



***HYPERICUM PERFORATUM* YAĞI YÜKLENMİŞ
POLİMERİK MEMBRANLARIN YANIK YARA
İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU OLUŞUMUNA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NAME ERDEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZLEM EĞRİ
2019**

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HYPERICUM PERFORATUM YAĞI YÜKLENMİŞ POLİMERİK
MEMBRANLARIN YANIK YARA İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU
OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

NAME ERDEMİR

TOKAT
Ocak - 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

TÜBİTAK tarafından 117S542 nolu proje ile desteklenmiştir.

Name ERDEMİR tarafından hazırlanan “*Hypericum perforatum* Yağı Yüklenmiş Polimerik Membranların Yanık Yara İyileşmesinde Skar Doku Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25 OCAK 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

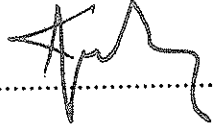
Jüri Üyeleri

İmza


Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Özlem EĞRİ
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye
Doç. Dr. Fikret GEVREK
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye
Dr. Öğr. Üyesi İsmail Alper İŞOĞLU
Abdullah Gül Üniversitesi




Prof. Dr. Cevat ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

20/02/2019

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

NAME ERDEMİR

23 Aralık 2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***HYPERICUM PERFORATUM* YAĞI YÜKLENMİŞ POLİMERİK MEMBRANLARIN YANIK YARA İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NAME ERDEMİR

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZLEM EĞRİ)

Epidermis ve dermis tabakalarının zarar gördüğü ikinci derece yanıklar, dermiste belirli oranlarda kayba neden olur. Bu nedenle yara iyileşme süreci genellikle ciddi yara izi oluşturarak tamamlanmaktadır. Sunulan tez çalışmasının amacı, ikinci derece yanık yaralarının tedavisinde yara iyileştirici özelliği bilinen *Hypericum perforatum* (kantaron) yağı yüklenmiş iki tabakalı PEG-PCL polimerik membranların üretilmesidir. *H. perforatum* yağı PEG polimer çözeltisinin içerisine katılarak elektro-spreyleme ile kapsüllenmiştir. Elektro-spreylenen PEG çözeltisi ile elektro-eğirilen PCL çözeltisi eş zamanlı ve karşılıklı olarak döner toplayıcıda biriktirilmiştir. Mikrokapsüllerin membran içerisindeki dağılımı ve membranların yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), polimerlerin çözücü ile etkileşimleri Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile belirlenmiştir. Membranların mekanik dayanımları standart çekme testleri ile karakterize edilmiştir. Gaz geçirgenlik özellikleri yine standart hava gazı geçirgenlik testi ile incelenmiştir. Membranların hidrofilitesi temas açısı ölçümleri, ıslanabilirliği şişme testleri gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Membranların zamana bağlı kütle kaybı ve *H. perforatum* yağının zamanla membranlardan kontrollü salımı *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Membranların gram-pozitif ve gram-negatif bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği disk difüzyon testleri yapılarak gözlemlenmiştir. *In vitro* koşullarda L929 fare fibroblast hücre hattı ile inkübe edilen membranların biyoyumluluğu (WST-1) ve hücrelerle etkileşimleri (hücre tutunması, proliferasyon ve apoptoz-nekroz) incelenmiştir. Son olarak polimerik membranlar, Wistar albino sıçanların kullanıldığı (n=35) 16 gün süren hayvan deneylerinde yara iyileştirici özelliği bakımından performansı incelenmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak üretilen polimerik membranlar gözeneklilik, hava geçirgenliği, nem tutma kapasitesi, hidrofilitesi, elastikiyet, antibakteriyel olma, yaraya yapışmama, biyoyumluluk gibi özellikler bakımından ideal bir yara örtüsünde olması istenilen optimum değerlere sahip olmakla birlikte içerdiği *H. perforatum* yağının istenilen şekilde membranlardan kontrollü salımının yara iyileşmesini destekleyerek iyileşme sürecini hızlandırdığı yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla teyit edilmiştir. Bununla

birlikte membranların uzun vadede yara izi oluşumunu da azaltma potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

2019, 109 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Yara örtüsü, Membran, *co*-elektro-eğirme, Elektro-spreyleme, *Hypericum perforatum* yağı



ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF POLYMERIC MEMBRANES LOADED WITH *HYPERICUM PERFORATUM* OIL ON SCAR TISSUE FORMATION IN BURN WOUND HEALING

NAME ERDEMİR

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. ÖZLEM EĞRİ

Second degree burns, which are damaged by epidermis and dermis, cause certain rates of loss in the dermis. Therefore, wound healing process is usually completed by creating a serious scar. The aim of the thesis is to produce two layer PEG-PCL polymeric membranes loaded with *Hypericum perforatum* oil known as wound healing in the treatment of second-degree burns. *H. perforatum* oil is encapsulated by electro-spraying into PEG polymer solution. The electro-spraying PEG solution and the electro-spun PCL solution were deposited simultaneously and mutually in the rotary collector. Distribution of microcapsules within the membrane, membrane surface morphology and interactions of polymers with solvents were determined by Scanning Electron Microscope (SEM) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), respectively. Mechanical strength of membranes have been characterized by standard tensile test. Gas permeability properties were investigated by standard air gas permeability test. The hydrophilicity of the membranes was determined by carrying out contact angle measurements and swelling tests. The time-dependent mass loss of the membranes and the controlled release properties of the *H. perforatum* oil from membranes over time were investigated *in vitro*. The antibacterial activity on gram-positive and gram-negative bacterial strains of the membranes was observed by disk diffusion tests. The biocompatibility (WST-1) and cell interaction with cells (incubation, proliferation and apoptosis-necrosis) of membranes, *in vitro* incubation with L929 mouse fibroblast cell line, were investigated. Finally, polymeric membranes were evaluated for their wound healing properties in a 16-days animal experiment performed by using Wistar Albino rats (n=35). Histochemical and immunohistochemical findings were evaluated statistically.

As a result of produced polymeric membranes have the optimum values to be in an ideal wound dressing in terms of various properties (porosity, air permeability, moisture retention capacity, hydrophilicity, elasticity, antibacterial, non-stickiness on wound, biocompatibility etc.). It was confirmed by *in vitro* and *in vivo* studies that controlled release of the *H. perforatum* oil from the membranes as desired to accelerate the healing

process by supporting wound healing. However, it is thought that membranes have the potential to reduce long-term scar formation.

2019, 109 Pages

KEY WORDS: Wound healing, Membranes, co-electrospinning, Electro-spraying, *Hypericum perforatum* oil



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanım olarak tez konusunun belirlenmesi, projelendirilmesi, çalışmamın başarılı bir şekilde ilerleyebilmesi için tüm imkanlarımı sunan ve tezin sonuçlandırılması, değerlendirilmesi hususunda sonsuz desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Özlem EĞRİ'ye,

Tez çalışmam sürecinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Fikret GEVREK, Doç. Dr. Sinan EĞRİ, Prof. Dr. Mustafa TÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Murat UYSAL'a,

Henüz lisans eğitimimin başlarında bana mühendisliğin önemini kavratan ve mesleğime çok farklı bakmamı sağlayan merhum hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Volkan KÖSELİ ve tüm Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi hocalarıma,

Tez çalışmamı 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Yıllardır birlikte çalıştığım, her konuda desteğini ve yakınlığını hissettiğim canım arkadaşım Arzu COŞKUN'a,

Berber çalışma imkanı bulduğum için mutluluk duyduğum ve hiçbir konuda yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Gülşen ŞAHİN'e,

Yaşantım boyunca her an sevgi, sabır ve anlayışları ile desteklerini hissettiren, kendilerine ne kadar minnet duysam yetersiz kalacağını bildiğim canım annem Nazmiye ve babam Metin ERDEMİR'e,

Güvenleri ve inançları ile bana güç veren anneannem Ayten ve dedem Mehmet Azmi AKGÖZ'e, babaannem Nevcivan ERDEMİR'e, teyzelerim Nesrin DENİZ ve Nilgün ÇIRAK'a, amcam Adalet ERDEMİR'e,

Hayatımı güzelleştiren ve varlıkları için şükrettiğim kardeşlerim Rahmi Can ERDEMİR ve Berfin DENİZ'e,

Sevgiyi, saflığı ve güzelliği yeniden öğrenmemi sağlayan sevgili yeğenim Melek ÇIRAK'a teşekkürlerimi sunarım.

NAME ERDEMİR

30.11.2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Deri Dokusu	4
2.1.1. Derinin Yapısı	4
2.1.1.1. Epidermis	5
2.1.1.2. Dermis	6
2.1.1.3. Hipodermis	7
2.1.2. Derinin Fonksiyonları	8
2.2. Yara.....	8
2.2.1. Yara Çeşitleri	9
2.2.2. Yanık Yaraları.....	9
2.2.2.1. Birinci Derece Yanıklar	9
2.2.2.2. İkinci Derece Yanıklar	10
2.2.2.3. Üçüncü Derece Yanıklar	10
2.2.2.4. Dördüncü Derece Yanıklar	11
2.2.3.Yara İyileşmesi	11

2.2.4. Yara İyileşme Süreci.....	12
2.2.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon	12
2.2.4.2. Migrasyon (Göç)	13
2.2.4.3. Proliferasyon	13
2.2.4.4. Olgunlaşma (Yeniden Biçimlendirme).....	13
2.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Malzemeler	14
2.3.1. Yanık Yara Örtü Materyalleri	14
2.3.2. Yanık Yara Örtü Materyallerinin Sınıflandırılması	17
2.3.2.1. Geleneksel Yanık Yara Örtü Materyalleri	17
2.3.2.2. Modern Yanık Yara Örtü Materyalleri	19
2.3.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Aktif Bileşenler	23
2.3.3.1. Büyüme Faktörleri	23
2.3.3.2. Vitamin ve Mineral Destekleri	23
2.3.3.3. Antimikrobiyaller	24
2.3.4. Yanık Yara İyileşmesinde Bitkisel Yağların Kullanımı	24
2.3.4.1. <i>Hypericum perforatum</i> Yağının Yanık Yara İyileşmesindeki Etkinliği	25
2.3.4.2. Yanık Yara İyileşmesinde Kullanılan Diğer Yağlar	26
2.4. Nanofibröz Yara Örtü Materyalleri	27
2.4.1. Nanofibröz Yara Örtü Materyallerinin Üretim Teknikleri	28
2.4.1.1. Elektro-eğirme Tekniği	28
2.4.1.2. Diğer Üretim Teknikleri	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Yara Örtü Materyallerinin Üretimi	35
3.2.2. Membran Karakterizasyonu ve <i>In vitro</i> Çalışmalar	37

3.2.2.1. Kimyasal Yapı Analizi	37
3.2.2.2. Yüzey Morfolojisi	37
3.2.2.3. Yoğunluk ve Gözeneklilik	38
3.2.2.4. Hidrofilisite/Hidrofobisite	38
3.2.2.5. Islanabilirlik (% Şişme Oranları).....	39
3.2.2.6. Hava Geçirgenliği	40
3.2.2.7. Zamana Bağlı Kütle Kaybı	40
3.2.2.8. Kontrollü Salım Çalışmaları	41
3.2.2.9. Mekanik Dayanıklılık	42
3.2.2.10. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları	43
3.2.2.11. Biyouyumluluk	44
3.2.2.12. Membranların Apoptotik & Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi	45
3.2.2.13. Membran Yüzeylerine Hücre Yapışmasının İncelenmesi	47
3.2.3. <i>In vivo</i> Uygulamalar ve Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar	48
3.2.3.1. Hayvan Deneyleri	48
3.2.3.2. Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar	52
3.2.3.2.1. Mayer's Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	53
3.2.3.2.2. Masson's Trichrome (Üçlü) Boyama Yöntemi	54
3.2.3.2.3. Tip 1 ve Tip 3 Kollajen Proteini İmmunohistolojik Boyama Yöntemi	56
3.2.3.2.4. İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1. Membran karakterizasyonu ve <i>in-vitro</i> çalışmalar	59
4.1.1. Kimyasal Yapı Analizi	59
4.1.2. Yüzey Morfolojisi (SEM).....	60
4.1.3. Membran Yoğunluğu ve Gözenekliliği	61
4.1.4. Hidrofilisite / Hidrofobisite (Temas Açısı Ölçümleri)	62

4.1.5. Islanabilirlik (Şişme Testi).....	64
4.1.6. Hava Geçirgenlik Testi	65
4.1.7. Zamana Bağlı Külte Kaybı Ölçümleri	66
4.1.8. <i>H.perforatum</i> Yağının Membranlardan Kontrollü Salımı	67
4.1.9. Elastikiyet (Çekme-Uzama Testleri)	69
4.1.10. Antibakteriyel Aktivite (Disk Difüzyon Testi).....	71
4.1.11. Biyoyumluluk (Sitotoksosite Testi /WST-1).....	72
4.1.12. Membranların Apoptotik & Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi	73
4.1.13. Membran Yüzeylerine Hücre Yapışmasının İncelenmesi	77
4.2. <i>In vivo</i> Uygulamalar ve Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar	78
4.2.1. Hayvan Deneyleri	78
4.2.2. İmmunohistokimyasal/Histolojik Çalışmalar ve İstatistiksel Analizler	87
4.2.2.1. İmmunohistokimyasal Bulgular	87
4.2.2.2. Histopatolojik Bulgular	92
5. SONUÇLAR.....	97
6. KAYNAKLAR	103
7.ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Derinin yapısı	4
Şekil 2.2. Epidermis yapısı ve katmanları	5
Şekil 2.3. Dermisin yapısı ve tabakaları	7
Şekil 2.4. Yara iyileşme fazları	12
Şekil 2.5. Polimer jetinin hareketi	29
Şekil 2.6. Elektro-eğirme düzeneğinin şematik görünümü	30
Şekil 3.1. Elektro-eğirme sistemi	36
Şekil 3.2. Döner silindir toplayıcı üzerine elektro-eğirilmiş PEG-PCL membranlar	37
Şekil 3.3. Hidrofobik ve hidrofilik yüzeyler	39
Şekil 3.4. (A) Temas açısı test cihazı; (B) Membran yüzeyindeki damlanın görüntüsü	39
Şekil 3.5. (A) Çekme-uzama grafiği; (B) çekme süresince malzemede sırasıyla gerçekleşen değişiklikler; (C) çekme test cihaz	42
Şekil 3.6. Mekanik test için hazırlanan membranlar	43
Şekil 3.7. Membranların (0, 1, 2, 3) petrolere yerleşimi	44
Şekil 3.8. (A) Pirinç çubuk (uzunluk: 10 mm ve çap: 7 mm); (B) İkinci derece derin yanık oluşturmak üzere seçilen proksimal dorsal bölge	50
Şekil 3.9. (A) Batikon uygulanması, (B) epidermisin uzaklaştırılması için bisturi ucu ile traşlama işlemi, (C) hafif kanlanma; epidermisin uzaklaştırılıp dermis tabakasına ulaşıldığını göstermektedir	50
Şekil 3.10. (A) 5 dakika boyunca doğrudan aleve maruz bırakılmış pirinç çubuğun 15 saniye boyunca sırt derisine uygulanışı, (B) uygulama sonrası görünüm, (C) dağlanmış deri tabakasının yine eskar eksizyonu ile uzaklaştırılması	51
Şekil 3.11. (A) Isıtılmış pirinç çubuğun 15 sn. uygulanması sonrasındaki yara görünümü ve (B) oluşturulan yaranın ölçülmesi (7,5 mm)	51
Şekil 3.12. Yara bölgesine membranların dikilmesi.....	51
Şekil 3.13. İmmunohistokimyasal boyamada antijen-antikor bağlanması.....	56

Şekil 4.1. Membran yapısına katılan polimerler ve <i>H. perforatum</i> yağına ait ATR-FTIR spektrumları	60
Şekil 4.2. 1'e ait SEM görüntüleri; (A) ve (B) üst tabaka sırasıyla x200 ve x400 büyütme, (C) ve (D) alt tabaka sırasıyla x400 ve x1000 büyütme	61
Şekil 4.3. Membran 0'ın (A) alt ve (B) üst tabaka yüzeylerindeki su damlacığı görüntüsü ve ölçülen temas açısı değerleri	63
Şekil 4.4. Membran 0'ın (A) alt ve (B) üst tabaka yüzeylerindeki su damlacığı görüntüsü ve ölçülen temas açısı değerleri	63
Şekil 4.5. Membran 0 ve membran 1'e ait zamana bağlı % şişme oranları	65
Şekil 4.6. Membranların (0 ve 1) zamana bağlı kütle kayıpları	67
Şekil 4.7. <i>H. perforatum</i> yağı içeren PBS çözeltilerinin optik density (OD) değerlerine karşılık gelen yağ miktarları (Kalibrasyon Grafiği)	68
Şekil 4.8. <i>H. perforatum</i> yağının membran 1'den zamana bağlı salımı (14 & 2 gün)....	69
Şekil 4.9. Bükülebilir esnek polimerik membran şeritler	70
Şekil 4.10. Membranların (0, 1, 2, 3) (A) <i>E. coli</i> ve (B) <i>S. aureus</i> bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinliği	72
Şekil 4.11. Membranlarla (0, 1, 2, 3) etkileştirilen L929 fare fibroblast hücrelerinin % hücre canlılığı ve % apoptoz /nekroz değerleri	75
Şekil 4.12. L929 fibroblast hücrelerinin ikili boyanmaları sonrasında apoptoz ve nekroz görüntüleri	75
Şekil 4.13. Membranlarla etkileştirilen L929 fibroblast hücrelerinin ikili boyanmaları sonrasında apoptoz ve nekroz görüntüleri	76
Şekil 4.14. L929 fare fibroblast hücreleri ile etkileştirilmiş yağlı membranlara (1, 2, 3) ait inkübasyon (2 gün) sonrası alınan farklı çözünürlüklerdeki 200X (A1, B1, C1), 400X (A2,B2,C2), 800X (A3, B3, C3) SEM görüntüleri.....	77
Şekil 4.15. Negatif kontrol grubunu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F)	81
Şekil 4.16. Pozitif kontrol grubunu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F)	82
Şekil 4.17. <i>H. perforatum</i> yağının direkt uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F)	83

Şekil 4.18. Membran 0'ın uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).....	84
Şekil 4.19. Membran 1'in uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).....	85
Şekil 4.20. Deney gruplarının 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerdeki ortalama yara alanı değeri	86
Şekil 4.21. Deney gruplarının 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerdeki ortalama % küçülme oranları	87
Şekil 4.22. Her bir gruptan sırasıyla temsili bir adet sıçan derisi kesitine ait tip 1 kollajen boyalı mikroskopik resimler (50 µm); A, B, C, D ve E sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5. deney gruplarını temsil etmektedir, (F) tip 1 kollajen immünohistokimyasal (İHK-DAB) boyanma yoğunlukları H-skorları grup ortalama değerleri	89
Şekil 4.23. Her bir gruptan sırasıyla temsili bir adet sıçan derisi kesitine ait tip 3 kollajen boyalı mikroskopik resimler (50 µm); A, B, C, D ve E sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5. deney gruplarını temsil etmektedir, (F) tip 3 kollajen immünohistokimyasal (İHK-DAB) boyanma yoğunlukları H-skorları grup ortalama değerleri	90
Şekil 4.24. Tip 1 ve tip 3 kollajen immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları H-skorları grup ortalama değer oranları	92
Şekil 4.25. Sıçanlardan alınan deri kesitine ait optik mikroskop görüntüsü (Masson's Trichrome üçlü boyama sonrası)	92
Şekil 4.26. Deney gruplarından temsili üçlü boyama (modifiye massontrikrom (MMT)) örnek resimleri (500 µm)	94
Şekil 4.27. Her bir deney grubunu temsilen hematoksilin eozin boyalı örnek resimler (Bar: 50 µm); A, B, C, D ve E'de sarı işaretli şeritler içerisinde kalan bölgeler yeni oluşan epidermis tabakasını ifade etmektedir, (F) her bir deney grubu için epidermis alanı/epidermis uzunluğunu veren grafik (*istatistiksel olarak benzerlik).....	95

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Elektro-eğirme Parametreleri	31
Çizelge 3.1. Mayer's Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü	54
Çizelge 3.2. Üçlü boyama prosedürü	55
Çizelge 3.3. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	57
Çizelge 4.1. Membranların spesifik hacim, yoğunluk ve % gözeneklilik değerleri	62
Çizelge 4.2. Membran (0 ve 1) alt ve üst tabaka yüzeylerinin temas açısı değerleri	63
Çizelge 4.3. Hava geçirgenlik test sonuçları	65
Çizelge 4.4. PEG-PCL membranların mekanik test sonuçları	70
Çizelge 4.5. Membranların (0, 1, 2, 3) (A) <i>E. coli</i> ve (B) <i>S. aureus</i> bakterileri üzerindeki inhibisyon zon çapları	72
Çizelge 4.6. % hücre canlılığı (WST-1 test sonuçları) ve % apoptoz/nekroz (Hoechst/PI ikili boyama) değerleri.....	74
Çizelge 4.7. <i>In vivo</i> deney grupları.....	79
Çizelge 4.8. İmmünohistokimyasal reaktivitenin derecelendirilmesi için kullanılan kriterler	88
Çizelge 4.9. Tip 1 ve tip 3 kollajen proteinlerin immün boyanma şiddeti skorları	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASTM: Amerikan Test ve Malzeme Kurumu

ATCC: American Type of Culture Collection

CV: Varyasyon katsayısı

DAB: 3,3'diaminobenzidine

DMEM: Dulbecco Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

ECM: Ekstraselüler matriks

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik asit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMB: Eosine Metilen Blue

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

H&E: Hematoksilen ve eosin

hGH: İnsan büyüme hormonu

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IP: İntraperitoneal

İHK: İmmunohisyo kimyasal

LB: Luria Bertani

MHB: Müller Hinton Buyyon

MMT: Modifiye massontrikrom

OM: Optik mikroskop

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCL: Polikaprolakton

PDGF: Platelet türevli büyüme faktörü

PEG: Polietilen glikol

PI: Propidyum iyodür

PLGA:Poli(laktik-co-glikolik asit)

PLLA:Poli(L-laktat)

PMA: Polimetakrilat

PVP: Polivinilpirolidon

RA: Ribonükleaz A

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

SJW: St. John's wort (*Hypericum perforatum*, sarı kantaron)

TGF- β 1: Dönüştürücü büyüme faktörü

WST-1: Water soluble Tetrazolium salts

WVP: Su buharı geçirgenliği

1. GİRİŞ

Deri, vücudun dış yüzeyini kaplayan, hayati birçok fonksiyonu olan ayrıca çevre ile organizma arasındaki iletişimi sağlayan oldukça organize ve tabakalı bir organdır. Vücudun fizyolojisini etkileyebilecek olan mekanik, kimyasal ve mikroorganizma kaynaklı faktörlere karşı bir bariyer oluşturur. Çeşitli faktörler sonucu derinin normal anatomik yapısının ve cilt fonksiyonlarının bozulması ile farklı şekillerde yaralar oluşabilir. Akut ve kronik olmak üzere temelde iki yara türü mevcuttur. Akut yaralar, travmalardan kaynaklanır ve genellikle 8-12 haftalık sürede iyileşebilir. Yanık yaraları, akut yaralar olarak değerlendirilir ve ısı, elektrik çarpması, aşındırıcı kimyasal maddelere maruz kalma gibi sebeplerle meydana gelebilir. Bu yaralar için bakım, yaranın şiddetine bağlıdır (Zahedi ve ark., 2010). Kronik yaralar ise diyabet, tümör ve fizyolojik kontaminasyonlar gibi belirli hastalıkların sonucunda oluşan yaralanmalardır. Bu yaraların iyileşmesi 12 haftadan daha uzun süreler alabilir. Ayrıca kronik yaraların tekrarlama ihtimali de vardır (Zahedi ve ark., 2010). Oluşan yaraların kısa sürede etkili bir şekilde iyileşme eğilimi vardır (Zahedi ve ark., 2010). Bu eğilim ile iyileşme süreci başlar ve yaralanma ile kaybedilen yapılar yeniden oluşur (Zahedi ve ark., 2010; Boateng ve ark., 2007). Yara iyileşmesi iç içe geçmiş kompleks biyolojik ve fizyolojik süreçlerden (hemostaz-inflamasyon, migrasyon, proliferasyon, olgunlaşma) oluşur (Zahedi ve ark., 2010).

Yaranın türüne, derecesine ve durumuna bağlı olarak bazen tedaviyi destekleyici materyallere ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle durumlarda yara yüzeyi uygun bir yara örtüsü ile kapatılarak yaranın hem nemli tutulması hem de dokunun dış etkenlerden korunması amaçlanmaktadır (Geronemus ve Robins, 1982). Yara iyileşmelerinde kullanılmak üzere farklı firmalar tarafından üretilen çok çeşitli yara örtü materyalleri bulunmaktadır (Stashak ve ark., 2004; Ulubayram ve Hasırcı, 1998). Bununla birlikte uygulamada kullanılan mevcut örtü materyallerinin büyük bir kısmı tasarımına, yara türüne, hastanın durumuna bağlı olarak tedavi sürecinde ideal bir örtü materyalinden beklenen tüm özellikleri gösteremeyebilir. Bu sebeple gelişen teknoloji ve artan talep üzerine yara örtü materyalleri ile ilgili araştırma-geliştirme çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Doku mühendisliği ve biyomalzeme literatüründe de yara örtü materyalleri sıklıkla çalışılan konular arasındadır (Zahedi ve ark., 2010; Altay ve Başal, 2010).

Sunulan tez çalışması kapsamında ikinci derece yanıkların tedavisi amacıyla iyileşme sürecini desteklemesi ve skar doku oluşumunu azaltması hedeflenen yanık yara örtü materyalleri üretilerek, karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veri ışığında, *in vitro/in vivo* performans değerlendirmeleri yapılmıştır. Yara örtü materyalleri yara çevresi ile temas eden üst tabaka ve yara ile temas eden alt tabakadan oluşan iki tabakalı tasarıma sahiptir. Üst tabaka mekanik dayanımı sağlayan Polikaprolakton (PCL) fiberlerden, alt tabaka ise Polietilen glikol (PEG) ve Polikaprolakton (PCL) fiberlerden oluşmaktadır. Ayrıca alt tabakada PEG fiberler üzerinde *Hypericum perforatum* (kantaron) yağı içeren PEG kapsüller bulunmaktadır. FDA (Food and Drug Administration) onaylı biyouyumlu, biyobozunur, kolay işlenebilir PEG ve PCL polimerleri doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Grossen ve ark., 2016). PCL polimeri mekanik olarak dayanıklı olması nedeniyle üst ve alt tabakalarda mekanik dayanımı sağlayarak iyileşme sürecinde membran bütünlüğünü korumaktadır. Suda çözünebilir PEG polimeri alt tabakada yara eksudası ile temas durumunda PEG kapsüllerin çözünmesi neticesinde *H. perforatum* yağının yara bölgesine kontrollü salımını sağlamaktadır. *H.perforatum* yağı içeriğinde bulunan hiperisin ve hiperforin gibi aktif bileşenleri yara iyileştirici özelliğe sahiptir (Wölfle ve ark., 2013) ve çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Rančić ve ark., 2005). Böylece membranlara antimikrobiyal özellik kazandırırken yara iyileşme sürecini desteklemektedir. Yara örtü materyalleri elektro-eğirme tekniği ile üretilmiştir. *H. perforatum* yağı ise PEG polimeri ile birlikte elektro-spreylenerek enkapsüle edilmiştir. Elektro-eğirme ve elektro-spreyleme benzer tekniklerdir. Polimerler uygun çözücülerde çözülerek iletken çözeltiler hazırlanır ve elektrik alan oluşturularak çözeltilerin şırınga ucundan bir toplayıcıya hareketi sağlanır. Çözücüsünün uçması ile beraber örgüsüz (non-woven) lifler oluşturarak çöken polimer toplayıcıda birikir. Yeterli şiddette elektrik-alan olmadığı durumda polimer çözeltisi saçılarak kesikli parçalar halinde hareket eder. Bu şekilde gerçekleştirilen elektro-eğirmeye elektro-spreyleme denilmektedir. Elektro-eğirme yöntemi sağladığı avantajlar ile yeni nesil yara örtü materyallerinin geliştirilmesinde son zamanlarda yaygın kullanılan teknikler arasındadır (Bhushani ve Anandharamakrishnan, 2014). Nanolif üretim tekniği olan elektro-eğirme yöntemiyle

yüksek gözenekliliğe, küçük gözenek boyutlarına, yüksek yüzey/hacim oranına sahip, esnek ve hafif membranlar üretilmektedir (Zahedi ve ark., 2010). Böylece ekstraselüler matriksin (ECM) hücrel iletkenliğini sağlayan, kan ve diğer doku sıvıları ile uyumluluğunu artıran ağsı nanofibröz yapısı taklit edilebilmektedir (Kim ve Yoon, 2008; Han ve Gouma, 2006).

Sunulan tez çalışması kapsamında nitelikli bir yara örtü materyalinden beklenen özelliklere sahip (yarayı eksojen bakteri vb. dış etkenlerden koruma, antimikrobiyal etkinlik, kontrollü nem dengesini sağlama, gaz geçirgenliği, yaraya yapışmama, biyouyumluluk, iyileşmeyi destekleme), bununla birlikte alternatif tıp (bitkisel yağ terapileri) ve modern yara örtü materyalinin bir arada kullanıldığı entegre bir yara örtü materyali üretilmiştir. Örtü materyallerinin *in vitro* performans değerlendirmeleri için gerekli analizler (kimyasal yapı, yüzey morfolojisi, yoğunluk, gözenekliik, yüzey hidrofobitesisi, ıslanabilirlik, hava geçirgenliği, kontrollü salım, elastikiyet, antibakteriyel aktivite, biyouyumluluk, apoptotik/nekrotik etki, L929 fibroblast hücreleri ile membran etkileşimi) yapılmış ayrıca *in vivo* hayvan deneyleri ve sonrasında immunohistokimyasal/histopatolojik analizler gerçekleştirilerek membranların yara örtü materyali olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

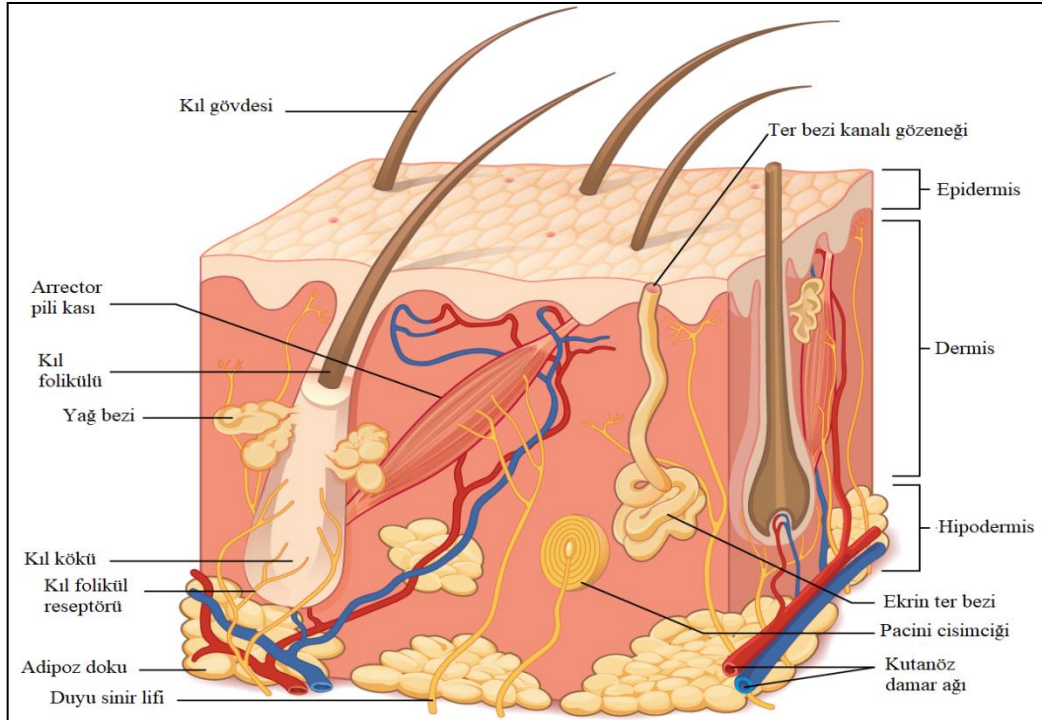
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Dokusu

Deri, vücudun dış yüzeyini kaplayan, hayati birçok fonksiyonu olan ayrıca çevre ile organizma arasındaki iletişimi sağlayan oldukça organize ve tabakalı bir organdır. Vücudun fizyolojisini etkileyebilecek olan mekanik, kimyasal ve mikroorganizma kaynaklı faktörlere karşı bir bariyer oluşturur.

2.1.1. Derinin Yapısı

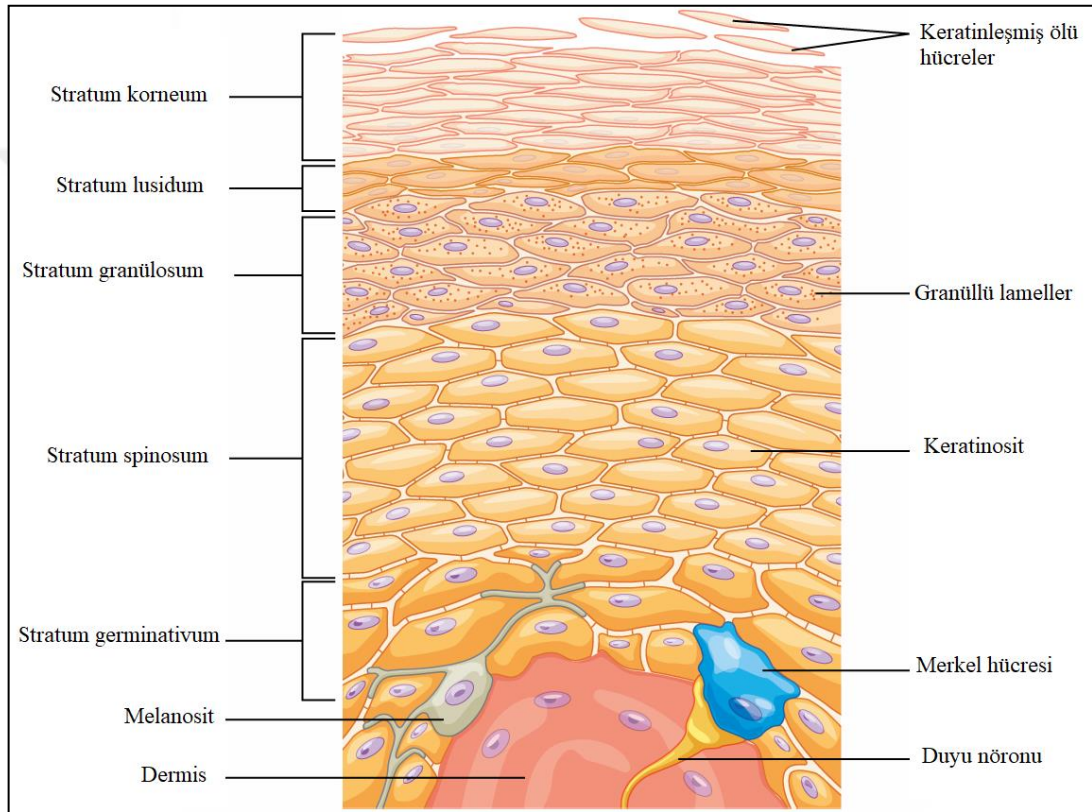
Deri embriyonel gelişim esnasında ektoderm ve mezoderm tabakalarından köken almaktadır. Dıştan içe doğru epidermis, dermis ve hipodermis (subkutis) olmak üzere 3 temel tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakaların kalınlıkları vücudun farklı bölgelerindeki derilerde farklı kalınlıklar göstermektedir. Bunlara ilaveten temel düzeyde fonksiyonlara yardımcı olmak amacı ile deri ekleri gelişmiştir. Deri, belirli tabakalardan oluşan düzenli bir yapı olsa da, bulunduğu bölgeye göre sitolojik, histolojik ve/veya biyokimyasal yönden farklılıklar gösteren heterojen bir yapıya sahiptir. Örneğin, ön kol derisi ile karın derisinin metabolik aktiviteleri de birbirinden farklılıklar göstermektedir (Ölçer ve Gönül, 2002).



Şekil 2.1. Derinin yapısı (Anonim, 2017)

2.1.1.1. Epidermis

Derinin dış katmanı olan epidermis, vücudu dış etkenlerden koruyan, nem dengesini ve belirli bir oranda geçirgenliği sağlayan tabakadır. Epidermis kendi içinde dıştan içe doğru sırasıyla; stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum germinativum olarak adlandırılan 5 ayrı alt tabakaya sahiptir (Hendriks, 2001; Mutlu, 2014).



Şekil 2.2. Epidermis yapısı ve katmanları (Anonim, 2017)

Epidermis yapısında temelde keratinositler olmak üzere pigment oluşturan hücreler olan melanositler; immunolojik fonksiyonlara sahip Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri olmak üzere 4 farklı hücre tipi bulunmaktadır (Ölçer ve Gönül, 2002; Hendriks, 2001). Epidermisi oluşturan temel hücreler ektoderm kökenli keratinositlerdir, skuamöz hücreler olarak da bilinen bu hücreler (stratum korneum/keratinize tabaka), kıl ve tırnağın temel yapısını oluşturan filament yapılı bir protein olan keratini üretirler. Derinin yüzeysel tabakasında yığın halde bulunan keratinize hücreler derinin ölü tabakasını oluşturur. Fiziksel, mekanik ve yaşlanma gibi etkilerle dökülme özelliği gösteren bu tabakadaki hücrelerin yerine epidermisin bazal

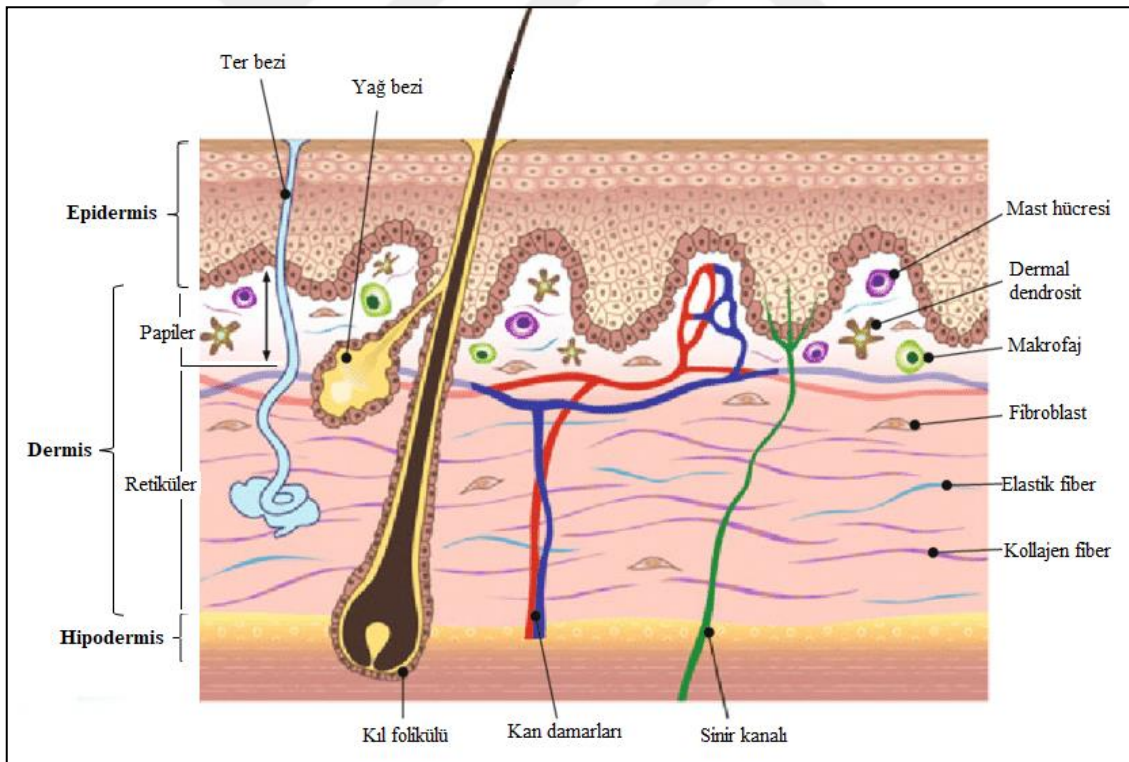
tabakasındaki hücrelerin bölünmesiyle oluşan, dışa doğru hareket edebilen yeni keratinositler oluşturulur (Hendriks, 2001; Çakal, 2004). Bu tabakanın altında stratum lusidum bulunmaktadır. Avuç içi ve ayak tabanı derisinde belirgin kalınlıktayken, derinin çok ince olduğu bölgelerde yok denilebilecek inceliktedir. Bu tabakanın altında bulunan stratum granulosumda sıralı olarak dizilmiş yassı hücrelerde keratin partikülleri bulunmakta ve keratin üretimine katkı sağlamaktadırlar. Stratum spinosum tabakasinda bulunan temel hücre tipleri keratinositler ve langerhans hücreleridir. Keratin üretimi ve immünolojik savunma bu tabakanın en önemli işlevleri olmakla birlikte deride nem dengesini sağlayan lipidlerin üretimi de gerçekleştirilmektedir. Epidermisin en alt tabakası olan stratum germinativum tek sıralı silindirik keratinositlerden oluşmakta ve melanositler, merkel hücreleri ve az miktarda langerhans hücrelerini içermektedir. Keratinositlerin mitoz bölünmesi ve melanositlerden melanin pigmentinin üretimi sadece bu tabakada gerçekleşmektedir. İhtiyaç olan bölgelere göç etme yeteneğindeki keratinositler göç sırasında farklılaşırlar (Mutlu, 2014). Epidermis kan damarlarınca yoksun olduğundan doku beslenmesi alttaki bağ dokudan kandan doku sıvısına difüzyonuyla gerçekleşmektedir (Çakal, 2004).

2.1.1.2. Dermis

Derinin epidermisin altında bulunan ikinci ana katmanı, deriye elastikiyet ve sağlamlık sağlayan dermis tabakasıdır. Yoğun fibroelastik bağ dokusundan oluşan derinin esas kütesini oluşturan dermis, derinin en kalın tabakasıdır. Dermisin kendisini iskelet bileşenlerine bağlayan hipodermisle net bir sınırı olmadığı için tam kalınlığı belirtilmez ve kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde farklı kalınlık göstermektedir. En kalın olduğu bölge sırttır ve buradaki kalınlık üzerindeki epidermis kalınlığının 30-40 katına çıkabilmektedir. Dermis tabakası el ve ayak tabanında en yüksek, göz kapağında ise en düşük kalınlıktadır (Hendriks, 2001; Çakal, 2004).

Yapısında bağ dokunun en yaygın hücre tipi olan fibroblastlar, immünolojik aktivite gösteren mast hücreleri ve histiyositler gibi birçok hücre tipi bulunmaktadır. Duyu ve motor sinirleri, kan ve lenf damarları, yağ ve ter bezleri, kıl folikülleri dermisin farklı derinliklerinde yer almaktadır. Ayrıca dermis, kollajen lifleri, fibroblastlarca üretilen jelatinöz madde ve elastin lifleri içeren ekstraselüler matriksten oluşur.

Dermis dıştan içe doğru sırasıyla, papiller ve retiküler dermis olmak üzere iki alt katmandan oluşmaktadır. Dermisin yaklaşık olarak %10'unu oluşturan papiller dermis, gevşek bağ dokudan oluşmuştur ve fibroblast ve makrofaj hücrelerince zengindir. Yapısında deriye dik durumda elastik lifler ve epidermis ile bağlantıyı sağlayan kollajen fibriller bulunmaktadır. Kapiller damarlar, duyu sinir lifleri bu katmanda bulunur. Papiller dermis, dermal papilla denilen yapılar ile epidermise uzanmakta ve yapısında bulunan kapiller damarlar aracılığıyla epidermisin beslenmesine yardımcı olmaktadır. Epidermis, bu tabakada bulunan bağ doku kapillerlerinden difüzyon ile beslenmektedir. Dermisin büyük bir kısmını oluşturan retiküler dermis, düzensiz bağ dokudan oluşmaktadır. Yapısında bulunan kollajen demetleri ve elastik lifler, papiller dermise oranla daha kalındır ve genel olarak deri yüzeyine paralel konumdadır. Bu tabaka, kan damarları ve sinir uçları bakımından zengin olup kıl folikülleri, yağ ve ter bezlerini de içermektedir (Hendriks, 2001; Mutlu, 2014).



Şekil 2.3. Dermisin yapısı ve tabakaları (Kawasumi ve ark., 2012)

2.1.1.3. Hipodermis

Hipodermis, derinin subkutan veya subkutis olarak da adlandırılan adipoz (yağ) doku ve gevşek bağ dokusundan oluşan en iç tabakasıdır. Dermisin deri altında bulunan iskelet

bileşenlerine bağlanmasını sağlayan dermisin devamı niteliğindeki dokudur. Deri altı yağ tabakasının kalınlığı karın ve kalça bölgelerinde en fazladır (Costin ve Hearing, 2007; Çakal, 2004). Yapısında sinirler, kan ve lenf damarları bulunmaktadır. Bu tabaka çarpma ve vurmalara karşı deriye mekanik destek sağlamanın yanında termal bariyer de oluşturur.

2.1.2. Derinin Fonksiyonları

Deri birçok yaşamsal görevi yerine getiren en büyük organdır. Mekanik darbelere karşı diğer organların hasar görmesini engelleyici etkisi bulunmaktadır. Bariyer görevinin yanında yağda çözünen bileşikler için de depo görevi görür. Özellikle dermis tabakasında bulunan kan damarlarının vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon mekanizmaları ile ısı düzenlenmesini sağlar ve ısı kaybını önler. Deri belirli bir geçirgenliğe sahiptir ve vücuda zararlı olabilecek yabancı maddelerin geçişine engel olmaktadır. Bu geçirgenlik ile çevreden gelen uyarılara bağlı olarak çeşitli maddeler salgılanır. Ayrıca deri bu yolla vücudun sıvı ve termal dengesinin sağlanmasına katkı sağlar. Deri hem mikroorganizma geçişine izin vermemekte hem de sahip olduğu pH değerinden (pH:5,6) dolayı mikroorganizmaların yaşaması için uygun bir ortam oluşturmamaktadır. Deri sıcaklık, basınç gibi çevreden gelen uyarıları içerisindeki duyu sinirleri ve reseptörler aracılığıyla algılayarak beyne iletir (Ölçer ve Gönül, 2002; Çakal, 2004). Tüm bu görevlerinin yanı sıra deride bulunan melanositler melanin pigmentinin üretilmesini sağlar. Melanin pigmentler ultraviyole radyasyona karşı koruyucudur (Costin ve Hearing, 2007; Çakal, 2004). Deri çeşitli ilaçların ve/veya kimyasalların deri yüzeyinden absorpsiyonunu ve kan dolaşımına katılmasını sağlar (Mutlu, 2014).

2.2. Yara

Yara; fiziksel, kimyasal, mekanik ve/veya termal hasarlar ile deri yüzeyindeki hasarlanma veya açılma olarak tanımlanabilir. Diğer bir tanımla derinin normal anatomik yapısının ve cilt fonksiyonlarının bozulması, deri ve doku bütünlüğünün kaybolmasıdır. Yaralanmaya sebep olan etkenin oluşturduğu hasar türü ve derecesi değişiklik göstermektedir. Yara türü ve yaralanma derecesi, yaranın iyileşme sürecini de değiştirmektedir.

2.2.1. Yara Çeşitleri

Akut ve kronik olmak üzere temelde iki yara türü mevcuttur. Akut yaralar, mekanik hasarlar, kesi, yüksek ısı, elektrik çarpması, aşındırıcı kimyasal maddelere maruz kalma gibi travmalardan kaynaklanır. Herhangi bir komplikasyon gelişmediği durumda genellikle normal süreç içerisinde 8-12 haftalık bir sürede iyileşebilen yaralardır. Kronik yaralar ise diyabet, tümör ve fizyolojik kontaminasyonlar gibi belirli hastalıkların sonucunda oluşan; yatak ve bası yaraları, venöz/iskemik kökenli bacak ülserlerini de içeren yaralanmalardır. Bu gibi hastalıklar sonucuna gelişen kronik yaraların yanında birinci ve ikinci derece yanık yaraları da kronik yaralar olarak değerlendirilmektedir. Bu yaraların iyileşmesi 12 haftadan daha uzun süreler alabilir. Ayrıca bu yaraların tekrarlama ihtimali de vardır (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007).

Yaraların sınıflandırılması ayrıca yaralanmadan etkilenen cilt alanı ve katmanlarına göre de yapılmaktadır. Sadece epidermal yüzeyi etkileyen yaralanmalar ile yüzeysel; epidermisle birlikte derin dermisi (kan damarları, ter bezleri ve kıl foliküllerini içeren) de etkileyen yaralanmalar ile kısmi kalınlıklı; epidermis ve dermis ile birlikte subkutan yağ tabakası ve/veya daha derin dokuların etkilendiği yaralanmalar ile de tam kalınlıklı yaralar oluşur (Boateng ve ark., 2007).

2.2.2. Yanık Yaraları

Isı, ışık, elektrik, radyasyon, kimyasal maddelere maruz kalmak ile vücutta oluşan hasarlar yanık yaraları olarak adlandırılmaktadır. Yanıklar oluştuğu alandaki derinliğine göre birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece olmak üzere sınıflandırılırlar.

2.2.2.1. Birinci Derece Yanıklar

Derinin sadece üst katmanı olan epidermisen etkilendiği hafif ve yüzeysel yanıklar, birinci derece yanık olarak adlandırılır. Güneş yanıkları bu sınıfa dahil edilebilir. 5-10 gün içerisinde yaranın kendiliğinden iyileştiği ve yara izi bırakmadan kapanan yaralardır. Tedavi süreci pansuman gerektirmeksizin genellikle soğuk uygulama, ağrı azaltıcı ve nemlendirici kremlerin uygulanmasını içerir (Çetinkale, 2008; Granger ve ark., 2009; Tintinalli ve ark., 2010).

2.2.2.2. İkinci Derece Yanıklar

Derinin alt katmanlarına geçerek epidermisin tamamı ve dermisin belli bir kısmının zarar gördüğü yanıklar ikinci derece yanık olarak adlandırılmaktadır (Granger ve ark., 2009; Tintinalli ve ark., 2010). Bu yanıklarda ağrı, deride kızarıklık, kabarcık oluşumu, yara renginde değişme ve şişlik meydana gelir. İyileşme, dermisin hasar görmeyen bölgesindeki kıl folikülleri ve ter bezlerindeki bazal hücrelerin re-epitelizasyonu ile gerçekleşir. İkinci derece yanıklar dermisin zarar görme derecesine bağlı olarak yüzeysel (papiler) veya derin (retiküler) olabilir (Çetinkale, 2008).

Yüzeysel ikinci derece yanıklarda, epidermis ve dermisin yüzeysel kısmı hasar görür. Yara, kırmızı görünüme sahiptir ve yüzeyinde kabarcık (bül) oluşur. Yara dokusu yumuşak, nemli (eksuda) ve ağrılı olabilir. İyileşme, genellikle 10-15 gün içerisinde kendiliğinden ve yara izi dokusu bırakmadan gerçekleşir. Yara bakımı günlük değiştirilen pansumanlarla yapılabilir (Çetinkale, 2008).

Derin ikinci derece yanıklar ise, epidermis ve dermisin retiküler katmanına kadar hasarlanan yaralardır. Yara yüzeyi kırmızı ve beyaz renk arasında değişiklik gösterir. Bül oluşumu görülür, genellikle kendiliğinden patlar. Yara dokusu sert, nemli ve genellikle ağrılıdır. İyileşme, 14-35 gün içerisinde ve dermiste önemli kayıp olduğundan dolayı yara izi dokusu bırakarak gerçekleşir. Yara durumuna bağlı olarak cerrahi müdahale gerektirebilir (Çetinkale, 2008).

2.2.2.3. Üçüncü Derece Yanıklar

Yanığın tüm dermise geçtiği durum, üçüncü derece yanık olarak adlandırılır. Yanık bölgesi ağrısızdır; koyu kırmızı, beyaz ve gri renk değişimi görülür. Yara dokusu sert ve kurudur; deri bu bölgede esnekliğini yitirmiştir. Dermis tabakasının bütünü yitirildiğinden kıl folikülü ve ter bezlerindeki hücrelerden re-epitelizasyon sadece yara kenarındaki çevre dokulardan gerçekleşebilir. Yara alanı büyüklüğüne bağlı olarak epitelizasyon çok uzun zaman alarak kapanabilir ya da hiç kapanmayabilir. Cerrahi müdahale gerektiren yaralardır ve iyileşme sonrasında yara izi dokusu oluşur (Tintinalli ve ark., 2010; Öncül, 2008).

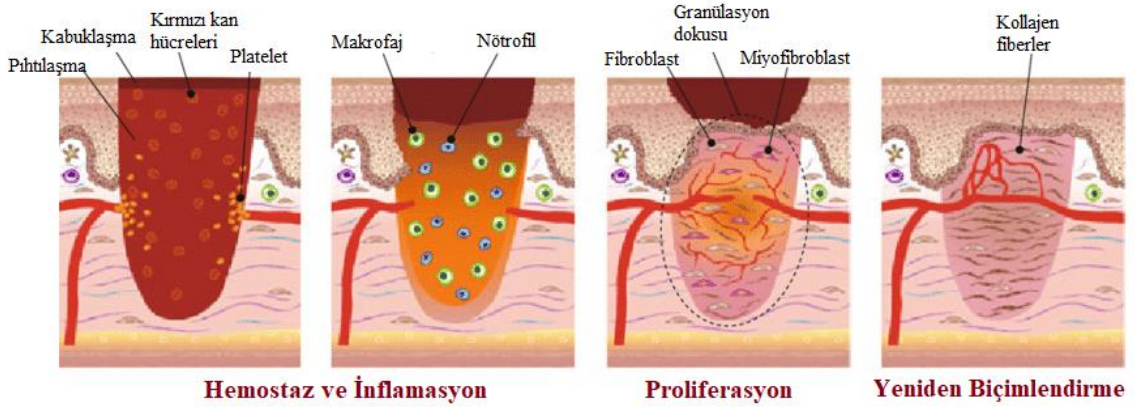
2.2.2.4. Dördüncü Derece Yanıklar

Dördüncü derece yanıklar tüm deri, derinin altındaki yağ, kas ve kemik dokularının da etkilendiği hayati risk taşıyan yaralanma türleridir. Yanık bölgesinde kahverengi veya siyah renk değişimi gerçekleşir. Yara dokusu oldukça sert, kurudur; ağrı olmamakla beraber dokuda his kaybı mevcuttur. Canlılığını yitiren dokular debride edilir ve doku rekonstrüksiyonu gerçekleştirilir (Tintinalli ve ark., 2010; Öncül, 2008).

2.2.3. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi ve doku yenilenmesini temel alan fizyolojik parametrelerle ilgili biyolojik bir süreçtir. Bu süreç, hasar gören doku bütünlüğünün yeniden oluşturulması için çeşitli hücreler ve matriks bileşenleriyle gerçekleşen birbiriyle bağlantılı ve devamlı aşamalardan geçmektedir. Yara iyileşmesi sürecindeki biyolojik ve fizyolojik aşamalar; hemostaz, inflamasyon, migrasyon (göç), proliferasyon ve olgunlaşma şeklinde birbirini takip eden ve kısmen iç içe geçmiş süreçler şeklinde ifade edilebilir (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007). Yara iyileşmesi sürecinde yara yüzeyi uygun bir yara örtüsü ile kapatılarak yaranın hem nemli tutulması hem de dokunun dış etkenlerden korunması gerekmektedir (Geronemus ve Robins, 1982). Yaralardan (kronik veya akut) veya fistüllerden iyileşme sürecinde üretilen, kırmızı kan hücreleri ve trombositlerin bulunmadığı sıvıya eksuda denilmektedir (Boateng ve ark., 2007). Eksuda, yara yatağında nemin dengede tutulması ve ideal çevresel koşulların sağlanması için en önemli bileşenlerden birisidir. Ayrıca, eksuda yara yüzeyinde mikroorganizma kontrolünü sağlayan lökositleri içeren bir yara ortamı sağlar (Boateng ve ark., 2007; Geronemus ve Robins, 1982). Eksuda aynı zamanda yaraya besin maddelerini temin eder, epitelyum hücrelerinin migrasyonu için uygun bir ortam oluşturur. Bazı durumlarda kronik yaralarda aşırı miktarda eksuda oluşur. Aşırı miktarda eksuda; enflamasyon, hücre hareketinin azalması, venöz ve lenfatik yetmezlik gibi nedenlerle oluşan ödemden kaynaklanmaktadır (Boateng ve ark., 2007).

2.2.4. Yara İyileşme Süreci



Şekil 2.4. Yara iyileşme fazları (Kawasumi ve ark., 2012)

2.2.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon

Hasar meydana geldikten hemen sonra genellikle kanama meydana gelir. Bunun amacı mikroorganizmaları ve vücuda yabancı maddeleri yaradan uzaklaştırmaktır. Kanamanın gerçekleşmesiyle pıhtılaşma mekanizması devreye girer böylece hemostaz başlatılmış olur. İlk aşamada kanamanın durdurulması için vazokonstriksiyon, sonra yara bölgesine hücre göçünün başlaması için vazodilatasyon mekanizmaları aktive olur (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007).

Yara bölgesinde gerçekleşen kan kaybı, trombosit agregasyonunu uyarır ve trombositlerden çeşitli uyarıların (epinefrin, norepinefrin, serotonin, trombosit aktivasyon faktörü vb.) salımı pıhtılaşma sürecini başlatır. Eksudada bulunan fibrinojenin fibrin haline geçmesi sonucu oluşan bir fibrin ağı ile pıhtı oluşumu gerçekleşir. Oluşan pıhtı ile hem kanama durdurulmuş olur hem de yara kenarları birbirine yaklaştırılır. Pıhtının kurumasıyla yaralı dokuya destek sağlayacak kabuk oluşumu gerçekleşir. Sonuç olarak, hemostaz yara iyileşmesini desteklemekle beraber yaranın iyileşme sürecinde korunmasını da sağlamış olur (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007; Altay ve Başal, 2010).

Hem hüresel hem de vasküler cevapların olduğu inflamasyon fazı hemostaz ile yaklaşık olarak aynı zamanda başlar ve 24 saatten uzun sürer. Yara yüzeyine salınan eksuda proteince zengindir ve içeriğindeki histamin ve serotonin vazodilatasyona neden olur. Bu durum nötrofil ve makrofajların yaraya göç etmesini ve nekrotik hücreleri sindirmesini sağlar. Sonrasında, fibroblastlar yara yatağına göç eder ve kollajen sentezi

gerçekleştirirler. Kollajenlerle aktif hale gelen trombositlerin agregasyonu gerçekleşir (Boateng ve ark., 2007). Ayrıca, inflamasyon evresi ile mikroorganizmalar, yabancı cisimler ve enfekte edici maddeler yara bölgesinden uzaklaştırılmış olur.

2.2.4.2. Migrasyon (Göç)

Migrasyon fazında, yaralanma ile kaybedilen dokuların yerini yeni, canlı epitel ve fibroblast hücrelerinin alması için göç olayı gerçekleşir. Bu hücreler pıhtı altında büyümekte ve epitelyal kalınlaşma gerçekleşmektedir. Fibroblastlar göç ettikten sonra yara yatağında kollajen sentezi gerçekleştirirler (Boateng ve ark., 2007).

2.2.4.3. Proliferasyon

Proliferasyon, migrasyon ile eş zamanlı olarak ya da hemen sonra gerçekleşir. Bazal hücre çoğalması ile yaranın epitel ile kaplanması sonucu oluşur. Fibroblastların proliferasyonu ve anjiyogenezi içeren iki aşamada gerçekleşir. Bu aşamada temelde fibroblastlar ve endotel hücreleri ile lökositler, mast hücreleri, plazma hücreleri gibi hücreler görev almaktadır. Yara içine fibroblastların hareket etmesi, kılcal damarların ve lenfatik damarların büyümesi ile granülasyon dokusu oluşur. Beş günlük süreçte kan damarları ve granülasyon dokusunun oluşumu büyük oranda gerçekleşir. Fibroblastlarca üretilen kollajen ve glikozaminoglikanlar ile doku güçlenir ve kollajen yarayı kapatana kadar epitel kalınlaşması devam eder. Ayrıca endotel hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar. Kollajen sentezi, kan damarları ve doku ödemi azalana kadar devam eder ve bu süreç yaklaşık 2 hafta sürer (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007).

2.2.4.4. Olgunlaşma (Yeniden Biçimlendirme)

Olgunlaşma fazı, yara iyileşme sürecinin son aşaması olup hücresel bağ dokusunun oluşumunu ve epitelin güçlendirilmesi ile dokunun yeniden biçimlendirilmesini içerir. Bu aşama, yaralanmadan sonraki ikinci ile üçüncü hafta arasında başlayıp birkaç aydan yaklaşık 1 yıla kadar devam eder. Yara iyileşmesinin ilk aşamalarında üretilen ve rastgele dizili halde olan kollajen lifler arasında kovalent bağlar artar. Bu aşamada hem kollajen yıkımı hem de yapımı devam ettiğinden total kollajen miktarında ciddi bir değişiklik meydana gelmez. Bu onarım evresinde kollajen üretimi devam ederken ekstraselüler matriks moleküllerinin üretimi ve doku sıvısı miktarı normal düzeye iner,

yara alanında hücre yoğunluğu ve damarlanma azalır. Kollajen lifler yaranın mekanik dayanımını artıracak şekilde organize olurlar ve yarada stabilizasyon sağlanır. Doku tamirinin son aşaması olan yara izi dokusu yaralanmanın derecesine bağlı olarak bu aşamada oluşur (Zahedi ve ark., 2009; Mutlu, 2014; Doğan, 2012).

2.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Malzemeler

Yara tedavisinde ilk aşama yara bakımı ve temizliği olup sonrasında yaranın türü, büyüklüğü, özellikleri ve iyileşme sürecinde gereksinimleri doğrultusunda tedavi yöntemi ve ürününün seçimidir. Yarayı temiz tutan, optimum koşulları sağlayarak yara iyileşme sürecine katkı sağlayan ve implante edilmeyen yöntem ve/veya ürün seçilir.

Yanık tedavisinde kullanılacak olan materyallerin sahip olması gereken bazı özellikler şu şekildedir: Yaranın nemli kalmasını sağlarken aynı zamanda yaranın kurumasına izin vermeden fazla eksudayı tutmalı, yara yüzeyinin doğal fizyolojik koşullarını sağlamalı, oksijen geçirgenliği olmalı ancak mikroorganizma ve yabancı madde geçişine izin vermeyecek şekilde yarayı dış etkilerden korumalı, pansuman için değiştirilirken yaraya yapışma problemi olmamalı, yara iyileştirmesini desteklemeli ve hızlandırmalı, toksik olmamalı, antimikrobiyal etkinliğe sahip olmalı, elde edilmesi ve uygulanması kolay ayrıca ekonomik olmalı (Çetinkale, 2008; Kurtuğlu ve Karataş, 2009).

Tüm bu özellikleri sağlayan, her yara türü için ideal bir tedavi yöntemi ve ürünü olmayıp üretilen yara materyalleri ile ideale yaklaşılmaya çalışılmaktadır. Modern yanık tedavisinde yara yüzeyini örtmesi için ince film tabakaların kullanımı söz konusudur. Birçok farklı nitelikte film örtüler mevcut olmakla birlikte bu örtüler genellikle doğal, sentetik ve/veya bunların karışımları ile ilaç veya biyoaktif moleküller yüklenmiş polimerleri içermektedir. Kollajen, jelatin, selüloz, ipek, kitosan ve hyaluronik asit gibi doğal polimerler; poli(kaprolakton), poli(laktat), poli(etilen glikol), poli(vinil alkol), çeşitli kopolimerleri gibi sentetik polimerler yanık yara film örtülerin üretiminde kullanılmaktadır (Zahedi ve ark., 2009; Kurtuğlu ve Karataş, 2009).

2.3.1. Yanık Yara Örtü Materyalleri

Yara örtüleri, yara bölgesinin dış etkenlerden korunmasını sağlarken yara iyileşmesi için uygun koşulları sağlayarak iyileşmeyi destekleyen medikal tekstil ürünleridir. Uzun

yıllar boyunca insanlar hayvansal yağlar, sebze lifleri, bal hamurları, keten gibi malzemeleri yara yüzeylerini örtmek ve tedavi etmek için kullanmışlardır. Bilinen ilk yara örtüsü uygulaması, Eski Mısır'da Ebers'in tıp papirüslerinde (M.Ö. 1550) bahsettiği, septik yara ve yanıkların tedavisinde hint yağı, ağrılı şişliklerin yok edilmesinde amonyak eriğinin kullanımınıdır. 1880 yılında Joseph Gamgee kendi adını taşıyan, emici pamuğun iki gazlı bez arasına yerleştirilmesiyle cerrahi uygulamalarda da kullanılan yeni bir örtü materyali geliştirmiştir. Lumiere tarafından 1903 yılında Tullegras olarak adlandırılan yumuşak parafin, balsam ve zeytinyağı içeren örtü materyali üretilmiştir. Bu ürün, yanık ve ülser kaynaklı derin deri yaralarının iyileştirilmesi için önerilmiştir (Mutlu, 2014; Karaçulha, 2010).

Günümüze kadar geçen süreçte teknolojiye bağlı olarak yara iyileşmesi için optimum koşulları sağlamaya yönelik birçok yara örtüsü geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Tüm bu ürünlerin iyileşme için önemli etkiler gösterdiği görülmüş ancak bu ürünler etkili bir yara iyileşmesi için çoğu zaman yetersiz kalmıştır. Bir yaranın hem kendi iyileşme süreci hem de hastanın koşulları değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle sadece bir çeşit örtü materyalinin tüm yaralar için tercih edilmesi doğru bir yol olmayacaktır. Bu gereksinim iyi bir yara yanık örtüsünün taşınması gereken belli başlı özellikleri içeren, yeni tasarım ve üretim teknikleri ile hazırlanan yanık yara örtü materyallerini önemli hale getirmiştir. İdeal bir yanık yara örtüsü için gerekli bazı özellikler aşağıda açıklamaları ile birlikte maddeler halinde belirtilmiştir (Zahedi ve ark., 2009; Mutlu, 2014; Altay ve Başal, 2010).

a. Biyouyumluluk

Alerjik, toksik ve karsinojenik etki göstermemeli; dokuya zarar verecek bir kimyasal reaksiyona girmemeli, inert olmalı.

b. Sıvı Kontrolü

Yara örtü materyali, epidermis tabakasının oluşumuna destek olmak için gereken nemli ortamı sağlayabilmelidir. Aynı zamanda mikroorganizma giriş riskini azaltmak ve eksudanın bandajdan sızmasını engellemek için belli bir miktarda eksudanın emsorbisyonuna izin vermelidir.

c. Mikroorganizma Kontrolü

Enfeksiyonlu yaralarda bakteriler uygun bir şekilde kontrol altına alınmalı ve yara dış ortamdan gelebilecek mikroorganizma enfeksiyonuna karşı korunmalıdır.

d. Koku Giderilmesi

Yara bölgesinde oluşan kokular kontrol altına alınabilmelidir.

e. Fiziksel Bariyer

Yara örtüsü, dış ortamdan gelebilecek mikroorganizma ve/veya yabancı maddelere karşı bir bariyer görevi üstlenmelidir. Ayrıca, sıvı birikimini engelleyecek kadar sıvı emme kapasitesine sahip olmalı, yara bölgesinin nefes almasını sağlayacak şekilde su buharı geçirgenliği sağlamalıdır.

f. Gaz Geçirgenliği

Yara örtü materyalinin, yara bölgesindeki hücrelerin nefes alabilmesi ve fazla doku sıvısının uzaklaştırılabilmesi için O₂, CO₂ ve H₂O gazlarını geçirgen özelliğe sahip olması gerekmektedir.

g. Düşük Yapışkanlık

Yara örtüsünün yara yüzeyine yapışması dokudan uzaklaştırılması sırasında iyileşen dokunun da zarar görmesine, yara bölgesinde yeni bir hasarın oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle düşük yapışkan nitelikte materyaller tercih edilmelidir.

h. Mekanik Dayanım

Uygulama ve kullanım esnasında yapısal bozulmaya uğramamalı, belli bir mekanik dayanıma sahip olmalı.

i. Elastikiyet

Yara yüzeyini örtebilecek esnekliğe sahip olmalı ve uzun süre kullanılabilir/saklanabilir şekilde elastikiyetini korumalıdır.

j. Isı Yalıtımı

Isı kaybını engellemelidir.

k. Kanama Etkisi

Yara örtü materyalinin cerrahi müdahale gerektiren ileri derecedeki yaralanmalarda pıhtılaşmayı kolaylaştırarak kan kaybının en hızlı şekilde durdurulmasına imkan vermesi gerekmektedir.

l. Yara İzinin Giderilmesi

Dermisin de hasarlandığı ileri derecedeki yanık yaralarında genellikle yara izi oluşumu görülmektedir. Yara örtüleri, bu doku oluşumunu azaltacak/engelleyecek şekilde tasarlanmalıdır.

m. Ölü Dokuların Temizlenmesi (Debridman)

Yara örtüsü, uygun koşulları (nem, sıcaklık, pH vb.) sağlayarak yarada bulunan hasarlı ve ölü dokuların, tüm safsızlıkların dokudan uzaklaştırılmasına yardımcı olmalıdır.

n. Uygulama Kolaylığı

Yara bölgesine hızlı ve kolay uygulanabilmelidir.

o. Stabilite

Hastanın rutin faaliyetleri esnasında stabil kalmalıdır.

p. Pansuman ve Zaman

En az sayıda pansuman ve örtü değişimi gerektirecek nitelikte olmalı.

r. Maliyet ve Ulaşılabilirlik

Düşük maliyetle üretilmeli, ekonomik olmalıdır. Temini kolay olmalıdır.

2.3.2. Yanık Yara Örtü Materyallerinin Sınıflandırılması

2.3.2.1. Geleneksel Yanık Yara Örtü Materyalleri

Geleneksel yara örtüleri öncelikli olarak yarayı dış etkilerden koruyarak, eksudanın absorbe edilmesi ile yarayı kuru ve sıcak tutmak ile görevli olan materyallerdir. Geleneksel yara örtüleri teknolojinin sağladığı imkanlarla zamanla oldukça

geliştirilmiştir. Yara örtüleri tasarımları, içerikleri, üretim yöntemleri ve uygulandıkları yara türüne göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Geleneksel yara örtüleri pamuk lifi, doğal ve sentetik bandajlar ve gazlı bezleri içermektedir. Bu gruptaki malzemeler birbirleri ile farklı birleşim ve kullanımlara sahip kompozit örtüleri oluştururlar. Farklı yara türlerinde çeşitli işlevleri yerine getiren yara örtüleri mevcuttur. Bu grupta bulunan örtü materyalleri sadece yarayı kapatarak koruduğu ve iyileşme sürecinde aktif etkili olmadığı için pasif örtüler olarak da adlandırılmaktadırlar.

Doğal bandaj olarak da nitelendirilebilen emici pamuklu orta tabakadan oluşan gazlı bez eksudayı absorblamak için kullanılır. Yaranın kontamine olmasını engellemek için bu gazlı bez üzerine selüloz liflerden oluşan örtü uygulanır. İç kısmı eksudayı emici özellikte selüloz veya pamuk lifinden, dış yüzeyi ise poliamidden oluşan sentetik bandajların kullanımı yaraya düşük yapışma riski taşır. Gazlı bezler, dokumalı ve dokumasız pamuk lifi, suni polyester veya ikisinin birlikte kullanımı ile oluşturulmaktadır. Gazlı bezler, yarayı bakteri girişinden koruyabilir ancak yüzey eksuda veya dışarıdan gelebilecek bir akışkan ile ıslandığında bu özelliğini yitirebilir. Ayrıca, bu pansuman malzemeleri yaraya yapışma eğilimi gösterir ve kaldırılırken yaraya zarar verebilir. Bu durumun önüne geçmek için parafin veya petrol jeli ile doyurulan gazlı bez kullanımı mevcuttur (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007; Mutlu, 2014).

Açık cerrahi müdahale gerektiren yaralarda eksuda ve diğer akışkanların absorbe edilmesinde steril gazlı bezlerin kullanımı söz konusudur. Gazlı bez sargılarının yara dokusunu korumak için sık sık değiştirilmesi gerekmekte ve bu malzemeler maliyetinin düşük oluşu ile avantaj sağlamaktadır. Bu örtü materyallerinin dezavantajı epidermis tabakasını oluşturan hücrelerin migrasyonuna imkan sağlayan nemli yüzeyin oluşmasına eksudayı absorblayarak engel olmalarıdır. Ayrıca, gazlı bez gibi lifli yapılar bozulduğunda yara mikroorganizma kontaminasyonuna açık hale gelebilmektedir. Bakteri enfeksiyonundan koruma etkinliğine (antimikrobiyal aktivite) sahip değildir. Bu gibi olumsuzluklar modern yara örtülerinin tasarımı ile en aza indirilmiş, yeni nesil örtü materyallerinin üretim ve kullanımları ön plana çıkmıştır (Boateng ve ark., 2007; Mutlu, 2014).

2.3.2.2. Modern Yanık Yara Örtü Materyalleri

Modern yara örtüleri, geleneksel yara örtülerinin yetersiz kaldığı özellikleri desteklemek, yara iyileşmesi için en uygun koşulları sağlamak için geliştirilmiştir. Yara iyileşmesinde nem kontrolü oldukça önemlidir. Modern yara örtüleri, hem iyileşme için gerekli olan nemi koruma hem de aşırı eksudanın giderilmesiyle yara bölgesinin nem dengesini sağlamak üzere tasarlanmaktadır. Bu örtü materyallerinin sınıflandırılması genel olarak malzeme içerikleri, fiziksel şekilleri, biyoaktif oluşları ve içerdikleri etken maddelere göre yapılmaktadır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

a. Üretildikleri Malzemelere Göre Yara Örtü Materyalleri

Hidrokolloid Örtüler

Hidrokolloid örtüler, en çok kullanılan örtülerdir. Yapısal olarak elastik ve adesif materyaller ile kolloid denilen jel formundaki polimer (jelatin, karboksimetilselüloz (CMC), pektin vb.) taneciklerden oluşmaktadır. Genellikle ağırlı, hafif yanık yaralarında ve travmatik sakatlanmalar ile oluşan yaralanmalarda kullanılan malzemelerdir. Yara ile temas halinde hidroaktif yapılar eksudayı çeker ve jel halini alır. Bu yapı dokunun nemlenmesini de sağlayarak epitelizasyon hızını ve kollajen üretimini artırır. Diğer örtü materyallerinden farklı olarak hem kuru hem de nemli yüzeylere bağlanabilme özelliğine sahip olmasından dolayı klinikte sıklıkla tercih edilmektedirler. Yaradan çıkarılırken ağrıya sebep olmazlar (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

Aljinat Örtüler

Aljinat örtüler, aljinik asidin sodyum ve kalsiyum tuzlarından (80:20) yapılır (Zahedi ve ark., 2009). Dondurularak kurutulmuş gözenekli tabaka halinde veya esnek lifli yapıda örtüler oluşturulabilir. Bu örtüler sahip olduğu iyon değişim özelliği ile yaraya uygulandığında yapısında bulunan iyonlar eksudada bulunan iyonlarla yer değiştirir ve yara yüzeyinde bir jel tabakası oluşturur. Oluşan bu jel yapı, yüksek absorpsiyon yeteneği ile yoğun eksudalı dokularda akıntıyı önlerken yaranın iyileşebilmesi için uygun nem ve sıcaklık ortamı da sağlar. Yapışkan yapıda olmayıp kullanımı kolaydır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Mutlu, 2014).

Hidrojel Örtüler

Hidrojeller, polivinilpirolidon (PVP) ve polimetakrilat (PMA) polimerlerinden oluşan ve çözünür olmayan hidrofilik çapraz bağlı yapılardır. Şekilsiz jel, katı ince tabaka, film vb. şekillerde hazırlanabilirler. Jel formu birincil örtü olarak kullanılıp ikincil bir örtüye ihtiyaç duyulmakta ve sık sık değiştirilmesi gerekmektedir. Tabaka ve film formundaki hidrojel örtülerde ise ikincil bir örtü gereksinimi bulunmamaktadır. Hidrojel örtüler, yüksek absorpsiyon kapasitesine sahiptir ve nemli yapısı ile yara iyileşmesini destekler. Yara yüzeyine yapışmazlar ve ağrı dindirici özelliği ile ağrılı yaralarda kullanım avantajı sağlarlar (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

b. Fiziksel Şekillerine Göre Yara Örtü Materyalleri

Köpük Örtüler

Esnek, gözenekli yapıda ve yüksek su tutma kapasitesine sahip olan köpükler poliüretan ve silikon bazlı olabilir. Poliüretan, hidrofilik veya hidrofobik monomerlerden üretilir. Bu şekilde farklı gözeneklilik ve sıvı tutma kapasitesine sahip malzemeler üretilmektedir. Köpük örtüler yara bölgesinde nemli ortam oluşmasını ve sıcaklığın korunmasını sağlarlar. Bu nedenle hem kuru hem de nemli yaralarda kullanımları uygundur. Eksudalı ve iltihaplı yaralarda absorban yapısı dolayısıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

Şeffaf Film Örtüler

Bu grup örtü materyalleri yarı geçirgen filmler olarak da adlandırılmaktadır. Adesif ve poliüretan membrandan oluşan iki yüzeye sahiptir. Oldukça esnek ve ince yapıda olup kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Şeffaf oluşu yara takibini kolaylaştırır. Mikroorganizma ve su geçişine izin vermezken, gaz geçirgenliğine sahiptir. Su tutma özelliğine sahip olmadığından yoğun eksudalı ve iltihaplı yaralarda kullanımı deride maserasyona neden olabilir. Bu nedenle sık sık değiştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca yarayı kapatmak için çevre dokuların sağlıklı olması gerekmektedir. Bu durum geniş yaralarda kullanımını kısıtlamaktadır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

c. Biyoaktif Yara Örtüleri

Biyoaktif yara örtüleri iyileşme sürecinde aktif rol alan biyomalzemelerden üretilen örtülerdir. Kollajen, hyaluronik asit, kitosan, elastin ve bunların birlikte kullanıldığı ürünlerdir. Bu malzemeler doğal ekstraselüler matriks bileşenleri içerirler ve biyoyumlu, biyobozunur olmaları ile iyileşme sürecinde önemli avantajlara sahiptirler. Yara bölgesine uygulanması için çeşitli etken maddeler de bazı durumlarda örtü materyaline dahil edilebilir. Bu gruba aynı zamanda domuz derisi ile heterograft, kadavradan elde edilen allograft, amniyotik membran gibi bir canlıdan alınan dokulardan köken alan ürünler de dahil edilmektedir. Bu gibi canlı organizmadan alınıp işlenen materyallerin viral kontaminasyon ve hastalık bulaştırma riski taşımalarına ek olarak saklama koşulları ve dayanıklılık konusunda da dezavantajları vardır (Karaçulha, 2010).

d. Polimerik İlaç Taşıyıcı Yara Örtü Materyalleri

Yapısında ilaç bulunduran, yara bölgesine kontrollü ve sürekli salım sağlayarak aktif ilacın etkinlik süresini artıran polimerik yara örtü materyalleridir (Boateng ve ark., 2007). Sentetik ya da doğal polimerlerden üretilen veya bu polimerlerin birlikte kullanıldıkları materyallere etken maddelerin yüklenmesiyle hazırlanırlar. Yara bölgesine kontrollü ilaç salımı yapılabildiği gibi çeşitli büyüme faktörleri ve genetik materyallerin de salımı gerçekleştirilebilir (Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

Sunulan tez kapsamında üretilen yara örtü materyalleri polimerik yapıda olup, yara ile temas edecek alt tabakasında *H. perforatum* yağı içeren PEG kapsüller bulunmaktadır. Membran yapısı PEG polimerinin kristal yapısı dolayısıyla esnek olmamaktadır. Bu nedenle membrana esneklik ve mekanik dayanım kazandırabilmesi için PCL polimeri de kullanılmıştır. PCL, biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu nedeniyle biyomedikal uygulamalarda dikkat çeken bir polimerdir ve geniş uygulama alanına sahiptir. Literatürde çeşitli etken maddeler ilave edilerek oluşturulan PCL içeren polimerik filmlerin biyobozunur örtü materyali olarak kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kil'deeva ve ark., 2006). Elektro-eğirilmiş PCL ve kompozitleri doku mühendisliği iskeleleri ve yara örtü materyallerini içeren birçok uygulamada kullanılmıştır (Augustine ve ark., 2015; Franco ve ark., 2011). PEG ve PCL'nin beraber

kullanıldığı çalışmalarda da olumlu sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Örneğin, PEG ile birlikte çeşitli hidrofobik polimerler (PCL, PLLA ve PLGA) kullanılarak lizozimin salım özellikleri incelenen bir çalışmada, PCL/PEG kullanımı ile üretilen elektro-eğirilmiş fibriler yapıdan lizozim salımının istenilen nitelikte olduğu belirtilmiştir. PEG'in çözünmesine bağlı olarak lizozim salımının gerçekleştirilmesi kontrollü ve uzatılmış bir salım profiline ulaşılmasını sağlamıştır (Kim ve ark., 2007). PEG katkısı ile *in vivo* hayvan modeli çalışmalarında iyileşme sürecine yardımcı olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlarla yapılan deneylerde kurkumin yüklü PCL fiberler uygulandığında 10 günde %59'luk bir kapanma görülürken kurkumin yüklü PCL/PEG lifler uygulandığında % 99'luk bir kapanma olduğu görülmüştür (Bui ve ark., 2014).

e. Deri Greftleri

Yara örtü materyalleri yara iyileşmesinde fayda sağlamaktadır ancak yaralanmalarla kaybedilen dokunun yeniden yapılanması sürecinde derinin yerini almakta yetersiz olmaktadır. Üzerinde hücre proliferasyonuna imkan sağlayan bu ürünler aselüler matriks veya hücre içeren matriksler olmak üzere iki tür matriksten oluşturulabilmektedir (Boateng ve ark., 2007). Farklı tasarımlara sahip ticari iki tabakadan oluşan doku mühendisliği ürünü deri greftleri bulunmaktadır. Örneğin, İntegraTM, ince silikon tabaka ile kaplı kollajen ve kondroitin-6-sülfat matriksten oluşan bir aselüler dermal matrikstir. BiobraneTM ise kollajenle kaplanmış naylon ağ yapısı ve silikon membranın birleştirilmesiyle elde edilmiş bir yapıdır. Hücre içeren deri greftlerine örnek olarak Dermagraft verilebilir. Bu ürün, biyobozunur poliglaktin (poliglikolik asit/polilaktik asit) ağ yapısı üzerinde geliştirilmiş insan fibroblast hücrelerini içermektedir (Zhong ve ark., 2010). En çok kullanılan doku greftleri; allogreft, amniyon zarları, ksenogreftlerdir (Kurtoğlu ve Karataş, 2009). Genellikle kronik yaralarda ve ileri derece yanık yaralarında kullanılır. Enfeksiyon ve hastalık taşıma riskleri ayrıca ekonomik olmamaları nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Boateng ve ark., 2007).

f. Etken Madde İçeren Yara Örtü Materyalleri

Yara örtülerinde kullanılan aktif bileşenler, farmasötik ajanlar ve/veya bunların yara bölgesine salımı gerçekleştirilir. Uzun yıllardır farmasötik dozaj şeklinde merhemler, kremler ve solüsyonlar kullanılmaktadır. Geliştirilen modern yara örtüleri ile mevcut uygulamaların istenmeyen etkileri giderilmektedir. Bu yara örtüleri genellikle antibiyotik, antimikrobiyal ajan, büyüme faktörleri, vitamin ve mineral destekli üretilmektedir. Bu etken maddeler yara iyileşmesini doğrudan veya dolaylı olarak desteklemektedir. Yara örtü materyallerinin kullanımı zaten yara iyileşmesinde birçok avantaj sağlarken, antimikrobiyal aktivite ile enfeksiyonu engellenmekte; büyüme faktörleri, vitamin ve mineral desteği ile doku yenilenmesini desteklemektedir (Boateng ve ark., 2007).

2.3.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Aktif Bileşenler

2.3.3.1. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücre bölünmesi, migrasyonu, farklılaşması; protein ve enzim üretiminde görev alırken aynı zamanda anjiyogenezi (damarlanma) uyararak yara iyileşmesinde önem arz etmektedir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insan büyüme hormonu (hGH), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β 1), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) vb. yara iyileşmesinde aktif rol aldığı bilinen bir grup büyüme faktörüdür. Bu büyüme faktörlerinin birçoğu rekombinant proteinlerdir. Büyüme faktörlerinin yara bölgesine salımı ve gösterdiği etkinlik açısından doğru yara örtü materyalinin seçimi oldukça önemlidir (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

2.3.3.2. Vitamin ve Mineral Destekleri

Yara iyileşmesinde A, C ve E vitaminleri; çinko ve bakır gibi mineraller oldukça önemli aktif bileşenlerdir. Yara örtüleri ile birlikte kullanılan vitamin ve mineral destekleri çok fazla bulunmamaktadır. Bu bileşenleri içeren ürünler genellikle merhemler, kremler ve solüsyonlardır. Vitaminler sistemik dolaşıma katılması ve tüm vücuda dağılması açısından oral yolla takviye olarak kullanılır (Zahedi ve ark., 2009; Boateng ve ark., 2007).

Vitamin A, epitel hücre farklılaşması ve kollajen sentezinde önemlidir. Kollajen sentezinde C vitamini de etkidir. Vitamin C aynı zamanda deri ve diğer bağ dokuların ekstraselüler matriksinin oluşumunda da etkili bir bileşendir. Aynı zamanda E vitamini ile birlikte iyileşme sürecini hızlandırmaktadır. Vitamin E, antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir; anjiyogenezi destekler. Ayrıca yara izi (skar) dokusu oluşumunu azaltıcı etkisi vardır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

2.3.3.3. Antimikrobiyaller

Antimikrobiyal etkinlik gösteren ajanlar ve antibiyotikler genellikle diyabetik ayak ülserleri, cerrahi müdahale yapılmış vücut direncinin düşmesine bağlı enfeksiyon riski barındıran yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Yara bölgesinin mikrobiyal kontaminasyondan korunmasında ve yara iyileşmesinin hızlandırılmasında antimikrobiyal ajanlar ve antibiyotiklerin kullanımı avantaj sağlamaktadır. Bazı antibiyotikler (gentamisin, ofloksasin vb.) yara örtülerine emdirilerek uygulanmaktadır. Antibiyotiklerin sistemik dolaşıma katılarak uygulanması yerine bu şekilde düşük dozlarda lokal olarak yara bölgesine uygulanması sistemik toksisite riskini azaltmaktadır. Antimikrobiyal ajan olarak povidon-iyot ve bazı iyonik gümüş bileşikler (gümüş nitrat, gümüş sülfadiazin vb.) yara örtü materyallerine dahil edilmiş ve kullanılmıştır (Boateng ve ark., 2007; Kurtoğlu ve Karataş, 2009). Aynı zamanda çeşitli bitkisel bileşenlerin (uçucu yağlar, flavonoidler, alkaloidler vb.) hem antimikrobiyal aktivite gösterdiği hem de iyileşme sürecinde koagülasyon, inflamasyon, kollajen yapımı, epitelizasyon gibi aşamaları desteklediği literatürde belirtilmiştir (Özkorkmaz ve Özyay, 2009).

2.3.4. Yanık Yara İyileşmesinde Bitkisel Yağların Kullanımı

Yara iyileşme süreci hasarlı dokuların onarılmasını içeren birbiriyle bağlantılı ve süreleri hasarın ciddiyetine bağlı olarak değişen süreçleri içermektedir.

Yara iyileşmesinde, bitkisel kaynaklara dayanan geleneksel tedaviler önemlidir. Geleneksel bitkisel tedavi yöntemleri ekonomik olmasının yanı sıra güvenlidir. Geliştirilen bitkisel kaynaklı ilaçlar birden fazla mekanizma ile hasarlı dokunun iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Çeşitli bitkilerin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici aktiviteleri ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bitkilerin

iyileştirici özellikleri ve tıbbi değerleri, insan vücudunda fizyolojik olarak etkinlik gösteren biyoaktif bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşenler, uçucu yağlar, flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler, saponinler, taninler ve fenolik bileşiklerdir (Süntar ve ark., 2011; Thakur ve ark., 2011).

2.3.4.1. *Hypericum perforatum* Yağının Yanık Yara İyileşmesindeki Etkinliği

Hypericum bitkisi yaklaşık 400 farklı türe sahip, değerli tıbbi özelliklerinden dolayı uzun yıllardır geleneksel tedavilerde kullanılan bir bitkidir. *Hypericum* türleri antiseptik, antiinflamatuvar ve sedatif etkilerinden dolayı sıkça kullanılmıştır (Saddique ve ark., 2010; Pirbalouti ve ark., 2013). En yaygın kullanılan ve araştırılan alt türü *Hypericum perforatum* olup St. John's wort (SJW) ve sarı kantaron olarak da adlandırılmaktadır. Ilıman bölgelerde yetişen, 0,3-1 m uzunluğunda ve çok yıllık otsu bitkilerdir. *H. perforatum*'un hiperisin, hiperforin, flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, esansiyel yağlar, aminoasitler vb. içeren biyoaktif bileşenleri için bitkinin temel kaynakları yaprakları, sapları ve özellikle çiçekleridir. Bu bileşenlerin antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antikanser, antidepresan ve yara iyileştirici olmak gibi biyoaktif etkileri bulunmaktadır (Pirbalouti ve ark., 2013; Patočka, 2013). Bu özellikleri ile yanık ve cilt yaraları, ülserler, egzama, hemoroid, sindirim sistemi ve psikolojik rahatsızlıklar gibi çok çeşitli tıbbi uygulamaya sahiptir (Saddique ve ark., 2010; Pirbalouti ve ark., 2013).

Cilt yaralanmalarında iyileşme süreci, organize olmuş yara bölgesi bileşenlerine, sistemik araçlara, yaralanma tipine bağlı olan hücresel ve moleküler olayları (inflamasyon, proliferasyon, epitelizasyon, yeniden şekillenme gibi) içerir. Yetersiz tedavi söz konusu olduğunda doku onarımı başarısız olur ve yara kronikleşebilir. Örneğin, enfeksiyon ile yara derecesi ilerleyebilir. Optimum yara iyileşmesi, doku hasarının en aza indirilmesi; dokunun beslenmesi ve oksijenlenmesi ile fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesi, anatomik sürekliliğinin sağlanmasını temel alır. Bitkilerin iyileştirici etkilerinin yapılan çalışmalar ile doğrulanması sonucu birçok bitkisel ilaçlar ve tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (Prisăcaru ve ark., 2013).

Antimikrobiyal olma, yara iyileşme sürecinde yara yatağında mikroorganizma enfeksiyonunun engellenmesi için tedavinin önemli bir bileşenidir. *H. perforatum* aktif bileşenlerinden hiperisin ve hiperforin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu ana

bileşenlerdir (Wölfle ve ark., 2013). Antimikrobiyal aktivite, bitki ana bileşenleri arasındaki etkileşime de bağlı olabilmektedir (Pirbalouti ve ark., 2013). Literatürde, *H. perforatum* yağının Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*) ve Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas tolaasii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*) bakteri türleri ve *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Farklı miktarlarda *H. perforatum* yağının uygulanmasıyla oluşan inhibisyon zonu değerleri belirtilmiştir (Rančić ve ark., 2011). *H. perforatum* ekstraktlarının yara iyileştirme aktivitesi, fibroblast hücrelerinin aktivasyonunu artırması ve kollajen üretimini uyarmasından kaynaklanmaktadır. Böylece hasarlı bölgenin kapatılarak iyileşmesinde önemli rol oynar (Saddiçe ve ark., 2010). Literatürde *H. perforatum* yağını da içeren bazı bitkisel yağlar ile merhem oluşturulmuş ve bu merhemlerin yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Süntar ve ark., 2011). *H. perforatum* ile hazırlanan merhem uygulandığı bir başka çalışmada alınan klinik ve histopatolojik sonuçlar, yaranın küçülme hızı ve epitelizasyon periyodu bu merhemin yara iyileştirici etkisini göstermiştir (Prisăcaru ve ark., 2013). *H. perforatum*'un yara izi (skar) dokusu oluşumu üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, sezaryen operasyonu sonrası kadınlarda hipertrofik skar oluşumunu azaltmak ve yara iyileşmesini kolaylaştırmak üzere *H. perforatum*'un güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, *H. perforatum*'un yara bölgesinde ağrı ve kaşıntı oluşumunu azaltıcı etki gösterdiği ifade edilmiştir (Samadi ve ark., 2010).

2.3.4.2. Yanık Yara İyileşmesinde Kullanılan Diğer Yağlar

Yara iyileşmesinin çeşitli aşamalarında aktivite gösteren *Hypericum* gibi birçok medikal bitki ve bu bitkilerle yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Literatürde *H. perforatum* (sarı kantaron) yağı ve zeytinyağı ile birlikte kullanılan adaçayı ve kekik esansiyel yağları ile bir merhem oluşturulduğu belirtilmiştir. Çalışmada merhem bileşenlerinin etkileşimlerini belirlemek için her materyalin yara iyileştirme potansiyeli incelenmiştir. Epitelizasyon ve yeniden modellendirme de her biri etkili olmakla birlikte bu iyileştirici etkinlik sıralaması sırasıyla kantaron yağı, adaçayı yağı, kekik yağı ve zeytinyağı şeklinde olduğu gösterilmiştir (Süntar ve ark., 2011).

Sıcak ve nemli iklim bitkisi olan *Aloe vera*'nın yanık yara tedavisinde topikal (krem, vazelin vb.) kullanımı kullanımı ile iyileşme sürecini kısalttığı, vaskülerizasyonu sağladığı ve epitelizasyonu hızlandırdığı belirtilmiştir. *Aloe vera*'nın iyileştirici etkisi antienflamatuar, antimikrobiyal aktivitesi ile birlikte yara bölgesini nemlendirici etki sağlamasına da bağlıdır (Özkorkmaz ve Özay, 2009).

Kekik (*Thymus vulgaris*) yağı, zeytinyağı (*Olive oil*) ve gümüş sülfadiazinin yanık yara iyileşmesi üzerindeki etkileri sıçanlar üzerinde yapılan 21 günlük süreçte incelenmiş ve karşılaştırma yapılmıştır. Histolojik bulgular sonucunda, tüm gruplarda yara kapanması, iyileşmesi gözlemlenirken en iyi sonuçların kekik yağı uygulaması ile alındığı belirtilmiştir (Dursun ve ark., 2003). Bir başka çalışmada kekik yağı, kitosan filmlerle birlikte kullanılmış ve bazı yara iyileştirici özellikleri incelenmiştir. Sonuçta oluşturulan filmlerin yara iyileştirme, antimikrobiyal, antioksidan etkinlikleri gösterilmiştir. (Altıok ve ark., 2010).

Yanık yaralarının tedavisinde kullanılan bir diğer bitki türü ise emzik otu (*Onosma*)'dur. Yapılan bir çalışmada normal ve diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine *Onosma hispidum* kökünden elde edilen ekstraktlarla hazırlanmış bir merhem etkisi incelenmiştir. Merhem diyabetik sıçanlar üzerinde iyileştirici etkisi incelenmiş ve yara kapanması sonrasında yara mukavemetinde anlamlı artış olduğu belirtilmiştir (Kumar ve Gupta, 2010).

Yara enfeksiyonunda etkili olduğu bilinen ve enfeksiyonlu hastalardan izole edilen *Staphylococcus* suşlarına (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*) adaçayı (*Salvia sclarea* L.) yağının etkisinin incelendiği bir çalışmada, *in vitro* test sonuçları adaçayı yağının aktif doğal bir antimikrobiyal ajan olduğunu göstermiştir (Sienkiewicz ve ark., 2015).

2.4. Nanofibröz Yara Örtü Materyalleri

Nanofiberler, nanomalzeme sınıfına dahil edilen çapı bir mikron ve altındaki fiberler olarak ifade edilebilir. Nanofiberler ile oluşturulan yapıların yüksek gözeneklilik ve küçük gözenek boyutuna, yüksek yüzey/hacim oranına, iyi mekanik performansa sahip ve hafif olmakla birlikte ekstraselüler matriks (ECM) yapısını taklit edebilmesi doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır (Mutlu, 2014).

Sağladığı avantajlar ile nanofiberler çok geniş kullanım alanlarına sahiptir. Nanofiberler ve kompozit malzemeler, biyomedikal malzeme ve doku mühendisliği ürünlerinde, filtrasyon membranlarının hazırlanması vb. alanlarda kullanılmaktadır (Dinç, 2013). Nanofiberlerin sahip oldukları yüksek yüzey alanı sayesinde kanama durdurucu etkisi, fibriler yapısı ile ECM'yi taklit edebilmesiyle hücre proliferasyonuna imkan sağlaması, yüksek gözeneklilik ve düşük gözenek çapları sayesinde yara bölgesine mikroorganizma ve yabancı madde girişini engellerken gaz geçirgenliğini sağlaması yara örtü materyalleri olarak kullanımını oldukça elverişli hale getirmiştir. Nanofibröz örtü yapısı oluşturulurken yapıya katılan malzemelerle kontrol edilebilir fiziksel özellikler ve istenilen özellikler (biyoyumluluk, biyobozunurluk vb.) kazandırılabilir (Kim ve Yoon, 2007). Biyobozunur nanofiber örtü yapısı, deri hücrelerine kendisini onarması için imkan sağladığından yara izi (skar) dokusu bırakmaksızın iyileşme sağlayabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca, tedaviyi destekleyici nitelikte çeşitli aktif bileşenler (antimikrobiyaller, vitamin ve mineral destekleri, büyüme faktörleri vb.), epitelizasyon ve damarlanmayı desteklemek için vazodilatörler ve hücreler nanofiber yapısına dahil edilebilmektedir (Zahedi ve ark., 2009).

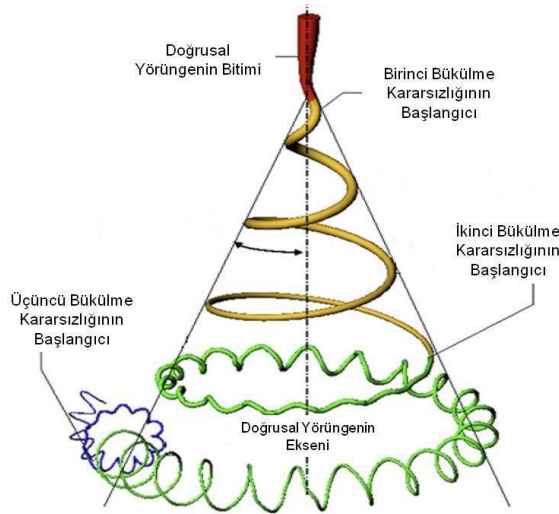
2.4.1. Nanofibröz Yara Örtü Materyallerinin Üretim Teknikleri

Nanofiberin üretiminde birçok seramik ve polimerik malzeme kullanılarak elektro-eğirme, kendiliğinden düzenleme, çekme, faz ayrımı, kalıp sentezi vb. yöntemler bulunmaktadır. Belirtilen yöntemler içerisinde elektro-eğirme yöntemi diğerlerine göre daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Çakmak, 2011).

2.4.1.1. Elektro-eğirme Tekniği

Elektro-eğirme, nanofiber üretimi için elektrostatik kuvvetlerden faydalanan ve akışkanlar dinamiği, polimer kimyası, temel fizik, elektrik, makina, tekstil mühendisliği gibi birçok disiplini birleştiren bir yöntemdir (Dinç, 2013). 1902'de Morton ve Cooley şimdi bilinen yöntemle elektro-eğirme yöntemini geliştirmiş ve patentlemişlerdir. Daha sonra 1934 yılında, Formhals elektro-eğirme süreci ve düzenineğin geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar yapmış ve ürettiği cihaz ile ilgili patent almıştır (Sarkar ve ark., 2010; Valizadeh ve Farkhani, 2014).

Elektro-eğirme yöntemi, doğal veya sentetik polimerlerin çapları nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişen kalınlıklarda nanofiberlerini üretme tekniğidir. Oluşan fibriler yapılar, çok küçük boyutlu gözeneklere ve yüksek yüzey alanına sahiptir. Bu yöntem ile nanofiberler, iletken bir iğne ucu ve kolektör yüzeyi arasındaki mesafe boyunca çözelti veya eriyik haldeki polimere yüksek voltaj (10-50 kV) uygulanmasıyla oluşturulur. Şırınga ucunda asılı durumdaki polimer damlası belli bir potansiyel fark değerine ulaştığında elektrostatik kuvvet ile yüzey gerilim kuvvetleri eşitlenir ve polimer damlası koni (Taylor konisi) şeklini alır (Dinç, 2013; Garg ve Bowlin, 2011). Yüksek voltaj ile elektrostatik kuvvetlerin yüzey gerilimini yendiği anda polimer çözeltisi karşı kutup olarak topraklanmış veya zıt kutup ile yüklenmiş bir metal yüzey (kolektör) üzerine doğru spin hareketi ile incelerek nanometre seviyelerinde lifler oluşturur. Bu hareket başlangıçta doğrusal olup toplayıcıya olan uzaklık arttıkça daha sonra sarmal hale gelir ve buna bükülme kararsızlığı denir. Oluşan jetin birkaç dönüşünün ardından bir bükülme daha oluşur ve geniş olan sarmaldan daha küçük bir sarmal oluşur (Garg ve Bowlin, 2011; Reneker ve Yarin, 2008). İğne ucu ve kolektör arasındaki mesafe boyunca çözücünün buharlaşmasıyla katılan polimer toplayıcıya nanofiber şeklinde ulaşır ve birikerek bir nanolif membran yüzey oluşmasını sağlar. Genellikle çözücü tamamen buharlaşmaz ve kolektör yüzeyinde fiberler biriktikçe birbirleri ile etkileştikleri noktada yapışırlar. Böylece film şeklinde örgüsüz fibröz yapı elde edilmiş olur (Zahedi ve ark., 2009; Uzunalan, 2011).

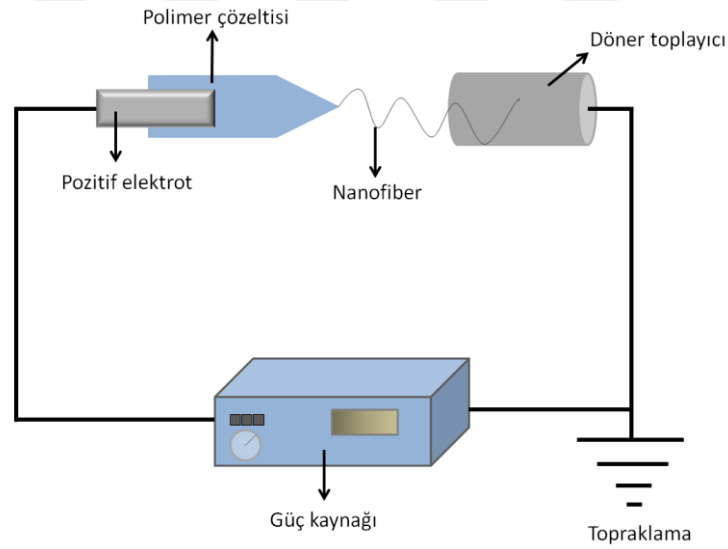


Şekil 2.5. Polimer jetinin hareketi (Mutlu, 2014)

Elektro-eğirme ile eş zamanlı iki veya üç farklı polimerin eğirilmesi mümkün olabilmektedir. Bu yöntem ‘co-spinning’ veya ‘co-axial spinning’ diye adlandırılır. Elektro-eğirme yönteminin sağladığı bir diğer avantaj ise, polimerik nanaofiberler içerisine/arasına biyoaktif ajanların da dahil edilebilmesidir. Bu yaklaşım ayrıca nanofiberler içerisinde biyomoleküllerin etkinliklerinin korunmasını da sağlamaktadır (Doğan, 2012).

Elektro-eğirme düzeneği temelde 3 ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Güç kaynağı,
2. Besleme ünitesi (şırınga, şırınga ucu, şırınga pompası vb.)
3. Toplayıcı yüzey (döner silindir, iletken plaka vb.)



Şekil 2.6. Elektro-eğirme düzeneğinin şematik görünümü

Elektro-eğirme sürecinde polimer nanofiberlerin morfolojilerini etkileyen parametreler çözelti, işlem ve çevresel faktörler olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Bu parametreler ve nanofiber yapısında meydana getirdiği değişiklikler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Bhardwaj ve Kundu, 2010; Mutlu, 2014).

Çizelge 2.1. Elektro-eğirme Parametreleri

Elektro-eğirme Parametreleri	
Parametreler	Fiber Morfolojisine Etkisi
<i>Çözelti Parametreleri</i>	
Konsantrasyon/Viskozite	Fiber çapı ile orantılıdır Azaldıkça boncuklu yapılar ve defektler oluşur
Polimerin Molekül Ağırlığı	Artıkça boncuk ve damlacık miktarı azalır
Çözücü Türü	Çözeltinin buharlaşma ve polimerin katılaşma hızını etkiler Boncuklu yapı oluşumunu etkiler Artıkça yüzeyde gözenekler oluşur ve yüzey alanı genişler
İletkenlik	Artıkça birbiriyle eş boncuksuz fiberler oluşur Genellikle artışıyla fiber çapı azalır
Yüzey Gerilimi	Yüksek oluşu jet akışında kararsızlığa neden olur
<i>İşlem Parametreleri</i>	
Voltaj	Artıkça genellikle fiber çapında azalma olur Çok yüksek gerilim boncuk oluşumuna neden olur
Çalışma Mesafesi	Artıkça fiber çapı azalır Mesafe çok büyük veya çok küçük olduğunda boncuk oluşumuna neden olur
Akış Hızı	Artıkça fiber çapı artar Çok yüksek oluşu boncuk oluşumuna neden olur
Şırınga İğnesi İç Çapı	Çözeltinin akış hızını etkiler
<i>Çevresel Parametreler</i>	
Sıcaklık	Artıkça çözücünün uçması kolaylaşır, çözelti viskozitesi azalır ve buna bağlı olarak fiber çapı azalır
Nem	Artıkça fiberler üzerinde su yoğunlaşabilir ve gözenekler oluşabilir. Nem ile beraber havanın elektriksel iletkenliği artacağı için eğirilen polimer liflerini toplayıcıya yönlendirmek zorlaşır.

Elektro-eğirme işleminde genellikle atmosferik basınç altında çalışılır. Daha düşük basınç değerlerinde iğne ucundan polimer çözeltisi akma eğiliminde olur ve bu durum kesikli jet akışına neden olur (Dinç, 2013).

2.4.1.2. Diğer Üretim Teknikleri

Nanofiber üretiminde elektro-eğirme yöntemi en çok tercih edileni olmakla beraber kendiliğinden düzenlenme, çekme, kalıp sentezi, eriyik fibrilasyon, ara yüz polimerizasyonu, faz ayrımı vb. farklı yöntemler de vardır.

a. Çekme

Birkaç mm çaplı bir mikropipetin düz silikon dioksit yüzeyde bulunan damlacıkla temas etmesi ile birlikte belirli bir hızda (100 mm/s) çekilmesi sonucu nanofiberlerin oluşturulması yöntemidir. Çekilen fiber mikropipet aracılığıyla başka yüzeye bırakılır. Damlacık, çok ince akıştan dolayı çözücüsünü kaybederek yoğunlaşır. Bu yöntemle uzun, tekli ve çapı 100 nm'den büyük nanofiberlerin oluşturulması sağlanır. Çekme sırasında gelişen çekme stresine ve deformasyonlara dayanıklı viskoelastik karakterde malzemelerin kullanımına uygun bir yöntemdir (Nayak ve ark., 2011; Huang ve ark., 2003).

b. Kendiliğinden Düzenlenme

Bu yöntem nanofiberlerin hidrojen bağı, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri gibi moleküller arası etkileşimlerle kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşur. Bu üretim yönteminde, kendiliğinden düzenlenecek moleküller kısıtlıdır ve genellikle küçük yapıtaşları, peptitler ve nükleik asitlerdir. Yöntemin dezavantajı üretim verimliliğinin düşük olması ve zaman almasıdır (Zhang ve ark., 2012).

c. Kalıp Sentezi

Nano ölçekli gözeneklere sahip membranların (polimer, metal, seramik vb.) kalıp olarak kullanıldığı bir yöntemdir (Nayak ve ark., 2011). Nanofiberleri oluşturacak polimer çözeltisi, basınç uygulanmasıyla membran gözeneklerinden geçer ve sonra katılaştırıcı bir çözeltiliyle polimer katılaştırılarak nanofiber elde edilir (Mutlu, 2014). Oluşturulan

fiberlerin çapı, kalıp membranlardaki gözeneklerin çapına bağlıdır ve devamlı nanofiberler oluşturmak için uygun bir yöntem değildir (Mutlu, 2014; Huang ve ark., 2003).

d. Faz Ayrımı

Genellikle iki ayrı fazın ayrışması esasına dayalı bir yöntemdir. Polimer uygun bir çözücüde çözünür ve jelleşme gerçekleşir. Bu aşamada ya çözücünün yapıdan uzaklaştırılması ya da farklı bir çözücünün (faz ayrımı sağlayan bir çözücü) yapıda dağıtılması sağlanır ve sonra dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilir. Çözücünün yapıdan uzaklaştırılmasıyla gözenekli nanofibriler yapılar oluşur (Mutlu, 2014). Sadece sınırlı sayıda polimerle çalışılabilmesi, yöntemin zaman alıcı olması (Huang ve ark., 2003) ve fiber çapı kontrolünün kolaylıkla sağlanamaması yöntemin zayıf yönleridir (Dahlin ve ark., 2011).

e. Eriyik Fibrilasyonu

Bu yöntem nanofiber eldesinde bir ya da birden çok polimerin eritilerek şekillendirilmesi (örneğin; ekstrüzyon ile şekillendirme) esasına dayanır. Eriyik püskürtme, eriyik film fibrilasyonu gibi yöntemleri içermektedir (Mutlu, 2014). Eriyik polimer püskürtülürken diğer taraftan üflenen soğuk hava ile polimer inceltirilerek nanofiber elde edilir (Dinç, 2013). Bu yöntemle fiberler arasında ve fiber boyunca fiber çapında değişiklikler görülmekte ve fiber dayanımı düşük olmaktadır (Güneşoğlu, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Sunulan tez kapsamında yanık yaralarında, yara iyileşmesini desteklemesi, beraberinde yara izi (skar doku) oluşumunu indirgemesi hedeflenen membranların yara ile temas etmesi planlanan ve yağ kapsüllerini içeren PEG-PCL nanofibröz alt tabakası ve PCL fiberlerden oluşan üst tabakası üretilmiştir. Membranların alt ve üst tabakalarının yüzey morfolojisi SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Fourier Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile kimyasal yapı analizi yapılarak üretim sürecinde polimerlerin çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olmadığı değerlendirilmiştir. Membranların yoğunluğu ve gözenekliliği hesaplanarak incelenmiş, mekanik dayanımı standart çekme testi, gaz geçirgenlik özellikleri standart hava geçirgenlik testi, yüzey hidrofilitesi temas açısı ölçümleri yapılarak karakterize edilmiştir. Membranların nem tutma kapasitelerinin belirlenebilmesi için şişme testi, zamana bağlı kütle kayıpları, *H. perforatum* yağının membranlardan kontrollü salımı, antibakteriyel etkileri, biyouyumlulukları ve apoptotik/nekrotik etkileri *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Son olarak yanık modeli oluşturulan sıçanlar (Wistar albino) üzerindeki yara bölgesine membranlar uygulanarak belirli aralıklarla yara iyileşmesi incelenmiş, uygulama sonrasında kurbanların iyileşme bölgelerinden alınan doku örneklerinin histolojik çalışmaları yapılarak membranların *in vivo* performansı değerlendirilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan %100 saflıktaki *H. perforatum* yağı soğuk pres yöntemiyle üretilmiş olup, Awe Cemre Laboratuvarlarından (Tokat, Türkiye) temin edilmiştir. PEG (Merck, Almanya) ve PCL (Sigma-Aldrich, UK) polimerleri firmalardan satın alınmıştır. Klorofom (Merck, Almanya) ve Metanol (Merck, Almanya) karışımı (5:1) çözücü olarak kullanılmıştır.

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarları'ndan temin edilen *Esheria coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bakteri suşları, Mueller Hinton Bouillon (MHB), Luria-Bertani broth (LB), Mueller Hinton Agar (MHA), Eosine Methylene Blue Agar (EMB) besiyerleri (Merck, Almanya) antimikrobiyal aktivite testleri için kullanılmıştır.

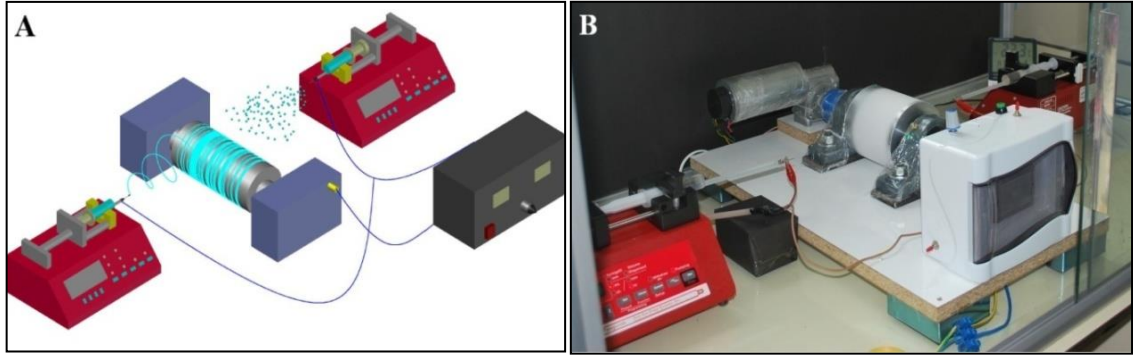
L929 fibroblast hücre hattı (Sigma-Aldrich) ve besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-low glucose (%10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 l-glutamine, %1 antibiyotik (penicillin/streptomycin)), Trypsin-EDTA, Hoechst 33342, Propidium Iodide (PI) ve ribonuclease A (RNase A) satın alınarak (Biological Industries Ltd. Kibbutz Beit Haemek, Israel) hücre kültür çalışmalarında kullanılmıştır. Biyouyumluluk çalışmalarında kullanılan WST-1 (2-(4-iodophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2-hetrazolyum tuzu Roche (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

In vivo hayvan deneyleri gerçekleştirilirken kullanılan anestezikler Ketamin ve Rompun (Bayer, İstanbul), ağrı kesici olarak kullanılan Parol (Atabay Kim. San. ve Tic. A.Ş., İstanbul) ve deney gruplarından birinin tedavisi için kullanılan gümüş içerikli yanık yara merhemi satın alınmış ve çalışmalarda kullanılmıştır. Sakrifiye edilen dokuların fiksasyonu ve sonrasında doku takibi için kullanılan formaldehit, ksilen ve entellan Merck (Almanya); parafin ise Sigma (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Mayer's Hematoksilen, Weigert Hematoksilen (Sigma-Aldrich, Almanya), Eosin, Aniline Blue, Orange G (Merck, Almanya) satın alınmış ve histokimyasal boyamalarda kullanılmıştır. Immunohistokimyasal boyamalar için Anti-collagen I ve anti-collagen III, biyotinlenmiş sekonder antikor, streptavidin (Abcam, İngiltere), blok solusyonu, endojen peroksit (SeyTek, Amerika), DAB (diaminobenzidine) (Invitrogen, Amerika) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

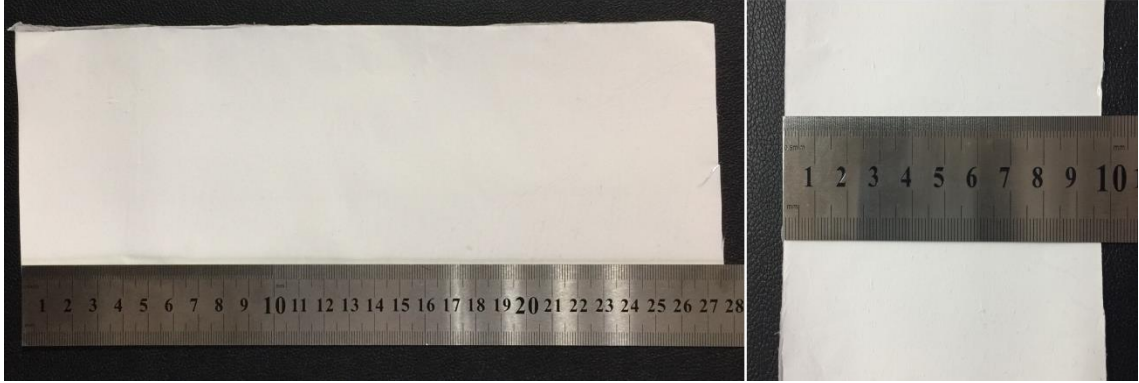
3.2.1. Yara Örtü Materyallerinin Üretimi

Polimerik membranlar Şekil 3.1'deki ikili eğirme (co-spinning) düzeneği kullanılarak hazırlanmıştır. *H. perforatum* yağı içeren PEG çözeltisi ile PCL çözeltisi karşılıklı elektro-eğirilerek toplayıcı döner silindir üzerine sarılı alüminyum folyo yüzeyinde biriktirilerek membranların alt tabakası oluşturulmuştur. PCL polimeri elektro-eğirilerek nanolifler halinde yüzeyde birikirken, yağ içeren PEG çözeltisinin elektro-eğirme koşulları farklılaştırılarak elektro-spreyleme gerçekleştirilmiştir. Böylece alt tabakada yağ içeren PEG kapsüllerin tutunduğu ince PEG fiberler üretilmiştir. İç içe geçmiş örgüsüz yapıdaki PEG ve PCL fiberlerden oluşan alt tabaka oluşturulduktan sonra PCL çözeltisi tek başına bir süre daha eğirilerek elastikiyet ve mekanik dayanımı sağlayan üst tabaka alt tabakaya entegre edilmiştir.



Şekil 3.1. Elektro-eğirme sistemi (A) Şematik gösterim; (B) Çalışmalarda kullanılan sistem

PCL çözeltisinin elektro-eğirme koşulları ilgili literatür ışığında (Augustine ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2017) yapılan denemelerle optimize edilmiştir. Polimerik membranların alt tabakasının üretimi için çözücü olarak kloroform/metanol karışımının (5:1) kullanıldığı çözelti konsantrasyonu %20 (w/v) ve şırınga ucu ile toplayıcı (döner silindir toplayıcı) arasındaki mesafe 13 cm olarak belirlenmiştir. PCL çözeltisi ve *H. perforatum* yağı içeren PEG çözeltisi güç kaynağından gelen akımla şırınga ucu ve toplayıcı arasında oluşturulan 14 kV potansiyel fark altında karşılıklı olarak elektro-eğirilmiştir. PCL ve *H. perforatum* yağı içeren PEG çözeltilerinin akış hızları sırasıyla 1,5 ve 3 ml/saat ve toplamda kullanılan çözelti hacimleri sırasıyla 8 ml ve 10 ml' dir. *H. perforatum* yağı içeren PEG çözeltisi şırıngada 2 ml kaldığında, PCL çözeltisinin akış hızı artırılarak (2 ml/saat) eğirme işlemine devam edilmiştir. PEG çözeltisi tamamen bittiğinde PCL çözeltisinin akış hızı kademeli olarak 3 ml/saat'e kadar çıkarılmış ve şırıngada çözelti kalmayana kadar eğirme işlemine devam edilmiştir. Böylece alt ve üst tabakaların birbirine entegrasyonu sağlanarak sıvı ile temas durumunda membran tabakalarının ıslanarak şişmesine bağlı olarak birbirinden ayrılması engellenmiştir. *H. perforatum* yağı içermeyen (membran 0) ve farklı oranlarda *H. perforatum* yağı içeren PEG çözeltisi (%20 w/v) kullanılarak 4 farklı membran hazırlanmıştır (membran 1: %7 (v/v); membran 2: %17 (v/v) ve membran 3: %34 (v/v)). Polimerik membranlar iki gün boyunca vakum desikatörde bekletilerek çözücünün uzaklaşması, membranların stabilize olması sağlanmıştır. Kurutulan membranlar etiketlenip, paketlenerek +4°C'ye kaldırılmıştır. Oluşturulan membranların boyutları ile birlikte görünümü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Döner silindir toplayıcı üzerine elektro-eğirilmiş PEG-PCL membranlar

3.2.2. Membran Karakterizasyonu ve *In vitro* Çalışmalar

3.2.2.1. Kimyasal Yapı Analizi

Membranların kimyasal yapısı ve polimerlerin çözücü ile etkileşimlerinde kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla elektro-eğirilmiş membranların ve *H. perforatum* yağının FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), (Perkin Elmer, Spectrum 100, Amerika) spektrumları incelenmiştir. Analiz FTIR-ATR ünitesi ile gerçekleştirilmiştir. Polimerik membranlar, 1-2 mm çaplı elmas disk üzerine kontrollü basınç uygulaması ile sabitlenerek, yüzeye gönderilen kızılötesi (Infrared/IR) ışının malzeme yapısında bulunan maddeler tarafından soğurulması ve kristalden yansıyan IR yoğunluğunun kaydedilmesi ile ölçümler alınmıştır (Baudry ve ark., 2012). Bu şekilde FTIR analizi için membran yapısına katılan polimerlerin ayrı ayrı eğirilmesiyle üretilen PEG ve PCL membranların, yağ içermeyen ve içeren PEG-PCL membranların (membran 0 ve 1) ve ayrıca *H. perforatum* yağının ayrı ayrı FTIR spektrumları alınmış ve karşılaştırmalı olarak spektrumlar değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).

3.2.2.2. Yüzey Morfolojisi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey özellikleri belirlenmek istenen numune yüzeyindeki elektronların cihaz aracılığıyla gönderilen elektron demetleri ile etkileşmesi sonucu yüzey topografisi hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Üretilen yara örtü materyali oluşturan alt ve üst tabakaların yüzey morfolojileri SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Daha önce vakum ortamda kurutulmuş ve 7,5 mm çaplı dairesel kesitler alınan membranlar SEM numune platformuna sabitlenmiştir.

Burada önemli olan hususlardan biri yüzeyin iletken olmasıdır. Ancak üretilen membran yüzeylerinin yalıtkan özellikte olması dolayısıyla membranlar ön kaplama işleminden geçirilmiştir. Kaplama işlemi 15 dakika boyunca vakum altında, yüksek sıcaklıkta, hızlı paladyum iyonlarının yüzeyi kaplamasını sağlayan bir cihaz (Polaron SC500 Sputter Coater, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Kaplama yapıldıktan sonra örnek yüzeylerinin SEM görüntüleri (Şekil 4.2) alınmıştır.

3.2.2.3. Yoğunluk ve Gözeneklilik

Gözenekli yapı ve yüksek yüzey alanı elektro-eğirme tekniğinin sağladığı önemli bir avantajdır. Nanofibriler membranların gözenekli yapısı gaz geçirgenliği, su tutma kapasitesi ve salım özellikleri gibi çeşitli fiziksel özelliklerin de kontrol edilmesini sağlamaktadır. Membran yapısına katılan maddenin niteliği ve miktarına bağlı olarak gözenekli yapısı değişmektedir. Çalışmada % gözeneklilik ölçümü için aşağıda verilen eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = [(V_m - V_o) / V_m] \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlik 3.1'de V_m , membranların spesifik hacimlerini; V_o ise PEG, PCL ve *H. perforatum* yağının kütlece birleşim oranlarına bağlı olarak hesaplanmış ortalama spesifik hacmi ifade etmektedir (Gupta ve ark., 2011). Spesifik hacmi hesaplamak için 10'ar tane 10 x 10 x 0,15 mm boyutlarda membran kesitleri elde edilmiş ve her bir kesitin ağırlıkları ölçülüp kaydedilmiştir. Ölçülen ağırlıklar (g) ve hesaplanan membran hacminin (cm^3) oranı membran yoğunluğu (ρ) ve buna bağlı olarak spesifik hacim (V_m) değerleri elde edilmiştir. Membran 1 ve 0 için 10'ar kesit alınarak ortalama yoğunluk ve spesifik hacim değerleri böylece eşitlik 3.1 kullanılarak membranların % gözeneklilik değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

3.2.2.4. Hidrofilisite/Hidrofobisite

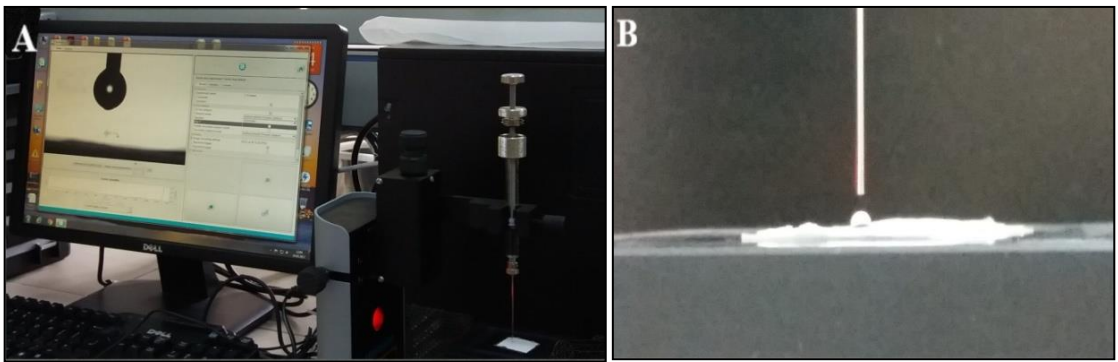
Yüzey özelliklerini belirlemede kullanılan yöntemlerden biri de yüzeyin su tutma (hidrofob), su emme (hidrofil) özelliklerinin belirlenmesidir. Membranların hidrofobik ya da hidrofilik olması hücre adhezyonu açısından oldukça önemlidir. Polimerik malzemelerin hidrofob ya da hidrofil olduğunun belirlenmesi temas açısı ölçümü ile mümkün olmaktadır. Temas açısının ölçümü su damlacığının damlatılan malzeme

yüzeyi ile yaptığı açının ölçülmesi esasına dayanır. Eğer bu açı $\theta < 90^\circ$ ise sıvının katı yüzeyi ıslattığı (hidrofilik) , $\theta > 90^\circ$ ise ıslatmadığı (hidrofobik) söylenebilir (Şekil 3.3). Malzemenin çok dar açılarda ($\theta < 10^\circ$) güçlü bir ıslatma (süper-hidrofilik), çok geniş açılarda ise ($\theta > 150^\circ$) ise güçlü bir ıslatmama özelliği (süper-hidrofobik) olduğu söylenebilir (Zhao ve Jiang, 2018).



Şekil 3.3. Hidrofobik ve hidrofilik yüzeyler

Temas açısı ölçümleri temas açısı ölçüm cihazı (Şekil 3.4; Attension, TerraLab, İsveç) ile standartlara (ASTM-D7334 2013) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Membran 0 ve Membran 1 için alt ve üst tabakaların yüzeylerine hava ortamında 4 µl deiyonize su damlatılmış ve damlanın membran yüzeyindeki görüntüsü bir kamera aracılığıyla alınıp bilgisayara aktarılmıştır. Görüntü üzerinden damlacığın membran ile yaptığı temas açısı ölçülmüştür. Her bir yüzey için üç farklı ölçüm alınarak ortalama temas açısı değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 3.4. (A) Temas açısı test cihazı; (B) Membran yüzeyindeki damlanın görüntüsü

3.2.2.5. Islanabilirlik (% Şişme Oranları)

Yara örtü materyali yeterli nem tutma kapasitesine sahip olmalıdır. Yara bölgesinin kontrollü nem dengesinin sağlanması yaranın çok nemli ya da çok kuru olmasını

engelleyerek iyileşme sürecini destekler. Bu nedenle yara örtü materyallerinin ıslanabilirlikleri önemlidir.

Polimerik membranların (0 ve 1) ıslanabilirliklerinin belirlenebilmesi için öncelikle 7,5 mm çaplı dairesel membran kesitleri alınarak fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde uygun koşullarda (pH 7,4 ve 37°C) bekletilmiş ve farklı zaman aralıklarında (3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 45, 60 dk) dairesel kesitler çözelti ortamından alınarak tartılmış ve değerler kaydedilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak % şişme oranı aşağıda belirtilen eşitlik ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

$$\% \text{ Şişme Oranı} = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.2)$$

W_0 ve W_t sırasıyla dairesel membran kesitlerinin deneyden önce ve her gözlem süresinden sonra tartılan ağırlığını ifade etmektedir (Sinha ve ark., 2013).

3.2.2.6. Hava Geçirgenliği

Yanık yara örtülerinde yara iyileşmesi için optimum koşulların sağlanabilmesi ve buna bağlı olarak iyileşmenin sağlıklı ilerleyebilmesi için örtü materyalinin belirli bir oranda hava geçişine müsaade etmesi gerekmektedir (Boateng ve ark., 2007; Kweon ve ark., 2000). Yaranın bölgesinin oksijenlenmesi açısından hava ile teması önemlidir.

Membran 1 ve 0 için hava geçirgenlik analizi standartlara (TS 391 EN ISO 9237, 1999) uygun olarak hava geçirgenlik test cihazı (SDL Atlas M021A Air Permeability Tester, Amerika) ile alınan ölçümlerle gerçekleştirilmiştir. Ölçüm alanı 20 cm² olup, her bir membranın rastgele ve farklı bölgelerine sabit basınç (100 Pa) altında ve belirli koşullarda (22±2 °C ve % 65±4 bağıl nem) membranın bir tarafından diğer tarafına hava geçiş hızı ölçümü yapılmış ve l/m²/s cinsinden sonuçlar alınmıştır (Çizelge 4.3).

3.2.2.7. Zamana Bağlı Kütle Kaybı

Membran 0 ve membran 1'in *in vitro* koşullarda zamana bağlı kütle kaybı ölçülmüştür. Bu amaçla, membranlardan 2 x 2 cm ölçülerinde kesitler alınarak ilk ağırlıklar tartılmış ve daha sonra kesitler PBS çözeltisi içerisinde (37°C ve pH 7.4) bekletilerek belirli aralıklarla (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 gün) çözelti içerisinde çıkarılarak kurutulmuş ve son ağırlıkları tartılmıştır. Ölçümler 4'er kesit üzerinden yapılarak 14 gün boyunca %

kalan kütle değerleri eşitlik 3.3'e göre hesaplanmış ve ortalama % kalan kütle miktarları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6)

$$\% \text{ Kalan Kütle} = (W_i / W_s) \times 100 \quad (3.3)$$

W_i ve W_s sırasıyla membran kesitlerinin ilk ve PBS içerisinde bekletildikten sonra ölçülen son ağırlığı ifade etmektedir (Sinha ve ark., 2013).

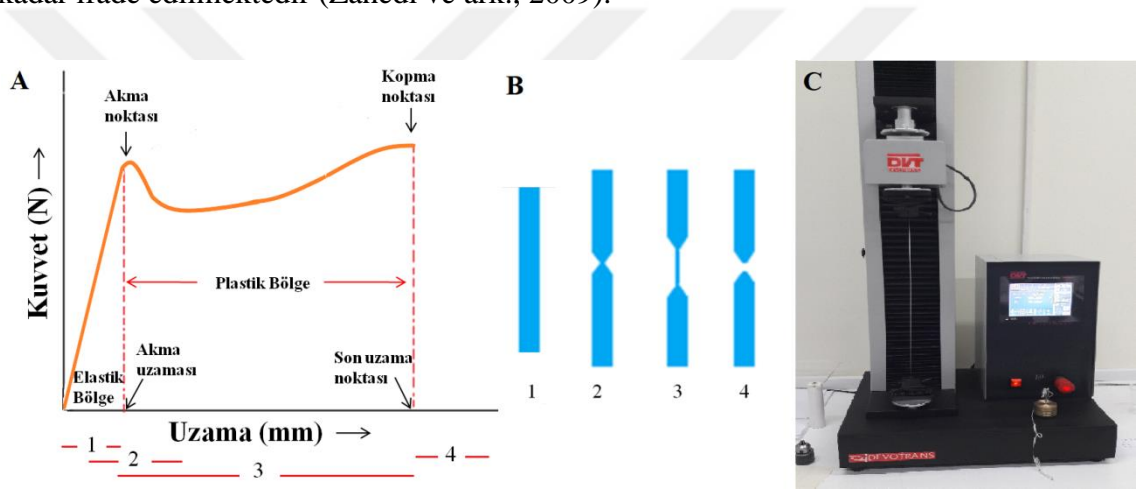
3.2.2.8. Kontrollü Salım Çalışmaları

Kontrollü salım çalışmaları polimerik membranlardan alınan 7,5 mm çaplı dairesel kesitlerden zamanla PBS çözeltisi içerisinde (37°C ve pH 7.4) salınan *H. perforatum* yağı miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. *H. perforatum* yağının maksimum absorbands gösterdiği nm değerinin belirlenmesi için bir dizi çalışma yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarında UV bölgede 270-330 nm (Zavoi ve ark., 2011) ve görünür bölgede 550-590 nm (Wölfle ve ark., 2013) dalga boylarında maksimum absorbands değerlerine ulaşıldığı belirtilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkılarak net bir dalga boyunun tespit edilebilmesi için 1 µl/ml *H. perforatum* yağı çözeltisinin UV bölgede 200-350 nm ve görünür bölgede 550-590 nm dalga boylarında ölçümler alınmıştır. Sonuçta en yüksek pik verdiği görülen 225 nm dalga boyunda spektrofotometre (BOECO S-30 Spectrophotometer, Almanya) ile ölçümler alınmıştır. Ayrıca membran yapısında bulunan diğer bileşenlerinde ortama salınıp absorbands değerini değiştirebileceği düşünülerek boş membranların da salım özellikleri incelenmiş ancak 225 nm'de yapılan ölçümlerde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Membran yapısında bulunan PCL sulu çözeltilerde çözünen bir polimer olmadığından ortama sadece PEG salımı gerçekleşmiştir. Bu polimerin sulu çözeltilerdeki çözünürlüğü de yüksek olduğundan çözelti ortamında partikül halinde kalmadığı ve dolayısıyla ölçümleri etkilemediği görülmüştür. Bu nedenle ölçümlerde alınan tüm değerlerin *H. perforatum* yağına ait olduğu düşünülmüştür. Salım çalışmaları hem 2 saatte bir örnek alınarak gerçekleştirilen 48 saatlik hem de 12 saatte bir örnek alınarak gerçekleştirilen 14 günlük üçer tekrarlı deneylerle yapılmıştır. Alınan absorbands değerlerine karşılık gelen yağ miktarları bilinen yağ konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbands değerleri yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisinin (Şekil 4.7) doğru denklemi

kullanılarak hesaplanmıştır. Böylece yağın membranlardan kontrollü salım grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.8).

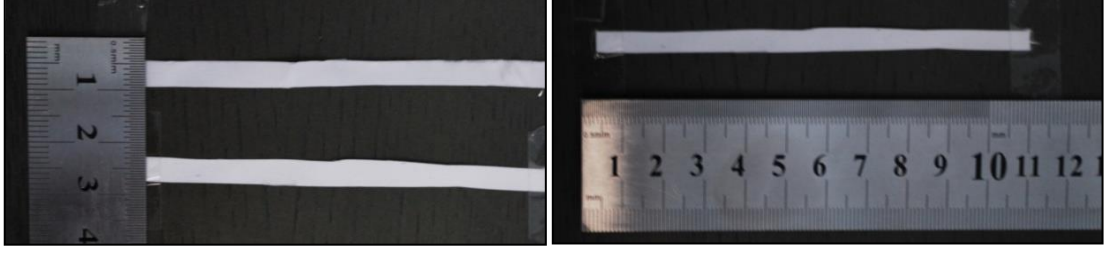
3.2.2.9. Mekanik Dayanıklılık

Vücudumuz üç boyutlu bir yapıya sahip olduğundan dolayı özellikle geniş yara yüzeylerinde yara örtülerinin yara bölgesini kolaylıkla sarabilmesi, kırılğan bir yapıya sahip olmaması gerekir. Bu nedenle yara örtülerinin belirli bir elastikiyete sahip olması önemlidir. Malzemelerin elastisitesi, çekmeye karşı birim uzamanın sonucu olarak ortaya çıkmakta ve malzemenin geri dönmeyecek şekilde deformasyona uğradığı ana kadar ifade edilmektedir (Zahedi ve ark., 2009).



Şekil 3.5. (A) Çekme-uzama grafiği; (B) çekme süresince malzemede sırasıyla (1-2-3-4) gerçekleşen değişiklikler; (C) çekme test cihazı

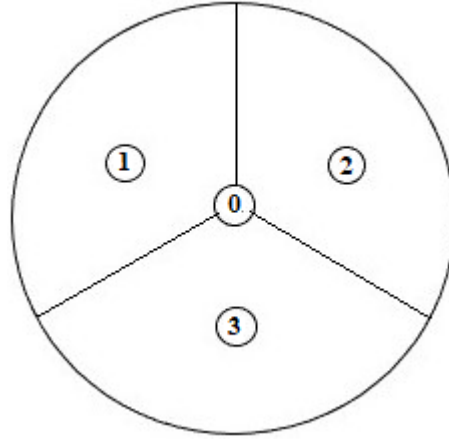
PEG-PCL membranların mekanik özellikleri, çekme yöntemi ile elde edilen gerinim-uzama (stres-strain) eğrileri incelenerek değerlendirilmiştir. Çekme-uzama testi çekme-test cihazı (Şekil 3.5, Dvt Bp D Nu, Türkiye) ile oda sıcaklığında, 1,5 ile 3,5 N arasında değişen kuvvetler uygulanarak gerçekleştirilmiş ve uygulanan çekme kuvvetine (stress) karşı % uzama miktarları (strain), kopma uzaması (elongation at break) ve kopma dayanıklılığı (ultimate tensile stress) ölçülerek membranların esneklik sınırı (yield point) ve elastisite modülü (Young's modulus) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Membranlardan (0, 1, 2, 3) literatürde belirtilen standartlara (ASTM D 882 – 02, 2002) uygun olarak eni 5 mm ve uzunluğu 10 cm olan kesitler (Şekil 3.6) hazırlanmıştır. Membran kalınlıkları 0.15 mm'dir. Her bir membran için 3 adet ölçüm yapılarak ortalama değerler hesaplanmış ve test sonuçları değerlendirilmiştir.



Şekil 3.6. Mekanik test için hazırlanan membranlar

3.2.2.10. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

Membranlardan (0, 1, 2, 3) alınan 0,75 cm çaplı dairesel kesitlerin gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram-negatif *Esheria coli* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Katı kültür ortamında bakterilerle inoküle edilmeden önce dairesel kesitler 15'er dk UV ışınlarına maruz bırakılarak sterilizasyon sağlanmıştır. Katı kültür ortamında bulunan *S. aureus* ve *E. coli* bakteri suşları sırasıyla Müller Hinton Buyyon (MHB) ve Luria Bertani (LB) sıvı besi ortamlarına inoküle edilmiştir. Yaklaşık 2 saatlik inkübasyon sonrasında sıvı kültürün, spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda 0,08 ile 0,13 arasında absorbanans verdiği görülmüştür. Bu aralık disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel etkinlik testinde kullanılacak kültürler için belirlenen 0.5 McFarland standardına uygun kabul edilmiştir. Bu standarda uygun bulanıklık değerine sahip *S. aureus* ve *E. coli* sıvı kültürlerinden eküvyon çubuğu yardımıyla alınan örnekler Müller Hinton-Agar (Merck, Almanya) ve Eosine Metilen Blue (EMB)-Agar besi ortamlarına yayma ekimi yöntemiyle ekilmiştir. Ekilen mikroorganizmaların üzerine steril dairesel kesitler uygun mesafelerde yerleştirilerek (Şekil 3.7) 37°C'ta 16-20 saat inkübasyona bırakılmış sonrasında antibakteriyel aktivite petrilerdeki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. Membranların (0, 1, 2, 3) petrilere yerleşimi

3.2.2.11. Biyouyumluluk

Membranların (0, 1, 2, 3) ve ayrıca membranların içerdiği *H. perforatum* yağının (1; 2 ve 3 μ l) biyouyumluluğu sitotoksosite testi yapılarak incelenmiştir. Sitotoksosite uygulamalarında hücreler ile materyal arasındaki etkileşim, direkt veya indirekt olabilmektedir. Direkt etkileşimde hücreler, etkinliği incelenen materyal ile doğrudan temas halinde olurken indirekt etkileşimde doğrudan bir temas söz konusu olmamaktadır (Uzun ve Bayındır, 2011). Çalışmalar direkt sistotoksosite yöntemi olan WST-1 (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzen disülfonat testi ile ISO 10993-5 (2009) standartlarına uygun olarak yapılmıştır (Anonim, 2017). Deneylerde hem deri dokusunu en doğru simüle edebilecek olması hem de ASTM F813-07 (2012) standartlarına göre sitotoksosite değerlendirmelerinde kullanılması önerilen L929 fare fibroblast hücre hattı ile çalışılmıştır (Anonim, 2012).

Çalışmada rutin hücre açma ve çoğaltma prosedürü uygulanmıştır. Biyouyumluluk testlerine başlamadan bir gün öncesinde L929 fibroblast hücreleri çoğaltılmıştır. Hücreler için uygun besi ortamı olan %1 antibiyotik (penisilin), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve DMEM L-glikoz (düşük glikoz) içerisinde kültür edilmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından canlılık durumlarının (canlı hücre sayılarının) belirlenmesi için kültür kabı yüzeyinde çoğalarak konflüent hale gelen hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Bu işlem besiyerinin uzaklaştırılması sonrasında hücrelerin Tripsin-EDTA (%0,25 Tripsin, %0,02 EDTA) ile muamele edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin Tripsin-EDTA ile bir süre inkübasyonunun ardından kültür ortamına besiyeri ilave edilerek hem enzim aktivitesi

durdurulmuş hem de hücreler sayım için süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon edilmiş hücreler hücre sayım cihazı (Invitrogen, Invitrogen Countess Automated Cell Counter, Kore) aracılığıyla sayılmıştır.

WST-1 sitotoksikite testinde kullanılacak membranlardan (0, 1, 2, 3) alınan 0,75 cm çaplı dairesel kesitler 15'er dk UV ışınlarına maruz bırakılarak sterilizasyon sağlanmıştır. *H. perforatum* yağı ise 0,1 µm'lik filtreden geçirilerek steril kabul edilmiştir. 24 kuyucuklu plaklara her birine 1×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak, 200 µl besi yeri ilave edilmiştir. Steril membran kesitleri ve steril *H. perforatum* yağı ayrı ayrı kuyucuklara konularak hücrelerle doğrudan temas etmeleri sağlanmıştır. Daha sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında 1 gece inkübe edilmiştir. 1 gecelik inkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan besi ortamı alınmış ve hücrelerin üzerine 200 µl taze renksiz (fenol resist) besi yeri ilave edilmiştir. Renksiz besi yeri ile çalışılmasının nedeni; WST-1 boyası ile boyama sonrası ELISA okuyucu ile ölçüm yapılacağından renk (pigment) maddesinin ölçümü etkileyebilecek olmasıdır. Daha sonra her bir kuyucuğa 15 µl tetrazolyum tuzu (WST-1) ilave edilmiştir. Bu işlemler tetrazolyum tuzu (WST-1) ışığa duyarlı olduğundan dolayı karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Tetrazolyum tuzu (WST-1) ilave edildikten sonra plak alüminyum folyo ile sarılmış ve 3 saatlik inkübasyon için etüve kaldırılmıştır. Aynı koşullarda sadece hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de WST-1 testi eş zamanlı yapılmıştır. Inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra ELISA plak okuyucu (BioTek PowerWave XS2, Amerika) ile 440 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol grubunun optik yoğunluk (OD) değeri referans alınarak, bu OD değerinde canlılık %100 kabul edilmiştir. Diğer deney gruplarının hücre canlılığına etkisi eşitlik 3.4'e göre hesaplanmış (Hussien ve ark., 2018) ve % canlılık değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

$$\text{Canlılık değeri (\%)} = (\text{OD}_{\text{ölçülen}} / \text{OD}_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.2.12. Membranların Apoptotik & Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

Apoptoz, çok hücreli canlılarda bölünme ile artan hücre sayısını dengelemek için devreye giren programlı ve kontrollü fizyolojik bir süreçtir. Eğer, bir hücreye artık ihtiyaç duyulmuyorsa hücre içi haberleşme ile o hücrenin kontrollü ölüm süreci başlar.

Eğer hücre geri dönüşü olmayacak ölçüde hasar görmüşse bu hücrelerin ortadan kaldırılması süreci başlar. Bu süreç ise, nekroz olarak adlandırılır. Apoptoz sinyali alındıktan sonra hücrede çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelir. Apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler bu spesifik değişiklikleri temel alan bazı teknikler kullanılarak birbirinden ayırt edilebilmektedir (Güleş ve Eren, 2008; Polat, 2013). İkili boyama tekniği de apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerden birisidir. Double Stain, sırasıyla %1 ve %5 oranlarında Propidyum iyodür (PI) ve Hoechst boyalarını içeren karışım bir boyadır. Hoechst, canlı ve apoptotik hücre çekirdeklerini maviye boyarken, PI sadece membran bütünlüğü bozulmuş nekrotik hücre çekirdeklerini kırmızıya boyamaktadır (Güleş ve Eren, 2008). Her iki boya da DNA'ya bağlanarak floresan mikroskopta farklı dalga boylarında (Hoechst: 350 nm, PI: 535 nm) gözlemlenebilmektedir (Polat, 2013). Boya içeriğinde ayrıca %1 oranında Ribonükleaz A (RA) bulunmaktadır. RA, sitoplazmik RNA'yı yok etmek ve spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla kullanılmaktadır.

Çalışmada rutin hücre açma ve çoğaltma prosedürü uygulanmıştır. L929 fibroblast hücreleri, uygun besi ortamında (%1 antibiyotik (penisilin), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve DMEM L-glikoz (düşük glikoz)) ve uygun koşullar altında (37°C, %5 CO₂) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kültür kabı yüzeyinde çoğalarak konflüent hale gelen hücreler, besiyerinin uzaklaştırılması sonrasında hücreler Tripsin-EDTA (%0,25 Tripsin, %0,02 EDTA) ile bir süre inkübe edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Hücrelerin Tripsin-EDTA ile inkübasyonunun ardından kültür ortamına besiyeri ilave edilerek hem enzim aktivitesi durdurulmuş hem de hücreler sayım için süspanse hale getirilmiştir. Süspanse edilmiş hücreler hücre sayım cihazı (İnvitrogen, Invitrogen Countess Automated Cell Counter, Kore) aracılığıyla sayılmıştır. 24 kuyucuklu plaklara her birine 1×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak, 200 µl besi yeri ilave edilmiştir. Membranlardan (0, 1, 2, 3) alınan 0,75 cm çaplı dairesel kesitler sterilizasyon amacıyla 15'er dk UV ışınlarına maruz bırakıldıktan sonra ayrı ayrı kuyucuklara konularak hücrelerle doğrudan temas etmeleri sağlanmıştır. Daha sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında 1 gece inkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan besi ortamı (vasat) atıldıktan sonra tekrar besi yeri ilave edilmeksizin yüzeye tutunan hücrelerin ikili boyama tekniği ile boyanmıştır. Çalışmada kullanılan boyaların ışığa duyarlı olması sebebiyle çalışmalar karanlık ortamda yapılmıştır. Hücreler üzerine her

bir kuyucuğa 150 µl Double Stain ilave edilmiştir. Double Stain ilave edildikten sonra plak tekrar alüminyum folyoya sarılmış ve hücreler boya ile 15 dk boyunca etüvide inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından apoptotik ve nekrotik hücreler floresan mikroskop (Inverted Microscope, Leica DM6000B, Almanya) altında fotoğraflanmış (Şekil 4.11 ve 4.12) ve apoptotik/nekrotik hücreler sayılarak % apoptoz/nekroz değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10). Aynı koşullarda membranlarla temas etmeyen hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de % apoptoz/nekroz değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10).

3.2.2.13. Membran Yüzeylerine Hücre Yapışmasının İncelenmesi

Yara örtü materyallerinin yaraya yapışması önemli bir sorundur ve örtü materyali yara üzerinden kaldırılırken ikincil bir hasara sebep olmaktadır. Bu nedenle yara örtülerinin yara bölgesine yapışması istenmez. Membranların (1, 2, 3) yara bölgesi ile temas edecek alt tabakası L929 fibroblast hücreleri ile inkübe edilerek yüzeyde hücre tutunması (adezyon) inkübasyon sonrası membran yüzeylerinden SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.13).

İlk olarak L929 fibroblast hücreleri uygun besi ortamı olan %1 antibiyotik (penisilin), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve DMEM L-glikoz (düşük glikoz) içerisinde, 37°C'de % 5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür kabındaki besi yeri uzaklaştırılmış ve konflüent tek tabaka halindeki hücreler Tripsin-EDTA (%0,25 Tripsin, %0,02 EDTA) ile muamele edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Süspanse edilmiş hücreler hücre sayım cihazı aracılığıyla sayılmıştır. Daha sonra kültür kabındaki hücreler besi yeri ile beraber 24 kuyucuklu plaklara alınmıştır. Membranlardan (1, 2, 3) alınan 0,75 cm çaplı dairesel kesitler sterilizasyon amacıyla 15'er dk UV ışınlarına maruz bırakıldıktan sonra alt tabakaları üste gelecek şekilde ayrı ayrı kuyucuklara yerleştirilmiştir. Her bir membran üzerine dikkatli bir şekilde 1×10^5 hücre içeren 35 µl hücre süspanasyonu ilave edilmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan sonra, hücrelerin membranlara tutunması için besi yeri ilave edilmeden 30 dakika inkübe edilmiştir (37°C'ta %5 CO₂). Belirtilen inkübasyon süresinin ardından kuyucuklara 200'er µl besi yeri membranların hücre ekilmiş yüzeylerinin dönmemesine dikkat edilerek ilave edilmiştir. Membranların yüzeylerine ekilmiş olan hücreler 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresinin ardından

membran kesitlerinin SEM görüntülerinin alınması için kültür ortamından ayrı bir plağa alınmış ve 1 gün boyunca kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan membran kesitleri, SEM platformuna inceleme yapılacak alt tabaka üstte kalacak şekilde sabitlenmiştir. Bu yüzeyler yaklaşık 15 dakika boyunca Polaron SC500 Sputter Coater cihazıyla paladyum ile kaplanmıştır. Daha sonra membran yüzeyleri bir taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM-5600 SEM, İngiltere) ile membran (1, 2, 3) kesitlerinin farklı bölgelerinden fotoğraflar çekilerek yüzeylerde hücre tutunması (adezyon) ve çoğalması (proliferasyon) olup olmadığı incelenmiştir (Şekil 4.13).

3.2.3. *In vivo* Uygulamalar ve Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar

3.2.3.1. Hayvan Deneyleri

Membranlar ikinci derece derin yanık yaralarında kullanılmak üzere üretilmiştir. Membranların bu amaçla kullanıma uygun olup olmadığının belirlenmesi için sıçanlarda *in vivo* deneyler yapılmıştır. Hayvan deneyleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Birimi (DETAB) Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. İkinci derece yanıklar dermisin zarar görme derecesine bağlı olarak yüzeysel (papiler) veya derin (retiküler) olabilir. Yanığın tüm dermise geçtiği durum, üçüncü derece yanık olarak adlandırılırken dermisin 2/3 oranında etkilendiği yanıklar ikinci derece derin yanık olarak adlandırılmaktadır (Tintinalli ve ark., 2010).

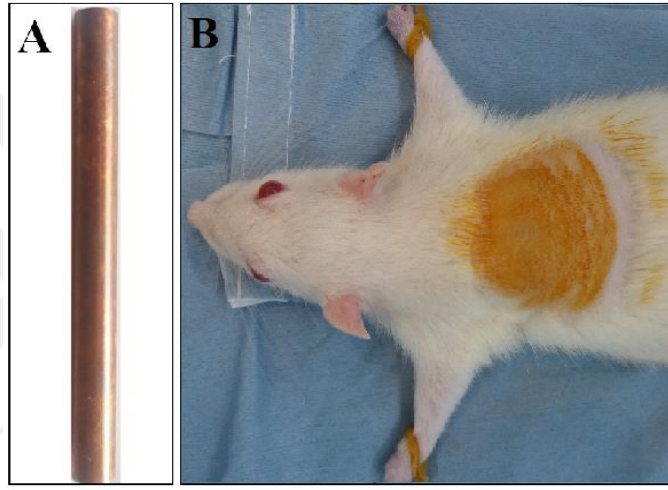
Çalışmada ağırlıkları 250 ile 300 g arasında değişen 35 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar, her grupta 7 sıçan olacak şekilde beş deney grubuna ayrılmıştır. Birinci gruba hiçbir uygulama yapılmayıp negatif kontrol grubu olarak, ikinci gruba ise gümüş içerikli yanık merhemi uygulanıp pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Üçüncü gruba *H. perforatum* yağı (1 µl), dördüncü gruba yağ içermeyen membran 0 ve beşinci gruba yağ içeren membran 1 uygulanmıştır.

Çalışmada belirtilen deney grupları ile deneylere başlanmadan önce sıçanların sırt derilerinde ikinci derece derin yanık oluşturulmak üzere pilot denemeler yapılmıştır. Pilot denemelerde 2 adet sıçan kullanılmıştır. Pilot deneylerle yanık modelinin oluşturulacağı yöntem karar verilmiş ve beş deney grubuna aynı yöntem uygulanmıştır. Operasyon öncesi anestezi ve hazırlık süreci, operasyon sonrası sıçanlara post operatif bakım uygulanmıştır. Deney hayvanları ile yapılan tüm çalışmalar, hayvanlar anestezi

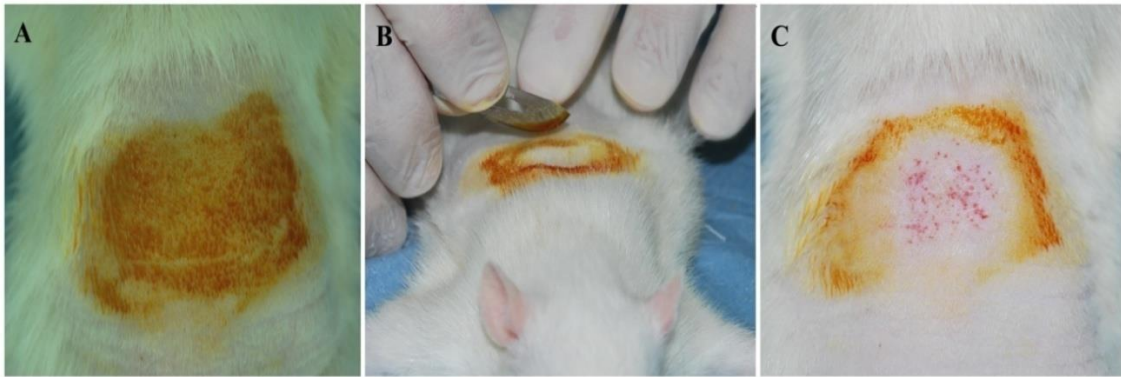
altındayken yapılmıştır. Anestezi, Ketamin (50 mg/kg) ve Rompun (5 mg/kg) karışımının hayvanlara intraperitoneal (IP) enjeksiyonu ile sağlanmıştır. Rompun miktarı çok önemlidir, fazla olması durumunda solunum problemleri ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle anestezi direnci olan sıçanlara ek doz uygulanması gerektiğinde sadece Ketamin enjekte edilmektedir. Sıçanların sırt bölgeleri tıraşlanmış ve uygulama yapılacak bölge batikon solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir. Tüm uygulamalardan sonra sıçanların ağrı ve acı duymaması için IP'den 0,5 ml parasetamol (Parol; 10 mg/ml etken madde) enjekte edilmiştir. Parol'un yara iyileşmesine bir etkisi olmadığı literatürden teyit edilmiş ve sadece ağrı kesici özelliğinden dolayı tercih edilmiştir. Deney süresince hayvanların ağırlıkları, klinik ve beslenme durumları değerlendirilmiştir. Sıçanlar bu süreçte 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde, 22 ± 3 °C sıcaklıkta sınırsız standart laboratuvar yemi ve istenilen miktarda musluk suyu ile beslenerek barındırılmıştır. Ayrıca hayvanların içme sularına hacimce %5 olacak şekilde Parol ilave edilmiş ve belli aralıklarla içme sularıyla beraber ağrı kesicileri de tazelenmiştir. Pilot çalışmaların yapıldığı iki sıçan deneyler tamamlandıktan sonra dekapite edilmiştir.

İkinci derece derin yanık modelinin elde edilebilmesi için literatür araştırmaları yapılmış ve Pereira ve ark., 2012 tarafından gerçekleştirilen çalışma referans alınarak, belirtilen model yanık oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, 7 mm çaplı pirinç çubuk 99 ± 2 °C su içerisinde 10 dakika ısıtılmış ve anestezi altındaki sırt derileri tıraşlanmış sıçanlara 15 saniye boyunca uygulanmıştır. Sonraki birkaç gün yara iyileşmesi izlenmiştir. Bu yöntemle ikinci derece yanıktan daha çok bir lezyon oluşturulduğu ve yanığın epidermis tabakasını geçip dermise etki edemediği görülmüş, bundan dolayı farklı bir yöntem ile model oluşturulması gerektiği düşünülmüştür. Aynı sıçanın sırtında farklı bir bölge tıraşlanmış ve 5 dakika boyunca doğrudan aleve tutulan 7 mm çaplı pirinç çubuk 15 saniye boyunca sıçanın sırt derisine uygulanmıştır. Bu şekilde oluşturulan yanık doğrudan dağlama şeklinde olduğundan yanık dermise kadar ilerlemiş olsa da hızlı bir şekilde kabuk oluşumu görülmüştür. Böyle bir yanıkta membran uygulaması mümkün olmayacağından denenen iki yöntemin birleştirildiği bir deney kurgulanmıştır. Farklı bir sıçanın sırtı tıraşlanmış ve derinin epidermis tabakası eskar eksizyonu yöntemiyle uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 5 dakika boyunca doğrudan aleve maruz bırakılmış pirinç çubuk 15 saniye boyunca sırt derisine uygulanmıştır. Bu şekilde dağlanmış deri tabakası yine eskar eksizyonu ile uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez

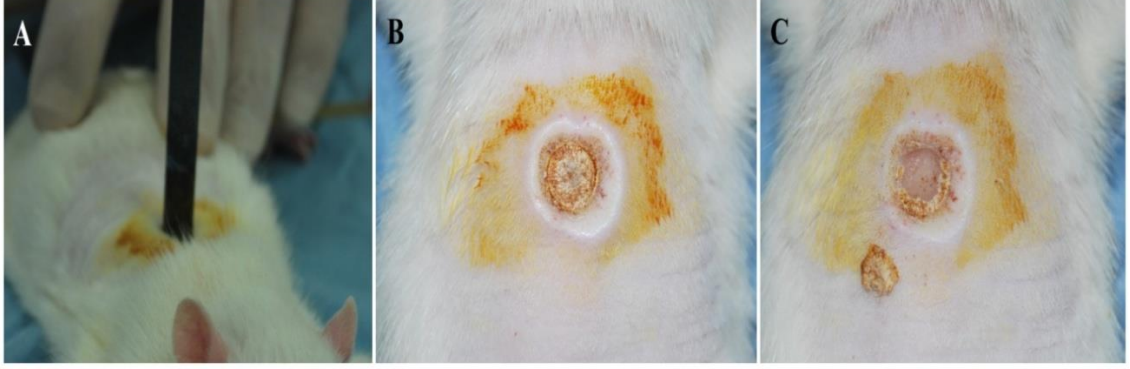
tekrarlanmıştır. Dermis tabakasına inilen yaraya $99\pm 2^{\circ}\text{C}$ su içerisinde 10 dakika ısıtılmış pirinç çubuk ile 15 saniye boyunca ısı uygulanmıştır. Bu işlem de iki kez tekrarlanmıştır. Yara bölgesinin anlık incelemeleri sonucunda dermisin büyük bir kısmının deforme olduğu ancak kas tabakasına ulaşılmadığı görülmüş ve oluşturulan yanığın makroskobik görünümünün ikinci derece derin yanığa uygun olduğu düşünülmüştür. Belirtildiği gibi birkaç optimizasyon denemesi sonucunda yara bölgesinin anlık ve sonraki günlerde incelenmesi sonucunda bu yöntem ile ikinci derece derin yanık modelinin oluşturulmasına karar verilmiştir.



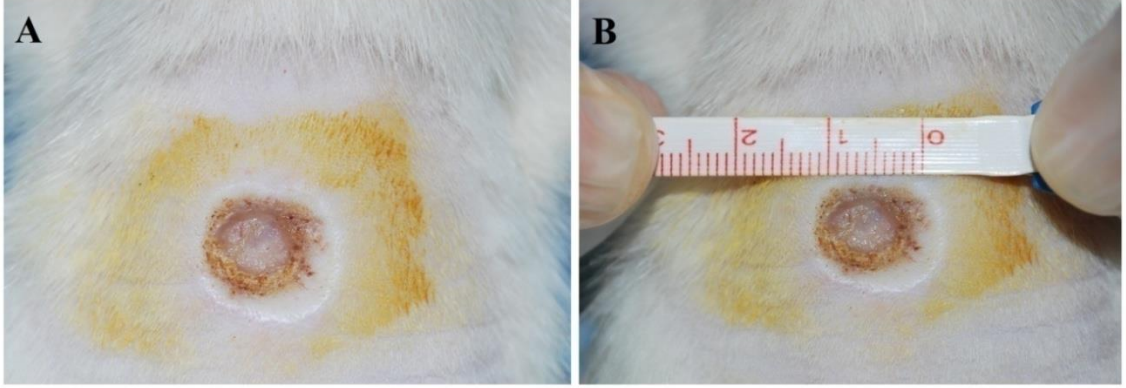
Şekil 3.8. (A) Pirinç çubuk (uzunluk: 10 mm ve çap: 7 mm); (B) İkinci derece derin yanık oluşturmak üzere seçilen proksimal dorsal bölge.



Şekil 3.9. (A) Batikon uygulanması, (B) epiderminin uzaklaştırılması için bisturi ucu ile tıraşlama işlemi, (C) hafif kanlanma; epiderminin uzaklaştırılıp dermis tabakasına ulaşıldığını göstermektedir.



Şekil 3.10. (A) 5 dakika boyunca doğrudan alev maruz bırakılmış pirinç çubuğun 15 saniye boyunca sırt derisine uygulanışı, (B) uygulama sonrası görünüm, (C) dağlanmış deri tabakasının yine eskar eksizyonu ile uzaklaştırılması.



Şekil 3.11. (A) 99 ± 2 °C su içerisinde 10 dakika ısıtılmış pirinç çubuğun 15 saniye uygulanması sonrasındaki yara görünümü ve (B) oluşturulan yaranın ölçülmesi (7,5 mm)



Şekil 3.12. Yara bölgesine membranların dikilmesi

İkinci derece derin yanık defektlerinin oluşturulmasının ardından her hayvanın yara durumu günlük olarak incelenmiş ve kontrol grubu hariç tüm hayvanlara uygulanan malzeme günlük olarak yenilenmiştir. 7,5 mm çaplı dairesel membran (0 ve 1) kesitleri

yara yüzeyini kapatacak şekilde 4 bölgeden yaraya dikilerek sabitlenmiştir. *H. perforatum* yağının direkt yara bölgesine uygulanacağı gruba 1 µl *H. perforatum* yağı ve klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan yanık merheminin uygulandığı deney grubuna ise merhem günlük olarak yara yüzeyini kapatacak ölçüde uygulanmıştır. 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerde yara bölgesinin durumu incelenmiştir. Yara bölgesinin fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarılmış ve Image J 1.48 programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ile yara alanı hesaplanmıştır. Hesaplanan yara alanları (ölçülen yara alanı) yanık modeli oluşturulan ilk gün hesaplanan orjinal yara alanı ile karşılaştırılarak % yara alanı küçülme oranı eşitlik 3.5'e göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ Küçülme Oranı} = [(\text{Orjinal yara alanı} - \text{Ölçülen yara alanı}) / \text{Orjinal yara alanı}] \times 100$$

(3.5)

Deney gruplarındaki tüm hayvanlar 16. gün uygun cerrahi yöntemle sakrifiye edildikten sonra yara dokularından alınmış deri örnekleri oda sıcaklığındaki %10 fosfat tamponlu formaldehit çözeltisi (pH 7.0) içerisine alınmıştır. Sonrasında hayvanlar dekapite edilmiş ve yönetmeliğe uygun koşullarda poşetlenerek daha sonra bertaraf edilmek üzere -20°C'de saklama dolabına kaldırılmıştır.

3.2.3.2. Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar

Sıçanların sırtlarında oluşturulan yara dokuları 16. günde uygun cerrahi yöntemlerle sakrifiye edildikten sonra %10 fosfat tamponlu formaldehit çözeltisi (pH 7.0) içerisine alınmıştır. Deney hayvanlarından alınan dokular yaranın tam ortasından ikiye ayrılarak (A ve B) formaldehit çözeltisi içerisinde 4-5 gün boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Yarayı merkezinden ikiye ayırmanın üç temel amacı bulunmaktadır. İlki yara bölgesine formaldehitin daha iyi nüfuz etmesidir; ikincisi doku takibi sonrası mikrotom ile kesit alma işlemleri gerçekleştirilirken yara bölgesine daha kolay ulaşılması ve yara bölgesinden kaybın daha az olmasıdır ve üçüncü sebebi ise kesit alınırken hata payı göz önünde bulundurularak yara bölgesinin kaybedilmesi durumunda aynı yaranın diğer kadranı ile çalışılabilme imkanı sağlamasıdır. Dokular formaldehit çözeltisinde bekletilirken belli aralıklarla doku durumları incelenmiş ve çözelti tazelenmiştir.

Formaldehit çözeltisi içerisinde fikse edilen dokulardan formaldehitin uzaklaştırılması için dokular 1 gece akan suda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler dereceli alkol çözeltilerinden (%70-80-90-100) geçirilerek dokulardaki suyun alkol ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. Dokular dereceli alkol çözeltilerinden geçirdikten sonra dokulardaki alkolün giderilmesi, dokunun berraklaştırılması ve parafinin doku içine girmesini sağlamak için ksilenden geçirilmiştir. Dokunun sertleşip kesit alınabilir hale gelmesi için parafinin dokuya infiltre olması gerekmektedir ve bu amaçla dokular erimiş parafine alınmıştır. Son olarak rutin yöntemlerle bloklama (parafin içerisine gömme) işlemi gerçekleştirilmiştir.

Parafin bloklardan mikrotomda (Leica RM 2125, Çin) 5 µm kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Kesitler Adhesive-Polysine lamlara (Superior Quality Microscope Slide, HDA) alınmış ve lamalar 60°C'de etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) 1 gece bekletilmiştir. Bu şekilde dokudaki parafinin uzaklaştırılması ve doku kesitlerinin lamlara tam olarak sabitlenmesi sağlanmıştır.

Doku kesitlerine rutin prosedürler uygulanarak Mayer's hematoksilin-eozin boyama yöntemiyle boyama yapılmıştır. Bu yöntemde hematoksilin hücre çekirdeğini boyarken eosin sitoplazmayı boyamaktadır. Total kollajen boyaması için Masson's trichrome (üçlü) boyama yöntemi uygulanmıştır. Dokulardaki Tip 1 ve Tip 3 kollajen miktarı oranını belirleyebilmek için Tip 1 ve Tip 3 kollajen antikorlarıyla immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Tüm boyamalar esnasında ve tamamlandıktan sonra incelemeler optik mikroskop (Nikon Eclipse E200, Amerika) altında NIS-Element programı (Hasp ID:6648AA61, Nikon) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.1. Mayer's Hematoksilin-Eozin Boyama Yöntemi

Hematoksilin ve eosin (H&E) boyaması histolojik boyamalarda en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. En büyük avantajı çok farklı doku yapılarını açıkça gösterebilen basit bir boyama olmasıdır. Dokular genellikle asidik ve bazik boyalar ile boyanırlar. Hematoksilin bileşenleri bazik olup hücre çekirdeğini mavi-mor renklerde boyarken, eosin bileşenleri asidik olup hücre sitoplazmasını pembe-kırmızı renklerde boyamaktadır. Hematoksilin boyamayı doğrudan gerçekleştirilmeyip, oksitlenme reaksiyonu sonucu temel oksidasyon ürünü olan Hemateine dönüşerek dolaylı olarak

gerçekleştirmektedir (Bancroft ve Gamble, 2008). 5 µm kalınlığında alınmış parafin kesitler 1 saat etüvde bekletilmiş ve doku çevresinde bulunan parafinin erimesi ve sağlanmıştır. Hematoksilen ve eozin boya her kullanım öncesinde mutlaka süzümüştür. Daha sonra rutin Mayer's Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü uygulanmıştır (Çizelge 3.1). Boyama prosedürü tamamlandıktan sonra lamaların yüzeyi kurutulmadan kesitler üzerine birer damla Entellan (Merck, Almanya) damlatılarak lamel ile kapatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.1. Mayer's Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

	İşlem	Uygulama	Süre
1	Deparafinizasyon	60°C'de etüvde bekletme	1 gece
2	Deparafinizasyon	Ksilen	3x10 dakika
3	Rehidratasyon	% 100 alkol	2x5 dakika
4		% 90 alkol	5 dakika
5		% 80 alkol	5 dakika
6		% 70 alkol	5 dakika
7	Yıkama	Distile su	5 dakika
8	Boyama	Mayer's Hematoksilen	25 dakika
9	Yıkama	Akar su	5 dakika
10	Yıkama	Distile su	5 dakika
11	Boyama	Eozin	2 dakika
12	Yıkama	Akar su	5 dakika
13	Yıkama	Distile su	5 dakika
14	Rehidratasyon	% 70 alkol	Daldır-çıkır
15		% 80 alkol	Daldır-çıkır
16		% 90 alkol	2 dakika
17		% 100 alkol	2x5 dakika
18	Şeffaflaştırma	Ksilen	3x5 dakika

3.2.3.2.2. Masson's Trichrome (Üçlü) Boyama Yöntemi

Trikrom boyama olarak adlandırılan yöntem kas, kollajen fiberler, fibrin ve eritrositlerin seçici gösterilmesi için sıklıkla kullanılan bir boyama tekniğidir. Kollajen ve kas fiberleri arasındaki farklılığın gösterilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Tüm kollajen tipleri asit boya çözeltileri ile seçici olarak belirlenebilir. Farklı boyaların (asit fuksin-orange G, anilin blue, hematoksilen) kombinasyonları ve sıralı kullanımları ile doku elemanlarının boyaması gerçekleştirilmektedir.

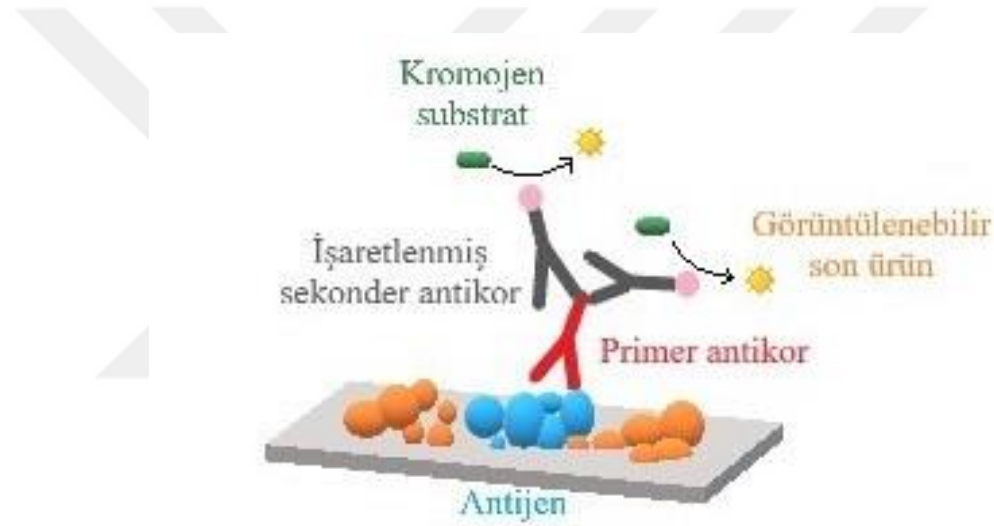
Masson's trichrome boyama yöntemi ile hücre çekirdeği hematoxilen boyama ile mavi-mor; sitoplazma, kas ve eritrositler asit fuksin-orange G boyaması ile pembe-kırmızı; kollajen fibriller ise anilin mavisi ile mavi rekte boyanmaktadır (Bancroft ve Gamble, 2008). 5 µm kalınlığında alınmış olan parafin kesitler 1 saat etüvde bekletilmiş ve böylelikle doku çevresinde bulunan parafinin erimesi sağlanmıştır. Boyamada kullanılan tüm boya ve çözeltiler hazırlanmış ve kullanılmadan önce süzölmüştür. Daha sonra üçlü boyama prosedürü uygulanmıştır (Çizelge 3.2). Boyama prosedürü tamamlandıktan sonra lamaların yüzeyi kurutulmadan kesitler üzerine birer damla Entellan (Merck, Almanya) damlatılarak lamel ile kapatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.2. Üçlü boyama prosedürü

	İşlem	Uygulama	Süre
1	Deparafinizasyon	60°C'de etüvde bekletme	1 gece
2	Deparafinizasyon	Ksilen	3x10 dakika
3	Rehidratasyon	% 100 alkol	2x5 dakika
4		% 90 alkol	5 dakika
5		% 80 alkol	5 dakika
6		% 70 alkol	5 dakika
7	Yıkama	Distile su	2xDaldır- çıkar
8	Boyama	Weigert Hematoxilen	8-10 dakika
9	Yıkama	Akar su	5 dakika
10	Yıkama	Distile su	2xDaldır- çıkar
11	Boyama	Asit fuksin	1 dakika
12	Yıkama	Distile su	2xDaldır- çıkar
13	Bağ dokunun beyazlaştırılması	Fosfotungstik asit	Doku beyazlaşana kadar (~1 saat)
14	Yıkama	Distile su	2xDaldır- çıkar
15	Boyama	Anilin mavisi	3 dakika
16	Yıkama	Distile su	2xDaldır- çıkar
17	Rehidratasyon	% 70 alkol	Daldır-çıkır
18		% 80 alkol	Daldır-çıkır
19		% 90 alkol	2 dakika
20		% 100 alkol	2x5 dakika
21	Şeffaflaştırma	Ksilen	2x10 dakika

3.2.3.2.3. Tip 1 ve Tip 3 Kollajen Proteini İmmunohistolojik Boyama Yöntemi

Yara dokusunda tip 1 ve tip 3 kollajen protein ekspresyon oranlarının belirlenebilmesi amacıyla immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir. Böyle spesifik protein ekspresyonlarının belirlenmesi için en kullanışlı yöntem işaretlenmiş antikorların kullanıldığı immunohistolojik boyama yöntemidir. İmmunohistokimya, primer antikorların spesifik protein antijenleri ile eşleşmesi temeline dayanır. İşaretlenmiş sekonder antikorlar ve kromojen substrat, spesifik kollajen antijenlerinin doku kesitindeki yerlerinin belirlenmesini sağlamaktadır. Böylece antijen-antikor bağlanmaları optik mikroskopta görülebilmektedir.



Şekil 3.13. İmmunohistokimyasal boyamada antijen-antikor bağlanması

Kullanılan tip 1 ve tip 3 kollajen antikorlar (ABCAM, İngiltere) tavşan antijenlerine karşı geliştirilmiş sıçanlarda kullanıma uygun antikorlardır. Boyamaya başlamadan önce kromojen substrat çözeltisi, tip 1 ve tip 3 kollajen çözeltileri temin edilen firmanın uygulama önerilerine göre hazırlanmıştır. 5 µm kalınlığında alınmış olan parafine gömülmüş doku kesitleri 1 gece etüvde bekletilmiş ve böylelikle doku çevresinde bulunan parafinin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra immunohistokimyasal boyama prosedürü uygulanmıştır (Çizelge 3.3). Boyama prosedürü tamamlandıktan sonra lamaların yüzeyi kurutulmadan kesitler üzerine birer damla entellan (Merck, Almanya) damlatılarak lamel ile kapatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü

1	1 gece 60°C'de etüvde deparafinizasyon	
2	Ksilen	3x20 dakika
3	% 100 alkol	2 dakika
4	% 90 alkol	2 dakika
5	% 80 alkol	2 dakika
6	% 70 alkol	2 dakika
7	Distile suda yıkama	10 dakika
8	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilmiştir (Bir lam üzerinde tip 1 ve tip 3 kollajen boyaması birlikte yapılmıştır).	
9	PBS (Fosfat Buffer Saline) çözeltisinde yıkama	3x5 dakika
10	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	5 dakika
11	PBS	3x5 dakika
12	Kesitler üzerine blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılmış ve 10 dakika beklenmiştir.	
13	Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılmış, uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatılmıştır. Kapalı nemli kutuda 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. * Tip 1 ve tip 3 primer antikorlar için çözelti konsantrasyonları sırasıyla; 7 µg/ml ve 1 mg/ml şeklindedir.	
14	PBS	3x5 dakika
15	Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatılmış, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir.	
16	PBS	3x5 dakika
17	Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılmış, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir.	
18	PBS	3x5 dakika
19	DAB solüsyonu damlatılmış ve 10-15 dk kapalı nemli kutuda bekletilmiştir.	
20	PBS	3x5 dakika
21	Distile suda yıkama	
22	Mayer's hematoksilen ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 10 dk boyama yapılmıştır.	
23	Distile suda yıkama	
24	% 70 alkol	1 dakika
25	% 80 alkol	1 dakika
26	% 90 alkol	1 dakika
27	% 100 alkol	3 dakika
28	% 100 alkol	5 dakika
29	Ksilen	3x5 dakika

3.2.3.2.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS 20 Windows İstatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma (standart error mean) olarak ifade edilmiştir. Elde edilen immunohistokimyasal verilerin çoklu karşılaştırılması One-way ANOVA sonrası post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden TUKEY HSD testleri ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda p değerinin 0,05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen polimerik yara örtü materyalleri kimyasal yapı, yüzey morfolojisi, yoğunluk, gözeneklilik, hidrofilitite/hidrofobisite, ıslanabilirlik, hava geçirgenliği, zamana bağlı kütle kaybı, *H. perforatum* yağının membranlardan kontrollü salımı, mekanik dayanıklılık, antibakteriyel aktivite, biyouyumluluk, L929 fare fibroblast hücrelerine apoptotik/nekrotik etki, membran yüzeylerine hücre yapışması gibi özellikleri bakımından çeşitli *in vitro* testlerle karakterize edilerek, membranların sıçanlarda *in vivo* uygulanması sonrasında histolojik/immunohistokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

4.1. Membran karakterizasyonu ve *in vitro* çalışmalar

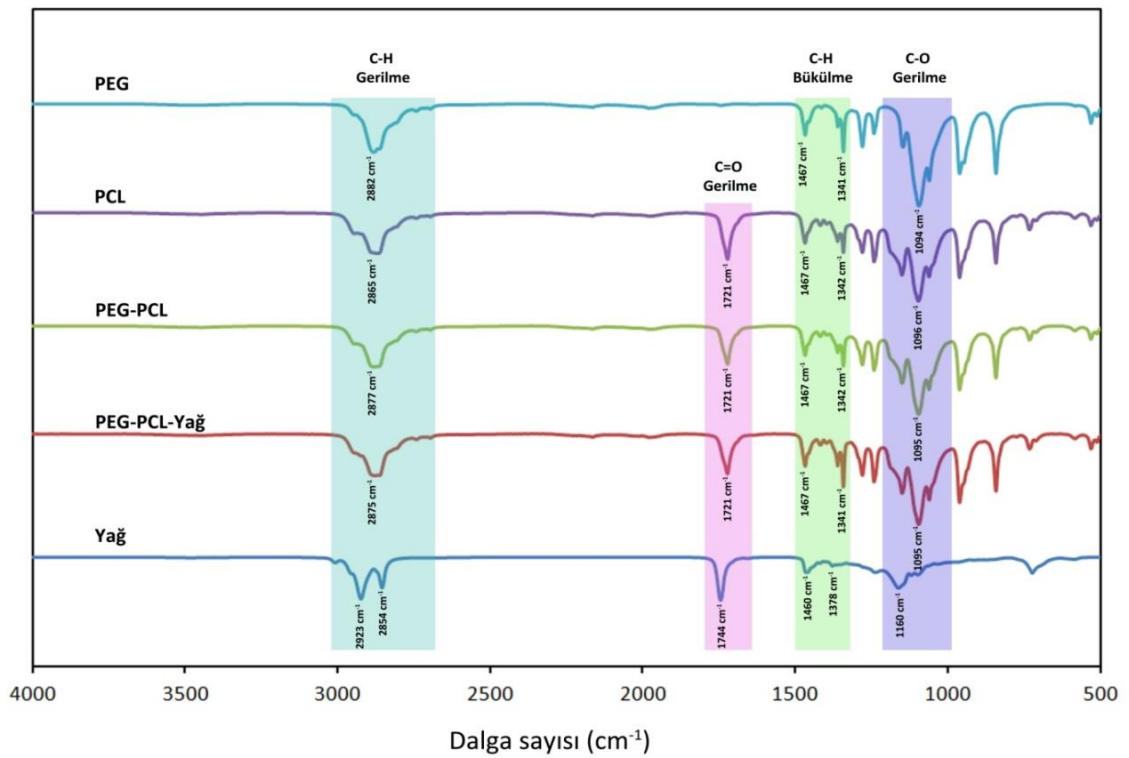
4.1.1. Kimyasal Yapı Analizi

Membranların kimyasal yapısı ve polimerlerin çözücü ile etkileşimlerinde kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla elektro-eğirilmiş membranların ve *H. perforatum* yağının FTIR (Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi) (Perkin Elmer, Spectrum 100, Amerika) spektrumları incelenmiştir.

Şekil 4.1'de sunulan FTIR spektrumları incelendiğinde PEG yapısında bulunan CH₂'ye ait C-H gerilme piki 2882 cm⁻¹ ve C-O gerilmesine ait pik ise 1094 cm⁻¹ dalga sayısında görülen piktir. Tüm spektrumlarda görülen 1467 cm⁻¹ ve 1341 cm⁻¹ dalga sayısı aralığına görülen pikler C-H bükülmelerine ait piklerdir. PCL'a ait spesifik pik olan simetrik CH₂ bağları 2865 cm⁻¹ dalga sayısında görülmektedir. Aynı şekilde CH₂'e ait pik PEG'in spektrumunda da yakın bir dalga sayısında görülmüştür. PEG-PCL ile oluşturulan membranlardaki CH₂ bağlarına ait spektrumlar ise PEG ve PCL'a ait ilgili piklerin arasındaki bir dalga sayısındadır. Ayrıca C-H gerilmelerini ifade eden bölgede bulunan 2942 cm⁻¹ dalga sayısında görülen nispeten küçük pik ise yine PCL'a özgü bir pik olup PCL içeren membran yapılarında da görülmektedir. 1721 cm⁻¹ dalga sayısında görülen pik PCL yapısında bulunan karbonil (C=O) grubunun varlığını göstermektedir. Bu dalga sayısındaki pik PEG-PCL membranlarda da görülmektedir. 2854 ve 2923 cm⁻¹ dalga sayısında *H. perforatum* yağına ait spesifik C-H gerilme (metil grubuna ait) pikleri görülmektedir (Zavoi ve ark., 2011; Pezzei ve ark., 2012). Yağın PEG-PCL membranlara ilave edilmesi ile C-H gerilme piklerinin bir miktar kaydırıldığı

görülmektedir. 1744 cm^{-1} dalga sayısında görülen pik ester bağlarında bulunan karbonil (C=O) grubunu ifade etmektedir. Aynı pik yapısında ester bağları bulunduran PCL'de ve yağın yapısında da bulunmaktadır.

FTIR-ATR analizinden elde edilen sonuçlar *H. perforatum* yağının PEG-PCL membranlara başarılı bir şekilde yüklendiğini, yapıya katılan bileşenlerin çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında değişiklik meydana gelmediğini doğrulamaktadır.

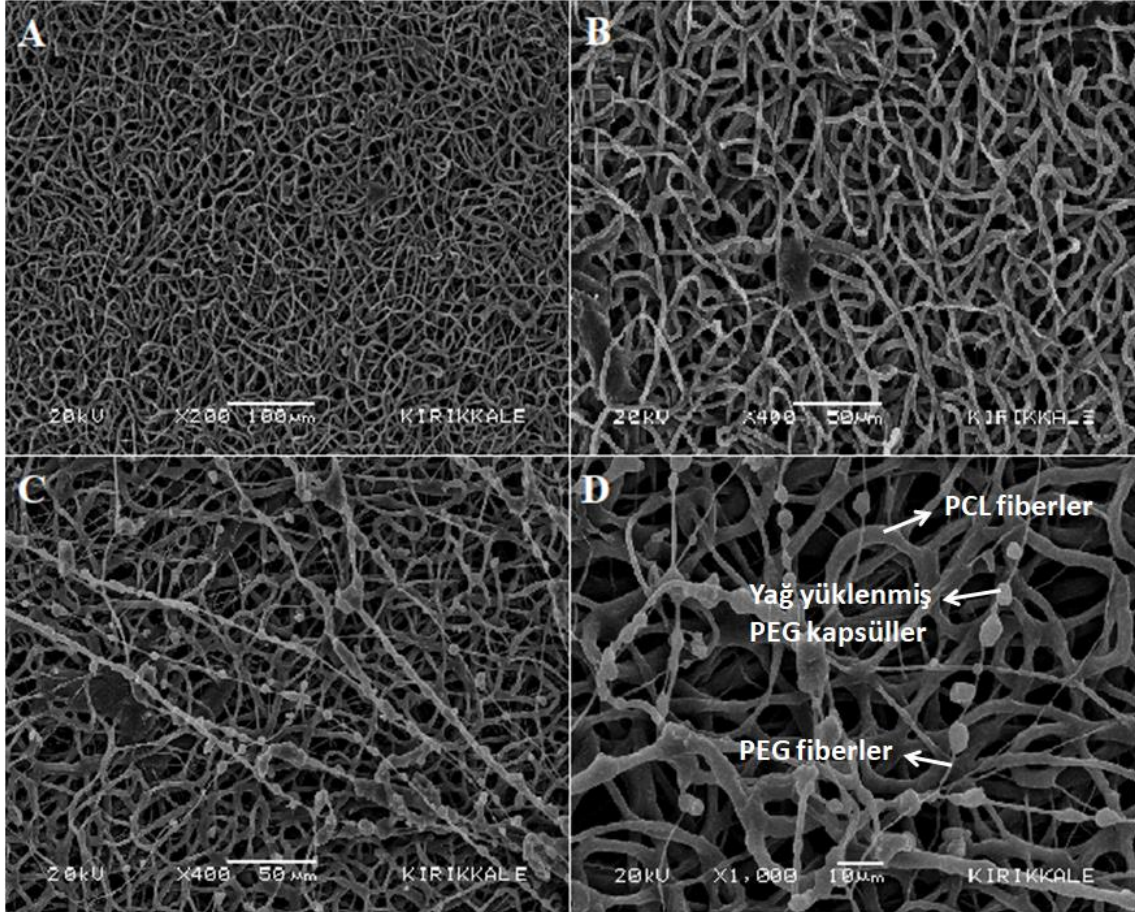


Şekil 4.1. Membran yapısına katılan polimerler ve *H. perforatum* yağına ait ATR-FTIR spektrumları

4.1.2. Yüzey Morfolojisi

Sunulan çalışma kapsamında üretilen polimerik yara örtü materyallerinin yüzey yapılarının incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de *H. perforatum* yağı içeren membran l'in alt ve üst tabakalarına ait SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.2 (A) ve (B)'de polimerik membranın sadece PCL fibelerden oluşan üst tabakasına ait SEM görüntülerinde örgüsüz gözenekli fibröz membran yapısı açıkça görülmektedir. Şekil 4.2 (C) ve (D)'de yara ile temas halinde olacak membranın alt tabakasına ait SEM görüntüleri verilmiştir. Bu tabaka Şekil 4.2 (D)'de işaretli olarak gösterilen PCL

fiberler, *H. perforatum* yağı içeren PEG kapsüller ve PEG fiberlerden oluşmaktadır. Görüldüğü gibi PCL fiberler, PEG fiberlere göre daha kalın yapılı olup boncuk içermemektedir. Kapsül yapılar PEG liflerde bulunup yer yer PCL fiberlere de tutunmaktadır.



Şekil 4.2. Membran 1'e ait SEM görüntüleri; (A) ve (B) üst tabaka sırasıyla x200 ve x400 büyütme, (C) ve (D) alt tabaka sırasıyla x400 ve x1000 büyütme

4.1.3. Membran Yoğunluğu ve Gözenekliliği

Gözenekli yapı ve yüksek yüzey alanı elektro-eğirme tekniğinin sağladığı önemli bir avantajdır. Membran yapısına katılan maddenin niteliği ve miktarına bağlı olarak gözenekli yapısı değişmektedir. Membranların gözenekli yapısı gaz geçirgenliği, su tutma kapasitesi ve salım özellikleri gibi çeşitli fiziksel özelliklerin de kontrol edilmesini sağlamaktadır. Çizelge 4.1'de membran 0 ve 1'e ait hesaplanan yoğunluk ve % gözeneklilik değerleri verilmiştir. % PEG, % PCL ve % yağ membran yapısındaki bileşenlerin ağırlıkça % miktarları, V_0 ve V_m sırasıyla polimerik film ve elektroegirilmiş membranların spesifik hacimlerini (cm^3/g) göstermektedir. Membran 0 için yoğunluk ve

% gözeneklilik değerleri sırasıyla 0,3 g/cm³ ve %73 iken membran 1 için bu değerler sırasıyla 0,477 g/cm³ ve %56'dır. Elde edilen değerler *H. perforatum* yağı ilavesinin beklenen şekilde membran yoğunluğunu artırırken, gözenekliliği azalttığını göstermektedir. Çalışmalarda yara örtü materyali olarak kullanımı öngörülen polimerik membranların gözeneklilik oranları % 50-70 arasında değişiklik göstermektedir. Üretilen polimerik membranlara ait % gözeneklilik değerleri *H. perforatum* yağının yapıya katılmasıyla birlikte belirgin şekilde azalmış olsa da literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında sonuçların optimal değerlerde olduğu görülmüştür (Gupta ve Saxena, 2011; Gupta ve ark., 2008).

Çizelge 4.1. Membranların spesifik hacim, yoğunluk ve % gözeneklilik değerleri

Membran	PEG % (w/w)	PCL % (w/w)	Yağ % (w/w)	V ₀ , cm ³ /g	V _m , cm ³ /g	Yoğunluk g/cm ³	Gözeneklilik %
0	0,194	0,806	0	0,885	3,333	0,3	73
1	0,148	0,616	0,234	0,923	2,096	0,477	56

4.1.4. Hidrofilisite / Hidrofobisite (Temas Açısı Ölçümleri)

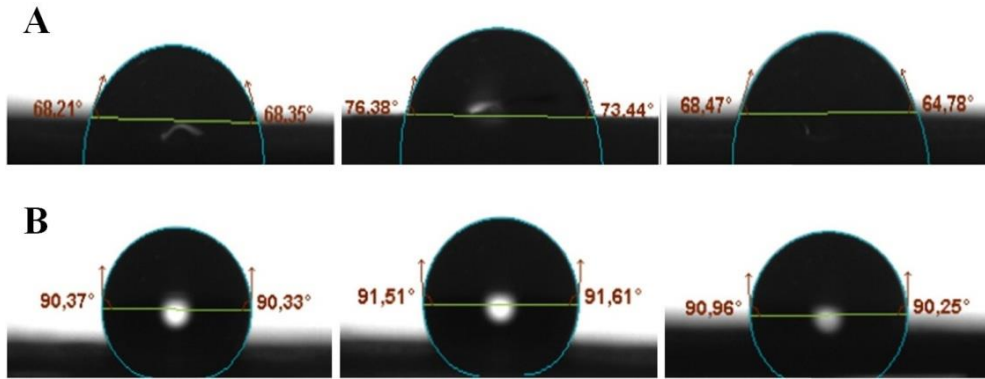
Membranların hidrofilik/hidrofobik karakterlerinin değerlendirilebilmesi için membranların temas açısı ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Temas açısı değeri $\theta < 90^\circ$ ise sıvının katı yüzeyi ıslattığı, $\theta > 90^\circ$ ise ıslatmadığı ifade edilebilir. $\theta < 10^\circ$ olduğunda süper-hidrofilik (güçlü bir ıslatma), $\theta > 150^\circ$ olduğunda ise süper-hidrofobik özellikte olduğu söylenebilir (Zhao ve Jiang, 2018).

Membran 0 ve 1 için üst tabakalara (elektro-eğirilmiş PCL tabaka) ait temas açısı (θ) değerleri sırasıyla 90,84° ve 97,18°'dir (Çizelge 4.2). Üst tabakanın hidrofobik özellik gösterdiği ifade edilebilir. Yara ile temas eden alt tabakanın (co-elektroeğirilmiş PEG-PCL tabaka) temas açısı ölçüm değeri 69,94° iken alt tabakada (co-elektroeğirilmiş yağ içeren PEG-PCL tabaka) yağ kullanılması ile birlikte temas açısı ortalama değeri 86,13° olarak ölçülmüştür. Çizelge 4.2.'deki değerler Şekil 4.3 ve 4.4'deki ölçümlerin ortalama değerleridir. Yağ hidrofobik yapısı nedeniyle membranın hidrofilisitesini belirgin şekilde azaltmıştır. Bu durum hücre yapışması riskini de minimize etmiştir. Yara örtü

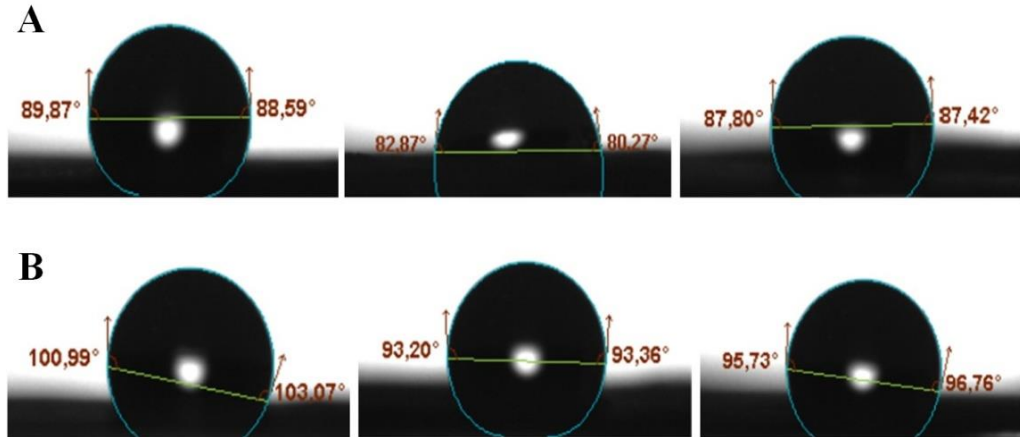
membranlarının aşırı hidrofobik olması yara bölgesinde irritasyona neden olabileceken, aşırı hidrofilik karakterde olması ise hücre adezyonuna dolayısı ile membranın yara bölgesine yapışmasına neden olabilmektedir. Çizelge 4.2'de membranların belirgin şekilde hidrofilik ya da hidrofobik olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.2. Membran (0 ve 1) alt ve üst tabaka yüzeylerinin temas açısı değerleri

	Alt tabaka (θ)	Üst tabaka (θ)
Membran 0	69,94 °	90,84 °
Membran 1	86,13 °	97,18 °



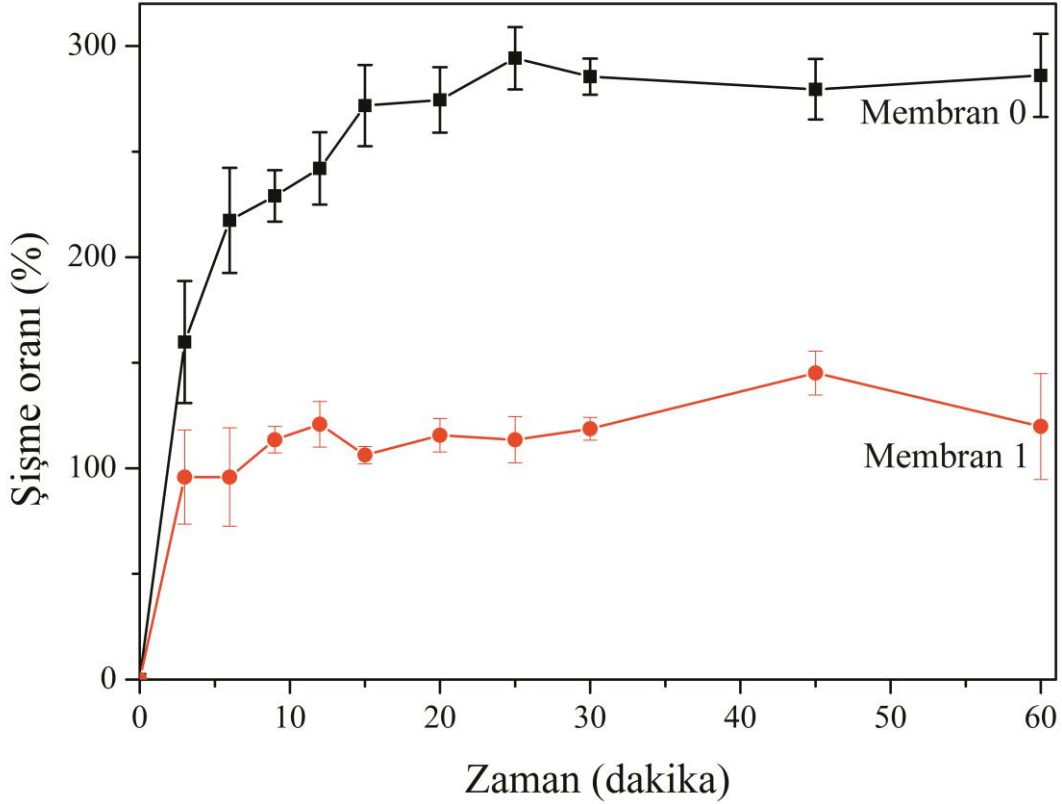
Şekil 4.3. Membran 0'ın (A) alt ve (B) üst tabaka yüzeylerindeki su damlacığı görüntüsü ve ölçülen temas açısı değerleri



Şekil 4.4. Membran 1'in (A) alt ve (B) üst tabaka yüzeylerindeki su damlacığı görüntüsü ve ölçülen temas açısı değerleri

4.1.5. Islanabilirlik (Şişme Testi)

Yara bölgesinin çok ıslak veya kuru olması iyileşmeyi geciktireceğinden bu bölgede nem kontrolü çok önemlidir (Zahedi vd., 2010). Membran tarafından nem kontrolünün sağlanabilmesi için eksudayı tutma kapasitesi (ıslanabilirlik) önemlidir. Membranların (0 ve 1) zamana bağlı % şişme oranları Şekil 4.5'de verilmiştir. Membranlar ilk 3 dakika hızlı ve doğrusal bir % şişme eğrisi göstermiştir. 3. dakikada membran 0'ın (~ %170) şişme oranı (%) membran 1'e göre (~ %90) daha yüksektir. Membran 1'in şişme oranı (%) 12. dakikada (~ %120), membran 0'ın şişme oranı (%) ise 25. dakikada (~ %290) dengeye ulaşmıştır. Membranların dengeye ulaştıkları şişme oranları (%) karşılaştırıldığında yağ kullanımı ile membranların ıslanabilirliklerinin yarı yarıya azaldığı görülmüştür. Bu durumun membran yapısındaki yağın membran yoğunluğunu artırarak gözenekliliği azaltmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.1). Ancak membranların (0 ve 1) yara iyileşmesi için yeterli nem tutma kapasitesine sahip olduğu ifade edilebilir (Kweon ve ark., 2000; Patil ve ark., 2011). Uygulamada yara eksudası ile temas eden elektro-eğrilmiş PCL fiberlerden oluşan hidrofobik karakterdeki üst tabakanın nemin alt tabaka kalmasını sağlayacağı yine alt tabakada hidrofilik özellik gösteren PEG polimerinin de nemi absorbe ederek yara bölgesinin nem kontrolünü sağlayacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.5. Membran 0 ve membran 1'e ait zamana bağlı % şişme oranları

4.1.6. Hava Geçirgenlik Testi

Yara örtü materyalleri için gaz geçirgenlik değeri yaralı bölgenin sistemik dolaşım haricinde de oksijenlenmesi ve ortamdaki CO₂'in ve eksudadan kaynaklı fazla su buharının uzaklaştırılması açısından önemli bir özelliktir. Hava gazı geçirgenlik testleri TS 391 EN ISO 9237.1999 standartlarına uygun olarak membran 0 ve 1 için 6-8 ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiş ve bu ölçümlerin ortalama değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hava geçirgenlik test sonuçları

	Membran 0	Membran 1
Hava geçirgenliği (l/m ² /s)	36,7	22,3
% CV	12,0	35,0

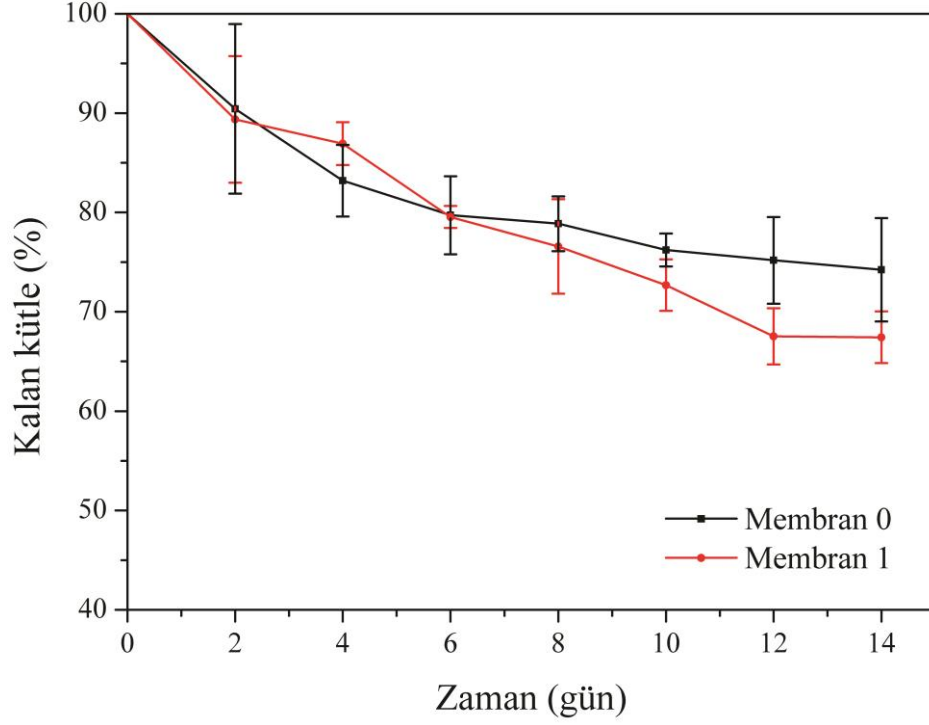
Literatürde ideal bir yara örtü materyalinde su buharı geçirgenliği (WVP) 8,33-10,42 mg/cm²/h aralığında olması gerektiği belirtilmiştir (Zahedi ve ark., 2009). Bu bilgiye göre elde edilen sonuçlar birim olarak uygun hale getirildiğinde membran 0 için 4,7 mg/cm²/h iken membran 1 için 2.8 mg/cm²/h şeklinde olmaktadır. Bu değerler belirtilen ideal değerlere yakın olmakla birlikte bir başka çalışmada belirtilen ticari yara örtülerinin su buharı geçirgenlik değerinin 90–2890 g/m²/gün aralığında olması gerektiği belirtilmiştir (Kweon ve ark., 2000). Bu bilgiye göre ise elde edilen geçirgenlik değerlerinin belirtilen ideal sınırlar içerisinde olduğu görülmektedir (membran 0 için 1128 g/m²/gün ve membran 1 için 672 g/m²/gün). Yağ kapsülleri ile birlikte membran yoğunluğunun artarak gözenekliliğin azalması (Çizelge 4.1) gaz geçirgenliğinde de belirgin şekilde azalmaya sebep olmuştur. Ancak her iki membranda da hava geçirgenlik performansının ideal bir yara örtü materyalinden beklenen değerlerle uyumlu olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.3'te belirtilen diğer bir değer olan % CV, yüzde varyasyon katsayısını ifade etmektedir. Üretim sırasında membran kalınlıklarının membranın her yerinde aynı olmasına dikkat edilmiş olsa da ölçüm farklılıklarının, fiber ve kapsül yapılarının membranın heryerinde homojen olarak dağılmamasından veya membran kalınlıklarının farklılıklar gösterebilmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

4.1.7. Zamana Bağlı Kütle Kaybı Ölçümleri

Üretilen polimerik membranlardan (0 ve 1) alınan 2 x 2 cm boyutlarında kesitler uygun koşullarda (37°C & pH 7,4) PBS içerisinde belirli sürelerde (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14 gün) bekletilerek membran kesitlerinin zamana bağlı % kalan kütle değerleri hesaplanarak zamana bağlı % kalan kütle grafiği Şekil 4.6'da sunulmuştur. Elde edilen veriler her iki membran için de zamana bağlı kütle kaybının arttığını göstermektedir. İlk 4 günlük süreçte membran 0'dan kütle kaybı membran 1'e göre daha hızlı olmuştur. 6. gün her iki membranda toplam kütle kaybının (~%20) benzer olduğu görülmektedir. Yağlı membranda 6-12 günleri arasında hızlı bir kütle kaybı gerçekleşmiştir. 14. günün sonunda membran 0 ve membran 1'deki toplam kütle kayıpları sırasıyla yaklaşık olarak % 26 ve % 32 şeklindedir. 14 gün süren bu çalışma polimerik membranların yapısına katılan PCL'nin degradasyonu için yeterli bir süre değildir. Membran 1'deki toplam kütle kaybı içerdiği PEG polimeri ile kapsüllenmiş *H. perforatum* yağının PEG'in

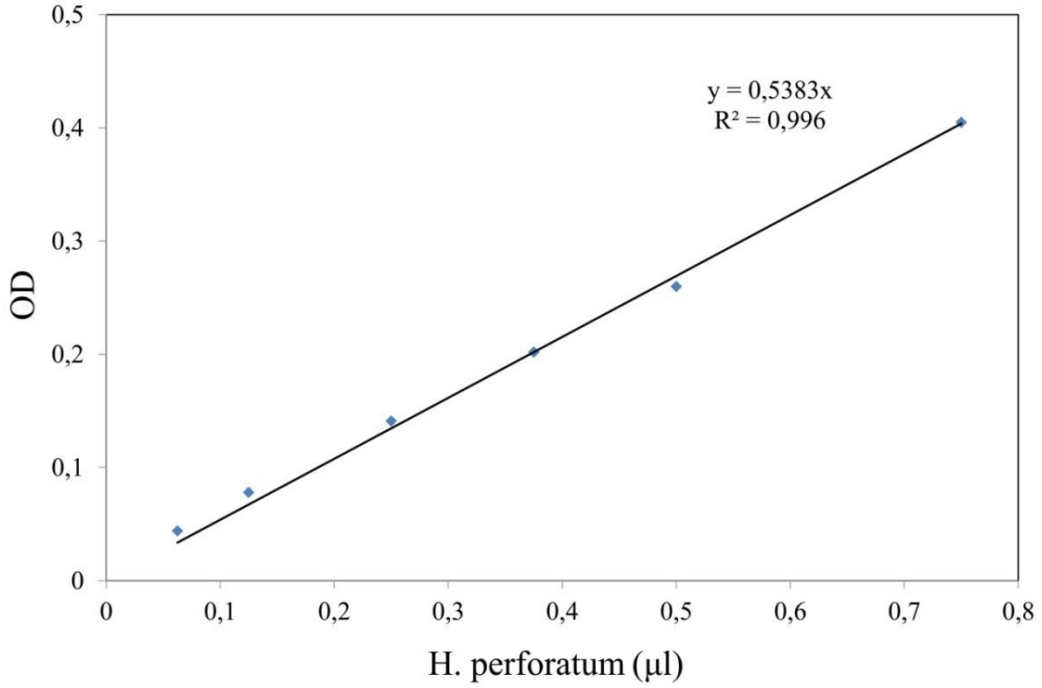
çözünmesi ile birlikte salımına bağlı olarak beklenen şekilde membran 0'a göre daha fazla olmuştur. Membranlar beklediği şekilde zamanla kütle kaybetmiştir.



Şekil 4.6. Membranların (0 ve 1) zamana bağlı kütle kayıpları

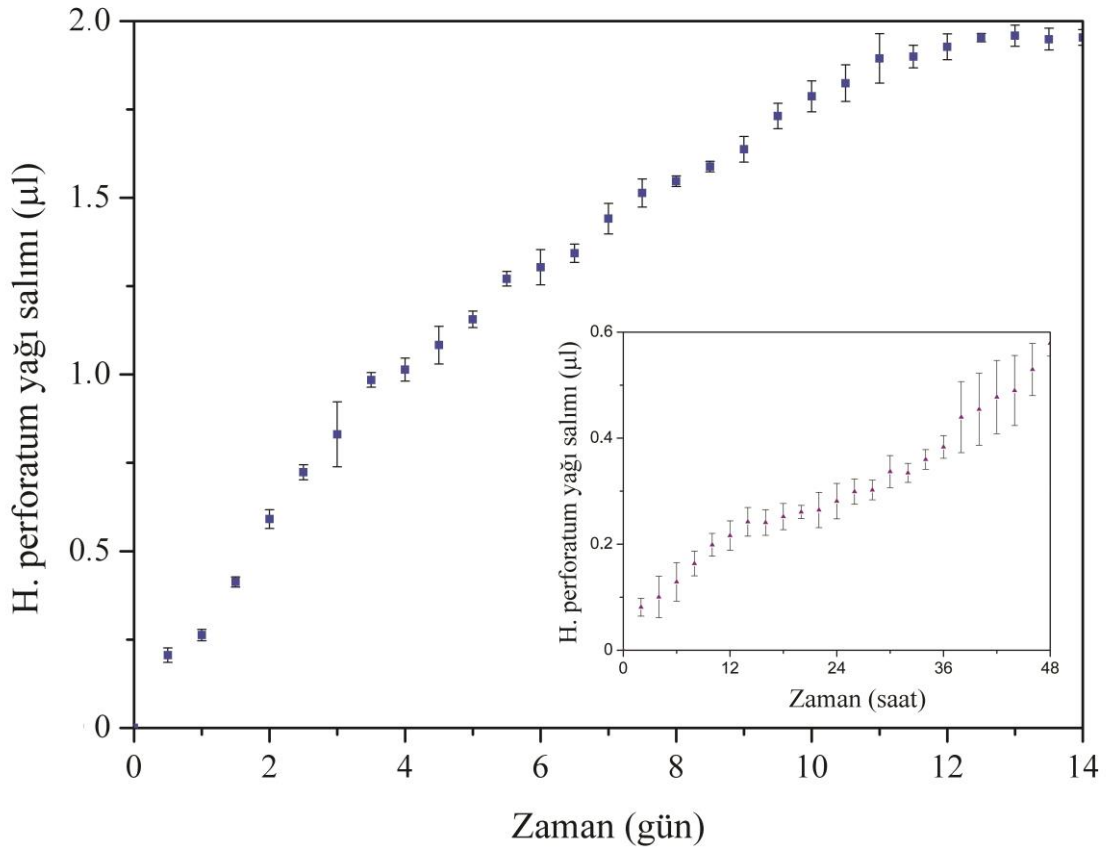
4.1.8. *H. perforatum* Yağının Membranlardan Kontrollü Salımı

H. perforatum yağı içeren polimerik membranlardan yağın salımı, içerisinde hapsediği PEG polimerinin sulu ortamda çözünmesine bağlı olarak gerçekleşmiştir. Böylece PEG çözünmesi ile yağ salımı kontrol edilmiştir. Polimerik membranlardan yağın salım profili UV-vis spektrofotometre ölçümleri (225 nm) alınarak belirlenmiştir. *H. perforatum* yağının *in vitro* salım profilinin tayininde Şekil 4.7'de verilen kalibrasyon grafiğinden faydalanılmıştır. Kalibrasyon grafiği farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bilinen miktarlarda *H. perforatum* yağı içeren PBS çözeltilerinin UV-Vis spektrofotometre ölçümleri (225 nm) alınarak optik density (OD) değerlerine karşılık gelen yağ miktarları ile oluşturulmuştur. Böylece grafiğin doğrusal olduğu kabul edilerek doğru grafiğinin denkleminde ölçülen OD değerlerine karşılık gelen yağ miktarları hesaplanabilmiştir.



Şekil 4.7. *H. perforatum* yağı içeren PBS çözeltilerinin optik density (OD) değerlerine karşılık gelen yağ miktarları (Kalibrasyon Grafiği)

İlk iki günlük süreçte 2 saatte bir, sonraki günlerde ise 12 saatte bir alınan örneklerin spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır. Alınan verilerle oluşturulan grafikler (Şekil 4.8) *H. perforatum* yağının zamana bağlı sürekli ve kontrollü salımını doğrulamaktadır. Membranlar ilk iki gün hızlı ve doğrusal bir salım gösterirken, uzun süreli salım grafiğinde salım hızının özellikle 3. günden sonra bir miktar yavaşladığı görülmektedir. Salım, hızı bir miktar yavaşlayarak devam etse de doğrusal sayılabilecek bir profil gösterirken 11. günden sonra salım hızı PEG kapsüllerin büyük bir kısmının çözünmüş olmasına bağlı olarak belirgin şekilde azalmıştır. Genel olarak 14 gün boyunca membrandan ortama devamlı ve kontrollü yağ salımının gerçekleştiği söylenebilir.



Şekil 4.8. *H. perforatum* yağının membran l'den zamana bağlı salımı (14 & 2 gün)

4.1.9. Elastikiyet (Çekme-Uzama Testleri)

Vücudumuz üç boyutlu bir yapıya sahip olduğundan dolayı özellikle geniş yara yüzeylerinde yara örtülerinin yara bölgesini kolaylıkla sarabilmesi, kırılğan bir yapıya sahip olmaması gerekir. Bu nedenle yara örtülerinin belirli bir elastikiyete sahip olması önemlidir. Malzemelerin elastisitesi, çekmeye karşı birim uzamanın sonucu olarak ortaya çıkmakta ve malzemenin geri dönmeyecek şekilde deformasyona uğradığı ana kadar ifade edilmektedir (Zahedi ve ark., 2009).

Çalışma dahilinde ISO 13934-1 standartlarına (EN ISO 134934-1: 2013) uygun çekme-uzama testleri gerçekleştirilerek membranların (0, 1, 2, 3) 1,5 ile 3,5 N arasında değişen çekme kuvvetlerine (stress) karşı % uzama miktarları (strain), kopma uzaması (elongation at break) ve kopma dayanıklılığı (ultimate tensile stress) ölçülerek membranların esneklik sınırı (yield point) ve elastisite modülü (young's modulus) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. PEG-PCL membranların mekanik test sonuçları

Membranlar	Kopma Uzaması (mm)	Maksimum Çekme Gerilmesi (N/mm ²)	Yield Point ($\sigma: F/A$) (N/mm ²)	Young Modülü ($E: \sigma/\epsilon$) (MPa)
0	494,13	0,23	0,09	0,9
1	413,34	0,38	0,17	2,22
2	396,71	0,29	0,13	3,17
3	402,98	0,21	0,15	1,52

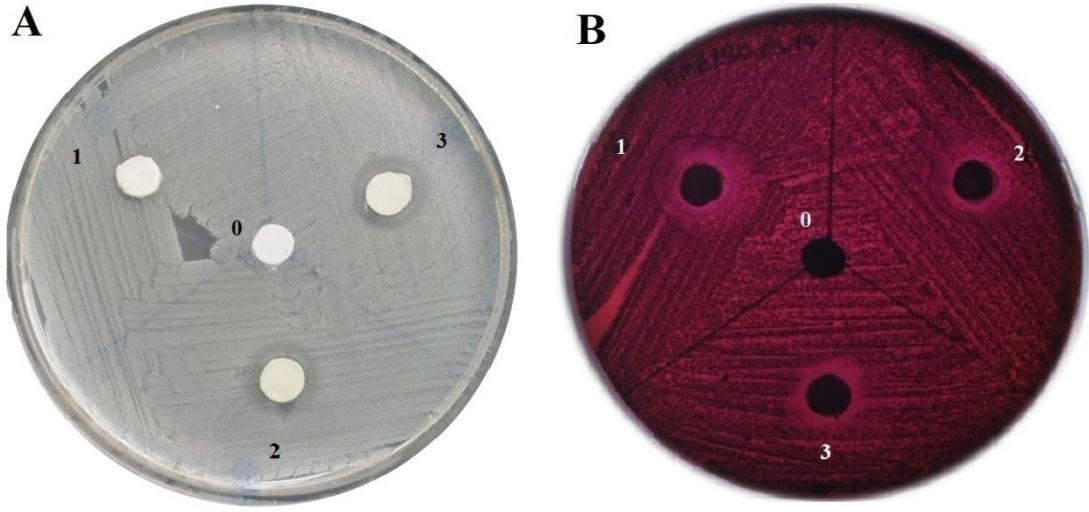
Membranların Young modülü (elastisite modülü) değerleri 0,9 ile 3,17 MPa arasında değişmektedir (Çizelge 4.4). *H. perforatum* yağı içeren membran 1 ve membran 2 için elastisite modülü değerleri sırasıyla 2,22 MPa ve 3,17 MPa'dır ve membran 0'a göre artan yağ miktarı ile artmıştır. Membran 3 yine membran 0'a göre daha yüksek elastisite değerine sahip olmakla birlikte membran 1 ve 2'ye göre elastisite modülü değeri azalmıştır. Membran 3'ün elastisite değerinin (1,51 MPa) membran 1 ve 2'ye kıyasla daha düşük olmasının sebebi membranlara *H. perforatum* yağının kristalin özellikteki PEG kapsüller içerisinde ilave edilmesinin membran sertliğini etkilemesi olabilir. Genel olarak membranlar yara bölgesini sarabilecek yeterli elastikiyete sahiptir. Membranların farklı çalışmalarda elde edilen değerlerle (Johnson vd., 2009; Augustine vd., 2015) ve insan derisi (Daldy ve Odland, 1979) ile karşılaştırılabilir elastikiyete sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.9 Bükülebilir esnek polimerik membran şeritler

4.1.10. Antibakteriyel Aktivite (Disk Difüzyon Testi)

Membranlardan (0, 1, 2, 3) alınan 0,75 cm çaplı dairesel kesitlerin gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram-negatif *Escherichia coli* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. *S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivite görüntülerinde (Şekil 4.10) yağsız membrana (membran 0) ait inhibisyon zonu gözlemlenmemiştir. Yağ içermeyen membranın *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkinliği yoktur. *H. perforatum* yağı içeren membranların (membran 1, 2, 3) etrafında ise inhibisyon zonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Ölçülen inhibisyon zon çapları (mm) Çizelge 4.5'de verilmiştir. Yapılarındaki artan yağ miktarına bağlı olmaksızın yağlı membranlar *E. coli* üzerinde benzer antibakteriyel etkinlik göstermişlerdir. Ancak yağlı membranlarda artan yağ miktarına bağlı olarak *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel aktivite belirgin şekilde artmıştır. İki organizma arasında farklı zonlar gözlemlenmesinin sebebi *S. aureus*'un gram-pozitif, *E. coli*'nin ise gram-negatif bakteriler olmasından kaynaklanmaktadır. Hücre zarı etrafında kalın bir hücre duvarına sahip olan *S. aureus*'un hücre duvarı yağın nüfuz etmesi için bir difüzyon bariyeri oluşturmaktadır. Yağın teması dolayısı ile antibakteriyel etkinlik göstermesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle membranlar yağ içeriği arttıkça *S. aureus* üzerinde daha fazla antibakteriyel etkinlik gösterebilmişlerdir. PEG polimeri ile kapsüllenerek polimerik membran yapısına hapsedilmiş olan yağın membrandan kontrollü salımı hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Böylece membran yapısına antibakteriyel etkinliği bilinen yağın (Saddiçe ve ark., 2010) katılması ile birlikte normalde antibakteriyel etkinlik göstermeyen polimerik membranlara antibakteriyel özellik kazandırılmıştır.



Şekil 4.10. Membranların (0, 1, 2, 3) (A) *S. aureus* ve (B) *E. coli* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinliği

Çizelge 4.5. Membraların (0, 1, 2, 3) *E. coli* (A) ve *S. aureus* (B) bakterileri üzerindeki inhibisyon zon çapları

Membranlar	İnhibisyon zon çapı (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
0	-	-
1	8,5	12,2
2	12,0	10,3
3	12,9	11,9

4.1.11. Biyoyumluluk (Sitotoksisite Testi /WST-1)

Membranların (0, 1, 2, 3) ve ayrıca membranların içerdiği *H. perforatum* yağının (1; 2 ve 3 µl) biyoyumluluğu direkt sistotoksisite yöntemi olan WST-1 (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazoliyum)-1,3-benzen disülfonat) testi ile ISO 10993-5 (2009) standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarının % hücre canlılığı değerleri ayrıca % apoptoz/nekroz değerleri ile karşılaştırmalı olarak çizelge 4.6 ve şekil 4.11'da verilmiştir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında membran 0, % hücre

canlılığını çok az azaltmıştır ancak toksik değildir. % hücre canlılığı membran 1'de artış gösterirken, membran 2 ve 3'te bu artış daha fazladır. Buna bağlı olarak membran yapısındaki yağ içeriğinin artmasının % hücre canlılığını artırdığı söylenebilir. Çalışmada ayrıca belirli miktarlardaki (1, 2, 3 µl) *H. perforatum* yağının da aynı koşullarda sitotoksitesisi incelenmiş ve kontrol grubuna kıyasla % hücre canlılığını artırdığı görülmüştür. *H. perforatum* yağı ve yağ içeren membranlar (1, 2, 3) hücrelerin metabolik aktivitesini artırarak % hücre canlılığını artırmışlardır. Dolayısı ile yağın ve membranların biyoyumlu olduğunu söylemek mümkündür.

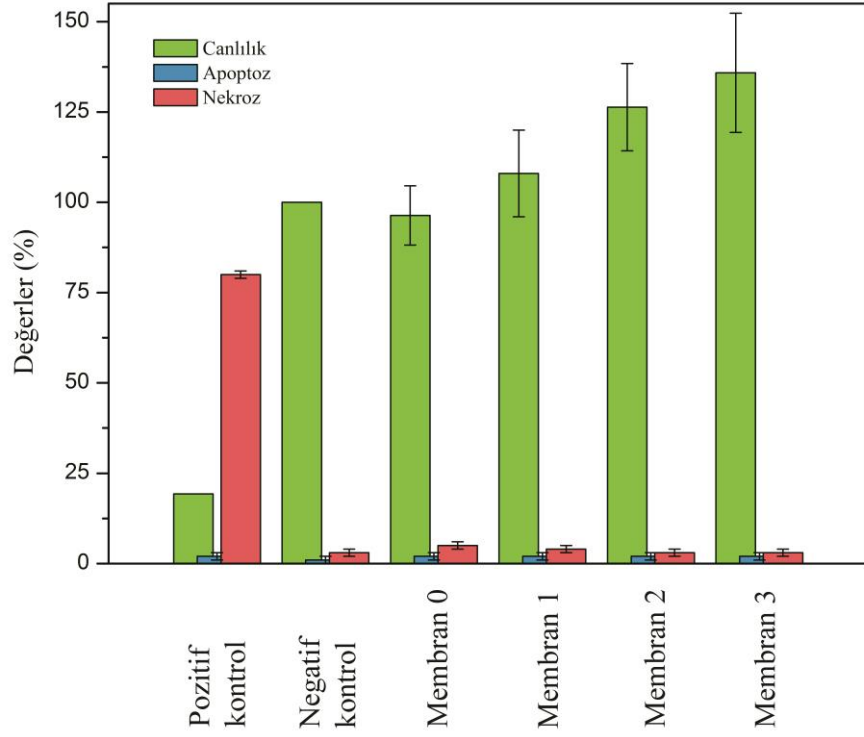
4.1.12. Membranların Apoptotik & Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada membranların (0, 1, 2, 3) L929 fibroblast hücreleri ile doğrudan muamele edildiğinde ne oranda apoptoz ve nekroza uğradıklarının tespit edilebilmesi için Hoechst/PI ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen % apoptoz ve % nekroz değerleri % canlılık değerleri ile birlikte çizelge 4.6 ve şekil 4.11'de ve deneye ilişkin görseller şekil 4.12 ve şekil 4.13'de sunulmuştur. Membranlar ile etkileştirilen hücrelerin apoptoz ve nekroz oranlarının belirlenebilmesi için pozitif (DMSO ile muamele edilen) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları da değerlendirilmiştir.

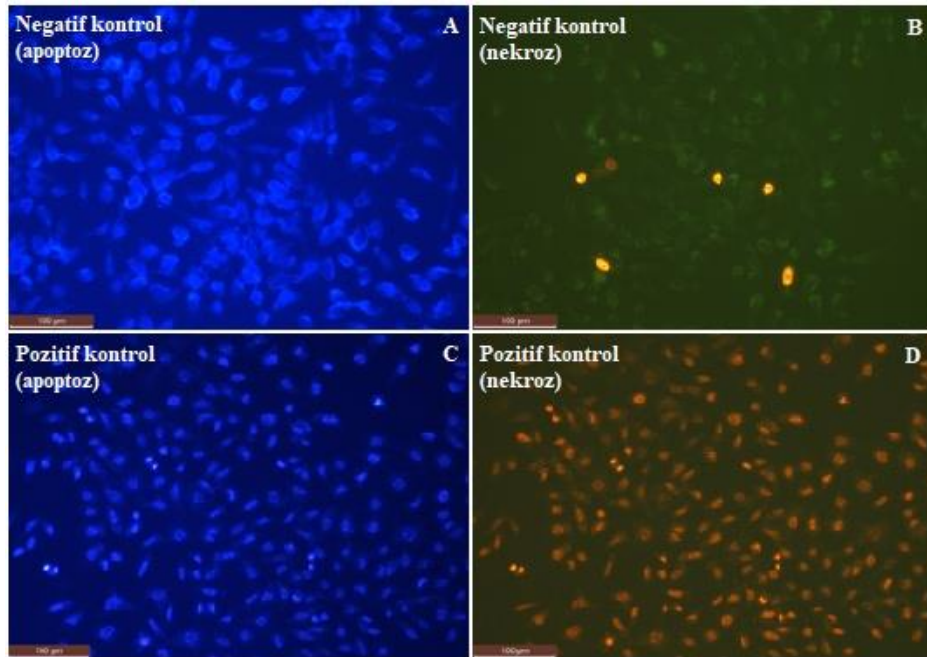
Çalışmada elde edilen ve Şekil 4.12'de verilen mikroskop görüntülerinde pozitif ve negatif kontrol grupları sırasıyla nekrotik ve canlı hücreleri temsil etmektedir. Şekil 4.13'de ise membran 0, 1, 2 ve 3 ile muamele edilmiş L929 fibroblast hücrelerinin ikili boyanmaları sonucunda elde edilen görüntüleri verilmiştir. Şekillerin sol sütununda bulunan Hoechst ile mavi renkli boyanmış hücreler büyük oranda canlılığını koruyan hücreleri, sağ sütundaki PI ile kırmızı boyanan hücreler ise canlılığını yitirmiş nekrotik hücreleri göstermektedir. Özellikle apoptotik hücreleri gösteren görsellerdeki parlaklığın çok arttığı bölgeler nekrotik hücreleri göstermekte olup karşılığındaki görselde kırmızı boyanmış olduğu görülmektedir. Membranların (0, 1, 2, 3) apoptotik ve nekrotik indeksi sırasıyla 2 ± 1 ve $3-5\pm 1$ 'dir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında membranların hücreler üzerinde belirgin bir apoptotik ve nekrotik etkisinin olmadığı hatta *H. perforatum* yağı içeren membranların (1, 2, 3) artan yağ içeriği ile birlikte hücre canlılığını artırdığı söylenebilir (Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12).

Çizelge 4.6. % hücre canlılığı (WST-1 test sonuçları) ve % apoptoz/nekroz (Hoechst/PI ikili boyama) değerleri

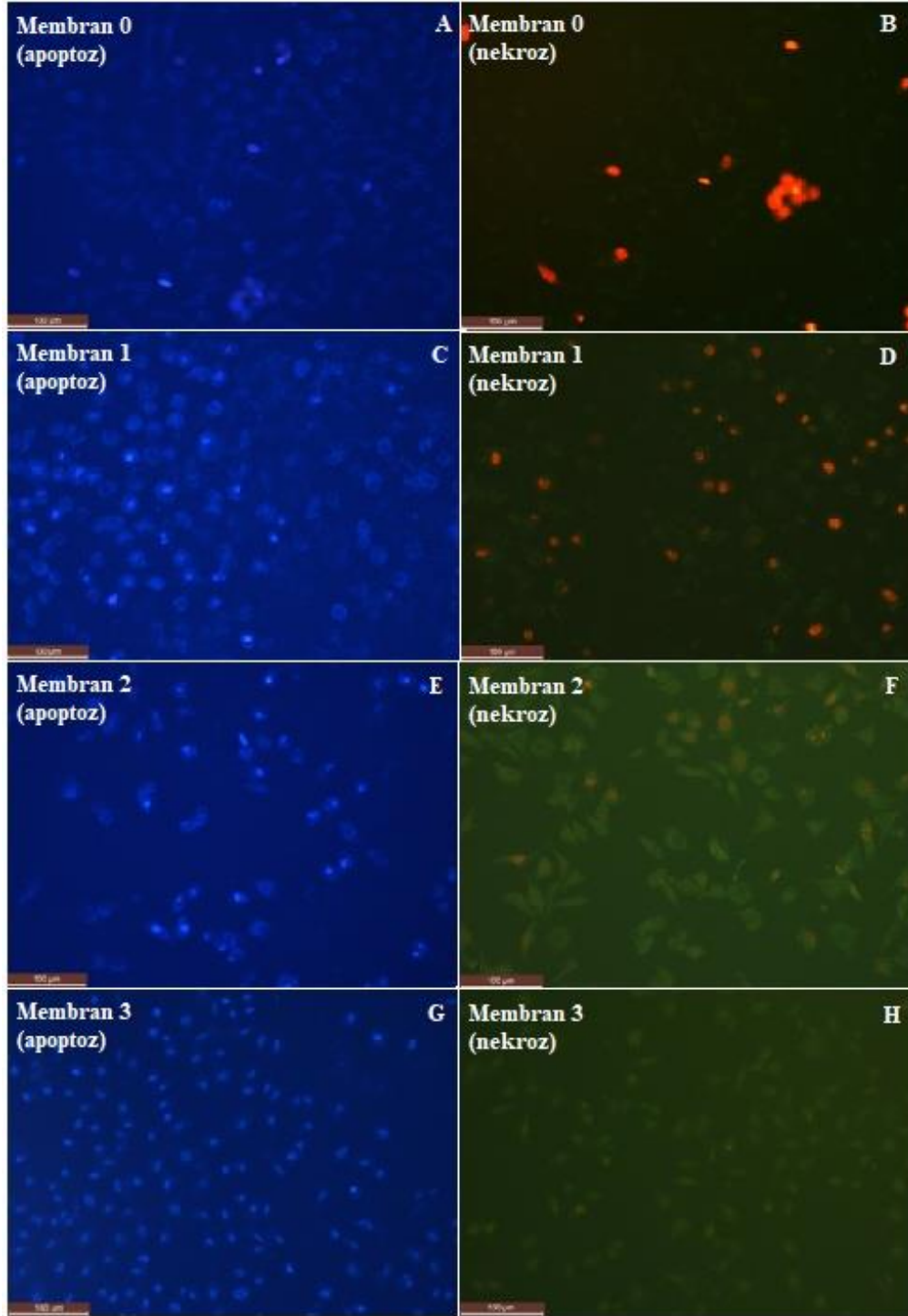
Deney Grupları	Hücre Canlılığı %	Apoptoz %	Nekroz %
Sadece Hücreler (Negatif Kontrol)	100	1±1	3±1
DMSO (Pozitif Kontrol)	19,26	2±1	80±1
Membran 0	96,35±8,2	2±1	5±1
Membran 1	108,02±12	2±1	4±1
Membran 2	126,34±12,07	2±1	3±1
Membran 3	135,85±16,48	2±1	3±1
<i>H. perforatum</i> yağı (1 µl)	143,07±6,95	-	-
<i>H. perforatum</i> yağı (2 µl)	132,89±8,7	-	-
<i>H. perforatum</i> yağı (3 µl)	117,84±11	-	-



Şekil 4.11. Membranlarla (0, 1, 2, 3) etkileştirilen L929 fare fibroblast hücrelerinin % hücre canlılığı ve % apoptoz /nekroz değerleri.



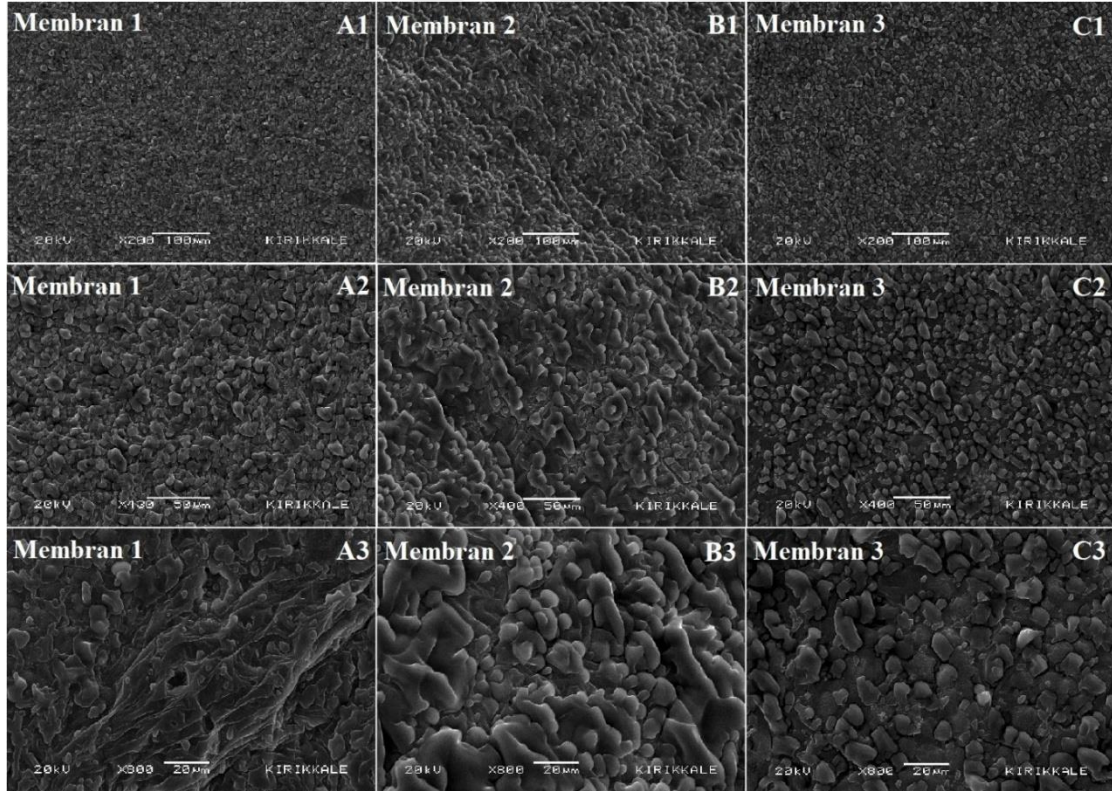
Şekil 4.12. L929 fibroblast hücrelerinin ikili boyanmaları sonrasında apoptoz ve nekroz görüntüleri



Şekil 4.13. Membranlarla etkileştirilen L929 fibroblast hücrelerinin ikili boyanmaları sonrasında apoptoz ve nekroz görüntüleri

4.1.13. Membran Yüzeylerine Hücre Yapışmasının İncelenmesi

Yara yüzeyinden kaldırılırken ikinci bir hasara sebep olmaması için yara örtülerinin yaraya yapışması istenmez. Membranların (1, 2, 3) yara bölgesi ile temas edecek alt tabakası L929 fibroblast hücreleri ile 2 gün inkübe edilerek yüzeyde hücre tutunması (adezyon) inkübasyon sonrası membran yüzeylerinden SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.14). İnkübasyon sonrası membran yüzeyindeki PEG kapsüller/fiberler besiyeri ortamında çözündüğünden dolayı yüzey görüntüsü Şekil 4.2 ile karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir. Değişen büyütmelerde çekilen SEM görüntüleri incelendiğinde hiçbir membran yüzeyinde hücre tutunması (adezyon) ve çoğalmasına (proliferasyon) rastlanmamıştır (Şekil 4.14). Yüzeyde hücre tutunmasının gerçekleşmeme sebebi PEG'in çözünmesi ve/veya hidrofobik karakterdeki yağın salınması olabilir. Membranların yaraya yapışma riski taşımadığı düşünülmektedir.



Şekil 4.14. L929 fare fibroblast hücreleri ile etkileştirilmiş yağlı membranlara (1, 2, 3) ait inkübasyon (2 gün) sonrası alınan farklı çözünürlüklerdeki 200X (A1, B1, C1), 400X (A2, B2, C2), 800X (A3, B3, C3) SEM görüntüleri.

Yara bölgesinde enfeksiyon vb. durumlar gelişmediğinde derecesi ve büyüklüğüne bağlı olarak yanık yaraları ortalama iki haftalık bir süreçte kendiliğinden belirli oranda

kapanır. Bu nedenle mevcut yanık yara örtü materyallerinin uzun süre yara yüzeyinde tutulması gerekmemekte, belirli aralıklarda yara pansumanı yapılarak yenilenmesi önerilmektedir.

Tez çalışması kapsamında üretilen PEG-PCL membranların yapısındaki biyouyumlu biyobozunur polimerlerin bozunma hızları farklıdır. Yara eksudası ile temas eden PEG fiber ve kapsüller hızla çözünür ve böylece yara bölgesine PEG kapsüller içerisindeki yağın salımı mümkün olur. Ancak PCL fiberlerin biyobozunması çok daha uzun sürer. Bu nedenle belirli bir süre sonunda PEG yapısının büyük bir kısmı bozunmuş olan membranlar PCL fiber yapının aynı hızla bozunmaması nedeniyle membran bütünlüğü korunmuş olur. Bu nedenle tamamen bozunmayan membranların uygulama sonrasında yara yüzeyinden kaldırılarak alınması gerekir. Mevcut tedavi uygulamalarında kullanılan membranlara benzer şekilde yara yüzeyinden alınması gereken PEG-PCL membranların bu esnada yaraya yapışmış olması yara bölgesinde ikincil bir hasara sebep olabilir. O nedenle membran yüzeylerine hücre yapışması istenmemektedir. Membran yüzeylerine hücre yapışmasının gözlemlenmemiş olması yara bölgesine salınan *H. perforatum* yağının hücre rejenerasyonunu destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırmasına engel olmadığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla teyit edilmiştir.

4.2. *In vivo* Uygulamalar ve Histolojik/İmmunohistokimyasal Çalışmalar

Üretilen yara örtü materyalleri (membran 0 ve 1) dişi Wistar Albino sıçanların sırt bölgesinde oluşturulan dairesel yanık defektlerine 16. gün boyunca uygulanmış ve yara iyileşmeleri takip edilmiştir. Çalışmanın 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerinde her bir deney grubu için yara durumları değerlendirilmiş, yara bölgesinin fotoğrafları çekilerek yara boyutları ölçülmüştür. 16 günlük iyileşme sürecinin ardından defekt bölgesi bir miktar çevre doku ile birlikte alınmış, fikse edilmiş ve histolojik olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. Hayvan Deneyleri

In vivo çalışmalar kapsamında önceki bölümlerde hazırlanmış olan % 7 (v/v) oranında *H. perforatum* yağı içeren (membran 1) ve yağ içermeyen PEG-PCL membranlar (membran 0), 35 adet dişi Wistar Albino sıçanın sırt bölgesinde oluşturulan dairesel yanık defektlerine 16 gün boyunca uygulanmış ve yara iyileşmeleri takip edilmiştir. Membran 0 ve 1'in uygulandığı deney gruplarının dışında *H. perforatum* yağının (1 µl)

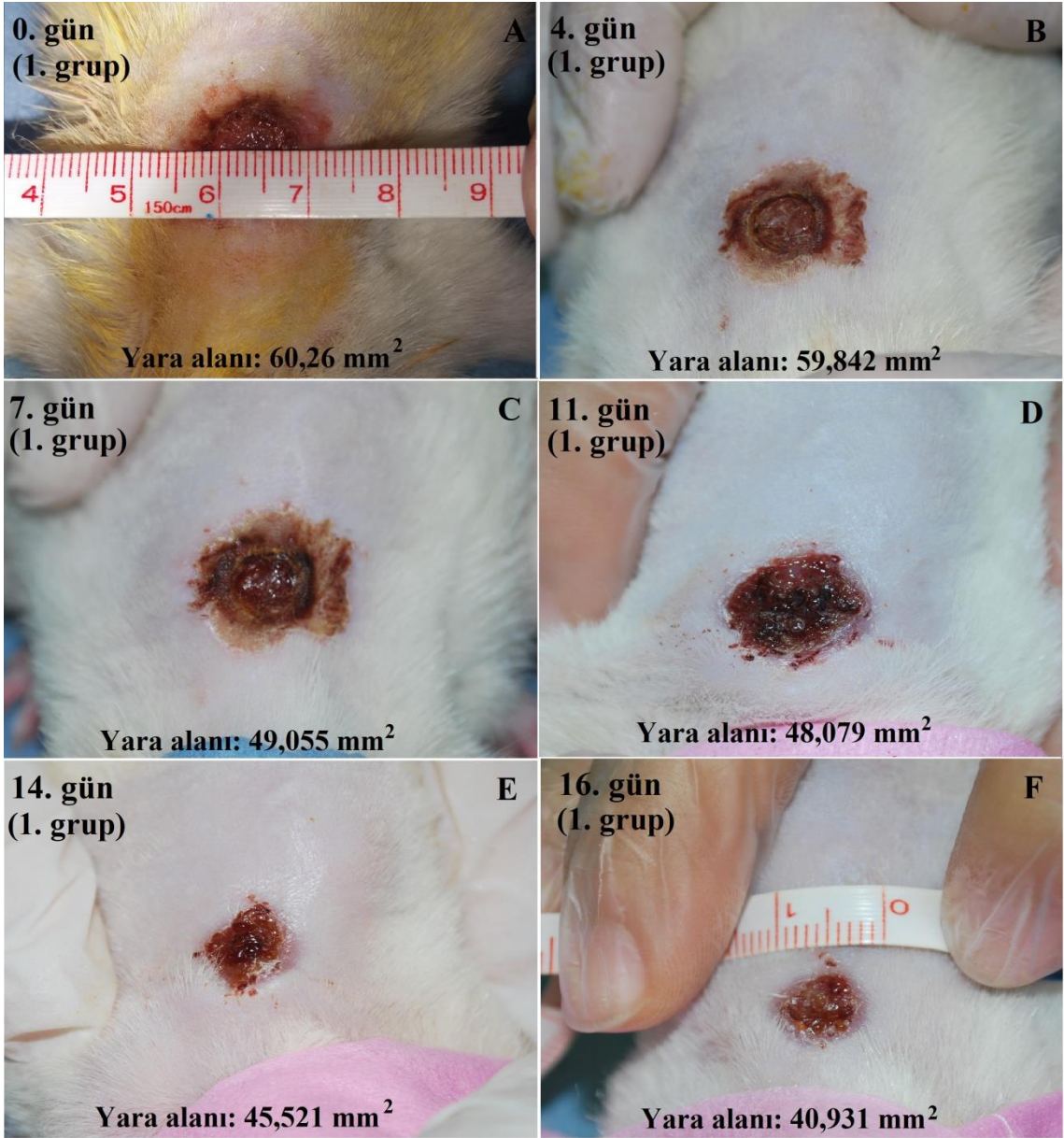
direkt olarak yaraya uygulandığı, yaygın olarak kullanılan gümüş içerikli yara merheminin pozitif kontrol amaçlı uygulandığı ve negatif kontrol amaçlı hiçbir tedavi uygulanmaksızın yaranın kendiliğinden iyileşmeye bırakıldığı 7'şer sıçandan oluşan toplam 5 grupta hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *In vivo* deney grupları

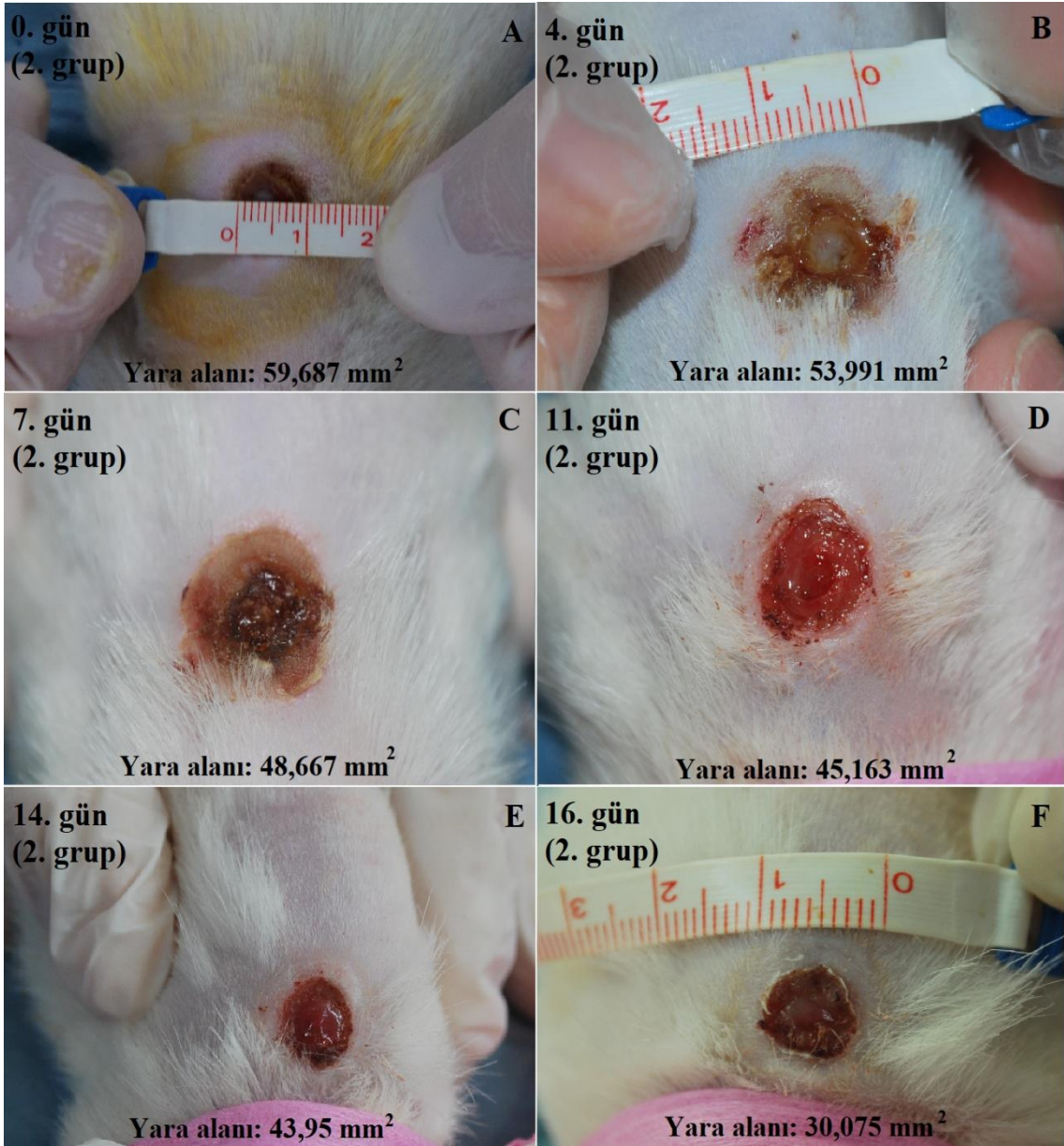
Deney Grubu	Uygulama	Hayvan Sayısı
1	Negatif kontrol	7
2	Pozitif kontrol	7
3	<i>H. perforatum</i> yağı	7
4	Membran 0	7
5	Membran 1	7

Çalışmanın 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerinde her bir deney grubu için yara durumları değerlendirilmiş, yara bölgesinin fotoğrafları çekilerek yara boyutları (mm²) ölçülmüş ve % yara küçülme oranları hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5). Negatif kontrol grubunun (Grup 1) yara durumları iyileşme süreci boyunca genel olarak değerlendirildiğinde kabuk oluşumunun yarayı koruduğu ifade edilebilir. Şekil 4.15'de görüldüğu gibi 16. günde yara alanı oldukça küçülmüştür. 16 günlük iyileşme süreci içerisinde yaranın makroskobik takibinde, deney grupları içerisinde yara iyileşmesi en yavaş gerçekleşen grup yara merhemi uygulanan gruptur (Grup 2) (Şekil 4.16). Yara yüzeyine doğrudan *H. perforatum* yağı uygulanan grup (Grup 3) merhem uygulanan gruptakine benzer iyileşme göstermiş ve her iki grup da negatif kontrol grubuna (Grup 1) göre geride kalmıştır (Şekil 4.17). Ancak bölüm 4.2.2'de verilen histolojik bulgulara göre *H. perforatum* yağı uygulanan grubun (Grup 3) merhem uygulanan (Grup 2) ve uygulama yapılmayan (Grup 1) gruba göre daha iyi epidermis kapanma oranları verdiği görülmüştür. Merhem ve yağın yara bölgesine direkt uygulamasının yaranın hava ile temasını azaltarak oksijenlenmesine engel olduğu düşünölmektedir. Özellikle merhem

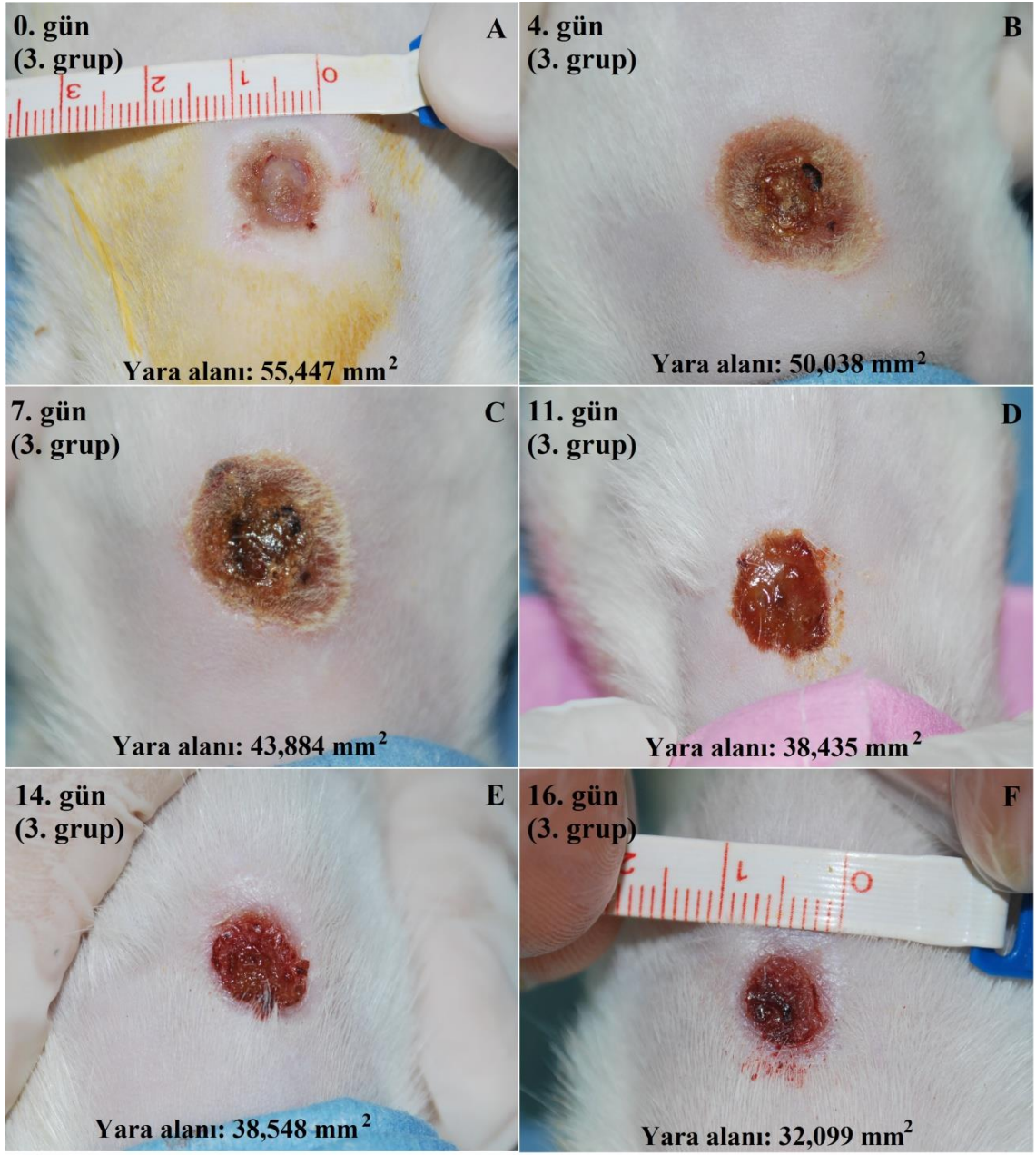
uygulanan grupta yara bölgesinde eksuda yoğunluğunun gözlemlenmesi nedeniyle yine merhemin nem kontrolünü sağlayamadığı düşünülmektedir. Genel olarak yara merhemlerinin ve yara tedavisinde kullanılan iyileştirici yağların yarayı organizmalardan koruyacak antibakteriyel özelliklere ya da yara iyileşmesini destekleyecek etken maddelere sahip olabilmelerinin yanında hava geçirgenliği ve kontrollü nem dengesini sağlama gibi yara iyileşmesinde kritik öneme sahip özellikleri yeterince gösteremediği bilinmektedir. En iyi iyileşme oranları polimerik membran uygulanan deney gruplarında elde edilmiştir. Makroskobik görüntülere göre (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19) her iki grupta da yara kapanması oldukça iyi seviyededir. Ancak yağ içeren membran uygulanan gruptaki (Grup 5) iyileşmenin, yağ içermeyen membran uygulanan gruba (Grup 4) göre daha iyi olduğu söylenebilir. İyileşme seviyeleri arasındaki fark bölüm 4.2.2'de verilen histolojik bulgular ile daha net bir şekilde belirtilmiştir.



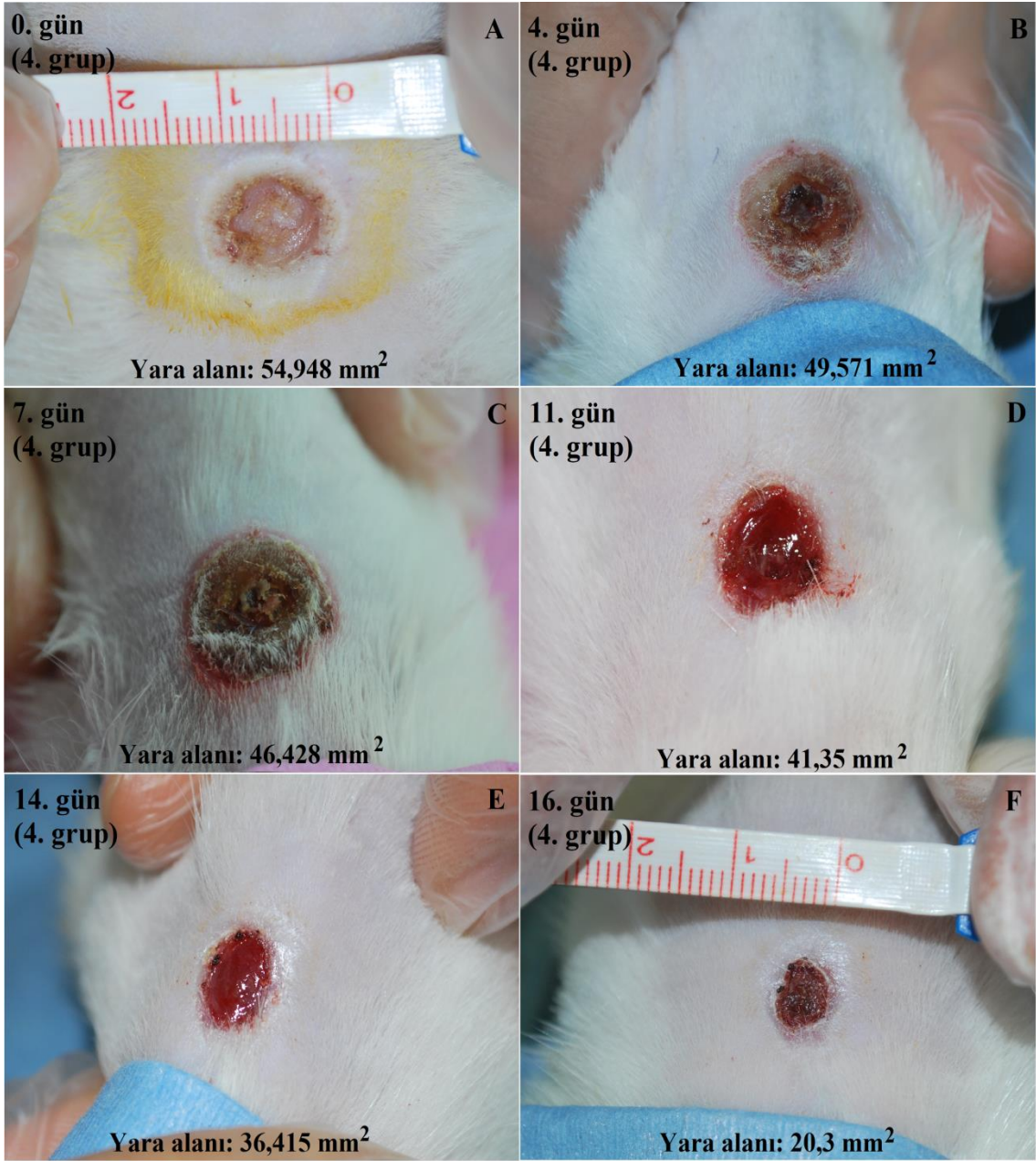
Şekil 4.15. Negatif kontrol grubunu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).



Şekil 4.16. Pozitif kontrol grubunu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).



Şekil 4.17. *H. perforatum* yağının direkt uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).



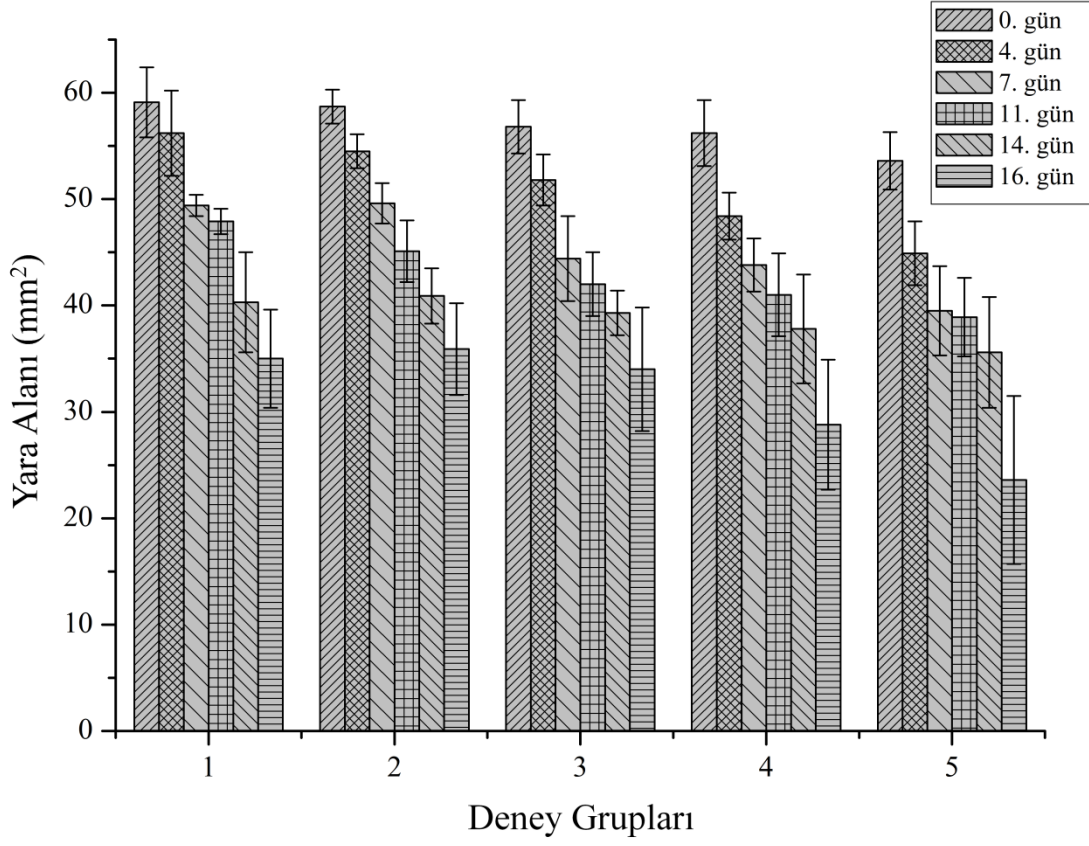
Şekil 4.18. Membran 0'ın uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).



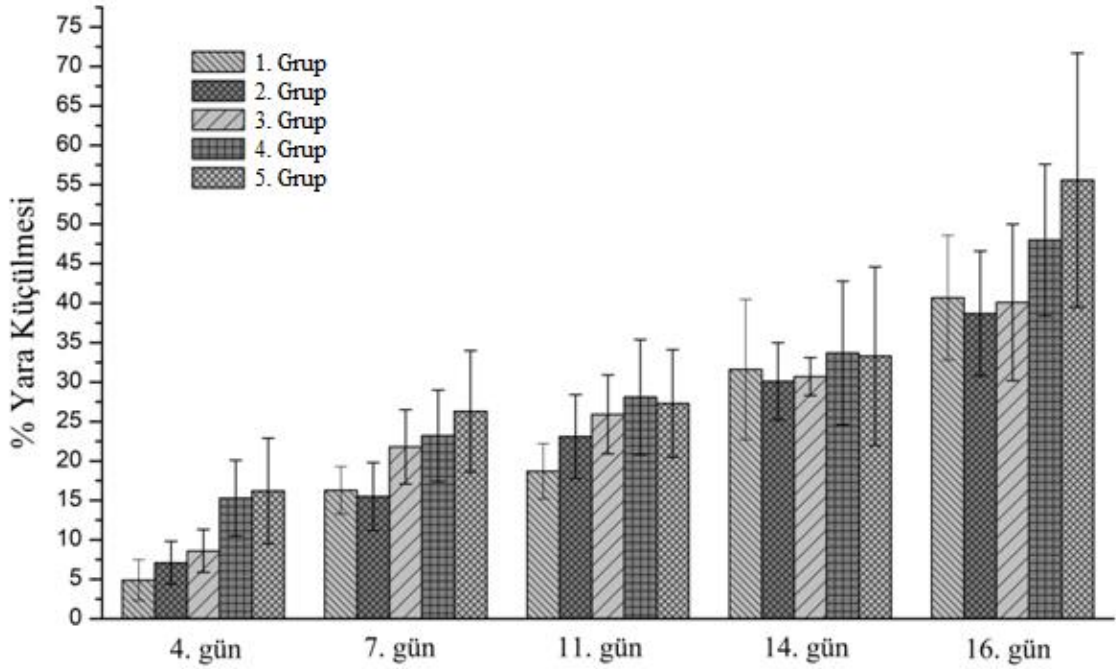
Şekil 4.19. Membran 1'in uygulandığı grubu temsil eden bir deney hayvanında oluşturulan yanık yarasının farklı günlerde (0, 4, 7, 11, 14, 16) alınmış yara görüntüleri (A, B, C, D, E, F).

16 günlük süreçte belirlenen günlerde (1, 4, 7, 11, 14, 16) yara bölgesinin fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarılmış ve Image J 1.48 programı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ile yara alanı (mm²) hesaplanmıştır. Hesaplanan yara alanları (ölçülen yara alanı) yanık modeli oluşturulan ilk gün hesaplanan orjinal yara alanı ile karşılaştırılarak % yara alanı küçülme oranı eşitlik 3.5'e göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Şekil 4.20'de her bir deney grubu için 16 günlük süreçte belirtilen

günlerde ölçülen yara boyutları ve Şekil 4.21’de ortalama yara küçülme oranları verilmiştir.



Şekil 4.20. Deney gruplarının 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerdeki ortalama yara alanı değerleri



Şekil 4.21. Deney gruplarının 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerdeki ortalama % küçülme oranları

Deney gruplarının hesaplanan % küçülme oranları değerlendirildiğinde membran uygulanan gruptaki % küçülme oranlarının özellikle 4. ve 7. günlerde merhem ve yağ uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu dolayısı ile ilk hafta membranların yara iyileşmesini hızlandırdığı söylenebilir. 11. ve 14. günlerde yara küçülmesi tüm gruplarda benzer değerler gösterirken 16. günün sonunda membran uygulanan grupların toplam % yara küçülme oranlarının nispeten daha iyi olduğu görülmektedir. Genel bir değerlendirme yapılırsa en hızlı yara küçülmesi ve 16. günün sonunda en yüksek % yara küçülmesi membran gruplarında görülmekle birlikte membran 1, membran 0'a göre hayvan deneylerinde daha iyi performans göstermiştir. Ayrıca, yaraların makroskobik değerlendirmesinin histokimyasal analiz sonuçları ile de benzerlik gösterdiği ifade edilebilir.

4.2.2. İmmunohistokimyasal/Histolojik Çalışmalar ve İstatistiksel Analizler

4.2.2.1. İmmunohistokimyasal Bulgular

Yanık yaralarının oluşturulmasından 16 gün sonra sıçanların yara iyileşme bölgelerini içeren deri kesitlerinde, kollajen tip 1 ve kollajen tip 3 protein moleküllerinin immünohistokimyasal ekspresyonlarının analizleri sonucunda boyanma şiddetlerine

bağlı skorlama yöntemi (Çizelge 4.8) ile elde edilen verilerin sayısal ifadeleri hem Çizelge 4.9'da hem de grafiksel olarak Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir. Tip 1 kollajen molekül ekspresyonu analiz sonuçları da tip 3 kollajen molekülü ekspresyonları ile benzer şekilde 5. deney grubunda (yağlı membran uygulanan grup) diğer gruplara göre bir miktar artış göstermiş olup istatistiksel olarak diğer gruplar ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.9).

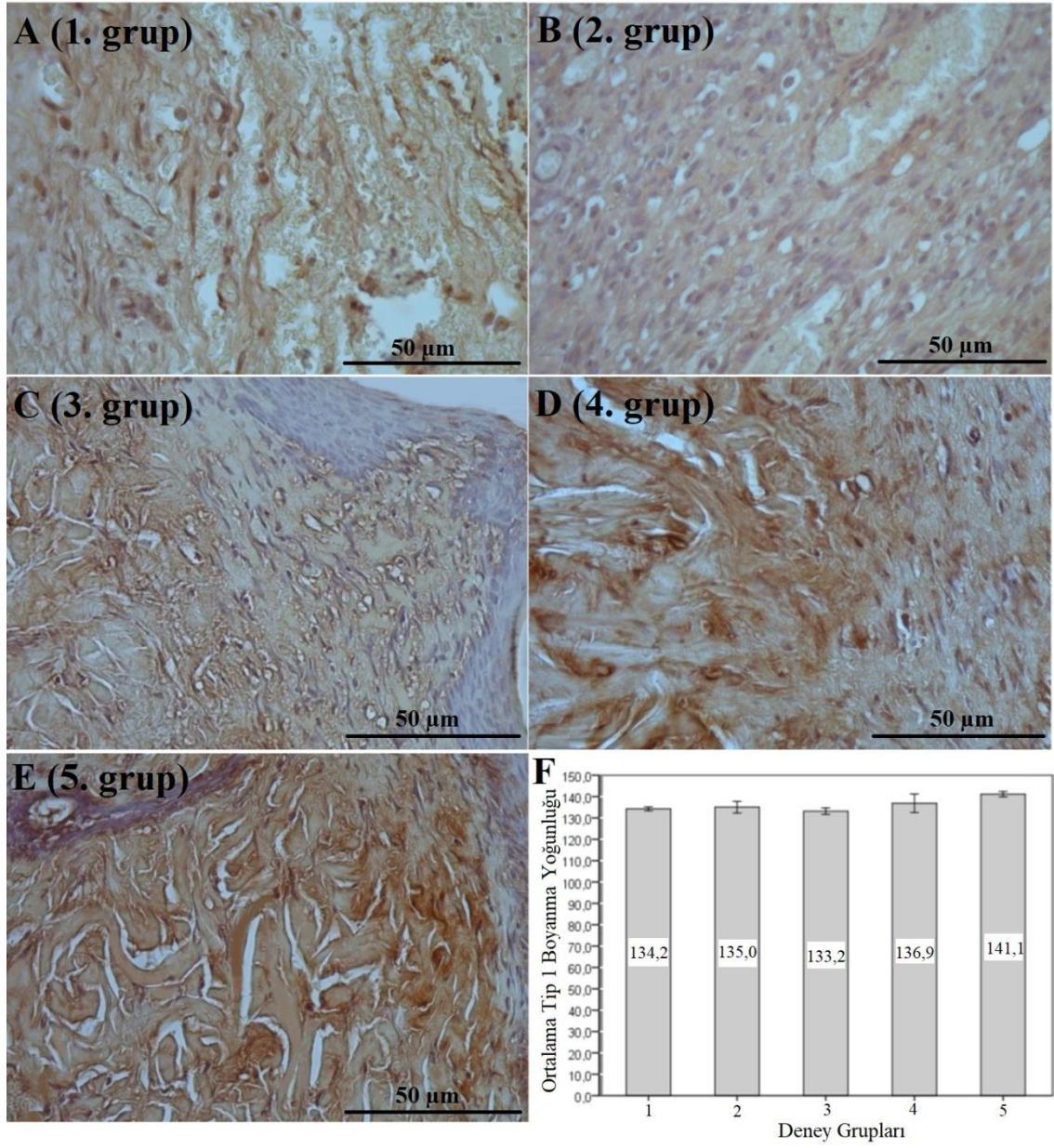
Çizelge 4.8. İmmünohistokimyasal reaktivitenin (boyanma şiddetlerinin) derecelendirilmesi için kullanılan kriterler

Skor	İmmün Reaktivite
0+	Negatif boyanma
1+	Zayıf şiddette boyanma
2+	Orta derece şiddette boyanma
3+	Şiddetli boyanma

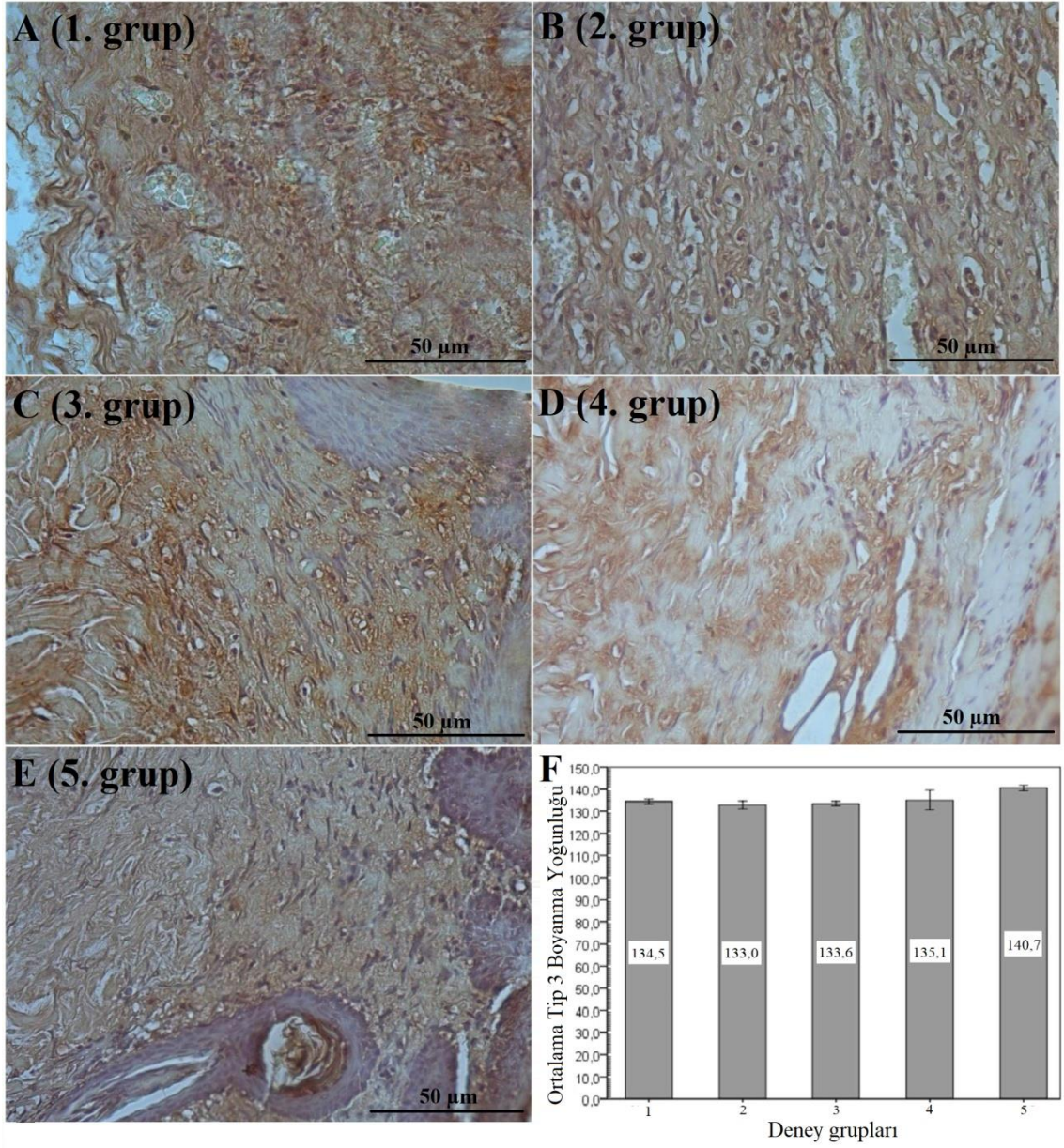
Çizelge 4.9. Tip 1 ve tip 3 kollajen proteinlerin immün boyanma şiddeti skorları

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
Tip-1	134,25±,90 ^a	135,04±2,74 ^a	133,18±1,51 ^a	136,86±4,37 ^a	141,09±1,2 ^a
Tip-3	134,55±1,08 ^b	133,01±1,78 ^b	133,58±1,09 ^b	135,12±4,47 ^b	140,70±1,34 ^b

*Değerler üzerindeki harfler her satırdaki parametre açısından gruplar arasındaki benzerlik (aynı harf) ve farklılıkları (farklı harf) ifade etmektedir.



Şekil 4.22. Her bir gruptan sırasıyla temsili bir adet sıçan derisi kesitine ait tip 1 kollajen boyalı mikroskopik resimler (50 µm); A, B, C, D ve E sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5. deney gruplarını temsil etmektedir, (F) tip 1 kollajen immünohistokimyasal (İHK-DAB) boyanma yoğunlukları H-skorumları grup ortalama değerleri

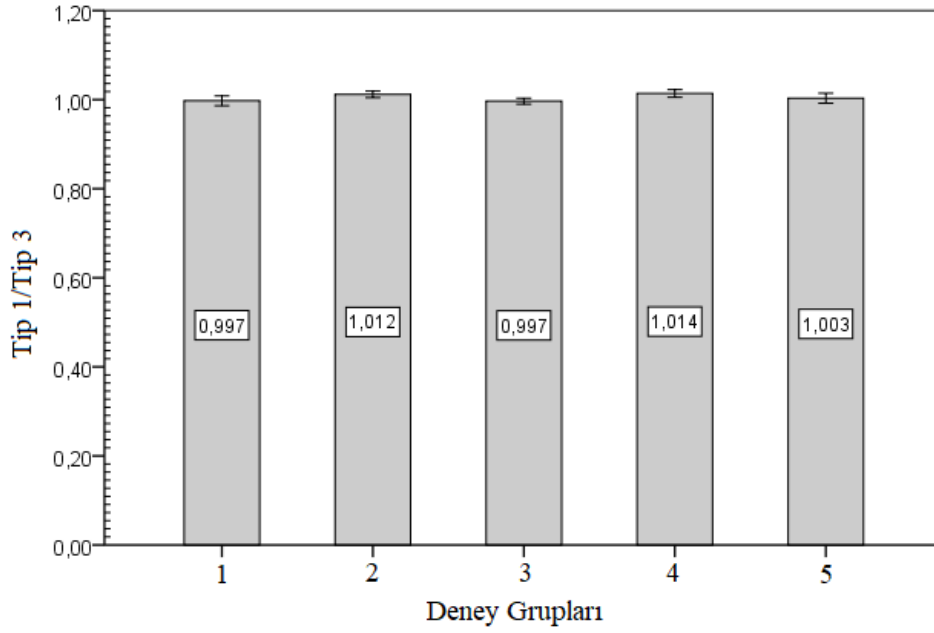


Şekil 4.23. Her bir gruptan sırasıyla temsili bir adet sıçan derisi kesitine ait tip 3 kollajen boyalı mikroskobik resimler (50 µm); A, B, C, D ve E sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5. deney gruplarını temsil etmektedir, (F) tip 3 kollajen immünohistokimyasal (İHK-DAB) boyanma yoğunlukları H-skorları grup ortalama değerleri

Tip 1 ve tip 3 kollajen molekül ekspresyonları oranlarının gruplar arası karşılaştırması Şekil 4.24'te verilmiştir. Bu grafiğe göre tip 1 ve tip 3 kollajen boyanma oranları her bir grup için bire yakın bir değer göstermektedir. Normal deride bu iki kollajen molekülü arasındaki oran 3 ile 4 arasında değişiklik göstermektedir (Broughton ve Rohrich, 2005). Elde edilen veriler dokuların iyileşme sürecinin henüz tamamlanmadığını, yara bölgesinde skarlı dokunun mevcut olduğunu göstermektedir. Yara iyileşme fazlarından

bölüm 2.2.4'te detaylıca bahsedilmiş olan olgunlaşma fazı, yara iyileşme sürecinin son aşaması olup hücre sel bağ dokusunun oluşumunu ve epitelin güçlendirilmesi ile dokunun yeniden biçimlendirilmesini içerir. Bu aşama, yaralanmadan sonraki ikinci ile üçüncü hafta arasında başlayıp birkaç aydan yaklaşık 1 yıla kadar devam eder. Bu süreçte yara bölgesinde akut olarak gelişen, zayıf ve ince yapılı tip 3 kollajen lifleri zamanla yerini tip 1 kollajen liflere bırakır ve sağlıklı bir iyileşme süreci tamamlandığında tip 1 ve tip 3 kollajen lifleri oranı belirlenir. Doku tamirinin son aşaması olan yara izi dokusu yaralanmanın derecesine bağlı olarak bu aşamada oluşur (Zahedi ve ark., 2009; Mutlu, 2014; Doğan, 2012).

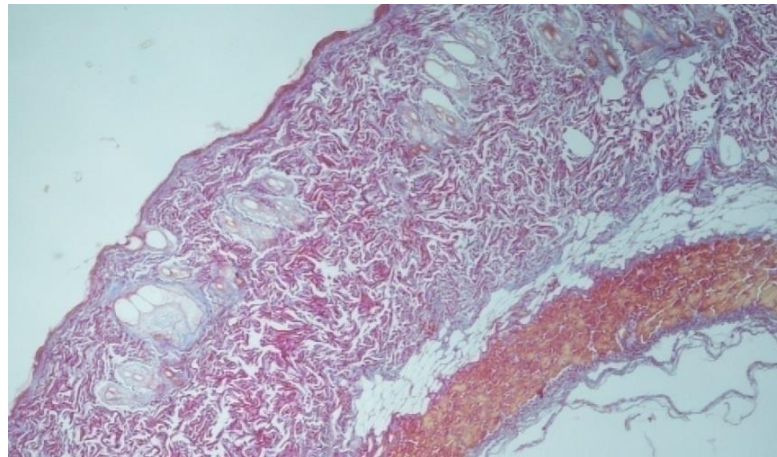
Yapılan çalışmada ikinci derece derin yanık yarası modeli kullanılmıştır. Normalde ikinci derece derin yanık yaraları iki haftalık sürede eğer yarada enfeksiyon vb. olmaz ise kendiliğinden kapanır ancak uzun vadede yara izi bırakır. Yapılan çalışmalar iki haftalık süreçte membranların yara bölgesini koruma, yara iyileşmesini destekleme performanslarını uygulama yapılmayan gruba kıyasla değerlendirmektedir. İki haftalık süreçte henüz skar doku oluşumunun başladığı uzun süren olgunlaşma süreci başlamamıştır. Membranların skar doku oluşumuna etkilerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için en az 6 ay gibi uzun vadeli çalışmalar yapılması gerekir. Dolayısıyla 16 günlük iyileşme süreci, yara kapanması sonrasındaki skar doku durumu ile ilgili net bir bilgi vermeyip sadece öngöründe bulunulmasını sağlar. Tip 1 ve tip 3 kollajen boyamaları gruplar arasında önemli bir fark ortaya koymamıştır. Ancak bir sonraki bölümde verilen histopatolojik bulgular membran uygulanan gruplardaki (özellikle yağ içeren membran grubu) iyileşmenin diğerlerine oranla çok iyi bir seviyede olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak uzun vadede iyileşme sürecinin daha az yara izi ile tamamlanacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.24. Tip 1 ve tip 3 kollajen immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları H-skorları grup ortalama değer oranları

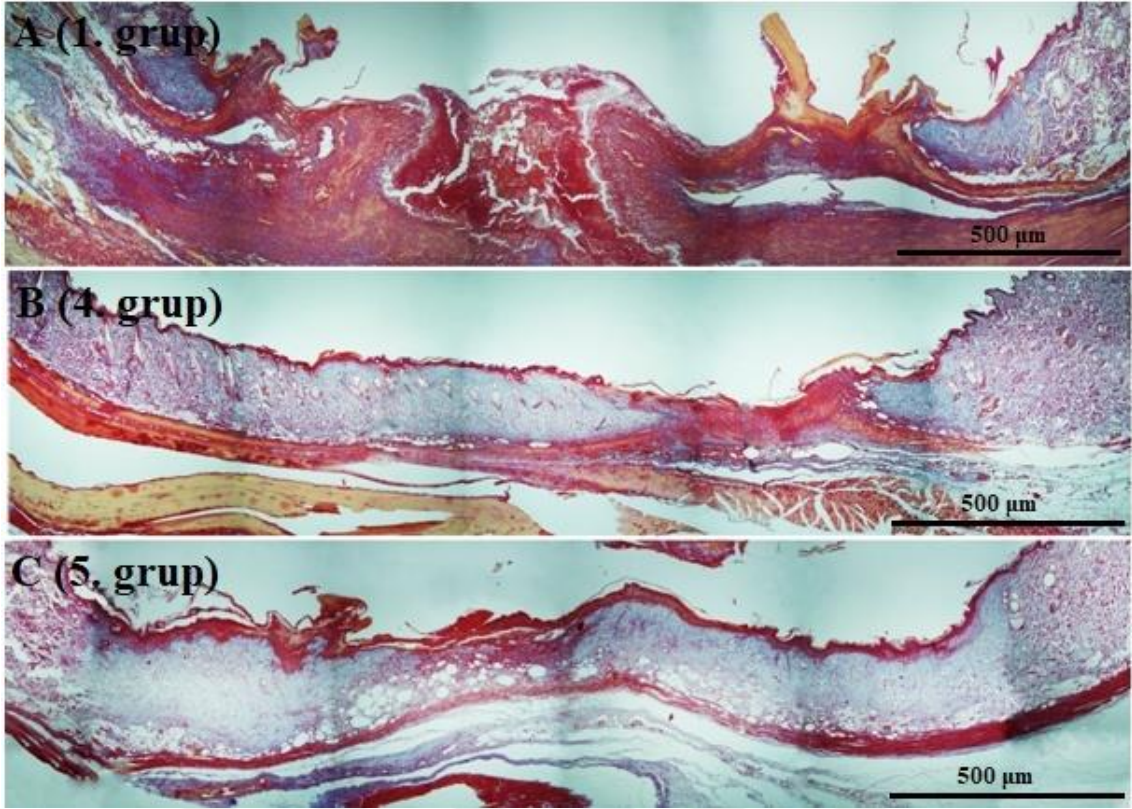
4.2.2.2. Histopatolojik Bulgular

Yanık deri iyileşme bölgesine ait doku kesitlerine materyal metotta belirtilen üçlü boyama ve hematoxilen eozin boyama protokolü uygulanarak dokular histokimyasal olarak boyanmıştır. Boyama işlemleri gerçekleştirilen preparatlar arasında deney grupları dışında yanık oluşturulmamış deri kesiti de (normal deri dokusu) mevcuttur (Şekil 4.25).

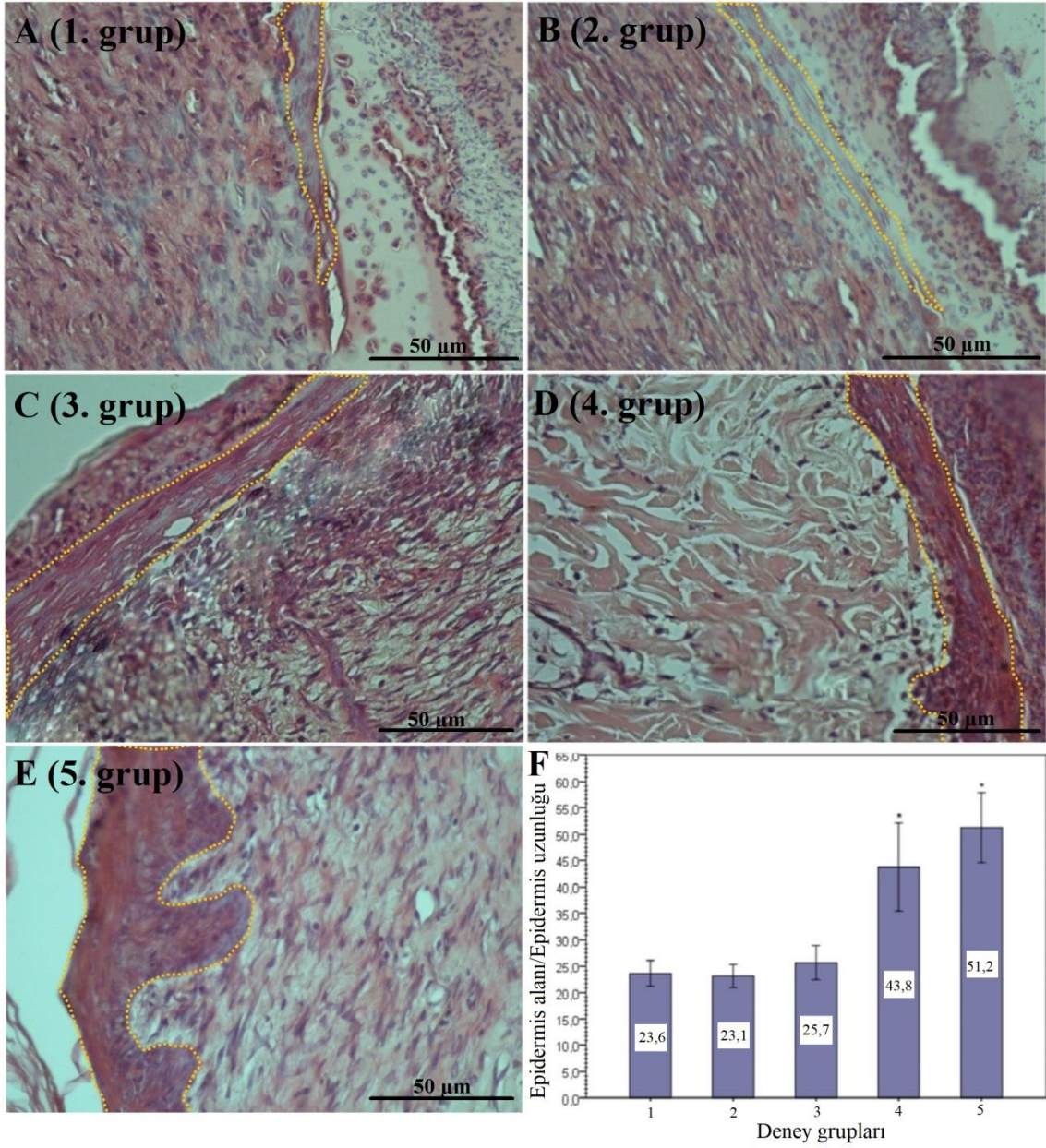


Şekil 4.25. Sıçanlardan alınan intakt deri kesitine ait optik mikroskop görüntüsü (Masson's Trichrome üçlü boyama sonrası)

Derinin epidermis, dermis ve hipodermis gibi ana katmanları ve epiderminin beş farklı hücre katmanı ile derminin retiküler ve papiller dermis alt katmanları ayrıca bu tabakalarda bulunan kıl folikülleri, yağ bezleri gibi deri ekleri de her iki boyama ile belirgin olarak görülmektedir. Ancak yanık yarası oluşturulan deri dokularında gruplara göre farklılık göstermekle birlikte bu yapılar belirgin olarak görülememektedir. Özellikle 1. deney grubundaki sıçanların deri dokuları oldukça hasarlı görünmektedir. Bu bireylere ait preparatlarda genel olarak epidermis dokusunun büyük bir bölümünün deforme olduğu reepitelizasyonun sadece başlangıç kısımları ile sınırlı kaldığı görülmüştür. Dokuda yara bölgesinin çevresinde yara eksudası sonrası oluşan kabuk tabakası dikkat çekmiştir. Epidermis altındaki dermis ve hipodermis katmanları bağ dokularının da hasarlı olduğu görülmüştür. Sağlam doku bölgelerinden yara merkezine doğru yoğun hücre göçleri, doku oluşumunun sağlanması için gerçekleşirken yaranın kapanmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.26 (A)). Yanık merhemi ve *H. perforatum* yağı uygulanan gruplarda ise tüm bu histolojik hasarların bir miktar hafiflemiş oldukları gözlemlenmiştir. Membran uygulaması gerçekleştirilen deney gruplarında yara iyileşmesinin belirgin olduğu ifade edilebilir. Bu gruplarda bulunan bireylerin genelinde yara uçlarının tamamen kaynaşıp kapandığı görülmüştür (Şekil 4.26 (B) ve Şekil 4.26 (C)). Özellikle *H. perforatum* yağı içeren polimerik membran uygulanan grupta (5. deney grubu) bulunan sıçanlara ait derilerin epidermis dokusunda reepitelizasyonun gerçekleşmiş olduğu; vasküleritenin, kıl foliküllerinin ve yağ bezlerinin tekrar oluşmasının yara iyileşme bölgesinde yoğun olarak görülmeye başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26 (C)).



Şekil 4.26. Deney gruplarından temsili üçlü boyama (modifiye massontrikrom (MMT)) örnek resimleri (500 µm)



Şekil 4.27. Her bir deney grubunu temsilen hematoxilen eozin boyalı örnek resimler (Bar: 50 µm); A, B, C, D ve E’de sarı işaretli şeritler içerisinde kalan bölgeler yeni oluşan epidermis tabakasını ifade etmektedir, (F) her bir deney grubu için epidermis alanı/epidermis uzunluğunu veren grafik (*istatistiksel olarak benzerlik)

Hematoxilen eozin boyaması yapılan preparatlarda dermisin retiküler bölümündeki sıkı bağ dokusunda yoğun kalın lif şeklindeki boyanmaların varlığı, kollajen moleküllerin demetler şeklinde bir araya gelerek tip 1 kollejen şeklinde olgunlaşmakta olduklarını göstermektedir (Şekil 4.27). Üçlü boyama ile boyalı preparatlarda ise normal intakt deri ile yara bölgesi karşılaştırıldığında özellikle 5. deney grubunda (Şekil 4.26 (C)), dermis ve hipodermis katmanları bağ dokuları mavi/yeşil tonda tamamen boyanmıştır. İntakt

doku bölgesinde bulunan retiküler dermis bölgesindeki mavi tonlarda boyanmaya ek olarak kırmızı tonlarda boyanma görülmektedir. Ancak yanık iyileşme bölgesindeki yeni oluşmuş/oluşan retiküler dermis bölgesinde kırmızı tonlarda boyanmanın zayıf olduğu görülmüştür. Bu durum yara iyileşme sürecinin tamamlanmamış olduğunu, büyük oranda olgunlaşma fazında gerçekleşen kollajen dönüşümlerinin henüz gerçekleşmediğini göstermektedir.

Şekil 4.27'de görüldüğü gibi vasküler kanamayla yara merkezine doğru yoğun bir inflamatuvar ve tamir hücreleri ile olası rejeneratif kök hücrelerin göçü gerçekleşmiştir. Şekil 4.27 A, B ve C'deki dokularda Şekil 4.27 E ve F'deki dokulara oranla hücre göçü oldukça yoğundur. Şekil 4.27'de D ve E ile temsil edilen 4 ve 5. deney gruplarında artık hücre göçü azalmış, epidermis kapanmaya başlamıştır. Şekil 4.26'daki gruplarda epidermis kapanma oranları daha belirgin olmakla birlikte Şekil 4.27'de sarı şeritlerle sınırlandırılan bölgeler yeni oluşan epidermis tabakalarını göstermektedir. Gruplar epidermis oluşum oranlarına göre karşılaştırıldığında membran uygulanan grupların (özellikle yağ içeren membran grubu) diğer gruplara göre oldukça iyi sonuçlar verdiği Şekil 4.27 (F)'de verilen grafikte de görülmektedir. Reepitelizasyon tamamlandıkça bu gruplarda yara bölgesi üzerindeki kabuk tabakanın incelerek gittikçe kaybolmuş olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 5. deney grubunu temsil eden kesitte epidermis tabakası ile dermis tabakası arasında sıkı bağ sağlayan kıvrımlı yapının da oluştuğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında ikinci derece yanıkların tedavisi amacıyla iyileşme sürecini desteklemesi ve skar doku oluşumunu azaltması hedeflenen yanık yara örtü materyalleri üretilerek, karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veri ışığında, *in vitro/in vivo* performans değerlendirmeleri yapılmıştır.

Yara örtü materyalleri yara çevresi ile temas eden üst tabaka ve yara ile temas eden alt tabakadan oluşan iki tabakalı tasarıma sahiptir. Üst tabaka mekanik dayanımı sağlayan Polikaprolakton (PCL) fiberlerden, alt tabaka ise Polietilen glikol (PEG) ve Polikaprolakton (PCL) fiberlerden oluşmaktadır. Ayrıca alt tabakada PEG fiberler üzerinde *Hypericum perforatum* (kantaron) yağı içeren PEG kapsüller bulunmaktadır. PCL polimeri mekanik olarak dayanıklı olması nedeniyle üst ve alt tabakalarda mekanik dayanımı sağlayarak iyileşme sürecinde membran bütünlüğünü korumaktadır. Suda çözünebilir PEG polimeri alt tabakada yara eksudası ile temas durumunda PEG kapsüllerin çözünmesi neticesinde *H. perforatum* yağının yara bölgesine kontrollü salımını sağlamaktadır. Yara örtü materyalleri elektro-eğirme tekniği ile üretilmiştir. *H. perforatum* yağı ise PEG polimeri ile birlikte elektro-spreylenerek enkapsüle edilmiştir.

Membranların kimyasal yapısı ve polimerlerin çözücü ile etkileşimlerinde kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla elektro-eğirilmiş membranların ve *H. perforatum* yağının FTIR spektrumları (Şekil 4.1) incelendiğinde yağın PEG-PCL membranlara başarılı bir şekilde yüklendiğini, yapıya katılan bileşenlerin üretim esnasında çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişiklik meydana gelmediği görülmüştür.

H. perforatum yağı içeren membran 1'in alt ve üst tabakalarına ait SEM görüntüleri (Şekil 4.2) incelendiğinde örgüsüz gözenekli fibröz membran yapısı ve alt tabakada PCL fiberler ve PEG fiberler üzerinde *H. perforatum* yağı içeren PEG kapsüller açıkça görülmektedir. Membran yüzeylerinin SEM görüntüleri polimerik membranların istenilen tasarımda üretilebildiğini göstermektedir.

Membran yapısına yağ içeren PEG kapsüllerin eklenmesi ile birlikte membran yoğunluğu artmış ve buna bağlı olarak gözeneklilik ve gaz geçirgenliği belirli oranda

azalmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.3). Ancak literatürde belirtilen değerler ile karşılaştırıldığında bu değerlerin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu görülmüştür. Polimerik membranlar temas açısı (Çizelge 4.2) ve ıslanabilirlik (Şekil 4.5) analizleri ile değerlendirilmiş ve membranların dengeli bir hidrofilitate gösterdiği, yara iyileşmesi için yeterli nem tutma kapasitesine sahip olduğu ve bu açıdan yara örtü materyali olarak kullanım için uygun olduğu ifade edilebilir.

Gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda *H. perforatum* yağı içeren PEG-PCL membranlardan (membran 1) sulu ortamda yağ salımının içerisinde hapsediği hidrofilitate karakterdeki PEG polimerinin sıvı ortamda çözünmesi ve kapsül yapısının bozulmasına bağlı olarak gerçekleştiği görülmüştür. Alınan verilere bağlı oluşturulan grafikler (Şekil 4.8) *H. perforatum* yağının membran yapısından zamana bağlı olarak sürekli ve kontrollü salımının gerçekleştiğini göstermiştir. *In vitro* koşullarda 14 günlük süreçte gerçekleştirilen kütle kaybı deneyleri 0 ve 1 numaralı membranların zamana bağlı olarak sırasıyla % 26 ve % 32 oranlarında kütle kaybına (Şekil 4.6) uğradıkları gözlemlenmiştir. Yağ salımının da etkisiyle 1 numaralı membrandaki kütle kaybı daha hızlı ve % kaybedilen toplam kütle daha fazla olmuştur. Kütle kaybı grafiği (Şekil 4.6) ve salım grafiği (Şekil 4.8) değerlendirildiğinde alınan sonuçların birbirini destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Yara örtülerinin yara bölgesini kolaylıkla sarabilmesi, kırılabilir bir yapıya sahip olmaması gerekir. Membranların Young modülü (elastisite modülü) değerleri 0,9 ile 3,17 MPa arasında değişmektedir (Çizelge 4.4). *H. perforatum* yağının kristalin özellikteki PEG kapsülleri ile kapsülendirilerek membran yapısına ilave edilmesi membran sertliğini dolayısı ile elastisite modülü değerlerini etkilemiştir. Genel olarak membranlar yara bölgesini sarabilecek yeterli elastikiyete sahiptir. Membranların farklı çalışmalarda elde edilen değerlerle (Johnson vd., 2009; Augustine vd., 2015) ve insan derisi (Daldy ve Odland, 1979) ile karşılaştırılabilir elastikiyete sahip olduğu söylenebilir.

Yapılan antibakteriyel etkinlik testi değerlendirildiğinde (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.5), Yağ içermeyen membranların *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkinliğinin olmadığı bununla birlikte yağlı membranların (1, 2, 3) antibakteriyel etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Yağlı membranlar *E. coli* üzerinde benzer antibakteriyel etkinlik gösterirken, *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel aktivite membran

yapısındaki yağ içeriği arttıkça artmıştır. PEG polimeri ile kapsülendirilerek polimerik membran yapısına hapsedilmiş olan yağın membrandan kontrollü salımı hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Membran yapısına antibakteriyel etkinliği bilinen yağın (Saddiqe ve ark., 2010) katılması ile birlikte normalde antibakteriyel etkinlik göstermeyen polimerik membranlara antibakteriyel özellik kazandırılmıştır.

Polimerik yara örtü membranlarının hücreler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için L929 fibroblast hücreleri ile *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Membranların ve ayrıca membranların içerdiği *H. perforatum* yağının biyoyumluluğu direkt sistotoksitesite yöntemi olan WST-1 testi ile değerlendirilmiştir. *H. perforatum* yağı ve yağ içeren membranlar pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Dolayısı ile yağın ve membranların biyoyumlu olduğunu söylemek mümkündür. Membranların apoptotik ve nekrotik indeksi sırasıyla 2 ± 1 ve $3-5\pm1$ 'dir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında membranların hücreler üzerinde belirgin bir apoptotik ve nekrotik etkisinin olmadığı hatta *H. perforatum* yağı içeren membranların artan yağ içeriği ile birlikte % hücre canlılığını artırdığı söylenebilir (Şekil 4.11 ve 4.13)

Yara yüzeyinden kaldırılırken ikinci bir hasara sebep olmaması için yara örtülerinin yaraya yapışması istenmez. Membranların (1, 2, 3) yara bölgesi ile temas edecek alt tabakası L929 fibroblast hücreleri ile 2 gün inkübe edilerek yüzeyde hücre tutunması (adezyon) inkübasyon sonrası membran yüzeylerinden SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.14). Değişen büyütme oranlarında çekilen SEM görüntüleri incelendiğinde hiçbir membran yüzeyinde hücre tutunması (adezyon) ve çoğalmasına (proliferasyon) rastlanmamıştır (Şekil 4.14). Membranların yaraya yapışma riski taşımadığı düşünülmektedir. Yüzeyde hücre tutunmasının gerçekleşmeme sebebi PEG'in çözünmesi ve/veya hidrofobik karakterdeki yağın salınması olabilir.

Çalışmanın son aşamasında 35 adet Wistar albino sıçan ile *in vivo* deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sıçanların sırt bölgelerinde 7,5 mm çaplı dairesel ikinci derece derin yanık yaraları oluşturulmuştur. 16 gün süren çalışmada *H. perforatum* içeren ve içermeyen PEG-PCL membranlar, hiçbir tedavinin uygulanmadığı, yanık

yaralanmalarında kullanılan bir yanık merheminin uygulandığı ve doğrudan *H. perforatum* yağının uygulandığı deney gruplarına karşı incelenmiştir (Çizelge 4.7). 0, 4, 7, 11, 14 ve 16. günlerde her sıçandaki yara çapları ölçülerek fotoğraflanmıştır (Şekil 4.15; 4.16; 4.17; 4.18; 4.19). Belirtilen günlerde çekilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarılarak Image J 1.48 programı ile yara alanı ve bu değerlere bağlı olarak % küçülme oranları hesaplanmıştır (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Bu şekilde elde edilen makroskobik sonuçlar değerlendirildiğinde, en iyi iyileşme oranı *H. perforatum* yağı içeren membranların uygulandığı yaralarda görülmüştür. Bu deney grubunu takip eden grup ise yağ içermeyen polimerik membranların uygulandığı gruptur. Diğer deney gruplarında ise birbirlerine yakın % küçülme oranları elde edilmiştir. Alınan makroskobik değerlendirme sonuçları, membranların beklenen şekilde etki göstererek yara iyileşme sürecini desteklediğini ve diğer gruplara oranla iyileşmeyi hızlandırdığını göstermiştir.

Her bir deney grubundaki sıçanlar 16. günde dekapite edilmiş ve yara bölgesi bir miktar çevre doku ile sakrifiye edilmiştir. Daha sonra numuneler fikse edilip dokular parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan kesitler alınmış ve immunohistokimyasal/histolojik boyamalar gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Grupların karşılaştırılması ve alınan sonuçların değerlendirilebilmesi amacıyla istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

Doku kesitlerinin immunohistokimyasal boyanması sonrası gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre Tip 1 ve Tip 3 kollajen molekül ekspresyonu 5. deney grubu olan yağ içeren membran uygulanan grupta diğer gruplara oranla bir miktar artış göstermiş olduğu ancak istatistiksel değerlendirmelerde diğer gruplar ile benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.9). Tip 1 ve Tip 3 kollajen molekül ekspresyonları oranları da gruplar arasında karşılaştırılmış ve elde edilen oranların her grup için bire yakın bir değerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.24). Normal deride bu iki kollajen molekülü arasındaki oran 3 ile 4 arasında değişiklik göstermektedir. Elde edilen veriler dokuların iyileşme sürecinin henüz tamamlanmadığını, yara bölgesinde skarlı dokunun mevcut olduğunu göstermektedir. Skar doku oluşumu yara iyileşmesinin olgunlaşma fazında başlar ve bu süreç yara iyileşmesinin son aşaması olup yaralanmadan sonraki ikinci ile üçüncü hafta arasında başlayıp birkaç aydan yaklaşık 1 yıla kadar devam eder. Yapılan çalışmada

ikinci derece derin yanık yarası modeli kullanılmıştır. Normalde ikinci derece derin yanık yaraları iki haftalık sürede eğer yarada enfeksiyon vb. olmaz ise kendiliğinden kapanır ancak uzun vadede yara izi bırakır. İki haftalık süreçte henüz skar doku oluşumunun başladığı uzun süren olgunlaşma süreci başlamamıştır. Membranların skar doku oluşumuna etkilerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için en az 6 ay gibi uzun vadeli çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla 16 günlük iyileşme süreci, yara kapanması sonrasındaki skar doku durumu ile ilgili net bir bilgi vermeyip sadece öngörude bulunulmasını sağlar. Tip 1 ve tip 3 kollajen boyamaları gruplar arasında önemli bir fark ortaya koymamıştır. Yapılan çalışmalar iki haftalık süreçte membranların yara bölgesini koruma, yara iyileşmesini destekleme performanslarını uygulama yapılmayan gruba kıyasla değerlendirmektedir. Histopatolojik bulgular membran uygulanan gruplardaki (özellikle yağ içeren membran grubu) iyileşmenin diğerlerine oranla çok iyi bir seviyede olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak uzun vadede iyileşme sürecinin daha az yara izi ile tamamlanacağı düşünülmektedir.

Doku kesitlerinin histokimyasal boyalı preparatları epidermis oluşumu açısından değerlendirildiğinde herhangi bir uygulama yapılmayan 1. deney grubundaki sıçanların deri dokuları oldukça hasarlı görünmektedir. Bu bireylere ait preparatlarda genel olarak epidermis dokusunun büyük bir bölümünün deforme olduğu reepitelizasyonun sadece başlangıç kısımları ile sınırlı kaldığı, sağlam doku bölgelerinden yara merkezine doğru yoğun hücre göçleri doku oluşumunun sağlanması için gerçekleşirken, yaranın kapanmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.26 (A)). Yanık merhemi ve *H. perforatum* yağı uygulanan gruplarda ise bu histolojik hasarların bir miktar hafiflemiş olduğu gözlemlenmiştir. Membran uygulaması gerçekleştirilen deney gruplarında yara iyileşmesinin belirgin olduğu ifade edilebilir. Bu gruplarda bulunan bireylerin genelinde yara uçlarının tamamen kaynaşıp kapandığı görülmüştür (Şekil 4.26 (B) ve Şekil 4.26 (C)). Özellikle *H. perforatum* yağı içeren polimerik membran uygulanan grupta (5. deney grubu) bulunan sıçanlara ait derilerin epidermis dokusunda reepitelizasyonun gerçekleşmiş olduğu; vasküleritenin, kıl foliküllerinin ve yağ bezlerinin tekrar oluşmasının yara iyileşme bölgesinde yoğun olarak görülmeye başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26 (C)). Gruplar epidermis oluşum oranlarına göre karşılaştırıldığında membran uygulanan grupların (özellikle yağ içeren membran grubu) diğer gruplara göre oldukça

iyi sonuçlar verdiği görülmektedir Şekil 4.27 (F). Reepitelizasyon tamamlandıkça bu gruplarda yara bölgesi üzerindeki kabuk tabakanın incelerek gittikçe kaybolmuş olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 5. Deney grubunu temsil eden kesitte epidermis tabakası ile dermis tabakası arasında yoğun etkileşim sağlayan kıvrımlı (papiller) yapının da olduğu görülmektedir Şekil 4.27 (E).

Sonuç olarak üretilen polimerik membranlar gözeneklilik, hava geçirgenliği, nem tutma kapasitesi, hidrofilitesi, elastikiyet, antibakteriyel olma, yaraya yapışmama, biyoyumluluk gibi özellikler bakımından ideal bir yara örtüsünde olması istenilen optimum değerlere sahip olmakla birlikte içerdiği *H. perforatum* yağının istenilen şekilde membranlardan kontrollü salımının yara iyileşmesini destekleyerek iyileşme sürecini hızlandırdığı yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla teyit edilmiştir. Bununla birlikte uzun vadede yara izi oluşumunu da azaltma potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Altay, P., Başal, G., 2010. Yara Örtüleri. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4 (1), 109-121.
- Altıok, D., Altıok, E., Tihminliođlu, F., 2010. Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications. *Journal of Material Science*, 21, 2227–2236.
- Anonim, 2012. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices, ASTM.
<https://www.astm.org/Standards/F813.htm> (30.11.2018).
- Anonim, 2017. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, International Organization for Standardization.
<https://www.iso.org/standard/36406.html> (30.11.2018).
- Anonim, 2017. Layers of the Skin, OpenStax College.
<https://cnx.org/contents/RxywCGkA@5/Layers-of-the-Skin> (30.11.2018).
- Augustine, R., Kalarikkal, N., Thomas, S. 2015. Electrospun PCL Membranes Incorporated with Biosynthesized Silver Nanoparticles as Antibacterial Wound Dressings, *Applied Nanoscience*, DOI 10.1007/s13204-015-0439-1.
- Bancroft, J.D., Gamble, M., 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone Elsevier, No: 121, 146, 150, Çin.
- Baudry, M.R., Gouttefangeas, F., Lannic, J.L., Rabiller, P., 2012. Coupling of SEM-EDX and FTIR-ATR to (Quantitatively) Investigate Organic Fouling on Porous Organic Composite Membranes. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* (A. Méndez-Vilas, Ed.), 2012, 1-11.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325–347.
- Bhushani, J.A., Anandharamakrishnan, C., 2014. Electrospinning and Electrospraying Techniques: Potential Food Based Applications. *Trends in Food Science & Technology*, 38; 21-33.
- Boateng, J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M., 2007. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97, 2892–2923.
- Broughton, G., Rohrich, R. J. 2005. Wounds and Scars. *Selected Readings in Plastic Surgery*, 10 (7), 1-54.
- Bui, H.T., Chung, O.H., Cruz, J.D., Park, J.S., 2014. Fabrication and Characterization of Electrospun Curcumin-Loaded Polycaprolactone-Polyethylene Glycol Nanofibers for Enhanced Wound Healing. *Macromolecular Research*, 22 (12), 1288-1296.
- Costin, G.E., Hearing, V.J., 2007. Human Skin Pigmentation: Melanocytes Modulate Skin Color in Response to Stress. *The FASEB Journal*, 21, 976-994.
- Çakal, C., 2004. PHEMA Bazlı Yara/Yanık Örtü Materyalleri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Çakmak, S., 2011. Her Yönüyle Nano, Nanomalzemeler, Karakterizasyonları ve Uygulama Alanları, *Nanofiberler*. *Nanobülten*, 13, 22-33.

- Çetinkale, O., 2008. Yara Bakımı ve Tedavisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi, 67, 107-117.
- Dahlin, R.L., Kasper, F.K., Mikos, A.G., 2011. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. Tissue Engineering: Part B, 17 (5), 349-364.
- Daldy, C.H., Odland, G.F., 1979. Age-related Changes in The Mechanical Properties of Human Skin. The Journal of Investigative Dermatology, 73, 84-87.
- Diñç, H., 2013. Polivinil Borat Sentezi; Elektrospon Yöntemiyle Nanofiber Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya mühendisliği Ana Bilim Dalı, Konya.
- Doğan, Z., 2012. Nanolif Yara Örtücü Yüzeylerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- Dursun N., Liman, N., Özyazgan, İ., Güneş, I., Saraymen, R., 2003. Role of Thymus Oil in Burn Wound Healing. Journal of Burn Care & Rehabilitation, 24 (6), 395-399.
- Franco, R.A., Nguyen, T.H., Lee, B.T., 2011. Preparation and Characterization of Electrospun PCL/PLGA Membranes and Chitosan/Gelatin Hydrogels for Skin Bioengineering Applications. Journal of Material Science, 22, 2207–2218.
- Garg, K., Bowlin, G.L., 2011. Electrospinning Jets and Nanofibrous Structures. Biomicrofluidics, 5, 1-19.
- Geronemus R.G., Robins P., 1982. The Effect of Two New Dressing on Epidermal Wound Healing. Journal of Dermatologic Surgery, 8, 850-852.
- Granger, J.P., Estrada, CM., Abramo, T.J., 2009. An Evidence-Based Approach to Pediatric Burns. Pediatric Emergency Medicine Practice, 6 (1), 1-18.
- Grossen, P., Québatte, G., Witzigmann, D., Baschong, C.P., Dieu, L.H., Huwyler, J., 2016. Functionalized Solid-Sphere PEG-*b*-PCL Nanoparticles to Target Brain Capillary Endothelial Cells *in vitro*. Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials, 2016; 1-13.
- Gupta, B., Arora, A., Saxena, S., Alam, M.S., 2008. Preparation of Chitosan-Polyethylene Glycol Coated Cotton Membranes for Wound Dressings: Preparation and Characterization. Polymer Advanced Technologies, 20, 58–65.
- Gupta, B., Saxena, S., 2011. Chitosan-Polyethylene Glycol Coated Cotton Membranes for Wound Dressing. Indian Journal of Fibre & Textile Research, 36, 272-280.
- Güleş, Ö., Eren, Ü., 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.
- Güneşoğlu, C., 2009. Nanoteknoloji ve Tekstil Sektöründeki Uygulamaları (Nanotekstiller). Mühendis ve Makine Dergisi, 50 (591), 25-34.
- Han D., Gouma P.I., 2006. Electrospun Bioscaffolds That Mimic The Topology of Extracellular Matrix. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2, 37– 41.
- Hendriks, F.M., 2001. Mechanical Behaviour of Human Skin *in vivo*. Nat.Lab. Unclassified Report.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, M., 2003. A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. Composites Science and Technology, 63, 2223–2253.

- Hussien, N.A., Işıklan, N., Türk, M., 2018. Aptamer-Functionalized Magnetic Graphene Oxide Nanocarrier for Targeted Drug Delivery of Paclitaxel. *Materials Chemistry and Physics*, 211, 479-488.
- Johnson, J., Niehaus, A., Nichols, S., Lee, D., Koepsel, J., Anderson, D., Lannutti, J., 2009. Electrospun PCL *in vitro*: a Microstructural Basis for Mechanical Property Changes. *Journal of Biomaterials Science*, 20, 467–481.
- Karaçulha, A., 2010. Yeni Nesil Biyomalzemeler: Yara Örtüleri. Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H., Tamura, K., 2012. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals. *New Perspectives in Regeneration*, 367, 33-49.
- Kil'deeva, N.R., Vikhoreva, G.A., Gal'braikh, L.S., Mironov, A.V., Bonartseva, G.A., Per-minov, P.A., Romashova, A.N., 2006. Preparation of Biodegradable Porous Films for Use as Wound Coverings. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 631–635.
- Kim G.H., Yoon H., 2008. A Direct-Electrospinning Process by Combined Electric Field and Air-Blowing System for Nanofibrous Wound-Dressings. *Applied Physics A Material Science&Processing*, 90, 389-394.
- Kim, T.G., Lee, D.S., 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.
- Kumar, N., Gupta, A.K., 2009. Wound-Healing Activity of *Onosma hispidum* (Ratanjot) in Normal and Diabetic Rats. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 15, 342–351.
- Kurtoğlu, A.H., Karataş, A., 2009. Yara Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar: Modern Yara Örtüleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38 (3), 211-232.
- Kweon, H., Ha, H.C., Um, I.C., Park, Y.H., 2000. Physical Properties of Silk Fibroin/Chitosan Blend Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 80, 928–934.
- Mutlu, G., 2014. Doku Rejenerasyonunda Kullanılmak Üzere Etkin Madde Yüklü Nanofibriler Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Nayak, R., Padhye, R., Kyrtzis, I.L., Truong, Y.B., Arnold, L., 2011. Recent Advances in Nanofibre Fabrication Techniques. *Textile Research Journal*, 82 (2), 129–147.
- Ölçer, A., Gönül, N., 2002. Perkütan Absorpsiyon ve Perkütan Absorpsiyonu Etkileyen Faktörler. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31 (1), 33-49.
- Öncül, O., 2008. Yanık Enfeksiyonları. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi, 60, 105-119.
- Özkorkmaz, E, Özay, Y., 2009. Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2); 63-67.
- Patil, B.S., Mastiholmath, V.S., Kulkarni, A.R., 2011. Development and Evaluation of Psyllium Seed Husk Polysaccharide Based Wound Dressing Films. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 11, 123–129.

- Patočka, J., 2013. The Chemistry, Pharmacology, and Toxicology of The Biologically Active Constituents of The Herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*, 1, 61–70.
- Pereira, D., Lima-Ribeiro, M., Pontes-Filho, N., Carneiro-Leão, A., Correia, M. 2012. Development of Animal Model for Studying Deep Second-Degree Thermal Burns. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology*, DOI:10.1155/2012/460841
- Pezzei, V.A.H., Pallua, J.D., Pezzei, C., Bittner, L.K., Schönbichler, S.A., Abel, G., Popp, M., Bonn, G.K., Huck, C.W., 2012. Fourier Transform Infrared Imaging Analysis in Discrimination Studies of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 1771–1778.
- Pirbalouti, A.G., Vanani, M.F., Craker, L., Shirmardi, H., 2013. Chemical Composition And Bioactivity of Essential Oils of *Hypericum Helianthemoides*, *Hypericum Perforatum* and *Hypericum Scabrum*. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 175–181.
- Polat, E., 2013. Polikaprolaktonun Elektrostatik Eğirmesi ve RGD Yüzey Modifikasyonu ile Periferik Sinir İyileşme Kanalları Üretim ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.
- Prisăcaru, A. I., Andrițoiu, C. V., Andriescu, C., Hăvârneanu, E. C., Popa, M., Motoc, A. G. M., Sava, A., 2013. Evaluation of The Wound-Healing Effect of A Novel *Hypericum perforatum* Ointment in Skin Injury. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 54 (4), 1053–1059.
- Rančić, A., Soković, M., Vukojević, J., Simić, A., Marin, P., Laušević, S., Djoković, D., 2005. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (3); 341-345.
- Reneker, D.H., Yarin, A.L., 2008. Electrospinning Jets and Polymer Nanofibers. *Polymer*, 49, 2387-2425.
- Saddiqe, Z., Naem, I., Maimoona, A., 2010. A Review of the Antibacterial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511–521.
- Samadi, S., Khadivzadeh, T., Emami, A., Moosavi, N. S., Tafaghodi, M. ve Behnam, H. R. 2010. “The Effect of *Hypericum perforatum* on The Wound Healing and Scar of Cesarean”, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16 (1), 113-117.
- Sarkar, K., Gomez, C., Zambrano, S., Ramirez, M., Hoyos, E., Vasquez, H., Lozano, K., 2010. Electrospinning to Forcespinning. *Materialstoday*, 13 (11), 12-14.
- Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kurowska, K.P., Kaszuba, A., Urbaniak, A., 2015. The Effect of Clary Sage Oil on Staphylococci Responsible for Wound Infections. *Advances in Dermatology and Allergology*, 32 (1), 21–26.
- Sinha, M., Banik, R.M., Haldar, C., Maiti, P., 2013. Development of Ciprofloxacinhydrochloride Loaded Poly(Ethylene Glycol)/Chitosan Scaffold as Wound Dressing. *Journal of Porous Materials*, 20, 799–807.
- Stashak, T.S., Farstvedt, E., Othick, A. 2004. Update on Wound Dressings: Indications and Best Use. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3, 148-163.

- Süntar, İ., Akkol, E., Keleş, H., Oktem, A., Başer, K.H.C., Yeşilada E., 2011. A Novel Wound Healing Ointment: A Formulation of *Hypericum perforatum* Oil and Sage and Oregano Essential Oils Based on Traditional Turkish Knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 134; 89-96.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R., Sandhu, S.S., 2011. Practices in Wound Healing Studies of Plants. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011; 1-17. doi:10.1155/2011/438056.
- Tintinalli, J., Stapczynski, J., Ma, O. J., Cline, D., Cydulka R., Meckler, G. 2010. Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide (7. baskı). New York: McGraw-Hill Companies.
- Ulubayram, K., Hasırcı, N. 1998. Polymeric Materials in Wound Healing. A. Hıncal and S. Kaş, Biomedical Science and Technology, Plenum Press, New York, 145-153.
- Uzun, İ.H., Bayındır, F., 2011. Dental Materyallerin Biyouyumluluk Test Yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28 (2), 115-122.
- Uzunalan, G., 2011. Yara-Yanık İyileşmesine Yönelik Gümüş Nano Partikül Yüklü Gözenekli Kolajen Doku İskeleleri Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- Valizadeh, A., Farkhani, S.M., 2014. Electrospinning and Electrospun Nanofibres. *IET Nanobiotechnology*, 8 (2), 83–92.
- Wölfle, U., Seelinger, G., Schempp, C.M., 2013. Topical Application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*, 80; 109-120.
- Zahedi, P., Rezaeian, I., Siadat, S.O., Jafari, S.H., Supaphol, P., 2010. A Review on Wound Dressings with An Emphasis on Electrospun Nanofibrous Polymeric Bandages. *Polymers Advanced Technologies*, 21,77–95.
- Zavoi, S., Fetea, F., Ranga, F., Pop, R.M., Baciuc, A., Socaciuc, C., 2011. Comparative Fingerprint and Extraction Yield of Medicinal Herb Phenolics with Hepatoprotective Potential, as Determined by UV-Vis and FT-MIR Spectroscopy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 39 (2), 82-89.
- Zhang, Z., Hu, J., Ma, P.X., 2012. Nanofiber-Based Delivery of Bioactive Agents and Stem Cells to Bone Sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (12), 1129–1141.
- Zhao, T., Jiang, L., 2018. Contact Angle Measurement of Natural Materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 324–330.
- Zhong, S.P., Zhang, Y.Z., Lim, C.T., 2010. Tissue Scaffolds for Skin Wound Healing and Dermal Reconstruction. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 510-525.
- Zhou, X., Wang, H., Zhang, J., Li, X., Wu, Y., Wei, Y., Ji, S., Kong, D., Zhao, Q., 2017. Functional Poly(ϵ -caprolactone)/Chitosan Dressings with Nitric Oxidoreleasing Property Improve Wound Healing. *Acta Biomaterialia*, 54, 128–137.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Name Erdemir
Doğum Tarihi/Yeri: 07.01.1992/Ankara
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni Durum : Bekar
TC Kimlik No : 38926893086
Tel no : 0(554) 503 1613
e-mail : name.erdemir@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Başlangıç ve Mezuniyet Tarihi
Lise	Mustafa Kemal Lisesi-Fen Bilimleri (Ankara)	2006-2010
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Biyomühendislik Bölümü (Tokat)	2010-2014
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Biyomühendislik Anabilim Dalı (Tokat)	2014-2019
Staj deneyimi	1. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Polimer Laboratuvarı 2. Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (Pedi-Stem)	2012 (4 hafta) 2013 (4 hafta)

Projeler

1. *Lactobacillus casei* NRRL B-441 Suşu ile L-Laktik Asit Üretimi, Saflaştırılması ve Polimerizasyonu (TÜBİTAK 2241- A Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı, 2014 2.Başvuru Dönemi)
2. Mandibular Defektlerde Vegf ve Bmp-2 Salımı Gerçekleştiren Biyobozunur Doku İskelelerinin Kullanılması (TÜBİTAK, Proje No: 112S489, 2014-2015)
3. *Hypericum perforatum* Yağı Yüklenmiş Polimerik Membranların Yanık Yara İyileşmesinde Skar Doku Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi (TÜBİTAK, Proje No: 117S542, 2017-2018)

Bildiriler

1. Eğri Ö., Erdemir N., Coşkun A., Kaya S., Eğri S. (2015). Production and Antibacterial Effect of Perlite Loaded Electrospun PCL Films. 4th Nanomedicine World Congress (Özet Bildiri) (Yayın No:3413325)
2. Eğri Ö., Çadırcı B. H., Coşkun A., Erdemir N., Bayramcı N. S. (2015). Effect of Magnetic Field on Biofilm Formation of *Streptococcus pyogenes* and *Klebsiella pneumoniae* Bacteria. 2nd International NanoBioTechnology Symposium (Özet Bildiri) (Yayın No:3413339)
3. Erdemir, N., Coşkun, A., Eğri, Ö. (2017). Antimikrobiyal Etkinliği Bilinen Bitkisel Yağlar ile Polimerik Membranlara Antimikrobiyal Özellik Kazandırılması. 4. Biyomalzeme Günleri (Özet Bildiri)
4. Coşkun, A., Erdemir, N., Eğri, S., Gökçe, İ. (2017). *Lactobacillus casei* ile L-Laktik Asit Üretimi, Saflaştırılması ve Polimerizasyonu. 4. Biyomalzeme Günleri (Özet Bildiri)
5. Eğri Ö., Erdemir N. (2017). Production of Polyethylene Glycol (PEG) - Polycaprolactone (PCL) Membranes by The Co-electrospinning Technique. International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies (Özet Bildiri) (Yayın No:3994635)
6. Eğri Ö., Erdemir N. (2017). Production of Polyethylene Glycol (PEG) Capsules That Includes *Hypericum perforatum* Oil by Using Electro-Spraying Technique. ISMSIT2017: International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies (Özet Bildiri) (Yayın No:3994623)