

**Atf İçin:** Bozdoğan, B. (2023). Gözenekli Film – Peptit Nanopartikül Hibrit Yapıların İlaç Salımı Yapan Yara Örtü Malzemesi Olarak Değerlendirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(2), 1120-1133.

**To Cite:** Bozdoğan, B. (2023). Evaluation of Porous Film – Peptide Nanoparticle Hybrid Structures as Drug-Releasing Wound Dressing Material. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(2), 1120-1133.

## Gözenekli Film – Peptit Nanopartikül Hibrit Yapıların İlaç Salımı Yapan Yara Örtü Malzemesi Olarak Değerlendirilmesi

Betül BOZDOĞAN<sup>1\*</sup>

### **Öne Çıkanlar:**

- Yara örtüsü
- Hibrit yapı
- İlaç salımı

### **Anahtar Kelimeler:**

- Nefes figürü
- Poliüretan
- Difenilalaninamid
- Kurkumin
- Peptit nanopartikül

### **ÖZET:**

Nefes figürü (Breath Figure) ile polimerik yüzeylerde desen ve gözenek oluşturma yöntemi oldukça yeni olup, bir polimer litografi tekniği olarak literatürde yerini almıştır. Teknolojik maliyetinin düşük olması, çevre dostu olması ve toksik kimyasallar kullanılmaması gibi avantajları sayesinde biyomalzeme üretiminde özellikle gözenekli membran, yara örtüleri ve doku iskelelerinin üretiminde tercih edilmektedir. Biyoyumlu ve biyobozunur poliüretanlar biyomalzeme üretiminde kullanılan polimerlerin başında gelmektedir. Çalışmada, nefes figürü tekniği ile üretilen poliüretan filmlerin gözenekleri içine kurkumin yüklü difenilalaninamid peptit nanopartiküller entegre edilerek bir hibrit yara örtü malzemesi dizayn edilmiştir. Biyoyumluluğu, kimyasal olarak modifiye edilebilirliği, kolay ve ucuz sentezlenebilirliği, olağanüstü dayanıklılığı, termal ve kimyasal stabiliteyi sayesinde peptit nanopartiküller biyomedikal uygulamalarda özellikle ilaç salım uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Kurkumin düşük molekül ağırlıklı bir fenolik bitki bileşenidir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral gibi farmakolojik özelliklerinden dolayı yara tedavilerinde etken madde olarak kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalar kapsamında, farklı BF parametreleri ile üretilen poliüretan filmler ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak karakterize edilmiş ve morfolojik özellikleri bakımından yara örtü malzemesi olmaya en uygun aday seçilmiştir. Hazırlanan kurkumin yüklü peptit (FFA/Ccm) nanopartiküller zayıflatılmış toplam yansıma – Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ve elektron mikroskopisi ile karakterize edilmiştir. FFA/Ccm nanopartiküllerin kurkumin yükleme kinetikleri UV-görünür bölge spektrofotometrisi ile değerlendirilmiştir. Poliüretan filmin gözenekleri içine FFA/Ccm nanopartiküllerin gömülmesi ile elde edilen hibrit yara örtüsünün morfolojik analizleri SEM ile ve kurkumin salım kinetikleri UV-görünür bölge spektrofotometrisi ile incelenmiştir. Son olarak, hibrit yara örtüsünün sitotoksisite testleri L929 fare fibroblast hücre hattında MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. Geliştirilen hibrit yara örtü malzemesinin biyomedikal uygulamalarda kullanımı gelecek vadedmektedir.

## Evaluation of Porous Film – Peptide Nanoparticle Hybrid Structures as Drug-Releasing Wound Dressing Material

### **Highlights:**

- Wound dressing
- Hybrid structure
- Drug release

### **Keywords:**

- Breath figure
- Polyurethane
- Diphenylalanineamid
- Curcumin
- Peptide nanoparticle

### **ABSTRACT:**

Breath Figure (BF), which is used to create patterns and pores on polymeric surfaces, is a polymer lithography technique. It is preferred in the production of biomaterials, especially porous membranes, wound dressings and tissue scaffolds, thanks to its advantages such as low technological cost, environmental friendliness and non-toxic chemicals. Biodegradable and biocompatible polyurethanes (PU) are the leading polymers used in biomaterial fabrication. In this study, porous PU films are fabricated with the BF method. Curcumin-loaded diphenylalanine (FFA/Ccm) peptide nanoparticles are integrated into the pores of films. Peptide nanoparticles are frequently used in biomedical applications, especially in drug release, thanks to their biocompatibility, chemical modifiability, inexpensive synthesis, and thermal and chemical stability. Curcumin is a natural phenolic compound. It is used as an active agent in wound treatments due to its pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antiviral. Within the scope of experimental studies, PU films produced with different BF parameters were characterized using light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The most suitable candidate for wound dressing material was evaluated in terms of their morphological features. Characterization of FFA/Ccm NPs was performed by attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and SEM. Curcumin loading kinetics of nanoparticles were evaluated by UV-visible spectrophotometry. Morphological analyzes of the hybrid wound dressing obtained by embedding NPs in the pores of the PU film were investigated by SEM. Curcumin release kinetics of hybrid wound dressing was investigated by UV-visible spectrophotometry. Finally, the cytotoxicity of the hybrid wound dressing was evaluated by the MTT method. The use of the developed hybrid material as a wound dressing in biomedical applications is promising.

<sup>1</sup> Betül BOZDOĞAN (Orcid ID: 0000-0003-1546-3895), Aksaray Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Aksaray, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Betül BOZDOĞAN, e-mail: betulbozdogan@aksaray.edu.tr

## GİRİŞ

Deri sürekli olarak fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkilere maruz kalan vücudun en dış organıdır. Dış dünya ile vücut arasında bir bariyer görevi görmektedir. Bu bariyer organ sık sık yanma, yaralanma ya da fiziksel travmalar sonucunda hasar görebilmektedir. Ciltte meydana gelen bu hasarlar bir dizi karmaşık ve zaman alıcı yara iyileşmesi süreçlerini başlatmaktadır. Kronik yaralar (diyabetik ülserler, venöz ülser vb.) patolojik olarak gecikmiş ve yetersiz iyileşme ile hastaların hayatlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Yara iyileşmesini hızlandırmak ve skar oluşumunu azaltmak için çeşitli yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi tüm dünyada yükselen araştırma konularından biridir. İdeal bir yara örtü malzemesi yara çevresini nemli tutmalı; epidermal migrasyonu arttırmalı, anjiyogenez ve bağdoku sentezini teşvik etmeli; yaralı doku ve çevresi arasında gaz geçişine izin vermeli; uygun doku sıcaklığını muhafaza etmeli, antimikrobiyal ve antifungal özelliği ile enfeksiyon oluşumunu önlemeli; dokuya yapışmamalı, travmasız ve acısız bir şekilde çıkarılabilmeli; mekanik koruma sağlamalı, toksik ve alerjik olmamalı; kullanımı kolay ve de ucuz olmalıdır. (Dhivya ve ark., 2015; Gonzalez ve ark., 2016). Yarayı dış etkilere ve kontaminasyonlardan korumak için pasif ve fiziksel bir bariyer görevi gören geleneksel yara örtü malzemelerinin yerini zamanla antibiyotik ve yara iyileştirici ilaçlar içeren örtü malzemeleri almıştır. Biyoaktif madde taşıyan ve bu maddelerin kontrollü salımını yapan biyoyumlu nanopartiküllerin yara örtü malzemelerine entegre edilmesi yara iyileşmesi çalışmalarında çığır açmıştır (Ferreira ve ark., 2014; Berthet ve ark., 2017; Ren ve ark., 2018; Jiang ve Loo, 2021).

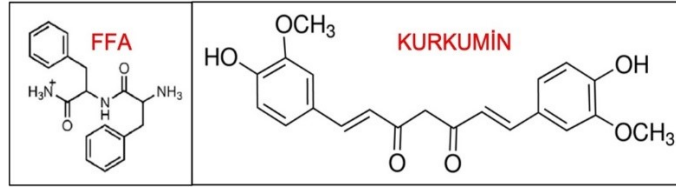
Poliüretan ve polikaprolakton gibi sentetik ve kitin, kitosan gibi doğal polimerler kullanılarak çok iyi yara iyileştirme performansları olan yeni nesil yara örtüleri geliştirilmektedir. Poliüretanlar (PU) biyoyumluluğu, iyi bariyer özellikleri, ince, esnek, dayanıklı, transparan, yara bölgesine yapışan ve gaz geçirgenliği gibi üstün fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı yara örtüsü uygulamalarında sıklıkla kullanılan polimerlerdir. Poliüretan yara örtüleri yarayı nemli tutarak ve inkübatör benzeri mikroortam oluşturarak yara iyileşme sürecini hızlandırmakta ve skar oluşum riskini azaltmaktadır (Eskandarinia ve ark., 2020; Esmaili ve ark., 2020).

Polimer bir yüzeyi gözenekli hale getirmek için kullanılan en düşük maliyetli ve çevre dostu yöntem Nefes Figürü (Breath Figure) yöntemidir. Nefes figürü günlük hayatta çokça karşılaşılan bir olgudur. Bir ortamda gaz halinde bulunan su moleküllerinin soğuk bir yüzeye teması sonrası sıvı hale geçmesi prensibine dayanır. Bu yöntem belli bir bağıl nem ortamında kapalı bir sistem içerisinde uygulanmaktadır. Polimer çözeltilsinin cam veya silikon gibi bir yüzeye yayılmasının akabinde polimer çözeltisindeki çözücü hızla buharlaşarak polimer çözeltilsinin yüzey sıcaklığının düşmesine sebep olur. Sistemde bulunan yüksek nem oranından dolayı, nem kaynağı olarak kullanılan su, metanol, etanol vb. molekülleri polimer yüzeyinde çekirdeklenir, büyür ve koagüle olur. Yoğunlaşan damlalar hegzagonal yapıda bal peteği benzeri düzenlenmeler yaratır (Daban ve ark., 2019). Nefes Figürü polimer bazlı gözenekli membranların üretiminde en çok kullanılan yöntemlerden biridir (Cong ve ark., 2012; Wan ve ark., 2012; Kawano ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Daban ve ark., 2019). Poliüretanlar yüksek moleküler ağırlıkları ve düşük suda çözünürlüklerinden dolayı su buharının bulunduğu ortamda kolay stabilize olurlar. Bu yüzden nefes figürü uygulamaları için uygun adaylardır.

Kurkumin (diferuloyil metane) *Curcuma longa* (zerdeçal) bitkisinin köklerinden ekstrakte edilen düşük molekül ağırlıklı doğal bir polifenoldür. Kurkumin farmakolojik olarak antibakteriyel, antiviral, antitümör, antioksidan, antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir (Alam ve ark., 2012). Kurkumin serbest radikal yakalama özelliği ile yara iyileşme sürecinde ortaya çıkan ve enflamasyona neden olan reaktif oksijen türlerini yok ederek iyileşmeye katkıda bulunmaktadır (Gong ve ark., 2013; Pankongadisak ve ark., 2019). Kurkumin anjiyogenez, fibroblast proliferasyonunu, granül doku

oluşumunu, kollajen migrasyonunu ve depolanmasını artırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Akbik ve ark., 2014; Ghae ve ark., 2019). Ek olarak, antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileriyle yara dokusunu enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Tüm bu sayısız terapötik özelliklerine rağmen kurkuminin hidrofobik doğası onun farmakolojik uygulamalarda kullanımını sınırlamaktadır. Bu yüzden kurkumin suda çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak için nanopartiküllere enkapsüle edilmektedir (Pandit ve ark., 2018).

Hidrofilik bir taşıyıcı sisteme hidrofobik ilaç yüklenmesi günümüzde hala zorluklarla dolu ve çözümsüz bir sorun olarak durmaktadır.  $\pi$ - $\pi$  istiflenmesi, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerin birlikte rol aldığı peptit-ilaç birlikte düzenlenmesi (coassembly) bu soruna çözüm olabilecek yöntemlerden biridir. Kurkumin ve difenilalaninamid dipeptidi hidrofobik doğaları ve aromatik fenil gruplarından dolayı (Şekil 1)  $\pi$ - $\pi$  istiflenmesi vasıtasıyla birlikte düzenlenme yapabilmektedirler (Altunbas ve ark., 2011; Alam ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2019). Peptitler ve proteinler kendiliğinden düzenlenme yapabilen “akıllı işlevsel malzemeler” olarak adlandırılırlar ve nanotüp, nanoçubuk, nanopartikül, nanovezikül ve nanofibril yapılara düzenlenebilirler (Kumaraswamy ve ark., 2011).



Şekil 1. Difenyilalaninamid (FFA) ve Kurkuminin Kimyasal Yapısı

Sunulan çalışmada, Difenyilalaninamid (FFA) dipeptidi ve kurkuminin birlikte düzenlenmesi ile elde edilen kurkumin yüklü nanopartiküller Nefes figürü yöntemiyle üretilen poröz filmin gözenekleri içine gömülerek ilaç salımı yapan hibrit yara örtü malzemesi geliştirilmiştir. Bu hibrit yapının kurkumin yükleme ve salım kinetikleri ve sitotoksik özellikleri incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda medikal kullanıma uygun termoplastik poliüretan (Lubrizol, Ohio, ABD) kullanılmıştır. Polimerin kloroform (Sigma-Aldrich, Almanya) içerisinde %5'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. %1'lik çözelti bu stok çözeltinin seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Stok çözelti oda koşullarında ağzı kapalı olarak saklanmıştır. Peptit nanopartikül sentezinde Difenyilalaninamid (FFA) dipeptidi (H-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.HCl) (Bachem, İsviçre) kullanılmıştır. Etkin madde olarak kullanılan kurkumin Sigma Aldrich (Almanya)'ten temin edilmiştir.

### Nefes figürü yaklaşımı ile gözenekli poliüretan filmlerin üretilmesi

Polimer çözeltisi uygulanacak yüzey (alt taş) olarak cam mikroskop lameli kullanılmıştır. İlk olarak, alt taş üzerindeki istenmeyen oksitler ve kontaminasyonların uzaklaştırılması için piranha çözeltisi içerisinde bekletilerek temizlenmiş ve azot gazıyla kurutulmuştur. Projede nem kaynağı olarak distile su kullanılmıştır. Temizlenip kurutulan alt taş, içerisinde nem kaynağı olan kapalı sistem içine yerleştirilmiş ve sistem belirlenen nem yüzdesine gelene dek bekletilmiştir. İstenen nem oranına ulaşıldığında %1'lik poliüretan çözeltisi alt taş üzerine damlatılmıştır. Belirlenen uygulama süresi kadar sistem kapalı tutulmuştur. Bu süre içerisinde poliüretan çözeltisi içerisinde bulunan çözücü buharlaşır ve ortamdaki su buharı polimer film üzerine yoğunlaşarak gözenek oluşumunu sağlar. Süre

sonunda sistem açılarak gözenekli PU filmler ileri karakterizasyon ve uygulamalar için kurumaya bırakılmıştır (Daban ve ark., 2019).

### Gözenekli poliüretan filmlerin karakterizasyonu

Gözenekli poliüretan filmlerin morfolojik karakterizasyonu ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ti2, Japonya) ve taramalı elektron mikroskobu – SEM (EVO 50 EP, Carl Zeiss, Almanya) ile yapılmıştır. Elektron mikroskobu analizleri öncesinde filmler altın ile kaplanmıştır. Filmlerin ortalama gözenek boyutları mikroskop görüntüleri üzerinde Image J (NIH Image) yazılımı ile yapılan analizler ile hesaplanmıştır. Her bir PU filmin gözenekliliği ( $p$ ) Eşitlik 1. e göre hesaplanmıştır (Ren ve ark., 2018).

$$p = \frac{\sum_{i=1}^n S_i}{S} \quad (1)$$

Burada,  $S_i$  her bir gözeneğin çapı,  $n$  yüzeydeki gözeneklerin sayısı ve  $S$  ise gözeneklerin bulunduğu film yüzeyinin alanıdır.

Temas açısı ölçümleri durağan damla temas açısı ölçüm yöntemiyle (Biolin Scientific, Attenson Theta, ABD) deiyonize suya karşı yapılmıştır ( $n=3$ ). Yaklaşık olarak 1  $\mu$ L kadar saf su membran yüzeyine damlatılarak görüntü alınmakta ve temas açısı bu görüntü üzerinden ölçülmektedir.

### Kurkumin yüklü FFA peptit nanopartiküllerin (FFA/Ccm NP) sentezlenmesi

Kurkumini FFA nanopartiküllere yüklemek için, FFA peptidi 100 mg/mL 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFP) çözücüsünde çözülerek FFA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kurkumin ise 20 mg/mL derişimde dimetilsulfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek Ccm stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ccm ve FFA stok çözeltilerinden Ccm/FFA oranı sırasıyla 10:10  $\mu$ L, 20:10  $\mu$ L, 30:10  $\mu$ L, 40:10  $\mu$ L ve 50:10  $\mu$ L olacak şekilde ayrı viallerde karıştırılmıştır. Her bir vialdeki çözelti Ccm:FFA son derişim oranı 0.2:1, 0.4:1, 0.6:1 0.8:1 ve 1:1 olacak şekilde %0.06'lık glutaraldehit (GA) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Herhangi bir çökelti oluşmasını önlemek için stok çözeltiler her deneyden önce taze olarak hazırlanmıştır. Daha sonra reaksiyonun, peptit-ilaç kendiliğinden düzenlenmesinin tamamlanması için çözelti 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, arta kalan HFP ve GA'ın sitotoksik etkisini elimine etmek için nanopartiküller 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek deiyonize su ile üç kez yıkanmıştır.

### Kurkumin yüklü FFA peptit nanopartiküllerin (FFA/Ccm NP) karakterizasyonu

Nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonları SEM (EVO 50 EP, Carl Zeiss, Almanya) ve kimyasal karakterizasyonu ATR-FTIR spektroskopisi ile yapılmıştır. Yüzde ilaç yükleme kapasitesi nanopartiküle ilaç yüklendikten sonra yapılan yıkama işlemlerinden toplanan süpernatantlardaki kurkuminin (artan Ccm) Nanodrop ND-1000 spektrofotometresi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 426 nm'deki absorbansı ölçülerek hesaplanmıştır. Referans standart kurkumin çözeltileri kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisinden yola çıkarak aşağıdaki Eşitlik 2 ve 3 kullanılarak nanopartikülün kurkumin yükleme verimi (YV) ve yükleme kapasitesi (YK) hesaplanmıştır.

$$\% YV = \frac{\text{eklenen Ccm (g)} - \text{artan Ccm (g)}}{\text{eklenen Ccm (g)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% YK = \frac{\text{yüklenen Ccm (g)}}{\text{Ccm yüklü nanopartikül (g)}} \times 100 \quad (3)$$

**PU Film–FFA/Ccm NP hibrit yara örtü malzemesinin üretilmesi**

Poröz film-nanopartikül hibrit yapılar, nanopartikül dispersiyonunun gözenekli film yüzeyine damlatılması şeklinde tek basamaklı bir prosedür yoluyla kolayca hazırlanabilmektedir. Nanopartiküller dispersiyondaki suyun buharlaşması esnasında oluşan kapiler kuvvetler yoluyla porların içinde düzenli bir şekilde birikmektedir (Yabu ve ark., 2006). 1 cm çapındaki gözenekli PU film üzerine 100 uL FFA/Ccm NP süspansiyonu damlatılarak yayılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

**PU Film–FFA/Ccm NP yibrit yara örtüsünün in vitro kurkumin salımı**

Çapı 1 cm olan disk yapıdaki hibrit yara örtü malzemesinin ilaç salım kinetikleri simüle edilmiş yara (SYS) sıvısı çözeltisi (pH 7.4) içerisinde belirlenmiştir (n=3). Simüle edilmiş yara sıvısı 5.84 g/L NaCl, 3.36 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.29 g/L KCl, 0.27 g/L CaCl<sub>2</sub>, 33.0 g/L BSA ve %0.01 sodyum azid deiyonize su içerisinde hazırlanmıştır. Salım ortamına kurkuminin düşük çözünürlüğünden dolayı ölçümünü sağlayabilmek için %0.05 (w/v) tween 80 eklenmiştir. Salım çalışmaları 5 mL SYS içeren kapaklı cam tüplerin içerisinde 37°C’de ve 85 rpm su banyosunda 7 gün inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından önceden belirlenen periyodik aralıklarla 5 µL örnek alınarak çözeltideki kurkumin miktarı UV spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda ilaç salım profilleri Eşitlik 4 ile hesaplanmıştır. Eşitlikteki m belirlenen zamanda salınan kurkumin miktarını, m<sub>t</sub> ise hibrit filmde hapsedilen toplam kurkumin miktarını göstermektedir.

$$\% \text{ Salım} = \frac{m}{m_t} \times 100 \quad (4)$$

**Sitotoksosite testleri**

Yara örtü malzemesi olarak kullanılacak örnekler için indirekt sitotoksite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ISO 10993-5 standardında belirtildiği şekilde L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. İlk olarak, PU filmler 30 dk UV ışığa maruz bırakılarak sterilize edilmiştir. Sonrasında, %70’lik etil alkol ve fosfat tampon çözeltilerine (PBS) ve saf suya daldırılarak yıkanmış ve steril koşullarda kurumaya bırakılmıştır. Sitotoksosite çalışmalarında kullanılacak FFA/Ccm NP’lerin sentezi steril koşullarda laminar hava akışlı kabin içerisinde ve steril kimyasallar kullanılarak yapılmıştır. Tüm cam malzemeler otoklav kullanılarak 121 °C’de 30 dk sterilize edilmiştir. Hibrit yara örtü malzemesi yukarıda açıklanan yöntemle laminar hava akışlı kabin içerisinde hazırlanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Hibrit yara örtü malzemesinin sitotoksosite testleri MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide) testi ile L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde yapılmıştır. Buna göre, L929 hücre hattı %10 FBS’li Dulbecco’s Modified Eagle’s medium (DMEM) besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37°C’de kültüre edilmiştir. Hücreler istenen doluluk oranlarına ulaştığında 0.25% tripsin/EDTA çözeltisi ile yüzeyden kaldırılarak ve 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Tekrar FBS’li DMEM içerisinde dağıtılarak ve 3x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde plakalara ekilerek 24 saat inkübatörde kültüre edilmiştir.

Örnek ekstraktı 1 cm çaplı disk şeklinde aseptik koşullarda hazırlanmış hibrit filmler serumsuz DMEM içerisinde 37°C’de 72 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır. Hücre tutunması gerçekleşikten sonra kuyucuklar PBS ile iki kez yıkanmıştır. Örnek ekstraktı her bir kuyucuğa eklenerek hücreler bu ekstrakta maruz bırakılmıştır. Kontrol grubuna örnek ekstraktı yerine serumsuz DMEM eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından ekstrakt içeren besiyerleri atılarak kuyucuklara MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenmiştir. 4 saat karanlıkta inkübe edildikten sonra ortam aspire edilmiş ve formazan tuzlarının uzaklaştırılması için 0.04 M izopropanol–HCl eklenmiştir. Hücre canlılık yüzdeleri mikropilaka okuyucu ile 570 nm’deki absorbanslar ölçülerek hesaplanmıştır.

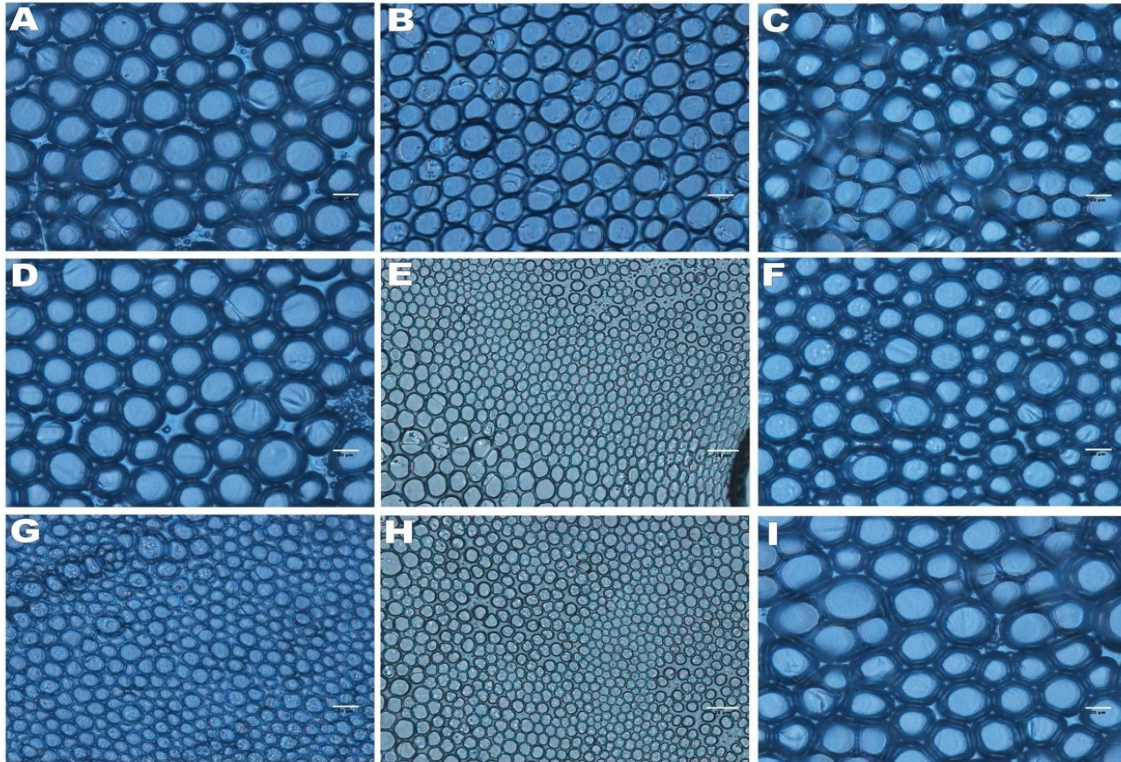


## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Gözenekli Poliüretan Filmlerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Şekil 2’de farklı bağıl ortam nemi ve farklı uygulama sürelerinde nefes figürü ile üretilen poliüretan gözenekli filmlerin ışık mikroskobu görüntüleri ve şekil 3’de bu filmlerin gözenek çapı dağılım grafikleri yer almaktadır. Bu veriler incelendiğinde, %60 ve %65 nem oranlarında ortamdaki su buharı miktarı ve su buharına maruz bırakma süresi arttıkça gözenek boyutunun küçüldüğü gözlemlenmektedir. Ancak, bu trende göre %70 nem oranında üretilen filmlerde gözenek çapının daha da küçülmesi beklenirken, bu şekilde olmamış ve hatta bir miktar artmıştır. Bu sonuç polimer film üzerinde yoğunlaşan su buharı damlacıklarının nem oranının artmasına bağlı olarak birleşip gözenek boyutunu artırmasıyla ilişkilendirilebilir. Organik bir çözücü içerisindeki su molekülleri sıvı-hava ara yüzeyindeki güçlerin kontrolüyle çekirdeklenmekte, birikmekte ve birbiriyle birleşerek polimer tabakaya gömülmektedir. Bu durum literatürde detaylı olarak çalışılmış ve açıklanmıştır (Anand ve ark., 2015). Bağıl nem oranı %70 gibi yoğun olduğunda sıvı-hava ara yüzeyindeki güçlerin artmasına bağlı olarak su buharı damlacıklarının birleşmesi gözenek çapında artış görülmesine neden olmuştur.

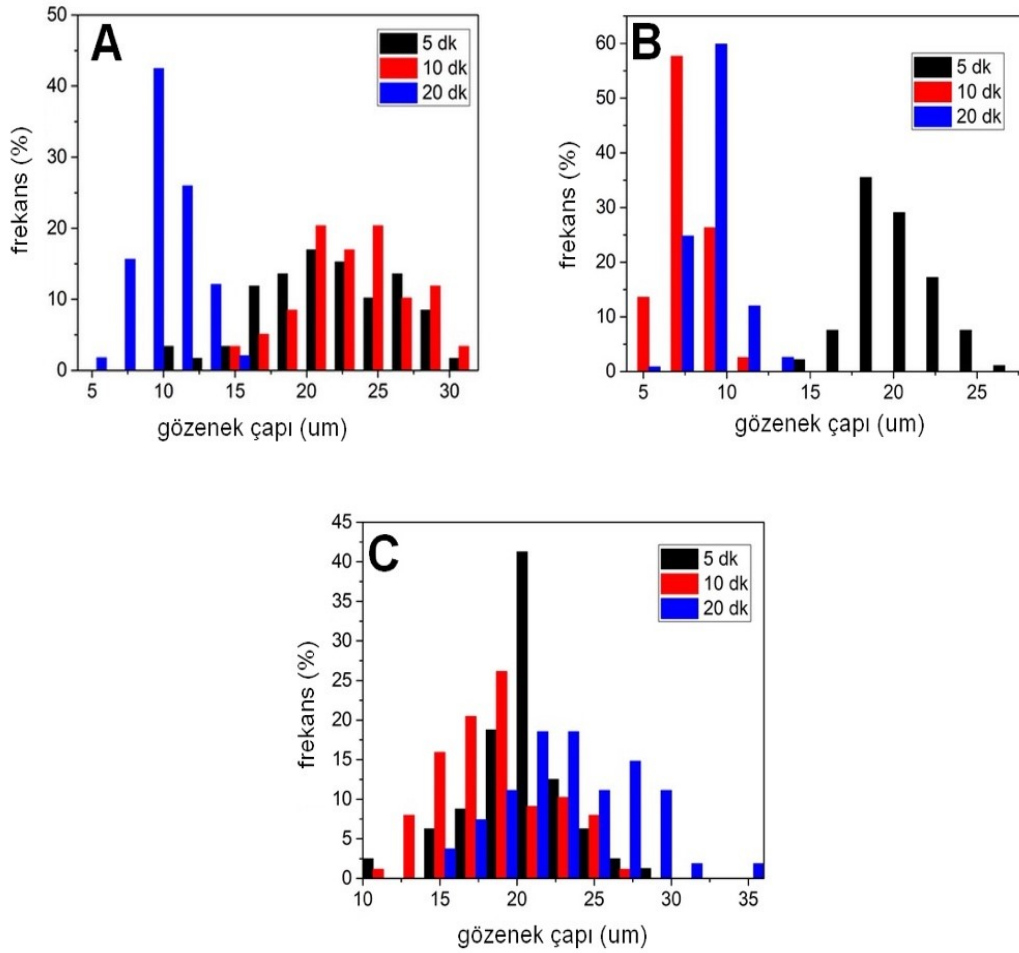
PU filmlerin bağıl nem oranına ve uygulama süresine bağlı olarak gözenek çaplarının dağılım grafikleri incelendiğinde gözenek çapı küçüldükçe, gözeneklerin eş boyutlu dağılım gösterdiği dikkat çekmektedir. Işık mikroskobu görüntüleri ile birlikte yorumlandığında, %60 bağıl nem oranında 20 dk (şekil 3(G)) ve %65 bağıl nem oranında 10 ve 20 dk’da (şekil (E ve H)) üretilen PU filmler hem daha küçük gözenek boyutuna hem de eş boyutlu gözeneklere sahiptirler.



**Şekil 2.** %60 Bağıl Ortam Neminde (A) 5 dk, (B) 10 dk, (C) 20 dk; %65 Bağıl Ortam Neminde (D) 5 dk, (E) 10 dk, (F) 20 dk; %70 Bağıl Ortam Neminde (G) 5 dk, (H) 10 dk ve (I) 20 dk Uygulama Süresinde Üretilen PU Filmlerin Işık Mikroskobu Görüntüleri (A, B, C, D, F, G ve I'daki Ölçekler 20 µm'yi, E ve H'deki Ölçekler 25 µm'yi İfade Etmektedir)

Gözeneklerine ilaç yüklü nanopartikül gömülmüş yara örtü malzemesi tasarımında film gözeneklerinin nispeten küçük ve eş boyutlu olması malzemenin etkinliğini artırmaktadır. Özellikle, gözeneklerin eş boyutlu olmasının ilaç salımı üzerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir (Anand ve

ark., 2015). Sunulan çalışmada, yara örtü malzemesi tasarımında kullanılacak PU filmin seçiminde bu kriterlerden yararlanılacaktır.



**Şekil 3.** %60 Bağlı Ortam Neminde (A), %65 Bağlı Ortam Neminde (B) ve %70 Bağlı Ortam Neminde (C) Farklı Uygulama Süresinde Üretilen PU Filmlerin Gözenek Çapı Dağılım Grafikleri

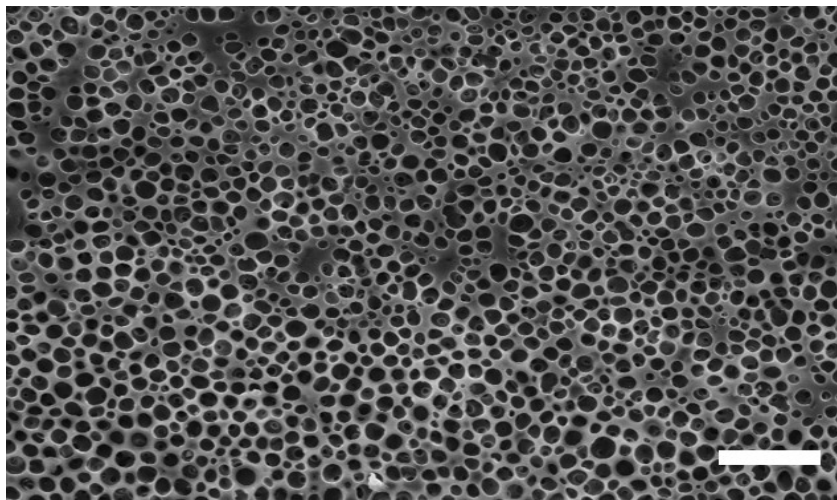
Yara örtü malzemelerinin dizayn edilmesinde en önemli parametrelerden biri malzemenin gözenekliliğidir. Özellikle gözenekler içerisinde nanopartiküllerin gömüldüğü malzemelerde gözeneklilik oranının yüksek olduğu malzemeler tercih edilmelidir. Gözenekli PU filmlerin ImageJ yazılımı ile yapılan morfolojik analizleri sonucunda elde edilen istatistiksel hesaplamalar Tablo 1’de verilmiştir. Hesaplamalara göre, daha önceki çıkarımlarımızla da uyumlu olarak %60 bağıl nem oranında 20 dk ve %65 bağıl nem oranında 10 ve 20 dk’da üretilen gözenekli filmlerin ortalama gözenek çapı sırasıyla  $9.8 \pm 1.9$ ,  $7.1 \pm 1.1$  ve  $8.9 \pm 1.2$  µm olarak hesaplanmıştır. Üretilen PU filmlerin gözeneklilik oranları incelendiğinde, bu üç örnekten %65 bağıl nem oranına 10 dk (Şekil 3.1(E)) maruz bırakılarak üretilen PU filmin %51.65 ile en yüksek gözeneklilik oranına sahip PU film olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki deneysel çalışmalarda ve yara örtü malzemesi tasarımında %65 bağıl nem oranına 10 dk maruz bırakılarak üretilen PU filmler kullanılacaktır.

Şekil 4’te %65 bağıl nem oranına 10 dk maruz bırakılarak üretilen PU filme ait SEM görüntüsü verilmiştir. ImageJ yazılımıyla yapılan analizler sonucunda filmin ortalama gözenek çapı ışık mikroskobu analizleriyle de uyumlu olarak  $6.90 \pm 1.03$  µm (n=120) olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 1.** Farklı Bağıl Nem Oranlarında ve Farklı Uygulama Sürelerinde Üretilmiş Gözenekli PU Filmlerin Fiziksel Özellikleri

Bağıl nem (%)	Uygulama süresi (dk)	Ort. gözenek çapı (µm)	Gözeneklilik (%)	Temas açısı (°)
60	5	21.9±4.6, n <sub>1</sub>	33.2±1.27	121
	10	23.4±3.9, n <sub>2</sub>	37.43±2.64	126
	20	9.8±1.9, n <sub>3</sub>	38.4±3.90	131
65	5	20.5±2.4, n <sub>4</sub>	44.75±3.23	126
	10	7.1±1.1, n <sub>5</sub>	51.65±4.22	128
	20	8.9±1.2, n <sub>6</sub>	41.45±1.76	130
70	5	20.2±3.1, n <sub>7</sub>	37.73±2.31	123
	10	18.45± 3.6, n <sub>8</sub>	35.10±1.12	126
	20	23.3±4.2, n <sub>9</sub>	33.74±1.93	121

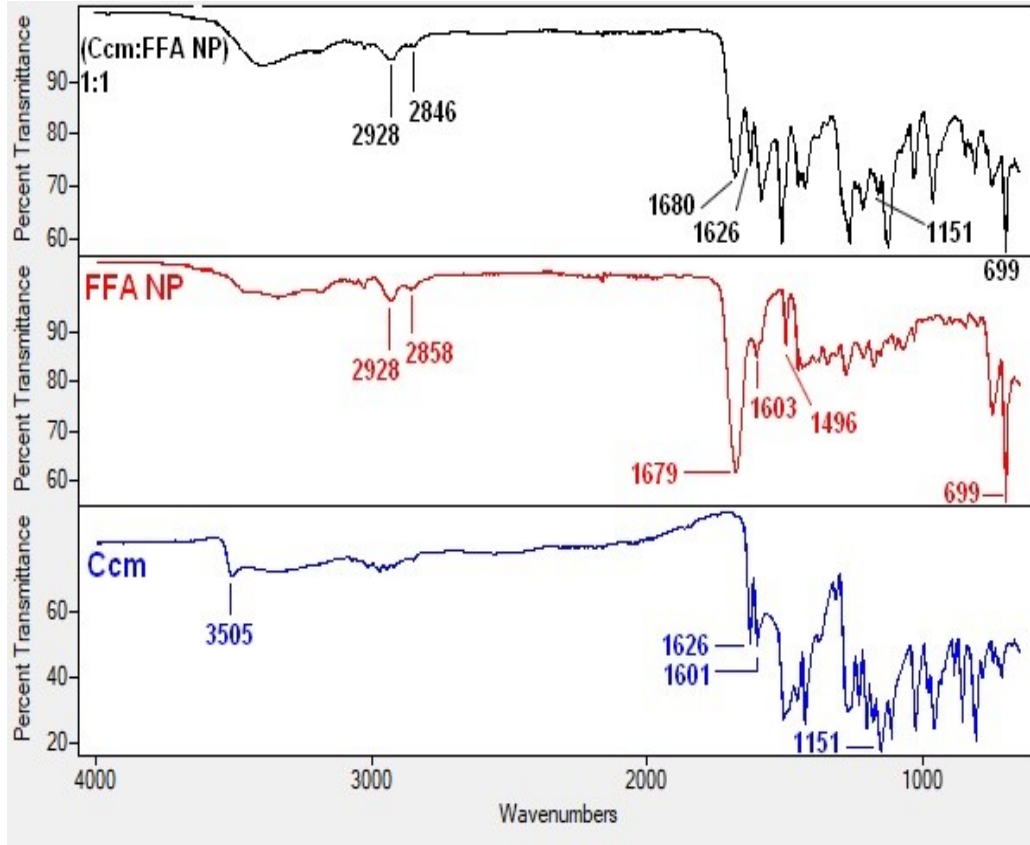
Not: n<sub>1</sub> - n<sub>4</sub> = 50, n<sub>5</sub>- n<sub>9</sub> = 100. Standart sapma (±SS).

**Şekil 4.** %65 Bağıl Nem Oranına 10 dk Maruz Bırakılarak Üretilen PU Filmin SEM Görüntüsü (ölçek 40 µm)

#### Kurkumin yüklü FFA peptit nanopartiküllerin (FFA/Ccm NP) karakterizasyonu

FFA nanopartiküllere kurkumin yüklemesi çalışmalarında Ccm: FFA oranı 0.2:1, 0.4:1, 0.6:1, 0.8:1 ve 1:1 (M/M) olacak şekilde farklı Ccm ve FFA oranları değerlendirilmiştir. Ccm, FFA nanopartikül ve FFA/Ccm nanopartiküllerin (Ccm: FFA, 1:1) FTIR spektrumları şekil 5'te verilmiştir. Spektrum incelendiğinde, FFA nanopartiküller (kırmızı spektrum) için amid I bandındaki 1679 cm<sup>-1</sup> C=O gerilme ve 1603 cm<sup>-1</sup> -NH<sub>2</sub> bükülme titreşimleri ile 1496 cm<sup>-1</sup> aromatik C=C gerilme titreşimleri karakteristiktir. Hatta, 1679 cm<sup>-1</sup>'deki pik FFA dipeptidinin kendiliğinden düzenlenmesinin β-tabaka konformasyonda olduğunu işaret etmektedir (Altunbas ve ark., 2011). 2928 ve 2846 cm<sup>-1</sup> C-H gerilme titreşimleri ve 699 cm<sup>-1</sup>'deki benzen halkasına ait pik de yine FFA nanopartiküllere karakteristik olan piklerdir (Bozdoğan ve ark., 2017)). Kurkumine ait spektrumda ise, 3505 cm<sup>-1</sup> O-H, 1626 cm<sup>-1</sup> C=C gerilme, 1601 cm<sup>-1</sup> simetrik aromatik halka gerilme ve 1151 cm<sup>-1</sup> C-O gerilme titreşimleri kurkumin için karakteristiktir (Ghaee ve ark., 2019). Kurkumin yüklü FFA nanopartiküllerin IR spektrumu incelendiğinde, FFA nanopartiküle ait 699, 1680, 2928, 2846 cm<sup>-1</sup> ve kurkumine ait 1626 ve 1151 cm<sup>-1</sup> absorpsiyonlardaki piklerin birlikte yer aldığı görülmektedir. Bu sonuç, kurkumin ve FFA dipeptidinin birlikte düzenlenerek nanopartikül oluşturduğunu ispatlamaktadır.

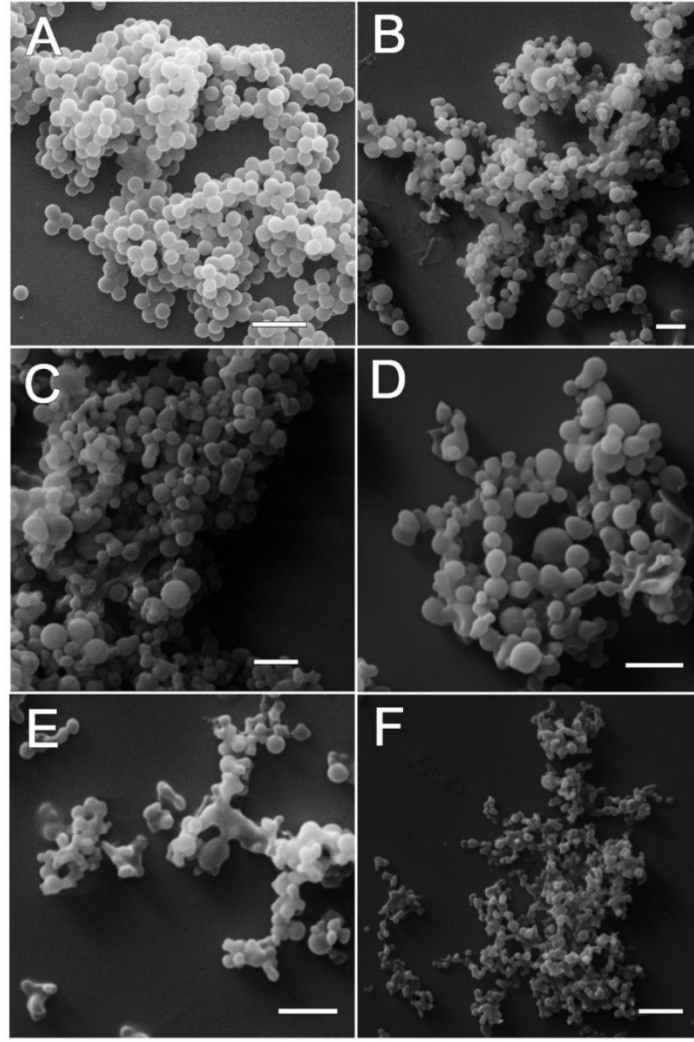




Şekil 5. Ccm, FFA NP ve Ccm yüklü FFA Nanopartiküllerin FTIR Spektrumu

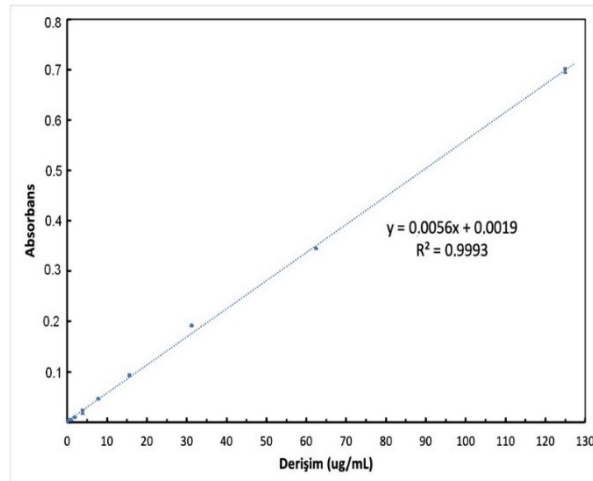
Aromatik halka ve amid grubu içeren birçok hidrofobik ilaç kendiliğinden düzenlenen peptitlerle  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri ve hidrojen bağları yaparak birlikte düzenlenebilmektedirler (ing.; coassembly). Bu peptit/ilâç birlikte düzenlenmesi akıllı ilâç yükleme metodu olarak literatürde yerini almıştır (Shi ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2018). Bu yöntemle, oldukça yüksek yükleme verimi ve kapasitesi ve müthiş bir homojenite sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, enkapsüle edilen hidrofobik ilâç uzatılmış salım kinetiğiyle salınmaktadır (Zhang ve ark., 2019) Çalışmada kullanılan Ccm ve FFA kimyasal yapılarında aromatik halka bulundurmaktadır (Şekil 1). Bu sayede, peptit/ilâç birlikte düzenlenmesi yaparak nanopartikül oluşturdıkları düşünülmektedir.

FFA/Ccm nanopartiküllerin morfolojik analizleri taramalı elektron mikrografları üzerinde ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Şekil 6'da kurkumin yüklenmemiş ve farklı oranlarda kurkumin yüklenmiş FFA nanopartiküllerin SEM görüntüleri yer almaktadır. Görüntüler analiz edildiğinde, Ccm yüklenmemiş FFA nanopartiküllerin ortalama çapı  $553 \pm 40$  nm iken, 0.2:1 oranında Ccm yüklenmiş FFA nanopartiküllerin ortalama çapı  $720 \pm 194$  nm'ye yükselmiştir ( $n=100$ ). 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 oranında Ccm yüklenmiş FFA nanopartiküllerin ortalama çapları sırasıyla  $601 \pm 126$ ,  $583 \pm 153$ ,  $447 \pm 115$  ve  $289 \pm 60$  nm olarak hesaplanmıştır ( $n=100$ ). Sonuçlar incelendiğinde, FFA ve Ccm birlikte düzenlenmesi sürecinde Ccm derişimi arttıkça nanopartiküllerin boyutları küçülmekte ve polidispersiteleri artmaktadır.



Şekil 6. A) Kurkumin Yüklenmemiş, B) 0.2:1, C) 0.4:1, D)0.6:1, E)0.8:1 ve F) 1:1 Oranında Kurkumin Yüklenmiş FFA Nanopartiküllerin SEM Görüntüleri (ölçekler: 2 µm)

Kurkuminin nanopartiküllere enkapsüle olma verimini hesaplamak için ilk olarak standart Ccm çözeltilerinin 426 nm dalga boyundaki absorpsiyonları ile bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (şekil 7).



Şekil 7. Kurkumine Ait Derişim-Absorbans Kalibrasyon Grafiği ve Doğru Denklemi (n=3)

Kalibrasyon doğrusundan yola çıkarak nanopartiküllerin yıkama sularındaki kurkumin miktarları belirlenmiş ve nanopartikülün kurkumini % enkapsüle etme verimi ve kapasitesi hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 2’de verilmiştir. Buna göre, FFA nanopartiküller 0.2 ve 1 mg/mL aralığında farklı derişimlerde kurkumini yaklaşık %99 verimle enkapsüle edebilmektedir. Yani FFA dipeptidi, kendi ağırlığı kadar kurkumini bünyesine hapsedebilmektedir. Bu olağanüstü bir yükleme kapasitesidir ve bir akıllı ilaç yükleme yöntemi olan peptit/ilaç birlikte düzenlenmesinin bir sonucudur.

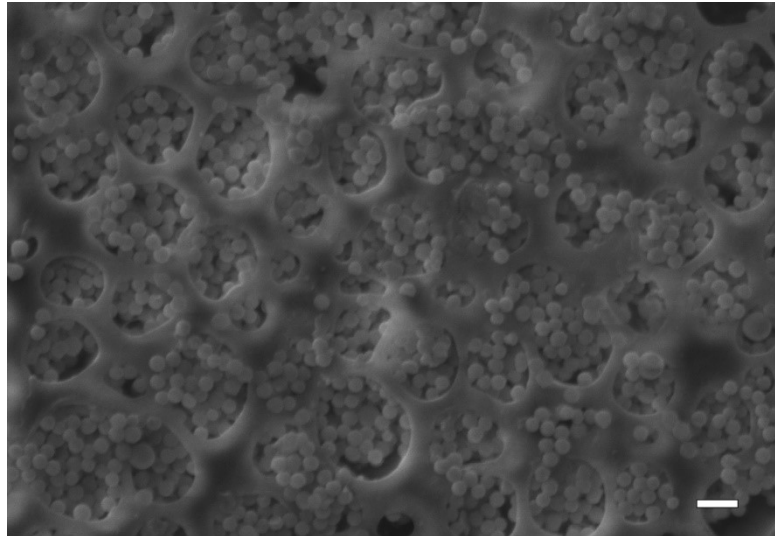
**Çizelge 2.** Nanopartikülün Enkapsülasyon Verimi ve Kapasitesi (n=3)

Ccm:FFA	Enkapsülasyon Verimi (%)	Enkapsülasyon Kapasitesi (%)
0.2:1	99.0	16.5
0.4:1	99.4	28.4
0.6:1	99.4	37.3
0.8:1	99.5	44.3
1:1	99.4	49.8

Standart sapmalar ihmal edilebilecek kadar küçük olduğu için tabloya eklenmemiştir.

### PU Film-FFA/Ccm nanopartikül hibrit yapıların üretilmesi

FFA/Ccm nanopartiküllerin PU filmin gözenekleri içinde düzenlenmesi nanopartikül dispersiyonunun direk olarak film yüzeyine damlatılıp kurutulması yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, benzer hidrofobik karakterde olan PU film ve FFA/Ccm nanopartiküller hidrofobik ve nonkovalent güçlerin etkisiyle düzenlenmiştir. Hibrit filmin SEM görüntüsü (Şekil 8) incelendiğinde film gözeneklerinin başarılı bir şekilde tamamen nanopartiküllerle kaplandığı dikkat çekmektedir. Nanopartiküller PU filmin tüm gözeneklerini doldurmuştur.

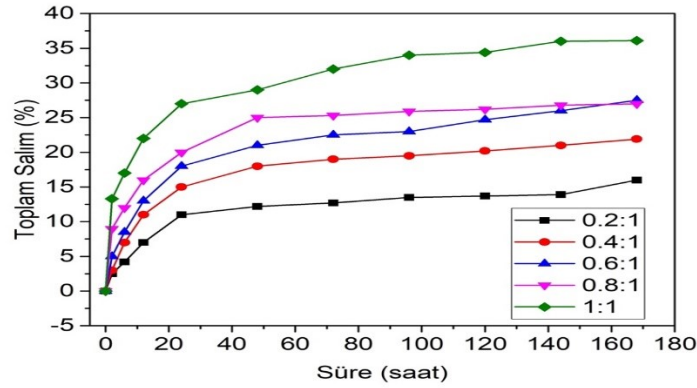


**Şekil 8.** Ccm:FFA Oranı 0.2:1 Olan Nanopartikül – PU Hibrit Filmin SEM Görüntüsü (ölçek 2 µm)

### Film-nanopartikül hibrit yapılardan in vitro kurkumin salımı

Hibrit yara örtü malzemesinin simüle edilmiş yara sıvısı içerisinde 37°C’de 7 gün boyunca kaydedilmiş kurkumin salım grafiği şekil 9’da verilmiştir. Grafiğe göre, hibrit filmlerin kurkumin salım kinetiği uzatılmış sürekli salım profili göstermektedir. 7 gün sonunda 0.2:1 Ccm/FFA NP bünyesindeki ilacın %16.4’ünü; 0.4:1 Ccm/FFA NP %21.9’unu; 0.6:1 Ccm/FFA NP %27.5’ini. 0.8:1 Ccm/FFA NP %27’sini ve 1:1 Ccm/FFA NP ise %36.1’ini salmıştır. Yapıya daha fazla kurkumin yüklenebiliyor olması daha fazla toplam kurkumin salımına neden olmaktadır. İlk 24 saatte ani salım (ing.; burst release) olması kurkumin salımının difüzyon kontrollü salım mekanizmasıyla kontrol edildiğini göstermektedir. İlk 24 saatten sonra tüm partiküllerden kurkumin salım hızı azalmaktadır.

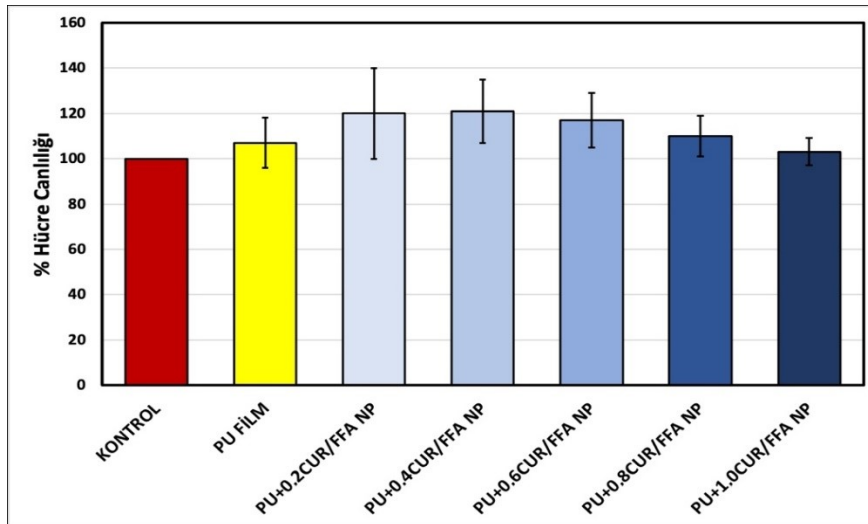
Bu geciktirilmiş kurkumin salımı ve ayarlanabilir salım derişimi, kurkumin ve FFA dipeptidi arasındaki  $\pi$ - $\pi$  etkileşimine atfedilebilir (Zhang ve ark., 2019).



Şekil 9. Ccm/FFA Nanopartiküllerin Kurkumin Salım Grafiği

### Sitotoksosite testleri

Geliştirilen hibrit yara örtüsü ile gerçekleştirilen sitotoksosite testlerinin sonuçları şekil 10'da verilmiştir. Buna göre, yara örtü malzemesi olarak geliştirilen hibrit filmlerin L929 fare fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediği % hücre canlılığı hesaplamalarından anlaşılmaktadır. Kontrol grubu olarak serumsuz DMEM besiyeri kullanılmıştır ve buradaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm deney grupları kontrol grubuna göre yüzde hesaplanarak verilmiştir. Hem PU film %107 canlılık oranıyla hem de deney grupları Ccm:FFA oranları 0.2:1, 0.4:1, 0.6:1, 0.8:1 ve 1.0:1 olan hibrit filmler sırasıyla %120, %121, %117, %110 ve %103 hücre canlılığı oranlarıyla L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir.



Şekil 10. Geliştirilen Yara Örtü Malzemelerinin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattıyla Gerçekleştirilen MTT Sitotoksosite Analizi

### SONUÇ

Bu çalışmada etken madde olarak kurkumin yüklenmiş peptit nanopartiküllerin gözenekli poliüretan filmin gözenekleri arasına gömülerek elde edilen hibrit yapının yara örtü malzemesi olarak kullanımına yönelik ilaç yükleme ve salım kinetikleri ve sitotoksitesi araştırılmıştır. Nefes figürü yönteminin parametreleri değerlendirilerek nanopartikül gömülmeye ve yara örtü malzemesi olarak tasarlanmaya en uygun gözenekli filmin üretilebilmesine elverişli parametreler belirlenmiştir. Çalışmanın devamında, hibrit sistemin bir diğer bileşeni olan etken madde yüklü peptit nanopartiküller



değerlendirilmiştir. Geliştirilen hibrit sistem, peptit-ilaç birlikte düzenlenmesi olgusuna atfedilen yüksek ilaç yükleme verimi ve kapasitesi ile öne çıkmaktadır. Hibrit yara örtü malzemesi geciktirilmiş kurkumin salımı ve yüklenen kurkumin miktarıyla ayarlanabilir salım derişimi sergilemiştir. Diğer taraftan hibrit yara örtü malzemesi sitotoksik etki göstermemektedir. Yani, biyoyumludur. Bu haliyle çalışma literatüre çok önemli katkılarda bulunmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2019-036.

Bu çalışmaya verdiği destekler için Hacettepe Üniversitesi, Jeoloji Mühendisliği, Elektronik Mikroskopu Operatörü Mehmet Özcan'a teşekkür ederim.

## Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akbik, D., Ghadiri, M., Chrzanowski, W., ve Rohanzadeh, R. (2014). Curcumin as a wound healing agent. *Life Sciences*, 116(1), 1-7.
- Alam, S., Panda, J.J., ve Chauhan, V.S. (2012). Novel dipeptide nanoparticles for effective curcumin delivery. *Int J Nanomedicine*, 7, 4207-4222.
- Altunbas, A., Lee, S.J., Rajasekaran, S.A., Schneider, J.P., ve Pochan, D.J. (2011). Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 32(25), 5906-5914.
- Anand, S., Rykaczewski, K., Subramanyam, S.B., Beysens, D., ve Varanasi, K.K. (2015). How droplets nucleate and grow on liquids and liquid impregnated surfaces. *Soft Matter*, 11(1), 69-80.
- Berthet, M., Gauthier, Y., Lacroix, C., Verrier, B., ve Monge, C. (2017). Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol*, 35(8), 770-784.
- Bozdoğan, B., Akbal, Ö., Çelik, E., Türk, M., ve Denkbaş, E.B. (2017). Novel layer-by-layer self-assembled peptide nanocarriers for siRNA delivery. *RSC Advances*, 7(75), 47592-47601.
- Chen, S., Lu, X., Huang, Z., ve Lu, Q. (2015). In situ growth of a polyphosphazene nanoparticle coating on a honeycomb surface: facile formation of hierarchical structures for bioapplication. *Chemical Communications*, 51(26), 5698-5701.
- Cong, H., Wang, J., Yu, B., ve Tang, J. (2012). Preparation of a highly permeable ordered porous microfiltration membrane of brominated poly(phenylene oxide) on an ice substrate by the breath figure method. *Soft Matter*, 8(34), 8835-8839.
- Daban, G., Bayram, C., Bozdoğan, B., ve Denkbaş, E.B. (2019). Porous polyurethane film fabricated via the breath figure approach for sustained drug release. *Journal of Applied Polymer Science* 136(25), 47658.
- Dhivya, S., Padma, V.V., ve Santhini, E. (2015). Wound dressings - a review. *BioMedicine*, 5(4), 22-22.
- Eskandarinia, A., Kefayat, A., Agheb, M., Rafienia, M., Amini Baghbadorani, M., Navid, S. ve Ghahremani, F. (2020). A Novel Bilayer Wound Dressing Composed of a Dense Polyurethane/Propolis Membrane and a Biodegradable Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffold. *Scientific reports*, 10(1), 3063.
- Esmaceli, E., Eslami-Arshaghi, T., Hosseinzadeh, S., Elahirad, E., Jamalpoor, Z., Hatamie, S., ve Soleimani, M. (2020). The biomedical potential of cellulose acetate/polyurethane nanofibrous mats containing reduced graphene oxide/silver nanocomposites and curcumin: Antimicrobial performance and cutaneous wound healing. *Int J Biol Macromol*, 152, 418-427.
- Ferreira, A.M., Mattu, C., Ranzato, E., ve Ciardelli, G. (2014). Bioinspired porous membranes containing polymer nanoparticles for wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12), 4394-4405.

- Ghaee, A., Bagheri-Khoulenjani, S., Amir Afshar, H., ve Bogheiri, H. (2019). Biomimetic nanocomposite scaffolds based on surface modified PCL-nanofibers containing curcumin embedded in chitosan/gelatin for skin regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 177, 107339.
- Gong, C., Wu, Q., Wang, Y., Zhang, D., Luo, F., Zhao, X. ve Qian, Z. (2013). A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 34(27), 6377-6387.
- Gonzalez, A.C.O., Costa, T.F., Andrade, Z.A., ve Medrado, A.R. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91(5), 614-620.
- Jiang, L. ve Loo, S.C.J. (2021). Intelligent Nanoparticle-Based Dressings for Bacterial Wound Infections. *ACS Applied Bio Materials*, 4(5), 3849-3862.
- Kawano, T., Sato, M., Yabu, H., ve Shimomura, M. (2014). Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds prepared by the breath figure technique. *Biomaterials Science*, 2(1), 52-56.
- Kumaraswamy, P., Lakshmanan, R., Sethuraman, S. Krishnan, U. M. (2011). Self-assembly of peptides: influence of substrate, pH and medium on the formation of supramolecular assemblies. *Soft Matter*, 7(6), 2744-2754.
- Pandit, G., Roy, K., Agarwal, U. ve Chatterjee, S. (2018). Self-Assembly Mechanism of a Peptide-Based Drug Delivery Vehicle. *ACS omega*, 3(3), 3143-3155.
- Pankongadisak, P., Sangklin, S., Chuysinuan, P., Suwanton, O. ve Supaphol, P. (2019). The use of electrospun curcumin-loaded poly(L-lactic acid) fiber mats as wound dressing materials. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101121.
- Ren, X., Han, Y., Wang, J., Jiang, Y., Yi, Z., Xu, H. ve Ke, Q. (2018). An aligned porous electrospun fibrous membrane with controlled drug delivery - An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing with improved angiogenesis. *Acta Biomater*, 70, 140-153.
- Shi, Y., van der Meel, R., Theek, B., Oude Blenke, E., Pieters, E.H.E., Fens, M.H. ve Hennink, W. E. (2015). Complete Regression of Xenograft Tumors upon Targeted Delivery of Paclitaxel via  $\Pi$ - $\Pi$  Stacking Stabilized Polymeric Micelles. *ACS Nano*, 9(4), 3740-3752.
- Wan, L.S., Li, J.W., Ke, B.B. ve Xu, Z.K. (2012). Ordered Microporous Membranes Templated by Breath Figures for Size-Selective Separation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(1), 95-98.
- Yabu, H., Inoue, K. ve Shimomura, M. (2006). Multiple-periodic structures of self-organized honeycomb-patterned films and polymer nanoparticles hybrids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 284-285, 301-304.
- Zhang, F., Hu, C., Kong, Q., Luo, R., ve Wang, Y. (2019). Peptide-/Drug-Directed Self-Assembly of Hybrid Polyurethane Hydrogels for Wound Healing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(40), 37147-37155.
- Zhou, L., Lv, F., Liu, L., Shen, G., Yan, X. ve Bazan, G. (2018). Cross-Linking of Thiolated Paclitaxel-Oligo(p-phenylene vinylene) Conjugates Aggregates inside Tumor Cells Leads to “Chemical Locks” That Increase Drug Efficacy. *Advanced Materials*, 30.