**T.C.**
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ALFA TOKOFEROL YÜKLÜ KARBOKSİMETİLSELÜLOZ KİTOSAN KOPOLİMERLERİNİN YARA ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

**MELİKE BİLGİÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN**
**DOÇ. DR. BANU MANSUROĞLU**

**EŞ DANIŞMAN**
**DOÇ. DR. NELİSA LAÇİN TÜRKOĞLU**

**İSTANBUL, 2017**

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# ALFA TOKOFEROL YÜKLÜ KARBOKSİMETİLSELÜLOZ KİTOSAN KOPOLİMERLERİNİN YARA ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Melike BİLGİÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 09.11.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman**

Doç. Dr. Nelisa Laçin TÜRKOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melike ERSÖZ

İstanbul Bilim Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

# ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve donanımlarıyla bana yol gösteren, her zaman benim için vakit ayıran değerli hocalarım ve danışmanlarım Doç. Dr. Banu Mansuroğlu'na ve Doç. Dr. Nelisa Laçin Türkoğlu'na çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarımda beni her türlü bilgisiyle aydınlatan ve her zaman yardımcı olabilme gayretini gösteren kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Hale Berber Yamak'a,

Yüksek lisans sürecinde tanıştığım ve her adımı, her heyecanı beraber deneyimlediğim sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Burcu Türkoğlu ve Araş. Gör. Fatma Şayan Poyraz'a,

Çalışmalarımda tecrübelerini esirgemeyen ve her zaman yardımcı olan Tayfun Acar, Uzman Elif Öztürk, Uzman Sabriye Sel'e,

Son olarak hayatım boyunca beni her alanda destekleyen, sevgi ve ilgilerini her daim hissettiren sevgili annem, babam, kardeşlerim ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

Kasım, 2017

Melike BİLGİÇ

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ ..... vi
KISALTMA LİSTESİ ..... vii
ŞEKİL LİSTESİ ..... viii
ÇİZELGE LİSTESİ ..... x
ÖZET ..... xi
ABSTRACT ..... xiii
BÖLÜM 1
GİRİŞ ..... 1
1.1 Literatür Özeti ..... 1
1.2 Tezin Amacı ..... 2
1.3 Hipotez ..... 2
BÖLÜM 2
GENEL BİLGİLER ..... 4
2.1 Yara İyileşmesi ..... 4
2.1.1 İnflamasyon ..... 5
2.1.2 Proliferasyon ..... 6
2.1.3 Maturasyon ..... 7
2.2 Modern Yara Örtüleri ve Sınıflandırılmaları ..... 7
2.2.1 Hidrojeller ..... 9
2.2.1.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması ..... 10
2.2.1.2 Hidrojellerin Kullanım Alanları ..... 11
2.2.1.3 Hidrojel Üretim Yöntemleri ..... 12
2.2.1.4 Hidrojellerin Biyomalzeme Olarak Kullanımı ..... 12
2.3 Kitosan ..... 13
2.4 Karboksimetilselüloz (CMC) ..... 15
2.5 Alfa Tokoferol (Vitamin E) ..... 17
2.6 Kompozit Hidrojel Karakterizasyonu ..... 19
2.6.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ..... 19
2.6.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ..... 20
2.6.3 Brunauer, Emmet ve Teller Deneyi (BET) ..... 21
2.6.4 Şişme Karakterizasyonu ..... 22

2.7 Kütle Spektrometresi ..... 23
2.7.1 Elektrosprey İyonlaştırma ..... 24
2.8 Floresan Mikroskopisi ..... 25
2.9 Hücre Kültürü ..... 26
2.10 Sitotoksisite Tayini ..... 27
2.10.1 MTT Testi ..... 28
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM ..... 29
3.1 Materyal ..... 29
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ..... 29
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar ..... 30
3.2 Yöntem ..... 30
3.2.1 Materyallerin Uygun Solventlerde Çözülmesi ..... 30
3.2.2 Hidrojel Sentezi ve Karakterizasyonu ..... 31
3.2.2.1 Hidrojel Sentezi ..... 31
3.2.2.2 Şişme Deneyi ..... 33
3.2.2.3 Spektroskopik Karakterizasyon (FTIR Analizi) ..... 34
3.2.2.4 SEM Analizi ..... 34
3.2.2.5 BET Analizi ..... 34
3.2.3 Vitamin Yükleme ve Salım ..... 34
3.2.3.1 Vitamin E için Standart Eğri Hazırlanması ..... 35
3.2.3.2 Vitamin E Yükleme ..... 35
3.2.3.3 Salınım ..... 35
3.2.4 Hidrojelin İn Vitro Etkisinin İncelenmesi ..... 35
3.2.4.1 Tamamlanmış Medyum Hazırlanması ..... 36
3.2.4.2 Fibroblast Hücre Kültürü ..... 36
3.2.4.3 Hidrojel ile Fibroblast Hücrelerinin Etkileştirilmesi ..... 37
3.2.4.4 MTT (Sitotoksisite Deneyi) ..... 37
BÖLÜM 4
SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 40
4.1 Hidrojel Karakterizasyon Çalışmaları ..... 40
4.1.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ..... 41
4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ..... 43
4.1.3 BET Analizi ..... 45
4.1.4 Şişme Kapasitesi ..... 46
4.1.4.1 pH Değerinin Membranın Şişme Karakterine Etkisi ..... 46
4.1.4.2 Yüzde Şişme Oranı ..... 47
4.2 Vitamin E Salımı ve Standart Eğrinin Belirlenmesi ..... 47
4.2.1 Vitamin E'ye ait LOD ve LOQ Değerleri ..... 48
4.2.2 Hidrojele Yüklenen Vitamin E Hesabı: ..... 48
4.3 İn vitro Çalışmalar ..... 51
4.3.1 Sitotoksisite (MTT) ..... 51
4.3.2 Elüsyon Metodu ..... 51
KAYNAKLAR ..... 56
ÖZGEÇMİŞ ..... 63

## SİMGE LİSTESİ

Q Yüzde şişme oranı
$W_0$ Kuru hidrojel ağırlığı
$W_t$ T süre sonunda şişmiş hidrojel ağırlığı
$OD570_e$ Test numunelerinin 570 nm'deki absorbansı
$OD570_b$ Kontrol grubu numunelerin 570 nm'deki absorbansı
µl Mikrolitre

## KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| BET | Brunauer, Emmet ve Teller |
| CMC | Karboksimetil Selüloz |
| CHI | Kitosan |
| DMEM | Besi Ortamı |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| DSI | Denge Sıvı İçeriği |
| ESI-MS | Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrumu |
| FBS | Fetal Bovin Serum |
| FIR | Uzak dalga boylu kızıl ötesi |
| FT-IR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| IPN | İnterpenetre ağları |
| IR | Kızılötesi Spektroskopi |
| LOD | Algılama sınırı |
| LOQ | Kantitatif ölçme sınırı |
| MIR | Orta dalga boylu kızıl ötesi |
| ml | Mililitre |
| MTT | (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid) |
| NIR | Yakın dalga boylu kızıl ötesi |
| nm | Nanometre |
| OD | Optik Yoğunluk |
| PBS | Potasyum Fosfat Tamponu |
| pH | Hidrojen gücü |
| ppm | Milyon başına düşen parça |
| Q-TOF | Uçuşun kuadropol süresi |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskopisi |

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa


Şekil 2.1 Yara iyileşme sürecinde birbiri içine geçmiş iyileşme evreleri..... 5
Şekil 2.2 Modern yara örtü alternatifleri a) Alginat yara örtüsü, b) Transparan poliüretan, c) Hidrojel yara örtüsü, d) Hidrokoloid yara örtüsü, e) Silikon içerikli köpük yara örtüsü, f) Poliüretan köpük yara örtüsü [17] ..... 9
Şekil 2.3 Hidrojelin ağ yapısının şematik gösterimi ($M_c$; polimer zincirler arasındaki çapraz bağların moleküler ağırlıkları, ξ; moleküler ağ boyutu) [18] ..... 10
Şekil 2.4 Kitosanın moleküler yapısı ..... 13
Şekil 2.5 Kitosanın yara yatağındaki etkisi..... 15
Şekil 2.6 Selülozun (a), Kitosanın (b) ve Kitinin (c) Kimyasal Yapısı [56] ..... 16
Şekil 2.7 CMC'nin yapısal gösterimi [59] ..... 16
Şekil 2.8 Tokoferol ve Tokotrienollerin kimyasal yapıları [70]. ..... 18
Şekil 2.9 FT-IR spektrometre şematik görünümü..... 20
Şekil 2.10 Taramalı elektron mikroskobu şematik görünümü [85]..... 21
Şekil 2.11 Bir kütle spektrometrenin şematik diyagramı [93]..... 23
Şekil 2.12 Floresansın temel fizik kuramı (A), uygulama ile ilgili şematik görünüm (B), epi-floresan mikroskop [94]..... 25
Şekil 3.1 Karboksimetilselülozun(CMC) %1'lik çözeltisinin hazırlanması (a), Kitosanın %1 lik çözeltisinin hazırlanması(b) ..... 31
Şekil 3.2 Hidrojel sentezi için kullanılan düzenek..... 32
Şekil 3.3 Hidrojel sentezinin sıcak su banyosunda bekletilme düzeneği ..... 33
Şekil 3.4 MTT çalışmasında kontrol grubu fibroblast hücreleri(solda), MTT uygulaması ile formazan yapısı oluşmuş kontrol grunu hücrelerin mikroskop görünümü (sağda)..... 38
Şekil 4.1 Sentezlenmiş olan CMC-kitosan hidrojel boyutu(Solda), Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan hidrojel kesiti(Sağda) ..... 40
Şekil 4.2 Hidrojelin sentezinde kullanılan saf CMC ve kitosan polimerler ve CMC-kitosan hidrojelin FT-IR analizi ..... 41
Şekil 4.3 Farklı MBA değerleri (M1: 100µL, M2: 200µL, M3: 400µL, M4: 800µL) ile sentezlenen CMC-kitosan hidrojellerin FT-IR analizi ..... 42
Şekil 4.4 Farklı oranlarda APS kullanılarak hazırlanan CMC-kitosan hidrojelin FT-IR analizi (A1:0,5 ml, A2:1 ml, A3:1,5 ml, A4:2 ml) ..... 42
Şekil 4.5 100µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile) ..... 44

Şekil 4.6 200µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile) ..... 44
Şekil 4.7 400µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile) ..... 45
Şekil 4.8 800µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC: kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile) ..... 45
Şekil 4.9 Hidrojelin BET analizi ile belirlenen özellikleri ..... 46
Şekil 4.10 pH değerinin membran şişme özelliğine etkisi ($37^0$C'de) ..... 46
Şekil 4.11 Vitamin E standart eğri grafiği ..... 48
Şekil 4.12 2.gün salım değerlerini gösteren örnek +ESI EIC kromotogram ..... 50
Şekil 4.13 Hidrojelden Vitamin E salım miktarını belirten grafik ..... 50

# ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa


Çizelge 2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılmaları ..... 11
Çizelge 2.2 Moleküler kütle spektrometride kullanılan iyon kaynakları [93] ..... 24
Çizelge 4.1 CMC ve kitosan saf polimerlerinin FT-IR analizine göre sahip olduğu fonksiyonel gruplar ..... 43
Çizelge 4.2 CMC-kitosan hidrojelin ortalama % şişme oranı ..... 47
Çizelge 4.3 Hidrojele yüklenemeyen vitamin E miktarları ..... 49
Çizelge 4.4 Günlere göre Vitamin E sinyal ve salım miktarı ..... 49
Çizelge 4.5 MTT çalışmasına göre belirlenen yüzde canlılık değerleri ve ortalamaları ..... 51
Çizelge 4.6 Elüsyon metodu uygulanan hücrelerin 570nm'de gösterdiği canlılık değerleri (24 saat) ..... 51

# ÖZET

## ALFA TOKOFEROL YÜKLÜ KARBOKSİMETİLSELÜLOZ KİTOSAN KOPOLİMERLERİNİN YARA ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Melike BİLGİÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Eş Danışman: Doç. Dr. Nelisa LAÇİN TÜRKOĞLU

Bu çalışmada yara yüzeyinde hava sirkülasyonunu ve yaranın nemli kalmasını sağlayan, yara üzerinde bakteri kontaminasyonuna izin vermeden yaranın sağlıklı iyileşebilmesine olanak sağlayan bir yara örtü materyali sentezinin gerçekleştirmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yara bölgesinde hücresel yenilenmenin ve doku onarımını gerçekleştirilmesini sağlayacak etkenler ile bu yara örtü materyali aktifleştirilmiştir. Hazırlanan biyomalzemenin; hücrelere toksik olmaması, biyo-bozunur özellikte olması, membrana yüklenen tokoferol ile doku onarımına ve hücresel yenilenmeye destek olması önemli özellikleridir. Bunun yanı sıra ekonomik bir üretim prosesine sahip ve sağlık açısından güvenilir olması, söz konusu hidrojellerin modern yara örtüsü alternatifleri içerisinden tercih edilebilmesini sağlayabilecektir.

Bu amaçla; kitosan ve karboksimetilselüloz (CMC) polimerlerinden, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-(bis)akrilamid (MBA) ve başlatıcı-katalizör olarak amonyumpersülfat (APS) kullanımıyla gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucunda bir kopolimer sentezlenmiştir. Sentezlenen hidrojelin karakteristik özellikleri; Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spektroskopi FT-IR), yüzey alanı ölçüm analizi (Brunauer, Emmet ve Teller BET), taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope SEM) analizleri ile belirlenmiştir. Vitamin E (Alfa tokoferol)'nin sentezlenen bu hidrojele yüklenmesi sağlanarak aktif bir yara örtüsü materyali oluşturulmuştur. Sentezlenen biyomalzemenin, in vitro şartlarda fibroblast hücreleri ile muamelesi sonucu, hücrelerin kendisine tutunmasını sağlanmış ve hücre sayısında artış meydana gelmiştir. Hücrelerin canlılık analizi 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. Dolayısıyla sentezlenen bu yara örtü materyalinin, yara koşullarına uygulandığı takdirde

de yara bölgesindeki iyileşmede önemli rol oynayan fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu sağlayacağı ve yaranın ilaç içermeyen yara örtülerinde kıyasla daha hızlı bir şekilde iyileşmesinin gerçekleşeceği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Karboksimetilselüloz (CMC), kitosan, hidrojel sentezi, yara örtü materyali, alfa tokoferol

## ABSTRACT

# IN VITRO EVALUATION OF ALPHA TOCOPHEROL LOADED CARBOXYMETHYLCELLULOSE CHITOSAN COPOLYMERS AS WOUND DRESSING MATERIALS

Melike BİLGİÇ

Department of Molecular Biology and Genetics
MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Banu MANSUROĞLU
Co-Adviser: Assoc. Prof. Nelisa LAÇİN TÜRKOĞLU

In this study, it was aimed to realize a wound dressing material synthesis which enables the air circulation on the wound surface and the wound to remain moist, ensure healthy healing of the wound without allowing bacterial contamination on the wound. In addition, this wound covering material has been activated with factors that will enable cellular renewal and tissue repair in the wound area. The most important advantages of this biomaterial are those it is synthesized by nontoxic materials, it is a biodegradable substance, and it contains vitamin E which can be used for tissue repair and cellular renewal. Furthermore, this hydrogel will be able to be preferred within modern wound dressing alternatives by means of its affordable production process and reliability in terms of health.

For this purpose, a copolymer was synthesized from chitosan and carboxymethyl cellulose (CMC) polymers as a result of a chemical reaction at which N,N'-methylene-(bis)acrylamide (MBA) was used as crosslinker and ammonium persulfate (APS) was used as initiator-catalyst. Characteristic features of the synthesized hydrogel were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), surface area measurement (Brunauer, Emmet and Teller BET), and Scanning Electron Microscope (SEM) analyses. By loading vitamin E (alpha tocopherol) into this hydrogel, an effective wound dressing was created. As a result of in vitro treatment of fibroblast cells with this biomaterial, cell adhesion and proliferation were observed. Cell viability assay was performed with 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method. By this way, it was detected that if this synthesized wound dressing is applied

to any wound, it will provide an increase in fibroblast cells, which play an important role in healing in the wound area, and heal the wound quickly and successfully.

**Keywords:** Carboxymethylcellulose, chitosan, hydrogel synthesis, wound dressing material, alpha tocopherol

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Yara; vücudun herhangi bir yerindeki dokunun ameliyat, travma veya başka nedenlerle devamlılığının bozulmasına denir. Canlılar, oluşan yaraları tamir edebilir özelliğe sahiptir [1]. Tüm dünyada yara tedavisi uygulamaları ve araştırmalarında yara örtüleri önemli bir yer tutmaktadır. Yara iyileşmesi, insanoğlunun varlığından günümüze dek uğraştığı patofizyolojik bir olaydır. Modern çağda yara iyileşmesi için yeni bir anlayış ortaya çıkmıştır. Bu anlayışa göre; iyi bir yara iyileşmesi için uygun ortamın nemli, yeterli oksijen sirkülasyonu yapabilen ve yara bölgesini bakteriyel kontaminasyondan koruyabilen özellikte olması gerektiği savunulmaktadır. Bu yara bakım ürünleri yara bölgesini örterek, zarar görmüş dokuyu dış etkilerden koruyarak ve yapısı uygunsa hücre üretimini aktive ederek iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır [2]. Bu şartları sağlamak için de gelişen teknolojinin de katkısıyla çeşitli yara örtüleri geliştirilmiştir. Yara iyileşme süreci, birden çok aşamada gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Bundan dolayı tek tip yara örtüsü kullanımı söz konusu olmamaktadır. Yara örtü materyali, yaranın özelliklerine ve ihtiyaçlarına uygun olarak seçilmelidir. Yaranın akut, kronik, kuru, eksüdasyonlu ve enfektif tipine göre uygun bir yara örtüsü seçilmelidir. Ayrıca yara iyileşme süreci, birbirini izleyen farklı aşamalardan oluşmaktadır ve tüm bu aşamaların tedavi ihtiyacı tek tip yara örtüsü ile sağlanamamaktadır [2, 3]. Etkin yara tedavisi için; hastanın genel sağlık durumu, çevresel ve sosyal koşulları, bununla birlikte kullanılan yara örtüsünün kimyasal ve fiziksel özellikleri gibi değişik faktörler birlikte çok iyi değerlendirilmelidir. Bundan dolayı rutin kullanıma geçmeden önce yaranın tipi

ve yaralanma derecesi için uygun olabilecek yara örtülerinin etkinlikleri ve performansları göz önünde bulundurulmalıdır [4].

### 1.2 Tezin Amacı

Modern yara örtüsü malzemelerine yeni bir bakış açısı sağlayabilecek, yaranın özelliğine bağlı olarak optimum uygunluk sağlayabilecek ve yaranın en hızlı ve başarılı şekilde iyileşebilmesine olanak sağlayacak bir yara örtüsü oluşturmak güncel araştırmalar arasında önemli yer tutmaktadır. Bu amaçla; doğada yaygın bulunabilen, ekonomik ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikte polimerlerin kullanımı tercih edilmiştir.

Bu çalışma; yaranın nemli kalmasını ve hava sirkülasyonunu sağlayan, yara üzerinde bakteri kontaminasyonuna izin vermeden yaranın sağlıklı iyileşebilmesine olanak sağlayan bir yara örtü maddesinin tasarlanmasını ve en önemlisi de hidrojele vitamin E yüklenmesiyle yara yüzeyinde hücre canlılığı ve proliferasyonunun artmasını amaçlamıştır. Bu yara örtü materyalinin, vitamin E etkileşimiyle yara bölgesinde doku onarımını ve hücresel yenilenmenin gerçekleştirilmesini sağlaması hedeflenmiştir. Bu biyomalzemenin; biyo-bozunur özellikte olması, toksik özellik göstermeyen maddelerce sentezlenebilmesi, yapısındaki vitamin E ile doku onarımını ve hücresel yenilenmeyi sağlaması önemli avantajlarındandır. Bunun yanı sıra sağlık açısından güvenilir ve ekonomik bir üretim prosesine sahip olması, söz konusu hidrojellerin modern yara örtüsü alternatifleri içerisinden tercih edilebilmesini sağlayabilecektir.

### 1.3 Hipotez

Hidrojel yapısının yara örtüsü olarak kullanımı, güncel çalışmalarda sıklıkla vurgulanmaktadır. Kitosan ve karboksimetilselüloz polimerlerinden hidrojel sentezlemek ve bu hidrojeli yara örtüsü materyali oluşturmak için kullanmanın uygun olduğu varsayılmaktadır. Bu fikirden yola çıkılarak, sentezlenen hidrojelin vitamin E ile etkinleştirilerek aktif bir biyomalzeme oluşturması hedeflenmektedir. Vitamin E' nin doku onarımı ve hücre yenileyici özelliğinin, bir yara örtüsü malzemesi için oldukça önemli bir etki sağlayacağına inanılmaktadır. Bu çalışmaya göre; kitosan ve karboksimetilselüloz (CMC) ile başarılı bir hidrojel sentezi gerçekleştirilecek, vitamin E'nin sentezlenen hidrojele yüklenmesi ile aktif bir yara örtüsü materyali

oluşturulacaktır. Sentezlenen bu biyomalzemenin, in vitro şartlarda fibroblast hücreleri ile muamelesi sonucu, hücrelerin bu hidrojele tutunmasını sağlayacak ve hücre sayısında artış sağlayacaktır.

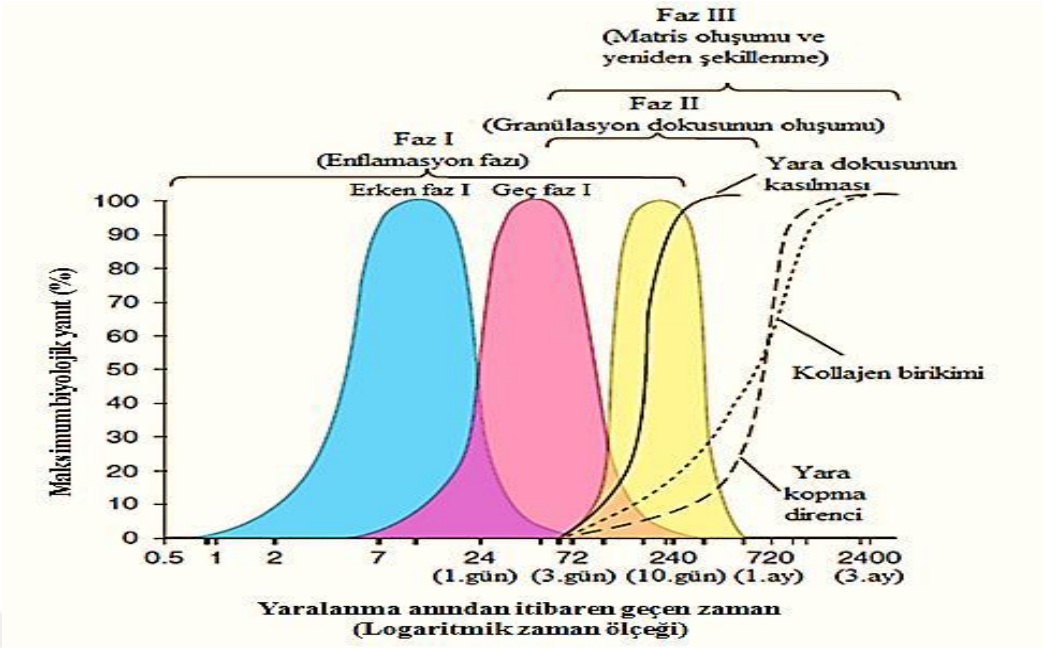
# BÖLÜM 2

# GENEL BİLGİLER

## 2.1 Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, kan hücreleri, çözünür ajanlar, parankimal hücreler ve ekstrasellüler matriks elemanlarının birlikte rol aldığı dinamik ve interaktif bir süreçtir [5]. Bir yaranın iyileşmesi, sadece yaranın olduğu bölge ile sınırlı olmayıp, tüm sistemleri barındıran fizyolojik, biyokimyasal ve hücresel olaylar bütünüdür. Yaralar aynı temel prensiple iyileşir ve yara iyileşmesi Şekil 2.1'de gösterildiği gibi temel olarak 3 aşamada gerçekleşir [1]:

- İnflamasyon
- Proliferasyon
- Maturasyon




Şekil 2.1 Yara iyileşme sürecinde birbiri içine geçmiş iyileşme evreleri [6]

### 2.1.1 İnflamasyon

İnflamasyon evresi yaranın ilk 1 – 5 gün sürecini kapsar. Doku zedelenmesiyle birlikte hücreler arası bilgi aktarımını sağlayan sitokinler ve birçok mediatör salınır. Bu maddeler aktivasyon ve inhibisyonlarla birçok kompleks olayı başlatır, hemostaz ve iyileşmeyi sağlarlar. Yara bölgesinde damar duvarı zedelendiğinde, trombositler açılan damar duvarında bulunan kollajenle temas eder, aktive olur ve birbirlerine yapışırlar. Bu aşamada trombositler, tromboksan A2 aktivasyonu ile geçici pıhtı oluşturup kanamayı azaltırlar. Daha sonraki aşamalarda vazokonstriksiyon gelişerek kanama daha da azalır. Trombositler, damar duvar hasarı ve tromboplastin gibi koagülasyon faktörleri ile birlikte pıhtılaşma döngüsü aktive olur. Döngü sonucunda oluşan fibrin ile trombositlerin oluşturduğu gevşek pıhtı sabit olur. Ardından prostaglandin ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile başlangıçta gelişen vazokonstriksiyon, yerini vazodilatasyon ve inflamasyona bırakır. Hücreler arasında inflamatuar eksuda toplanmaya başlar. Birçok kemotaktik faktörün etkisiyle nötrofil ve monositler bu sahaya toplanmaya başlar. Lökositler yara sahasındaki bakterilerle savaşırken, monositler de makrofaja dönüşerek çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlarlar. Yaralanmadan 72 saat sonra etkili olan hücreler makrofajlardır. Bu aşamada yeni damar oluşumları başlar. Fibroblastlar, yeni oluşan damarların

etrafında kollajen yapar ve ürettikleri proteoglikanlarla kollajenlerin birbirine bağlanmasını ve esnek olmalarını sağlarlar. Bunun yanı sıra ürettikleri fibronektin ile kollajen ve diğer hücreleri birarada tutarlar. 5.gün itibariyle granülasyon dokusu oluşumu başlar. Bu aşama için de iyi bir oksijenasyon ve beslenme şarttır [1, 7].

### 2.1.2 Proliferasyon

Proliferasyon evresi, yaranın 5. – 14.günler sürecini kapsar. Yaradaki inflamatuar hücrelerin sayısı azaldıkça; fibroblast, endotel ve keratinosit gibi hücreler büyüme faktörü salgılamaya devam eder [1]. Geçici ekstrasellüler matriks, granülasyon dokusu ile yer değişmeye başlar. Bu değişim, hücresel aşamada dermisin kalıcı üyelerinin yara bölgesinde oluşmasıyla kendini gösterir. Bu kalıcı üyeler fibroblast hücreleri ve onlar tarafından meydana getirilen kollojen ve kan damarlarıdır. Bu evrede kollojen üretimini sağlayan fibroblast hücreleri, yara çevresinden yara olan noktaya doğru göç ederler ve böylece kollojen üretimi/birikimi sağlarlar. Granülasyon dokusunun gelişimi, yeni damarların oluşum safhasını içeren anjiyogenezis ile karakterizedir. Granülasyon dokusu ayrıca, üretilen sitokin ve büyüme faktörleri sayesinde proliferatif faz ile inflamasyon fazı arasında köpri vazifesindeki makrofajları da içerir [8]. Fibroblastlar tarafından kollajen lifleri üretilir. Bu da yaranın gerilme kuvvetini ve kontraksiyonunu oluşturur. Yeni oluşan kollajen ve hidroksiprolin (kollajene helikal yapı veren molekül) ile birlikte deri yeniden eski direncini ve elastikiyetini kazanır. Eğer yara bölgesinde çok büyük doku kaybı varsa, rejenerasyon yara kenarlarından başlar ve epitel granülasyon dokusunun üzerinden ilerler. Epitellerin karşılıklı bir araya gelmesinin ardından kontraksiyon başlar ve böylece yara büyüklüğü azalır. Epitelizasyon tamamlanınca proliferasyon aşaması da sona erer [7].

Yaralanma bölgesinde bulunan sağlam kıl kökleri, keratinositler için depo görevi görmektedir. Keratinositlerden prolifere olanlar, yara içine doğru yönelirler ve yara kenarlarının birbirine doğru hareketine/yaklaşmasını, yaranın farklı kenarlarıda arasında hücre migrasyonunun gerçekleşmesini ve köprüler kurularak yara yüzeyinin küçültülmesini sağlarlar. Bu küçülme ile beraber proliferasyon evresi azalmaya başlar [9].

### 2.1.3 Maturasyon

Son aşamadır ve yıllarca sürer. Yara, noral dokuyu taklit etmeye başlar. Bu, kollojen liflerinin yeniden şekillenmesidir. Yara ortalama 6 hafta sonunda başlangıçtaki gücünün %95'ini kazanır [1, 7]. İnsanlarda yara maturasyonu; kızarma, yara kalınlığında azalma, yara kontraksiyonu (büzülme-kasılma) ve yara kuvvetinde artma şeklinde kararkterize edilir. Yara kontraksiyonu myofibroblastlar ile sağlanır. Bunlar, hücre içi aktin flamentrlerine sahip ve kontraksiyon karakterlerine sahip fibroblastlardır. Üzerlerindeki integrin molekülleri ile ekstrasellüler matrikse tutunurlar.

Bu evrede yaranın gerilmeye karşı dayanma kuvveti artarken, bununla zıt olacak şekilde yaranın kalınlığı azalmaktadır. Ekstrasellüler matriks bunu remodelizasyon özelliği ile sağlar. Yaralanmadan sonra kollajen üretimi yaklaşık 21.güne kadar sürekli artış gösterir. Ancak yaralanmanın daha sonraki günlerinde, ekstrasellüler matriksde artmış durumdaki kollajen miktarı, geri besleme mekanizması ile fibrobalstların kollojen üretimini azaltacak şekilde etki gösterir [10, 11].

Yaranın olması veya olmaması durumu farketmeksizin hücreleri destekleyen yapı ekstrasellüler matriks yapısıdır. Ekstrasellüler matriks, büyüme faktörleri ve sitokinleri bünyesinde barındıran depo görevi görür. Bu aşamada yara bölgesindeki fibroblast hücre sayısı azalmakta, dolayısıyla kollojen üretimi azalmaktadır. Bununla birlikte yaranın gerilim direnci artmakta, yara dokusunun hacmi azalmakta ve yara rengi soluklaşmaktadır [12].

Kollajen, en temel görevleri, dokuları deformasyonlara karşı koruyan ve dokulara şekil veren bir molekül olup bağ dokunun temel bileşeni konumundadır. Bunu sağlayan kollojen tipi olan tip 1 kollajen, vücuttaki kollajenin %90'ını oluşturmaktadır [12].

## 2.2 Modern Yara Örtüleri ve Sınıflandırılmaları

Her yara kendine has özellikler taşır ve çevresel faktörler gibi pek çok faktörden etkilenir [13]. Modern yara bakımı anlayışında esas olan, yaranın doğru değerlendirilmesi, gereksiniminin belirlenmesi ve yaranın nemli tutulmasıdır. Bununla birlikte yara bölgesinin bakteri ve yabancı maddelerden korunması, yara bölgesinde gaz alışverişine izin verilmesi ve yara çevresindeki sağlıklı dokuların zarar görmeden korunması ideal bir yara örtü materyalinde beklenen özelliklerdir. Yara örtü maddelerinin en önemli görevleri; nem oluşturmak, antitoksik özellik sağlamak,

pıhtılaşmayı sağlamak, yara izini gidermek, yara bölgesinde enfeksiyonu önlemek, ağrı/acı azaltıcı olmak, akıntıyı absorbe etmek, en uygun ısı sağlamak, dokuya az yapışma eğilimi göstermek, koku giderici olmak, fiziksel bariyer oluşturmak, kontaminasyonu engellemek ve yara çevresindeki mikrobiyal yapıyı kontrol atında tutmaktır [14]. Bu bağlamda yara iyi tanınmalı ve ihtiyacına uygun yara örtü materyali seçilmelidir [15, 16].

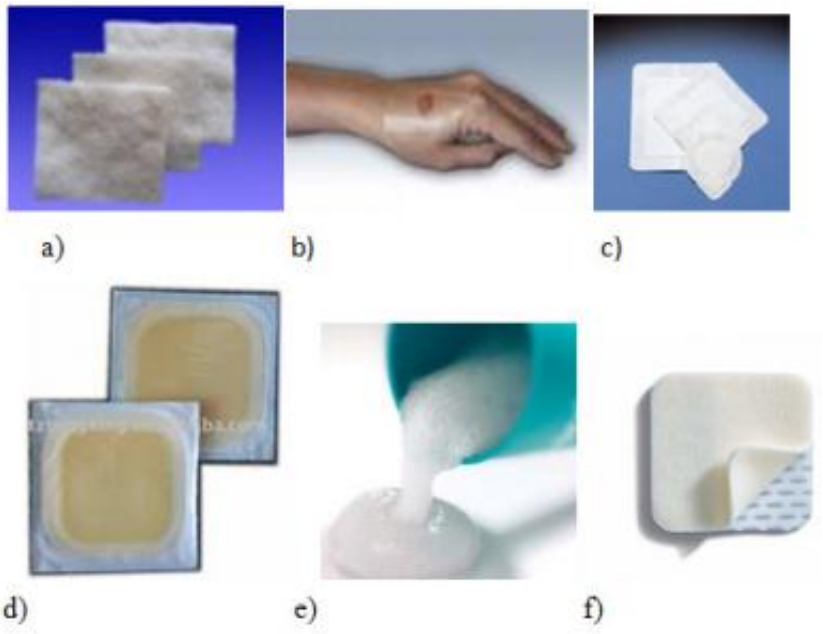
Genel olarak modern yara örtüleri aşağıdaki gibi sıralanabilir [4]. Modern yara örtüleri Şekil 2.2'de de görsel olarak ifade edilmiştir.

1. Üretildikleri materyale göre modern yara örtüleri
- Alginat örtüler
- Hidrokolloidler
- Hidrojeller

2. Fiziksel şekillerine göre modern yara örtüleri
- Köpükler
- Şeffaf filmler

3. Etken madde içeriğine göre modern yara örtüleri
- Antibakteriyel Etken Madde İçerenler
- Büyüme Faktörü İçerenler
- Vitamin ve Mineral İçerenler

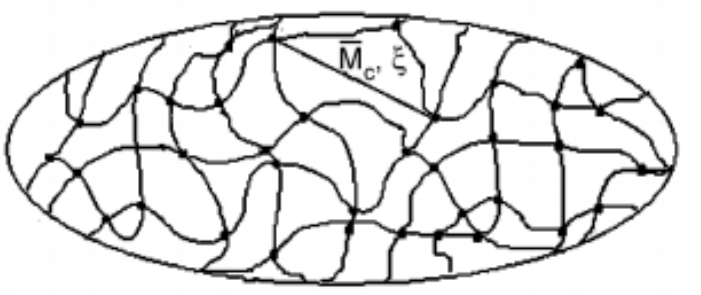
4. En güncel modern yara örtüleri
- Biyoaktif Yara Örtüleri
- Doku Mühendisliği Ürünleri
- Greft ve Greft Eşdeğerleri




Şekil 2.2 Modern yara örtü alternatifleri a) Alginat yara örtüsü, b) Transparan poliüretan, c) Hidrojel yara örtüsü, d) Hidrokoloid yara örtüsü, e) Silikon içerikli köpük yara örtüsü, f) Poliüretan köpük yara örtüsü [17]

### 2.2.1 Hidrojeller

Hidrojeller, sulu ortama maruz kaldıklarında çözünmeyen, çok sayıda hidrofilik grup içeren, suyun büyük miktarını içine alarak şişme davranışı gösteren, üç boyutlu ağ yapısına sahip biyopolimerlerdir. Ağ yapıları kovalent ve iyoniktir. Hidrofilik olmaları nedeniyle hidrofil polimerler olarak da adlandırılırlar [18]. Biyomalzemeler ve gıda alanında çalışan bilim insanları tarafından çapraz bağlı polimerik ağ yapılarını tanımlamak için jel ve hidrojel terimleri kullanılır. Jeller genelde seyrek çapraz bağlı hidrojeller olarak tanımlanırken, hidrojeller ise sentetik veya doğal polimerlerden elde edilen ve belli miktarda su absorblayarak bünyesinde tutan üç boyutlu ağ yapıları olarak bilinmektedir [19]. Yapılan çalışmalar, bu tip su tutma kapasitesine sahip biyomalzemelerin yara iyileşmesini desteklediğini göstermektedir [20]. Hidrojel sentezlenirken kullanılan polimerlerin yapısı ve ağ yapı düğüm noktalarının oranı gibi özelliklere bağlı olarak hidrojellerin özellikleri değişmektedir [18].



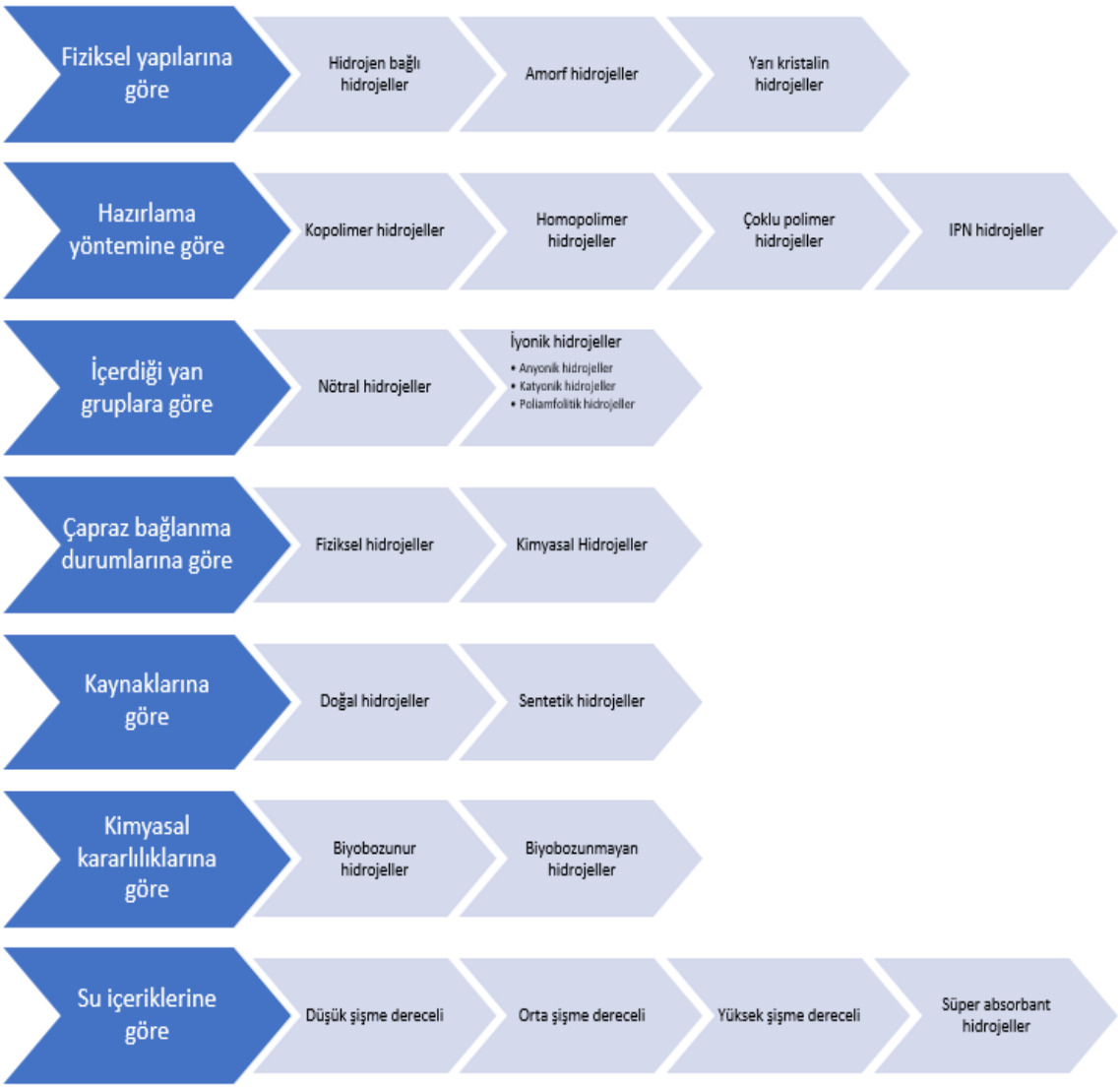

Şekil 2.3 Hidrojelin ağ yapısının şematik gösterimi ($M_c$; polimer zincirler arasındaki çapraz bağların moleküler ağırlıkları, ξ; moleküler ağ boyutu) [18]

Fiziksel ve kimyasal yapılarına bağlı olarak hidrojeller; nötral hidrojeller, iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller ve iyonik hidrojeller olmak üzere 3 tip hidrojel bulunmaktadır. Bir polimerin hidrojel yapısı sağlayabilmesi için; ana zincir ya da yan dallarında karboksil, karbonil, hidroksil, amin ve amid gibi hidrojen bağı yapabilme özelliği taşıyan hidrofilik grupların bulunması gerekmektedir. Bu gruplara bağlanan su molekülleri ile birlikte, çapraz bağlı polimer yapısı kütle ve hacim artışıyla beraber şişmeye başlar [18].

#### 2.2.1.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Polimer yapıdaki hidrojellerin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmaları Çizelge 2.1'deki gibidir [21-23].

Çizelge 2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılmaları




### 2.2.1.2 Hidrojellerin Kullanım Alanları

Sentetik veya doğal polimerler kullanılarak hazırlanan hidrojellerin çoğu doku mühendisliği uygulamaları, ilaç sanayii, biyomedikal uygulamaları ve arıtma gibi alanlarda kullanılmaktadır. Hidrojeller, yüksek su absorblama kapasiteleri ve biyouyumluluk özellikleri dolayısıyla; yara örtüleri, tarım, diş malzemeleri, implant, ilaç salınım sistemleri, kontakt lensler gibi birçok ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Kullanım alanına bağlı olarak hidrojellerin sentezlendiği polimerler değişkenlik göstermektedir [24].

Yara bakımı için kullanılacak olan hidrojeller; polietilen glikol, poli(laktikasit-glikolik asit) [24], polivinil alkol [25], glukomannan-polivinil prolidon [26], karboksimetil selüloz, aljinat, hyaluronan [27] polimerlerinden sentezlenebilmektedir.

İlaç salınım sistemleri için kullanılacak olan hidrojeller; kitosan-poli hidroksimetil akrilat [28], polivinil alkol, akrilik asit, metakrilik asit [29], kitosan, polietilenoksit [30], akrilik asit, karboksimetil selüloz [31] polimerlerinden sentezlenebilmektedir.

Diş malzemeleri için kullanılacak olan hidrojeller genellikle hidrokolloidlerden [32] sentezlenirken, doku mühendisliği ve implantlar için kullanılacak olanlar; polivinil alkol [33], aljinat [34] ve dekstran [35] kullanılarak sentezlenebilir.

Enjekte edilebilir sistemler için kullanılan hidrojeller; hyaluronik asit, polietilen glikol [36], dekstran, karboksimetil selüloz [37] polimerleri kullanılarak sentezlenebilir.

Kozmetik ve ilaç benzeri teknik ürünler için hazırlanan hidrojeller; nişasta [38], gum arabik [39] ve ksantan, pektin, alginat, heparin, kitin, kitosan [40] gibi polimerler kullanılarak sentezlenmektedir.

#### 2.2.1.3 Hidrojel Üretim Yöntemleri

Kimyasal çapraz bağlama, fiziksel çapraz bağlama, graftlama ve yüksek enerjili ışıma ile polimerizasyon başta olmak üzere bu gibi yöntemler kullanılarak hidrojel sentezi yapılabilmektedir.

Fiziksel çapraz bağlama; çapraz bağlayıcı gereksinimlerinin olmaması ve kolay üretimi sebebiyle daha çok kullanılmaktadır. Polimer çözeltilerinin ısıtılıp/soğutulması, iyonik etkileşim, H bağları vb. yöntemlerle fiziksel çapraz bağlama yöntemi gerçekleştirilebilmektedir.

Işıma ile çapraz bağlama da biyopolimerlerin biyouyumuluğunu koruması ve kimyasal katkı malzemelerinin kullanılmaması sebepleriyle sıkça kullanılmaktadır. Tek safhada sterilizasyon ve modifikasyonun gerçekleştirilebilmesi de bu yöntemi ekonomik hale getirmektedir. Yüksek enerjili ışımaya maruz kalan polimerler üzerindeki serbest radikal oluşumu ile bu yöntem özetlenebilmektedir [41].

Kimyasal çapraz bağlama; bir çapraz bağlayıcı kullanarak iki polimer zincirinin bağlanması veya monomerlerin polimer iskeleti üzerine graftlanması ile tanımlanabilmektedir [42].

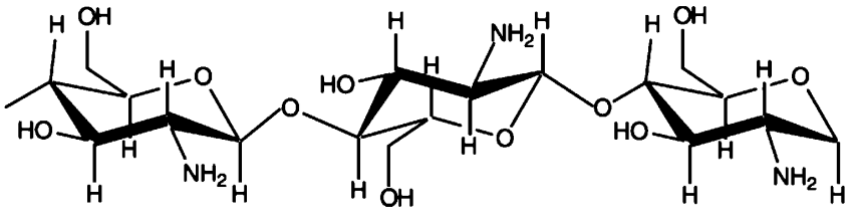
#### 2.2.1.4 Hidrojellerin Biyomalzeme Olarak Kullanımı

Hidrojellerin biyomalzeme olarak kullanımı, pek çok endüstri dalında oldukça yaygındır. Bu kullanımı aşağıdaki sebepler desteklemektedir [43];

- Hidrojeller, yumuşak yapılı malzemelerdir. İmplat olarak kullanımlarında, hidrojel implantının etrafında oluşan ve onu saran doku dayanıklı, ince ve kalınlaşma eğilimi göstermeyen yapıdadır.
- Hidrojeller, dokulara düşük de olsa yapışma özelliği göstermektedir.
- Hidrojeller, su absorblayabilme yetisine sahiptir. Kuru haldeki bir jel, belirli miktarda su absorblayabilir. Bu davranışı, hidrojelin biyomalzeme olarak kullanımında aşırı vücut sıvılarının atılmasında kullanılmaktadır.
- Hidrojeller vücut sıvılarına geçirgen olduklarından, oksijen ve besin maddesi gibi faydalı maddelerin geçişine katkı sağlarlar.
- Hidrojeller suda çözünen maddelere geçirgendirler. Dolayısıyla hidrojelin veya birlikte kullanılacağı maddelerin sentezi aşamasında kullanılan katalizör, aktivatör, stabilizatör, atık monomer maddeler gibi safsızlık meydana getirecek maddeler hidrojelden kolaylıkla uzaklaştırılabilir.
- Hidrojeller belirli büyüklükteki polimer moleküllere difüzyon etkisi sağlayabilirler. Bunu, su ile muamelesinin ardından şişmesi ile gerçekleştirirler. Dolayısıyla ilaçların difüze edilmesi gibi birçok kullanım kolaylığı sağlarlar. Bunun yanı sıra şişerek kazandığı formasyonda polimerik yapı ve ağ yapısı nedeniyle büyük moleküller, bakteri ve hücreler için de bariyer görevi görmektedirler.

## 2.3 Kitosan

Kitosan; kabuklu deniz canlılarının temel bileşeni olarak bulunan kitinin, kısmi deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir polisakkarittir. Şekil 2.4'de belirtildiği gibi kitosan, β-(1→4) ile bağlanmış 2-asetamido-2-deoksi-ß-D-glukoz birimlerini içermektedir.




Şekil 2.4 Kitosanın moleküler yapısı [44]

Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle beraber kendi içlerinde birtakım farklılıklar da taşımaktadırlar. Selülozda ikinci karbon atomuna bağlı

hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitosanda amin ($-NH_2$), kitinde ise asetamid ($-NHCOCH_3$) grubu bulunmaktadır [45].

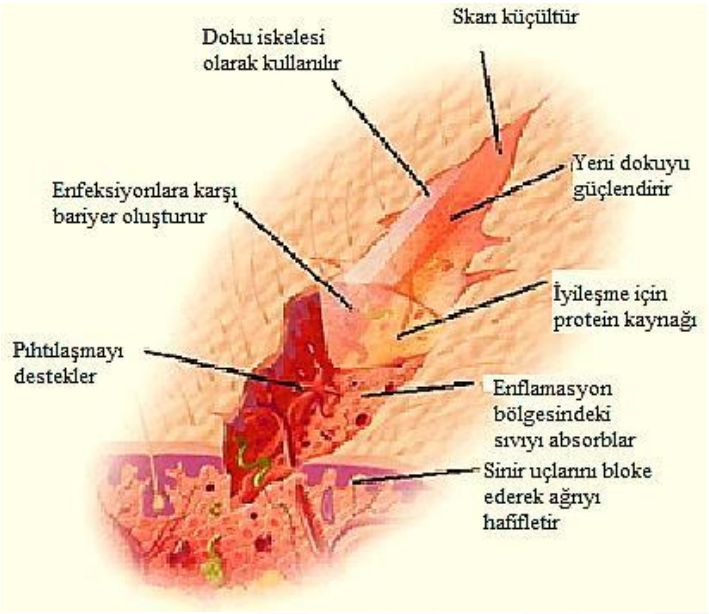
Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer ve sekonder hidroksil grupları ile amin grubu olmak üzere 3 reaktif gruba sahiptir. Bu gruplar kolaylıkla kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın fiziksel ve mekanik özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirebilmektedir [45].

Kitosan günümüzde gıda, tıp, ziraat, kozmetik, tekstil eczacılık, arıtma gibi birçok sektörde kullanılan önemli bir polimerdir [45].

Doğal kaynaklardan bol miktarda elde edilebilir bir biyopolimer olan kitosan, biyolojik olarak parçalanabilir olması, canlılar için toksik etki yapmaması, biyouyumlu olması gibi dikkat çekici özellikleri ile birçok endüstri dalı için uygun bir madde olarak seçilip kullanılmaktadır [45]. Özellikle medikal tekstiller alanında oldukça önem kazanmıştır. Yara tedavisinde doku özelliği sağlanması için kitosan, oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanısıra yapay kan damarları, cerrahi dikiş iğneleri, medikal yapay deri, kontrollü ilaç salımı, yara bandı ve sargı bezleri üretimi gibi birçok alt kategoride kullanımı sağlanmaktadır [46].

Kitosanın bakterisidal ve antifungal özelliği, oksijen geçirgen özelliği sayesinde yara-yanık tedavilerinde sıkça tercih edilmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosan; doku iskelesi, fiber, membran ve sünger formlarında kullanılmaktadır [47, 48].

Birçok çalışmada, Şekil 2.5'de gösterildiği gibi kitosanın biyouyumluluğu ve yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisi incelenmiş ve kanıtlanmıştır. Yapılan araştırmalarda; kitosan bazlı yara malzemelerinin farklı dokuların onarımını hızlandırdığı, yara kontraksiyonunu kolaylaştırdığı ve yara bölgesinde enflamatuar açıdan etkili olan interlökin-8 gibi ajanların salınımını etkilediği kanıtlanmıştır [47].




Şekil 2.5 Kitosanın yara yatağındaki etkisi [49]

Kitosan, yara iyileşmesini hızlandırmada oldukça etkili olmaktadır. Özellikle diyabet hastaları başta olmak üzere vücutta yaraların iyileşme hızı, hastalar için oldukça önem taşımaktadır. Heparin, kanın pıhtılaşmasını önleyen (antikoagülan) bir polisakkarittir. Kitosan, heparin (-yüklü) ile polielektrolit kompleks oluşturma özelliği ile yara tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu kompleksin oluşumu ve ardından ortamda büyüme faktörlerinin de katkısıyla doku gelişimi ve onarımı desteklenmektedir [50].

Kitosan yara iyileşmesi mekanizmasında etkili olan; fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, hücre migrasyonu, kollojen sentezi, polimorfonükleer hücre (PMN) ve makrofajların aktivasyonu gibi birçok mekanizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [51].

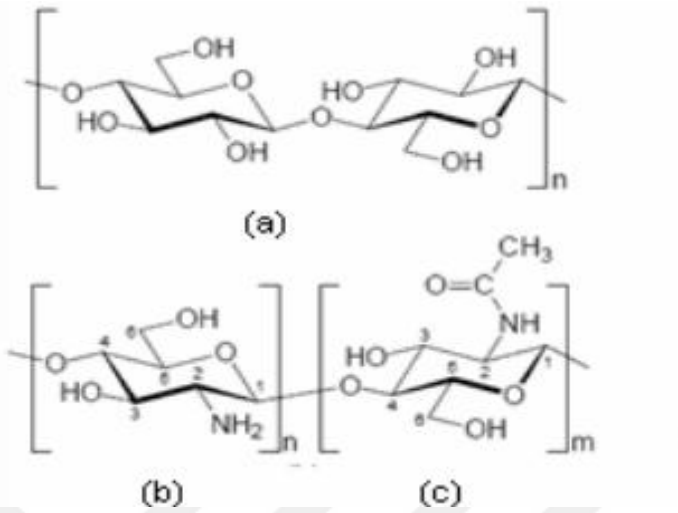
Kitosan, hemostatik özellikli bir polimerdir. Hemostatik etki mekanizması, eritrosit hücre membranı ile kitosan arasındaki etkileşmeye bağlıdır [52, 53].

Özetle kitosan, antimikrobiyal aktivitesi, biyouyumluluğu, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması, başka moleküllerle kompozit oluşturabilmesi gibi özellikleri ile yüksek kullanım alanına sahip olmuştur [54, 55].

## 2.4 Karboksimetilselüloz (CMC)

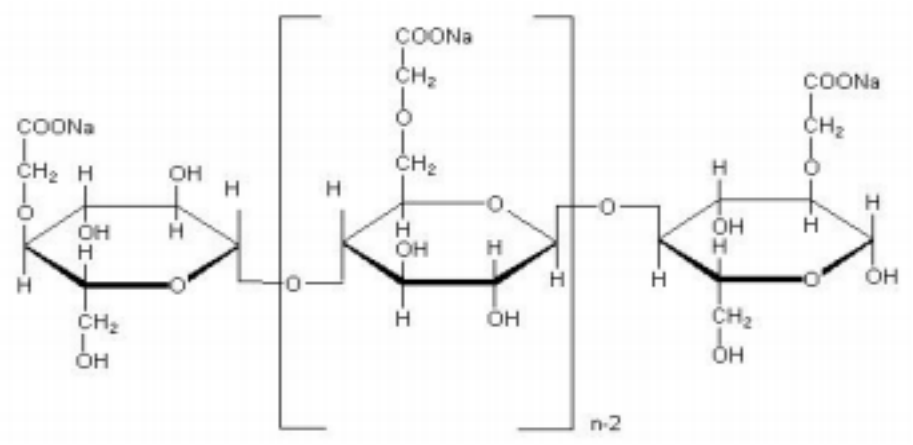
Selüloz, doğada en çok bulunan yenilebilir doğal kaynaklarından bir tanesidir. D-glukopiranoz birimlerinin β-1, 4 bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan lineer yapıdaki polimer

bir bileşiktir (Şekil2.6). Yapısındaki hidroksil grupları, zincirden dışarıya doğru yönelerek birbirleriyle hidrojen bağı yapmaktadır. Moleküler kolaylıkla yan yana dizilebilmekte ve sonuçta yapısındaki çok sayıda güçlü hidrojen bağı ile kararlı bir yapı oluşmaktadır.




Şekil 2.6 Selülozun (a), Kitosanın (b) ve Kitinin (c) Kimyasal Yapısı [56]

Selülozun kimyasal olarak modifiye edilmesiyle selüloz türevleri elde edilir. Bu modifikasyonlar sayesinde; selülozun yüzey özellikleri, kuru/ıslak dayanıklılığı, kimyasal direnci vs. özellikleri iyileştirilebilmektedir. Selüloz türevlerinden en yaygın olanlarından biri de karboksimetilselülozdur [57, 58].



Şekil 2.7 CMC'nin yapısal gösterimi [59]

Karboksimetilselüloz (CMC), suda çözünebilen bir selüloz eteri türevi olan sentetik doğal bir polimerdir. Kimyasal formülü $C_6H_7O_2(OH)_2OCH_2COO_2$ olup, beyaz-sarı arası bir

renkte ve lifli yapıdadır [60]. CMC, ticari değeri olan yaygın olarak kullanılan bir selüloz türevidir. Bunun sebebi; biyolojik olarak parçalanabilir olması, suda çözünebilmesi, biyouyumlu olması, yenilebilir, ucuz, doğrusal, bitkisel bir polimer olması ve de toksik olmaması gibi özelliklere sahip olmasıdır.

CMC başlangıçta Almanya'da, jelatinin yerine kullanılmak üzere üretilmiştir. 1935 yılında, çamaşır deterjanlarının etkinliğini arttırdığı bulunmuş ve bu amaçla ticari olarak üretilmiştir. 1946 yılında, Hercules firması tarafından uygun saflıkta CMC üretilmiş ve ilk kez gıdalarda kullanılmıştır [61].

CMC; serbest asit, sodyum tuzu veya ikisinin karışımı şeklinde bulunabilir. Gıdalarda kullanımı için en yaygın suda çözünebilir formu, sodyum tuzu olanıdır [62]. Serbest asit formu suda çözünmez. 3 değerlikli katyonlarla etkileştirildiğinde suda çözünmeyen, sağlam ve organik maddelerden etkilenmeyen küre veya jel formunda yapılar oluşturur. CMC, soğuk ve sıcak suda çözünebilmesine karşın organik çözücülerde çözünemez. CMC'nin fonksiyonel özelliği, selülozun yapısal özelliklerine bağlıdır. Jelleştirmeden vizkositeyi arttırır özelliktedir. CMC'nin doğal pH'ı 8,25'tir ancak ticari olarakdaha iyi çözünmesi amacıyla pH= 7,5 olarak üretilir. Ürün; 4 ve altındaki pH'larda suda çözünemez haldedir, pH düştükçe çözünürlüğü azalır [63].

CMC'nin su tutucu, koyulaştırıcı, sabitleyici, süspansiyon halini stabil tutması, film yapması, akıcılığı kontrol edici ve koloit engelleyici olması özelliklerinden dolayı; gıda, tekstil, kozmetik, kâğıt ve deterjan endüstrilerinde yaygın kullanım alanları mevcuttur [64, 65].

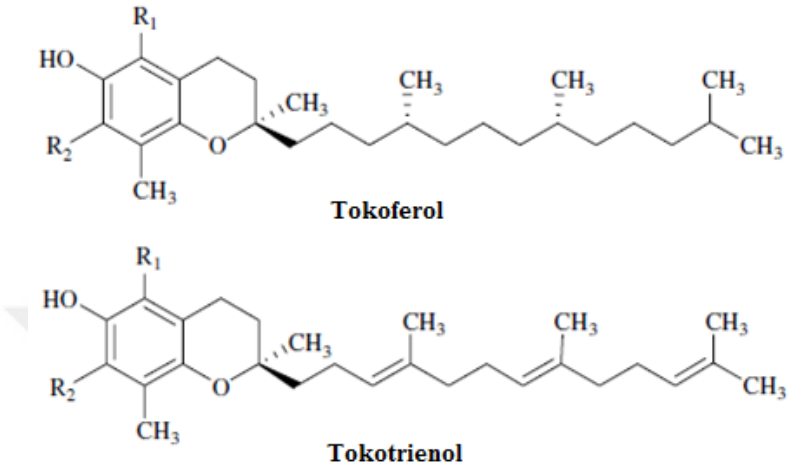
## 2.5 Alfa Tokoferol (Vitamin E)

Alfa tokoferol (vitamin E), optimal hücre fonksiyonunu sağlamaya yardım eden, yaşam için gerekli, tüm hücre membranları üzerinde stabilize edici ve düzenleyici etkisi olan, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni ve diğer radikalleri indirgeyen ve bunun yanı sıra hücreyi serbest radikallerin meydana getireceği hasarlardan koruyan doğadaki en etkili lipitte eriyen bir antioksidandır [66, 67]. Hücreyi, membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan peroksil radikallerinden koruyarak antioksidan özellik göstermektedir [68].

Vitamin E, sekiz adet yağda çözünebilen, doğal esansiyel bileşikten meydana gelir. Dört bileşikten oluşup, doymuş düz zincir taşıyan seri; tokol yapısıdır (α, β, γ, δ tokoferol).

Diğer dört bileşikten oluşan seri ise düz zincir yapısında 3 çift bağ içeren tokotrienol yapısıdır (α, β, γ, δ tokotrienol) [69, 70].

Vitamin E'nin en dikkat çekici özelliği antioksidan aktivitesidir. Bu özelliğini, Şekil 2.8'de gösterildiği şekilde 6. Karbon atomundaki fenolik hidroksil grubundan almaktadır. Alifatik yan zincirleri, non-polar olduğu için suda çözünemezler [71].




| $R_1$ | $R_2$ | |
|---|---|---|
| $CH_3$ | $CH_3$ | α |
| $CH_3$ | H | β |
| H | $CH_3$ | γ |
| H | H | δ |

Şekil 2.8 Tokoferol ve Tokotrienollerin kimyasal yapıları [70].

Vitamin E, çok uzun yıllardan beri deneysel ve klinik dermatolojide kullanılan ve antioksidan özelliğe sahip yağda çözünebilen bir vitamin türüdür [72]. Yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğini konu edinen birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, diyabetik fareler üzerinde tropikal vitamin E uygulaması ile; kollajen üretiminin arttığı, oksidatif stresin azaldığı ve böylece yara iyileşmesinin belirgin düzeyde arttığı gözlenmiştir [68].

Vitamin E genel olarak pamuk yağı, mısır yağı, soya yağı ve diğer birçok bitkisel sıvı yağlarda, tahıl tanelerinde ve bu bitkisel sıvı yağlardan elde edilen margarinlerde, balık eti, tavuk eti, hayvansal yağ, karaciğer, yumurta ve ette bulunur [73].

Vitamin E emilimi; yağların sindirimi ve emilimi ile yakından bağlantılıdır. Vitamin E, önce safra tuzları ve pankreas özsuyu aracılığıyla besinlerden lipitlerle beraber ince bağırsaktan emilip, ardından epitelyum hücre membranına geçerler [74].

Vitamin E'nin dokulara dağılması için geçerli olan mekanizma; lipitlerin dokulara dağılımı için geçerli olan mekanizma ile aynıdır. Çünkü vitamin E'nin plazmada taşınımı için özel taşıyıcı bir protein mevcut değildir [75].

Vitamin E'nin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca profilaktik vitamin E uygulamalarının, preoperatif

irradyasyona maruz bırakılan yaralarda normal iyileşmeyi ve yara dudaklarındaki kopma direncini arttırdığı düşünülmektedir [76]. Vitamin E'nin antioksidan özelliği ile ilgili araştırmaların önemli kısmı, derinin antioksidan kapasitesini arttırdığını ortaya koymaktadır. Işığın deri üzerindeki yıpratıcı etkisine ve cilt yaşlanmasına karşı daha güçlü bir korunma oluşturmada vitamin E ve onun kombinasyonları önemli düzeyde etkilidir. Vitamin E, özellikle cilt yanığı ve benzer yaralarda yara iyileşmesini belirgin düzeyde hızlandırdığı için kozmetik amaçlı geniş kullanım alanına sahip olmuştur [77].

E vitamini eksikliğinde hayvanlarda kısırlık, kanama, beyin dokusunun yumuşaması, kas rahatsızlıkları, karaciğer harabiyeti, fetüsün gelişememesi gibi bozukluklar tespit edilmiştir. İnsanlarda ise bazı hastalıklarda, kandaki seviyesinin normale göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bazı kanser çeşitleri, enfeksiyon, anemi, akne, Alzheimer, sinir-kas hastalıklarına sahip olan kişiler bunlara örnek gösterilebilir. Vitamin E eksikliğinde, prematüre bebeklerde anemi ortaya çıkabilmektedir. Doğum sonrası anne sütü alamayan dolayısıyla da inek sütü ile beslenen bebeklerde E vitamini eksikliğine bağlı olarak anemi görülebilmektedir. Bu bebeklerde kan hücreleri dayanıksız olup kolayca parçalanmaktadır. Parçalanan bu hücrelerden meydana gelen yıkım ürünleri, kaslarda normal olmayan yağlanma ve karaciğer sorunları meydana getirir [78].

Günlük ortalama düzenli kullanım 1200 IU'yi aştığında immün sistemin baskılandığı gözlenmiştir. Buna karşın düşük dozajlar, immün sistemde güçlendirici etki yapmaktadır [78].

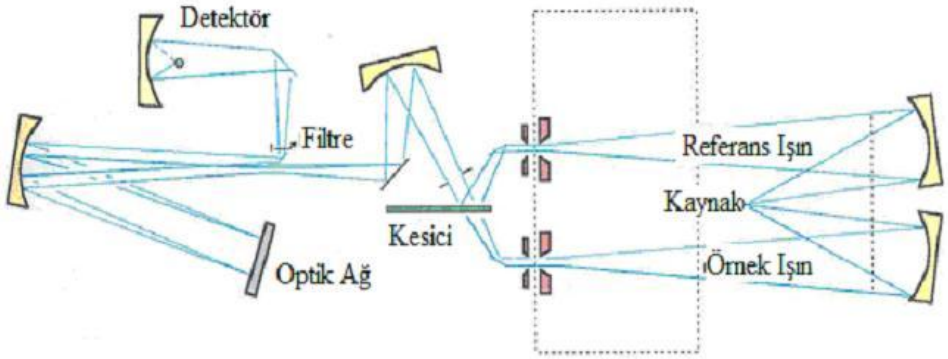
## 2.6 Kompozit Hidrojel Karakterizasyonu

### 2.6.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Polimerik yapıların aydınlatılması için kullanılan en yaygın spektroskopik yöntem infrared (IR) spektroskopisidir. Polimerlerin nicel ve nitel analizleri, bu spektroskopi ile yapılabilmektedir. Günümüzde bilgisayar bağlantılı fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi ile daha hassas analizler yapılmaktadır. Bu teknikte; dalgaboyu ayırıcısı yerine bir interferometre kullanılarak, tüm dalgaboylarında yayılan ışınımlar bilgisayar sisteminin de katkısıyla her dalgaboyunda ayrı ayrı çözümlenerek soğurumlar toplanmaktadır. Böylelikle çok düşük soğurum değerleri dahi büyük duyarlılıkla ölçülebilmekte ve düşük derişimli örneklerle çalışılabilmektedir. Optik izomerler dışında

bütün bileşiklerin IR spektrumları birbirinden farklıdır. Elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikrodalga bölgesi arasında kalan kısım IR bölgesidir. Bu bölge 4000-450 $cm^{-1}$ dalga boyu arasındadır. IR spektrumu, organik bir maddenin strüktürü ile ilgili direkt bilgileri sağlamasına karşın, maddenin saflığı hakkında bilgi veremez [79]. Elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesi 10-14000 $cm^{-1}$ arasında üç farklı bölgeye ayrılmış durumdadır:

- Uzak dalgaboylu kızıl ötesi (FIR, 4000~14000 $cm^{-1}$)
- Orta dalgaboylu kızıl ötesi (MIR, 400~4000 $cm^{-1}$)
- Yakın dalgaboylu kızıl ötesi (NIR, 4~400 $cm^{-1}$)

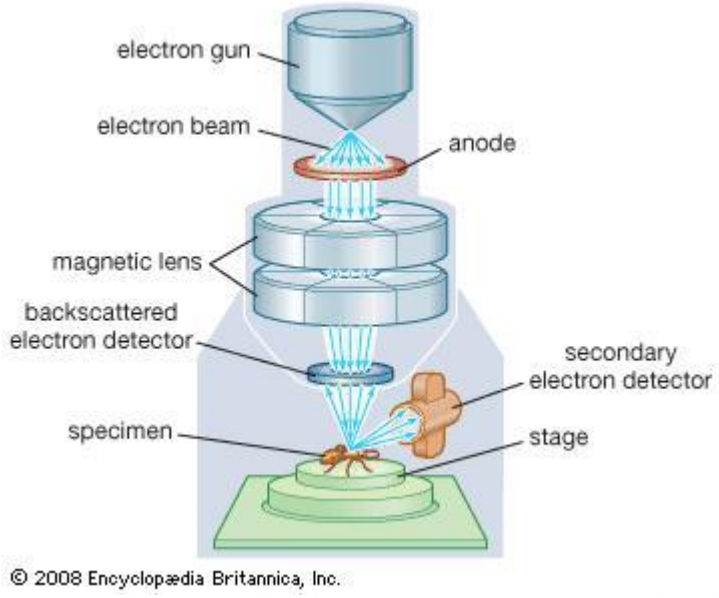



Şekil 2.9 FT-IR spektrometre şematik görünümü [80, 81]

Bir molekülün IR ışınını adsorplayabilmesi için, molekülde titreşim veya dönme hareketi açısından bir değişiklik meydana gelmesi gerekir. Molekülün doğal titreşim frekansı, uygulanan ışının frekansı ile uygun olursa, net bir enerji alışverişi meydana gelir ve bu da moleküler titreşim genliğinde bir değişim meydana getirir [82].

### 2.6.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Karakterizasyon tayininde, üretilen polimerik yapıların yüzey özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Polimerik yapıların gözenekliliği ve yüzey özelliklerini inceleyebilmek amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden biri taramalı elektron mikroskopi (Scanning Electron Microscopy, SEM) yöntemidir [83, 84].




Şekil 2.10 Taramalı elektron mikroskobu şematik görünümü [85]

Yansıtma ve tarama tiplerinin elektron mikroskopları için en yaygın kullanım alanı, kopya yöntemleri kullanılamadığında opak nesnelerin incelenmesi içindir. Taramalı elektron mikroskopunun gözlem altında iken belirli bir manipülasyon tipini uygulamasını; çok düzensiz yüzeylerde dahi çalışabilmesi, bu yeteneğin derin odaklama derinliği ile birleşmesi özelliği sağlamaktadır [86].

İki temel yaklaşım ile SEM çözünürlüğü iyileştirilebilmektedir:

- Kaynak parlaklığını daha da arttırmak,
- Optik lens sapmalarını azaltmak [87].

### 2.6.3 Brunauer, Emmet ve Teller Deneyi (BET)

Bir gaz ile bir katı yüzeyi reaksiyona sokulduğunda, gaz molekülleri katı molekülün yüzeyine tutunur ve bu yüzey tarafından adsorbe olmuş tabakalar oluşturur. Normal şartlar altında, adsorpsiyon miktarı katı molekülün toplam yüzey alanı ile doğru orantılıdır [88, 89].

Bu analizde BET metoduyla 77 K'daki sıvı azot ortamında, azot ($N_2$) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak yüzey alanı ve gözeneklilik tayini yapılmaktadır. BET cihazı kullanılarak; aktif karbon, adsorbent, seramik, implantlar, boya ve kaplama ürünleri, jeolojik numuneler, kozmetik ve elektronik sektörlerinden çeşitli örnekler analiz edilebilmektedir. Analiz sonucunda tek ve çok noktalı BET yüzey alanı, toplam gözenek

hacmi, gözenek boyutu dağılımı değerleri ve adsorpsiyon – desorpsiyon eğrileri verilmektedir [89].

Yüzey alanı analizlerinde ve gaz adsorpsiyon çalışmalarında temelde konum alan BET denklemi, çok tabakalı adsorpsiyon teorisi olarak bilinmektedir [89]. BET metodu, genellikle sıvı azot olmakla birlikte kullanılan gaz moleküllerinin nüfuz edebildiği tüm yüzeyleri ölçebilmektedir. BET gaz adsorpsiyon ölçümü yapılarak, tanelerin pürüzlülüğü belirlenebilir. Yüzey pürüzlülüğü ($R_{BET}$) değeri Eşitlik 2.1 formülasyonu ile hesaplanabilir [90].

$$R_{BET} = A_B \cdot d\ (D/6) \quad (2.1)$$

Eşitliğe göre;

$A_B$: Ölçülmüş BET yüzey alanı($cm^2/g$)

d: Katı yoğunluğu($g/cm^3$)

D: Tane çapı(cm).

### 2.6.4 Şişme Karakterizasyonu

Polimerlerin çapraz bağlanmasıyla oluşan ağ yapısı, uygun çözücü ortamında çözücünün yapıya girmesiyle beraber şişmeye başlar. Bir süre sonra çözücünün jele girme hızı ile jelden salım hızı birbirine eşit olur. Bu durum, en büyük şişme değeri olan denge durumudur [91]. Ağ yapılı polimerlerin karakterizasyonunda şişme kineğinin incelenmesi, difüzyon türü ve mekanizmasının aydınlatılması da oldukça önemlidir. Bu çalışmalar için şişme eğrilerinin oluşturulması gerekir. Şişme eğrileri, uygun çözücü içersindeki polimerin kütlesel veya hacimsel değişikliklerinin zamana bağlı izlenmesi ile oluşturulur [92].

$$\%\ \text{Şişme}\ (\%Q) = (W_t - W_0) / W_0 \times 100 \quad (2.2)$$

eşitliği ile verilir. Bu eşitlikte $W_{0;}$ ilk durumdaki kuru polimer kütlesi $W_t$; t süre sonraki şişmiş polimerin kütlesidir.

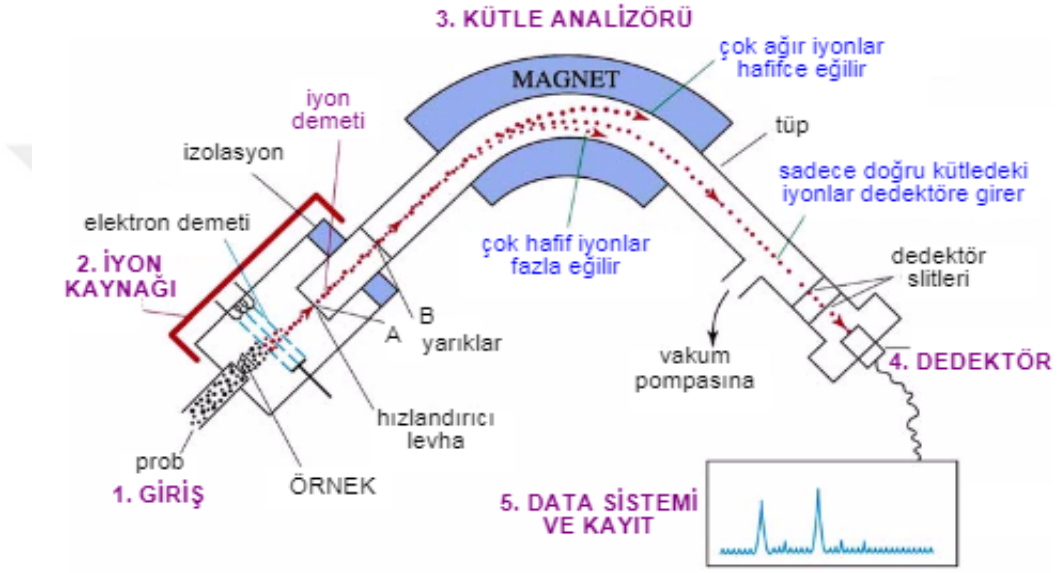
Denge durumunda olan hidrojel, en büyük şişme değerine sahiptir. Çözücüsüyle dengede bulunan hidrojeller için denge sıvı içeriği (DSİ);

$$\text{DSİ} = (W_d - W_0) / W_d \quad (2.3)$$

eşitliği ile hesaplanır. Eşitlikte $W_d$; dengedeki (şişmiş) polimerin kütlesini, $W_0$; kuru polimerin kütlesini göstermektedir.

## 2.7 Kütle Spektrometresi

İnorganik ve organik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, bir örnekteki atomların izotoplarının tayin edilmesinde, karışımların nitel ve nicel analizlerinin yapılmasında, gaz-sıvı-katı maddelerin bileşimlerinin ve yapılarının aydınlatılmasında sıkça kullanılan bir analitik yöntemdir. Bir kütle spektroskopisinde öncelikle, spektrumu alınmak istenen örneğin gaz halindeki iyonlarını elde etmek gerekmektedir. Kullanılan iyonlaştırma yöntemlerine göre kütle spektrumlarının görünüşü önemli ölçüde değişkenlik gösterebilmektedir [93].




Şekil 2.11 Bir kütle spektrometrenin şematik diyagramı [93]

Moleküler kütle spektrometrede kullanılan iyon kaynakları 2 alt başlıkta incelenir (Çizelge 2.2):

Dispersiyon kaynakları
Gaz fazı iyon kaynakları

Buna göre;

- ✓ Desorpsiyon yönteminde, sıvı ve katı haldeki madde doğrudan gaz iyonuna dönüştürülür.
- ✓ Gaz fazı kaynaklarında ise, örnek ilk önce buharlaştırılır, daha sonra iyonlaştırılır.
- ✓ Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometreleri, termal açıdan kararsız maddelere ve uçucu özellikte olmayan maddelere uygulanabilir.
- ✓ Gaz fazı kaynaklı kütle spektrometreleri ise, kaynama noktaları $500^0$C'den daha küçük olan termal açıdan kararlı maddelere uygulanabilir.

Çizelge 2.2 Moleküler kütle spektrometride kullanılan iyon kaynakları [93]

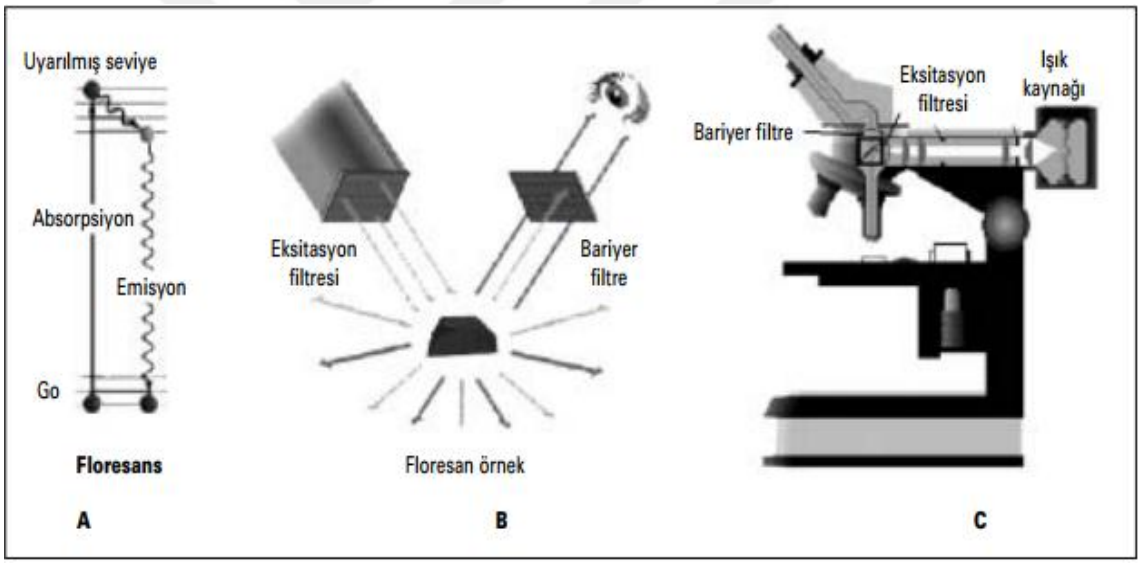
| **İyon Kaynağı Tipi** | **Çeşitleri** | **İyonlaştırıcı** |
|---|---|---|
| **Gaz Fazı** | Alan İyonlaştırma | Yüksek potansiyelli elektrot |
| | Elektron İmpakt (EI) | Enerjik elektronlar |
| | Kimyasal İyonlaştırma (CI) | Reaktif gaz iyonları |
| **Desorpsiyon** | Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) | Yüksek elektrik alanı |
| | Termosprey İyonlaştırma (TS) | Yüksek sıcaklık |
| | Alan Desorpsiyonu (FD) | Yüksek potansiyelli elektrot |
| | Matriks Yardımlı İyonlaştırma (MALDI) | Lazer demeti |
| | Plazma desorpsiyonu (PD) | 252Cf'nin fisyon ürünleri |
| | İkincil İyon Kütle Spektrometri (SIMS) | Enerjik iyon demeti |
| | Hızlı Atom Bombardımanı (FAB) | Enerjik atom demeti |

### 2.7.1 Elektrosprey İyonlaştırma

Oda ısısında ve atmosferik basınç altında gerçekleşir. İğne biçimindeki bir kapiler, örnek çözeltiyi bir dakikada birkaç mikrolitre pompalar. Elektrottan iğneye birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Bunun sonucunda çok küçük elektrik yüklü damlacıklar oluşur. Bu damlacıklar, daha sonra çözücü giderme kapilerinden geçer. Bu alanda elektrik yükleri örnek moleküllere tutturulur ve çözücü böylece buharlaşır. İyonlar, gaz fazına ayrışmış olur [93].

## 2.8 Floresan Mikroskopisi

Floresan mikroskopi hem biyolojik hem de medikal alanlarda birçok fonksiyonel teknolojiye sahiptir. Temel olarak floresan mikroskop, spesifik yapıların morfolojilerinin aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Floresanın, bir görüntü elde etmek için kullanılmasından dolayı bu ismi almıştır. İncelenmesi istenen numune, floresanla belli bir dalga boyunda ışık yayar ve bu dalga boyunu diğerlerinden ayırır. Floresan mikroskopunda asıl anahtar mekanizma, sadece istenen dalga boyunun geçmesine olanak veren ve diğer ışınlardan kaynaklı dalga boylarının geçişini bloke eden filtrelerin kullanımıdır. Örnekler floresan ışık ile muamele gördüğü için, hücresel bölgeler mikroskop altında yüksek bir kontrastta koyu zeminde parlar şekilde görülmektedir. Örnek ve zemin arasındaki bu yüksek zıtlık, örneklerden elde edilen görüntülerde keskin yoğunluk değişiklikleri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Buna bağlı olarak hücresel bölgeleri açıkça tanımlamak mümkün olmaktadır.




Şekil 2.12 Floresansın temel fizik kuramı (A), uygulama ile ilgili şematik görünüm (B), epi-floresan mikroskop [94]

Segmentasyon görevinin performansı için 'görüntü kalitesi' kritik bir faktör olmaktadır. Düzensiz aydınlatma ve gürültü durumu, segmentasyon işlemi için en büyük dezavantaj olmaktadır. Bu gibi dezavantajlar; kamera, mikroskop veya uzmanla ilgili teknik sorunlardan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra filtrelerin etkileri, görüntünün doğru aydınlatılması, objektifin odaklanma seviyesi de yüksek kalitede görüntüler elde etmek için önemli rol oynamaktadır [94].

## 2.9 Hücre Kültürü

Hücrelerin kontrollü koşullar altında yetiştirilmesi, çoğaltılması aşamasına hücre kültürü adı verilmektedir. Hücre kültürünün temel ilkesi, canlı dokulardan edinilen parçaların yaşama ve çağalmasını in vitro koşullarda sağlamaktır. Laboratuar gereçleri kullanımıyla canlı dokuların uygun besiyerleri içerisinde çoğaltılmasıdır. Bu amaçla; çeşitli canlıların (insan, fare, maymun, tavşan gibi) çeşitli dokularından (tümör dokusu, akciğer, amniyon zarı, böbrek vs. gibi) temin edilen dokuların parçalanmasıyla hücreler açığa çıkarılır. Bu hücreler çeşitli tampon maddeleri, tuzlar, aminoasit, vitamin, at veya dana serumu içerikli besleyici sıvılar içerisinde steril koşullarla muhafaza edilir. Hücreler bulundukları steril kaplarda $37^0$C'de bekletildiklerinde, kabın iç kısımdaki yüzeylerine yapışarak üreme gerçekleştirirler. Hücrelerin üremesi ile meydana gelen bu yapıya hücre kültürü adı verilir [95, 96].

Hücre kültürü çalışmalarında iki farklı özellikte hücre hattı kullanılmaktadır. Bunlar; primer hücre hatları ve devamlı hücre hatlarıdır. Organ ve dokularından ayrılan hücrelerin, 24 saatten daha fazla süreyle kültür edilmesiyle primer hücre kültürleri elde edilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler, çoğaltıldıkları kültür içerisinden ayrılıp başka kültürler içerisine ekilip çoğaltılabilir. Bu doğrultuda elde edilen ilk alt kültür, sekonder hücre kültürü olarak adlandırılır ve devam eden kültür uygulamalarının ardından 'hücre hatları' elde edilir. Primer kültür hücreleri kategorisine, diş eti fibroblastları ve pulpa fibroblastları örnek verilebilir. Primer hücre kültürlerinin insandan izole edilmesi işlemi ve kültürün yapılması bir hayli zordur. Bunun nedeni; primer kültürler birbirinden farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması da birbirinden farklılık meydana getirir. Devamlı hücre hatları ise; transformasyon geçirmiş primer hücrelerdir. Bu hücreler süresiz çoğalma özelliği edinmiştir. Primer hücrelere kıyasla daha stabil bir fenotip özelliği taşır. Devamlı hücreler, transformasyona uğramış oldukları için taşıdıkları in vivo karakterlerin tümünü koruyamazlar. Bu hücre hatları oldukça kolay bir şekilde çoğaltılabilir. En sık çalışılan devamlı hücre hatlarına; insan epitelyal hücreleri (HeLa) ve fare fibroblastları (3T3, L-929) örnek verilebilir [97, 98].

## 2.10 Sitotoksisite Tayini

Bir maddenin biyouyumluluğu, o maddenin hücre yaşamına olan etkisi ile ölçülür. Bir moleküler reaksiyon dizisi sonucunda bir takım makromoleküllerin sentezinin durması, bunun sonucunda hücrenin yapısında ve hücresel fonksiyonunda bir takım hasarlar ve aksaklıkların gelişmesiyle, sitotoksik davranış meydana gelmiş olur [99], [100].

Sitotoksisite testleri, in vitro olarak gerçekleştirilen ve hücre kültürlerinde gerçekleşen muhtemel toksikolojik reaksiyonlar olarak tanımlanır. Bu sitotoksisite testlerinde;

- Hücredeki DNA veya Protein sentezi
- Hücre membran yapısı
- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücrenin bölünmesi
- Hücre organelleri ile ilgili bilgiler elde edilir.

Bu testlerde, hücre ve test edilecek materyalin (ilaç, nanopartikül, biyomalzeme vs.) birbiriyle etkinleştirme şekli (direkt, indirekt, ekstrakt) de önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, hücreler üzerinde test edilecek materyalin fiziksel durumu da önem taşımaktadır. Örneğin; test edilecek materyalin biyomalzeme yerine ilaç formatında olması, hücreler ve materyalin etkileştirilme yöntemini değiştirecektir [101].

Testlerin her uygulamada sabit bir standartta yapılabilmesi için uluslararası standartlar geliştirilmiştir. Sitotoksisite testlerinin standartlaştırılması için ISO bazı kriterler belirlemiştir. Medikal ürünlerin biyolojik açıdan değerlendirilmesinde kullanılan ve birçok farklı metodun kullanımı kapsayan, temel prensip olarak insanları korumayı amaçlayan test protokolü; ISO 10993'tür. Bunlar içinde *in vitro* sitotoksisite testleri için önerilen test protokolü; ISO 10993-5 protokolüdür. ISO 10993-5 standartında önerilen test metotları [99, 102]:

1) a) Direkt hücre kültürü yöntemi
   i. Direkt temas testi
   ii. Ekstrakt testi
   b) Bariyer test yöntemi
2) Filtre difüzyon testi
3) Dentin bariyer testi
4) Agar difüzyon testi

Sitotoksisite çalışmalarını değerlendirme yöntemleri dört farklı grupta incelenebilir [103]:

- Canlılık (viability) oranını değerlendiren testler: Hücre ortamında kısa sürede meydana gelen toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
- Yaşamsal (survival) süreci değerlendiren testler: Hücre ortamında uzun sürede oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri

### 2.10.1 MTT Testi

Sitotoksisite değerlendirme çalışmalarında çok sık kullanılan test metodu; kolorimetrik MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. Bu test, MTT'yi çözünmeyen mavi renkli formazan kristallerine dönüştürebilen dehidrogenaz enziminin aktivitesini ölçmektedir. Hücrede meydana gelen sitotoksik bir etki sonucunda dehidrogenaz enzim aktivitesinin etkilenmesi sonucunda mavi renkli formazan oluşmamaktadır. Formazan kristalleri, yalnızca aktif ve canlı mitokondrinin bulunduğu hücrelerde oluşabilmektedir. Hücrelerde formazan kristali oluşumu, spektrofotometre cihazı ile optik yoğunluğun ölçülmesi veya örneğin çevresinde meydana gelen formazan ışığın elektron mikroskobu yardımıyla belirlenmesi ile ölçülebilmektedir [103, 104].

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Distile su cihazı – Milipore Q
- pH metre – Hanna
- Vortex – Heidolph, Stuart
- Hassas terazi – Shimadzu
- Liyofilizatör – Telstar
- Vakum etüvü – BINDER
- Manyetik karıştırıcı/Isıtıcı – ISOLAB
- $CO_2$ İnkübatör – N-BIOTEK NB-203XL
- SEM – Carl-Zeiss EVO LS10
- FT-IR – Shimadzu IR Prestige21
- BET- QuadraSorb SI
- Santrifüj cihazı – Hermle Z206A
- Floresan mikroskop – Zeiss Axiocam 503
- İnverted mikroskop – Olympus CKX41
- Elisa okuyucu – Biotek Powerwave XS2
- Sıvı azot tankı – International cryogenics, Inc. IC 20R
- Çeker ocak (Steril kabin) – Hedlab X-Bio Class-II
- HEPA filtre – Metisafe

- ($-80^0$) Buzdolabı – ThermoScientific
- Sıcak su banyosu – N-BIOTEK/NB-303
- Çalkalayıcılı etüv- Biosan-ES20
- Bilgisayar- Philips

### 3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

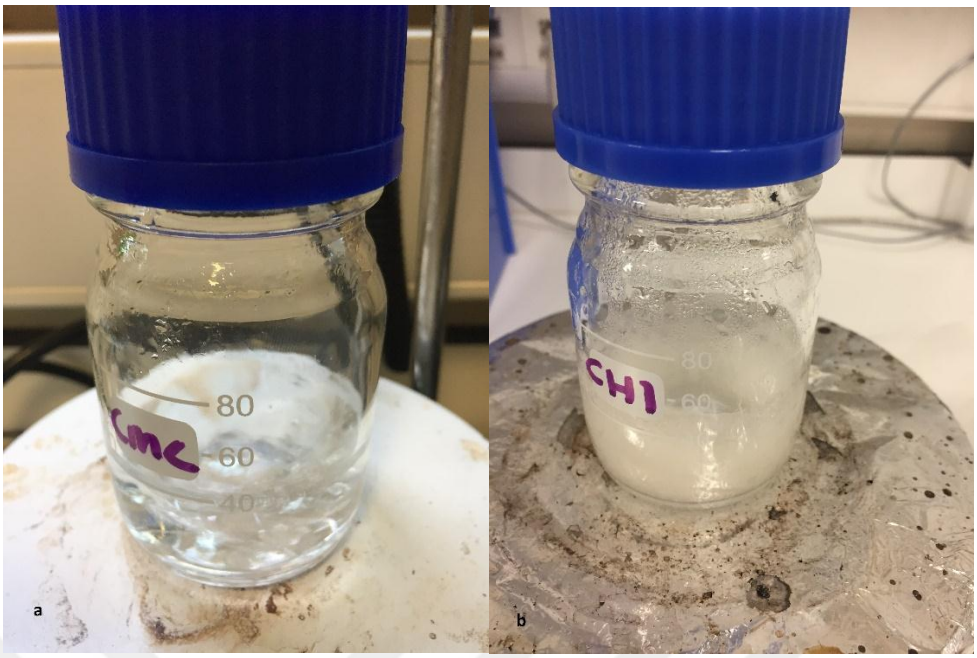
Çalışmada kullanılan kitosan ve karboksimetil selüloz polimerleri Sigma-Aldrich (Almanya)'dir. Asetik asit (>99,7 saflık) kullanılmıştır. Amonyumpersülfat (APS) Sigma-Aldrich (Almanya)'dir. N,N'-metilen-(bis)akrilamid Sigma-Aldrich (Almanya)'dir. Alfa-tokoferol (Vitamin E) ise Sigma-Aldrich'dir. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12 Ham) MTT, DMSO ve Tripsin; Sigma-Aldrich (Almanya)'dir. Antibiyotik(Penicilin-streptomicin); Wisent'ten temin edilmiştir. L-glutamin; PAN-Biotech, FBS ise Sigma-Aldrich (Almanya), PBS ise Amresco'dur.

Ayrıca multipipet, beher, 24 ve 96 kuyucuklu pleyt, elektronik pipet, steril pipet uçları (20 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml), steril falkon tüp (15 ml, 50 ml), kriyotüp, thoma lamı, lamel, eppendorf tüp, manyetik balık kullanılmıştır.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Materyallerin Uygun Solventlerde Çözülmesi

Hidrojel sentezinde kullanılmak üzere kitosan ve CMC polimerleri uygun çözücülerde çözülmüştür. Buna göre; 0,4 gr kitosan tartılıp 40 ml %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde (%1'lik kitosan çözeltisi hazırlamak için) manyetik karıştırıcı ile yaklaşık 12 saat karışması sağlanarak çözülmüştür (Şekil 3.1). 0,4 gr CMC tartılıp 40 ml deiyonize su içerisinde (karboksimetilselülozun %1'lik çözeltisini hazırlamak üzere) manyetik karıştırıcı ile yaklaşık 12 saat karışması sağlanarak çözülmüştür (Şekil 3.1). Çalışmada çapraz bağlayıcı olarak kullanılan N, N'-metilen-(bis) akrilamid ise 0,072 gr tartılarak 6 ml deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Amonyum persülfat, 4 mg tartılarak 10 ml deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Çalışmada kullanılan alfa-tokoferol 1mg/ml olmak üzere; 1,05µl vitamin e, 1ml %80'lik etil alkol çözeltisi içerisinde çözülmüştür.




Şekil 3.1 Karboksimetilselülozun(CMC) %1'lik çözeltisinin hazırlanması (a), Kitosanın %1 lik çözeltisinin hazırlanması(b)

### 3.2.2 Hidrojel Sentezi ve Karakterizasyonu

#### 3.2.2.1 Hidrojel Sentezi

İlk aşamada bu çalışmaya özgün olarak manyetik karıştırıcılı ısıtıcı cihaz üzerinde bir düzenek hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Buna göre; içerisinde bir miktar su bulunan büyük beher ısıtıcı üzerine konulmuştur. Ardından sentezin gerçekleştirileceği küçük beher bu beher içerisine yerleştirilmiştir. Sentezin gerçekleştirileceği beher içerisine termometre yerleştirilerek sıcaklığın sürekli kontrolü sağlanmıştır. Manyetik karıştırıcının da behere konulmasıyla, düzenek hazır hale getirilmiştir.




Şekil 3.2 Hidrojel sentezi için kullanılan düzenek

Isıtıcıların sıcaklıkları, termometrenin de kontrolü ile $50^0$C'ye ayarlanmıştır. Beher içerisine ilk olarak 4 ml kitosan solüsyonu mikropipet yardımıyla eklenmiştir. Sıcaklığın $50^0$C'ye ulaşması ile birlikte manyetik karıştırıcının yaklaşık 1500 rpm hızla çalışması sağlanmıştır. Bu aşamada mikropipet yardımı ile alınan 4 ml CMC solüsyonu, damla damla eklenmek şartı ile $50^0$C'de karışmakta olan kitosan solüsyonun üzerine eklenmiştir (1:1 polimer oranı). Ardından sıcaklık $55^0$C'ye ayarlanarak kitosan ve CMC solüsyonlarının bu süre içerisinde karışması sağlanmıştır. Sıcaklık ilgili değere ulaşınca mikropipet yardımıyla alınan 1 ml amonyumpersülfat (APS) solüsyonu, damla damla olacak şekilde beher içerisine eklenmiştir ve yaklaşık 5 dakika karışması sağlanmıştır. Ardından mikropipet yardımıyla alınan 200 µl N,N'-metilen-(bis)akrilamid (MBA) solüsyonu da beher içerisindeki solüsyona damla damla eklenmiştir. Isıtıcının sıcaklığı $60^0$C'ye ayarlanarak, bu sıcaklığa ulaşana dek (yaklaşık 5-10 dakika) solüsyonun karışması sağlanmıştır. Ardından beher, hazırlanmış olan düzenekten alınarak ve manyetik karıştırıcı solüsyondan uzaklaştırılmıştır. Beher içerisine argon gazı hapsedilerek hava sirkülasyonu olmayacak şekilde kapak kısmı sıkıca parafinlenip, alüminyum folyo ile kaplanarak sıkıca kapatılmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için yaklaşık 1 saat süre ile su banyosunda $65^0$C'de bekletilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Hidrojel sentezinin sıcak su banyosunda bekletilme düzeneği

Bekleme süresinin ardından beher cihazdan çıkarılmış ve solüsyonun oda ısısına ulaşması için bir süre bekletilmiştir. Oda ısısına ulaşan solüsyon, -80$^0$C buzdolabına konularak 1 gece dondurulmuştur. Kurutma işlemi için donmuş haldeki solüsyon, liyofilizatör cihazına yerleştirilmiş ve yaklaşık 48 saat sonra kurumuş halde elde edilmiştir. Hidrojellerin nem tutmaması için hızlıca vakum etüvü içerisine (37$^0$C'de) konularak muhafaza edilmiştir.

Aynı işlem, farklı parametrelerin hidrojel sentezi üzerindeki etkisini gözlemlemek üzere de hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı miktarının etkisini gözlemlemek için; MBA 100 µl, 200 µl, 400 µl ve 800 µl olacak şekilde 4 farklı konsantrasyonda 4 ayrı hidrojel sentezi yapılmıştır. Başlatıcı/katalizör olarak kullanılan APS miktarının etkisini gözlemlemek için ise; kullanılan APS 0.5 ml, 1.5 ml ve 2 ml olacak şekilde 3 farklı konsantrasyon ile 3 ayrı sentez yapılmıştır.

#### 3.2.2.2 Şişme Deneyi

Sentezlenen hidrojellerin su tutma kapasitesini belirlemek için 6, 7, 7.4 ve 8 olmak üzere 4 farklı pH değeri kullanılarak en çok su tutma oranını sağlayan pH değerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle sentezlenen hidrojellerin kuru ağırlığı tartılmıştır ve hidrojeller belirtilen pH değerlerindeki PBS çözeltisi içerisine

konulmuştur. 1 saat süre ile hidrojeller bulundukları PBS çözeltisi içerisinden çıkarılarak tartılmış ve yeniden PBS içerisinde şişmeye bırakılmıştır. 1 saat süreyle hidrojellerin ağırlığı not edilmiş ve şişme oranı Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme } (Q) = (W_t - W_0) / W_0 \quad (3.1)$$

Eşitlikte $W_0$; ilk durumdaki kuru polimer kütlesi $W_t$, t süre sonraki şişmiş polimerin kütlesidir.

#### 3.2.2.3 Spektroskopik Karakterizasyon (FTIR Analizi)

Birbirinden farklı parametreler ile hazırlanan hidrojellerin infrared spektrumları, Shimadzu IR Prestige21 spektrometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, 4000-650 $cm^{-1}$ dalgaboyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Her numune için eşit koşullar altında FT-IR spektrum ölçümleri yapılmıştır.

#### 3.2.2.4 SEM Analizi

SEM analizi tüm numuneler için eşit koşullar altında gerçekleştirilmiştir. CMC-Kitosan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda, Carl-Zeiss EVO LS10 taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Analiz öncesi hidrojel yapısından ufak bir kesit alınmış ve bu kesit altın-paladyum ile kaplanmıştır. Hidrojel iskelelerinin gözenek çapı, SEM görüntüleri doğrultusunda ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir.

#### 3.2.2.5 BET Analizi

Hidrojellerin gözenek boyutu ve yüzey alanı, BET yüzey alanı analizatörü ile belirlenmiştir. Numunelerden nemi çıkartmak için, numuneler örnek hücrelere yerleştirilmiştir. Daha sonra numuneler $37^0$C'de 2 saat ısıtılmış ve BET analizi yapmadan önce oda sıcaklığına soğutulmuştur. CMC-kitosan hidrojelin BET gözenek boyutu ve yüzey alanı belirlenmiştir.

### 3.2.3 Vitamin Yükleme ve Salım

Vitamin yükleme ve salım çalışmalarında kullanılmak üzere optimize edilmiş olan hidrojel örneği kullanılmıştır. Buna göre (1:1) oranda herbir polimerden 4 ml kullanılarak ve 200 µl MBA, 1 ml APS ile sentezlenmiş olan hidrojelden elde edilen 1 cm çaplı kesit ile vitamin E yükleme ve salım çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.2.3.1 Vitamin E için Standart Eğri Hazırlanması

Bunun için öncelikle vitamin E çözeltisi hazırlanmıştır. 300 ppm olacak şekilde 3 mg vitamin E balon jojede tartılarak, 10 ml %80'lik etanolde çözülmüştür. Hazırlanan solüsyon, standart eğri grafiğini hazırlamak üzere seyreltemeye tabi tutulmuştur. Buna göre; vitamin E'nin 1 ppm- 100 ppm aralığında seyreltme ile hazırlandığı bir seri oluşturulmuştur. Hazırlanan kalibrasyon değerleri, Q-TOF cihazı kullanılarak ESI-MS ile tayin edilmiş ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

#### 3.2.3.2 Vitamin E Yükleme

Hidrojel örneğinden 1 cm çaplı plak halinde hidrojel parçası alınmıştır. Hidrojel plak, falkon tüpü içerisine konularak üzerine 200 µl 300 ppm konsantrasyonda hazırlanan vitamin E solüsyonu eklenmiştir. Tüpün kapağı sıkıca kapatılıp 24 saat $37^0$C'de çalkalayıcılı etüvde bekletilerek vitamini emmesi sağlanmıştır.

#### 3.2.3.3 Salınım

Vitamin E yüklenmiş olan hidrojel, bulunduğu falkondan çıkarılarak deiyonize su içerisine bir defa batırılmış, ardından kurutma kâğıdına her iki yüzeyi hafifçe temas ettirilmiştir. Hidrojel ayrı bir falkon tüpüne yerleştirilmiştir. Tüp içerisine 1 ml PBS konulmuş ve kapağı sıkıca kapatılarak çalkalayıcılı etüvde $37^0$C sıcaklıkta 50 rpm hızda 24 saat bekletilmiştir. Süre sonuna tüp içerisindeki hidrojel dikkatlice çıkarılarak yeni bir tüpe aktarılmış, tüpte kalan PBS ise ayrı bir falkon tüpe aktarılarak ESI-MS ile miktar tayini yapılmıştır.

Hidrojelin aktarıldığı tüpe yeniden 1 ml PBS konulmuş ve aynı koşullardaki etüve yeniden yerleştirilmiştir. Bu işlem yaklaşık 10 gün boyunca devam ettirilmiş ve her gün tüplerde kalan PBS solüsyonlarının analizleri yapılmıştır.

### 3.2.4 Hidrojelin İn Vitro Etkisinin İncelenmesi

İn vitro çalışmalarda kullanılmak üzere optimize edilmiş olan hidrojel örneği kullanılmıştır. Buna göre (1:1) oranda herbir polimerden 4 ml kullanılarak ve 200 µl MBA, 1 ml APS ile sentezlenmiş olan hidrojelden elde edilen 1 cm çaplı kesit, in vitro çalışmalarda kullanılmıştır.

#### 3.2.4.1 Tamamlanmış Medyum Hazırlanması

Fibroblast hücresi için besiyeri olarak kullanılacak DMEM medyum solüsyonu içerisine; %1 oranda L-Glutamin, %1 oranda antibiyotik ve %10 oranda FBS eklenir. DMEM medyum içerisine bu belirtilen oranlarda antibiyotik, L-Glutamin ve FBS eklenmesi ile tamamlanmış medyum hazırlanmış olur. Hücre kültürü aşamalarında besiyeri olarak tamamlanmış medyum kullanılır.

#### 3.2.4.2 Fibroblast Hücre Kültürü

İlk olarak ATCC'den temin edilmiş ve sıvı azotta dondurulmuş şekilde saklanan L929 fibroblast hücrelerinin kültürü sağlanmıştır. Bunun için, hücreler çözülmüş ve yaklaşık 15 ml tam medyum içeren falkon tüpü içerisine aktarılmıştır. Ardından 1000 rpm 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Tüp içerisinde hücreler pelet oluşturacak şekilde dibe çökmüş; dondurma solüsyonu, medyum vs. de süpernatant kısmı oluşturmuştur. Süpernatant kısım atılmıştır, pelet üzerine de 10 ml tam medyum eklenmiş ve pipetaj uygulaması ile hücrelerin medyum içerisinde homojen olarak karışması sağlanmıştır. Flask içerisine yaklaşık 5 ml tam medyum konularak hücrelerin tutunacağı yüzeyin yıkanması sağlanmıştır. Falkon tüpü içersinde homojen olarak karışımı sağlanan hücreler ve medyum karışımı da flask içerisine aktarılmıştır. Hücreleri içeren flask inkübatör içerisine konularak hücrelerin çoğaltımı sağlanmıştır.

Hücreler ışık mikroskobu altında gözlemlenerek flask yüzeyini yeterli oranda kapladığı aşamada hücre pasajlaması yapılmıştır. Bunun için; öncelikle flask içerisindeki medyum atılmış, hücreler Tripsin ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılmıştır. Yüzeyden ayrılan hücreler üzerine 15 ml tam medyum eklenmiş ve tüm solüsyon, flask yüzeyi tamamen yıkanarak bir falkon tüpe aktarılmıştır. 1000 rpm 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Fibroblast hücreleri dipte pelet oluşturmuş, süpernatant faz ise atılmıştır. Pelet üzerine yeniden tam medyum eklenerek hücrelerin medyum içerisinde homojen dağılımı sağlanmış ve solüsyon pasajlanması belirlenen sayıya göre ilgili flasklara eşit miktarda ayrılarak aktarılmıştır. Flasklar yeniden inkübatöre yerleştirilmiş ve hücrelerin yeni ortamlarında çoğaltımı sağlanmıştır.

### 3.2.4.3 Hidrojel ile Fibroblast Hücrelerinin Etkileştirilmesi

Sitotoksisite analizi için uygulanan MTT testi; ISO 10993-5 standartlarına göre gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4.4 MTT (Sitotoksisite Deneyi)

Sitotoksisite analizi için hücrelere uygulanan MTT testi birkaç adımda gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle hücreler mikroskop yardımıyla sayılmış, daha sonra hücreler üzerinde etkisi incelenecek olan hidrojel, hücre ortamına bırakılmış ve son aşamada da MTT analizi belirlenen gün ve saat aralıklarıyla yapılmıştır.

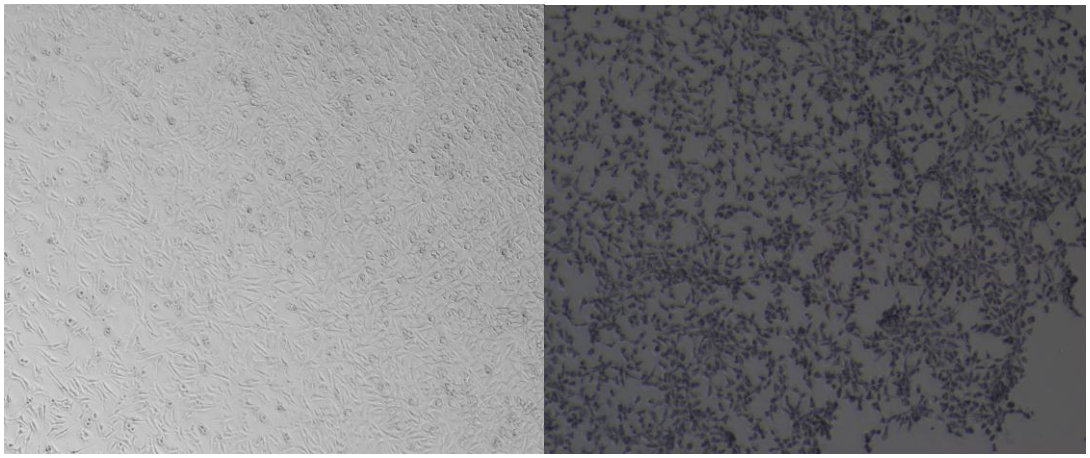
**Hücre sayımı:** Daha önce kültür edilmiş ve pasajlanmış olan L929 fibroblast hücreleri, yapışmış oldukları flask yüzeyinden enzimatik muameleyle kaldırılmıştır. Bunun için yaklaşık 1ml tripsin, hücreler üzerine hassas bir şekilde uygulanmış ve ölü hücrelerin, atıkların uzaklaştırılmasını sağlamak için yıkama sonrası atılmıştır. Ardından yeniden 1 ml tripsin, hücreler üzerinde tüm yüzeylere temas edecek şekilde uygulanmıştır. Flask, yaklaşık 3 dakika inkübatörde (%5 $CO_2$, $37^0$C) bekletilerek hücrelerin tripsinle yüzeyden tamamen kalkması sağlanmıştır.

Hücrelerin tutunduğu flask yüzeyi, 10 ml medyum ile yıkanarak tüm hücreler, içerisine önceden 5 ml medyum konmuş olan falkon tüpe aktarılmıştır. Hücreleri içeren falkon tüpü, santrifüj cihazına yerleştirilerek 1000 rpm 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süreç sonunda hücreler dipte pelet oluşturacak şekilde çökmüştür. Süpernatant kısım atıldıktan sonra hücreler üzerine 5 ml medyum eklenmiş ve hücreler nazikçe medyum ile karıştırılmıştır. Eppendorf tüp içerisine; medyumla karıştırılmış olan hücre solüsyonundan 20 µl konulmuş, üzerine 20 µl tripan mavisi boyası eklerek (1:1) hafifçe pipetaj yapılmıştır. Thoma lamı üzerine lamel yerleştirilmiş ve sayım alanlarını tam kaplayacak şekilde boya/hücre karışımı bu alana aktarılmıştır. Işık mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Canlı hücreler renksiz, ölü hücreler ise mavi renkte gözlenmiştir. Buna göre; thoma lamı üzerinde ilgili alanda tüm hücreler sayılmıştır. Sayılan hücre sayısı doğrultusunda MTT için kullanılması gereken hücre konsantrasyonu belirlenmiştir.

**Hücre ekimi ve MTT:** MTT çalışması 1., 3., 5. ve 7. gün olmak üzere uygulanmıştır. Bu nedenle çalışmada, 4 adet 24 kuyucuklu steril pleyt kullanılmıştır. Kuyucuklara

uygulanmak üzere oluşturulan hidrojel kesitleri, öncelikle steril edilmek üzere 24 saat boyunca %80 etil alkol içerisinde bekletilmiştir. Vitamin E yüklenecek olan örnek grubu da eş zamanlı olarak %80 etanolde çözünmüş durumdaki vitamin E içerisinde inkübe edilmiştir. Hidrojellerin steril kabin içerisinde kurutulmasının ardından, her membran ilgili kuyucuklara yerleştirilmiştir. Hücre sayım işlemi sonucunda belirlenen hücre konsantrasyonu doğrultusunda, pleyt içerisindeki kuyucuklara eşit miktarda hücre ekimi yapılmıştır. İlk olarak 24 saat ölçümü alınacak olan pleyt için; her kuyucuk içerisindeki medyum çekilerek atılmış, yerine 200 µl MTT solüsyonu eklemiş ve 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. MTT prensibinde; canlı hücrelerin mitokondrisindeki oksidatif enzimlerin tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

Pleytlerdeki optik yoğunluk ölçülerek hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. İnkübasyonun ardından pleyt kuyucuklarında bulunan MTT solüsyonu çekilerek yerine 400 µl DMSO eklenmiştir. DMSO'nun hidrojele tutunmuş hücreler üzerinde de etkileşimini tamamen sağladığına emin olduktan sonra, kuyucuklar içerisinden bir miktar solüsyon alınarak yeni pleyt içerisinde ilgili kuyucuklara aktarılmıştır. Ardından pleyt hızlıca Elisa okuyucu cihazına konularak 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. 3., 5. ve 7. günler için hazırlanan hücreler için de aynı işlemler kendi süreleri dahilinde uygulanmıştır.



Şekil 3.4 MTT çalışmasında kontrol grubu fibroblast hücreleri(solda), MTT uygulaması ile formazan yapısı oluşmuş kontrol grubu hücrelerin mikroskop görünümü (sağda)

Tüm günler için alınan ölçümlerde; canlılık oranı Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre;

$$\%\text{Canlılık} = 100 \times OD_{570e} / OD_{570b} \quad (3.2)$$

$OD_{570e}$: Test grubu örneklerinin 570 nm'de verdiği absorbans

$OD_{570b}$: Kontrol grubu örneklerinin 570 nm'de verdiği absorbans

Düşük %canlılık; yüksek toksisite anlamına gelmektedir. Buna göre; canlılık oranı %50'ten az ise test edilen madde, hücreler için toksik olmaktadır. Bu verilere dayanarak vitamin E yüklü CMC-kitosan hidrojelinin fibroblast hücreleri üzerindeki canlılık oranı hesaplanmıştır.

**Elüsyon Metodu:** Bu çalışma, ISO 10993-5 Standartlarına uygun yapılmış olup, MTT çalışmasının doğruluğunu kanıtlar nitelikte bir çalışmadır. Buna göre; sentezlenen hidrojel kesitleri steril edilip, örnek grubu membranlara Vitamin E yüklemesi yapıldıktan sonra, hidrojeller prosedür gereği (ISO 10993-5) 1 $cm^2$ membranı 330 µl DMEM ile inkübe edilmelidir. Bu doğrultuda, hazırlanan 1$cm^3$ hacimli hidrojel kesitler, steril koşullar altında 330 µl DMEM solüsyon içerisinde, 37$^0$C'de 24 saat boyunca çalkalayıcı etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Hidrojel içeriğinin, DMEM solüsyona geçmesi sağlanmıştır. 24 saat sonunda hidrojelin içerisinde bulunduğu DMEM solüsyon çekilerek, 24 kuyucuklu pleyt içerisine bir gün önce ekilmiş ve medyumu uzaklaştırılmış olan L929 fibroblast hücreleri üzerine 300 µl olacak şekilde eklenmiştir. 24 saatlik inkübe süresi sonunda DMEM solüsyon atılmış, yerine 200 µl MTT solüsyon eklenmiş ve 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından MTT solüsyon da atılmış, yerine 400 µl DMSO eklenmiştir. Elisa okuyucuda 570nm'de optik yoğunluğa bakılmıştır. Buna göre hidrojeller ile etkileşmiş DMEM solüsyonunun, hücre canlığı üzerindeki etkisi incelenmiş ve MTT çalışması ile tutarlığı karşılaştırılmıştır.

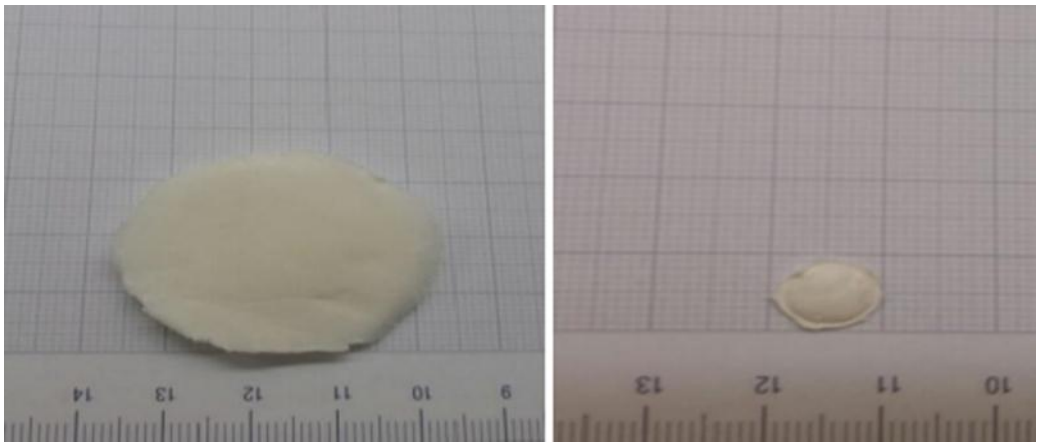
# BÖLÜM 4

# SONUÇ VE ÖNERİLER

## 4.1 Hidrojel Karakterizasyon Çalışmaları

CMC ve kitosan polimerlerinin, metilen bisakrilamid (MBA) ve amonyum persülfat (APS) eşliğinde kopolimerize olması sağlanmış ve yara örtü materyali olarak kullanılmak üzere hidrojel sentezlenmiştir.

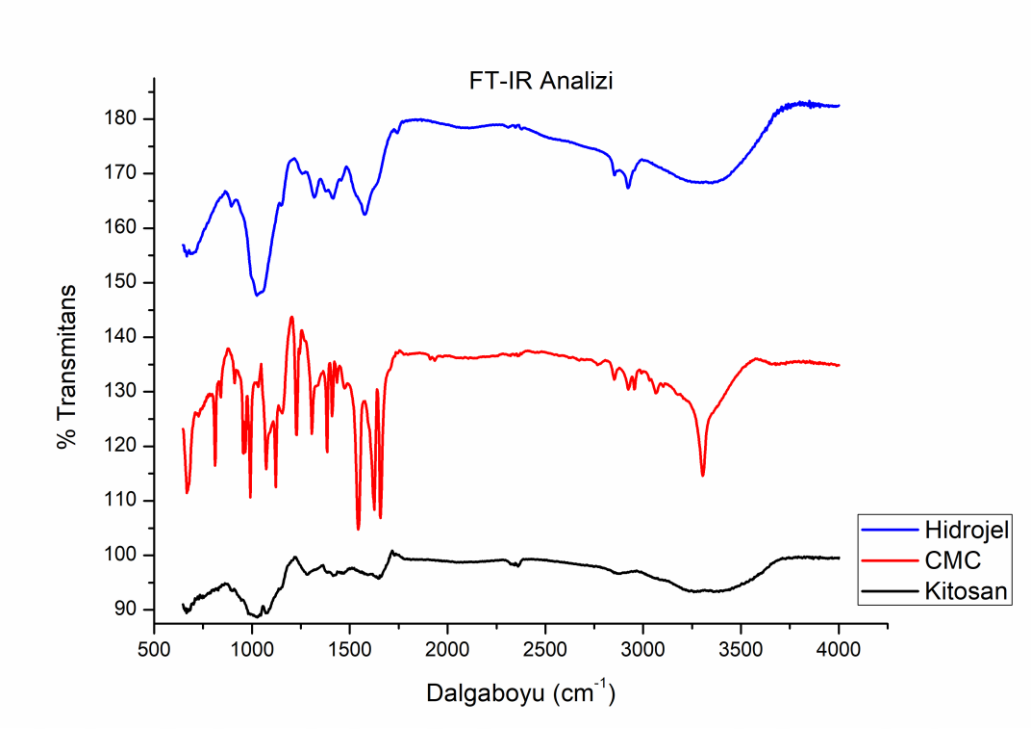
Şişme deneyi, BET analizi, MTT deneyi ve elüsyon deneyi için kullanılmak üzere optimize edilen oranlar ile sentezlenen hidrojel kullanılmıştır. Buna göre, 4'er ml CMC ve kitosan (1:1), 1 ml APS ve 200 µl MBA kullanılarak hazırlanan hidrojel optimize edilmiştir.



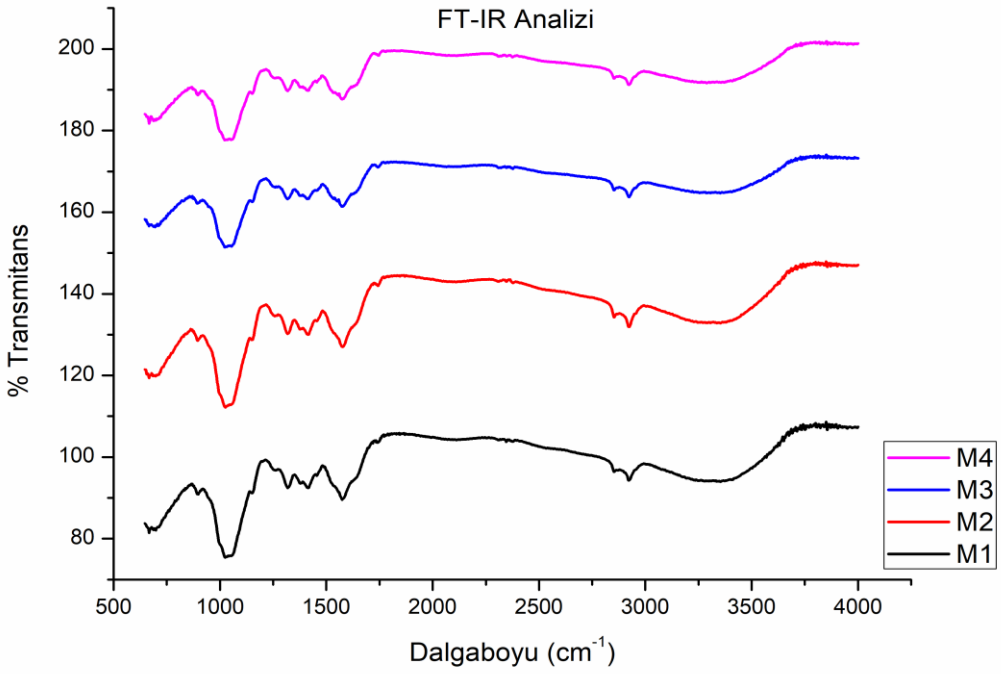
Şekil 4.1 Sentezlenmiş olan CMC-kitosan hidrojel boyutu(Solda), Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan hidrojel kesiti(Sağda)

### 4.1.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

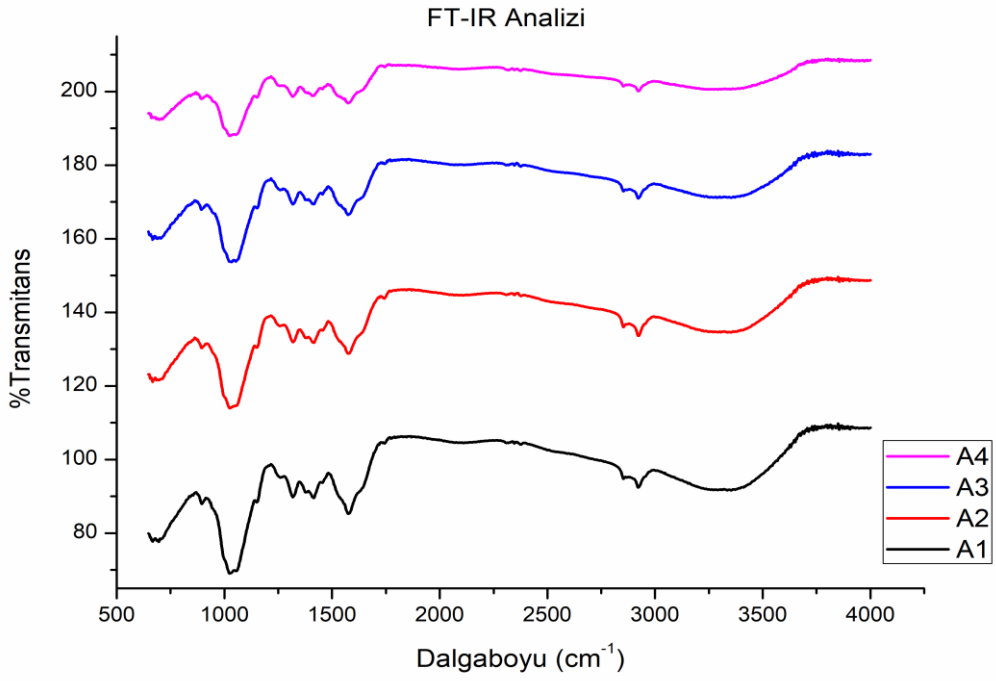
CMC ve kitosan polimerlerinin, N, N'-metilen-(bis)akrilamid (MBA) ile çapraz bağlanması sonucu oluşan hidrojelin yapısını aydınlatmak için FT-IR analizi yapılmıştır. Buna göre FT-IR spektrumları Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4' de verilmiştir.




Şekil 4.2 Hidrojelin sentezinde kullanılan saf CMC ve kitosan polimerler ve CMC-kitosan hidrojelin FT-IR analizi




Şekil 4.3 Farklı MBA değerleri (M1: 100µL, M2: 200µL, M3: 400µL, M4: 800µL) ile sentezlenen CMC-kitosan hidrojellerin FT-IR analizi




Şekil 4.4 Farklı oranlarda APS kullanılarak hazırlanan CMC-kitosan hidrojellerin FT-IR analizi (A1:0,5 ml, A2:1 ml, A3:1,5 ml, A4:2 ml)

Çizelge 4.1 CMC ve kitosan saf polimerlerinin FT-IR analizine göre sahip olduğu fonksiyonel gruplar

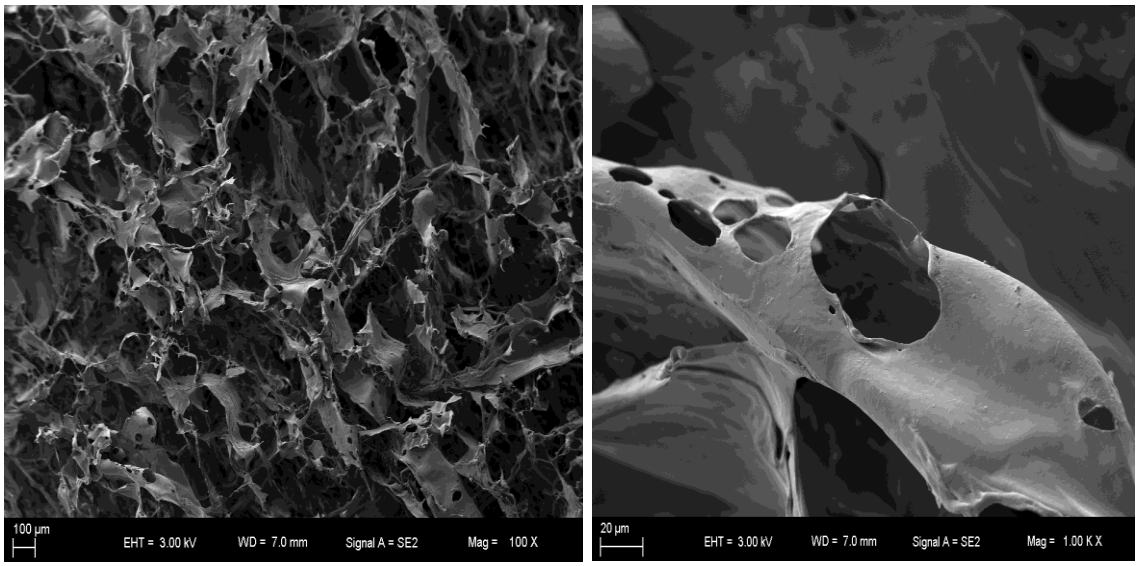
| Fonksiyonel Gruplar/Absorpsiyon bantları(cm-1) | | | |
|---|---|---|---|
| Karboksimetilselüloz(CMC) | | Kitosan | |
| 3924 | -OH gerilmesi | 3300 | -OH ve NH gerilmeleri |
| 2922 | -CH gerilmesi | 2922 | -CH gerilmesi |
| 2868 | -CH gerilmesi | 2868 | -CH gerilmesi |
| 1589 | Asit tuzlarının C=O gerilmesi | 1647 | N-H eğilmesi |
| 1415 | C-H eğilmesi | 1577 | N-H düzlem eğilmesi |
| 1321 | -OH eğilmesi | 1024 | C-O, C-N, C-C gerilmeleri |
| 1022 | C-O gerilmesi | 1313 | -OH eğilmesi |
| | | 1375 | C-H eğilmesi (Simetrik) |
| | | 1419 | C-H eğilmesi (Asimetrik) |
| | | 893 | N-H düzlem dışı eğilme |

Buna göre karboksimetilselüloz polimerinin spektrumunda, 3924 $cm^{-1}$'de -OH bantı görülmektedir. 2922 – 2868 $cm^{-1}$'de -CH gerilmesi bantı yer almaktadır. 1589 $cm^{-1}$ bantı ise asit tuzlarının yapısında yer alan C=O gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1415 $cm^{-1}$ bantı C-H eğilmesini gösterirken, 1321 $cm^{-1}$ bantı ise -OH eğilmesi temsil eder. 1022 $cm^{-1}$ bantı da CMC'nin yapısındaki C-O gerilmesini temsil etmektedir.

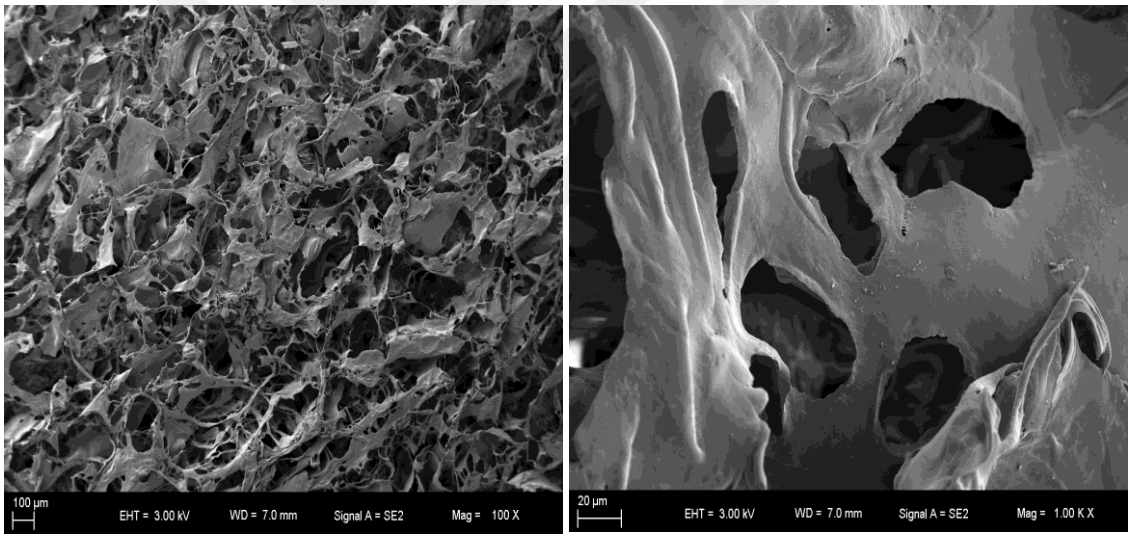
Kitosan polimerinin spektrumunda ise, 3300 $cm^{-1}$ bantında -OH ve -NH gerilmeleri görülmektedir. 2922 – 2868 $cm^{-1}$'de -CH gerilmesi bantı yer almaktadır. 1647 $cm^{-1}$ bantı N-H eğilmesini yansıtırken, 1577 $cm^{-1}$ bantı N-H düzlem eğilmesini temsil eder. Spektrumda yer alan 1024 $cm^{-1}$ bantı C-O, C-C, C-N gerilmelerinden kaynaklanır. Yine 1313 $cm^{-1}$ bantı -OH eğilmesi, 893 $cm^{-1}$ N-H düzlem dışı eğilmesine bağlı oluşmuştur. 1375 $cm^{-1}$ ve 1419 $cm^{-1}$ bantları ise sırasıyla C-H eğilmesi (Simetrik) ve C-H eğilmesi (Asimetrik)'ni temsil etmektedir.

### 4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

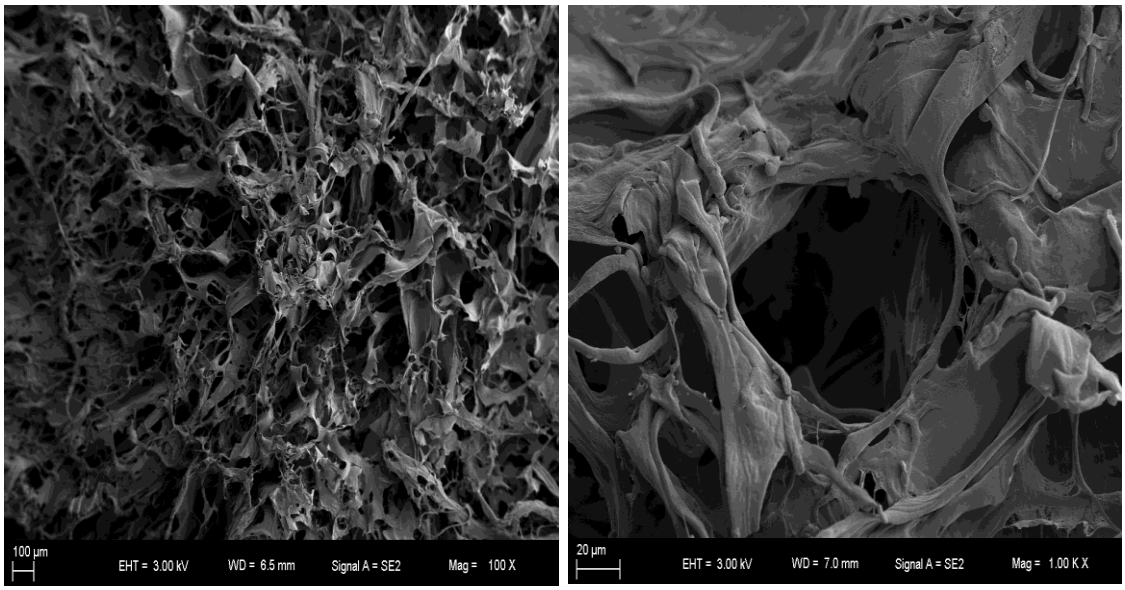
Çapraz bağlayıcı oranının değiştirilmesiyle hazırlanan 4 farklı hidrojel için yapılan SEM analizi sonuçları görüntülenmiştir. Hidrojelden elde edilen SEM görüntüleri, literatürde yer alan [105, 106] yine kitosan ve CMC kullanılarak farklı şekillerde hazırlanmış hidrojel çalışmalarında da benzer şekilde gözlenmiş ve dolayısıyla tutarlı olduğu görülmüştür.



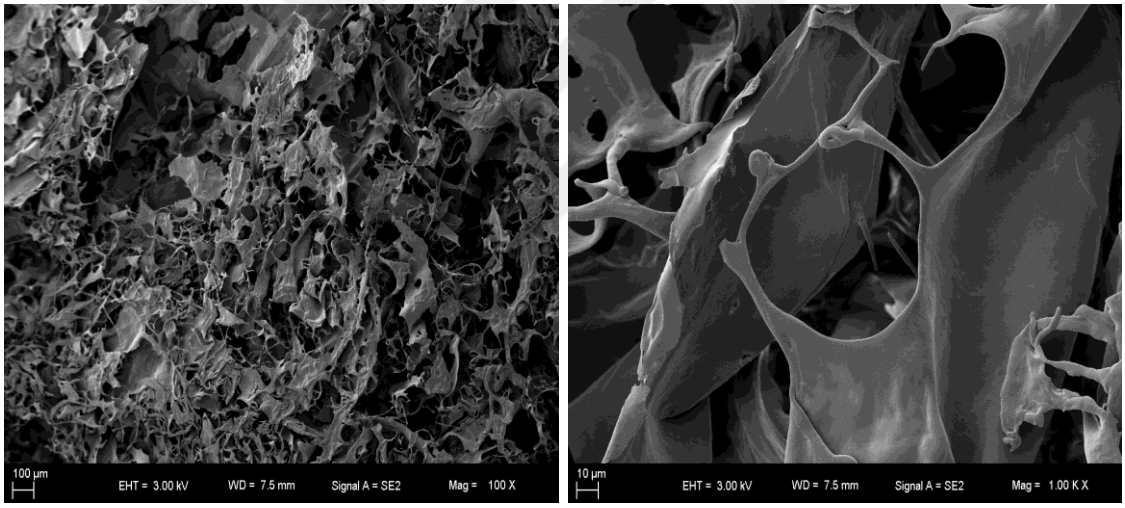

Şekil 4.5 100µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile)




Şekil 4.6 200µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile)




Şekil 4.7 400µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC:kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile)




Şekil 4.8 800µl MBA kullanılarak hazırlanan CMC: kitosan (1:1) hidrojelin SEM analizi (100X ve 1.00 KX ölçeklendirme ile)

### 4.1.3 BET Analizi

Bu analizde BET metoduyla 77 K'daki sıvı azot ortamında, azot ($N_2$) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak yüzey alanı ve gözeneklilik tayini yapılmıştır. Optimize edilmiş değere göre 200 µl MBA ve 1 ml APS ile hazırlanan hidrojel örneğine BET analizi yapılmıştır. Buna göre sentezlenen hidrojelin BET analizi sonuçları Şekil 4.9'da olduğu gibi belirlenmiştir.

| BET summary | |
|---|---|
| Slope = | 238.336 |
| Intercept = | 1.278e+02 |
| Correlation coefficient, r = | 0.993273 |
| C constant= | 2.866 |
| Surface Area = | 9.513 m²/g |

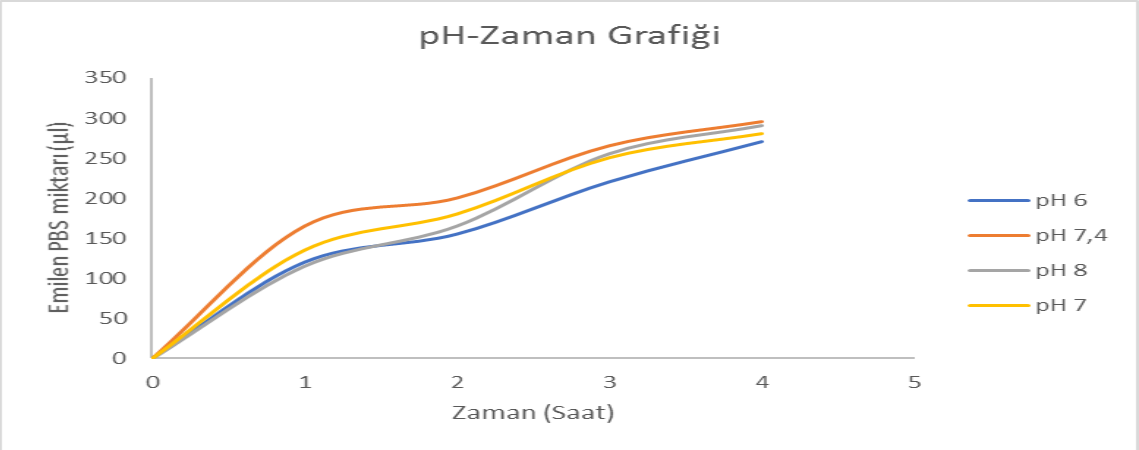
Şekil 4.9 Hidrojelin BET analizi ile belirlenen özellikleri

CMC-kitosan hidrojelinin BET analizi sonucunda yüzey alanı **9.513 $m^2/g$** olarak belirlenmiştir.

### 4.1.4 Şişme Kapasitesi

#### 4.1.4.1 pH Değerinin Membranın Şişme Karakterine Etkisi

Optimize edilmiş değere göre 200 µl MBA ve 1 ml APS ile sentezlenen hidrojel örneğinden elde edilen 1 cm çapındaki 4 adet kesit, 4 farklı pH değerine sahip 500µl PBS solüsyonları içerisinde $37^0$C'de şişmeye bırakılmıştır. Hidrojelin, hücre kültürü ortamında $37^0$C'de hücrelerle muamele edilmesi gerektiği için sıcaklık değeri $37^0$C olarak seçilmiştir. 1 saat süreyle şişme sağlanmış, süre sonunda membran çıkarılmış ve ıslak hidrojelin ağırlığı not edilmiş ve hidrojel yeniden aynı PBS solüsyonuna geri bırakılarak şişmeye devam etmesi sağlanmıştır. Her saatin sonunda hidrojelin ağırlığı kontrol edilerek not edilmiştir.




Şekil 4.10 pH değerinin membran şişme özelliğine etkisi ($37^0$C'de)

#### 4.1.4.2 Yüzde Şişme Oranı

Optimize edilen değerlerle sentezlenen 1 cm çaplı eşit özellikli 5 adet hidrojel kesiti hazırlandı. Bu plakların kuru ağırlığı tartılarak not edildi. Ardından membranlar, içinde 400 µl distile su bulunan falkon tüplere konulup, kapakları sıkıca kapatılarak 24 saat bekletildi. Süre sonunda membranlar tartıldı ve son durumdaki ağırlıkları not edildi. Sonuçlar Eşitlik 4.1'de yerine yazılarak % şişme oranı hesaplandı:

$Q = (Wt - W_0) / W_0$ formülasyonu kullanılmıştır. (4.1)

Eşitlikte $W_0$; ilk durumdaki kuru polimer kütlesi $W_t$, t süre sonraki şişmiş polimerin kütlesidir.

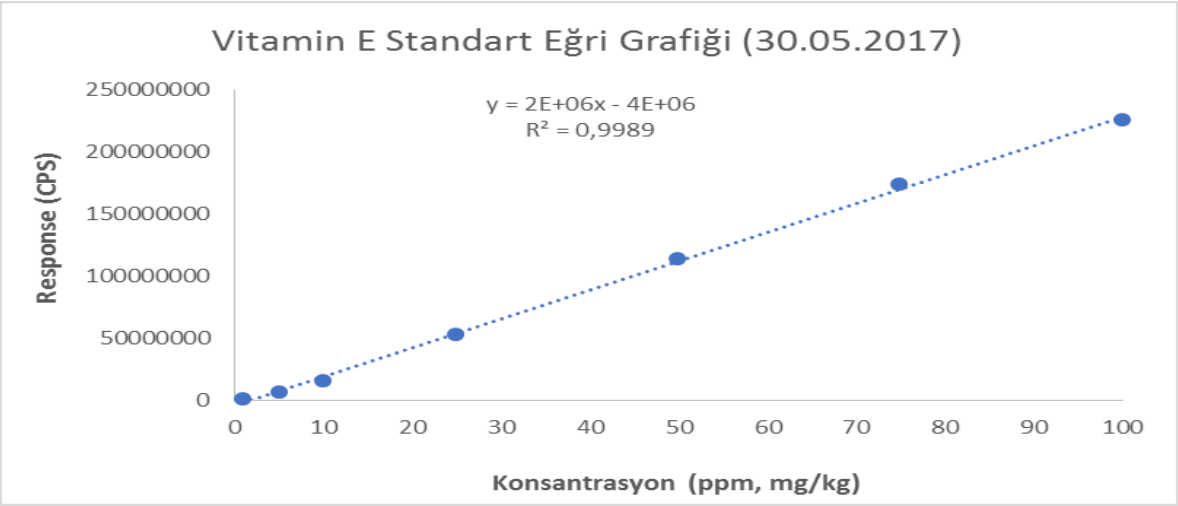
Buna göre ortalama yüzde şişme oranı;

Çizelge 4.2 CMC-kitosan hidrojelin ortalama % şişme oranı

| CMC-CHI Membran Kuru Ağırlık (g) | CMC-CHI Membran Hidrat Haldeki Ağırlık (g) | CMC-CHI Membranın Şişme Oranı (%) |
|---|---|---|
| 0,0068 | 0,0284 | 317,7 |
| 0,0055 | 0,0244 | 343,6 |
| 0,0042 | 0,0204 | 385,7 |
| **ORTALAMA** | | **349** |

### 4.2 Vitamin E Salımı ve Standart Eğrinin Belirlenmesi

Vitamin E standart solüsyon %80 etanol ile; 1ppm, 5ppm, 10ppm, 25ppm, 50ppm, 75ppm ve 100ppm değerlerinde çözelti hazırlamıştır. Bu değerlere göre kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.




Şekil 4.11 Vitamin E standart eğri grafiği

300 ppm konsantrasyonda hazırlanan vitamin E solüsyon, optimize edilmiş değerlerle sentezlenen 1 cm çaplı bir hidrojel tabakası üzerine (200µl) eklenerek $37^0$C çalkalamalı etüvde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Falkon tüpte kalan vitamin E solüsyon ve hidrojelin yıkanmasında kullanılan distile su içerisindeki vitamin E miktarı analiz edilmiştir.

### 4.2.1 Vitamin E'ye ait LOD ve LOQ Değerleri

500 ppb konsantrasyondaki Vitamin E örneği için 7 kez +ESI EIC analizi tekrarlandı. Standart sapma 7283,225 olarak hesaplandı. Eğim ise grafiğe bağlı olarak; 181,868 olarak belirlendi. Buna göre;

**LOD=** (3 x Std Sapma) / Eğim= **120 ppb** (4.2)

**LOQ=** (10 x Std Sapma) / Eğim= **400 ppb** (4.3)

### 4.2.2 Hidrojele Yüklenen Vitamin E Hesabı:

Optimize edilmiş değerlerle hazırlanan CMC-kitosan hidrojel kesitine başlangıç olarak 300 ppm vitamin E yüklenmiştir. Buna göre, hidrojele hapsolan vitamin E miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Hidrojele yüklenemeyen vitamin E miktarları

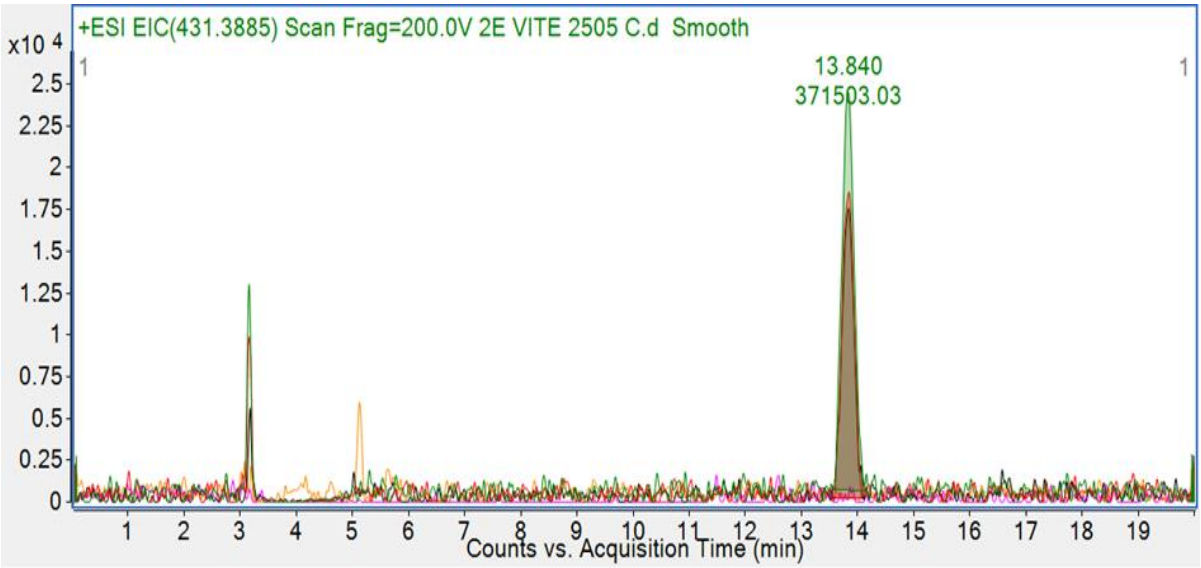
| | **Yükleme yapılan tüpte kalan Vitamin E miktarları** mg/L (ppm) | **Hidrojelin yıkama suyuna bırakılan Vitamin E miktarları** mg/L (ppm) |
|---|---|---|
| 1.örnek | 241 | 35 |
| 2.örnek | 239 | 23 |
| 3.örnek | 231 | 22 |
| **ORTALAMA** | **237** | **27** |
| **TOPLAM** | **264 mg/L (ppm)** | |

**300 ppm – (237 + 27) = <u>36 ppm</u>** hidrojele yüklenen vitamin miktarıdır.

**36 ppm** Vitamin E yüklenmiş olan hidrojelden Vitamin E salım miktarları ve grafikleri;

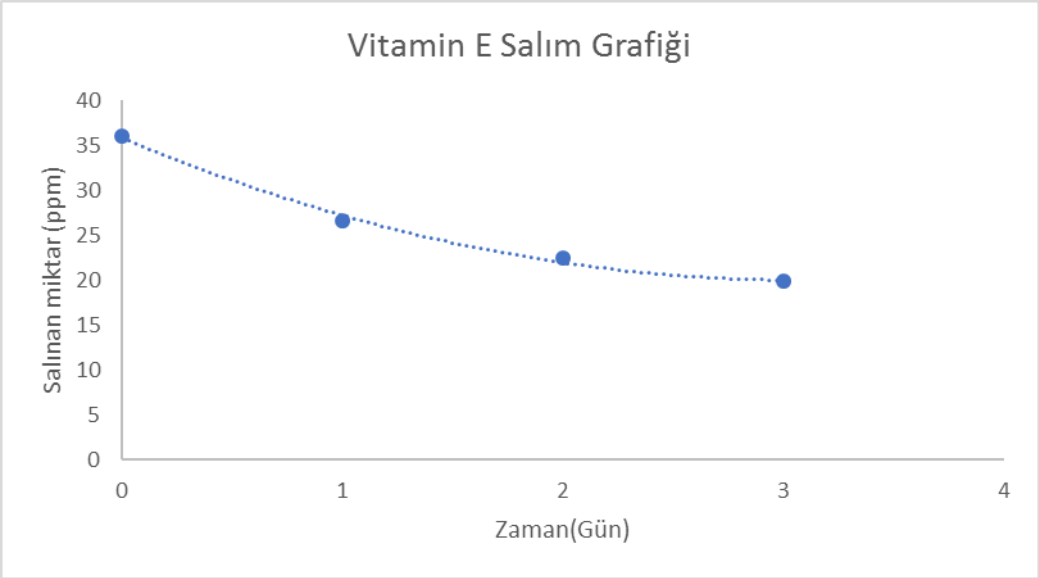
Çizelge 4.4 Günlere göre Vitamin E sinyal ve salım miktarı

| **Gün** | **1.** | **2.** | **3.** | **4.** | **5.** | **6.** | **7.** | **8.** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Sinyal Şiddeti (CPS)** | 636111 | 266210 | 286258 | - | - | - | - | - |
| | 718684 | 280134 | 378817 | - | - | - | - | - |
| | 756080 | 371503 | 493091 | - | - | - | - | - |
| **Salım Miktarı (ppm)** | 9,00 | 4,13 | 2,64 | - | - | - | - | - |
| | 9,45 | 4,14 | 2,68 | - | - | - | - | - |
| | 9,65 | 4,18 | 2,74 | - | - | - | - | - |




Şekil 4.12 2.gün salım değerlerini gösteren örnek +ESI EIC kromotogram

Algılama limitinin daha altında değerler vermesinden dolayı 4.gün, 5.gün, 6.gün, 7.gün ve 8.gün **salım değeri sinyali ölçülemedi.**




Şekil 4.13 Hidrojelden Vitamin E salım miktarını belirten grafik

**Toplam:** **16,2 ppm** Vitamin E salınmış; **19,8 ppm** Vitamin E hidrojel yapısı içerisine hapsolmuştur.

## 4.3 İn vitro Çalışmalar

### 4.3.1 Sitotoksisite (MTT)

MTT çalışması sonucunda belirlenen günler dahilinde hücre canlılık oranı tespit edilmiş ve buna göre yüzde canlılık oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Yüzde canlılık Eşitlik 4.4 kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre;

$$\%\text{Canlılık} = 100 \times OD_{570e} / OD_{570b} \quad (4.4)$$

Eşitlik 4.4'e göre;

OD570e: Test grubu örneklerinin 570 nm'de verdiği absorbans

OD570b: Kontrol grubu örneklerinin 570 nm'de verdiği absorbansı

Çizelge 4.5 MTT çalışmasına göre belirlenen yüzde canlılık değerleri ve ortalamaları

| Günler | Kontrol | Hidrojel(%Canlılık) | Vitamin E emdirilmiş hidrojel(%Canlılık) |
|---|---|---|---|
| 1 | 100 | 96,3 | 121,81 |
| 3 | 100 | 67,4 | 71,86 |
| 5 | 100 | 73,55 | 66,78 |
| 7 | 100 | 73,3 | 68,464 |
| Ortalama %canlılık | 100 | 77,6375 | 82,2285 |

Vitamin içermeyen hidrojelin **%77,64** ve Vitamin E yüklenmiş hidrojelin ise **%82,23** oranında hücre canlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da vitamin E'nin etkinleştirildiği hidrojelin hücre canlılık oranını, vitaminsiz hidrojele göre daha fazla arttırdığını göstermektedir.

### 4.3.2 Elüsyon Metodu

Bu çalışmaya göre elde edilen yüzde canlılık değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Elüsyon metodu uygulanan hücrelerin 570nm'de gösterdiği canlılık değerleri (24 saat)

| | | | | | Ortalama | %Canlılık |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol | 0,57 | 0,709 | 0,647 | 0,723 | 0,66225 | 100 |
| Membran | 0,675 | 0,629 | 0,64 | 0,556 | 0,625 | 94,3752359 |
| Vitamin E emdirilmiş membran | 0,653 | 0,598 | 0,621 | 0,625 | 0,62425 | 94,2619857 |

Buna göre 24 saat sonunda vitamin içermeyen hidrojel %94,38 oranında, vitamin E emdirilmiş hidrojel ise %94,262 oranında hücre canlılığı ortaya koymuştur.

## ÖNERİLER

FT-IR analizine bağlı olarak saf polimerlerin ve bunlardan sentezlenen CMC-kitosan hidrojelin taşıdığı fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.

Kitosan ve CMC polimerleri kullanılarak sentezlenen membranın FT-IR analizine göre; MBA (çapraz bağlayıcı) oranının değişimi, FT-IR analiz piklerinin konumunu etkilemezken, şiddetinde artma veya azalma şeklinde etki göstermiştir. Çapraz bağlayıcı oranı, fonsiyonel grupları vs. etkilememiş ancak hidrojelin yapısında, gözeneklerinde farklılıklar meydana getirdiği için pik şiddetlerinde farklılıklar meydana gelmiştir. Aynı şekilde APS (başlatıcı katalizör) oranının değişimi ile; piklerin konumu etkilenmezken şiddetlerinde farklılaşmalar meydana gelmiştir. APS miktarı, reaksiyon başlama anının farklılaşması ile doğrudan ilişkilendirilebileceği için, FT-IR analizinde piklerin şiddetlerinde farklılaşmalar yaratmış olabilmektedir.

Saf polimerlerin FT-IR analizi incelendiğinde; hidrojelin sentezinin, bu iki polimerin etkileşimi doğrultusunda gerçekleştiği kanıtlanmış olmaktadır. Çünkü CMC ve kitosan polimerlerinin verdiği spesifik karakterli piklerin birlikteliği ile hidrojele ait spesifik karakterli yeni bazı pik yapıları gözlenmiştir. Literatürde yer alan (Kumar Sing Yadav ve Shivakumar [107]) ve (Lü vd. [106]) gibi çalışmalar incelendiğinde CMC ve kitosan polimerlerinin FT-IR analizlerinde de bu çalışmada yer alan spektrumlardaki piklere ve dalgaboyları örtüşmüştür.

SEM analizine bağlı olarak; sentezlenen CMC-kitosan hidrojellerinin farklı büyüklüklerde gözenek yapılarına sahip olduğu gözlenmiştir. İki polimerin çapraz bağlanması ile birçok gözenek yapısı oluşmuştur. Bu gözenekler; yara örtüsü materyali olarak kullanılacak olan hidrojelin hava geçirgenliği, vitamin E'yi emme kapasitesi, yara eksüdasının buharlaşmasına olanak sağlaması gibi özelliklere katkı sağlayacağı için büyük ölçüde önem taşımaktadır. CMC-kitosan hidrojel örneklerinin SEM analizleri örnek literatür verileri ile (Chen ve Fan [105]) kıyaslandığında, SEM görüntülerinin bu çalışmadaki görüntüler ile benzerliği dikkat çekmektedir. Bunun yanı sıra diğer çalışmalarda (Lü vd.[106]) yer alan por çapı büyüklükleri, bu çalışmadaki değerlerle

uyumludur (Tian vd. [108]). Farklı oranlarda çapraz bağlayıcı kullanımı, hidrojel yapısındaki por büyüklüğünün çeşitli oranlarda olabilmesine olanak sağlamıştır.

Farklı MBA (100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl) ve APS (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml) konsantrasyonlarıyla sentezlenerek FT-IR ve SEM analizi yapılmış olan CMC-kitosan hidrojellerin arasından formasyon, polimerizasyon kalitesi ve süresi, toksisite vb. özellikleri gözönünde bulundurularak belirlenen 200 µl MBA ve 1 ml APS ile hazırlanan hidrojel örneği seçilerek optimize edilmiştir. Buna göre; BET analizi, şişme kapasitesi, vitamin E yükleme ve salım deneyleri ve sitotoksisite deneyleri; optimize edilen parametrelerle sentezlenen hidrojel ile gerçekleştirilmiştir.

BET analizine göre; CMC-kitosan hidrojelinin BET analizi sonucunda yüzey alanı 9.513 $m^2/g$ olarak belirlenmiştir. (Husband [109]) ve (Phisalaphong ve Jatupaiboon [110]) çalışmalarında yer alan ve kitosan, CMC kullanılarak sentezlenen hidrojel örneklerinde (çapraz bağlanma yapılmamış) BET analizi ile ölçülen yüzey alanı ortalama 12 $m^2/g$'dir. Bu çalışmada BET analizi ile ölçülen yüzey alanı literatürdeki örneklere yakın bir değerdedir.

Çapraz bağlayıcı miktarının, gözenek yapısına etkisinin SEM analizi ile incelenmesi doğrultusunda; çapraz bağlayıcı miktarının artması ile gözenek yapılarının küçüldüğü ve hidrojelin daha kompakt bir kimyasal bağlanma gerçekleştirdiği görülmüştür.

Sentezlenen hidrojel, hücre kültürü ortamında kullanılacağı için şişme ve salım deneylerinde $37^0C$ sıcaklık ortamı seçilmiştir. Hidrojelin şişme özelliğine pH değerinin etkisi incelenmiş ve en iyi şişme sağlanan değer pH 7,4 olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda vitamin yükleme ve salım deneyleri de $37^0C$ sıcaklıkta ve pH 7,4 özellikte PBS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatür çalışmalarında (Fukuda ve Kikuchi [111]) ve (Tian vd. [108]) gibi, yer aldığı üzere CMC ve kitosan polimerlerinin kullanımı ile hazırlanan hidrojellerde maksimum şişme değerlerine yaklaşık 2,5 – 5 arasında ulaşılmıştır. Bu çalışmada ise maksimum şişme değeri 7,4 olarak belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak çaprazbağlayıcı olarak kullanılan MBA gösterilebilir. Çünkü MBA, pH>=5 iken çözünürlük göstermektedir. Dolayısıyla CMC ve kitosan polimerlerini çapraz bağlayarak kopolimerize etmesi için uygun çözünürlüğe ulaşması gerekir. Hazırlanan CMC-kitosan hidrojelin 7,4 pH'da en yüksek şişme değerine sahip olması bundan kaynaklanmış olmalıdır.

Vitamin E standart eğrisi; 1 ppm-100 ppm konsantrasyon aralığında çizilmiş ve $R^2$ değeri 1'e oldukça yakın bir grafik eğrisi elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış, buna göre Vitamin E için analizi yapılabilecek sınırlar belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerlerinin, hidrojelden vitamin E salımı sürecinde ölçülebilen en düşük değerler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Hidrojelin 36 ppm vitamin E emdiği, buna karşılık yalnızca 16,2 ppm Vitamin E salımı yaptığı belirlenmiştir. Hidrojelin emdiği vitaminin yaklaşık yarısını salmaması; vitaminin, hidrojel gözeneklerine hapsolmuş olması ve hidrojelin yapısındaki yan gruplara bağlanmış ve böylece tam olarak salınamaması şeklinde yorumlanmıştır.

Kullanılan 300 ppm konsantrasyondan daha yüksek değerlerde vitaminin hidrojele yüklenmesi ve daha sonra hücre kültür ortamında hücrelerle muamelesinin; hücreler üzerinde etil alkol miktarının artışıyla birlikte toksik bir etki yapmasına neden olduğu için ve 300 ppm üzerindeki değerlerin ESI-MS ile tayin edilememesi nedenlerinden dolayı daha yüksek değerlerde vitamin yüklemesi yapılmamıştır.

MTT çalışmasına göre; 24 saat sonunda vitamin E yüklenmiş olan CMC-kitosan hidrojelin, hücre proliferasyonunu belirgin oranda arttırdığı kanıtlanmıştır. Bunun yanısıra vitamin emdirilmemiş hidrojelin 24 saat sonunda hücre proliferasyonu arttırmadığı ancak olağan seyrinde ilerlemesini sağladığı gözlemlenmiştir. Bu durum, 3.günün sonunda da aynı şekilde gözlemlenmiştir.

24 saat sonundaki hücre proliferasyonunun, ilerleyen günlerdeki hücre proliferasyonuna oranla daha yüksek olması; çalışmanın ilerleyen günlerinde hücre çoğalmasının daha da artması ile hücrelerin çoğalacak yeterli alan bulamayıp litik faza geçmesi ile canlılık oranlarının düşmesinden dolayı kaynaklanmış olabilmektedir. Hücrelerin yeterli çoğalacak alanının bulunduğu 1.gün ve 3.günde tespit edilen canlılık oranları, hidrojel etkinliğinin belirlenmesinde daha doğru sonuç ortaya koymaktadır.

Elüsyon metodu ile, MTT çalışmasının bir nevi kontrolü sağlanmıştır. Bu çalışma ile hidrojelin DMEM içerisinde inkübe edilmesiyle; sentezlenen biyomalzemenin yapısındaki polimerler, çapraz bağlayıcı maddeler vs. kaynaklı olabilecek muhtemel toksik bir maddenin veya hücre artışını sağlayacak proliferatif bir maddenin DMEM solüsyona geçmesi sağlanmıştır. Bu solüsyonun hücreler üzerindeki etkinliği test edilmiş ve böylece hücre canlılığı, MTT çalışması ile kıyaslanarak sonuçların aynı paralellikte olduğu görülmüştür.

Elüsyon metodunda, MTT çalışmasının sonucundan farklı olarak, vitamin emdirilmiş hidrojel ve vitamin emdirilmemiş hidrojel arasında hücre canlılığı açısından belirgin bir farklılık oluşmamıştır. Bunun nedeni, yüklenen vitaminin 24 saatte DMEM solüsyona salınımımın yeterli oranda gerçekleşmemesi ve membran içerisine hapsolmasından dolayı olmaktadır.

## KAYNAKLAR


[1] Arab, A., Orakçı, V., Erbilen, M., & Şahin, M., (1994). "Yara İyileşmesi", Journal of Turgut Özal Medical Center, 1(2): 160-166.

[2] Valenta, C., & Auner, B. G., (2004). "The Use of Polymers for Dermal and Transdermal Delivery", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 58(2): 279-289.

[3] Arıcan, M., & Parlak, K., (2016). "Yara Örtü Materyalleri", Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Surgery-Special Topics, 2(1): 32-40.

[4] Kurtoğlu, A. H., (2009). "YARA TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: MODERN YARA ÖRTÜLERİ", Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 38(3): 211-232.

[5] Enoch, S., & Leaper, D. J., (2005). "Basic Science of Wound Healing", Surgery (Oxford), 23(2): 37-42.

[6] Lorenz, H. P., & Longaker, M. T., (2006). "Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment", Plastic Surgery, 1: 209-32.

[7] Parsak, C. K., Sakman, G., & Çelik, Ü., (2007). "Yara İyileşmesi, Yara Bakımı ve Komplikasyonları", Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 16(2).

[8] Singer, A. J., & Clark, R. A., (1999). "Cutaneous Wound Healing", New England Journal of Medicine, 341(10): 738-746.

[9] Li, J., Chen, J., & Kirsner, R., (2007). "Pathophysiology of Acute Wound Healing", Clinics in Dermatology, 25(1): 9-18.

[10] Gurtner, G. C., & Wong, V. W., (2007). "Wound Healing: Normal and Abnormal", Grabb Plastic Surgery 6th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer-Lippincot William and Wilkins, 15-22.

[11] Baum, C. L., & Arpey, C. J., (2005). "Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events", Dermatologic Surgery, 31(6): 674-686.

[12] Karasu, A., & Bakır, B., (2008). "Wound and Wound Healing", YYÜ Veteriner Cerrahi Dergisi, 14(1): 36-43.

[13] Kumar, S., Wong, P. F., & Leaper, D. J., (2004). "What is new in wound healing?", Turkish Journal of Medical Sciences, 34(3): 147-160.

[14] Ersoy, Y., Duran, M., & Tayyar, A. E., (2015). "Tıbbi Tekstiller ve Yara Örtüsü", Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(2).

[15] Ruszczak, Z., & Schwartz, R. A., (2000). "Modern Aspects of Wound Healing: An Update", Dermatologic Surgery, 26(3): 219-229.

[16] Hanna, J. R., & Giacopelli, J. A., (1997). "A Review of Wound Healing and Wound Dressing Products", The Journal of Foot and Ankle Surgery, 36(1): 2-14.
[17] Altay, P., & Başal, G., (2010). "Yara örtüleri", Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 4(1): 109-121.
[18] Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., & Vasheghani-Farahani, E., (2010). "Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review", Iran Polym J, 19(5): 375-398.
[19] Altınışık, A., & Yurdakoç, K., (2011). "Synthesis, Characterization and Enzymatic Degradation of Chitosan/PEG Hydrogel Films", Journal of Applied Polymer Science, 122(3): 1556-1563.
[20] Lee, K. Y., & Mooney, D. J., (2001). "Hydrogels for Tissue Engineering", Chemical Reviews, 101(7): 1869-1880.
[21] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H., (2000). "Hydrogels in Pharmaceutical Formulations", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50(1): 27-46.
[22] Park, K., Shalaby, W. S. W., & Park, H., (1993). "Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery", Technomic Publishing Company, **1**(4): 8.
[23] Duran, S., Şolpan, D., & Güven, O., (1999). "Synthesis and Characterization of Acrylamide–Acrylic Acid Hydrogels and Adsorption of Some Textile Dyes", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 151(1): 196-199.
[24] Lee, P. Y., Li, Z., & Huang, L., (2003). "Thermosensitive Hydrogel as a Tgf-β1 Gene Delivery Vehicle Enhances Diabetic Wound Healing", Pharmaceutical research, 20(12): 1995-2000.
[25] Masters, K. S. B., Leibovich, S. J., Belem, P., West, J. L., & Poole-Warren, L. A., (2002). "Effects of Nitric Oxide Releasing Poly (vinyl alcohol) Hydrogel Dressings on Dermal Wound Healing in Diabetic Mice", Wound Repair and Regeneration, 10(5): 286-294.
[26] Shahbuddin, M., Bullock, A. J., MacNeil, S., & Rimmer, S., (2014). "Glucomannan-Poly (N-vinyl pyrrolidinone) Bicomponent Hydrogels for Wound Healing", Journal of Materials Chemistry B, 2(6): 727-738.
[27] Walker, M., Hobot, J. A., Newman, G. R., & Bowler, P. G., (2003). "Scanning Electron Microscopic Examination of Bacterial Immobilisation in a Carboxymethyl Cellulose (AQUACEL®) and Alginate Dressings", Biomaterials, 24(5): 883-890.
[28] Casimiro, M. H., Leal, J. P., & Gil, M. H., (2005). "Characterisation of Gamma Irradiated Chitosan/pHEMA Membranes for Biomedical Purposes", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 236(1): 482-487.
[29] Liu, W., Griffith, M., & Fengfu, L. I., (2008). "Alginate Microsphere-Collagen Composite Hydrogel for Ocular Drug Delivery and Implantation", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(11): 3365-3371.
[30] Gu, J., Xia, F., Wu, Y., Qu, X., Yang, Z., & Jiang, L., (2007). "Programmable Delivery of Hydrophilic Drug Using Dually Responsive Hydrogel Cages", Journal of Controlled Release, 117(3): 396-402.

[31] Gao, X. ve ark., (2014). "Biodegradable, pH-Responsive Carboxymethyl Cellulose/Poly (Acrylic Acid) Hydrogels for Oral Insulin Delivery", Macromolecular Bioscience, 14(4): 565-575.

[32] Purcell, B. P. ve ark., (2014). "Injectable and Bioresponsive Hydrogels for on-Demand Matrix Metalloproteinase Inhibition", Nature Materials, 13(6): 653-661.

[33] Schmedlen, R. H., Masters, K. S., & West, J. L., (2002). "Photocrosslinkable Polyvinyl Alcohol Hydrogels That Can Be Modified with Cell Adhesion Aeptides for Use in Tissue Engineering", Biomaterials, 23(22): 4325-4332.

[34] Kuo, C. K., & Ma, P. X., (2008). "Maintaining Dimensions and Mechanical Properties of Ionically Crosslinked Alginate Hydrogel Scaffolds In Vitro", Journal of biomedical materials research Part A, 84(4): 899-907.

[35] Liu, Y., & Chan-Park, M. B., (2009). "Hydrogel Based on İnterpenetrating Polymer Networks of Dextran and Gelatin for Vascular Tissue Engineering", Biomaterials, 30(2): 196-207.

[36] Park, H., Choi, B., Hu, J., & Lee, M., (2013). "Injectable Chitosan Hyaluronic Acid Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering", Acta Biomaterialia, 9(1): 4779-4786.

[37] Hudson, S. P., Langer, R., Fink, G. R., & Kohane, D. S., (2010). "Injectable In Situ Cross-Linking Hydrogels for Local Antifungal Therapy", Biomaterials, 31(6): 1444-1452.

[38] Trksak, R. M., & Ford, P. J., U.S. Patent No. 7,422,638. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, https://www.google.com/patents/US7422638, 20 Nisan 2017.

[39] Katayama, T., Ogasawara, T., Sasaki, Y., Al-Assaf, S., & Phillips, G., U.S. Patent Application No. 11/658,003, https://www.google.com/patents/US20080038436, 22 Nisan 2017.

[40] Phillips, G. O., Du Plessis, T. A., Al-Assaf, S., & Williams, P. A., U.S. Patent No. 6,841,644. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, https://www.google.com/patents/US6841644, 26 Nisan 2017.

[41] Sen, M., Radiation synthesis of hydrogels with diprotic acid moieties and their use in the adsorption of biomolecules, http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/34/018/34018065.pdf?r=1, 5 Haziran 2017.

[42] Gulrez, S. K., Al-Assaf, S., & Phillips, G. O., (2011). "Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications", In Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-from Analysis and Modeling to Technology Applications, InTech.

[43] İU, T., (2001). Poli (Vinil Eter) Bazlı Ampifilik Hidrojellerin Sentezi ve Kontrollü İlaç Salım Uygulamaları, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[44] Taşkın, P., (2015). Kitosanın Radyasyonla Bozunmasına Deasetilizasyon Derecesinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

[45] Agboh, O. C., & Qin, Y., (1997). "Chitin and Chitosan Fibers", Polymers for Advanced Technologies, 8(6): 355-365.

[46] Montazer, M., & Afjeh, M. G., (2007). "Simultaneous X-Linking and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabric", Journal of Applied Polymer Science, 103(1): 178-185.
[47] Jayakumar, R., Prabaharan, M., Kumar, P. S., Nair, S. V., & Tamura, H., (2011). "Biomaterials Based on Chitin and Chitosan In Wound Dressing Applications", Biotechnology Advances, 29(3): 322-337.
[48] Saravanan, S., Nethala, S., Pattnaik, S., Tripathi, A., Moorthi, A., & Selvamurugan, N., (2011). "Preparation, Characterization and Antimicrobial Activity of A Bio-Composite Scaffold Containing Chitosan/Nano-Hydroxyapatite/Nano-Silver for Bone Tissue Engineering", International Journal Of Biological Macromolecules, 49(2): 188-193.
[49] Paul, W., & Sharma, C. P., (2004). "Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review", Trends Biomater Artif Organs, 18(1): 18-23.
[50] Cho, Y. W., Cho, Y. N., Chung, S. H., Yoo, G., & Ko, S. W., (1999). "Water-Soluble Chitin As A Wound Healing Accelerator", Biomaterials, 20(22): 2139-2145.
[51] Usami, Y., Okamoto, Y., Takayama, T., Shigemasa, Y., & Minami, S., (1998). "Chitin and Chitosan Stimulate Canine Polymorphonuclear Cells to Release Leukotriene B4 and Prostaglandin E2", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 42(4): 517-522.
[52] Duman, S. S., & Şenel, S., (2004). "Kitosan ve Veteriner Alandaki Uygulamaları", Veteriner Cerrahi Dergisi, 10(3-4): 62-72.
[53] Wollina, U., Heide, M., Müller-Litz, W., Obenauf, D., & Ash, J., (2003). "Functional Textiles In Prevention of Chronic Wounds, Wound Healing and Tissue Engineering", In Textiles and The Skin, 31: 82-97).
[54] Queen, H., (2006). Electrospinning Chitosan-Based Nanofibers for Biomedical Applications, Yüksek Lisans Tezi, Kuzey Karolina Eyalet Üniversitesi Tekstil Mühendisliği, Kuzey Karolina.
[55] Mecit, D., Ilgaz, S., Duran, D., Basal, G., Gueluemser, T., & Tarakcioglu, I., (2007). "Technical Textiles and Applications (part 1)", Tekstil ve Konfeksiyon, 17(2): 79-82.
[56] Lim, S. H., (2003). Synthesis of A Fiber-Reactive Chitosan Derivative and Its Application to Cotton Fabric As An Antimicrobial Finish and A Dyeing-İmproving Agent, Doktora Tezi, Kuzey Karolina Eyalet Üniversitesi Fiber ve Polimer Bilimi, Kuzey Karolina.
[57] Fengel, D., & Wegener, G., (1984). "Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions", Walter de Gruyter, 613: 1960-82.
[58] Köksel, H., (2005). Karbonhidratlar Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
[59] Nalbantoğlu, A., (2012). Kimyasal Çapraz Bağlı 2-akrilamido-2-metil-1-propansülfonik Asit, Sodyum Karboksimetil Selüloz ve Montmorillonit İçeren Akrilamid Esaslı Polimerik Kompozitlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Yüzeye Soğurum Çalışmalarının Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
[60] Khurma, J. R., Rohindra, D. R., & Nand, A. V., (2006). "Synthesis and Properties of Hydrogels Based on Chitosan and Poly (Vinyl Alcohol) Crosslinked by Genipin", Journal of Macromolecular Science, 43(4-5): 749-758.

[61] Coffey, D. G., Bell, D. A., & Henderson, A., (1995). "Cellulose and Cellulose Derivatives", Food Science And Technology, 123-123.
[62] Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., & Stokke, B. T., (2006). "Similarities and Differences Between Alginic Acid Gels and Ionically Crosslinked Alginate Gels", Food Hydrocolloids, 20(2): 170-175.
[63] Dilaver, M., (2011). Preparation and Characterization of Carboxymethylcellulose Based Hydrogels, Doktora Tezi, DEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
[64] Kırcı, H., Ateş, S., & Akgül, M., (2001). "Selüloz Türevleri ve Kullanım Yerleri", Fen ve Mühendislik Dergisi, 4(2): 119-130.
[65] Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H., (2005). "Lignin", Thermal Properties of Green Polymers and Biocomposites, 171-215.
[66] Dündar, Y., & Aslan, R., (1999). "Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü", Hayvancılık Araştırma Dergisi, 306: 1-17.
[67] Kappus, H., & Diplock, A. T., (1992). "Tolerance and Safety of Vitamin E: A Toxicological Position Report", Free Radical Biology and Medicine, 13(1): 55-74.
[68] Galeano, M., ve ark., (2001). "Raxofelast, A Hydrophilic Vitamin E-Like Antioxidant, Stimulates Wound Healing In Genetically Diabetic Mice", Surgery, 129(4): 467-477.
[69] Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. E., & Drevon, C. A., (1990). "Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E", J Nutr, 120(3): 233-42.
[70] Zingg, J. M., (2007). "Vitamin E: An Overview of Major Research Directions", Molecular Aspects of Medicine, 28(5): 400-422.
[71] Robertson, J. M., Donner, A. P., & Trevithick, J. R., (1989). "Vitamin E Intake and Risk of Cataracts In Humans", Annals of the New York Academy of Sciences, 570(1): 372-382.
[72] Thiele, J. J., & Ekanayake-Mudiyanselage, S., (2007). "Vitamin E In Human Skin: Organ-Specific Physiology and Considerations for Its Use In Dermatology", Molecular Aspects of Medicine, 28(5): 646-667.
[73] Machlin, L. J., (1991). Handbook of Vitamins, New York.
[74] Fukui, E. ve ark., (1989). "Enhancing Effect of Medium-Chain Triglycerides on Intestinal Absorption of d-α-tocopherol Acetate from Lecithin-Dispersed Preparations In The Rat", Journal of Pharmacobio-Dynamics, 12(2): 80-86.
[75] Traber, M. G., & Sies, H., (1996). "Vitamin E in Humans: Demand and Delivery", Annual Review of Nutrition, 16(1): 321-347.
[76] Taren, D. L. ve ark., (1987). "Increasing the Breaking Strength of Wounds Exposed to Preoperative Irradiation Using Vitamin E Supplementation", Int J Nutr Res 57, 133.
[77] MacKay, D. J., & Miller, A. L., (2003). "Nutritional Support for Wound Healing", Alternative Medicine Review, 8(4): 359-378.
[78] Şeker, M. E. ve ark., (2012). "Determination of Vitamin E Isomers of Grape Seeds by High-Performance Liquid Chromatography–UV Detection", Journal of Chromatographic Science, 50(2): 97-101.
[79] Holler, F. J. ve ark., (2007). Principles of Instrumental Analysis, Belmont.
[80] Ayaslan, M., (2003). Bazı Metal (II) Phthalazine Bileşiklerinin Infrared Spektroskopi Yöntemiyle Araştırılması ve Phthalazine Molekülünün Titreşim

Spektrumunun Teorik Olarak İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[81] Davis, R., & Mauer, L. J., (2010). "Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy: A Rapid Tool for Detection and Analysis of Foodborne Pathogenic Bacteria", Current Research, Technology and Education Topics In Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2: 1582-1594.

[82] Altınışık, M., (2004). Spektroskopik Analiz Yöntemleri, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Ders Notları.

[83] Hong, H. ve ark., (2009). "Preparation and Characterization of Chitosan/PEG/Gelatin Composites for Tissue Engineering", Journal of Applied Polymer Science, 114(2): 1220-1225.

[84] Zang, L. ve ark., (2010). "Preparation and Characterization of Poly (Ethylene Glycol)/Organo-Vermiculite Nanocomposite Polymer Electrolytes", Polymer Bulletin, 65(7): 669-680.

[85] Encyclopaedia Britannica, Britannica Book of the Year, https://www.britannica.com/, 23 Nisan 2017.

[86] Smith, K. C. A., & Oatley, C. W., (1955). "The Scanning Electron Microscope and Its Fields of Application", British Journal of Applied Physics, 6(11): 391.

[87] Bogner, A. ve ark., (2007). "A history of Scanning Electron Microscopy Developments: Towards “Wet-STEM” Imaging", Micron, 38(4): 390-401.

[88] Hogg, R., (1980). "Characterization of Mineral Surfaces", Fine Particle Processing, 1: 492-524.

[89] Allen, T., (1997). Particle Size and Measurement, 1, Chapman and Hall, Londra.

[90] Jaycock, M. J., & Parfitt, G. D., (1981). Chemistry of Interfaces, E. Horwood, http://agris.fao.org, 23 Nisan 2017.

[91] Karadağ, E. ve ark., (2010). "Investigation of Sorption/Swelling Characteristics of Chemically Crosslinked Aam/Sma Hydrogels As Biopotential Sorbent", Journal of Applied Polymer Science, 117(3): 1787-1797.

[92] Evmenenko, G. ve ark., (1999). "Swelling-İnduced Structure Changes of Polyelectrolyte Gels", Polymer, 40(11): 2975-2979.

[93] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A., (1998). "Principles of Instrumental Analysis", Brooks/Cole.

[94] Herman, B., (1998). "Fluorescence Microscopy", Bios Scientific Publishers.

[95] TUNCER, S., & DEMİRCİ, M., (2011). "Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri", Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 21: 141-9.

[96] Çiçek, C., & Bilgiç, A., (2006). "Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model", İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 20(3): 231-241.

[97] Freshney, R. I., (1994). Culture of animal cells: a manual of basic technique, www.bib.usb.ve, 24 Nisan 2017 .

[98] Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D., (2009). "Determination of Biocompatibility", Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 13-44.

[99] Murray, P. E. ve ark., (2007). "How Is the biocompatibilty of Dental Biomaterials Evaluated?", Medicina Oral, 12(3): 258-266.

[100] Aldridge, W. N., (1993). "The Biochemical Principles of Toxicology", Exp Toxicol, 5: 56-78.

[101] Nicholson, J. W., (2002). The Chemistry of Medical and Dental Materials (RSC Materials Monographs), Royal Society of Chemistry.
[102] ISO 10993-5, (1999). Biological Evaluation of Medical Devices–Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity, Third Edition, International Valuation Standards Committee.
[103] Freshney, R. I., (2000). "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", Wiley-Liss, New York, 323.
[104] Moharamzadeh, K., Brook, I. M., & Van Noort, R., (2009). "Biocompatibility of Resin-Based Dental Materials", Materials, 2(2): 514-548.
[105] Chen, H., & Fan, M., (2008). "Novel Thermally Sensitive pH-Dependent Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Hydrogels", Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 23(1): 38-48.
[106] Lü, S., Liu, M., & Ni, B., (2010). "An İnjectable Oxidized Carboxymethylcellulose/N-Succinyl-Chitosan Hydrogel System for Protein Delivery", Chemical Engineering Journal, 160(2): 779-787.
[107] Kumar Singh Yadav, H., & Shivakumar, H. G., (2012). In Vitro and In vivo Evaluation of pH-Sensitive Hydrogels of Carboxymethyl Chitosan for Intestinal Delivery of Theophylline", ISRN Pharmaceutics.
[108] Chen, L., Tian, Z., & Du, Y., (2004). "Synthesis and pH Sensitivity of Carboxymethyl Chitosan-Based Polyampholyte Hydrogels for Protein Carrier Matrices", Biomaterials, 25(17): 3725-3732.
[109] Husband, J. C., (1998). "Adsorption and rheological studies of Sodium Carboxymethyl Cellulose Onto Kaolin: Effect of Degree of Substitution", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 134(3): 349-358.
[110] Phisalaphong, M., & Jatupaiboon, N., (2008). "Biosynthesis and Characterization of Bacteria Cellulose–Chitosan Film", Carbohydrate Polymers, 74(3): 482-488.
[111] Fukuda, H., & Kikuchi, Y., (1979). "Polyelectrolyte Complexes of Sodium Carboxymethylcellulose with Chitosan", Macromolecular Chemistry and Physics, 180(6): 1631-1633.

# ÖZGEÇMİŞ

**KİŞİSEL BİLGİLER**

**Adı Soyadı** : Melike BİLGİÇ

**Doğum Tarihi ve Yeri** : 07.01.1993 / İzmir

**Yabancı Dili** : İngilizce

**E-posta** : bayindirmelike35@gmail.com

**ÖĞRENİM DURUMU**

| Derece | Alan | Okul/Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|---|---|---|---|
| Y. Lisans | Moleküler Biyoloji ve Genetik | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2015-2017 |
| Lisans | Moleküler Biyoloji ve Genetik | Haliç Üniversitesi (Tam Burslu) | 2011-2015 |
| Lise | Örgün Eğitim | Bornova Anadolu Lisesi | 2007-2011 |

**YAYINLARI**

**Bildiri**

1. BİLGİÇ, M., (2017). "Alfa Tokoferol Yüklü Karboksimetilselüloz Kitosan Kopolimerlerinin Yara Örtü Materyali Olarak İn Vitro Değerlendirilmesi", Yıldız Teknik Üniversitesi 8. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 16-18 Mayıs 2017, İstanbul.