termogramlarında piklerde kaybolma ya da yeni pik oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.1-4.5).

Sonuç olarak DSC termogramları incelendiğinde doksisisiklin ve yardımcı maddeler arasında sonuç formülasyonu etkileyecek olası bir etkileşim görülmemiştir.

5.1.2. İletkenlik ölçümleri

Elektro-çekim işleminde çözeltinin iletkenliği lif oluşumu için önemli bir parametredir. Çözeltinin iletkenliği genellikle polimer çeşidi, çözücü türü veya tuz ilavesi ile değişmektedir.

Koaksiyal nanolifleri oluşturan polimer çözeltilerin iletkenlik ölçümleri

Koaksiyal nanoliflerin elektro-çekim işleminde çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin iletkenliğinin, kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinden düşük olması tercih edilir. Kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinin iletkenlik değerinin çekirdek kısmından daha yüksek olması, düşük voltaj değerinde jet oluşumunu sağlayarak, çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin tek başına jet oluşumunu engelleyecektir. Tam tersi bir durum söz konusu olduğunda, çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisi elektriksel alanda kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinden ayrılarak kendi başına jetler oluşturur ve koaksiyal yapının bozulması söz konusu olabilir. Kabuk kısmı oluşturan doksisiklin ve PEO kullanılarak hazırlanan çözeltinin iletkenlik değeri ($374 \mu\text{S/cm}$) çekirdek kısmı oluşturan PCL/kollajen polimer karışımının iletkenlik değerinden ($14,4 \mu\text{S/cm}$) yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1). Kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinin iletkenliği çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinden daha yüksek olması koaksiyal nanoliflerin elektro-çekim işleminde 8 saat boyunca kesintisiz üretimine imkan sağlamıştır.

Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerini oluşturan polimer çözeltilerinin iletkenlik ölçümleri

Polimer çözeltilerinin iletkenlik değerleri incelendiğinde kitozan ve sodyum aljinat çözeltilerinin elektriksel iletkenlik değerlerinin çok yüksek olduğu görülmektedir.

Saf kitozan ve sodyum aljinat çözeltileri sahip oldukları yüksek elektriksel iletkenlik özelliklerinden dolayı elektro-çekim işlemine uygun değildir. Yüksek polielektrolit özelliklerinden dolayı bu iki polimerin sulu çözeltilerinde saf halde elektro-çekim işlemi mümkün olmamaktadır. Bu zorluğu aşmak amacıyla genellikle bu polimerlerin PEO veya PVA ile kombinasyonu yapılarak nanolifleri hazırlanmaktadır (Krebs ve diğerleri, 2011; Bizarria ve diğerleri, 2014; Hu ve diğerleri, 2015; Tort ve Acartürk 2016). Saf PEO çözeltilerinin, iletkenlik değerleri düşüktür ve polimer konsantrasyonunun artması elektriksel iletkenlik değerinde anlamlı artışa ($p>0,05$) neden olmamıştır. Çizelge 4.1'deki elektriksel iletkenlik değerleri incelendiğinde özellikle saf halde yüksek elektriksel iletkenliğe sahip kitozan ve sodyum aljinatın PEO çözeltisi ile kombine edildiğinde elektriksel iletkenlikleri düşmüştür. Bu düşüş sonucunda da bu polimer karışımlarında elektro-çekim işlemi ile nanolif üretimi başarıyla gerçekleştirilebilmiştir.

5.1.3. Viskozite ölçümleri

Elektro-çekim yönteminde kullanılan polimer çözeltisinin viskozitesi nanoliflerin morfolojisi açısından kritik bir parametredir. Düşük viskoziteli polimer çözeltilerinde boncuk oluşumu gözlenirken, viskozitenin artmasıyla düzgün lif yapısının elde edildiği bildirilmiştir (Nezerati ve diğerleri, 2013). Kullanılan polimer çözeltisinin viskozitesine bağlı olarak iletkenliği ve yüzey gerilimi değerleri değişiklik gösterecektir. Elektriksel alanda hareket eden jetlerin yüzey gerilimi, yüzey alanını azaltmaya yetecek kadar yüksekse boncuk oluşumu gerçekleşecektir. Ancak bu dönüşüme viskoziteye bağlı olarak viskoelastik kuvvetler karşı koymaktadır. Polimer konsantrasyonundaki artışla viskozitenin artmasına bağlı olarak viskoelastik kuvvetleri çok fazla artırmak ise lif çapında artışa yol açacaktır.

Koaksiyal nanolifleri oluşturan polimer çözeltilerinin viskozite ölçümleri

Koaksiyal nanolifleri oluşturan PCL/kollajen polimer karışımlarının viskozite değerleri incelendiğinde PCL konsantrasyonu sabit tutulup kollajen konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak viskozitenin azaldığı görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.2). Kollajenin en yüksek oranında (%5) dahi karışımın viskozitesinin yüksek olmasının koaksiyal başlığın iç kısmındaki iğneden (18G) akışa engel olmadığı görülmüştür. Kollajen miktarı sabit tutulup PCL konsantrasyonu azaldığında viskozite değerleri azalmıştır. Koaksiyal nanolif üretiminde viskoziteden kaynaklı bir problemle karşılaşılmamış ve düzgün yapıda nanolifler elde edilmiştir.

Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerini oluşturan polimer çözeltilerinin viskozite ölçümleri

PEO ile üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri incelendiğinde PEO konsantrasyonu %5'ten %7'ye çıktığında viskozite değerinde yaklaşık 3 kat artış gözlemlendi (Bkz. Çizelge 4.2). Saf kitozan ve sodyum aljinat çözeltileri PEO ile kombine edildiğinde viskozite değerlerinde artış gözlemlendi. Ancak viskozitedeki artış elektro-çekim işleminde herhangi bir soruna yol açmamış ve kesintisiz üretim sağlanarak düzgün yapıda nanolifler elde edilmiştir.

5.1.4. Yüzey gerilimi ölçümleri

Polimer çözeltisinin yüzey gerilimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak elektro-çekim işleminde önemli bir role sahiptir. Polimerin konsantrasyonu değiştirilerek veya değişik çözücüler kullanılarak farklı yüzey gerilimi değerleri elde edilebilir. Su ile hazırlanan çözeltilerde genellikle yüksek, organik çözücülerle hazırlanmış çözeltilerde düşük yüzey gerilimi değerleri elde edilmektedir. Yüzey geriliminin düşük, viskozitenin yüksek olması düzgün yapıda lif oluşumu açısından önerilmektedir (Li ve diğerleri, 2005).

Koaksiyal nanolifleri oluşturan polimer çözeltilerinin yüzey gerilimi ölçümleri

Koaksiyal nanolifleri oluşturan PCL/kollajen polimer karışımlarının yüzey gerilimi değerleri incelendiğinde kollajen miktarındaki artış yüzey geriliminde artışa neden olurken, PCL miktarındaki azalma yüzey geriliminde düşüşe neden olmuştur (Bkz. Çizelge 4.3). Literatürde de polimer çözeltilerinin konsantrasyonlarındaki değişimin yüzey gerilimini doğrudan etkilediği bulunmuştur (Park ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda da her iki maddenin, karışımın yüzey gerilimi üzerine doğrudan etkisi bulunmaktadır. Nanolif üretiminde kullanılacak polimer karışımının yüzey gerilimi değeri ne kadar düşük olursa uygulanan voltajla jet oluşumu o kadar rahat olacaktır (Chuangchote ve diğerleri, 2009; Park ve diğerleri, 2010). Literatürde Huan ve diğerleri (2015) tarafından yüzey geriliminde azalma olması durumunda boncuk oluşabileceği belirtilirken, çalışmalarımızda boncuk problemi ile karşılaşılmamıştır. Kollajen miktarının %4,5 ve PCL miktarının %1 olduğu karışımın yüzey geriliminin en düşük olmasına bağlı olarak lif oluşumu için diğerlerine göre daha ideal olduğu kanısına varılmıştır.

Kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerini oluşturan polimer çözeltilerinin viskozite ölçümleri

Farklı konsantrasyonda PEO içeren çözeltilerin yüzey gerilimleri incelendiğinde yüzey geriliminin konsantrasyonla azaldığı bulunmuştur. PEO'in surfaktan özelliğinden dolayı polimer konsantrasyonu arttıkça yüzey gerilimi azalmıştır. PEO ile kitozan ya da sodyum aljinat çözeltilerinin karışımlarının da yüzey gerilimi daha düşük bulunmuştur. Bu da elektro-çekim işleminin kesintisiz gerçekleşmesine yardımcı olmuştur.

5.2. Nanolif Üretim Çalışmaları

5.2.1. Koaksiyal nanolif üretim çalışmaları

Nanolif üretim çalışmalarında voltaj, iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe ve akış hızı önemli işlem parametreleridir. Önformülasyon çalışmalarına başlamadan önce koaksiyal nanoliflerin üretiminde 10-25 kV aralığındaki voltaj değerleri denenmiş ve jet oluşumunu sağlayabilen değerle (12 kV) çalışmalara devam edilmiştir. İğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe için de 10-23 cm aralığında değerler denenmiş ve en uzak mesafe olan 23 cm uygun bulunmuştur. 23 cm'den daha yakın değerlerde jetlerden çözücünün buharlaşması tam sağlanamadığı için folyo üzerindeki nanolif tabakasının ıslanarak nanoliflerin çözünmesinin sonuç ürüne zarar verdiği gözlenmiştir. Bu nedenle bu iki değer çalışmalarda sabit tutulmuştur. Koaksiyal başlığın ucunda koaksiyal damlanın oluşmasını etkileyen en önemli parametre çözeltilerin akış hızıdır. Çizelge 3.1'deki formülasyonlarla yapılan önformülasyon çalışmalarında koaksiyal nanoliflerin üretiminde kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilisinin akış hızının koaksiyal yapı oluşumuna doğrudan etkili olduğu belirlendi. A1-A5 formülasyonlarının TEM görüntüleri incelendiğinde akış hızlarına göre 3 farklı durum olduğu gözlemlendi. Kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilinin akış hızı, çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltilisinin akış hızından yüksek olduğu A1 ve A5 formülasyonlarında koaksiyal yapı oluşmaktadır (Bkz. Resim 4.1 ve 4.5). Çekirdek ve kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilerinin akış hızlarının aynı olduğu A2 formülasyonunda koaksiyal nanolif yapısı oluşmaktadır (Bkz. Resim 4.2). Çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltilinin akış hızı, kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilisinin akış hızından yüksek olduğu A3 formülasyonunda koaksiyal başlıkta damlacık oluşumu bozulmakta ve nanolif oluşumu gerçekleşmemektedir (Bkz. Resim 4.3). Bu nedenle çalışmalarda çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltilisinin akış hızının, kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltilisinden düşük veya aynı olması tercih edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda, kollajen içeren nanolif elde etmek için çözücü olarak HFIP kullanıldığı görülmüştür (Shih ve diğerleri, 2006; Dong ve diğerleri, 2009). Çalışmalarda çözücü olarak kaynama noktası düşük (61°C) olan HFIP'nin kullanılmasının, kollajenin toplama plakasına kuru bir şekilde toplanması için avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. A5 formülasyonunda kollajen glasiyal asetik yerine HFIP'de çözülerek hazırlanmış ve

koaksiyal yapının daha net görüntüleri alınmıştır. Bu nedenle daha sonraki formülasyonlarda kollajenin HFIP’de çözülerek kullanılmasına karar verilmiştir.

5.2.2. Koaksiyal yapıda paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmaları

Nanoliflerin paralel yerleşimli elde edilmesi için döner silindir, döner disk ya da ızgara şeklindeki farklı toplayıcılar kullanılmaktadır (Kotaki ve diğerleri, 2006; Haider ve diğerleri, 2013). Ancak çalışmalarda en sık döner silindir yöntemi uygulanmaktadır. Döner silindire nanoliflerin paralel yerleşmesini etkileyen ana parametre dönüş hızıdır. Dönüş hızı arttıkça toplanan nanoliflerin paralellik derecesi artmaktadır. Çok yüksek dönüş hızlarında (4500 rpm) paralel yerleşimin sağlandığı çalışmaların yanı sıra daha düşük hızlarda da (1000 rpm) paralel yerleşim elde edilmiş çalışmalar mevcuttur (Huang ve diğerleri, 2003).

A5 formülasyonunun farklı dönüş hızlarında elde edilen nanoliflerinin (Bkz. Çizelge 3.2) SEM görüntüleri incelendiğinde (Bkz. Resim 4.6-4.10) elektro-çekim cihazında 500 rpm’de rasgele yerleşmiş nanolifler elde edilirken, 1500 rpm’den sonraki dönüş hızlarında paralel nanoliflerin elde edildiği görülmektedir. Çalışmalarımızda yüksek dönüş hızlarında özellikle 2000 rpm’den sonra döner silindirin yarattığı hava akımının etkisiyle nanoliflerin döner silindire toplanamadan savrulması söz konusu olmuştur. Bu nedenle çalışmalarımızda nanoliflerin paralel elde edilmeye başlandığı 1500 rpm dönüş hızında çalışılması uygun bulunmuştur.

5.2.3. Kollajen konsantrasyonunun belirlenmesi

Kollajen ECM’de nanometre ölçeğinde multi-fibrillerden oluşan 3-boyutlu ağ yapısındadır. ECM’nin temel yapı taşı tip 1 ve tip 3 kollajendir. Dokularda bulunan tip 1 kollajen yaklaşık 50-500 nm çapındadır ve çap dağılımı oldukça tekdüzedir. Nanoliflerden oluşan dokunmamış matriks yapısı elektro-çekim yöntemiyle kolaylıkla üretilebilir ve oluşturulan bu yapı kollajen içeren ECM yapısına mükemmel benzerlik gösterir (Matthews ve diğerleri, 2002).

Kollajen içeren koaksiyal nanoliflerle yapılan çalışmalarda kollajenin %2-8 arasında yer aldığı bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010; Wang ve diğerleri, 2014). Sadece kollajen

içeren nanoliflerde ise kollajen konsantrasyonu %10-30 arasında değişmektedir (Fiorani ve diğerleri, 2014). Koaksiyal yapının oluşmasını sağlayabilen en yüksek kollajen konsantrasyonunu bulmak için artan konsantrasyonlarda kollajen kullanılarak koaksiyal nanolif üretim denemeleri yapıldı. Koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmını oluşturan çözeltinin bileşiminin üretim çalışmalarında sabit tutulması nedeniyle, akış hızı haricinde işlem parametrelerinde değişiklik yapılmamıştır. Böylece polimer konsantrasyonunun koaksiyal yapıya doğrudan etkisinin araştırılması mümkün olmuştur. Polimer konsantrasyonu dışında, koaksiyal yapı oluşumunu etkileyecek bir diğer parametre ise akış hızıdır. Bu nedenle farklı kollajen konsantrasyonlarında iki farklı akış hızında (0,25 ml/saat ve 0,35 ml/saat) çalışıldı (Bkz. Çizelge 3.3).

TEM görüntüleri incelendiğinde (Bkz. Resim 4.11-4.24), hem çekirdek-kabuk kısımlarının akış hızlarının (0,25 – 0,25 ml/saat) aynı olduğu, hem de kabuk kısmının akış hızının (0,25 – 0,35 ml/saat) daha yüksek olduğu formülasyonlarda koaksiyal yapıların oluştuğu gözlenmiştir (A6, A8, A10, A12, A14, A16). Ancak kollajen konsantrasyonu %4,5'tan %5'e çıkarıldığında koaksiyal yapının her iki akış hızında da oluşmadığı gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak kollajen konsantrasyonu %5'e yükseltildiğinde, kollajenin koaksiyal damla oluşurken kabuk kısmının çözücüsü olan asetik asitle etkileşime girdiği ve koaksiyal damla yapısının bozulduğu düşünülmektedir. TEM görüntüleri alınırken grid üzerindeki birçok nokta taranmakta ve koaksiyal yapının oluşup oluşmadığı incelenmektedir. Resim 4.22 incelendiğinde A16 formülasyonunda koaksiyal yapının ideal (çekirdek kısmı kabuk kısmının tam ortasında) ve grid üzerindeki liflerin tamamında oluştuğu gözlemlendi. Bu nedenle kollajen konsantrasyonunun %4,5'ta sabit tutulmasına karar verilmiştir.

5.2.4. PCL konsantrasyonunun belirlenmesi

PCL hidrofobik yapıda, düşük erime noktasına sahip, FDA onaylı sentetik bir polimerdir. PCL bakteri ve mantarlar tarafından enzimatik degradasyona uğrarken, hayvan ve insan vücudunda çok yavaş hidrolitik degradasyona uğramaktadır (Woodruff ve Hutmacher, 2010). Bu nedenle farmasötik alanda kontrollü salım ajanı olarak, diş hekimliğinde, cerrahi ipliklerde, yara örtülerinde, implantlarda, kontraseptif cihazlarda ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadır (Woodruff ve Hutmacher, 2010).

Literatürde PCL ile yapılmış birçok nanolif çalışması bulunmaktadır (Haider ve diğerleri, 2015). Bazı çalışmalarda koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmında kontrollü salım ajanı olarak kullanılmıştır (Zhang ve diğerleri, 2004; Jiang ve diğerleri, 2005). Yara örtüsü olarak kullanıldığı çalışmalarda ise doğal polimerlerin mekanik özelliklerine destek vermesi amacıyla kullanılmıştır (Zeybek ve diğerleri, 2014). PCL diğer biyoparçalanabilir polimerlerle karşılaştırıldığında molekül ağırlığındaki artışa bağlı olarak daha çok elastik etki göstermektedir.

PCL üretilen koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmında bulunan ve hidrofobik karakterde bir polimerdir. Literatürde PCL nanoliflerinin, %7,5 - 15 aralığında PCL içeren polimer çözeltilerinden hazırlandığı görülmüştür (Baker ve diğerleri, 2016). Kabuk kısmına PCL yüklenen koaksiyal nanoliflerin hazırlandığı çalışmalarda ise %3 - 10 konsantrasyon aralığında PCL çözeltileri kullanılmıştır (Jiang ve diğerleri, 2005). PCL her ne kadar nanolif yapısına sağlamlık verse de hücre tutunmasını negatif yönde etkileyecektir (Zhang ve diğerleri, 2005b). Bu nedenle kollajen konsantrasyonunun %4,5 olmasına karar verildikten sonra PCL miktarının azaltılarak koaksiyal yapının sağlandığı en düşük PCL konsantrasyonu bulunmaya çalışıldı (Bkz. Çizelge 3.4). İncelenen TEM görüntülerinde (Bkz. Resim 4.25-4.29) A22-A24 formülasyonlarında koaksiyal yapının oluştuğu gözlenmiştir.

5.2.5. Kitozan ve sodyum aljinat nanolif tabakalarının elde edilmesi

Kitozan ve aljinat yara örtüsüne, yara iyileşmesini hızlandırması amacıyla eklenmiştir. Kitozan inflamatuvar evrede hücrelerin yara bölgesine göçünü hızlandırmaktadır (Azuma ve diğerleri, 2015). Böylece makrofajların mikroorganizmaları yok etmesini, ölü hücreleri uzaklaştırmasını ve diğer bağışıklık sağlayıcı hücrelerin uyarılmasını sağlamaktadır. Uyarılan bu hücreler doku organizasyonuna ve yeni damar oluşumuna yardım etmektedirler. Ayrıca hemostatik etkisinden dolayı kanamanın durmasına yardım eder. Kitozanın doku gerilim kuvvetini artırdığını gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Değim ve diğerleri, 2002). Kitozanın bilinen bir diğer etkisi de kuarterner amonyum gruplarının bakteri hücre duvarını parçalayarak gösterdiği antimikrobiyal etkisidir (Kılıç ve diğerleri, 2013). Aljinatların ise yara örtülerinde üç temel etkisi bulunmaktadır (Clark, 2012). Bunlar yara yatağında nem ortamı oluşturmaları, eksudayı absorbe edebilmeleri ve hemostaza yardım etmeleridir. Bunların yanısıra ağrının azaltılmasına, daha az biyolojik

kalıntı olmasına, kokunun giderilmesine ve proteinazların absorbe edilmesine de yardım ederler.

Kitozan ve aljinatın sulu çözeltilerinin yüksek yük yoğunluğu nedeniyle saf halde nanolifleri hazırlanamamaktadır. Literatürde kitozanın trifloroasetik asit kullanılarak saf halde elde edildiği bir çalışma mevcuttur (Sun ve Li, 2011). Ancak trifloroasetik asitin yüksek korozyon özelliği olması, asetik asitten 34000 kat daha kuvvetli olması, hidroflorik asite dönüşme riskinin olması ve inhalasyonunun sağlık açısından riskli olması nedeniyle bu çözücüyle çalışılmamıştır.

Kitozan ve sodyum aljinatın PEO veya PVA gibi polimerlerle nanolifleri hazırlanabilmektedir. PEO, polietilen glikol ile aynı kimyasal yapıda $((\text{--O--CH}_2\text{--CH}_2\text{--})_n\text{OH})$ fakat daha yüksek molekül ağırlıklıdır. Etilen glikolün metalik katalizör sistemlerde polimerizasyonu ile elde edilir ve MA'sı 100 kDa altında olanlar polietilen glikol, yüksek olanlarsa polietilen oksit olarak sınıflandırılır. Polietilen oksit hidrofilik, lineer ve çapraz bağlanmamış yapıda, molekül ağırlığı 100 – 800 kDa arasında değişen sentetik bir polimerdir. PEO suda çözünürlüğü yüksek, hızlı hidrate olabilen, non-toksik yapıdadır. PEO biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olması nedeniyle farmasötik alanda kontrollü ilaç salım sistemlerinde (osmotik pompalı tablet, matris tabletlerde), oftalmik çözeltilerde, biyoadheziv ilaç sistemlerinde ve yara örtüsü formülasyonlarında kullanılmaktadır (Shah ve diğerleri, 2014). Biyoadheziv ilaç sistemleri açısından PEO uzun lineer zincirli yapısından dolayı mukus ile kuvvetli etkileşime girmektedir. İçeriğinde sadece PEO olan Vigilon® isimli yara örtücü ürün bulunmaktadır (Mandy, 1983; Wong ve Dodou, 2015). Vigilon®'un kendi ağırlığı kadar eksuda absorblama özelliği ve oksijen geçirgenliği bulunmaktadır. Vigilon® ile yapılmış bir çalışmada referans ürüne göre daha hızlı yara iyileşmesi sağladığı gösterilmiştir (Mandy, 1983).

PEO nanoliflerinin hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak PEO konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.5'teki formülasyonlar hazırlandı. PEO konsantrasyonu nanolif oluşumunda etkili olmuştur. PEO konsantrasyonu %5 olduğu zaman elde edilen SEM görüntülerinde nanoliflerin deforme olduğu gözlemlendi (Bkz. Resim 4.30). %6 ve %7 konsantrasyonda hazırlanan PEO2 ve PEO3 formülasyonlarının SEM görüntüleri ile PEO1 formülasyonunun SEM görüntüleri

kıyaslandığında PEO2 ve PEO3 formülasyonu ile elde edilen nanolifler daha pürüzsüz yapıdadırlar (Bkz. Resim 4.31 ve 4.32). Dolayısıyla kitozan ve sodyum aljinatla kombinasyonların hazırlanması için polietilen oksitin %6 ve %7 konsantrasyonları kullanıldı.

Rasgele yerleşimli kitozan nanoliflerinin elde edilmesi

Kitozanın hammaddesi olan kitin (β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin) selülozdan sonra en çok elde edilen doğal bir polisakkarittir. Yengeç ve karides kabuklarının ana bileşenidir. Kitinin birçok çözücünde çözünmemesinden deasetilasyon işlemiyle kitozan elde edilmektedir. Kitin ve kitozan biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve toksik olmayan maddelerdir (Acartürk ve diğerleri, 1993; Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2013). Kitozan ilaç taşıyıcı sistemlerde, yara örtülerinde, doku mühendisliğinde ve kök hücre teknolojisinde kullanılmaktadır (Çakmak ve diğerleri, 2009). Kitozan farmasötik alanda başlıca hidrojel, nanolif, boncuk, mikro/nanopartiküller ve köpük formülasyonlarında kullanılmaktadır (Özcan ve diğerleri, 2009; Şenel, 2010; Üstündağ-Okur ve diğerleri, 2014).

İki farklı konsantrasyonda (%6 ve %7) hazırlanan PEO çözeltisi ve %2'lik kitozan çözeltilerinin 80:20 oranındaki karışımlarından nanolifler elde edilmesine rağmen kitozan oranı %30'a çıkarıldığında elektro-çekim işlemi sağlanamamıştır. PEO-CH1 ve PEO-CH2 formülasyonlarında PEO konsantrasyonunun azalması viskozite, yüzey gerilimi ve iletkenliğin azalmasına neden olmuştur. Ancak PEO-CH2 formülasyonunda nanolif üretimi kesintisiz bir şekilde gerçekleştirilememiştir. PEO-CH1 formülasyonunda ise polimer karışımının yüzey geriliminin daha düşük olmasına bağlı olarak kesintisiz üretim sağlanmış ve bu formülasyonla çalışmalara devam edilmiştir.

Rasgele yerleşimli sodyum aljinat nanoliflerinin hazırlanması

Aljinat çözeltileri içerdiği iyonlardan dolayı yüksek elektriksel iletkenlik gösterirler. Bu nedenle tek başına çözeltilerinden nanolifleri elde edilememektedir ve başka bir polimerle karışımı hazırlanarak nanolifleri elde edilmektedir. Literatürde PEO ve PVA ile aljinat nanolifleri elde edilmiştir (Safi ve diğerleri, 2007; Hu ve diğerleri, 2015)

İki farklı konsantrasyonda (%6 ve %7) hazırlanan PEO çözeltisi ve %2'lik sodyum aljinat çözeltilerinin 70:30 oranındaki karışımlarından nanolifler elde edilmesine rağmen aljinat oranı %40 çıkarıldığında elektro-çekim işlemi sağlanamamıştır (Bkz. Çizelge 3.7). Kitozan çözeltilerine benzer şekilde elektriksel iletkenlik değerleri incelendiğinde özellikle saf halde yüksek elektriksel iletkenliğe sahip sodyum aljinat çözeltisi PEO çözeltisi ile kombine edildiğinde viskozite, yüzey gerilimi ve iletkenlikte azalma söz konusudur. Bu azalma ile sodyum aljinatın elektro-çekim işlemi ile nanolif üretimi gerçekleştirilebilmiştir. PEO-SA1 ve PEO-SA2 formülasyonlarının SEM görüntüleri incelendiğinde her iki formülasyonda nanolifler homojen ve pürüzsüz yapıdadır (Bkz. Resim 4.35 ve 4.36).

Paralel yerleşimli kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin elde edilmesi

%7 PEO çözeltisi ile hazırlanan kombine polimer çözeltileri, %6 konsantrasyonda hazırlanan kombine çözeltilere kıyasla daha yüksek viskoziteye sahiptir. Yüksek viskoziteden dolayı bu çözeltilerin akışı zordur ve jet oluşumunun durması nedeniyle kesintisiz üretim sağlanamamaktadır. Elektro-çekim işleminde jet oluşumu durursa yeniden jet oluşurken nanolif tabakasına polimer çözeltilerinin damla halinde geçişi söz konusu olabilir. Toplayıcı üzerinde kuru haldeki nanolif tabakasına polimer çözeltisinin damla şeklinde sıçraması, nanoliflerin çözücü ile çözünmesine ve nanolif yapısının kaybolmasına neden olabilir. %6 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden akışın daha rahat olması nedeniyle devamlı lif çekimi gerçekleştirilebilmiştir. Üretim yönteminin tekrarlanabilir olması istenildiği için %6'lık PEO karışımı ile hazırlanan polimer karışımları kullanılmıştır.

Sabit plakaya toplanan rasgele yerleşimli nanolifler elde edildikten sonra paralel yerleşimli nanoliflerin elde edilmesi çalışmalarında toplayıcı kısmında döner silindir bulunan elektro-çekim cihazı kullanılmıştır. Dolayısıyla işlem parametrelerinde akış hızı sabit tutularak üretimi sağlayan voltaj ve mesafe parametreleri yeniden belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.8). Bu parametrelerle üretilen kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin paralel yerleşimli olduğu SEM görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Bkz. Resim 4.37 ve 4.38).

Yapılan çalışmalar sonucunda kabuk kısmı doksisiklin/PEO ve çekirdek kısmı PCL/kollajenden oluşan koaksiyal nanoliflerin üzerine önce kitozan nanolifleri, sonra

aljinat nanolifleri toplanarak B1, B2 ve B3 (Bkz. Çizelge 3.9) sonuç formülasyonlar halinde üretilmiştir.

5.3. Hazırlanan Koaksiyal Nanoliflerin Karakterizasyon Çalışmaları

Üç farklı katman içeren yara örtüsünün en alt katmanı koaksiyal nanoliflerden oluşmaktadır. Bu nedenle karakterizasyon çalışmalarına en alt katmanı oluşturan koaksiyal nanoliflerden başlanmıştır.

5.3.1. FT-IR çalışması

Koaksiyal nanoliflerin yapısına giren polimerler ve doksisisiklinin FT-IR spektrumları Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Koaksiyal nanoliflerin FT-IR spektrumu incelendiğinde,

- Kollajenin karakteristik olan amid I ve II bantları sırasıyla 1613 ve 1460 cm^{-1} 'de (Chen ve diğerleri, 2009),
- Doksisisiklinin için CH_2 ve CH gerilim bantı 1459 cm^{-1} 'de (Kogawa ve diğerleri, 2014),
- PCL için karakteristik olan asimetric CH_2 gerilim ve karbonil gerilim bantları 2944 cm^{-1} ve 1725 cm^{-1} 'de (Elzein ve diğerleri, 2004),
- PEO için karakteristik olan C-H gerilimi 2869 cm^{-1} ve CH_2 salınım bantı 842 cm^{-1} 'de (Gondoliya ve diğerleri, 2011) görülmektedir.

Bu çalışma ile 4 maddenin de koaksiyal nanolif yapısına girdiği görülmektedir.

5.3.2. Ortalama lif çapının hesaplanması

Nanolifler nanoboyuttaki lifler için kullanılan bir terimdir. Lif çapının nanometre boyutuna inmesi yapıya spesifik yüzey alanında artış, yüksek porozite gibi özellikler kazanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hazırlanan yara örtülerini oluşturan liflerin nanometre ölçeğinde ($<1\mu\text{m}$) olması hedeflenmiştir. Nanoliflerin çapını etkileyen en önemli iki parametre polimer konsantrasyonu ve akış hızıdır. Elektro-çekim işleminde polimer konsantrasyonu arttıkça genellikle nanolif çapı artsa da literatürde çözücü farkına bağlı olarak tam tersi sonuçlara da rastlanmaktadır. Poliamid-66 polimerinin %7, %10, %14 ve %18 konsantrasyonlarındaki çözeltilerinden nanolif elde edildiği bir çalışmada ortalama nanolif çapları sırasıyla 125, 273, 490 ve 713 nm olarak bulunmuştur (Alghoraibi, 2014).

Beachley ve Wen (2009) saf PCL nanolifleri üzerine yaptıkları çalışmada da artan PCL konsantrasyonunun ortalama lif çapını anlamlı olarak artırdığını bulmuşlardır. Fiorani ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada kollajeni farklı çözücülerde çözerek nanolifler elde etmişlerdir. Trifluroetanolda %10 konsantrasyonda hazırlanan çözeltiden elde edilen kollajen nanoliflerin ortalama çapları 320 nm iken, seyreltik asetik asitte %30 oranındaki çözeltiden ortalama 150 nm çapında kollajen nanolifleri elde edilmiştir. Dolayısıyla aynı polimerin konsantrasyonu artmasına rağmen farklı çözücülerde hazırlanması nanolif çapı üzerine etki etmektedir.

Yaptığımız çalışmada hazırladığımız nanoliflerde kollajen konsantrasyonu artışının nanoliflerin ortalama çapında artışa neden olduğu gözlemlendi (Bkz. Çizelge 4.4). Ayrıca kollajen konsantrasyonu sabit tutulup PCL konsantrasyonu artırıldığında lif çapında artış gözlemlenmiştir.

Akış hızı arttıkça daha fazla jet oluşacağı için nanolif yapısına giren madde miktarının artması beklenmektedir. Akış hızının lif çapına olan etkisi incelendiğinde, kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızının, çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızına göre daha hızlı olması nanoliflerin ortalama lif çapında artışa neden olmuştur (Bkz. Çizelge 4.4). Goncalves, Silva, Picciani ve Diaz (2015) yaptıkları çalışmada da çekirdek kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızı sabit tutulup, kabuk kısmı oluşturan polimer çözeltisinin akış hızı artırıldığında lif çapının arttığı gözlemlenmiştir. Hazırlanan tüm formülasyonlarda lif çapları mikron altı olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir.

5.3.3. Mekanik özelliklerin incelenmesi

Nanoliflerin mekanik özellikleri doku mühendisliğinde başarılı uygulamaları için kritik öneme sahiptir. Örneğin, deri replasmanlarında başarısızlığının önemli bir nedeni, greft ile deri dokusu arasındaki uyumsuzluğu nedeniyle ortaya çıkan iskemi ve besin yetersizliğidir (Pan ve diğerleri, 2014). ECM'yi taklit edecek yara örtüsünü oluşturan nanolifler ve cilt dokuları arasında uygun mekanik uyumluluk gereklidir. Bu nedenle yara örtülerinin mekanik özelliklerinin, iyi bir esneklik ve harekete uyum sağlamasını sağlayarak insan derisinin özelliklerine benzer olması istenilir. İnsan derisinin gerilme direnci 1-40 MPa olarak belirlenmiştir (Sander ve diğerleri, 2014).

Nanoliflerin paralel yerleşimli olması, hem mekanik özellikleri ve hem de hücre tutunması açısından rasgele toplanmış nanoliflere kıyasla avantaj sağlamaktadır (Shang ve diğerleri, 2010; Yeganegi ve diğerleri, 2010).

Doku iskelesi olarak sadece doğal polimerlerin kullanıldığı çalışmalarda oluşturulan yapıların mekanik olarak zayıf olduğu bildirilmiştir. Kollajenle yapılan çalışmalarda yapının mekanik olarak sağlamlığını artırmak için PCL kullanılmıştır (Lee ve diğerleri, 2010; Baylan ve diğerleri, 2013). PCL konsantrasyonu belirlenmesi için yapılan çalışmalarda kullanılan formülasyonların yanı sıra üç farklı konsantrasyonda kollajen içeren nanoliflerin (A5-2, A10 ve A16 formülasyonları) mekanik özellikleri de incelendi. Çekirdek kısmı oluşturan PCL konsantrasyonu sabitken kollajen konsantrasyonunun artması nanoliflerin hem kopma uzaması hem de gerilim kuvvetinde artışa neden olmuştur ve en yüksek değer %4,5 kollajen konsantrasyonunda elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.7 ve 4.8). Saf PCL nanoliflerinin gerilme direnci 3,51 MPa iken nanoliflere kollajen eklenmesi gerilme direncini 4,06 MPa'ya çıkartmıştır (Krithica ve diğerleri, 2012). Aynı şekilde PCL/kollajen nanolifleri ile yapılmış başka bir çalışmada da saf PCL nanoliflerinin gerilme direnci 3,50MPa, kopma uzaması %54 iken PCL/kollajen nanoliflerinin gerilme direnci 5,00MPa'ya kopma uzaması %60'a çıkmıştır (Hackett ve diğerleri, 2010).

Çekirdek kısmında %4,5 oranında kollajen içermesine karar verilen nanoliflerde, PCL konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, PCL konsantrasyonunun azalması özellikle %2'den sonra kopma uzaması değerinde anlamlı azalmaya neden olurken (Bkz. Şekil 4.9 ve 4.10) gerilme direncini anlamlı olarak etkilememiştir. Nanoliflerin kopma uzaması değerinin azalmasının yapıya giren elastik özellikteki PCL'nin azalması ile orantılı olduğu görülmektedir.

5.3.4. Yapışma özelliklerinin incelenmesi

Yara örtülerinin ikincil bir örtüye ihtiyaç duymadan kendi başına yaraya yapışabilir özellikte olması istenen bir özelliktir. Yaraya ilk temas edecek olan aljinat ve kitozan iyi biyoadhezif özellik gösteren polimerlerdir (Gaserod ve diğerleri, 1998; El-Kamel ve diğerleri, 2002; Martinac ve diğerleri, 2005; Suknuntha ve diğerleri, 2011). Ayrıca yara örtüsündeki PEO de biyoadhezif özellik göstermektedir (Thumma ve diğerleri, 2008; Kapil ve diğerleri, 2010). Şekil 4.11 ve 4.12'deki çalışma sonuçları incelendiğinde PCL

miktarındaki azalma biyoadezyon işi değerlerinde artışa neden olmuştur. Nanolif yapısında yer alan hidrofobik yapıdaki PCL polimerinin miktarı azaldıkça nanolifler daha iyi ıslanabilmekte ve daha iyi yapışma özelliği göstermektedir. PCL koaksiyal nanoliflerin iç kısmında olmasına rağmen yapışma özelliklerini etkilemiştir. Bu sonuçlar PCL'nin hidrofobik yapısından dolayı beklenen ve istenen bir sonuçtur.

5.3.5. Temas açılarının ölçülmesi

Temas açısı hazırlanan yara örtülerinin ıslanabilirliği açısından önemli bir parametredir. Temas açısının 90°'den düşük olması yapının hidrofilik olduğunun göstergesidir (Kubiak ve Mathia, 2014). Piyasadaki birçok yara örtüsü hidrofilik özelliktedir. Hidrofilik yara örtülerinin en önemli avantajı hücre çoğalması için uygun ortam oluşturmastır (Li ve diğerleri, 2013).

Çalışmalarımızda kullandığımız polimerler PCL haricinde hidrofilik özelliktedir. Literatürde yapılan çalışmalarda saf PCL nanoliflerinin temas açısı 130° civarındadır (Yan ve diğerleri, 2012). Bu nedenle PCL miktarının formülasyonda mümkün olduğunca düşük olması tercih edilerek konsantrasyonu azaltılmıştır. Beklendiği gibi PCL konsantrasyonundaki azalma temas açısının azalmasına neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.13). Hidrofobik özellikteki PCL konsantrasyonu azaldıkça yara örtüsü daha hidrofilik hale gelmiştir.

Koaksiyal nanoliflerle yapılan çalışmalar sonucunda kollajen konsantrasyonu en fazla ve PCL oranı %1, %1,5 ve %2 olan formülasyonların üzerine kitozan ve sodyum aljinat nanolif katmanlarının toplanmasına karar verildi (Bkz. Çizelge 3.9).

5.4. B1, B2 ve B3 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

5.4.1. Mekanik özelliklerin incelenmesi

Koaksiyal üretim yöntemiyle hazırlanan nanoliflerin üzerine PEO-CH1 ve PEO-SA1 nanolifleri toplanıp yara örtüsü haline getirildiğinde kopma uzaması testlerinde kitozan ve sodyum aljinat nanoliflerinin sonuçta her üç formülasyonun da aynı kopma uzaması değerine sahip olduğu görülmektedir ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.14). Her üç formülasyonun da kitozan ve sodyum aljinat nanolifleri aynı işlem parametreleri ile üretildiği için kopma

uzaması değerleri de aynı olmaktadır. Sadece A22 formülasyonunun kopma uzaması değeri B3 formülasyonuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Bunun nedeni test esnasında nanolifler gerilirken önce kitozan ve aljinat nanoliflerinin kopması ve bunun yazılım tarafından kopma uzaması değeri olarak belirlenmesidir.

Formülasyonların gerilim direnci değerleri incelendiğinde koaksiyal tabakaya kıyasla gerilim direncinde artış gözlenmektedir (Bkz. Şekil 4.15). B2 ve B3 formülasyonlarındaki artış anlamlı iken B1 formülasyonuna kitozan ve sodyum aljinat nanolif katmanlarının eklenmesi anlamlı artışa neden olmamıştır. Hem koaksiyal nanoliflerin, hem de sodyum aljinat ve kitozan nanoliflerin birarada bulunması nanolifin daha zor kopmasına neden olmuştur.

Nanoliflerin yara örtüsü olarak kullanıldığı bir çalışmada kopma uzaması değerinin %1,3 olması uygun bulunmuştur. (Cai ve diğerleri, 2010). Ayrıca literatürde insan derisinin gerilme direnci 1-40 MPa olarak belirtilmiştir (Sander ve diğerleri, 2014). Dolayısıyla her üç formülasyonun da gerilme direnci değerleri (4,08-2,5 MPa) ve kopma uzaması değerlerinin (%9,35-7,6), insan derisinin mekanik özellikleri ile uyumlu olabileceğine karar verilmiştir.

5.4.2. Yapışma özelliklerinin ölçülmesi

Koaksiyal nanoliflerin üzerine kitozan ve aljinat nanoliflerinin toplanması yapışma özelliğinde artışa neden olmuştur ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.16). Bunun nedeni kaplama karışımlarında bulunan PEO, sodyum aljinat ve kitozanın iyi biyoadhezif özellik göstermesidir. Nanoliflerin kaplama sonrası yapışma özelliğindeki artışın kitozan ve sodyum aljinat polimerlerinin glikoproteince zengin yara sıvısı ile temasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Müsinin yapısındaki doku yüzeyinin negatif yüklü amin grupları, pozitif yüklü kitozan ve sodyum aljinatla etkileşime girmekte ve biyoadezyon işinin artmasına neden olmaktadır (Sezer ve diğerleri, 2007). Sıçan derisi ile tavşan derisinin yapışma özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda B1 formülasyonunun tavşan derisinde biyoadezyon işi $0,151 \text{ mJ/cm}^2$ iken sıçan derisinde $0,485 \text{ mJ/cm}^2$ 'ye anlamlı olarak artmıştır (Bkz. Şekil 4.17) ($p<0,05$). Aktar ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada metaklopramid yüklü transdermal filmlerin in vitro biyoadezyon özelliklerini incelemiştir. Hazırladıkları transdermal filmlerin biyoadezyon

işı değerlerini $0,023-0,035 \text{ mJ/cm}^2$ aralığında bulmuşlardır. Silva ve diğerlerinin (2008) kitozan içeren film formülasyonları hazırladıkları bir çalışmada ise insan derisini kullanarak yaptıkları deneylerde biyoadhezyon değerlerini $4,9 \times 10^{-5} - 311,2 \times 10^{-5} \text{ mJ/cm}^2$ aralığında bulmuşlardır. Çalışma sonucunda $311,2 \times 10^{-5} \text{ mJ/cm}^2$ değeri biyoadeziflik açısından uygun bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise yara örtüsü olarak hazırlanan kitozan ve fukoidan içeren filmlerin tavuk derisinde yapılan deneylerde biyoadhezyon ışık değerleri $0,076 - 1,158 \text{ mJ/cm}^2$ aralığında bulunmuş ve yara örtüsü olarak kullanılması biyoadhezyon açısından uygun olarak değerlendirilmiştir. Tüm literatürler göz önünde bulundurulduğunda hazırlanan B1, B2 ve B3 formülasyonlarının biyoadhezyon değerleri uygun olarak değerlendirilmiştir.

5.4.3. Temas açılarının ölçülmesi

Koaksiyal nanoliflerin üzerine toplanan aljinat ve kitozan nanoliflerin temas açısında $20-27^\circ$ 'lik bir artışa neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.18). Bunun nedeni ise PEO-CH1 ve PEO-SA1 nanolifleri suyla temas ettiğinde jelleşerek koaksiyal tabakaya suyun penetrasyonunu geciktirmektedir. Her üç nanolif formülasyonu için 30 saniye olan deney süresini 60 saniyeye uzattığımızda kaplanmamış koaksiyal nanoliflerle aynı temas açısı değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Her üç formülasyonun temas açısı değerlerinin 90° 'den düşük olması yara örtüsünün hidrofilik yapıda olduğunu göstermektedir. Yara örtüsünün ıslanabilirliğinin yüksek olması, doku sıvısının yara örtüsü üzerinde kolayca dağılmasını sağlayarak oksijen ve besin permeabilitesini düzenlemeye yardımcı olmaktadır.

Sonuç formülasyonların yapışma, mekanik ve ıslanabilirlik özellikleri incelendikten sonra B1 ve B2 formülasyonları uygun bulunup, daha ileri karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

5.5. B1 ve B2 Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

5.5.1. Porozite ve por çapı dağılımı ölçümleri

Doku mühendisliğinde kullanılacak nanoliflerin ECM'yi taklit edebilmesi için mutlaka poröz yapıda olması gerekmektedir (Chen ve diğerleri, 2010). Yara iyileşmesinde kullanılacak bir yara örtüsünün porozitesi, hava geçirgenliği ve ıslanabilirliği yara

iyileşmesini etkileyen önemli özelliklerdendir. Literatürde kollajen ve poliüretan kullanılarak hazırlanan koaksiyal nanoliflerin porozitesi %62 – 68 arasında bulunmuştur (Chen ve diğerleri, 2010). Bir başka çalışmada ise kitozan ve PEO kullanılarak hazırlanan nanoliflerin porozitesi %80 civarında bulunmuştur (Bizarria ve diğerleri, 2014). Literatürde aljinatlarla hazırlanan nanoliflerin porozitesinin ölçüldüğü bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Polimerik nanoliflerin porozitesinin genellikle %50-60 olduğu bildirilmiştir (Malik ve diğerleri, 2015). Yara örtüsü olarak kullanılacak nanoliflerin de ECM'yi taklit edebilmesi ve hücre tutunmasını sağlayıp çoğalmaları için uygun ortam yaratması açısından porozitesinin yüksek olması istenmektedir (Sharma ve diğerleri, 2015). Biyomedikal uygulamalarda kullanılması amacıyla üretilen farklı oranlarda PLCL/PCL içeren nanoliflerinin porozitesi %56-63 arasında bulunmuştur (Kwon ve diğerleri, 2005). Çalışmamızda da hazırladığımız formülasyonların porozitesi, ImageJ programı ile hesaplandığında %50,5-61,1 arasında bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.19). Bu nedenle hazırlanan yara örtülerinin yeterli poroziteye sahip olduğu kanısına varılmıştır. A23 ve A24 formülasyonlarına kitozan ve aljinat nanolifleri toplandığında da benzer por çapı dağılımı histogramları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.20 ve 4.21).

5.5.2. Spesifik yüzey alanı ölçümleri

Nano boyuttaki lifler mikro boyuttaki liflere kıyasla 1000 kat daha fazla yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Nanoliflerin yüksek yüzey alanı sayesinde yara iyileşmesinde hemostazı desteklediği bildirilmiştir (Abrigo ve diğerleri, 2014). Ayrıca nanolifler spesifik yüzey alanının geniş olması sayesinde sıvı emiliminde de rol oynamaktadırlar. Geniş yüzey alanı ile yüksek porozite sayesinde gaz alışverişine imkan sağlanırken, yaranın kuruması ve dehidrasyonu engellenmiş olur. Yara örtüsü olarak kullanılacak nanoliflerin spesifik yüzey alanları $5 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dan yüksek olması istenmektedir. (Khan ve diğerleri, 2013).

Literatürde polikarbonat nanoliflerinin spesifik yüzey alanları $2,4 - 3,5 \text{ m}^2/\text{g}$ arasında, PCL ve jelatin nanoliflerinin $7,3$ ve $17,6 \text{ m}^2/\text{g}$, saf kollajen nanoliflerinin $28,3 \text{ m}^2/\text{g}$ ve siklodekstrin yüklenmiş poliester nanoliflerin spesifik yüzey alanlarını $0,57 - 6,03 \text{ m}^2/\text{g}$ arasında bulunmuştur (Lee ve diğerleri, 2010; Dubsky ve diğerleri, 2012; Kayacı ve

diğerleri, 2013; Zhou ve diğerleri, 2015). Çalışmalarımızda A23, A24, B1 ve B2 formülasyonlarının çok noktalı BET analiz sonuçlarına göre spesifik yüzey alanlarının $9 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dan büyük olduğu bulundu (Bkz. Şekil 4.22). PEO-CH1 ve PEO-SA1 nanolifleri ile yapılan kaplama işlemi spesifik yüzey alanını bir miktar artırmıştır. Bu sonuçlara göre hazırlanan nanoliflerin spesifik yüzey alanı değerleri $5 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dan büyük olduğu için uygun bulunmuştur.

5.5.3. Doksisisiklinin miktar tayini yöntem validasyonu

Miktar tayini yöntemleri içerisinde kolay bir yöntem olan UV spektrofotometre yöntemi, validasyon çalışmaları sonucunda uygun bulunmuştur. Bu nedenle doksisisiklinin miktar tayini ve salım hızı çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.

Doksisisiklinin 400-200 nm dalga boyu aralığında iki farklı dalga boyunda maksimum absorbans verdiği gözlenmiştir ve literatürle uyumludur (Bkz. Şekil 4.24) (Kogawa ve Salgado, 2012). Bunlardan 346 nm'deki dalga boyunun kalibrasyon grafiğinin r^2 değeri daha yüksek bulunduğu için bu değer kullanılması karar verilmiştir (Bkz. Şekil 4.24). Ayrıca USP36'da doksisisiklin içeren geciktirilmiş salım yapan tabletlerin salım çalışmalarında doksisisiklin miktar tayininde kullanılacak yöntemde UV dedektörde dalga boyu olarak 346 nm kullanılması önerilmektedir. Geri elde etme çalışmasında bulunan değerler miktar tayini yönteminin geçerli ve doğru olduğunu göstermektedir (Bkz. Çizelge 4.5). Deneyiçi ve deneylerarası tekrarlanabilirlik çalışmalarında % bağıl sapma sonuçları % 2'nin altında bulundu (Bkz. Çizelge 4.6 ve 4.7). Formülasyonlarda kullanılacak diğer yardımcı maddeler 400–200 nm dalga boyu aralığında herhangi bir pik vermedi (Bkz. Şekil 4.23). Tüm bu sonuçlar kullanılan miktar tayini yönteminin valide edildiğini göstermektedir.

5.5.4. Doksisisiklin salım hızı çalışmaları

Nanoliflerden etkin madde salım hızı çalışmalarında literatürde farklı yöntemlerin kullandığı görülmüştür. Jahangiri ve diğerleri (2014) triamsinolon yüklenmiş PLGA nanoliflerden ilaç salım hızı çalışmalarını 300 ml pH 6.8 fosfat tamponunda palet yöntemini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Paaver ve diğerleri (2014) hazırladıkları nanoliflerden ilaç salım çalışmalarını döner sepet yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise nanolifler 15 ml fosfat tamponu içeren test tüpüne yerleştirilmiş ve farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak ilaç salım hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Loh ve diğerleri, 2010). Koaksiyal nanoliflerden etkin madde salımının incelendiği bir çalışmada ise palet yöntemi kullanılmıştır (Yu ve diğerleri, 2013). Disk üzerinde palet yöntemi topikal ve transdermal formülasyonlarda ilaç salım hızı çalışmalarında USP’de yer alan bir yöntemdir. Nanoliflerin salım ortamında baskete yapışmasını veya yüzeye çıkmasını engellemek açısından disk üzerinde palet yöntemiyle çalışılması uygun bulunmuştur.

Tez kapsamında hazırlanan yara örtüsünün içerdiği doksisisiklinin yara sıvısına hızla karışması planlanmıştır. Bu amaçla da suda çözünürlüğü yüksek olan doksisisiklin suda çözünebilir bir polimer olan PEO ile koaksiyal nanoliflerin kabuk kısmına yüklenmiştir. Hidrofilik polimer kullanılarak hazırlanan nanoliflerden etkin maddenin salım hızı yüksektir. Örneğin meloksikamın PVP ile hazırlanan nanoliflerinin 120 dakika içerisinde tüm etkin maddeyi ortama verdiği bulunmuştur (Samprasit ve diğerleri, 2015a). Benzer şekilde donepezil HCl ve PVA içeren nanoliflerle yapılmış bir çalışmada yine etkin maddenin tamamının 30 saniye içerisinde salındığı bulunmuştur (Nagy ve diğerleri, 2010). Nebivolol ve PVA içeren nanoliflerle yapılan bir çalışmada etkin maddenin asidik ortamda 15 içerisinde tamamı salınmıştır (Sipos ve diğerleri, 2016). Ancak Chaturvedi ve diğerlerinin (2013) yaptıkları bir çalışmada doksisisiklin ve hidrofobik özellikteki PCL kullanılarak hazırladıkları nanoliflerden salım hızı 6 gün sonunda %30-40 arasında bulunmuştur.

Literatürde yara üzerine uygulanacak formülasyonlarda etkin madde salım hızı çalışmalarında çözünme hızı ortamı olarak distile suyun kullanıldığı görülmüştür (Mehta ve diğerleri, 2013; Maver ve diğerleri, 2015; Singh ve diğerleri, 2016). Bu nedenle salım hızı çalışmaları distile suda yapılmıştır.

Hazırlanan nanoliflerden doksisisiklinin salımı incelendiğinde, koaksiyal tabakanın çekirdek kısmında %1 PCL içeren A24 formülasyonundan doksisisiklin salımının en yüksek olduğu ve 5 dk içinde %85’ten fazla maddenin salındığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.26). A24 formülasyonunda hidrofobik bir polimer olan PCL, koaksiyal nanoliflerin çekirdek kısmında düşük konsantrasyonda yer aldığı için doksisisiklinin salım hızı üzerine etkisi diğer formülasyonlara göre daha azdır.

Koaksiyal nanoliflerin üzerine kitozan ve aljinat nanolifleri toplandıktan sonra hazırlanan formülasyonlarda kaplama işleminin doksisiklinin salım hızını bir miktar geciktirdiği görülmektedir (Bkz. Şekil 4.26). Buna rağmen 15. dakikada A24 ve B1 formülasyonlarının aynı oranda etkin maddeyi saldıkları görülmektedir.

B1 ve B2 formülasyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda B1 formülasyonu sonuç formülasyon olarak seçilmiştir. Bu seçimde,

- PCL konsantrasyonunun en az,
- Mekanik ve yapışma özelliklerinin yüksek,
- Temas açısının düşük,
- Porozitenin ve spesifik yüzey alanının yeterli (%50-60, $>5\text{m}^2/\text{g}$),
- Doksisiklin salım hızının yüksek olması göz önünde bulundurulmuştur.

5.6. B1 Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

5.6.1. Nanoliflerde doksisiklin miktar tayini çalışması

Doksisiklin miktar tayini çalışması sonuçlarına göre doksisiklin alüminyum folyonun 3 cm'lik orta kısmında homojen olarak ($260\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dağılmıştır. Dolayısıyla bütün deneylerde bu kısımdan alınan numunelerin kullanılmasına dikkat edilmiştir. Doksisiklinin MMP inhibitörü olarak yara iyileştirici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 200-375 μg dozlarda topikal yoldan uygulanmıştır ve tedavi gruplarında yara iyileşmesi daha hızlı olmuştur (Anumolu, 2011). Bu nedenle nanoliflere yüklenen doksisiklin miktarı uygun bulunmuştur.

5.6.2. UV sterilizasyon çalışmaları

Doku mühendisliğinde veya biyomedikal uygulamalarda kullanılacak nanoliflerin sterilize edilmesi gereklidir (Braghirolli ve diğerleri, 2014). Bu amaçla nanolifler farklı sterilizasyon yöntemleri ile sterilize edilebilmektedir. Her yöntemin kendine göre avantajı ve dezavantajları bulunmaktadır.

Polietilen tereftalat nanoliflerinin 121°C 'de 15 dk buhar sterilizasyonu işlemi sonunda kopma uzamasının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Düzyer ve diğerleri, 2013).

Çalışmamızda otoklav ile sterilizasyonu kullanmamamızın nedeni polimerlerin erime noktalarından çok yüksek sıcaklıkta çalışılması gerekliliğidir. Gama radyasyonu ile sterilizasyonun en önemli dezavantajı ise nanoliflerin mekanik özelliklerini ciddi derecede olumsuz yönde etkilemesidir (Dai ve diğerleri, 2016). Etilen oksit sterilizasyonunun farklı sterilizasyon yöntemleri arasında polietilen tereftalat nanoliflerinin yüzeyini en fazla etkileyen yöntem olduğu bildirilmiştir (Düzyer ve diğerleri, 2013). Nanolifler benzalkonyum klorür çözeltisi (2 dakika) veya etil alkolde (1 saat) bekletilerek de sterilize edilmektedirler (Robin ve diğerleri, 2009; Dai ve diğerleri, 2015). Ancak kullandığımız polimerlerin bu çözücülerde çözünüyor olması nedeniyle çalışmalarımızda bu yöntem kullanılamamıştır.

UV ile sterilizasyon genellikle laboratuvar ölçekli sterilizasyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar UV radyasyona doğrudan maruz kaldıklarında inaktive olmaktadır. İşlem süresi materyalin cinsine bağlı olarak 20 dakikadan başlamaktadır. Nanoliflerin sterilizasyonu için sıklıkla bu yöntemin kullanıldığı literatürde görülmüş ve çalışmalarımızda kullanılmasına karar verilmiştir (Düzyer ve diğerleri, 2013; Dai ve diğerleri, 2015). Farklı sterilizasyon yöntemlerinin nanoliflerin mekanik özellikleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da UV sterilizasyon en az hasar veren yöntem olarak bulunmuştur (Düzyer ve diğerleri, 2013).

Hazırladığımız yara örtüleri, UV lamba altında alt ve üst yüzeyi ayrı ayrı bekletilerek sterilize edilmiştir. Yara örtülerinin tek yüzeyinin sterilize edildiği çalışma sonuçlarında mikrobiyal üreme görülmesinden sonra alt ve üst yüzeyin ayrı ayrı sterilize edilmesine karar verilmiştir.

UV sterilizasyon süresinin B1 formülasyonunun ortalama lif çapı, temas açısı, mekanik, biyoadeziv özellikleri ve doksisisiklin miktarı üzerine etkinliği araştırılmıştır (Bkz. Çizelge 4.8). Yapılan deney sonuçlarında yara örtüsünün alt ve üst yüzeyinin ayrı ayrı 1 ve 2 saatlik UV sterilizasyona maruz kalması, nanoliflerin özelliklerinde anlamlı değişikliğe yol açmamıştır. Ancak 3 saatlik UV sterilizasyon süresi temas açısı ve gerilme direnci değerlerini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). Üç farklı sterilizasyon süresi uygulanan örneklerde doksisisiklin miktarında anlamlı değişiklik olmamıştır ($p>0,05$). Ramesh ve diğerleri (2010) doksisisiklin hiklatın zorlanmış koşullarda stabilitesini araştırdıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. Doksisisiklinin toz hali 48 saat boyunca UV

radasyona ve 105°C sıcaklığa maruz bırakılmış, ayrıca 1M HCl, 1M NaOH ve %10 H₂O₂ içindeki çözeltileri 80°C'de 3 saat bekletilmiştir. HPLC ile doksisisiklin miktarının tayin edildiği çalışma sonucunda, UV radyasyona, yüksek sıcaklığa ve 1M HCl'ye maruz bırakılan örneklerde, pik alanları ve gecikme süresi değişmezken, 1M NaOH ve %10 H₂O₂ içindeki örneklerde anlamlı sapmalar meydana gelmiştir.

Hem tiyoglikolatlı besi yeri hem de agarlı besiyerinde yapılan sterilizasyon etkinliği çalışma sonuçlarına göre 2 ve 3 saatlik numunelerde mikrobiyal üreme meydana gelmediği için her bir yüzey için 2 saatlik UV sterilizasyonun yeterli olduğuna karar verilmiştir.

5.6.3. Stabilite çalışmaları

Otoklav poşeti ile ambalajlanan B1 formülasyonuna ait numunelerin her üç ortamda yapılan stabilite çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde sıcaklığın ve bağıl nemin etkili olduğu ve 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde bekletilen numunelerin renginin değiştiği, 4°C ise değişim olmadığı gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.42). Bu numunelerin SEM görüntüleri incelendiğinde de 4°C dışındaki ortamlarda bekletilen numunelerin lif yapısının bozulduğu gözlenmektedir (Bkz. Resim 4.43). Bu nedenle sadece 4°C'de bekletilen numunenin 12 aylık stabilite çalışmaları tamamlanmış ve incelenen stabilite test parametrelerinde yara örtüsünün kullanımını olumsuz etkileyecek bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Bkz. Resim 4.44, Çizelge 4.9). Nanoliflerin uzun süreli stabilite çalışmalarının kısıtlı sayıda olduğu görülmektedir. Kitozan-EDTA/PVA polimerleri ve α -mangostin içeren nanoliflerle yapılmış bir çalışmada nanoliflerin 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde bekletildiğinde lif çapında anlamlı değişim söz konusu değilken, gerilme direnci anlamlı olarak azalmış ve nanoliflerde renk değişimi söz konusu olmuştur (Charernsriwilaiwat ve diğerleri, 2013). Bu çalışmada nanoliflerin daha düşük sıcaklıklarda bekletilmesinin uygun olacağı bildirilmiştir. Samprasit ve diğerleri (2015a) PVP/siklodektrin polimerleri ve meloksikam yüklü nanoliflerin stabilitesini 6 ay süreyle 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde incelemişlerdir. Nanoliflerin lif çapı her iki ortamda da 6 ay sonunda değişmemiş ancak meloksikamın yüksek sıcaklıkta kristalize olduğu ve 25°C/%60 bağıl nemde 6 aylık sürede değişmeden kaldığı gösterilmiştir.

Pratikte yara örtülerinin oda sıcaklığında saklanması daha uygundur. Bu nedenle nemin etkisini en aza indirmek için hazırlanan yara örtüleri iki kat ambalajlanarak 25 ve 40°C’de stabilite çalışmalarına tekrar başlanmıştır. 40°C/%75 bağıl nemde bekletilen numunenin 3. ayda renginin yine değiştiği gözlenirken, 25°C/%60 bağıl nemde bekletilen numunelerde renk değişimi gözlenmemiştir (Bkz. Resim 4.45). 25°C/%60 bağıl nemde bekletilen numunenin 3.aydaki ortalama lif çapı, temas açısı, mekanik ve biyoadeziv özellikleri, etkin madde miktarı ve SEM görüntüsü sonuçları incelendiğinde başlangıca göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p>0,05$) (Bkz. Resim 4.46, Çizelge 4.10). Ancak 6. ayda alınan SEM görüntülerinde görüldüğü gibi nanolifler nem nedeniyle deformasyona uğramıştır. 6. aydaki numunelerde sadece SEM görüntüsü alınabilmiş, diğer deneyler nanolifler ambalajdan çıkarken parçalandığından dolayı yapılamamıştır. Polimetil metakrilat polimeri ve lornoksikam yüklü nanoliflerin 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde 3 ay süreyle yapılan stabilite çalışmalarında nanoliflerden çözünme hızının başlangıca göre anlamlı değişmediği bulunmuştur (Bonthagarala ve diğerleri, 2015). Ancak bu çalışmada nanoliflerin test kabinlerine konulmadan önce nasıl ambalajlandığına dair bir bilgi verilmemiştir. Oral mukozaya uygulanmak üzere tiyole kitozan/PVA polimeri ve α -mangostin içeren nanoliflerin 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde yapılan 6 aylık stabilite çalışmalarında α -mangostin içeriğinin başlangıca göre değişmediği ve nanoliflerin en az 6 ay süreyle stabil kaldığı gösterilmiştir (Samprasit ve diğerleri, 2015b). Bu çalışmalarda nanoliflerin stabilite testlerinde ambalajlanmaları hakkında bilgi verilmemiştir. Ancak Tamm ve diğerleri (2016) hazırladıkları PVP polimeri ve kloramfenikol yüklü nanoliflerin 12 aylık stabilitesini, oda sıcaklığında ve içinde desikantlar bulunan (bağıl nemi %0-5 aralığında) desikatöre nanolifleri ambalajlamadan doğrudan koyarak incelemiştir. Çalışma sonucunda 12 ay sonunda nanoliflerin morfolojik olarak stabil olduğu ve etkin maddenin değişmeden kaldığı bulunmuştur. Ancak farklı nem koşullarında deneylerin yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Nanoliflerin kullanılan polimerin cinsine sıcaklık ve nemden etkilendiği açıkça görülmektedir. Stabilite kabininde yüksek nemin nanoliflerde bulunan hidrofilik polimerlere etki ederek yapısının bozulduğu düşünülmektedir.

5.6.4. Hücre kültürü çalışmaları

Literatürde yapılmış birçok hücre kültürü çalışması sonucunda nanoliflerin hücre üremesi için uygun ortam sağladığı gösterilmiştir. Zhang ve diğerlerinin (2005b) yaptığı bir çalışmada saf PCL nanolifleri, kollajen kaplanmış PCL nanolifleri ve kollajen(çekirdek)/PCL(kabuk) koaksiyal nanolifleri hazırlanmıştır. PCL nanolifleri hazırlandıktan sonra asetik asitle hazırlanan kollajen çözeltisinde bekletilerek kaplama yapılması sağlanmıştır. Hazırlanan nanoliflerin dermal fibroblastlar ile hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarında koaksiyal nanoliflerin saf PCL veya kollajen kaplanmış PCL nanoliflerinden daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Jia ve diğerlerinin (2016) yaptığı bir çalışmada periodontal hastalıklarda kullanmak amacıyla PCL ve doksisisiklin içeren nanolifler hazırlanmıştır. Nanoliflerin hazırlanmasında çözücü olarak bizim de tezde kullandığımız HFIP kullanılmıştır. Periodontal ligament hücreleri kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan nanoliflerin 7 gün boyunca sitotoksik özellik göstermediği bulunmuştur. Yara örtüsü olarak kullanılacak nanoliflerle yapılmış çalışmalarda genellikle fibroblast ve keratinosit (HaCat) hücre serileri ile yapılmış hücre kültürü çalışmaları mevcuttur (Asran ve diğerleri, 2010).

Hücre kültürü çalışma sonuçlarına göre doksisisiklin içeren B1 formülasyonunun hücre canlılığı kontrole göre yaklaşık %20 oranında azalmakla birlikte hem 3 hem de 7. günde sitotoksik bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.28). Hücre canlılığı çalışmalarında B1 formülasyonun keratinosit hücrelerinin üremeleri için uygun ortam sağlayabileceğine karar verilmiştir.

5.7. İn Vivo Deneyler

5.7.1. Yara kapanması denetimi

Bir yarayı iyileştirmenin en ideal yolu yaralanmadan sonra mümkün olan en kısa sürede bilinen standartlara göre cerrahi olarak yaranın kapatılmasıdır. Ancak bu prosedür yaranın kapatılmasına izin veren anatomik bölgelerle sınırlıdır (Ruszczak, 2003) Yara iyileşmesinin hedefi ECM sentezi ile yara alanının azaltılmasıdır. Klinik değerlendirmede iyileşme, yaranın daralmasına bağlı olarak değerlendirilir (Özler ve diğerleri, 2010).

İdeal bir yara örtüsü hava ve oksijen değişimi yapabilmeli, hücre çoğalması, proliferasyon ve kollajen sentezini destekleyebilmelidir. Ayrıca yara eksudasını absorbe etmesi için yara sıvısı absorban kapasitesine sahip olmalıdır. Çalışmalarımızda hazırladığımız B1 formülasyonu nanolif yapısından dolayı hava ve oksijen değişimi yapabilecek özellikte, içerdiği aljinat sayesinde yara sıvısını absorbe edebilme yeteneğine sahip, hücre çoğalmasını ve kollajen sentezini destekleyebilecek 3-boyutlu matriks yapısındadır.

Erken fazlarda aktif MMP'ler yaranın debridmanını sağlaması açısından önemlidir. Ancak ilerleyen fazlarda MMP'lerin artış göstermesi yeni oluşan matrisin parçalanmasına neden olarak iyileşmenin gecikmesine neden olur. Kronik yaralarda proteolitik enzimler, MMP'lerin miktarı artmıştır ve yara kapanmasını geciktirmektedir. Bu enzimlerin seviyesinin artması ECM bileşenlerinden kollajen, glikozaminoglukan ve proteoglikanın yanı sıra iyileşmeyi koordine eden bazı büyüme faktörlerinin parçalanmasına neden olur. Genellikle yeni epidermis yara kenarlarından iç kısma doğru büyür, yaranın derinliği ve alanı zamanla azalır. Kronik yaralarda hiperglisemiye bağlı olarak yara kapanması gecikmektedir. Yara kapanması yüzdesi değerleri incelendiğinde 3. ve 7. günlerde hiperglisemik gruplarda yara boyutu daha yüksektir (Bkz. Çizelge 4.30). Bu değerler hiperglisemiye bağlı olarak yara kapanmasının geciktiğini desteklemektedir.

Yara kapanması yüzdesi değerleri incelendiğinde B1 formülasyonu 7. günde, hem normoglisemik hem de hiperglisemik sıçanlarda yara boyutunu, tedavisiz ve ticari gruba göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$). B1 formülasyonunun bu etkisini farklı mekanizmalarla sağladığı düşünülmektedir:

- Nanolif yapısı sayesinde yaranın kurummasını önleyerek nemli yara ortamı sağlamış ve nemli yara ortamlarında epitelizasyonun hızlanmasından dolayı yara kapanma hızını artırmış olabilir.
- B1 formülasyonunda bulunan kitozan inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların migrasyonuna neden olarak yara iyileşmesini hızlandırmış olabilir.
- Yara örtüsünde bulunan aljinat hemostazı indükleyerek, yara yatağına kollajen ve fibronektin yığılmasını sağlamış ve yara iyileşmesini hızlandırmış olabilir.
- Bir MMP inhibitörü olan doksisisiklinin özellikle 7. güne kadar etkisini göstererek yara kapanmasına katkı sağlamış olabilir. Doksisisiklin yara kapanmasında anahtar rol

oynayan büyüme faktörlerini proteolitik yıkımdan koruyarak aktif büyüme faktörlerinin yara yatağında birikimini artırmış olabilir (Lobmann ve diğerleri, 2006).

14. gün verileri incelendiğinde hem normoglisemik hem de hiperglisemik gruplarda yaraların neredeyse tamamen kapandığı gözlenmekle beraber bu gruplarda biyokimyasal ve immunohistokimyasal veriler incelendiğinde, kapanmış yara dokusunun altında oksidatif olayların halen devam ettiği anlaşılmıştır.

5.7.2. Doku örneklerinde biyokimyasal çalışmalar

Yara iyileşmesi esnasında meydana gelen oksidatif olayları iyileşmenin inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme evrelerinde inceleyerek ortaya koymak bu tezin amaçlarından biridir. Bu amaçla iyileşme esnasında gerçekleşen oksidatif olayların durumunu incelemek için yara örtülerinin performansını ölçmede sıkça kullanılan tam kalınlıktaki yara modeli sıçanlarda oluşturulmuştur.

Akut ve kronik yaranın iyileşme prensipleri, süreçleri, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları birbirinden farklıdır. Bu iki yara tipinin iyileşme süreçleri pek çok araştırmacı tarafından detaylı olarak ortaya konmuştur. Çalışmalardaki amaç yeni formülasyonların oluşturulması şeklindedir. Bizim çalışmamızda çok sayıda grup ve alt grup olması nedeniyle normoglisemik ve hiperglisemik sıçan gruplarını karşılaştırmanın uygun olmayacağı düşünülmüştür. Bu nedenle normoglisemik gruplar ve hiperglisemik gruplardan 3., 7. ve 14. günlerde elde edilen sonuçlar kendi içinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Yara örtüleri uygulandıktan sonra iyileşme evreleri göz önüne alınarak 3., 7. ve 14. günlerde dokular alınmış ve oksidatif parametreler olan MDA ve NO düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca bu oksidatif olaylar meydana gelirken doku antioksidanlarının durumları, non-enzimatik antioksidanlardan GSH ve AA düzeylerine bakılarak ve enzimatik antioksidanlardan olan SOD aktivitesi ölçülerek de değerlendirilmiştir.

Normoglisemik gruplar

Akut yarada iyileşmenin başlaması için bir oksidatif stres olması gerekir. Minimum düzeyde oluşmuş serbest radikaller iyileşmenin başlamasında sinyal molekül olarak işlev

görürler. Ancak yara yaptığımız zaman oksidatif stres çok yüksektir. Bu nedenle ekzojen (dış kaynaklı) uygulamalar yapılarak bu stres ortadan kaldırmak istenmektedir. Hazırladığımız yara örtüsünün oksidatif stresi baskılayarak yara iyileşmesine katkı yapması beklenmiştir.

Yara dokusu MDA düzeyleri

Yara bölgesinde serbest radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu sırasında ara ürün olarak MDA oluşmaktadır (Karataş ve diğerleri, 2011). Yara iyileşmesinde oksidatif stres artışı bilinen bir durumdur ve MDA'nın yara dokularında yüksek oranda bulunması oksidatif stresin ya da lipid peroksidasyonun arttığının bir göstergesidir (Coşkun ve diğerleri, 2011). Bu durum, yara iyileşmesinin doğasında özellikle inflamasyon fazında artmış biyokimyasal reaksiyonlar nedeniyle reaktif oksijen türlerini artırmakta ve bu da lipid peroksidasyonunu tetiklemektedir.

B1 formülasyonu uygulanan gruplar tedavisiz gruplar ile karşılaştırıldığında; B1 formülasyonu uygulaması yara iyileşmesinin 14. gününde MDA düzeyini azaltmıştır ($p<0,05$). Bu sonuç B1 formülasyonu uygulamasının yara dokusu lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. Yara bölgesine topikal yoldan antioksidan özellik gösteren maddelerin uygulanması ile MDA seviyelerini azaltılarak antioksidan enzimlerin artırılması yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Özler ve diğerleri, 2010).

Ticari ürün ve B1 formülasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, B1 formülasyonu uygulanan gruplarda MDA düzeyi 7. günde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). B1 formülasyonu uygulaması yara iyileşmesinin proliferasyon fazında etkili olarak doku lipid peroksidasyonunu azaltmıştır ve 7. günde ticari ürüne oranla lipid peroksidasyonunu azaltma bakımından daha başarılıdır ($p<0,05$).

B1 formülasyonunun MDA düzeylerindeki etkisinin hem doksisisiklin hem de kitozandan kaynaklandığı düşünülmektedir. Doksisisiklinin MMP inhibisyonunun yanı sıra reaktif oksijen türlerinin seviyesini azalttığı bildirilmiştir (Lipowsky ve Lescanic, 2013; Yağan ve diğerleri, 2014). Akne tedavisinde doksisisiklin nötrofiller üzerinde antioksidan etki göstererek süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali seviyelerini azaltmaktadır (Akamatsu ve diğerleri, 1991; Antonio ve diğerleri, 2014). Doksisisiklinin

lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisi, bu antibiyotiğin antiinflamatuvar etkisinden kaynaklanmaktadır (Yağan ve diğerleri, 2014). Bian ve diğerlerinin (2016) yapmış oldukları çalışma da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Taurin-kitozan jellerinin yara iyileşmesi üzerine yapılmış bir çalışmada taurin içermeyen %1,5 kitozan jel formülasyonu, MDA seviyesini kontrol grubuna göre azaltmış ancak bu azalma anlamlı bulunmamıştır (Değim ve diğerleri, 2002). Kitozanın yara iyileştirici etkisi üzerine yapılmış birçok in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur (Kılıç ve diğerleri, 2013; Moura ve diğerleri, 2014). Çalışmalarda kitin ve türevlerinin fibroblastların çoğalmasını ve sitokin üretimini artırdığı gösterilmiştir (Alemdaroğlu ve diğerleri, 2006; Kaltalıoğlu ve diğerleri, 2013). Kitozan ayrıca katyonik yükleri sayesinde glukozaminoglikanlar ile etkileşime girerek büyüme faktörlerini harekete geçirir. N-asetil-β-D-glukozamin kollajenlerin düzenlenmesini sağlar, hiyaluronik asit sentezini uyararak skar oluşumunu engeller ve yara iyileşmesini hızlandırır (Azuma ve diğerleri, 2015). Dolayısıyla B1 formülasyonunda bulunan kitozanın da MDA seviyelerindeki azalmaya faydası olduğu düşünülmektedir.

B1 formülasyonunun içerdiği doksisisiklin ve kitozana bağlı olarak, hem proliferasyon hem de yeniden şekillenme fazlarında, doku lipid peroksidasyonunu azaltıp yara iyileşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir ($p<0,05$).

Yara dokusu NO düzeyleri

Nitrik oksit vücutta farklı olaylarda rol oynayan önemli bir bileşiktir. Genel olarak vücutta sentez ve oksidatif yıkım olmak üzere iki farklı yolla üretilir. L-arjinin, nitrik oksit sentaz aracılığı ile nitrik oksite dönüşür. Yara ortamında bulunan NO bir serbest radikaldir ve süperoksit anyonu ile etkileşmesi sonucu sitotoksik etkili peroksinitrit oluşması söz konusudur. Yara ortamında artmış NO seviyeleri doku hasarına yol açacağı için NO dengesinin hassas olarak sağlanması önemlidir (Wilcox ve diğerleri, 2012). Artmış NO düzeyinin azalması yara iyileşmesi için oldukça önemlidir. Termal yaralarda yapılmış bir çalışmada kafeik asitin NO seviyelerini düşürerek tedaviye yardımcı olduğu bildirilmiştir (Hoşnuter ve diğerleri, 2004).

B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanması, tedavisiz grupların 14. gününe kıyasla NO düzeylerini anlamlı olarak azaltmaktadır ($p<0,05$). B1 formülasyonu uygulanmasının serbest radikal oluşumunu azalttığı söylenebilir. Normoglisemik sıçanlar üzerinde B1 formülasyonu uygulanmasının NO düzeylerini azaltması doksisiklin ve NO düzeyleri arasında bir ilişkinin olduğuna işaret etmektedir. Amin ve diğerleri (1996) tetrasiklinlerin NO üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca doksisiklinin indüklenebilir nitrik oksit sentaz seviyelerini düşürerek nitrik oksit sentaz ekspresyonunu inhibe ederek sitokin kaynaklı NO üretimini azalttığı bildirilmiştir (Wilcox ve diğerleri, 2012). Bu da nitrik oksit kaynaklı patolojik olaylarda doksisiklinin potansiyel terapötik modülatör olabileceğini göstermiştir.

Bu sonuçlar B1 formülasyonunun serbest radikal hasarını ortadan kaldırmak bakımından ticari ürün kadar etkili olduğunu göstermektedir. B1 formülasyonu uygulamasının proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarında doku NO düzeyini azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Yara dokusu MDA ve NO düzeyleri arasındaki paralellik, B1 formülasyonunun etkinliğini desteklemektedir.

Yara dokusu GSH düzeyleri

Glutasyon dokuyu oksidatif strese karşı koruyan önemli bir antioksidan moleküldür. Glutasyonun yara oluşumu durumlarında meydana gelen oksidatif stresin etkisi ile miktarının azaldığı ancak oksidatif stresin ortadan kalkması ile miktarının artmaya başladığı bilinmektedir.

Tedavisiz gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde; yara iyileşmesinin 7. gününe ait GSH düzeyleri hem 3. gün hem de 14. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Yara iyileşmesinin normal seyri içerisinde 7. günde GSH değerinin düşük çıkması, artmış lipid peroksidasyonu ortadan kaldırmak için GSH'un kullanıldığının bir göstergesidir (Dinçer ve Gülen, 2010).

Tedavisiz gruplarla karşılaştırıldığında B1 formülasyonu uygulanması yara iyileşmesinin tüm fazlarında doku GSH düzeyini artırmıştır. GSH düzeyleri tedavisiz gruba göre yüksek bir seyir izlemiştir. Oysa ticari ürün doku GSH düzeylerini sadece 7. ve 14. günlerde artırmıştır. Yara örtüsünde bulunan kitozanın yara dokusunda antioksidan kapasiteyi

artırmaya yardımcı olduğu düşünülebilir. Kılıç ve diğerleri kitozan uygulamasının yara dokusunda antioksidan kapasiteyi artırdığını bildirmişlerdir (Kılıç ve diğerleri, 2013). Çoban ve Cevher (2016) yaptıkları bir çalışmada insizyonel yara oluşturulmuş sıçanlarda topikal kitozan jel uygulamasının tedavisiz gruplara göre serum GSH düzeyini artırdığını göstermişlerdir. B1 formülasyonu lipid peroksidasyonunu azaltırken bir diğer yönüyle de GSH düzeylerini artırmıştır. Doksisisiklinin MMP inhibisyonunun yanı sıra antioksidan etkisi de bulunmaktadır (Yağan ve diğerleri, 2014). Akamatsu ve diğerleri (2014) doksisisiklinin insan nötrofillerinde serbest radikalleri azalttığını göstermişlerdir. B1 formülasyonu içerisindeki doksisisiklinin ROS düzeyini azaltarak lipid peroksidasyonunun artışı antioksidan özelliğine bağlı olarak önlediği düşünülmektedir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde B1 formülasyonu uygulaması antioksidan kapasiteyi artırarak yara iyileşmesinin inflamasyon ve yeniden şekillenme fazlarında piyasa preparatına göre doku GSH düzeylerini artırma bakımından daha etkili bulunmuştur ($p<0,05$).

Yara dokusu AA düzeyleri

Yara iyileşmesinde askorbik asit kollajen sentezine yardım eder, serbest radikallere karşı etki gösterir ve hücrel bağışıklığı artırarak görev yapar (Kaltalıoğlu ve diğerleri, 2013). Askorbik asit, kollajen prekürsörü olan prokollajende bulunan prolin ve lizinin hidroksilasyon reaksiyonlarında görev alır (Lima ve diğerleri, 2009). Bu hidroksilasyon reaksiyonu olmazsa prokollajen oluşumu ve daha sonra aktif kollajene dönüşümü gerçekleşmez. Kollajenin üçlü-heliks yapısını sağlamlaştıran hidroksiprolin maddesi, askorbik asit yardımı ile gerçekleşen bir hidroksilasyon reaksiyonu ile oluşur (Murad ve diğerleri, 1981). Benzer bir hidroksilasyon reaksiyonunda oluşan hidroksilizin, iyileşen dokularda kollajenler arası çapraz bağlanmayı sağlayarak dokunun gerilim kuvvetini artırır (Kaplan ve diğerleri, 2004). Bu nedenlerle kollajenin sağlıklı biçimde görev yapması için askorbik asit dokularda yeterli miktarda bulunmalıdır.

B1 formülasyonu uygulanan gruplarda AA düzeyinin başlangıçta yüksek olduğu, ancak 14. günde düştüğü görülmektedir. Bu da inflamasyon ve proliferasyon fazlarında artmış veya hala devam etmekte olan serbest radikal hasarına karşı AA'nın serbest radikalleri süpürücü etkisinin B1 formülasyonu ile sağlandığını göstermektedir. B1 formülasyonu uygulaması

doku AA düzeylerini yara iyileşmesinin proliferasyon fazında artırarak iyileşmeye katkıda bulunmuş ve yara dokusunun antioksidan kapasitesini artırmış gözükmektedir. Literatürde doksisiklin ve sodyum aljinatın AA seviyelerine etkisi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kitozanın eksizyonel yarada etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada kitozan tedavisiz gruba göre 7. günde AA düzeyini anlamlı olarak artırmıştır (Kaltalıoğlu ve diğerleri, 2013). Bu nedenle B1 formülasyonunun yara dokusunda AA düzeyine olumlu etkisinin temel olarak kitozandan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kitozanın yanı sıra, yara örtüsünde bulunan kollajenin de AA düzeyine olumlu etkisinin olduğu düşünülmektedir. ECM'nin temel bileşeni olan kollajenin yaralı bölgeye uygulanmasıyla, fibrin köprüler oluşur ve yeni sentezlenen kollajen yardımıyla ülser zeminine yapışır. Kollajen, fibriller arasında lökosit, makrofaj, fibroblast ve epitel hücrelerinin canlı tutulmasını sağlar. Böylece oluşan yarı kapalı bu ortam enfeksiyonlara karşı engel oluşturarak, yara yatağında yeterince nem ve oksijen olmasını sağlar (Palmieri, 1992). Kollajen içeren nanolif yara örtüleri biyoparçalanabilir ve biyobenzer yapı iskelesi oluşturmakta ve hücrelerin tutunup çoğalmaları için uygun bir ortam sağlamaktadır. Kollajen nanolif yara örtülerinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada kollajen nanolifleri uygulanan grupta kontrol gruplarına göre daha hızlı yara iyileşmesi sağlanmıştır (Rho ve diğerleri, 2006).

B1 formülasyonu ile yara yatağına uygulanan kollajenin, inflamasyon ve proliferasyon fazlarında yara yatağında AA seviyesini artırarak yara iyileşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir ($p < 0,05$). Yeniden şekillenme fazına geçiş ile dokuda kollajen sentezinin dengeye ulaşması, askorbik asit düzeylerinin düşmesine neden olmuştur.

Yara dokusu SOD aktivitesi

Açık bir yara bölgesi sürekli atmosferdeki oksijene maruz kalmakta ve bu da hücrel redoks durumlarını etkileyerek yara iyileşmesini geciktirmektedir. Yara bölgesinde güçlü ve toksik bir oksitleyici olan peroksinitritin etkilerinden korunmak için süperoksit anyonları SOD tarafından hidrojen peroksit'e çevrilir (Kurahashi ve Fujii, 2015). Hidrojen peroksitin glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığıyla etkisiz hale getirilmesiyle lipid peroksidasyonu inhibe edilmiş olur. Dolayısıyla SOD oksidatif strese karşı koruyucu

bir enzimdir. Akut yaralarda SOD enziminin 7. güne kadar azaldığı ancak 14. günde normal seviyesine ulaştığı bildirilmiştir (Deveci ve diğerleri, 2005).

Yara bölgesinde SOD düzeyleri yüksek bulunan çalışmalar olmasına karşılık, sıçanlarda yara iyileşmesinde düzeylerinin azaldığı da gözlenmiştir (Kurahashi ve Fujii, 2015).

SOD aktivitesi bakımından tedavisiz ve tedavili gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak B1 formülasyonu kendi içinde değerlendirildiğinde 7. günde SOD aktivitesi yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu nedenle B1 formülasyonu uygulamasının antioksidan kapasiteyi SOD üzerinden artırdığı söylenebilir.

Hiperglisemik gruplar

Hem yara yapılması hem de diyabet olması serbest radikal hasarının kümülatif olarak arttığının bir göstergesidir. Bu iki etki birbirini tetikler, bu nedenle diyabetli hayvanlarda yara iyileşmesi ROS nedeniyle akut yaralara göre daha uzamaktadır. Ayrıca akut yarada kısa bir inflamasyon fazı söz konusu iken, diyabette devam eden uzamış bir inflamasyon fazı bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında uygulanan B1 formülasyonunun hem inflamasyonu baskılayıcı hem de kendisi bir antioksidan olarak görev yaparken iyileşmeye katkıda bulunması beklenmektedir.

Yara dokusu MDA düzeyleri

Kronik yaralarda artmış lipid peroksidasyon ve oksidatif stres temel bir bulgudur. Örneğin esansiyel yağ asitlerinin (temel olarak araşidonik asit) peroksidasyonu prostaglandin benzeri moleküller olan izoprostanların oluşumu ile sonuçlanır. Kronik venöz ülserli hastalarda 8-izoprostan konsantrasyonu normal dokuya göre anlamlı artış göstermektedir (Schafer ve Werner, 2008). Leptinin diyabetik yara üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da normoglisemik gruplara göre hiperglisemik gruplarda MDA seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri düşük bulunmuştur (Dinçer ve Gülen, 2010).

Diyabetik yaralarda serbest radikallerin oluşumu ve bunları ortadan kaldıran antioksidan mekanizmalar arasında dengesizlik vardır. Bu durum, diyabette süregelen hiperglisemi varlığında glikozun ve glikolize proteinlerin oto-oksidasyonu sonucu serbest radikallerin artışı ve savunma mekanizmalarının azalması ile açıklanmaktadır (Dinçer ve Gülen, 2010).

İnflamatuvar evre normal yara iyileşmesinin temel evrelerinden biridir. MMP'ler denatüre proteinlerin parçalanması, büyüme faktörlerinin salgılanması, anjiyogenezis ve epitel migrasyonunda normal iyileşmede rol oynarlar. Ancak kronik yaralarda kontrolsüz inflamasyon iyileşmenin kötü olmasına neden olmaktadır. Akut yaralarla karşılaştırıldığında MMP'ler kronik yarada artmıştır. Kronik yarada farklı MMP türleri artarken bazı çalışmalar MMP-9'a odaklanmıştır. Makrofajlar tarafından üretilen MMP-9'un kronik yaranın inflamatuvar bileşeni olduğu düşünülmektedir. Kronik yarada bu enzim akut yaraya kıyasla 25 kat daha fazladır. Aktif MMP-9 kronik yara iyileşmesi ilerledikçe azalmaktadır. Kronik yaraların iyileşme evresine girdikçe MMP düzeyleri azalmaktadır (Monk ve diğerleri, 2011).

Diyabetli sıçanlarda diyabetin neden olduğu stres nedeniyle yara dokusu MDA düzeylerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. B1 formülasyonu uygulaması, özellikle yara iyileşmesinin 7. ve 14. günlerinde etkili olmuş ve doku MDA düzeylerini proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarında azaltarak iyileşmeye katkıda bulunmuştur ($p<0,05$). Özellikle 14. günde bu etki daha fazla görülmektedir ve ticari ürünle benzer sonuçlar elde edilmiştir. Doksisiklinin MMP inhibe edici etkisi ile MMP düzeylerini azaltarak inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı düşünülmektedir.

Yara dokusu NO düzeyleri

Kronik yarada inflamasyon fazının uzaması ve yaranın enfekte olması NO üretiminde aşırı artmaya neden olmaktadır. Diyabetik hayvanlarda yapılmış çalışmalarda yara ortamında NO metabolitlerinin daha az olduğu gösterilmiştir (Witte ve Barbul, 2002). Ancak bunun diyabet nedeniyle inflamatuvar cevabın az oluşundan kaynaklandığı doğrulanmamıştır.

B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulamasının tedavisiz gruplara göre yara iyileşmesinin 7. ve 14. gününde etkili olarak NO düzeyini azaltarak yara iyileşmesine katkıda bulundukları görülmektedir ($p<0,05$). Bu sonuç MDA düzeylerinde elde edilen sonuçlar ile benzerdir ve MMP aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak oksidatif stresin azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak B1 formülasyonu ve ticari ürün NO düzeylerinin azalmasında etkili olmuşlardır.

Yara dokusu GSH düzeyleri

Diyabetik yaralarda yara iyileşmesinin gecikmesi, oksidatif stresin artmasına ve hücre içi glutatyon düzeylerinde değişikliğe bağlı olmaktadır (Deveci ve diğerleri, 2005). Hiperglisemik farelerde oluşturulan yaralarda ve diyabetik ayak ülseri olan hastaların yara sıvılarında azalmış glutatyon seviyeleri gözlenmiştir (Mudge ve diğerleri, 2002). Azalmış glutatyon seviyeleri hücrenin redoks potansiyelinin azalmasına neden olmaktadır. Değişen redoks potansiyeli ile yara iyileşmesi arasındaki etki tam olarak bilinmese de bu azalmanın gecikmiş yara iyileşmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Glutatyon yara bölgesinde, hücreye hasar verebilecek peroksitlerin detoksifikasyonuna ve okside ürünlerin redüksiyonuna katılır.

Dokuda glutatyon seviyesinin artırılması için glutatyonun doğrudan kullanılması ya da antioksidan özellik gösteren maddeler kullanarak glutatyon seviyesinin artırılması mümkündür (Altındaş, 2006). Topikal glutatyon uygulamasının hücre içi glutatyon seviyesinin normale dönmesini sağladığı ve diyabetik yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (Deveci ve diğerleri). Amin ve Abdel-Raheem (2014) diyabetik yaralarda azalan GSH seviyesini, antioksidan özellikteki arı venomunu topikal yoldan kullanarak artırmışlar ve yara iyileşmesinin hızlandığını göstermişlerdir. Ayrıca glutatyonun hücre kültürü çalışmalarında MMP aktivitesini inhibe ettiği ve MMP inaktivasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Kendre ve diğerleri, 2013).

B1 formülasyonu uygulaması hiperglisemik sıçanlarda GSH düzeyi açısından, yara iyileşmesinin 3. ve 7. gününde etkili olmuştur. B1 formülasyonu uygulaması, tedavisiz gruplarla karşılaştırıldığında özellikle kronik yaralarda yara iyileşmesinin iç içe geçmiş olan uzamış inflamasyon fazı ve proliferasyon fazında etkili olarak GSH düzeylerini artırmıştır. Hem diyabetle hem de yara oluşturmakla ortaya çıkan artmış ROS düzeyleri kümülatif bir etki göstererek lipid peroksidasyonunun artmasına neden olmuştur. Organizma bunun üstesinden gelebilmek ve bu hasarı kaldırabilmek için antioksidan kapasitesini artırmış olabilir.

Ticari ürün ise hiperglisemik sıçanlarda yara iyileşmesinin ancak 14. gününde etkili olarak doku GSH düzeylerini artırmıştır ($p < 0,05$). Bu da ticari ürün uygulanan gruplarda oksidatif olayların hala devam ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak B1 formülasyonu diyabetli hayvanlarda yara iyileşmesinin 3. ve 7. günlerinde etkili iken ticari ürün ancak 14. günde etkili olmuştur.

Yara dokusu AA düzeyleri

Vitamin C olarak bilinen askorbik asit yara iyileşmesinin bütün aşamalarına katılmaktadır ve bir çok enzimatik reaksiyonda rol almaktadır (Aksoy ve Özakpınar, 2014). Askorbik asit antioksidan kapasitesine bağlı olarak yara bölgesindeki OH, H₂O₂ ve hipoklorit radikallerini indirgeyici özelliğe sahiptir. Ayrıca derideki askorbik asit büyüme faktörü benzeri özelliklere sahiptir ve ECM’de kollajen sentezi için önemli bir regülatördür. İnflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan oksidatif stres ve süperoksit radikalleri, kronik ülser gibi bazı hastalıklarda önemli rol oynarlar. Diyabetik, yaşlı ve immün yetmezliği olan hayvanlarda, eksizyonel yaraların antioksidan seviyelerinde azalma ve oksidatif stresteeki artış nedeniyle geç iyileştiği bildirilmiştir. Ayrıca STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda da GSH, AA, katalaz ve E vitamininin derideki seviyelerinin diyabetik olmayanlara kıyasla düşük olduğu gösterilmiştir (Kamer ve diğerleri, 2010).

Dokuda AA seviyesinin artırılması için AA doğrudan ya da antioksidan özellik gösteren maddeler kullanılabilir (Gopinath ve diğerleri, 2004; Lima ve diğerleri, 2009). Kollajen filmlerinin yara iyileştirici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada askorbik asit ve GSH seviyeleri, kontrole göre 14. günde anlamlı olarak artmıştır (Arul ve diğerleri, 2007). Kollajen filmleri antioksidan kapasiteyi artırarak yara iyileşmesine yardımcı olmuştur. Ayrıca doksisiklinin reaktif oksijenleri süpürücü etkisinin olduğu bildirilmiştir (Ramamurthy ve diğerleri, 1993).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda B1 formülasyonunun hiperglisemik sıçanlarda miktarı çok fazla artan reaktif oksijen türlerini inhibe etmek için AA seviyesini artırması beklenmektedir.

B1 formülasyonu uygulamasının, diğer gruplara göre doku AA düzeylerini yara iyileşmesinin 3. ve 7. günlerinde artırarak doku antioksidan kapasitesine katkıda bulunduğu görülmektedir. B1 formülasyonu diyabetli gruplarda yara iyileşmesinin inflamasyon ve proliferasyon fazında etkili olarak doku antioksidan kapasitesini artırmıştır ($p<0,05$). Ayrıca B1 formülasyonu uygulamasının, doku AA düzeylerini artırma

bakımından 7. günde piyasa preparatına oranla daha başarılı olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Yara dokusu SOD aktivitesi

İyileşmeyen yaralarda SOD normal düzeylerine geri dönemez ve yara iyileşmesinin gecikmesine neden olur (Deveci ve diğerleri, 2005).

B1 formülasyonu uygulamasının yara iyileşmesinin 14. gününde etkili olarak doku SOD aktivitesini artırdığı görülmektedir ($p<0,05$).

B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulaması karşılaştırıldığında SOD aktivitesindeki 7. gündeki azalma artmış olan lipid peroksidasyonun ortadan kaldırılması için SOD'un tüketilmiş ya da kullanılmış olmasından kaynaklanabilir.

Ticari ürünün de doku SOD aktivitesi üzerinde benzer şekilde etkili olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada non enzimatik antioksidanlardan GSH ve AA yara iyileşmesinde SOD antioksidanına göre birincil rolü üstlenmişlerdir.

5.7.3. Histolojik ve immunohistokimyasal sonuçlar

Histolojik sonuçlar

Yara örtülerinin temel amacı cildin yapısal ve fonksiyonel tüm özelliklerini normal doku seviyelerine getirmektir.

Normoglisemik gruplarda B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda 14. günde yara bölgesinde kıl follikülleri ve folliküllere açılan yağ bezleri yeniden organize olmuşken, tedavisiz gruplarda deri eklerinin reorganizasyonu gözlenmedi. Kıl follikülleri, ter ve yağ bezlerinin yeniden organizasyonu dermisin sağlıklı onarılması ve tam bir doku iyileşmesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. (Abdel-Mohsen ve diğerleri, 2016).

Hiperglisemik sıçanlarda tedavisiz ve ticari ürün uygulanan gruplarda, 14. günde yara bölgesinde küçük bir yara kabuğu ve dar bir inflamasyon bölgesi gözlemlendi. Bu alanda

epidermis gelişimi tamamlanmamıştı. B1 formülasyonu uygulanan gruplarda ise 14. gün yara bölgesinde derinin histolojik katmanları tam olarak gözlenmiştir. Ancak tam bir epidermis oluşmasına rağmen dermal skar dokusu bu bölgede kıl foliküllerinin reorganizasyonunu engellemiştir. Kıl foliküllerinin yeniden organize olamaması, histolojik olarak bölgedeki skar dokusunun yoğun kollajen organizasyonuna ve doku onarımındaki fizyolojik sürecin diyabet nedeniyle yavaşlamasına bağlı olabilir. Buna rağmen histolojik katmanların tümünün varlığı nedeniyle B1 formülasyonu uygulanan gruplarda yara dokusunun daha iyi onarıldığını belirlendi. Ancak normoglisemik ve hiperglisemik gruplar reepitelizasyon değerleri açısından kendi içlerinde karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemesine rağmen tedavili gruplar tedavisiz gruplara göre daha iyi epitelize olmuştu.

Kitozan, inflamasyon fazında hücrelerin yara bölgesine göçünü hızlandırarak makrofajların mikroorganizmaları yok etmesini, ölü hücreleri uzaklaştırmasını ve diğer bağışıklık sağlayıcı hücrelerin uyarılmasını sağlamaktadır. Uyarılan bu hücreler doku organizasyonuna ve yeni damar oluşumuna yardım etmektedirler (Azuma ve diğerleri, 2015). Histolojik çalışmalarda da 14. günde B1 formülasyonunun anjiyogenez skorları tedavisiz gruba kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu da B1 formülasyonunda bulunan kitozanın etkisini desteklemektedir.

İmmunohistokimyasal sonuçlar

Akut ve kronik yara karşılaştırıldığında akut yaralarda mitojenik aktivite yüksek, sitokin ve proteaz seviyesi düşük, büyüme faktörü seviyesi yüksektir. Kronik yaralarda ise mitojenik aktivite düşük, proteaz ve sitokin seviyesi yüksek, büyüme faktörlerinin seviyesi azalmış ve anjiyogenezis baskılanmıştır.

VEGF ailesi vasküler sistem boyunca dizilmiş endotel hücreleri için bilinen en özgül mitojendir. Anjiyogenik etkilerine ek olarak, endotelial hücrelerin migrasyonunu uyarmaktadır. VEGF ekspresyonunun başarısız olduğu durumlarda yara iyileşmesi gecikmektedir. Makrofaj ve keratinositlerden eksprese edilen VEGF'nin hedef hücresi endotel hücreleridir.

bFGF yara dokusunda damar oluşumunda etkili diğer bir potent indükleyici mitojendir. Endotelyal marker olan bFGF deride keratinositlerde, ekstrasellüler matrikste, fibroblastlarda işaretlenmektedir. Çalışmamızda bFGF ekspresyonu sadece keratinositlerde değerlendirilmiştir. Yara tamamen epidermisten yoksun olduğu, sağlam epidermis dokusu bulunmadığı için 3 günlük gruplarda keratinosit değerlendirmesi yapılmamıştır. bFGF ve VEGF ekspresyonunun in vivo ve in vitro ortamda incelendiği bir çalışmada, ortamda doksisisiklin bulunması bFGF ve VEGF ekspresyonunu artırmıştır. Hücrelerin büyüme hızı doksisisiklin varlığında anlamlı olarak artmıştır (Seghezzi ve diğerleri, 1998).

Bir diğer anjiyogenik faktör olan vWF büyük moleküllü multimerik bir glikoproteindir. Yaralanmalarda primer hemostazın sağlanmasında kritik bir rolü vardır. Yaralanma durumunda vWF'nin degradasyonu söz konusudur. Doksisisiklinin vWF proteazı inhibe ederek vWF degradasyonunu ve kanama riskini azalttığı gösterilmiştir (Bartoli ve diğerleri, 2015).

Normoglisemik sıçanlarda, B1 formülasyonu ve piyasa preparatı uygulanan gruplarda tedavisiz gruba göre 3. günde daha fazla VEGF tutulumu gözlenmiştir. vWF tutulumunun da B1 formülasyonu ve ticari ürün uygulanan gruplarda 3. ve 7. günlerde tedavisiz gruba göre arttığı gözlenmiştir. bFGF tutulumları değerlendirildiğinde ise 7. günde tedavisiz grupta sadece bazal keratinositlerde tutulum olmasına rağmen, B1 formülasyonu ve piyasa preparatı uygulanan gruplarda yeni oluşmaya başlayan epidermiste de tutulum gözlenmiştir.

Yara iyileşmesinde başlangıçta yara bölgesi çevre dokulara kıyasla iskemiktir. Yara bölgesinde oksijen ve besin transferi olmadan iyileşme gerçekleşemez. Bu nedenle anjiyogenez yara iyileşmesinde temel bir olaydır. Bu sonuçlar VEGF, vWF ve bFGF anjiyogenik markerları açısından birlikte değerlendirildiğinde, B1 formülasyonu ve piyasa preparatı uygulanan gruplarda anjiyogenezin daha iyi gerçekleştiğini ve vaskülarizasyonun daha iyi olduğunu göstermektedir. Bu immünohistokimyasal veriler, histolojik bulgularla da desteklenmektedir.

Hiperglisemik ve normoglisemik gruplarda VEGF tutulumları benzer olmasına rağmen, hiperglisemik gruplarda vWF tutulumu, 7. günde B1 formülasyonu uygulanan grupta hem tedavisiz hem de piyasa preparatı gruplarına göre daha yüksektir. bFGF tutulumları ise

tedavisiz grupla özdeştir. Anjiyogenik markerların tutulumu açısından gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında en iyi damar gelişimi, B1 formülasyonu, ticari ürün ve tedavisiz grup olarak sıralanmaktadır. Bu sonuçlara göre doksisiklinin yara iyileşmesinde anjiyogenezi sağlayarak olumlu katkıda bulunduğu görülmüştür.

Tam kalınlıkta oluşturulan yara bölgesine aljinat uygulamasının VEGF, TGF- β 1 ve fibronektin baskılanmasını azalttığı ve kollajen baskılanmasını artırdığı bildirilmiştir (Lee ve diğerleri, 2009). B1 formülasyonunda bulunan sodyum aljinatın, VEGF üzerinden anjiyogenik etkiye yardım ettiği düşünülmektedir.

Epitelial bazal membranın önemli bileşenlerinden olan MMP-2 ve MMP-9 deride keratinositler ve fibroblastlar tarafından üretilen elastik liflerin yıkımından sorumlu elastazlardır. MMP'ler ECM'de bulunan fibrin, tendon gibi maddeleri parçalayarak yeni ECM ve doku oluşumunda görev yaparlar (Stechmiller ve diğerleri, 2010). Ancak tekrarlanan travma, hipoksi, enfeksiyon gibi olaylar MMP'lerin normal görev yapmasını engelleyebilir. TIMP-1 antikoru MMP-9 inhibisyonundan, TIMP-2 ise MMP-2 inhibisyonundan sorumludur (Stechmiller ve diğerleri, 2010). TIMP/MMP dengesinin MMP lehine bozulması yaranın geç iyileşmesine ve kronikleşmesine yol açmaktadır. Kronik yarada TIMP seviyeleri çok azalmakta ve MMP seviyeleri göreceli olarak artmaktadır (Stechmiller ve diğerleri, 2010). Dolayısıyla kronik yarada MMP seviyelerinin azalması/TIMP seviyelerinin artması yara iyileşmesini olumlu yönde etkileyecektir. Diyabetik ülserlerde de artmış MMP ve azalmış TIMP seviyesi uzamış inflamasyona ve proteolitik yara ortamına neden olur.

Hiperglisemik ve normoglisemik gruplar kendi içlerinde, ECM'de kollajen yıkım markerları olan MMP-2 ve MMP-9 açısından, karşılaştırıldığında her iki grupta da matriks yıkımının 3. ve 7. günde, B1 formülasyonu ve piyasa preparatı uygulanan gruplarda tedavisiz gruba göre daha az olduğu bulunmuştur.

MMP-2'nin inhibitörü olan TIMP-2 seviyeleri değerlendirildiğinde, normoglisemik gruplarda inhibisyon mekanizmasının devreye girdiği ve MMP-2 bulgularının tam tersi olarak TIMP-2'nin 3. ve 7. günde B1 formülasyonu uygulanan grupta tedavisiz gruba göre arttığı gözlemlendi.

Hiperglisemik gruplarda ise TIMP-2 tutulumu, B1 formülasyonu uygulanan grupta tedavisiz gruba göre 3. günde, hem tedavisiz hem de piyasa preparatı uygulanan gruba göre ise 7. günde artmıştır.

MMP-9 inhibitörü olan TIMP-1 tutulumu ise B1 formülasyonu ve piyasa preparatı uygulanan gruplarda tedavisiz gruba göre artmıştır. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, hazırladığımız B1 formülasyonunun MMP seviyelerini azaltarak/TIMP seviyelerini artırarak yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir.

Yara bölgesinde ilk 24-48 saatte nötrofil göçü gerçekleşir, bu hücrelerden ve yara periferindeki damar endotel hücrelerinden IL-8 eksprese edilir (Springer, 1994; Yager ve Nwomeh, 1999). 48 saatten sonraki süreçte 2-3. haftaya kadar nötrofiller apoptoza giderek yerini kan dolaşımı ile gelen monosit kökenli makrofajlara bırakır. Bu süreçte monositik göç ne kadar fazlaysa o kadar tam yara iyileşmesi gerçekleşir (Shukaliak and Dorovini-Zis, 2000). Monositik infiltrasyon yeterli değilse epidermis rejenere olurken, dermiste skar dokusu gelişir. Bu süreçte IL-8 ekspresyonu inflamatuvar sürecin başlatılmasında önemlidir (Springer, 1994; Mehendale and Martin, 2001).

Yara iyileşmesi gibi biyolojik olarak kompleks bir süreçte reepitelizasyonu artırdığı bilinen IL-8 beklendiği gibi normoglisemik gruplarda hiperglisemik gruplara göre daha yoğun eksprese edilmiştir. Bu bulgu reepitelizasyonun sağlıklı yara iyileşmesi süreçlerine koşut olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak en iyi ekspresyon B1 formülasyonu uygulanan grupta gerçekleşmiştir ve sırasıyla ticari ve tedavisiz gruplar bu grubu izlemiştir. Hiperglisemik grupta ise IL-8 ekspresyonu normoglisemik gruplara göre daha zayıf tutulum göstermiş ve reepitelizasyon daha geç oluşmuştur.

.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında akut ve kronik yara tedavisinde kullanılmak üzere, elektro-çekim yöntemiyle hazırlanmış prototip bir yara örtüsü geliştirilmiştir. Yara örtüsünün alt tabakası, çekirdek kısmında %1 PCL ve %4,5 kollajen, kabuk kısmında ise %2,5 doksisisiklin ve %2,5 PEO içeren koaksiyal nanoliflerden oluşmaktadır. Yara örtüsünün orta tabakasını kitozan, üst tabakasını ise sodyum aljinat nanolifleri oluşturmaktadır. Geliştirilen yara örtüsünün özellikleri aşağıdadır:

- Lif yerleşimi paraleldir.
- Temas açısı 38°'dir. Hidrofilik yapısından dolayı kolay ıslanabilmektedir.
- Sıçan derisinde biyoadezyon işi 0,485 mJ/cm²'dir.
- Gerilme direnci 2,76 MPa ve kopma uzaması %7,65'dir. Yaraya uygulandığında gerek biyoadezif gerekse mekanik özellikleri açısından deriyle uyumludur.
- Spesifik yüzey alanı 9,65 m²/g ve porozitesi %52,3'tür. Böylece yarayı bakteriyel penetrasyondan ve dehidrasyondan koruyabilecek ve yara sıvısının drenajını sağlayabilecek özelliktedir.
- Yüklenen doksisisiklin miktarı 260 µg/cm²'dir.
- Doksisisiklinin tamamı 15 dakika içinde salınmaktadır.
- Her iki yüzeyine ayrı ayrı uygulanan 2 saatlik UV sterilizasyon işlemi, yara örtüsünün ortalama lif çapı, mekanik, yapışma ve temas açısı özelliklerini etkilememiş, doksisisiklin miktarı değişmemiş ve mikrobiyal üreme olmamıştır.
- Keratinosit hücre serisinde 3 ve 7 günlük MTT testlerinde sitotoksik etki göstermemiştir.
- Stabilite test sonuçlarına göre 4°C'de 12 ay boyunca ortalama lif çapı, mekanik, yapışma, temas açısı özellikleri ve doksisisiklin miktarı açısından stabil kalmıştır. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda nemden etkilenerek özelliklerini kaybetmektedir.
- Hem normoglisemik hem de hiperglisemik sıçanlarda yara boyutunu 7.günde anlamlı olarak küçültmektedir.
- Normoglisemik sıçanlarda hem proliferasyon hem de yeniden şekillenme fazında doku lipid peroksidasyonu (MDA) ve NO düzeyini azaltmaktadır.

- Normoglisemik sıçanlarda inflamasyon ve yeniden şekillenme fazlarında GSH düzeylerini, proliferasyon fazında AA düzeylerini artırarak iyileşmeye katkıda bulunmaktadır.
- Hiperglisemik sıçanlarda yara iyileşmesinin 7. ve 14. günlerinde etkili olarak doku MDA düzeylerini proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarında azaltmaktadır.
- Hiperglisemik sıçanlarda doku AA düzeylerini 7. günde piyasa preparatına oranla daha fazla artırmaktadır.
- İmmunohistokimyasal değerlendirme sonuçlarına göre, yara örtüsünün içerdiği doksisisiklin sayesinde MMP oranlarının azaldığı ve TIMP oranlarının arttığı bulunmuştur. Ayrıca büyüme faktörlerini (VEGF, bFGF, vWF) uyararak anjiyogeneze yardımcı olduğu bulgusu histolojik bulgularla desteklendi.

Hazırladığımız yara örtüsü yara iyileşmesinin büyük oranda inflamasyon ve proliferasyon fazlarında etkiliyken, piyasa preparatı yeniden şekillenme fazında etkilidir. Hem inflamasyonu baskılayarak hem de kendisi bir antioksidan olarak görev yaparak iyileşmeye katkıda bulunmaktadır. Özellikle hiperglisemik sıçanlarda inflamatuvar fazın kısaltılması için ticari ürüne göre daha üstündür.

Çalışmalarda gözlenen bazı sorunlar ve çözüm önerileri aşağıda belirtilmiştir:

- Tezde kullanılan elektro-çekim cihazında döner silindir sağa-sola hareket ederek lif/doz homojenliği sağlanmaktadır. Ancak elektro-çekim işlemi ile üretilen nanolif formülasyonlarında etkin madde miktarının yara örtüsünün genelde orta kısmındaki hat boyunca homojen olduğu gözlenmiştir. Gözlenen bu sorunun, yara örtülerinin daha verimli üretilibilmeleri açısından, döner silindirin sağa-sola hareketinin hızlandırılarak çözülebileceği düşünülmektedir.
- Stabilitate çalışmalarında sadece 4°C’de saklanan yara örtülerinin özelliklerini kaybetmediği, ancak daha yüksek sıcaklık ve nem koşullarında özelliklerini kaybederek kullanılamaz hale geldiği gözlenmiştir. Yara örtüsündeki hidrofilik polimerler nem varlığında nanolif yapısını kaybetmektedir. Özellikle ambalaj seçiminde dikkat edilmesi ve nem geçirmeyecek bir ambalaj kullanımı önemlidir. Bu nedenle yara örtüsünün oda sıcaklığında saklanabilmesi açısından uygun ambalaj seçimini destekleyen farklı ambalaj materyallerinin denendiği stabilite çalışmalarının yapılması uygun olacaktır.

- Yara örtüsünün diğer sterilizasyon yöntemleriyle sterilize edilip, sterilizasyon sonrası karakterizasyon testleri de yapıldıktan sonra yöntemler arası karşılaştırma yapılarak daha uygun bir sterilizasyon yöntemi seçilebilir.
- Yara örtüsünün ticari olarak üretilmesi için mutlaka ölçek büyütme (scale-up) çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu amaçla öncelikle bir pilot üretim cihazında kritik işlem parametrelerinin (akış hızı, voltaj, iğne ucu-toplayıcı mesafesi, dönüş hızı) belirlenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Mohsen, A. M., Jancar, J., Massoud, D., Fohlerova, Z., Elhadidy, H., Spatz, Z., and Hebeish, A. (2016). Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *International journal of pharmaceutics*.
- Abrigo, M., McArthur, S.L. and Kingshott, P. (2014). Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects. *Macromolecular Bioscience*, 14(6), 772-792.
- Acartürk, F., Şencan, A., and Çelebi, N. (1993). Evaluation of the effect of low-molecular chitosan on the solubility and dissolution characteristics of spirinolactone. *Pharmazie*, 48(8), 605-607.
- Aduba, D. C., Hammer, J. A., Yuan, Q., Yeudall, W. A., Bowlin, G. L., and Yang, H. (2013). Semi-interpenetrating Network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 9, 6576–84.
- Akalın, F. A., Baltacıoğlu, E., Sengün, D., Hekimoğlu, S., Taşkın, M., Etikan, I., and Fisenk, I. (2004). A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Oral Science*, 46(1), 25-35.
- Akamatsu, H., Asada, M., Komura, J., Asada, Y., and Niwa, Y. (1991). Effect of doxycycline on the generation of reactive oxygen species: a possible mechanism of action of acne therapy with doxycycline. *Acta dermato-venereologica*, 72(3), 178-179.
- Akduman, C., Özgüney, I., and Kumbasar, E. P. A. (2016). Preparation and characterization of naproxen-loaded electrospun thermoplastic polyurethane nanofibers as a drug delivery system. *Materials Science and Engineering: C*, 64, 383-390.
- Aksoy, H., ve Bingöl Özakpınar, Ö. (2014). Yara iyileşmesi ve oksidatif stres. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18, 153-158.
- Aktar, B., Erdal, M. S., Sagirli, O., Güngör, S., and Özsoy, Y. (2014). Optimization of biopolymer based transdermal films of metoclopramide as an alternative delivery approach. *Polymers*, 6(5), 1350-1365.
- Alemdaroğlu, C., Değim, Z., Çelebi, N., Zor, F., Öztürk, S., and Erdoğan, D. (2006). An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32(3), 319-327.
- Alghoraibi, İ. (2014). Fabrication and characterization of polyamide-66 nanofibers via electrospinning technique: Effect of concentration and viscosity. *International Journal of ChemTech Research*, 7(01), 20-27.
- Altındaş, M. (2006). Diyabetik yaraların tedavisinde topikal glutatyon uygulanması. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 14(1).

- Amin, A. R., Attur, M. G., Thakker, G. D., Patel, P. D., Vyas, P. R., Patel, R. N., and Abramson, S. B. (1996). A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 14014-14019.
- Amin, M. A., and Abdel-Raheem, IT. (2014). Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol–chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. *Archives of pharmacal research*, 37(8), 1016-1031.
- Amiraliyan, N., Nouri, M., and Kish, M. H. (2009). Electrospinning of silk nanofibers. I. An investigation of nanofiber morphology and process optimization using response surface methodology. *Fibers and Polymers*, 10(2), 167–176.
- Antonio, RC., Ceron, CS., Rizzi, E., Coelho, EB., Tanus-Santos, JE., and Gerlach, RF. (2014). Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. *Molecular and cellular biochemistry*, 386(1-2), 99-105.
- Anumolu, S. S., DeSantis, A. S., Menjoge, A. R., Hahn, R. A., Beloni, J. A., and Gordon, M. K. (2010). doxycycline loaded poly(ethylene glycol) hydrogels for healing vesicant induced ocular wounds. *Biomaterials*, 31(5), 964-974.
- Anumolu, S., Menjoge, A. R., Deshmukh, M., Gerecke, D., Stein, S., Laskin, J., and Sinko, P. J. (2011). Doxycycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries. *Biomaterials*, 32, 1204-1217.
- Arul, V., Kartha, R., and Jayakumar, R. (2007). A therapeutic approach for diabetic wound healing using biotinylated GHK incorporated collagen matrices. *Life sciences*, 80(4), 275-284.
- Asran, A. S., Razghandi, K., Aggarwal, N., Michler, G. H., and Groth, T. (2010). Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin. *Biomacromolecules*, 11(12), 3413-3421.
- Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., and Oz, H. (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, 36, 71–76.
- Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, AS., Koçak-Toker, N., Sivas, A., and Oz, H. (1985). The Effect of Chronic Ethanol Ingestion on Hepatic Lipid Peroxide, Glutathione, Glutathione Peroxidase and Glutathione Transferase in Rats. *Toxicology*, 36, 71–76.
- Azuma, K., Izumi, R., Osaki, T., Ifuku, S., Morimoto, M., Saimoto, H., and Okamoto, Y. (2015). Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(1), 104-142.
- Bae, H. S., Haider, A., Selim, K. K., Kang, D. Y., Kim, E. J., and Kang, I. K. (2013). Fabrication of highly porous pmma electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine, *Journal of Polymer Research*, 20(7), 1-7.

- Baji, A., Mai, Y. W., Wong, S. C., Abtahi, M., and Chen, P. (2010). Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, 70, 703-718.
- Baker, S. R., Banerjee, S., Bonin, K., and Guthold, M. (2016). Determining the mechanical properties of electrospun poly- ϵ -caprolactone (pcl) nanofibers using afm and a novel fiber anchoring technique. *Materials Science and Engineering: C*, 59(1), 203-212.
- Barnes, C. P., Sell, S. A., Boland, E. D., Simpson, D. G., and Bowlin, G. L. (2007). Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1413-1433.
- Bartoli, C. R., Kang, J., Restle, D. J., Zhang, D. M., Shabahang, C., Acker, M. A., and Atluri, P. (2015). Inhibition of ADAMTS-13 by doxycycline reduces von Willebrand factor degradation during supraphysiological shear stress: therapeutic implications for left ventricular assist device-associated bleeding. *JACC: Heart Failure*, 3(11), 860-869.
- Baylan, N., Bhat, S., Ditto, M., Lawrence, J. G., Lecka-Czernik, B. and Yildirim-Ayan, E. (2013). Polycaprolactone nanofiber interspersed collagen type-1 scaffold for bone regeneration: a unique injectable osteogenic scaffold. *Biomedical Materials*, 8(4), 1-11.
- Beachley, V., Wen, X. (2009). Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science Engineering C*. 29(3), 663–668.
- Berger, J., Shepart, D., Morrow, F., and Taylor, A. (1989). relationship between dietary intake and tissue levels reduced and total vitamin c in nonscorbutic guinea pig. *Journal of Nutrition*, 119, 734-740.
- Bian, F., Pelegrino, F. S., Henriksson, J. T., Pflugfelder, S. C., Volpe, E. A., Li, D. Q., and de Paiva, C. S. (2016). Differential Effects of Dexamethasone and Doxycycline on Inflammation and MMP Production in Murine Alkali-Burned Corneas Associated with Dry Eye. *The Ocular Surface*, 14(2), 242-254.
- Birer, M., Rüzgar, G., Tort, S. and Acartürk, F. (2015, 12-15 November). *Studies on Improvement of Water-solubility with Electrospun Nanofibers I:Curcumin*. Paper presented at the First International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya.
- Bizarria, M. T. M., Avila, M. A., Mei, and L. H. I. (2014). Non-woven nanofiber chitosan/PEO membranes obtained by electrospinning. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(1), 57-68.
- Bonthagarala, B., Swain, S., Rao, P.V. and Dasari, V. (2015). Design and characterization of controlled release lornoxicam nanofibers by electrospinning technique. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 6(3), 220-232.

- Braghirolli, D. I., Steffens, D., Quintiliano, K., Arisoly, G., Acasigua, X., Gamba, D., Fleck, R. A., Petzhold, C. L., and Pranke, P. (2014). The effect of sterilization methods on electronspun poly(lactide- co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 102B(4), 700-708.
- Buschle-Diller, G., Cooper, J., Xie, Z., Wu, Y., Waldrup, J., and Ren, X. (2007). Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose*, 14(6), 553-562.
- Cai, Z. X., Mo, X. M., Zhang, K. H., Fan, L. P., Yin, A. L., He, C. L. and Wang, H. S. (2010). Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3529-3539.
- Cao, H., Jiang, X., Chai, C., and Chew, S. Y. (2010). RNA interference by nanofiber-based siRNA delivery system. *Journal of Controlled Release*, 144, 203-212.
- Charernsriwilaiwat, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Sukma, M. and Opanasopit, P. (2013). Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with garcinia mangostana extracts. *International Journal of Pharmaceutics*, 452(1), 333-343.
- Chaturvedi, T. P., Srivastava, R., Srivastava, A. K., Gupta, V., and Verma, P. K. (2013). Doxycycline poly e-caprolactone nanofibers in patients with chronic periodontitis – a clinical evaluation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(10), 2339-2342.
- Chen, J. P., Chang, G. Y., and Chen, J. K. (2008). Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 313, 183–188.
- Chen, R., Huang, C., Ke, Q., He, C., Wang, H., and Mo, X. (2010). Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 315-325.
- Chen, R., Qui, L., Ke, Q., He, C., and Mo, X. (2009). Electrospinning thermoplastic polyurethane- contained collagen nanofibers for tissue- engineering applications. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 20, 1513-1536.
- Chin, G. A., Thigpin, T. G., Perrin, K. J., Moldawer, L. L., and Schultz, G. S. (2003). Treatment of chronic ulcers in diabetic patients with a topical metalloproteinase inhibitor, doxycycline. *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*, 15(10), 315-323.
- Choi, J. S., Leong, K. W., and Yoo, H. S. (2008). In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, 29, 587-596.
- Chronakis, I. (2010). Micro-/nano-fibers by electrospinning technology. In Qin Y. (Ed), *Micromanufacturing engineering and technology*. United Kingdom: William Andrew, pp. 264-266.

- Chuangchote, S., Sagawa, T., and Yoshikawa, S. (2009). Electrospinning of Poly(vinyl pyrrolidone): Effects of Solvents on Electrospinnability for the Fabrication of Poly(p-phenylene vinylene) and TiO₂ Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 2777–2791.
- Chung, H. J., and Park, T. G. (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 249-62.
- Civelek, B., Çelebioğlu, S., Erbaş, O., ve Yavuz, E. (2007). Yanık tedavisinde yara örtüsü seçenekleri. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 2(15), 67-72.
- Clark, M. (2012). Rediscovering alginate dressings, *Wounds International*, 3(2), 24-28.
- Coşkun, Ş., Karataş, F., Acartürk, F., Olmuş, H., Selvi, M., and Erbaş, D. (2005). The effect of L-NAME administrations after oral mucosal incision on wound no level in rabbit. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 278(1-2), 65-69.
- Coşkun, Ş., Peker, E. G., Balabanlı, B., Ahıska, S., and Acartürk, F. (2011). Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. *Medicinal chemistry research*, 20(1), 23-28.
- Cui, W., Li, X., Zhu, X., Yu, G., Zhou, S., and Weng, J. (2006). Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(dl-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules*, 7(5), 1623-1629.
- Çakmak, A., Çırpanlı, Y., Bilensoy, E., Yorgancı, K., Çalış, S., Sarıbaş, Z., and Kaynaroglu, V. (2009). Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *International Journal of Pharmaceutics*, 381(2), 214-219.
- Çalamak, S., Erdoğan, C., Özalp, M., and Ulubayram, K. (2014). Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials. *Materials Science and Engineering: C*, 43, 11-20.
- Çoban, VS., and Cevher, ŞC. (2016). The investigation of the effect of topical vascular endothelial growth factor (VEGF) administration on serum oxidative parameters in diabetic rats. *Gazi University Journal of Science*, 29(3), 543-547.
- Dai, Y., Xia, Y., Chen, H. B., Li, N., Chen, G., Zhang, F., and Gu, N. (2015). Optimization of sterilization methods for electrospun poly(e-caprolactone) to enhance pre-osteoblast cell behaviors for guided bone regeneration. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1, 1-15.
- Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B. and Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, 7, 1-13.
- Değim, Z., Çelebi, N., Sayan, H., Babül, A., Erdoğan, D., and Take, G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids*, 22(2), 187-198.

- Deveci, M., Gilmont, R. R., Dunham, W. R., Mudge, B. P., Smith, D. J., and Marcelo, C. L. (2005). Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. *British Journal of Dermatology*, 152(2), 217-224.
- Diaz, J. E., Barrero, A., Marquez, M., and Loscertales, I. G. (2006). Controlled encapsulation of hydrophobic liquids in hydrophilic polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Functional Materials*, 16, 2110-2116.
- Diegelmann, R. F., Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 283-289.
- Dinçer, S., and Gülen, S. (2010). Wound tissue malondialdehyde and glutathione levels in leptin treated healthy and diabetic rats. *Erciyes Medical Journal*, 32(3), 161-166.
- Dong, B., Arnoult, O., Smith, ME. and Wnek, GE. (2009). Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign Solvents. *Macromolecular Rapid Communications*, 30(7), 539-542.
- Dorsett-Martin, W. A. (2004). Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 12(6), 591-599.
- Dubsky, M., M., Kubinova, S., Sirc, J., Voska, L., Zajicek, R., Zajicova, A., Lesny, P., Jirkovska, A., Michalek, J., Munzarova, M., Holan, V., and Sykova, E. (2012). Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 931-941.
- Düzyer, Ş., Koç, S. K., Hockenberger, A., Evke, E., Kahveci, Z., and Uğuz, A. (2013). Effects of different sterilization methods on polyester surfaces. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 23(4), 319-324.
- El-Kamel, A., Sokar, M., Naggar, V., and Gamal, S. A. (2002). Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive Vaginal Tablets. *AAPS PharmSciTech*, 4(4), 1-7.
- Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., and Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 381-387.
- Feng, J. J. (2003). Stretching of a straight electrically Charged viscoelastic jet. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 116(1), 55-70.
- Fiorani, A., Gualandi, C., Panseri, S., Montesi, M., Marcacci, M., Focarete, M. L., and Bigi, A. (2014). Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, 2313-2321.
- Furman, B. L. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 5, 5-47.
- Gaserod, O., Joliffe, I. G., Hampson, F. C., Dettmar, P. W., and Braek G. (1998). The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 175(2), 237-246.

- Gautam, S., Dinda, A. K., and Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1228–35.
- Goncalves, R. P., Silva, F., Picciani, P. H., and Dias, M. L. (2015). Morphology and thermal properties of core-shell PVA/PLA ultrafine fibers produced by coaxial electrospinning. *Materials Sciences and Applications*, 6, 189-199.
- Gondoliya, N., Kanchan, D. K., Sharma, P., Joge, P. (2011). Structural and conductivity studies of poly(ethylene oxide)—silver triflate polymer electrolyte system. *Materials Sciences and Applications*, 2, 1639-1643.
- Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A., and Jhurry, D. (2014). Drug loading and release from electrospun biodegradable nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(9), 2173-2199.
- Gopinath, D., Ahmed, MR., Gomathi, K., Chitra, K., Sehgal, PK., and Jayakumar, R. (2004). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25(10), 1911-1917.
- Gönül, B., Söylemezoglu, T., Babül, A., and Çelebi, N. (1998). Effects of epidermal growth factor dosage forms on mice full-thickness skin wound zinc levels and relation to wound strength. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(6), 641-644.
- Greiner, A., Wendorff, J. H., Yarin, A. L., and Zussman, E. (2006). Biohybrid nanosystems with polymer nanofibers and nanotubes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 387-393.
- Hackett, JM., Dang, TT., Tsai, EC. and Cao, X. (2010). Electrospun biocomposite polycaprolactone/collagen tubes as scaffolds for neural stem cell differentiation. *Materials*, 3(6), 3714-3728.
- Haider, A., Haider, S., and Kang, I. K. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, -24.
- Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ali, F. A. A., Haider, A., Mahmood, A., Al-Masry, W., Imran, M., and Aijaz, M. O. (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *journal of Polymer Research*, 20(105), 1-11.
- Han, J., Chen, T. X., Branford-White, C. J., and Zhu, L. M. (2009). Electrospun shikonin-loaded pcl/ptmc composite fiber mats with potential biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 215-221.
- Harding, K. G., Morris, H. L., and Patel, G. K. (2002). Healing chronic wounds. *British Medical Journal*, 324(7330), 160-163.
- He, C. L., Huang, Z. M., and Han, X. J. (2009). Fabrication of drug-loaded electrospun aligned fibrous threads for suture applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89, 80-95.

- He, C. L., Huang, Z. M., Han, X. J., Liu, L., Zhang, H. S., and Chen, L.S. (2006). Coaxial electrospun poly(l-lactic acid) ultrafine fibers for sustained drug delivery. *Journal of Macromolecular Science Part B*, 45, 515-524.
- Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G., and Brenner, M. P. (2001a). Electrospinning and electrically forced jets. I. stability theory. *Physics of Fluids*, 13(8), 2201–2220.
- Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G., and Brenner, M. P. (2001b). Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids*, 13(8), 2221–2222.
- Hoşnutter, M., Gürel, A., Babuççu, O., Armutcu, F., Kargi, E., and Işıkdemir, A. (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*, 30(2), 121-125.
- Hu, C., Gong, R. H., and Zhou, F. L. (2015). Electrospun sodium alginate/polyethylene oxide fibers and nanocoated yarns. *International Journal of Polymer Science*, 1, 1-12.
- Huan, S., Liu, G., Han, G., Cheng, W., Fu., Z., Wu, Q., and Wang, Q. (2015). Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers. *Materials*, 2015(8), 2718-2734.
- Huang, Z. M., He, C. L., Yang, A., Zhang, Y., Han, X. J., Yin, J., and Wu, Q. (2006). Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77, 169-179.
- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. (2003). A Review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63, 2223–2253.
- Huang, Z. M., Zhang, Y., and Ramakrishna, S. (2005). Double layered composite nanofibers and their mechanical performance. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43, 2852-2861.
- Ignatious, F., Sun, L., Lee, CP., and Baldoni, J. (2010). Electrospun nanofibers in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 576-588.
- Jahangiri, A., Davaran, S., Fayyazi, B., Tanhaei, A., Payab, S. and Adibkia, K. (2014). Application of electrospraying as a one-step method for the fabrication of triamcinolone acetate-plga nanofibers and nanobeads. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 219-224.
- Jannesari, M., Varshosaz, J., Morshed, M., and Zamani, M. (2011). Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 993-1003.
- Jia, L., Zhang, X., Xu, H., Hua, F., Hu, X., Xie, Q., Wang, W., and Jia, J. (2016). Development of a doxycycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibrous membrane for GTR/GBR applications. *Journal of Biomaterials*, 1, 1-10.

- Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., and Chen, W. (2005). A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, 108(2), 237–243.
- Joung, Y. K., Bae, J. W., and Park, K. D. (2008). Controlled release of heparin-binding growth factors using heparin-containing particulate systems for tissue regeneration. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 1173–1184.
- Jun, S. H., Chang, M. S., Kim, B. C., An, H. J., Lopez-Ferrer, D., Zhao, R., Smith, R. D., Lee, S. W., and Kim, J. (2010). Trypsin coatings on electrospun and alcohol-dispersed polymer nanofibers for trypsin digestion column. *Analytical Chemistry*, 82(18), 7828–7834.
- Kaltalıoğlu, K., Coşkun-Cevher, S., Tuğcu-Demiröz, F., and Çelebi, N. (2013). PDGF supplementation alters oxidative events in wound healing process: A time course study. *Archives of Dermatological Research*, 305(5), 415–422.
- Kamer, E., Unalp, H. R., Gundogan, O., Diniz, G., Ortac, R., Olukman, M., Derici, H., and Onal, M. A. (2010). Effect of ascorbic acid on incisional wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Wounds*, 22(2), 27–31.
- Kanani, A. G., and Bahrami, S. H. (2010). Review on electrospun nanofibers scaffold and biomedical applications. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 24(2), 93–115.
- Kapahi, H., Mansoor Khan, N., Bhardwaj, A., and Mishra, N. (2015). Implication of nanofibers in oral drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 21(15), 2021–2036.
- Kapil, R., Kapoor, D. N., and Dhawan, S. (2010). Flow, compressive, and bioadhesive properties of various blends of poly(ethylene oxide). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(1), 45–55.
- Kaplan, B., Gönül, B., Dinçer, S., Kaya, F. N. D., and Babül, A. (2004). Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surgery Today*, 34(9), 747–751.
- Karatas, F., Akbulut, K. G., Ozer, C., Acartürk, F., Ömeroğlu, S., Yıldırım, Z., and Erbaş, D. (2011). The effects of aminoguanidine on the antioxidant mechanisms and nitrate levels in incisional oral mucosal wound healing process. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(1), 43–49.
- Kayacı, F., Aytaç, Z., and Uyar, T. (2013). Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 286–294.
- Kenawy, E. R., Bowlin, G. L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D. G., Sanders, E. H., and Wnek, G. E. (2002). Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of controlled release*, 81(1), 57–64.

- Kendre, G., Raghavan, R., Cheriyaundath, S., and Madassery, J. (2013). Tetracycline and glutathione inhibit matrix metalloproteinase activity: An in vitro study using culture supernatants of 1929 and dalton lymphoma cell lines. *Journal of Cancer Research*, 2013.
- Khan, P.A., Sasikanth, K., Nama, S. and Suresh, S. (2013). Nanofibers-a new trend in nano drug delivery systems. *The Pharma Innovation*, 2(2), 118-127
- Kılıç, Ç., Peker, E. G., Acartürk, F., Kılıçaslan, S. M. S., and Cevher, Ş. C. (2013). Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisional oral mucosal wound healing in rabbits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 499-507.
- Kim, H. S., and Yoo, H. S. (2013). In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes. *Acta Biomaterialia*, 9, 7371–7380.
- Kim, J., Kim, W. J., Kim, S. J., Cho, C. W., and Shin, S. C. (2006). Release characteristics of quinupramine from the ethylene-vinyl acetate matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 315, 134-139.
- Kim, K., Luu, Y. K., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., and Hadjiargyrou, M. (2004). Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release*, 98, 47-56.
- Kim, T. G., Lee, D. S., and Park, T. G. (2007). Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 276-283.
- Ko, F.K., (2004). Bridging the Gap between Nano and Macro World. In Guceri, S., Yuri, G., and Kuznetsov, V. (Eds), *Formation of nanofibers and nanotubes production*, USA: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-18.
- Ko, J. B., Lee, S. W., and Kim, D. E. (2006). Fabrication of SiO₂-ZrO₂ composite fiber mats via electrospinning. *Journal of Porous Materials*, 13(3), 325–330.
- Kogawa, A. C., and Salgado, H. R. N. (2012). Doxycycline hyclate: A review of properties, applications and analytical methods. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 2(4), 11-25.
- Kogawa, A. C., Zoppi, A., Quevedo, M. A., Salgado, H. R. N., and Longhi, M. R. (2014). Increasing doxycycline hyclate photostability by complexation with β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1209-1217.
- Koski, A., Yim, K., and Shivkumar, S. (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58 (3–4), 493–497.
- Kotaki, M., Liu, X. M., and He, C., (2006). Optical properties of electrospun nanofibers of conducting polymer-based blends. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(12), 3997-4000.

- Kozanoğlu, S. (2006). *Elektrospinning yöntemiyle nanolif üretim teknolojisi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-56.
- Kraitzer, A., Ofek, L., Schreiber, R., and Zilberman, M. (2008). Long-term in vitro study of paclitaxel-eluting bioresorbable core/shell fiber structures. *Journal of Controlled Release*, 126, 139-148.
- Krebs, M. D., Bonino, C. A., Samorezov, B. S., Khan, S. A., and Alsberg, E. (2011). Electrospun chitosan–alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 17(1-2), 59-70.
- Krithica, N., Natarajan, V., Madhan, B., Sehgal, P. K., and Mandal, A. B. (2012). Type I collagen immobilized poly(caprolactone) nanofibers: Characterization of surface modification and growth of fibroblasts. *Advanced Engineering Materials*, 14(4), 149-154.
- Ku, M. S., and Dulin, W. 2012, A biopharmaceutical classification-based right-first-time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from first-in-human to clinical proof-of-concept. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(3), 285-302.
- Kubiak, KJ., and Mathia. TG. (2014). Anisotropic wetting of hydrophobic and hydrophilic surfaces–modelling by lattice boltzmann method. *Procedia Engineering*, 79, 45-48
- Kurahashi, T., and Fujii, J. (2015). Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *Journal of Developmental Biology*, 3(2), 57-70.
- Kurçer, Z., ve Karaoğlu, D. (2012). Deneysel diyabet modellerinde alloxan ve streptozotosin kullanımı. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16, 34-40.
- Kwon, I. K., Kidoaki, S., and Matsuda, T. (2005). Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: Structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials*, 26(18), 3929–3939.
- Lee, G. H., Song, J. C., and Yoon, K. B. (2010). Controlled wall thickness and porosity of polymeric hollow nanofibers by coaxial electrospinning. *Macromolecular Research*, 18(6), 571-576.
- Lee, J., Yoo, J. J., Atala, A., and Lee, SJ. (2012). The effect of controlled release of pdgf-bb from heparin-conjugated electrospun PCL/gelatin scaffolds on cellular bioactivity and infiltration. *Biomaterials*, 33, 6709-6720.
- Lee, W. R., Park, J. H., Kim, K. H., Kim, S. J., Park, D. H., Chae, M. H., and Park, K. K. (2009). The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. *Wound repair and regeneration*, 17(4), 505-510.
- Lee, YH., Chang, JJ., Chien, CT., Yang, MC., and Chien, HF. (2012). Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research*, 1, 1-11, 2012.

- Li, D., and Xia, Y. (2004). Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano Letters*, 4, 933-938.
- Li, D., McCann, J. T., and Xia, Y. (2005). Use of electrospinning to directly fabricate hollow nanofibers with functionalized inner and outer surfaces, *Small*, 1, 83-86.
- Li, F., Song, Y., and Zhao, Y. (2010). Core-shell nanofibers: nano channel and capsule by coaxial electrospinning. *INTECH Open Access Publisher*, 1, 421-438.
- Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., and Lelkes, P. A. (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5999-6008.
- Li, X., Kanjwal, M. A., Lin, L., and Chronakis, I. S. (2013). Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 103, 182-188.
- Li, Z., and Wang, C. (2013). *One dimensional nanostructures*. (First edition). Berlin: Springer-Verlag, 15-28.
- Liang, A. C., and Chen, L. I. H. (2001). Fast-dissolving intraoral drug delivery systems. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 11(6), 981-986.
- Liao, I. C., and Leong, K. W. (2011). Efficacy of engineered FVIII-producing skeletal muscle enhanced by growth factor-releasing coaxial electrospun fibers. *Biomaterials*, 32, 1669-1677.
- Lim, J. (2015). A primer on amniotic membrane regenerative healing. USA: MiMedx Group, 1-56.
- Lima, C. C., Pereira, A. P. C., Silva, J. R. F., Oliveira, L. S., Resck, M. C. C., Grechi, C. O., and Garcia, J. A. D. (2009). Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats. *Brazilian Journal of Biology*, 69(4), 1195-1201.
- Lin, T. C., Lin, F. H., and Lin, J. C. (2012). In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2704-2711.
- Lipowsky, HH., and Lescanic, A. (2013). The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species. *Microvascular research*, 90, 80-85.
- Liu, J., Xiong, W., Baca-Regen, L., Nagase, H., and Baxter, B. T. (2013). Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle Cells. *Journal of Vascular Surgery*, 38(6), 1376-1383.
- Lobmann, R., Zemlin, C., Motzkau, M., Reschke, K., and Lehnert, H. (2006). Proteaz absorban örtü ile tedavi edilmiş diyabetik ayak yaralarında matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2, 230-238.

- Loh, X.J., Peh, P., Liao, S., Sng, C. and Li, J. (2010). Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers. *Journal of Controlled Release*, 143(2), 175-182.
- Löffek, S., Schilling, O., and Franzke, C. W. (2011). Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. *European Respiratory Journal*, 38(1), 191-208.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., and Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and yeniden şekillenme in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), 1-24.
- Luong-Van, E., Grondahl, L., Chua, K. N., Leong, K. W., Nurcombe, V., and Cool, S. M. (2006). Controlled release of heparin from PCL electrospun fibers. *Biomaterials*, 27(9), 2042-2050.
- Malik, R., Garg, T., Goyal, A. K., and Rath, G. (2015). Polymeric nanofibers: Targeted gastro-retentive drug delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 23(2), 109–124.
- Mandy, S. H. (1983). A New primary wound dressing made of polyethylene oxide gel. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 9(2), 153-155.
- Marklein, R. A., Soranno, D. E., and Burdick, J. A. (2012). Magnitude and presentation of mechanical signals influence adult stem cell behavior in 3-dimensional macroporous hydrogels. *Soft Matter*, 8(31), 8113-8120.
- Martin, P., and Leibovich, S. J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11), 599-607.
- Martinac, A., Filipović-Grcić, J., Voinovich, D., Perissutti, B., and Franceschinis, E. (2005). Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 291(1-2), 69-77.
- Matthews, J. A., Wnek, G. E., Simpson, D. G., and Bowlin, G. L. (2002). Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232-238.
- Maver, T., Maver, U., Mostegel, F., Griesser, T., Spirk, S., Smrke, D. M., and Stana-Kleinschek, K. (2015). Cellulose based thin films as a platform for drug release studies to mimick wound dressing materials. *Cellulose*, 22(1), 749-761.
- Mehendale, F., and Martin, P. (2001). The cellular and molecular events of wound healing. *Cutaneous wound healing*, 15-37.
- Mehta, P., Sharma, D., Dashora, A., Sahu, D., Garg, R. K., Agrawal, P., and Kapoor, D. N. (2013). Design, development and evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and wounds. *Innovare Journal of Life Sciences*, 1(1), 38-47.
- Meng, Z. X., Xu, X. X., Zheng, W., Zhou, H. M., Li, L., Zheng, Y. F., and Lou, X. (2011a). Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 97-102.

- Meng, Z. X., Zheng, W., Li, L., and Zheng, Y. F. (2011b). Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Materials Chemistry and Physics*, 125(3), 606-611.
- Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., and Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 19-25.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
- Miranda, KM., Espey, MG., and Wink, D.A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite, *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
- Mishra, M., and Mishra, B. (2011). Formulation optimization and characterization of spray dried microparticles for inhalation delivery of doxycycline hyclate. *Yakugaku Zasshi*, 131(12), 1813-1825.
- Monaco, J. L., and Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing: An overview. *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1), 1-12.
- Monk, E., Shalita, A., and Siegel, D. M. (2011). Clinical applications of non-antimicrobial tetracyclines in dermatology. *Pharmacological research*, 63(2), 130-145.
- Monkhouse, D. C., and Huq, A. S. (1988). Transdermal drug delivery problems and promises. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(2-3), 183-209.
- Moura, LI., Dias, AM., Leal, EC., Carvalho, L., de Sousa, HC., and Carvalho, E. (2014). Chitosan-based dressings loaded with neurotensin—An efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 843-857.
- Mudge, B. P., Harris, C., Gilmont, R. R., Adamson, B. S., and Rees, R. S. (2002). Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 10(1), 52-8.
- Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A., and Pinnell, S. R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2879-2882.
- Nagy, K., Nyul, K., Wagner, I, Molnar, K., and Marosi, G. (2010). Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of donepezil HCl. *eXPRESS Polymer Letters*, 4(12), 763–772.
- Natu, M. V., Sousa, H. C., and Gil, M. H. (2010). Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 397, 50-58.
- Nezarati, RM., Eifert, MB. and Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10), 810-819.

- Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., and Supaphol, P. (2006). Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14, 70-79.
- Nunan, R., Harding, K. G., Martin, P. (2014). Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models and Mechanisms*, 7(11), 1205-1213.
- Oldstone, M. B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (Virus) immune response. *Cell*, 65(2), 319-331.
- Öntürk, H., ve Özbek, H. (2007). Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Dergisi*, 17(4), 231-36.
- Özcan, İ., Abacı, Ö., Uztan, A. H., Aksu, B., Boyacıoğlu, H., Güneri, T., and Özer, Ö. (2009). Enhanced topical delivery of terbinafine hydrochloride with chitosan hydrogels. *AAPS PharmSciTech*, 10(3), 1024-1031.
- Özler, M., Özkan, C., Erdoğan, E., Topal, T., Sadır, S., Uysal, B., Öter, Ş., and Korkmaz, A. (2009). Kronik yara iyileşmesi modelinde topikal nikotinamid ve asetil sisteinin etkileri. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 25(4), 165-169.
- Özler, M., Simsek, K., Özkan, C., Akgul, E. O., Topal, T., Öter, S., and Korkmaz, A. (2010). Comparison of the effect of topical and systemic melatonin administration on delayed wound healing in rats that underwent pinealectomy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 70(6), 447-452.
- Paaver, U., Tamm, I., Laidmäe, I., Lust, A., Kirsimäe, K., Veski, P. and Heinämäki, J. (2014). Soluplus graft copolymer: Potential novel carrier polymer in electrospinning of nanofibrous drug delivery systems for wound therapy. *Biomed Research International*, 2014, 1-7.
- Palmieri B., (1992). Heterologous collagen in wound healing: A clinical study. *International Journal of Tissue Reactions*, 14(Supp 1), 21-25.
- Pan, J. F., Liu, N. H., Sun, H. and Xu, F. (2014). Preparation and characterization of electrospun PLCL/poloxamer nanofibers and dextran/gelatin hydrogels for skin tissue engineering. *PloS one*, 9(11), 1-12.
- Park, J. C., Ito, T., Kim, K., Kim, K. W., Kim, B. S., Khil, M. S., Kim, H. K., and Kim, I. S. (2010). Electrospun poly(Vinyl Alcohol) nanofibers: Effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability. *Polymer Journal*, 42, 273-276.
- Park, J. E., and Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 187(5), S11-S16.
- Peng, J. R., Qian, Z. Y., Wang, B., Fu, B. S., Guo, G., Luo, F., Li, R., and Wu, D. (2011). Preparation and release characteristics of quercetin loaded poly(lactic acid) ultrafine fibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11, 3659-3668.

- Pham, Q. P., Sharma, U., Mikos, A. G. (2006). Electrospun poly(e-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 7, 2796–2805.
- Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y. E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., Toit, L. C., Ndesendo, V. M. K. (2013). A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Nanomaterials*, 1, 1-22.
- Piras, A. M., Nikkola, L., Chiellini, F., Ashammakhi, N., and Chiellini, E. (2006). Development of diclofenac sodium releasing bioerodible polymeric nanomats. *Journal Nanoscience and Nanotechnology*, 6(9-10), 3310-3320.
- Ramamurthy, N. S., Vernillo, A. T., Greenwald, R. A., Lee, H. M., Sorsa, T., Golub, L. M., and Rifkin, B. R. (1993). Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(10), 1247-1253.
- Ramesh, P. J., Basavaiah, K., Tharpa, K., Vinay, K. B., and Revanasiddappa, H. D. (2010). Development and validation of RP-HPLC method for the determination of doxycycline hyclate in spiked human urine and pharmaceuticals. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 4(2).
- Ranganath, SH., and Wang, C. H. (2008). Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*, 29, 2996-3003.
- Reneker, D. H., and Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, 49(10), 2387-2425.
- Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., and Koombhongse, S. (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, 87(9), 4531–4547.
- Renuka, M., Nishadh, P., Jigar, S., & Tejal, M. (2012). Mucoadhesive wound healing film of Doxycycline Hydrochloride. *International Journal of Drug Development and Research*.
- Rho, K. S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B. M., Park, Y. J., Hong, S. D., Roh, S., Cho, J. J., Park, W. H, Min, B. M. (2006). Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27, 1452–1461.
- Rnjak-Kovacina, J., Wise S. G., Li, Z., Maitz, P. K. M., Young, C. J., Wang, Y., and Weiss, A. S. (2011). Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering. *Biomaterials*, 32, 6729-6736.
- Robin, N. G., Gurm, J. S., and Yang, S. T. (2009). Benzalkonium chloride sterilization of nonwoven fibrous scaffolds for astrocyte culture. *The Open Biotechnology Journal*, 3, 73-78.

- Ruszczak, Z. (2003). Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1595-1611.
- Ryu, Y. J., Kim, H. Y., Lee, K. H., Park, H. C., and Lee, D. R. (2003). Transport properties of electrospun nylon 6 nonwoven mats. *European Polymer Journal*, 39(9), 1883–1889.
- Sadler, G. M., Wallace, H. J., and Stacey, M. C. (2012). Oral doxycycline for the treatment of chronic leg ulceration. *Archives of dermatological research*, 304(6), 487-493.
- Safi, S., Morshed, M., Ravandi, H., and Ghiaci, M. (2007). Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide). *Journal of Applied Polymer Science*, 104(5), 3245-3255.
- Samprasit, W., Akkaramongkolporn, P., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Kaomongkolgit, R., and Opanasopit, P. (2015a). Fast releasing oral electrospun PVP/CD nanofiber mats of taste-masked meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, 487(1-2), 213-222.
- Samprasit, W., Rojanarata, T., Akkaramongkolporn, P., Ngawhirunpat, T., Kaomongkolgit, R. and Opanasopit, P. (2015b). Fabrication and in vitro/in vivo performance of mucoadhesive electrospun nanofiber mats containing α -mangostin. *AAPS PharmSciTech*, 16(5), 1140-1152.
- Sander, E. A., Lynch, K. A. and Boyce, S. T. (2014). Development of the mechanical properties of engineered skin substitutes after grafting to full-thickness wounds. *Journal of biomechanical engineering*, 136(5), 1-8.
- Saraf, A., Baggett, L. S., Raphael, R. M., Kasper, F. K., and Mikos, A. G. (2010). Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds. *Journal of Controlled Release*, 143, 95-103.
- Schäfer, M., and Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*, 58(2), 165-171.
- Seager, H. (1998). Drug-delivery products and the zydis fast-dissolving dosage form. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(4), 375-382.
- Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R.S., Galloway, A., Rifkin, D.B. and Mignatti, P. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1659-1673.
- Sezer, AD., Hatipoğlu, F., Cevher, E., Oğurtan, Z., Ahmet Levent, B., and Akbuğa, J. (2007). Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 8(2), E94-E101.

- Shah, K. R., Chaudhary, S. A., and Mehta, T. A. (2014). Polyox (polyethylene oxide) multifunctional polymer in novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 6(2), 95-101.
- Shang, S., Yang, F., Cheng, X., Walboomers, F., and Jansen, J. A. (2010). The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells. *European Cells and Materials*, 19, 180-192.
- Sharma, J., Lizu, M., Stewart, M., Zygula, K., Lu, Y., Chauhan, R., Yan, X., Guo, Z., Wujcik, E. K., and Wei, S. (2015). Multifunctional nanofibers towards active biomedical therapeutics. *Polymers*, 7, 186-219.
- Shi, Y., Wei, Z., Zhao, H., Liu, T., Dong, A., and Zhang, J. (2013). Electrospinning of ibuprofen-loaded composite nanofibers for improving the performances of transdermal patches. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(6), 3855-3863.
- Shih, YRV., Chen, CN., Tsai, SW., Wang, YJ. and Lee, OK. (2006). Growth of mesenchymal stem cells on electrospun Type I collagen nanofibers. *Stem Cells*, 24(11), 2391-2397.
- Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P., and Rutledge, G. C. (2001). Experimental characterization of electrospinning: The electrically forced jet and instabilities. *Polymer*, 42(25), 9955–9967.
- Shukaliak, J. A., and Dorovini-Zis, K. (2000). Expression of the β -chemokines RANTES and MIP-1 β by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(5), 339-352.
- Silva, CL., Jorge, CP., Ramalha, A., Pais, A., and Sousa, JJ. (2008). Film based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: development and characterization. *Journal of Membrane Science*, 320(1-2), 268-279.
- Singer, A. J., and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746.
- Singh, B., and Dhiman, A. (2016). Design of acacia gum–carbopol–cross-linked-polyvinylimidazole hydrogel wound dressings for antibiotic/anesthetic drug delivery. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b01963, 1-13.
- Sipos, E., Szabo, Z. I., Redai, E., Szabo, P., Sebe, I., and Zelko, R. (2016). Preparation and characterization of nanofibrous sheets for enhanced oral dissolution of nebivolol hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 224–228.
- Sirc, J., Hobzova, R., Kostina, N., Munzarova, M., Juklickova, M., Lhotka, M., Kubinova, S., Zajicova, A., and Michalek J. (2012). Morphological characterization of nanofibers: Methods and application in practice. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-14.
- Snyder, D. L., Sullivan, N., and Schoelles, K. M. (2012). *Skin substitutes for treating chronic wounds*. USA: Agency for Healthcare Research and Quality, 10-20.

- Solorzano, C. C., Ksontini, R., and Pruitt, J. H. (1997). A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF) and abrogates endotoxin-induced lethality. *Shock*, 7, 427-431.
- Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., and Park, W. H. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 45, 2959–2566.
- Song, W., Yu, X., Markel, D. C., Shi, T., and Ren, W. (2013). Coaxial PCL/PVA electrospun nanofibers: osseointegration enhancer and controlled drug release device. *Biofabrication*, 5, 1-11.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301-314.
- Stachewicz, U., and Barber, A. H. (2011). Enhanced wetting behavior at electrospun polyamide nanofiber surfaces. *Langmuir*, 27(6), 3024–3029.
- Stalder, A. F., Melchior, T., Müller, M., Sage, D., Blu, T., and Unser, M. (2010). Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364(1), 72-81.
- Stechmiller, J., Cowan, L., and Schultz, G. (2010). The role of doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of chronic wounds. *Biological Research for Nursing*, 11(4), 336-344.
- Sukigara, S., Gandhi, M., Ayutsede, J., Micklus, M., and Ko, F. (2003). Regeneration of *bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: Processing parameters and geometric properties. *Polymer*, 44(19), 5721–5727.
- Suknuntha, K., Tantishaiyakul, V., Worakul, N., and Taweepreda, W. (2011). Characterization of muco and bioadhesive properties of chitosan, pvp, and chitosan/pvp blends and release of amoxicillin from alginate beads coated with chitosan/PVP. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(4), 408-418.
- Sun, K., and Li, Z. H. (2011). Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polymer Letters*, 5(4), 342-361.
- Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A. L., Wendorff, J. H., and Greiner, A. (2003). Compound coreshell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials*, 15(22), 1929-1932.
- Şenel, S. (2010). Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20(1), 23-32.
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., and Supaphol, P. (2006). Drug loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology*, 17, 2317-2329.

- Tamm, I., Heinämäki, J., Laidmäe, I., Rammo, L., Paaver, U., Ingebrigtsen, S.G. and Alakurtti, S. (2016). Development of suberin fatty acids and chloramphenicol-loaded antimicrobial electrospun nanofibrous mats intended for wound therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(3), 1239-1247.
- Thakur, R. A., Florek, C. A., Kohn, J., and Michniak, B. B. (2008). Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 87-93.
- Thomas, V., Jose, M. V., Chowdhury, S., Sullivan, J. F., Dean, D. R., and Vohra, Y. K. (2006). Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 17, 969-984.
- Thumma, S., Majumdar, S., ElSohly, M. A., Gul, W., and Repka, M. A. (2008). Chemical stability and bioadhesive properties of an ester prodrug of delta 9-tetrahydrocannabinol in poly(ethylene oxide) matrices: Effect of formulation additives. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1-2), 126-132.
- Tiwari, S. K., Tzezana, R., Zussman, E., and Venkatraman, S. S. (2010). Optimizing partition controlled drug release from electrospun core-shell fibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 392, 209-217.
- Tort, H., Oktay, E., Tort, S., Bayar, G., Kılıç, E., Kılıç, A., Topçu, F., and Acartürk, F. (2016, 21-23 October). *Ornidazole-loaded nanofiber as an alternative treatment for direct pulp capping*. Presented at the 20th International Congress of Esthetic Dentistry, İstanbul.
- Tort, S., and Acartürk, F. (2015). Wound healing and electrospun wound dressings: Review. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 4(2), 68-78.
- Tort, S., and Acartürk, F. (2016). Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine. *Carbohydrate Polymers*, 152, 802-814.
- Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., and Erdoğan, D. (2013). Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Pharmaceutics*, 457(1), 25-39.
- Türsen, Ü. (2013). Wound dressing in ulcer treatment. *Turkish Journal of Dermatology*, 7, 61-71.
- Üstündağ-Okur, N., Gökçe, E. H., Bozbıyık, D. İ., Eğrilmez, S., Özer, Ö., and Ertan, G. (2014). Preparation and in vitro–in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 204-215.
- Venkataraman, R., Das, G., Singh, S. R., Pathak, L. C., Ghosh, R. N., Venkataraman, B., and Krishnamurthy, R. (2007). Study on influence of porosity, pore size, spatial and topological distribution of pores on microhardness of as plasma sprayed ceramic coatings. *Materials Science and Engineering: A*, 445, 269-274.

- Wang, M., Yu, J. H., Kaplan, D. L., and Rutledge, G. C. (2006). Production of submicron diameter silk fibers under benign processing conditions by two-fluid electrospinning. *Macromolecules*, 39, 1102-1107.
- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., and Kennedy, J. F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 842-847.
- Wang, Z., Sun, B., Zhang, M., Ou, L., Che, Y., Zhang, J., and Kong, D. (2013). Functionalization of electrospun poly(-caprolactone) scaffold with heparin and vascular endothelial growth factors for potential application as vascular grafts. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28, 1-13.
- Wilcox, J. R., Covington, D. S., and Paez, N. (2012). Doxycycline as a modulator of inflammation in chronic wounds. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 24(12), 339-349.
- Witte, M. B., and Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, 183, 406-412.
- Wong, R. S., Ashton, M., and Dodou, K. (2015). Effect of crosslinking agent concentration on the properties of unmedicated hydrogels. *Pharmaceutics*, 7(3), 305-319.
- Woodruff, M. A., and Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10), 1217-1256.
- Xie, J., and Wang, C. H., (2006). Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical Research*, 23(8), 1817-1826.
- Xie, Y., Xu, B., and Gao, Y. (2005). Controlled transdermal delivery of model drug compounds by mems microneedle array. *Nanomedicine*, 1(2), 184-190.
- Xie, Z., and Buschle-Diller, G. (2010). Electrospun Poly(D,L-lactide) Fibers for drug delivery: the influence of cosolvent and the mechanism of drug release. *Journal of Applied Polymer Science*, 115, 1-8.
- Xu, Q., Zhang, N., Qin, W., Liu, J., Jia, Z., and Liu, H. (2013). Preparation, in vitro and in vivo evaluation of budesonide loaded core/shell nanofibers as oral colonic drug delivery system. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 149-156.
- Xu, X., Chen, X., Wang, Z., and Jing, X. (2009). Ultrafine PEG–PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro Cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 18-25.
- Xu, X., Chen, X., Xu, X., Lu, T., Wang, X., Yang, L., and Jing, X. (2006). BCNU loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against glioma C6 cells. *Journal of Controlled Release*, 114(3), 307-316.
- Xu, X., Yang, L., Xu, X., Wang, X., Chen, X., Liang, Q., Zeng, J., and Jing, X. (2005). Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions. *Journal of Control Release*, 108, 33-42.

- Yager, D. R., and Nwomeh, B. C. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6), 433-441.
- Yağın, A., Kesim, S., and Liman, N. (2014). Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*, 85(3), 478-489.
- Yamawaki-Ogata, A., Hashizume, R., Satake, M., Kaneko, H., Mizutani, S., and Moritan, T. (2010). A doxycycline loaded, controlled release, biodegradable fiber for the treatment of aortic aneurysms. *Biomaterials*, 31(36), 9554-9564.
- Yan, D., Jones, J., Yuan, X., Xu, X., Sheng, J., Lee, J. C., Ma, G., and Yu, Q. (2012). Plasma treatment of random and aligned electrospun PCL nanofibers. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 33(3), 171-178.
- Yang, D. J., Xiong, C. D., Govender, T., and Wang, Y. Z. (2009). Preparation and drug-delivery potential of metronidazole-loaded poly(triblock copolymeric) electrospun membranes. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 20, 1321-1324.
- Yang, Q., Li, Z., Hong, Y., Zhao, Y., Qiu, S., Wang, C., and Wei, Y. (2004). Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 42(20), 3721-26.
- Yarin, A. L., Koombhongse, S., and Reneker, D. H. (2001). Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, 90(9), 4836-46.
- Yeganegi, M., Kandel, R. A., and Santerre, J. P. (2010). Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. *Acta Biomaterialia*, 6, 3847-3855.
- Yoo, H. S., Kim, T. G., and Park, T. G. (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1033-1042.
- Yoshida, M., Langer, R., Lendlein, A., and Lahann, J. (2006). From advanced biomedical coatings to multi-functionalized biomaterials. *Journal of Macromolecular Science Part C Polymer Reviews*, 46, 347-375.
- Yu, D. G., Branford-White, C., Shen, X. X., Zhang, X. F., and Zhu, L. M. (2010a). Solid dispersions of ketoprofen in drug-loaded electrospun Nanofibers. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31, 902-908.
- Yu, D. G., Gao, L. D., White, K., Branford-White, C., Lu, W. Y., and Zhu, L. M. (2010b). Multicomponent amorphous nanofibers electrospun from hot aqueous solutions of a poorly soluble drug. *Pharmaceutical Research*, 27, 2466-2477.
- Yu, D. G., Shen, X. X., Branford-White, C., White, K., Zhu, L. M., Bligh, S. W. A. (2009b). Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers. *Nanotechnology*, 20(5), 1-9.

- Yu, D. G., Zhang, X. F., Shen, X. X., Branford-White, C., and Zhu, L. M. (2009a). Ultrafine ibuprofen-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning. *Polymer International*, 58, 1010-1013.
- Yu, DG., Wang, X., Li, XY., Chian, W., Li, Y. and Liao, YZ. (2013). Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5665-5672.
- Yu, J. H., Fridrikh, S. V., and Rutledge, G. C. (2004). Production of submicrometer diameter fibers by two-fluid electrospinning. *Advanced Materials*, 16, 1562-1566.
- Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C., and Sheng, J. (2004). Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International*, 53(11), 1704–1710.
- Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J., and Jannesari, M. (2010). Controlled release of metronidazole benzoate from PCL electrospun nanofibres for periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, 179-185.
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., and Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2997-3017.
- Zeng, J., Yang, L., Liang, Q., Zhang, X., Guan, H., Xu, X., Chen, X., and Jing, X. (2005). Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release*, 105, 43-51.
- Zeybek, B., Duman, M., and Ürkmez, A. S. (2014). Electrospinning of nanofibrous polycaprolactone (PCL) and collagen-blended polycaprolactone for wound dressing and tissue engineering. *Usak University Journal of Material Sciences*, 3(1), 121-134.
- Zhang, Y. Z., Venugopal, J., Huang, Z. M., Lim, C. T., and Ramakrishna, S. (2005b). Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6, 2583-2589.
- Zhang, Y., Huang, Z. M., Xu, X., Lim, C. T., and Ramakrishna, S. (2004). Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin bi-component nanofibers by co-axial electrospinning. *Chemistry of Materials*, 16, 3406-3409.
- Zhang, Y., Lim, C. T., Ramakrishna, S., and Huang, Z. M. (2005a). Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(10), 933-946.
- Zhao, Y. Y., Yang, Q. B., Lu, X. F., Wang, C., and Wei, Y. (2005). Study on correlation of morphology of electrospun products of polyacrylamide with ultrahigh molecular weight. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(16), 2190–2195.
- Zhou, T., Wang, N., Xue, Y., Ding, T., Liu, X., Mo, X., and Sun, J. (2015). Development of biomimetic tilapia collagen nanofibers for skin regeneration through inducing keratinocytes differentiation and collagen synthesis of dermal fibroblasts, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 3253–3262.

Zupancic, S., Sinha-Ray, S., Sinha-Ray, S., Kristl, J., and Yarin, A. L. (2016). Controlled release of ciprofloxacin from core-shell nanofibers with monolithic or blended core. *Molecular Pharmaceutics*, 13, 1393-1404.

EKLER

EK-1. Etik kurul onayı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 206-26505
KONU :

28 /11/2013

Sayın

Prof.Dr.Fusun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Fusun ACARTÜRK, Şule COŞKUN CEVHER, Candan ÖZOĞUL, Arzu ONAY BEŞİKÇİ, Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ ve Serdar TORT'tan oluşan, G.Ü.ET-13.072 kod numaralı ve "**Kronik Yara Tedavisinde Etkili, Elektro-çekim Tekniği ile Hazırlanmış Nanolif Yara Örtülerinin Geliştirilmesi**" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.072 and entitled "**Development of Nanofiber Based Wound Dressing Prepared by Electrospinning for Chronic Wound Treatment**" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

AÇIK
Prof.Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TORT, Serdar
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 13/05/1984 Develi
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 30 47
 e-posta : serdartort@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Yüce Fen Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011- Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2010-2011	Elmadağ Devlet Hastanesi	Eczacı
2008-2009	Merkez Lab. İlaç San.	Eczacı
2006-2007	Develi Eczanesi	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Yayınlar

1. Tort, S., Acartürk, F. (2015). Wound healing and electrospun wound dressings: Review, *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*. 4(2), 68-78.
2. Tort, S., Acartürk, F. (2016). Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine, *Carbohydrate Polymers*. 152, 802-814.

3. Rüzgar, G., Birer, M., Tort, S., Acartürk, F. (2016). Studies on improvement of water-solubility of curcumin with electrospun nanofibers, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 143-149.

Yüksek Lisans Tezi

- Morfinin Denetimli Salım Yapan İlaç Şekillerinin Tasarımı Üzerine Çalışmalar

Bildiriler

- Tuğcu-Demiröz, F., Tort, S., İlbasmış-Tamer, S., Acartürk, F. *Assessment of Mucoadhesion Properties of Different Polymers and Mucosal Tissues by Texture Analyze*, 2nd International Conference and Expo on Drug Discovery & Designing, 2016, Rome, Italy.
- Tort, H., Oktay, E., Tort, S., Bayar, G., Kılıç, E., Kılıç, A., Topçu, F., Acartürk, F. *Ornidazole-loaded nanofiber as an alternative treatment for direct pulp capping*, 20th International Congress of Esthetic Dentistry, 2016, İstanbul, Turkey.
- Tort, S., Tuğcu-Demiröz, T., Coşkun-Cevher, Ş., Acartürk, F. *In Vitro and In Vivo Studies on Doxycycline/Collagen Co-Axial Nanofiber Wound Dressing*, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2016, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Acartürk, F. *Studies on Collagen-Doxycycline Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning Method III: Effect of Collagen Concentration on Nanofiber Diameter*, 4th International Conference on Electrospinning, 2016, Otranto, Italy.
- Tort, S., Oğuz, E., Özmen, T., Tuğcu-Demiröz, T., Coşkun-Cevher, Ş., Acartürk, F. *Effect of doxycycline/collagen coaxial nanofibers on oxidative stress in the wound healing I. Malondialdehyde and glutathione levels*, 6. Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları Dünya Kongresi, 2016, Isparta, Turkey.
- Tort, S., Tuğcu-Demiröz, T., Coşkun-Cevher, Ş., Acartürk, F. *Effect of Doxycycline/Collagen Coaxial Nanofibers on Wound Closure Rate*, 26th Conference of European Wound Management Association, 2016, Bremen, Germany.
- Tort, S., Acartürk, F. *Studies on Collagen-Doxycycline Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning Method II: Effect of Polycaprolactone Concentration on Mechanical Properties*, 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2016, Glasgow, Scotland.
- Birer, M., Rüzgar, G., Tort, S., Acartürk, F. *Studies on Improvement of Water-Solubility with Electrospun Nanofibers I: Curcumin*, 1st Gazi Pharma Symposium Series, 2015, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. *Studies on Collagen-Doxycycline Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning Method I: Effect of Collagen Concentration*, AAPS 2015, 2015, Orlando, USA.
- Tort, S., Acartürk, F. *Preparation and Characterization of Electrospun Alginate-based Glutamine Nanofibers*, 6th BBBB International Conference, 2015, Helsinki, Finland.

- Tort, S., Acartürk, F. *Studies on Poly (Ethylene Oxide) Electrospun Nanofibers with Various Polymers III: Sodium Alginate*, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2015, Ankara, Turkey.
- Tort, S., Acartürk, F. *Studies On Poly (Ethylene Oxide) Electrospun Nanofibers with Various Polymers II: Chitosan*, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2014, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Acartürk, F. *Studies on Poly (ethylene oxide) Electrospun Nanofibers with Various Polymers I: k-carrageenan*, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 2013, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Köksal, H., Teksin, ZŞ. *Implementation of BCS Based Biowaiver in Turkey: BCS Class II drugs*, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 2013, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Cin, Ş., Taşhan, E., Yalçın, E., Değim, Z. *Preparation of Theophylline Microspheres and Effect of Stirring Speed on Particle Size*, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 2013, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Köksal, H., Teksin, ZŞ. *Implementation of BCS Based Biowaiver in Turkey*, 5th BBBB International Conference, 2013, Athens, Greece.
- Tort, S., Acartürk, F. *Curcumin-Pectin Nanoparticles for Colon Specific Delivery System*, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2012, Antalya, Turkey.
- Tort, S., Tuğcu-Demiröz, F., Yalçın, E., Cin, Ş., Çelebi, N. *In Vitro Determination of Disintegration Time of Orally Disintegrating Tablets Using a New Method*, 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2012, Ankara, Turkey.

Ödüller

- Serdar Tort, Fatmanur Tuğcu Demiröz, Şule Coşkun Cevher, Füsun Acartürk, “*In vitro and in vivo studies on doxycycline/collagen co-axial nanofiber wound dressing*”, 18th International Pharmaceutical Symposium, September, 18-21, 2016, En İyi Poster Ödülü
- Serdar Tort, Alptuğ Eren Karaküçük, “*İş güvenliği ve savunma sanayine yönelik kanama durdurucu nanoteknolojik örtü geliştirilmesi*”, Gazi Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi – Halkbankası, Fikirden İcraata 2015, Birincilik Ödülü
- Serdar Tort, Alptuğ Eren Karaküçük, “*Akne ve uçuk tedavisinde etkili resveratrolün kombine yöntemlerle yeni nanofiber formülasyonunun geliştirilmesi*”, Gazi Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi – Halkbankası, Fikirden İcraata 2014, Birinci Mansiyon Ödülü

Projeler

- *Akneye meyilli ciltlerde ve cilt bakımında etkili yeni nanoteknolojik ürün geliştirilmesi*, 2015-2016, Proje Kodu: 0104.TGSD.2015, Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Teknogirişim Sermayesi Desteği, Araştırmacı

- *Kronik yara tedavisinde etkili, elektro-çekim tekniği ile hazırlanmış nanolif yara örtülerinin geliştirilmesi*, 2014-2016, Proje Kodu:213M689, TÜBİTAK 1003 - Öncelikli Alanlar Ar-Ge Destekleme Programı, Bursiyer
- *Oral mukozit tedavisi için glutamin içeren mukoadhezif nanolif formülasyonlarının elektro-çekim yöntemi ile geliştirilmesi*, 2013-2014, Proje Kodu:112S399, TÜBİTAK 1002 – Hızlı Destek Programı, Bursiyer

Patentler

- Serdar Tort, Alptuğ Eren Karaküçük, “*Kitozan ve PVP nanolifleri içeren kanama durdurucu örtü*”, TR2016/16139, Başvuru yapıldı
- Füsün Acartürk, Serdar Tort, “*Koaksiyal nanolif yara örtüsü*”, TR2016/03822, Başvuru yapıldı
- Füsün Acartürk, Serdar Tort, “*Glutamin içeren bir nanolif formülasyonu*”, TR2014/08284, Tescil Tarihi: 2016/12/21



GAZİ GELECEKTİR..

