T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU OLUŞUMUNU ÖNLEMEK ÜZERE YARA ÖRTÜ MALZEMESİ GELİŞTİRİLMESİ VE IN VITRO ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

VOLKAN YALMAN

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

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NELİSA TÜRKOĞLU

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU OLUŞUMUNU ÖNLEMEK ÜZERE YARA ÖRTÜ MALZEMESİ GELİŞTİRİLMESİ VE IN VITRO ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Volkan YALMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 16 Nisan 2018 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. Nelisa TÜRKOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Engin KAPLAN

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Hacettepe Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün FYL-2017-3193 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında yara iyileşmesinde kullanılmak üzere yeni bir yara örtü malzemesinin geliştirilmesi amaçlanmış olup Türkiye Cumhuriyeti Devleti'ne hem bilimsel hem de ekonomik yönden katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ülkemizin bilim üretimine katkı sağladığına inandığımız bu çalışmamızı destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne destekleri için teşekkür etmeyi borç bilirim.

Tez konusu seçiminde ve tezin her aşamasında bana yardım etmekten çekinmeyen tez danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana her konuda yardımcı olan eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Engin KAPLAN'a destekleri için minnetimi belirtmekten gurur duyarım. Çalışma arkadaşlarım olan Sevgi VARLI, Funda ALKAN, Ceren KIRMIZITAŞ, Meryem AKKURT ve İlkay ŞENEL'e yardımları için teşekkür ederim. Beni hep destekleyen aileme ve Begüm ÖZDEN'e sonsuz teşekkürler.

Nisan, 2018

Volkan YALMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 1
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2 3

YARA ÖRTÜ MALZEMELERİ 3

2.1 Yara 4
2.2 Yara İyileşmesi 5
2.2.1 Hemostaz Fazı 6
2.2.2 Enflamasyon Fazı 7
2.2.3 Hücre Proliferasyonu ve Tamir Fazı 9
2.2.4 Yeniden Şekillenme Fazı 11
2.3 Yara Direnci ve Yara Kontraksiyonu 12
2.3.1 Yara direnci 12
2.3.2 Yara Kontraksiyonu 13
2.4 Yara Örtü Malzemeleri 13
2.4.1 Yapıldıkları malzemeye göre yara örtü malzemeleri 17
2.4.1.1 Hidrokolloidler 17
2.4.1.2 Aljinat 18
2.4.1.3 Hidrojeller 19

2.4.2 Fiziksel yapılarına göre yara örtü malzemleri 20
2.4.2.1 Transparan filmler 20
2.4.2.2 Köpükler 21
2.4.3 Aktif madde içeriklerine göre yara örtü malzemeleri 22
2.4.3.1 Vitaminler ve minareller 22
2.4.3.2 Büyüme faktörleri 22
2.4.3.3 Antibakteriyel moleküller 22
2.4.4 En yeni tekniklere göre yara örtü malzemeleri 23
2.4.4.1 Biyoaktif yara örtü malzemeleri 23
2.4.4.2 Doku mühendisliği ürünleri 23
2.4.4.3 Greft ve greft benzeri yara örtü malzemeleri 24

BÖLÜM 3 25

MATERYAL-METOD 25

3.1 Materyal 25
3.1.1 Kullanılan sarf malzemeleri 25
3.1.2 Kullanılan Kitler 26
3.1.3 Kullanılan Cihazlar 27
3.2 Metod 30
3.2.1 Yara örtüsünün hazırlanması 30
3.2.2 Yara örtüsünün karakterizasyon çalışmaları 31
3.2.2.1 Yüzey morfoloji analizi 32
3.2.2.2 Yüzey alanı analizi 33
3.2.2.3 Termogravimetrik analiz 34
3.2.2.4 Şişme analizi 35
3.2.2.5 Biyodegredasyon analizi 36
3.2.3 Hücre kültür çalışmaları 37
3.2.3.1 Sitotoksisite çalışmaları 37
3.2.3.2 İmmünotoksisite çalışmaları 40
3.2.3.3 Kollajen salınım çalışmaları 41
3.2.3.4 Antioksidant kapasite çalışmaları 42

BÖLÜM 4 43

SONUÇ VE ÖNERİLER 43

4.1 Yara örtü malzemelerinin hazırlanması 43
4.2 Yara örtüsünün karakterizasyon çalışmaları 45
4.2.1 Yüzey morfoloji analizi 45
4.2.2 Yüzey alanı analizi 47
4.2.3 Termogravimetrik analiz 47
4.2.4 Şişme analizi 48
4.2.5 Biyodegradasyon analizi 50
4.3 Hücre kültür çalışmaları 51
4.3.1 Sitotoksisite çalışmaları 52
4.3.1.1 MTT 52
4.3.1.2 Nötral Red 53

4.3.2 İmmünotoksisite çalışmaları 55
4.3.2.1 Makrofaj sitotoksisite çalışmaları 56
4.3.2.2 İnterlökin-1β salınımı 56
4.3.2.3 Tümör Nekroz Faktörü α salınımı 58
4.3.3 Kollajen salınım çalışmaları 59
4.3.3.1 Kollejen Tip 1 salınımı 59
4.3.3.2 Kollajen Tip 3 salınımı 61
4.3.4 Antioksidant kapasite çalışmaları 62
4.4 Tartışma 64

KAYNAKLAR 66

EK-A 74

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (SİTOTOKSİSİTE) 74

A-1 HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı 74
A-2 L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı 76
A-3 HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabı 78
A-4 L929 hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabı 80

EK-B 83

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (İMMÜNOTOKSİSİTE) 83

B-1 Makrofaj hücreleri üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı 83
B-2 İnterlökin-1β salınımı 85
B-3 Tümör nekroz faktörü α salınımı 86

EK-C 89

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (KOLLAJEN SALINIMI) 89

C-1 Kollajen tip 1 salınımı 89
C-2 Kollajen tip 3 salınımı 90

EK-D 93

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (ANTİOKSİDAN KAPASİTE) 93

D-1 Antioksidant kapasite 93

ÖZGEÇMİŞ 96

SİMGE LİSTESİ

α	alfa
β	beta
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µM	mikroMolar
CO_2	Karbondioksit
H_2O_2	HidrojenPeroksit

KISALTMA LİSTESİ

BET	Brunauer Emmett ve Teller
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Extra Cellular Matrix
FBS	Fetal Bovin Serum
HaCaT	Human immortalized keratinocyte cell line
L929	Fare fibroblast hücre hattı
mL	Mililitre
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
nM	Nanomolar
PBS	Fosfat Buffered Saline
pg	Pikogram
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TG/DTA	Termogravimetrik/ Diferansiyel termal analiz
TAS	Total antioksidant status
THP-1	İnsan monosit hücre hattı
TNF	Tümor nekroz faktörü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Edwin Smith Papirüsü[3] 3
Şekil 2.2 Derinin katmanları 4
Şekil 2.3 Yara iyileşme aşamaları 5
Şekil 2.4 Tromboz tıkacın oluşması 6
Şekil 2.5 Yaralı dokudaki nötrofillerin ve makrofajların zamana göre değişimi 7
şekil 2.6 Yara iyileşmesi fazlarının günlere göre dağılımı 10
Şekil 2.7 Fibroblast ve myofibroblast hücrelerinin karşılaştırılması 11
Şekil 2.8 Yaralanmadan önceki ve iyileşmiş bir doku arasındaki görünüm farkı 13
Şekil 2.9 Yara örtü malzemelerinin sınıflandırılması 16
Şekil 2.10 Hidrokolloid yara örtü materyalleri 17
Şekil 2.11 Aljinat yara örtü materyalleri 18
Şekil 2.12 Transparan film örneği 21
Şekil 2.13 Köpük yara örtü malzemesi örnekleri 21
Şekil 3.1 Hümik asit-aljinat ve aljinat hidrojelleri 31
Şekil 3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 32
Şekil 3.3 BET P/P_0 oaranına sahip örnek tablo 33
Şekil 3.4 TG/DTA analiz grafiği 35
Şekil 3.5 Hidrojellerin kuru ve su tutmuşgörüntüleri **A** Su tutmuş aljinat bazlı hidrojel, **B** Su tutmuş hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, **C** Kuru Aljinat bazlı hidrojel, **D** Kuru hümik asit-aljinat bazlı hidrojel 36
Şekil 3.6 MTT prösedürü (iso10993.5 2009 yılı) 38
Şekil 3.7 Nötral Red prösedürü (iso10993.5 2009 yılı) 39
Şekil 3.8 THP-1 hücre hattının Makrofaj hücrelerine farklılaşması **A** PMA uygulanmış THp-1 hücreleri 1. gün, **B** PMA uygulanmış THp-1 hücreleri 2. Gün**, C-D** PMA uygulanmış THp-1 hücreleri 3. Gün 40
Şekil 3.9 Eliza yöntemi (Thermo fisher eliza kit prosüdürü) 41
Şekil 4.1 Hidrojeller, **A** aljinat bazlı hidrojel, **B** Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel 43
Şekil 4.2 Hümik asidin in-vitro sitotoksisitesini (negatif kontrol sağlıklı hücreler, pozitif kontrol %20 DMSO içeren hücreler) 44
Şekil 4.3 Hidrojellerin SEM görüntüleri. **A** Hümik asit-aljinat içeren hidrojel 1000x büyütme,**B** Hümik asit-aljinat içeren hidrojel 2500x büyütme, **C** Aljinat içeren hidrojel 46
Şekil 4.4 Hümik asit-aljinat bazlı ve aljinat bazlı hidrojelin yüzey alanları 47

Şekil 4.5 Hidrojellerin sıcaklığa bağlı kütle kaybı grafiği 48
Şekil 4.6 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin şişme yüzdeleri ve ağırlık değişimleri 49
Şekil 4.7 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin biyodegradasyonu 51
Şekil 4.8 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin Hacat hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi(MTT) 52
Şekil 4.9 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin L929 hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi(MTT) 53
Şekil 4.10 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin HaCaT hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi (Nötral Red) 54
Şekil 4.11 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin L929 hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi (Nötral Red) 54
Şekil 4.12 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin immünotoksisitesi 56
Şekil 4.13 İnterlokin-1β için standart grafiği 57
Şekil 4.14 Hidrojellerin İnterlokin-1β sentezine etkisi 57
Şekil 4.15 TNFα için standart grafiği 58
Şekil 4.16 Hidrojellerin TNFα sentezine etkisi 58
Şekil 4.17 Kollajen tip 1 içinstandart grafiği 60
Şekil 4.18 Hidrojellerin kollojen tip 1 sentezine etkisi 60
Şekil 4.19 Kollajen tip 3 için standart grafiği 61
Şekil 4.20 Hidrojellerin kollojen tip 3 sentezine etkisi 61
Şekil 4.21 Hidrojellerin antioksidant kapasitesi 63

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Enflamasyon sırasında sentezlenen önemli kimyasal mediyatörler.....8
Çizelge A.1 HaCaT hücrelerin canlılık yüzdelerini (MTT)hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı 75
Çizelge A.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (HaCaT MTT) 75
Çizelge A.3 t-testi sonuçları (HaCaT MTT).....76
Çizelge A.4 L929 hücrelerin canlılk yüzdelerini (MTT) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı 77
Çizelge A.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (L929 MTT).....77
Çizelge A.6 T-testi sonuçları (L929 MTT).....78
Çizelge A.7 HaCaT hücrelerin canlılk yüzdelerini (Nötral Red) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı 79
Çizelge A.8 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (HaCaT Nötral Red).....79
Çizelge A.9 t-testi sonuçları (HaCaT Nötral Red).....80
Çizelge A.10 L929 hücrelerin canlılk yüzdelerini (Nötral Red) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı 81
Çizelge A.11 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (L929 Nötral Red).....81
Çizelge A.12 t-testi sonuçları (L929 Nötral Red) 82
Çizelge B.1 Makrofaj hücrelerinin canlılık yüzdelerini (MTT) hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 83
Çizelge B.2 Çizelge Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Makrofaj MTT).....84
Çizelge B.3 t-testi sonuçları (Makrofaj MTT).....84
Çizelge B.4 IL-1β konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 85
Çizelge B.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (IL-1β) 85
Çizelge B.6 t-testi sonuçları (IL-1β).....86
Çizelge B.7 TNFα konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 87
Çizelge B.8 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (TNFα)....87

Çizelge B.9 t-testi sonuçları (TNFα) 88
Çizelge C.1 Kollajen tip 1 konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 89
Çizelge C.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Kollajen tip 1) 90
Çizelge C.3 t-testi sonuçları (Kollajen tip 1) 90
Çizelge C.4 Kollajen tip 3 konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 91
Çizelge C.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Kollajen tip 3) 91
Çizelge C.6 t-testi sonuçları (Kollajen tip 3) 92
Çizelge D.1 Antioksidant kapasite değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı 93
Çizelge D.1 Antioksidant kapasite değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı (devamı) 94
Çizelge D.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Antioksidant kapasite) 94
Çizelge D.3 t-testi sonuçları (Antioksidant kapasite) 95

ÖZET

YARA İYİLEŞMESİNDE SKAR DOKU OLUŞUMUNU ÖNLEMEK ÜZERE YARA ÖRTÜ MALZEMESİ GELİŞTİRİLMESİ VE IN VITRO ORTAMDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Volkan YALMAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş Danışman: Dr. Ögr. Üyesi Engin KAPLAN

Yara; mekanik, termal, elektriksel ve kimyasal zedelenmeler ya da tıbbi veya fizyolojik rahatsızlıkların altında yatan nedenler sonucu doku bütünlüğünün kaybolması olarak tanımlanabilir. Yara örtülerinin amacı, yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve iyileşmenin kalitesini artırmaktır. Enflamasyon yara iyileşmesi için olmazsa olmazdır. Bununla birlikte enflamatuar sürecin normal ve anormal yara iyileşmesi üzerinde doğrudan etkileri vardır. Çalışmalar, hipertrofik skar oluşumunun, fibroblastların aşırı bir fonksiyonu ve yara iyileşmesi sırasında hücre dışı matrisin (ECM) aşırı birikimini içeren, anormal bir yara iyileşmesi şekli olduğunu göstermiştir. Skar dokuyu engellemek için sistemik anti-enflamatuar ilaç kullanımının proliferasyonu baskıladığı ve dolayısıyla yara iyileşmesine olumsuz yönde etki ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte lokal ve transdermal uygulamalarda yara direncini ve yara kontrastını azalttığı da belirlenmiştir.

Bu çalışmada yara örtü malzemesi olarak hümik asit içeren aljinat doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hümik asit yapısındaki fenoller, karboksilik asitler ve kinonların varlığı nedeni ile antioksidan, antimutajenik, anti-enflamatuar, antifungal ve bakterisidal etkilere sahiptir. Projede, hümik asit özellikle anti- enflamatuar etkisinden dolayı tercih

edilmiştir. Projede sentezlenen yara örtü malzemesinin ana iskeleti olarak aljinat kullanılmıştır. Aljinat yara örtü malzemeleri yüksek sıvı absorblama kapasitesine sahiptir. Aljinat yara örtüleri yara lezyonunun, ideal nem ve sıcaklıkta kalmasını sağlar. Bu özellikleri aljinat yara örtülerini özellikle yara eksudası fazla olan yaralar için ideal bir örtü malzemesi yapmaktadır. Bu çalışmada hümik asit ve aljinat kullanılarak sentezlenen yara örtü malzemesinde aljinat ve hümik asit molekülleri kovelent çapraz bağlanarak hümik asit-aljinat bazlı bir hidrojel elde edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarında elde edilen biyomalzemenin şişme profili, degradasyon profili değerlendirilmiştir. Bununla birlikte malzemenin morfolojik özellikleri ve yüzey karakterizasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, hücre kültür ortamında sitokinler kollajen tip 1 ve tip 3 salımı üzerine etkisi belirlenmiştir. Yara örtülerinin yüzey karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Hazırlanan malzemenin insan deri hücreleri (keratinosit HaCaT hücre hattı) ve fibroblast hücreleri (L929) üzerine sitotoksisiteleri incelenecektir. Hümik asitin enflamasyon sürecine etkisi in-vitro modelleme ile belirlenmiştir. Modellemede monosit-makrofaj hücre hattı (THP-1) kullanılacaktır. Yara örtülerinin pro-enflmatuar sitokinlerden Tümör Nekroz Faktörü-alfa ve interlökin-1β salımı üzerine etkisi incelenmiştir. Hümik asitin ECM üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile L929 hücre hattı kullanılmıştır. L929 hücrelerinin kollajen tip I ve tip III sentez seviyeleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aljinat, Hümik Asit, Yara Örtüsü, Biyouyumluluk

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF WOUND DRESSING MATERIAL TO PREVENT SCAR TISSUE FORMATION IN WOUND HEALING AND EVALUATION IN VITRO

Volkan YALMAN

Department of Moleculer Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Engin KAPLAN

Wound; can be defined as the loss of skin or tissue integrity that is the underlying causes of medical or physiological disorders or injuries such as mechanical, thermal, electrical and chemical. The purpose of a wound cover is to stimulate the wound healing process and improve the quality of the healing. Inflammation is one of the essential step for wound healing. However, the inflammatory process has direct effects on normal and abnormal wound healing. Studies have shown that an abnormal wound healing involving hypertrophic scar formation, is the excessive function of fibroblasts and excessive extracellular matrix accumulation. The use of systemic anti-inflammatory drugs to inhibit scar tissue has been shown to suppress the proliferation phase and affects wound healing negatively. It has also been shown that it reduces wound resistance and wound contamination in local and transdermal applications.

In this study, aljinate tissue scaffolds containing humic acid have prepared as a wound dressing material. Humic acid has antioxidant, antimutagenic, anti-inflammatory, antifungal and bactericidal properties due to the presence of phenols, carboxylic acids and quinones in structure. Humic acid has been preferred thanks to its anti-

inflammatory effect. Aljinate was used as the main skeleton of the wound dressing material in the project. Aljinate wound dressing materials have high fluid adsorption capacity. Aljinate wound dressings allow wound lesions stay at ideal humidity and temperature. These properties make aljinate wound dressings an ideal dressing material, especially for those with excessive wound exudation. In this study, aljinate and humic acid molecules were covalently cross-linked to obtain a hydrogel wound dressing.

For the characterization of biomaterial, water retention capacity and degredation profile of the membranes were evaluated. Additionally, morphological and surface characterization of the material was performed. Furthermore, the effect of the hydrogel on cytokine and collagen type 1 levels were determined. The surface characterization of the wound cover was performed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The cytotoxicity of the prepared material to human skin cells (keratinocyte (HaCaT cell line) and fibroblast cells (L929) are investigated. The effect of humic acid on the inflammatory process is determined by in vitro model. İnflammatory response was evaluated via THP-1 cell line. The effect of humic acid on ECM composition was investigated by using the L929 cell line. The collagen type I and type III levels were determined.

Keywords: Aljinate, Humic Acid, Wound Dress, Biocompatibility

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Literatür incelendiğinde çeşitli malzemelerden üretilmiş, farklı formlarda yara örtü malzemeleri mevcuttur. Yara örtü malzemeleri dünya pazarında önemli yere sahip olan biyomalzemelerdendir ve ekonomik getirisi yüksek ürünlerdir. Şu ana kadar piyasada bulunan ve geliştirilmek üzere olan yara örtü malzemeleri incelendiğinde hümik asit-aljinat bazlı bir yara örtü malzemesinin bulunmadığı görülmektedir.

Hümik asit için yapılan literatür taraması, antiviral ve anti-enflamatuvar etkilerinin olduğunu göstermektedir. Hümik asidin sahip olduğu antiviral ve anti-enflamatuvar etkiler, hümik asidin ümit verici bir yara örtü malzemesi konumunda olduğunu göstermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Yara örtüleri medikal tekstillerin önemli bir alanıdır. Özellikle son yıllarda çok sayıda fonksiyonel yara örtüsü geliştirilmiştir. Bu ürünlerin amacı yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve hastalara bu süreçte maksimum konforu sağlayabilmektedir. Şu anda mevcut olan yara örtülerinin geliştirilmesi için çok disiplinli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Yara iyileşmesinde hipertrofik skar oluşumunun, fibroblastların aşırı bir fonksiyonu ve yara iyileşmesi sırasında hücre dışı matrisin (ECM) aşırı birikimini içeren, anormal bir yara iyileşmesi şekli olduğunu göstermiştir. Hümik asit anti-enflamatuar ve antioksidant etki ile yaranın skarlı iyileşmesini engelleme potansiyeline sahiptir.

Çalışmanın genel amacı hümik asit içeren aljinat doku iskelelerinin pro-enflamatuar sitokinler ve kollojen tip 1 ve tip 3 salımı üzerine etkisini belirlemektir. Çalışmanın amaçları aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

1.Hümik asitin insan keratinositleri üzerine sitotoksik olmayan dozunun bulunması

2.Belirlenen hümik asit dozu içeren aljinat yara örtüsünün hazırlanması

3.Hazırlanan doku iskelelerinin şişme, degradasyon profilinin, morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

4.Hazırlanan doku iskelelerinin keratinosit ve L929 hücreleri üzerine sitotoksisitelerinin belirlenmesi

5.Hazırlanan doku iskelelerinin pro-enflamatuar sitokin salımı üzerine etkisinin incelenmesi

6.Hazırlanan doku iskelelerinin kollajen tip 1 ve tip 3 salımı üzerine etksinin incelenmesi

7.Hazırlanan doku iskelesinin antioksidant kapasitesi üzerine etkisinin incelenmesi

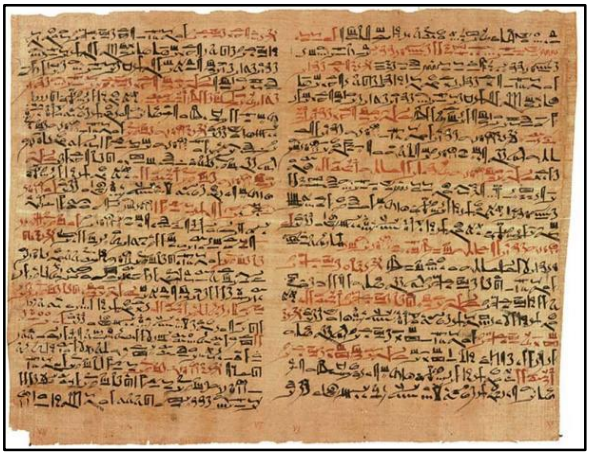
1.3 **Hipotez**

Hümik asidin anti-enflamatuar ve antioksidant etkisinden yaralanılmak amacıyla yapılmak istenen bir yara örtü malzemesinin enflamasyonu baskılaması beklenmektedir. Enflamasyon şiddetine göre deride sentezlenen kollejen miktarları farklılık gösterir, kollejen sentezi ve formasyonundaki değişiklik yara iyileşirken deride iz bırakabilir. Enflamasyon doğru düzeyde baskınabilir ise yara bölgesinde iz kalmadan yara iyileşmesi sağlanılabilir. Bu nedenle hümik asidin anti-enflamatuar etkisinden yaralanılarak enflamasyonu doğru düzeyde baskılayabilecek bir yara örtü malzemesi senteznerek, izsiz yara iyileşmesi sağlanılabilir.

BÖLÜM 2

YARA ÖRTÜ MALZEMELERİ

Yara örtüleri, yarayı örtmek ve iyileşme süreçlerini desteklemek amacıylaya kullanılan malzemelerdir[1].Yara örtü malzemeleri biyolojik ya da biyolojik olmayan birçok materyal içerebilir. Yaranın bulunduğu yer, neden olan etken, hastanın yaşı ve hastadaki fizyolojik gibi değişkenler bir yaranın tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Kullanılacak yara örtü malzemesi, bu değişkenler göz önüne alınarak seçilmelidir. Yara tedavisi için doğru yara örtü malzemesinin seçilmesi iyileşme sürecini desteklediği gibi yanlış bir yara örtü malzemesinin seçilmesi ise yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyerek daha büyük rahatsızlara yol açabilir[1], [2].



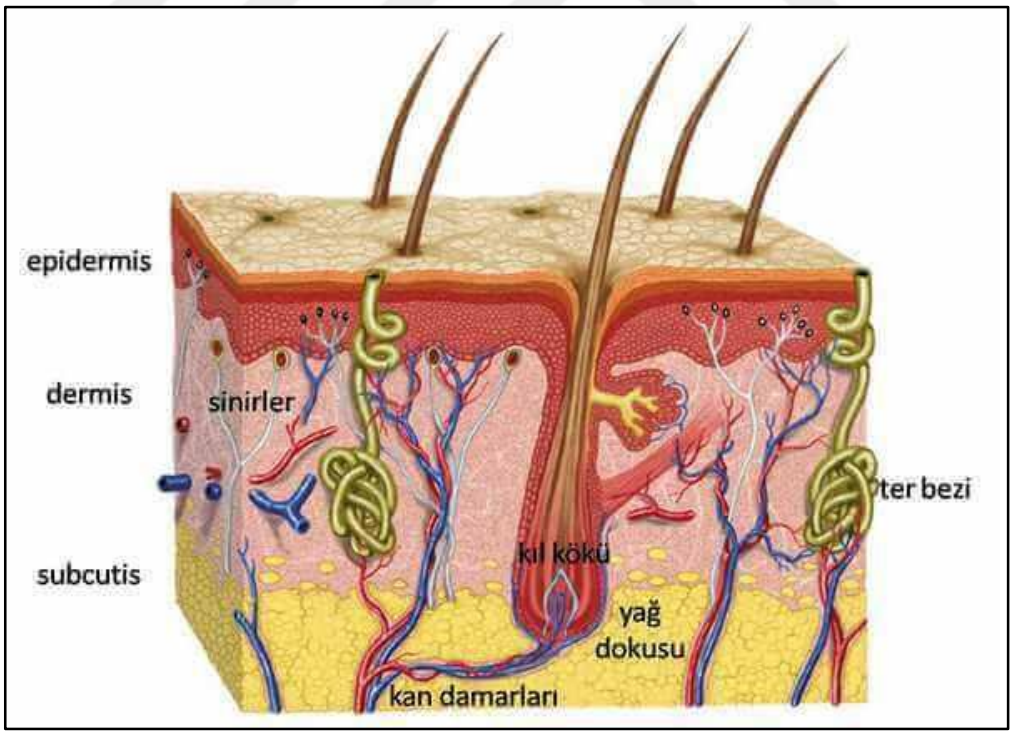
Şekil 2.1 Edwin Smith Papirüsü[3]

Edwin Smith Papirüsü (Şekil 2.1) milattan önce 1700 yıllarda yazıldığı düşünülen ilk cerahi metinlerdendir. Bu metinde bir yaranın nasıl temizlenip bakım yapılacağı anlatılmıştır[3].

2.1 **Yara**

Yara, herhangi bir faktörden dolayı doku anatomisinin bozulması olarak tanımlanabilir[4]. Bu faktörler fiziksel, kimyasal, biyolojik, sıcaklık veya radyasyon gibi farklı sebeplerden dolayı olabilmektedir. Yaraya neden olan etkene göre yaranın morfolojisi ve özellikleri çeşitlilik göstermektedir. Aynı zamanda yaralanmanın meydana geldiği doku, bireyin yaşı ve bireyin sağlık durumu gibi faktörler de yaranın morfolojisini ve yaranın iyileşmesini etkilemektedir[5], [6].

Bu tezin konusu olan hümik asit ve aljinat bazlı yara örtü malzemesi deride meydana gelen yaralanmalar için kullanılması hedeflenmiştir. Deri vücudumuzdaki en büyük organdır ve yaklaşık olarak vücut ağırlığının %15'ini oluşturur [4], [7]. Deri (Şekil 2.2) tüm vücudu sarar ve vücudu dış etkenlere karşı korumak gibi hayati bir görevi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle deri üzerindeki yaralanmalar ve yaraların bakımı büyük bir önem taşımaktadır [7].

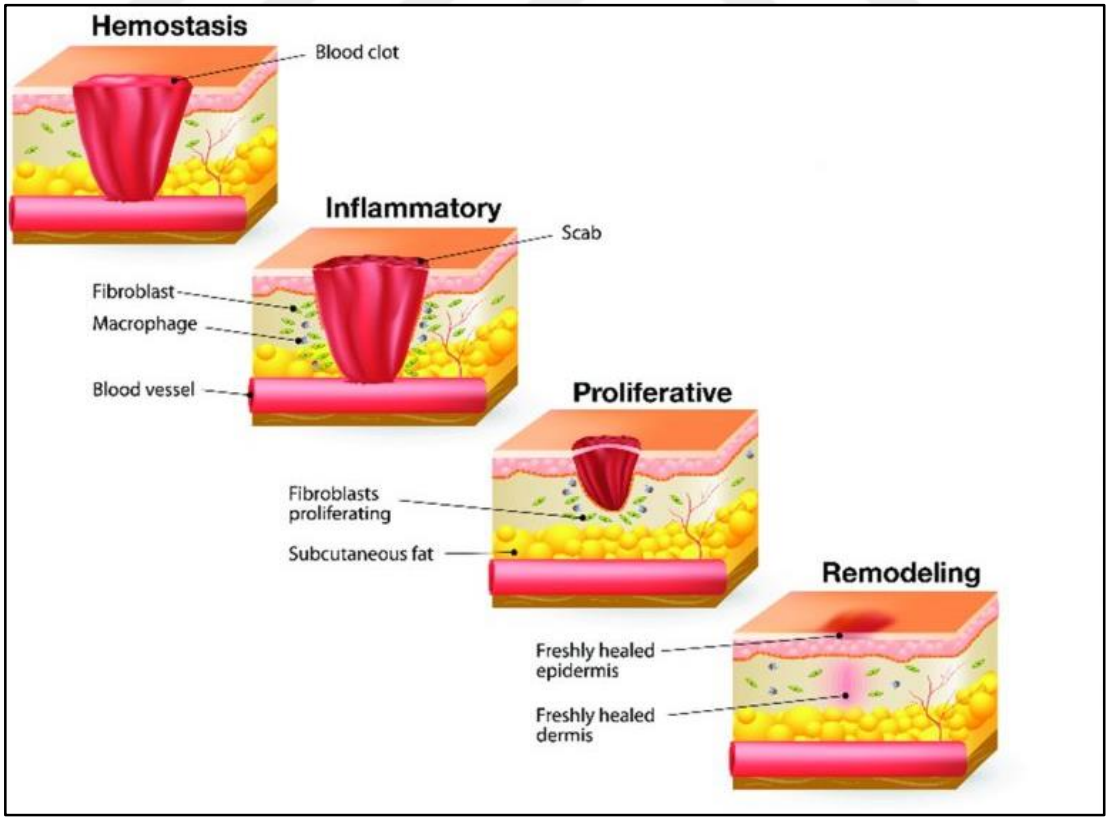


Şekil 2.2 Derinin katmanları

2.2 **Yara İyileşmesi**

Yara iyileşmesi çok fazla sayıda mekanizmadan oluşan karmaşık bir olaydır [4], [5], [6], [7]. Deri üzerindeki bir yaranın iyileşmesi yaralanmanın şiddetine ve yaraya neden olan kaynağa göre farklılık gösterebilir. Aynı zamanda lokal etkiler olan bireyin yaşı, sağlık durumu ve metabolizması, yara iyileşme mekanizmasında değişikliklere ve iyileşme süresinde değişiklere sebep olur[2], [8].

Yara iyileşmesi hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma özelliklerinden yararalanılarak hasarlı ya da kaybedilen dokunun yerine yeni dokunun oluşturulması prensibine dayanır. Her ne kadar yaralı doku tamir olsa da morfolojik görünüşü eskisinin birebir aynısı olamaz. Skar doku denilen, görünüş olarak biraz daha deforme bir morfolojiye sahiptir[9]. Bu deforme görünüşün altında yatan neden kollejen miktarının ve organizasyonunun hasar almamış dokudaki kompozisyon ile aynı olamamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle yara iyileşmesinde kollejen tip 1 ve tip 3 ile kollejenin sentezlenmesi için hücreleri uyaran sitokinler büyük öneme sahiptir[10], [11]. Yara iyileşmesi şekil 2.3'de gösterildiği gibi dört aşamada gerçekleşmektedir.



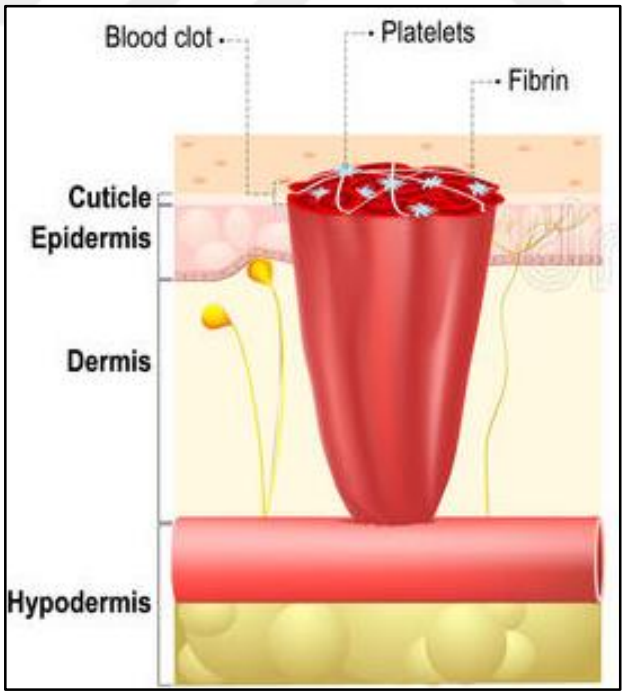
Şekil 2.3 Yara iyileşme aşamaları

2.2.1 **Hemostaz Fazı**

Yaralanmanın etkisiyle damar bütünlüğü bozulur ve damarlardan dışarı doğru kan akışı olur. Trombositler pıhtılaşmayı sağlayarak hasar gören damarı bir tıkaç gibi tıkar ve hemostazın yeniden sağlanması için uygun şartları sağlar. Ayrıca hücre göçü için hücre dışı bir matriks görevi yapar. Trombositler, ortama saldıkları büyüme faktörleri ile makrofajları ve fibroblastların bölgeye göç etmesini uyarmaktadır[12].

Trombosit ve yaralı dokunun çevresindeki parankimal doku hücrelerinden çeşitli büyüme faktörlerinin ve mediyatörlerin ortama salınımı bu aşamada gerçekleştirilir. Bu salınan mediyatörler ve büyüme faktörleri yaralı dokuya lökositlerin gelmesine neden olarak enflamasyonu başlamasına sebep olduğu bilinmektedir[13].

Yaralı bölgeye trombositlerin akını ve sentezledikleri fibrin iplikleriyle kanın pıhtılaşmasına (Şekil 2.4) neden olarak yaralı bölgenin dışortamdan izole edilmesini sağlamaktadır. Yara iyileşmesinin bir sonraki adımı olan enflamasyon için yaralı bölgeye beyaz kan hücrelerinin gelebilmesi için hemostazi yeniden sağlanır ve dış ortamdan vücut içene patojen girişi engellenmiş olur [12], [13].



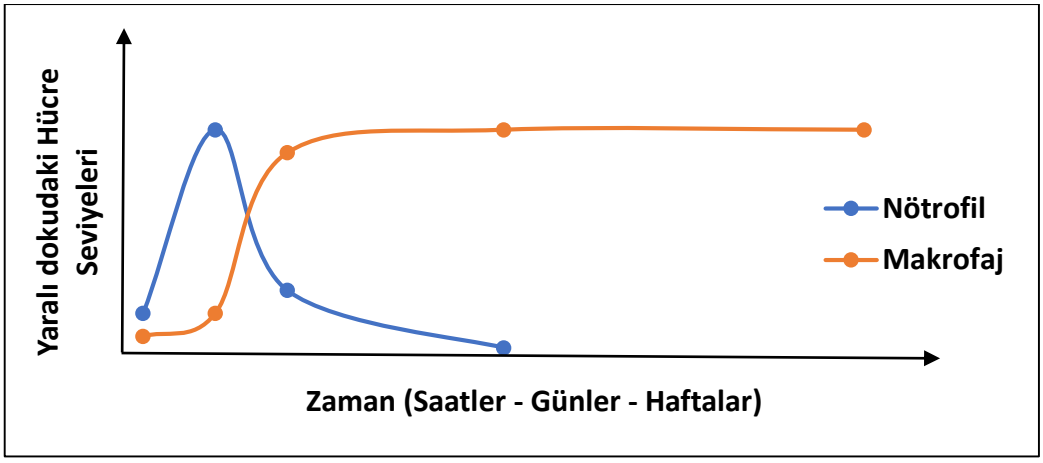
Şekil 2.4 Tromboz tıkacın oluşması

2.2.2 **Enflamasyon Fazı**

Enflamasyon, yaralı bölgede damarlanmanın oluşması ve beyaz kan hücrelerinin yaralı bölgeye ulaşması olarak tanımlanabilir [13]. Yaralı bölgeye ilk olarak ulaşan ve yara bölgesinde baskın olan beyaz kan hücreleri nötrofillerdir. Nötrofiller, trombosit ve parakimal hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri ve kimyasal uyaranlara hassastır ve yaralı bölgeye hücum eden ilk beyaz kan hücreleridir. Nötrofillerin yaralı dokuda bulunması kısa sürelidir, yaralanmadan sonraki ilk 24 saatten sonra sayıları giderek azalmaktadır[14].

Yaralanmadan sonraki ilk 24-48 saat aralığında (Şekil 2.5) nötröfillerin yerine monositlerin yaralı bölgede baskın hücre olmaya başladığı bilinmektedir. Nötröfillerin ortama salgıladığı sitokinler, monositleri yaralanmanın olduğu ortama çeker. Monositlerin yaralı bölgeye göçü yaranın durumuna göre günler ya da haftalar boyunca devam edebilir[15].

Monositler yaralı bölgede bulunan hücrelerin ortama saldığı büyüme faktörlerinin etkisiyle makrofajlara dönüşür. Makrofajlar uzun ömürlü hücrelerdir, yaşama süreleri aylara ulaşır. Makrofajlar yüzey resoptörleri sayesinde yaralı bölgede bulunan patojenleri fagosite ederek etkisiz hale getirmektedir[16]. Yara iyileşmesinde aktif rol oynayan nötrofil, monosit ve makrofaj gibi beyaz kan hücrelerinin esas görevi yaralı dokuyu patojenlerden temizlemek ve salgıladıkları büyüme faktörleri ve sitokinler ile yaralı bölge etrafında bulunan fibroblast, kretosit gibi hücrelerin bölünmesi ve ECM yapısını situmule etmektir [15], [17].



Şekil 2.5 Yaralı dokudaki nötrofillerin ve makrofajların zamana göre değişimi

Kemotaksi sonucu yaralı bölgeye gelen nötrofil, monosit ve makrofaj gibi beyaz kan hücreleri marjinasyon, yaraya göç, adezyon, fagositoz ve hücre dışına çeşitli moleküller salmak gibi bir dizi görev üstlenmişlerdir [18]. Makrofajlar yara iyileşmesinin orkestra şefidir. Makrofajların salgıladığı; proteazlar, kemotaktik faktörler, araşidonik asit metabolitleri, reaktif oksijen metabolitleri, kompleman bileşenleri, koagülasyon faktörleri, büyüme destekleyici faktörler ve sitokinler gibi moleküller (Çizelge 2.1) yara iyileşmesinde kilit rol oynayan moleküllerdir [15].

Çizelge 2.1 Enflamasyon sırasındasentezlenen önemli kimyasal mediyatörler

Büyüme Faktörleri	**Sitokinler**	**Oksijen Türevi serbest radikallar**	**Lizozimal proteazlar**	**Trombosit aktive edici faktörler**
Trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF)	İnterlökin 1β (IL-1β)	H_2O_2	Kollajenaz	Hücre membran lipitleri
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Tümor nekroz faktorü (TNF)	Süperoksit anyonu	Elastaz	
Transforme edici büyüme faktörü (TGFα veya TGFβ)				
Epitelyal büyüme faktörü (EGF)				

PDGF, FGF, TFGβ, TGFα / EGF gibi büyüme faktörleri ve IL-1, TNF gibi kimyasallar fibroblastların ve kan damarlarının büyümesi ve epitel hücrelerinin rejenerasyonu için önemlidir[19]. Yara iyileşmesi süreci boyunca lökositler ve trombositler gibi aktive edilmiş hücreler tarafından salınan bu büyüme faktörleri, çok çeşitli hücrelerin üretimini uyarır; hücre göçü, farklılaşmaya ve dokuyu yeniden biçimlendirmeye başlar ve yara iyileşmesinin çeşitli aşamalarına katılabilirler[19], [20], [21].

2.2.3 **Hücre Proliferasyonu ve Tamir Fazı**

Yeniden epitelyalizasyon, granülasyon doku oluşumu ve anjiyojenez gibi olaylardan oluşan keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinin başrolde olduğu yara iyileşme aşamasıdır[16].

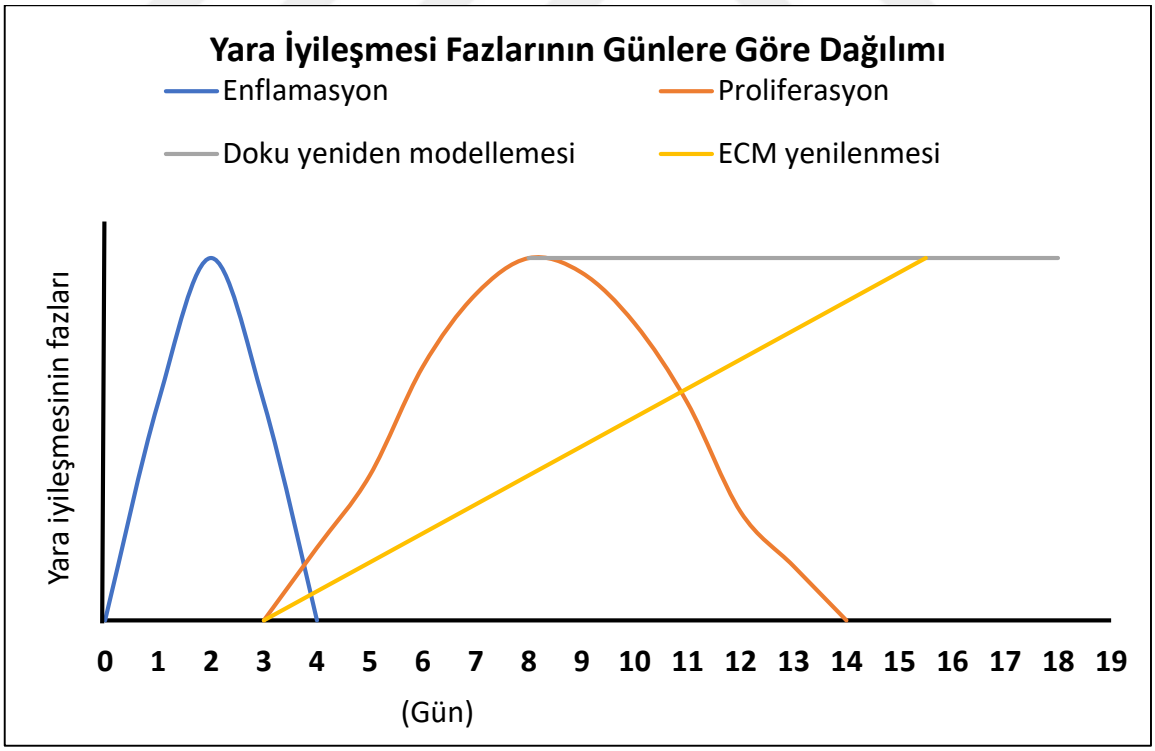
Yaralanmadan hemen sonra, inflamasyonla hemen hemen paralel olarak, keratinositlerin çoğalması ve göçüyle yeniden epitelizasyon başlatılır. Epidermisin bazal tabakasında bulunan epidermal kök hücreleri, yaranın tekrar epitelyalizasyonuna katkıda bulunur [22], [23]. Yeniden epitelizasyon ile yarada bunun pıhtılaşmış kanın degredasyonu yapılmakta ve dış ortama açılan boşluk yeni oluşturulmuş keratinositlerle doldurulmaktadır[24].

Yaralı bölgede yeni kılcal damarların dokuya verdiği görüntü nedeniyle granülasyon dokusu olarak adlandırılan yeni bir doku oluşmaktadır. Makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarları aynı zamanda yaralı bölgede aktivite göstermektedir. Makrofajlar, fibroplaziyi ve anjiyogenezisi uyarmak için gerekli büyüme faktörlerini salar; fibroblastlar hücrenin gelişmesini desteklemek için gerekli olan yeni hücre dışı matrisi üretir ve kan damarları hücre metabolizmasını sürdürmek için gerekli oksijen ve besin maddelerini taşımaktadır[12].

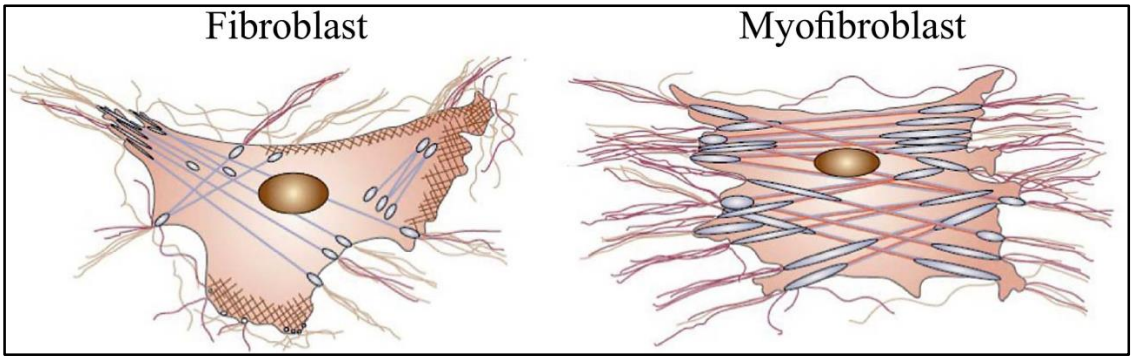
Geçici matris olarak adlandırılan yeni oluşturulmuş hücre dışı matrisin yapısal molekülleri, hücre göçü için bir iskele görevi yaparak granülasyon dokusunun oluşumuna katkıda bulunur. Bu moleküller fibrin, fibronektin ve hiyalüronik asit gibi molekülleri içermektedir. Fibroblastlar, hücre dışı matrisin sentezi, depolanması ve yeniden biçimlendirilmesinden sorumludur. Yaraya göç ettikten sonra, fibroblastlar hücre dışı matris sentezine başlamaktadır. Geçici hücre dışı matris, kademeli olarak kolajenli bir

matrise dönüşmektedir. Yarada bol miktarda kollajen içeren matriks oluşturulduktan sonra, fibroblastlar kollajen üretimini durdurur ve fibroblast açısından zengin granülasyon dokusu nispeten aselüler yaralı bir dokuya dönüşür[12], [23].

Yaralı dokudaki yeni kan damarları, neovaskülarizasyon veya anjiyogenez olarak bilinen bir süreçte var olan damarlardan gelişerek oluşturulur. Bu süreç proliferasyon, olgunlaşma ve endotel hücrelerinin kılcal kanallar içerisindeki organizasyonlarını içerir[25]. Fibroblastlar proliferasyon evresinde aktif rol oynamakla beraber kollajen ve proteoglikanlar sentezinde de aktiftir. Yeni oluşan dokusunun gelişiminin erken evrelerinde proteoglikanlar baskın iken daha sonra kolajen, özellikle de tip I kollajen, baskın hale gelir[15]. Proliferasyon evresindeki bazı fibroblastlar düz kas hücreleri özelliklerine sahip olabilir. Bu hücrelere miyofibroblastlar denir ve granülasyon dokusu gelişimi sırasında görülen yaranın kasılmalarından sorumlu olduğu düşünülmektedir[26].Geçici fibrin matrisinin granülasyon dokusu ile değiştirilmesi ile karakterize edilen proliferatif faz, yaralanmadan 72 saat sonra başlar ve yaklaşık 14 gün sürmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Yara İyileşmesi Fazlarının Günlere Göre Dağılımı



Şekil 2.7 Fibroblast ve myofibroblast hücrelerinin karşılaştırılması

2.2.4 **Yeniden Şekillenme Fazı**

Yaranın yeniden şekillenmesi, hücrelerin, hücre dışı matriksin ve sitokinlerin kompleks ve karmaşık bir şekilde düzenlenmiş etkileşimlerinden oluşur. İyileşmenin ikinci haftasında, fibroblastlar, Şekil 2.5'de görüldüğü gibi hücre-hücre ve hücre-matris bağlantılarına sahip büyük miktarda aktin içeren mikrofilament demetleri ile karakterize edilmiş miyofibroblast fenotipinde görünürler[27]. Miyofibroblastların görünümü, bağ dokusu yeniden şekillenmesinin başlamasına ve yaranın kasılmaya başladığının bir göstergesidir. Yeniden şekillenmede fibroblastların integrin reseptörleri vasıtasıyla kollajen matrisine tuttunması ve kollagen demetleri arasında çapraz bağlar kurulması gerekmektedir[28].

Granülasyon dokusundan skarlı dokuya geçiş sırasında kollajenin yeniden modellenmesi, kollajenin sentezine ve kollajenin düşük oranda katabolizmasına bağlıdır. Yarada kollajenin parçalanması, makrofajlar, epidermal hücreleri ve endotel hücreleri ile fibroblastlar tarafından salgılanan matriks metalloproteinazlar adı verilen proteolitik enzim tarafından kontrol edilir. Yara onarımının çeşitli safhalarında, matriks metalloproteinazların farklı kombinasyonları görülür[29], [30].

Yaralar, iyileşme sürecinin ilk üç hafta içinde eskidayanımının sadece yüzde 20'sine ulaşabilmektedir; bu süre zarfında, fibriler kollajen nispeten hızlı bir şekilde biriktirilir ve yaranın kasılmasıyla yeniden şekillendirilir. Bundan sonra yaraların çekme mukavemeti kazanması yavaş bir süreçtir, kollajenin birikimi ise daha yavaş bir süreçtir[31].Daha büyük kollajen demetlerinin oluşumu ve molekül içi çapraz bağların sayısındaki artışla birlikte kollajen yeniden modellenmesine yansıyarak kollajenin yeniden şekillenmesini

yavaşlatır. Ayrıca yarada biriken kollejen tip 3, kollejen tip 1'e dönüştürülür [32]. Yaralı dokular asla yaralanmadan önceki dayanımına ulaşamaz. Yaralı bir dokunun maksimum dayanıma ulaşması yaralanma önceki dayanımının sadece %80'ine karşılık gelir[33].

2.3 **Yara Direnci ve Yara Kontraksiyonu**

Bazı durumlarda yaralı bir dokunun iyileşmesi sonuncunda, dokuda anormal bir görüntü oluşur. Oluşan bu anormal görüntünün açıklanabilmesi için yara direnci ve yara kontraksiyonu adı verilen iki kavramın bilinmesi önemlidir.

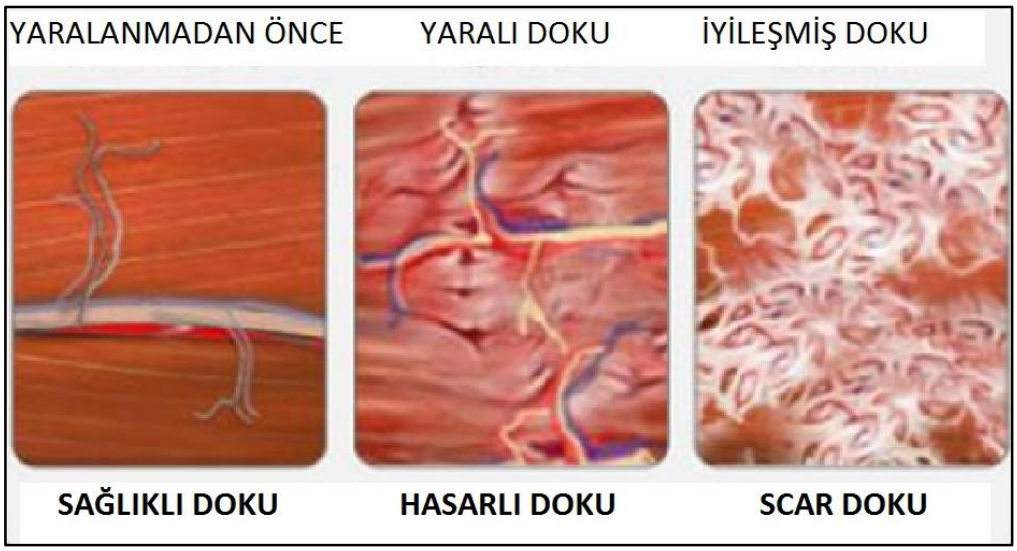
2.3.1 **Yara direnci**

Yaraya direnç kazandıran ana madde kollajendir. Yaranın erken evrelerinde direnç kazanma özelliği fibrin pıhtı sayesinde oluşur. İlk 24 saatte yaranın ölçülebilir miktarda gerilim direnci kazandığı, sonuç olarak bu direnci epitelizasyon ve fibrin pıhtı sayesinde kazandığı gösterilmiştir. Lökositlerin, kollajen oluşumunda yeri olmadığından, inflamasyon evresinde kollajen depozisyonu çok azdır. Ancak makrofajlardan salınan büyüme faktörleri kollajen oluşumunu etkileyerek, dolaylı yoldan yaranın direncine katkıda bulundukları gösterilmiştir. Literatürde, yara yerindeki makrofajların sayısının azalması ile kollajen depozisyonunun azaldığı ile ilgili sonuçlar bulunmuştur[34]**.**

Yara oluşumundan sonraki ilk üç günde yara kavitesini dolduran fibrin pıhtı ve epitelizasyon sayesinde kazanılan gerilim direnci 3-30 gün arası kollajen sentezi artışı ile doğru orantılı olarak artar. Yara bölgesi ikinci haftada, sağlam deri direncinin %10'unu kazanmıştır. Bu oran 3–4 haftalarda %25 olup, sekizinci haftada en yüksek düzeydedir. Yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra, yara bölgesi hiçbir zaman sağlam deri gerilim direncinin tamamını kazanamaz. Aylar sonra ölçülen değerlere göre optimal şartlarda dahi gerilim direnci %70-80 düzeyine ulaşır[35]. Ancak bireyler arası farklılıklara, yaranın oluştuğu dokunun özelliğine ve diğer etkenlere bağlı olarak kazanılan gerilim direnci düzeyi değişebilir[36].

2.3.2 **Yara Kontraksiyonu**

Doku kaybı olan ve sekonder iyileşmeye bırakılan yaralarda, yarayı çevreleyen dokunun merkeze doğru hareket etmesiyle yara alanı küçültülmeye çalışılmaktadır. Yara oluşumunun yedinci gününde başlayan bu hareket dört hafta kadar devam etmektedir. Nadiren yaranın spontan kapanmasını sağlayan kontraksiyon, genellikle açık yara alanının %80'ini kapatabilmektedir. Yara kontraksiyonunun kontraktil bir protein olan aktin filamentlerince zengin olan miyofibroblastlar tarafından sağlandığının bilinmesine karşın, kesin mekanizmalar hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Yara kontraksiyon alanındaki skar dokusunun kısalması olarak tanımlanan yara kontraktürü, yanık iyileşmesinden sonra görülen kontraktürler gibi deformite (Şekil 2.4) ve fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir. Yara zeminindeki granülasyon dokusunun greftle kapatılması miyofibroblast miktarında azalmaya neden olarak kontraksiyonu durdurabilmektedir[37].



Şekil 2.8 Yaralanmadan önceki ve iyileşmiş bir doku arasındaki görünüm farkı

2.4 **Yara Örtü Malzemeleri**

Yara tedavisi antik çağlardan beri üzerinde çalışılan bir konudur. Deri, mikroorganizmaların kontaminasyonunu önlemede ve homeostazisi sağlamak açısından önemli bir rol oynamaktadır. Derinin hasar gördükten hemen sonra bir materyal ile örtülmesi gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan ilk yara örtü materyalleri, kanamanın önlenmesi ve yarayı çevresel travmalardan koruması için hazırlanmıştır [38].

Günümüzde gelişen bilim ve bilgi birikimiyle beraber yara bakımındaki bu anlayışa ek olarak, yaralı bölgedeki iyileşme sürecini destekleyecek materyaller geliştirilmektedir [6]. Yaralı bölgeye nemli ortam sağlanmasının yara iyileşmesini desteklediğinin keşfedilmesiyle modern yara örtüleri yaraya nemli bir ortam sağlayabilecek sıvı absorbans profilleri iyi olan materyaller seçilerek yapılmaktadır [39].

Günümüzde yaranın iyileşmesini desteklemek amacıyla kullanılan birçok yara örtü malzemesi bulunmaktadır. Etkili bir yara iyileşmesi için uygun yara örtü malzemesinin seçilmesi çok önemlidir. Uygun yara örtü malzemesi yaranın türüne, özelliklerine, iyileşmenin hangi aşamasında olduğuna ve bu aşamada neye gereksinimi olduğuna göre seçilmelidir [40].

Modern yara örtülerinde istenilen bazı özellikler şu şekilde sıralabilir [1], [2], [41].

1. Nemi tutması: Yara örtüsü, bandajdan yara sıvısının sızmasını önlemek için yara salgısını absorbe edebilmeli ve kuru yarayı nemlendirebilmelidir. Yaralı alandaki epidermal hücrelerin kendini hızla yenileyebilmesi için yaranın yeterince nemli olması büyük bir öneme sahiptir. Yeterli nem; yarada damar oluşumunu ve makrofajların fagositik işlevini artırmaktadır.
2. Koku giderilmesi: Yara çoğu zaman hoş olmayan zararlı bir koku üretmektedir. Bu koku oluştuğunda, yara örtüsü bu kokuyu kontrol altına alabilmelidir.
3. Anti-mikrobiyal etki: Açık yaralarda vücudu kaplayan derinin bütünlüğü bozulduğu için yaradan içeri yoğun bir mikroorganizma akını olur. Yaralı bölgedeki bu mikroorganizmaların damar sistemiyle vücuda yayılmadan önce etkisiz hale getirilmesi gerekmektedir.
4. Fiziksel bariyer: Yara örtüsü, yara yüzeyinin dış ortamdan ayırarak mikroorganzima bulaşmasını ve dokunun dış kaynaklı etkenlerden dolayı zarar görmesini engellemelidir. Ayrıca, yarayı travmatik durumlara karşı da korumalıdır.
5. Boşluk doldurucu: Doku kaybının büyük miktarlarda olduğu yaralarda, yaranın dolgu materyalleriyle açık tutulmaması önemlidir. Böylece; yara iyileşme süreci

dokunun alt kısmından üst kısmına doğru gerçekleşebilmekte ve kaybedilen tüm doku doldurulmadan yaranın gereksiz yere kapatılması önlenebilmektedir.

6. Yaradaki yabancı cisimlerin, hasarlı ve enfekte olmuş dokuların tamamen yaralı bölgeden uzaklaştırılması (debridman): Ölü ve çürümüş dokuların uzaklaştırılmasının, normal yara iyilesme sürecini kolaylaştırdığı bilinmektedir. Yara örtüleri uygun nem, pH, sıcaklık ve diğer ideal olan koşulları sağlayarak yaradaki yabancı cisimlerin, hasarlı ve enfekte olmuş dokuların makrofajlar ve diğer hücreler tarafından temizlenmesini hızlandırabilmektedir.
7. Kanama durdurucu etkisi: Ağır yaralarda, kan kaybının önlenebilmesi için kanamanın mümkün olan en kısa sürede durdurulması hayati önem taşır. Uygun yara örtüleri kan pıhtılaşmasını uyararak kanamanın durdurulmasını hızlandırabilmektedir.
8. Düşük adesif özellik: Yara örtüsünün yara yüzeyine yapışması, yara tedavisindeki önemli sorunlardan birisidir. Yara örtüsünün yara yüzeyine yapışması, yara örtüsünün çıkarılması esnasında iyileşmiş dokuda hasara ve travmaya neden olmaktadır. Düşük-adesif özellikteki yara örtüleri, yara örtüsünün yara yüzeyine yapışmasını azaltabilmekte ve yara üzerinde yapışmaya bağlı oluşabilecek doku hasarını önleyebilmektedir.
9. Yara izi oluşumun engellenmesi: Yara izi çoğu insan için estetik bakımdan önemli bir sorundur. Bu amaçla üretilen yara örtü materyallerinin yaraların iz bırakmadan iyileşmesini sağlayarak günümüzdeki insanların en önemli sorunlarından biri haline gelen estetik kaygıya çözüm olacağı düşünülmektedir.

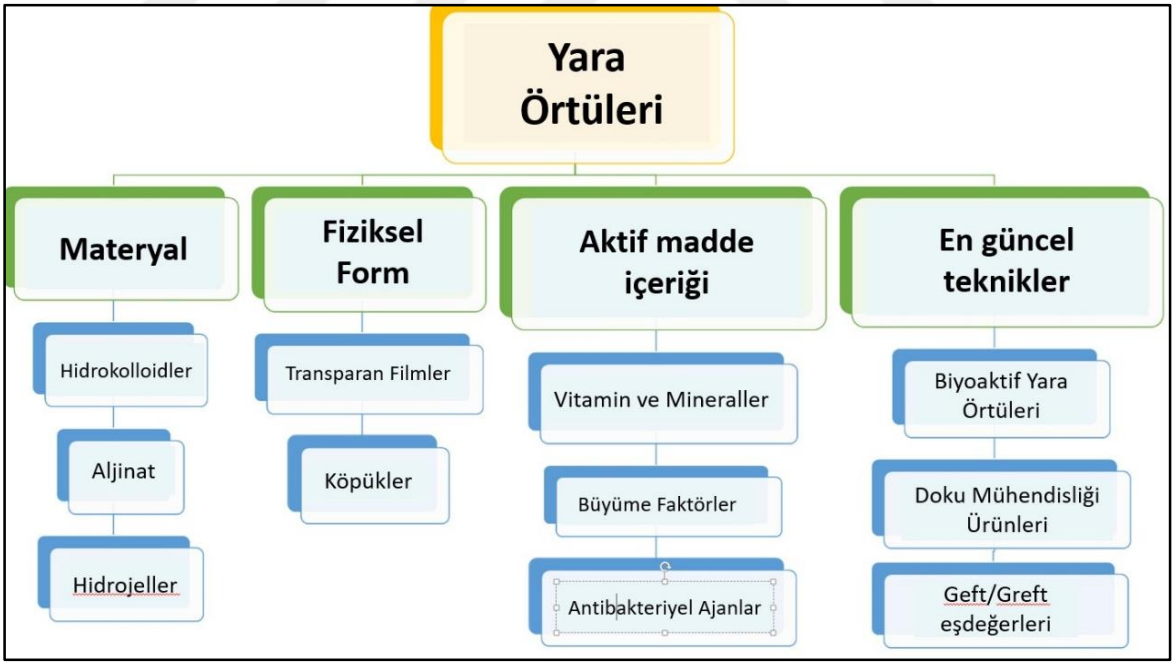
Bu çalışmada yapılması hedeflenen yara örtü malzemesinin ana amacı iz bırakmadan yara iyileşmesidir. Bu amaç doğrultusunda anti-enflamatuar etkisi olan bir yara örtü malzemesi yapılmıştır. Sentezlenen yara örtü malzemesinin enflamasyonu uygun düzeyde baskılayarak yara iyileşmesi sırasında oluşabilecek yara izini engelleyebileceği ön görülmüştür.

10. Metal iyon metabolizması: Demir, çinko, bakır, magnezyum, selenyum gibi bir takım metal iyonları hücresel aktivitede önemli rol oynamaktadır. Herhangi bir metal iyonunun eksikliği, yara iyileşmesini geciktirmektedir. Bu metal iyonlarının

yetersiz alınımı gibi sorunları uygun yara örtülerinin kullanımıyla da giderilebilmesi mümkündür.

11. Yara iyileşmesinin desteklenmesi: Yara iyileşmesi, kompleks bir süreçtir. Tek başlarına yara örtülerinin, yara iyileşmesi sürecinin hızı üzerinde oynadıkları rol küçüktür. Bununla birlikte; bir takım etken maddeler ile kombine edildiğinde uygun yara örtüsü kullanımı yara iyileşmesi sürecini destekleyerek hızlandırabilmektedir.

Yara örtü malzemeleri çok çeşitli şekillerde sınıfladırılmaktadır. Bu çalışmada yara örtü materyalleri dört ana başlık altında (Şekil 2.7) incelenmiştir. Yara örtüleri yapıldıkları materyale göre hidrokolloidler, aljinat ve hidrojeller olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Fiziksel formlarına göre ise transparan filmler ve köpükler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Aktif madde içeriğine göre vitamin ve minareller, büyüme faktörleri ve antibakteriyel ajan içerenler olmak üzere üçe ayrılmaktadır. En güncel tekniklere göre ise biyoaktif yara örtüleri, doku mühendisliği ürünleri ve greft/greft eşdeğerleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Yara örtü malzemelerinin sınıflandırılması

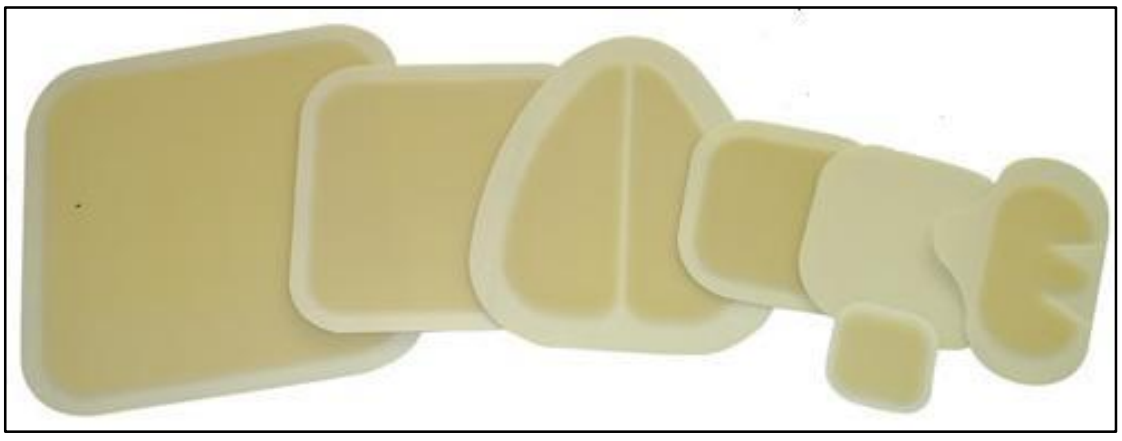
2.4.1 **Yapıldıkları malzemeye göre yara örtü malzemeleri**

Yapıldıkları malzemelere göre yara örtü materyalleri hidrokolloidler, aljinat ve hidrojeller olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

2.4.1.1 **Hidrokolloidler**

Hidrokolloidler, çeşitli doğal veya sentetik polimerlerden (örn. jelatin veya pektin) üretilebilmektedirler. Yara eksüda ile temas ettiğinde aktif olmaktadırlar ve kohezif veya hidrofilik olabilen bir jel yapısına dönüşebilmektedirler. Bu jel yaranın boş kısmına doğru şişmektedir. Hidrokoloid yara örtüleri, oklüzif olmayan sargılarla kıyaslandığında yaranın enfekte olma ihtimalini düşürmektedir. Hidrokolloidler yarayı tıkayıcı malzemelerdir ve anti-bakteriyel bir bariyer oluşturmaktadırlar, pH'ı düşürürerek vücudun savunma mekanizmasının etkin bir şekilde çalışmasını sağlayacak bir ortam yaratmaktadırlar. Aynı zamanda hidrokolloidler tarafından oluşturulan düşük pH'ın, *Pseudomonas* bakterisinin tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır[42]. Nekrotik ve süngerimsi yaraların su ile debridmanını kolaylaştırmaktır[43].

Hidrokolloidler su geçirmezdir, bu nedenle hastalar banyo veya duş yapabilmektedir. Hidrokolloid yara örtü malzemeleri nekrotik yaralarda, eksüdası az ve orta seviye olan yaralarda kullanılması için ideal bir malzemedir. Piyasada Granugel, DuoDERm, Alione, CombiDERM, Tegasorb (2.10) gibi çok çeşitli ticari hidrokolloid yara örtü materyalları bulunmaktadır [44].



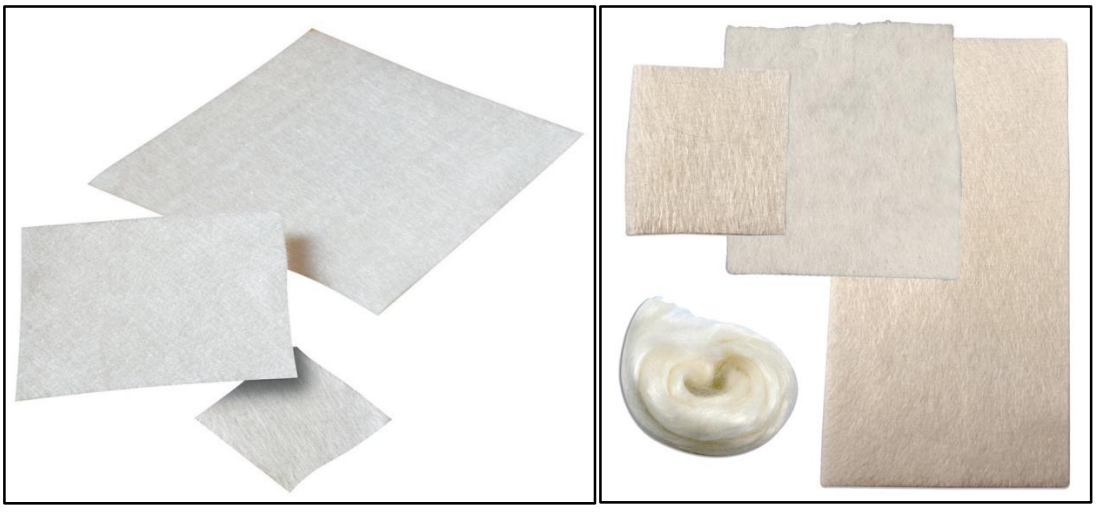
Şekil 2.10 Hidrokolloid yara örtü materyalleri

2.4.1.2 **Aljinat**

Aljinat, kahverengi su yosunlardan ekstrakte edilen suda çözünür bir lineer polisakarittir ve 1-4 bağlı α-L-guluronik ve β-D-mannuronik asit residülerinden oluşur. Bu iki residünün dizilişi ve dizilerin moleküler ağırlıkları, aljinatların fiziksel özelliklerini belirlemektedir. Dimer yapılı aljinat (alginik asit) Ca^{+2}, Sr^{+2} ve Ba^{+2} gibi iyonlarla veya moleküllerle polimerleşerek çeşitli polimerik yapılar oluşturmaktadır[45].

Aljinat, gıda endüstrisinde yoğunlaştırıcı, emülgatör ve stabilizatör olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aljinat, FDA tarafından genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilen bir bileşik grubunun üyesidir. Aljinatın; poli-L-lisin, kitozan, DEAE-dekstran, amino-poli (oksietilen) veya proteinler gibi polikatyonik suda çözünür polimerlerle kovalent çapraz bağlanmasıyla jel yapıları oluşturduğu bilinmektedir[45].

Kalsiyum aljinat tuzu 1940'lardan bu yana yara tedavisinde kullanılmaktadır [46]. Aljinat jelller, yara iyileştirmesi için nemli bir ortamı sağlar. Bu jeller ayrıca yeni oluşmakta olan granülasyon dokusunun bozulmamasını ve yarayı çevreleyen derinin zarar görmemesini sağlar. Kanamalı yaralarda etkili bir hemostatik madde özelliği gösterirler[42]. Aljinatlar, ağırlıklarının 15-20 misli kadar sıvı emebilmektedirler, bu da onları yüksek oranda eksüdası bulunan yaralar için ideal bir yara örtü malzemesi yapmaktadır. Piyasada Algisite, Algosteril, Kaltostat, Melgisorb, SeaSorb, Sorbsan, Sorbsan SA, Tegagen ve Urgosorb gibi birçok ticari aljinat yara örtü (Şekil 2.11) malzemesi bulunmaktadır [44].



Şekil 2.11 Aljinat yara örtü materyalleri

2.4.1.3 **Hidrojeller**

Hidrojeller, büyük miktarda suyu emmediklerinde dahi üç boyutlu (3D) yapılarını muhafaza edebilen yara örtü malzemeleridir. Hidrojelin su emmiş halindeki 3D bütünlüğü, bünyesinde bulunan fiziksel veya kimyasal çapraz bağlamalar ile korunur. Çapraz bağlarının gücüne göre hidrojellerin sudaki çözünürlükleri değişiklik gösterir. Kuru ağırlıkların 10-100 katı kadar suyu bünyelerinde hapsedebilen hidrojellerin en önemli özellikleri yüksek su tutabilme kapasiteleridir. Hidrojelin yapısında bulunan –COOH, –OH, $–CONH_2$, –CONH–, ve $–SO_3H$ gibi polar hidrofilik gruplar hidrojellin bol miktarda su tutmasını sağlayan moleküllerdir [47].

Hidrojeller su absorbe edebildiği gibi aynı zamanda sıcaklık, PH ve iyon konsantrasyonu gibi belirli çevresel uyaranlara tepki göstererek absorbe ettikleri suyu dışarıda salabilmektedirler[48]. Daha düşük ara yüzey gerilimi, yumuşak ve doku benzeri fiziksel özellikleri, üzerine yüklenen maddelerin kontrollü bir şekilde salınmasını sağlaması gibi özellikleri hidrojellerin farklı biyomedikal alanlarda kullanımı için cazip bir araştırma konusu olmasını sağlamıştır[49].

Hidrojellerin geniş bir kullanım alanı vardır. Bunlar; biyosensör /biyoaktivatör, biyoseparasyon ve suni deri veya suni kas, biyo-mekanik ve biyolojik aktiviteler, tarım, ilaç salınımı, sızdırmazlık, kömür suyunu giderme, yapay kar üretimi, gıda katkı maddeleri, farmasötik ürünler, mikroakışkan kontrolü, biyomedikal uygulamalar, doku mühendisliği ve rejeneratif ilaçlar, yara örtü materyali, biyomoleküllerin veya hücrelerin ayrıştırılması ve biyosensörleri düzenlemek için bariyer materyalleri olarak kullanımlarıdır [50].

Hidrojeller, rejenaratif tıp alanında kullanılan önemli biyomalzemelerdendir. Hidrojellerin daha önce belirtilen özelliklerinden dolayı, hücre kültürü için doku iskelesi ve kontrollü salınım araçları olarak rejeneratif tıp alanında birçok uygulamada kullanılmaktadır. Hidrojeller ayarlanabilir mekanik ve bozunma özellikleri ile biyolojik olarak kullanım amacına göre uygun hale getirilebilirler. Hücrelerin yapışması, göç etmesi, çoğalması gibi olaylardaki önemli hücresel molekülleri belirlemek amacıyla biyolojik işeretçiler ile donatılabilmektedir. Büyüme faktörleri, peptidler veya sitokinler gibi moderatörleri bağlayan hücre içi moleküllerin belirlenmesinde de bu işaretçiler

kullanılabilmektedir. Bu özellikleri, ekstrasellüler matriks (ECM) ortamını taklit edebilen biyomimetik hidrojellerin yapımına izin verir [51].

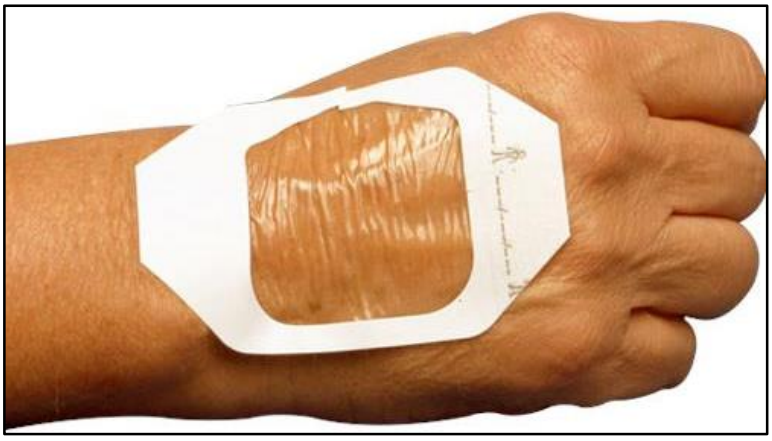
Hidrojellerin yara iyileşmesinde önemli bir rol oynadığının gösterilmesi hidrojllerin yara örtü malzemesi olarak kullanılmasını yaygınlaştırmıştır. Hidrojeller, kuru, kaygan veya nekrotik yaraların tedavisine yardımcı olmak için kullanılır[52]. Granugel® (ConvaTec), Intrasite Gel® (Smith & Nephew), Purilon Gel®(Coloplast), Aquaflo (Covidien) ve Woundtab® (First Water) gibi hidrojel içerikli ürünler piyasada yara ötü materyali olarak bulunmaktadır[53].

2.4.2 **Fiziksel yapılarına göre yara örtü malzemleri**

Fiziksel yapılarına göre yara örtü malzemleri transparan filmler ve köpükler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.4.2.1 **Transparan filmler**

Tranparan filmler kalınlığı µm ila mm arasında değişen farklı yöntemlerle hazırlanan bir veya daha fazla polimerden oluşan yapılardır. Transparan filmler yara örtü malzemeleridir ve ticari olarak piyasada hali hazırda mevcuttur. Homojen bir polimerik ağ yapısına sahip olan transparan filmler, hasar gören alanı tedavi etmek veya genelde yarayı ve yanık alanını dış faktörlere karşı korumak amacıyla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak trasparan filmler kapalı cerrahi insizyon yerleri, minimal eksudatlar ile yüzeysel yaralar, deri greft donör alanları ve intravenöz kateter alanları için yaygın olarak kullanılmaktadır [54]. Eksüdası bol yaralar için transparan filmler (Şekil 2.12) kullanılmamalıdır. Filmlerin hazırlanmasında kullanılan filmler genelde şu polimerleri içermektedir; poliüretan, polivinilpirolidon, hiyalüronik asit, kolajen, chitosan ve türevleri, poli-N-asetil glukozamin ve fukoidan'dır [4].



Şekil 2.12 Transparan film örneği

2.4.2.2 **Köpükler**

Köpük yara örtü malzemleri, poliüretan veya silikon köpük olarak üretilmektedir. Nem, buhar ve oksijen geçirgenlikleri fazladır, yara yatağının ısısının korunmasında yardımcı olurlar. Poliüretan köpükler, bir hidrofilik yaraya temas eden yüzey ile bir hidrofobik destek kısmı olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Su tutma kapasiteleri yüksektir. Eksüdatın, absorbe eden tabaka boyunca düzgün dağılımını kolaylaştırırlar ve yarı geçirgen bir astarın varlığına bağlı olarak dış sızıntıyı (grev) önlemektedir[44].

Şekil 2.13 Köpük yara örtü malzemesi örnekleri

Köpük yara örtü malzemeleri (2.13) orta veya bol eksüdalı yaralar, granüle haline gelmiş veya kısmen yaralar, ostomi alanları, minör yanıklar ve diyabetik ülserler gibi yaralar için ideal bir yara örtü malzemesidir. Kuru yaralarda kullanılması tavsiye edilmemektedir[54].

2.4.3 **Aktif madde içeriklerine göre yara örtü malzemeleri**

Aktif madde içeriklerine göre yara örtü malzemeleri vitamin ve minareller, büyüme faktörleri, antibakteriyel madde içeren biyomalzemeler olmak üzere üçe ayrılır.

2.4.3.1 **Vitaminler ve minareller**

Yara tedavisinde, vitamin ve mineraller önemli bileşiklerdir. Özellikle A, C, E, vitaminlerinin yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği birçok çalışmada belirtilmiş. Tedavi sırasında A ve C vitaminler genel olarak oral yolla alınmaktadır [55]. Yapılan bazı çalışmalarda ise E vitaminin farklı jel ve transparan filmlere yüklerek yanık tedavisinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [56], [57].

2.4.3.2 **Büyüme faktörleri**

Büyüme faktörleri, hücre çoğalması, farklılaşması, proliferasyonu, göçü ve metabolizmasına katılan biyolojik aktif polipeptitlerdir. Büyüme faktörlerinin etkileri, bir dizi moleküler olayı aktive eden reseptörlerine spesifik olarak bağlanmasının bir sonucudur. İyileşme sürecinin tüm aşamalarıçeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından kontrol edilir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aileleri gibi büyüme faktörleri yara iyileşmesi ve derinin onarımı ile ilgili temel büyüme faktörleridir [58].

Hidrojel yara örtüleri, kollajen filmler, aljinat yara örtüleri, poliüretan ve kollajen filmler gibi yara örtü malzemelerinin içine büyüme faktörleri yüklenerek yara iyileşmesi üzrine etkilerini belirlemek adına birçok çalışma yapılmaktadır[6].

2.4.3.3 **Antibakteriyel moleküller**

Bu tip yara örtü malzemeleri daha çok klasik yara örtü sistemlerinin içine gümüş, bal, iyot ve PHMB gibi antimikrobiyal moleküllerin yerleştirilmesiyle ve bu moleküllerin kontrollü ve etkin bir salınımı göstemesiyle karakterize edelir. Diyabetik ayak

ülserlerinde, cerrahi ve kaza sonucu oluşan yaralarda enfeksiyonu önlemek veya gidermek amacıyla antimikrobiyal moleküller içren yara örtü malzemleri kullanılır [59].

Antimikrobiyal maddelersıklıkla aljinat hidrojelleri, hidrokolloidler, köpükler ve gazlı bezler dahil olmak üzere piyasada bulunan çeşitli yara örtü malzemelerinin içinde bulunmaktadır [60].

2.4.4 **En yeni tekniklere göre yara örtü malzemeleri**

En yeni tekniklere göre yara örtü malzemleri biyoaktif yara örtü malzemleri, doku mühendisliği ürünleri ve graft/graft benzeri yara örtü malzemleri olmak üzere üçe ayrılır.

2.4.4.1 **Biyoaktif yara örtü malzemeleri**

Biyoaktif yara örtü malzemeleri, yara için optimal bir mikro çevre sağlamak veya yara iyileşmesini hızlandırmak için gerekli biyoaktif molekülleri, yara ortamında sağlamak amacıyla üretilmiş yara örtü malzemleridir[61]. Klinikte ve geliştirilmekte olana birçok farklı biyoaktif malzemeleri bulunmaktadır. Kollajen, hiyalüronik asit, kitosan, aljinatlar ve elastin gibi biyoaktif polimerlerden üretilen yara örtü malzemelerinin içine büyüme faktörleri veya antibakteriyel maddeler yüklenebilmektedir [62], [63].

2.4.4.2 **Doku mühendisliği ürünleri**

Doku mühendisliği ürünleri genellikle ECM bileşenlerine benzer özellik gösteren doğal polimerlerden elde edilen bir matriks üzerine canlı hücrelerin yerleştirilmesiyle karakterize edilen sistemlerden oluşur. Bu matriks yapıları, hücreleri desteklemek, hücrelerin farklılaşmalarını ve çoğalmalarını teşvik etmek amacına uygun olarak geliştirilmektedir. Matriks yapılarında kitosan, kollojen ve fibrin gibi doğal polimer bulunan birçok biyomalzeme hazırlanmıştır. Yapılan çalışmalar yara örtülerinin enflamasyon şiddetini optimum duruma getirmesinde büyük önem taşıdığını göstermiştir, eğer inflamasyon şiddeti optimum düzeyde olmazsa yara iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir [64]. Doku mühendisliği ürünleri, kırılgan yaralar ve primer kapanmaya uygun olmayan yaralar için umut vaad edici ürünler olmaktadır[65].

2.4.4.3 **Greft ve greft benzeri yara örtü malzemeleri**

Greftlar başka bir organizmadan alınan doku parçasının hasarlı doku üzerini örtmesi amacıyla kullanıllınan örtü malzemleridir. Yara ortamının yara iyileşmesi için optimal hale getirilmesi amacıyla kullanılır. Başka bir canlıdan alınan bir dokunun uygulaması olduğu için immün yanıt ve bulaşıcı hastalık olma ihtimali yüksektir. Bu gibi sorunlardan dolayı kişinin kendi kök hücrelerinden geliştirilen yapay dokuların (greft benzeri) üretilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır [6].

Başka canlıdan elde edilenlere ksenogreft, aynı tür canlının başka bireyden elde edilen greftlere ise allogreft denir. Greftler genellikle ikinci derece veya tam doku yanıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Piyasada çok farklı greft yara örtü örtüleri bulunmaktadır [66].

BÖLÜM 3

MATERYAL-METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan sarf malzemeleri

- L929 hücre hattı
- HaCaT hücre hattı
- THP-1 hücre hattı
- DMEM-F12 besi yeri
- RPMI besiyeri
- Fetal bovine serum (FBS)
- Tripsin EDTA
- 75 cm^2 flask
- 25 cm^2 flask
- 96 kuyulu hücre kültür plakaları
- 24 kuyulu hücre kültür plakaları
- Hümik asit sodyum tuzu
- Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)

- Nitril eldiven
- L-glutamine
- Falkon Tüp
- Fosfat Buffered Saline (PBS) Tablet
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Etanol (%70'lik)
- Nötral red
- Epiklorohidrin
- Sodyum Aljinat
- Steril pipetler tek kullanımlık - 2 ml
- Steril pipetler tek kullanımlık - 5 ml
- Steril pipetler tek kullanımlık - 10 ml
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

3.1.2 **Kullanılan Kitler**

- IL-1β insan kit
- TNFα insan kit
- Kollojen tip 1 fare kit
- Kollojen tip 3 fare kit
- Total Antioxidant Status (TAS) Test Kiti

3.1.3 **Kullanılan Cihazlar**

- Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, EVO® LS 10)

- Bet yüzey alanı cihazı (Quantachrome, QuadraSorb SI)

- TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300)

- Elisa reader (Thermo Scientific, Multiskan GO)

- Elisa plate washer (Thermo Scientific, Wellwash)

- İnverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)

- CO_2 inkübatörü (Esco, CelCulture CO_2 INCUBATOR)

- Çalkalamalı su banyosu(Memmert WNB 29)

- Flow kabin (Esco, Sentinel PLATINUM, Class II)

- Santrifüj (Hermle, Z 206 A)

3.2 **Metod**

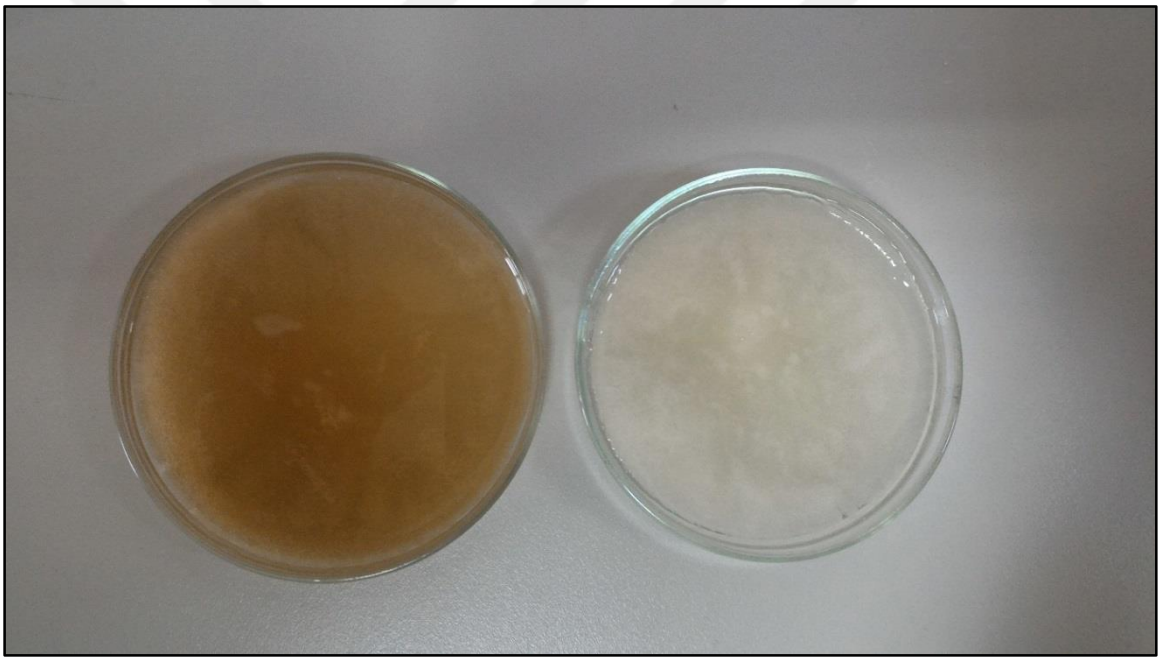
Metod kısmı üç ana iş paketinden oluşmaktadır. İlk olarak yara örtü malzemesi hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan yara örtü malzemeleriinin karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1 **Yara örtüsünün hazırlanması**

Hümik asidin in-vitro sitotoksisite seviyesi belirlendi. Bu amaçla 2mg/ml'lik (distile su içerisinde) hümik asit çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda hümik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin insan keratinosit hücresi (HaCaT) üzerine sitotoksisitesi MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi için DMEM F-12 besiyeri içerinde %5 CO_2 içeren ortamda 37^{o}C 'de inkübe edilen HaCaT hücre hattı kullanılmıştır. Hümik asit 2mg/mL olucak şekilde distile suda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hücreler 96 kuyulu plakaya 100 000 hücre/ml olucak şekilde her kuyuya 100 µl besiyeri hücre karışımı ekilmiştir. 96 kuyulu plakaya ekilen hücreler 24 saat yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edilmiştir. Kuyulardaki besiyeri hümik asitin faklı konstarasyonlarını içeren besi yeri (500 µg/mL,250 µg/mL, 125 µg/mL, 67,5 µg/mL, 33 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL) ile değiştirildi. 24 saat yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edildi. 24 saat sonunda besiyeri dökülüp %10 MTT stok solüsyon içeren besi yeri eklendi. 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonunda

besiyeri döküldü ve tüm kuyulara 100 µl DMSO yüklendi. Formazan kristillerinin ile DMSO çözülmesi için kuyular karıştırıldı ve 96 kuyulu plaka ELİSA reader'da 570 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

Hümik asit – Aljinat hidrojelinin hazırlanması için öncelikle %2'lik aljinat çözeltisi (distile suda) hazırlanmıştır. Aljinat çözeltisi içine 125 µg/mL olucak şekilde hümik asit eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen solusyon 1 saat -80^{o}C'de bekletilen kalıplara döküldü ve 1 gece -80^{o}C'de bekletilmiştir. -80^{o}C'de gece boyu bekleyen hidrojel -80^{o}C'de iki gün boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen hidrojel kovalent çapraz bağlarının oluşturulması için bir gece epikloridine maruz bırakılmıştır. Çapraz bağlanan hidrojel %1 $CaCl_2$ çözeltisi (1:10 etanol:distile su içerinde) ile yıkanarak çapraz bağlanmayan moleküller uzaklaştırılmıştır.



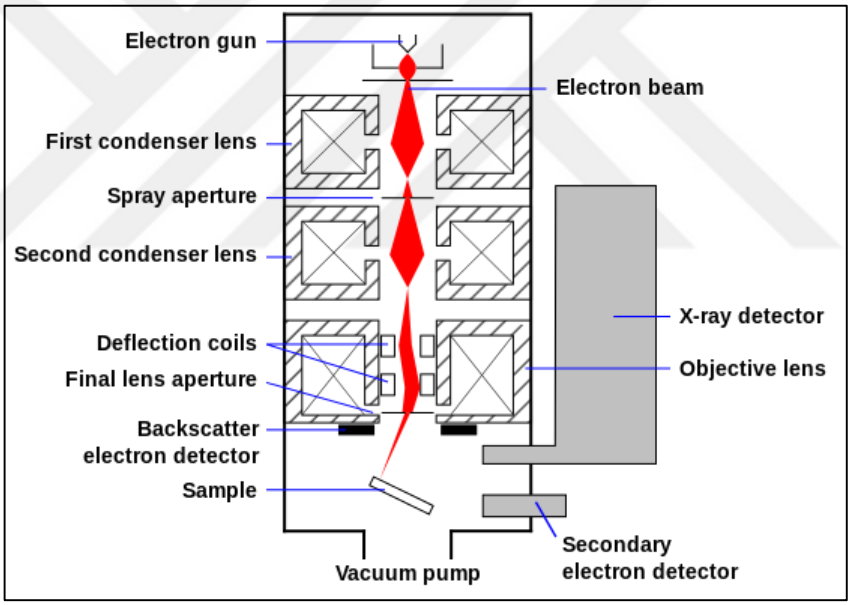
Şekil 3.1 Hümik asit-aljinat ve aljinat hidrojelleri

3.2.2 **Yara örtüsünün karakterizasyon çalışmaları**

Hazırlanan yara örtü malzemleri olan aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojellerin karakterizasyonu için yüzey alanı analizi, yüzey morfoloji analizi, termogravimetrik, şişme ve biyodegredasyon analizleri yapılmıştır.

3.2.2.1 **Yüzey morfoloji analizi**

Taramalı elektron mikroskobunda (sem) numuneleri görüntülemek için ışık yerine elektronlar kullanılmaktadır. Elektron kullanımı ile SEM en güçlü ışık mikroskobundan 250 kat daha fazla büyütme oranına sahiptir. SEM numuneye yüksek enerjili demet elektronları yollayarak numune yüzeyindeki atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları ve yüzey elektronları ya da yüksek enerjili demet elektronlarından enerisi düşüp yüzeyde toplanan ikincil elektronlar diye tabir edilen elektronların oluşumuna neden olmaktadır. İkincil elektronlar numune haznesinde bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektronlar görüntü sinyaline çevrilmektedir (Şekil 3.2). İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesini sağlamaktadır[67].

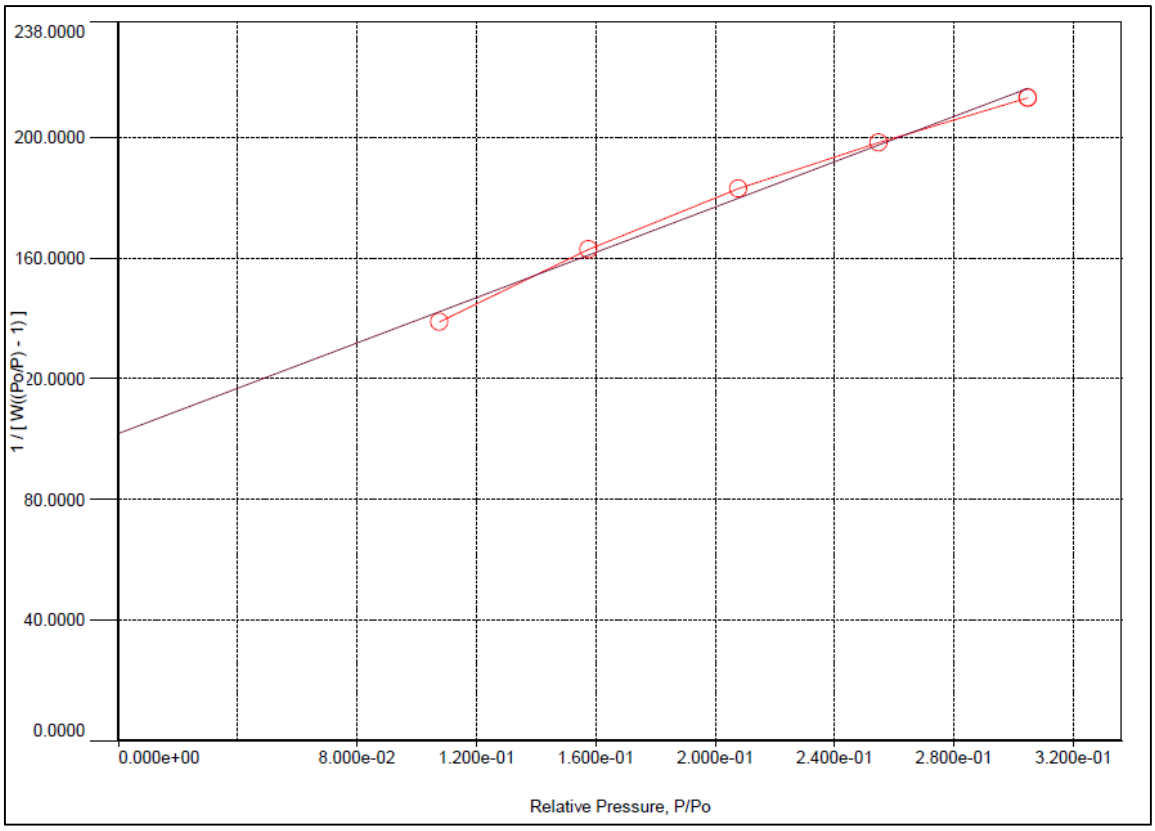


Şekil 3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren aljinat doku iskelelerinin yüzey morfoloji analizi SEM (Zeiss, EVO® LS 10) ile yapılmıştır. Hidrojellerin 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanıp 'Spotter coater' cihazı kullanılarak altın kaplanması sağlanmıştır. Yüksek basınç koşulları altında ikincil elektron saptayan dedektör kullanılarak yüzey analizi yapılmıştır. İkincil elektron kaynağı olarak LaB_6 flaman kullanılmıştır. 1000x ve 2500x büyütme oranları arasında çalışılmıştır. SEM kullanılarak hidrojellerin makro gözenekleri ve makro gözeneklerin çapları belirlenmiştir.

3.2.2.2 **Yüzey alanı analizi**

Bet yöntemi 1938 yılında Brunauer, Emmett ve Teller tarafından geliştirilmiştir. 1960 yılında ise Haul ve dümbgen tarafından geliştirlen cihazla beraber bugün kullanılan metod ortaya çıkmıştır. Metod gaz basıncından yararlanarak katı maddelerin yüzey alanının ölçülmesine dayanmaktadır. Numunenin gaz basıncına uğratıldığı ve numunin gözenekli yapısı tarafından gaz absorbe edildikten sonraki gaz basıncı P olarak adlandırılmaktadır. Numuneye uygulanan gazın ilk basıncı ise P_0 olarak adlandılmaktadır. P/P_0(Şekil 3.3) kullanılarak katı numunenin yüzey alanı hesaplanmaktadır[68].



Şekil 3.3 BET P/P_0 oaranına sahip örnek tablo

Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren aljinat doku iskelelerinin yüzey alanı BET yüzey alanı cihazı(Quantachrome, QuadraSorb SI) kullanılarak belirlenmiştir. Doku iskelelerinini bet analizine hazırlamak amacıyla 75°C'de 18 saat boyunca degaz işlemine maruz bırakılmıştır. Doku iskeleleri yüksek saflıkta azot kullanılarak yüzeylerinin azotu fiziksel olarak absorblaması ölçülmüştür. Analiz 189,3 dakika boyunca devam etmiştir. P/P_0 değerinin 0,05 – 0,3 olduğu aralıkta analiz yapılmıştır.

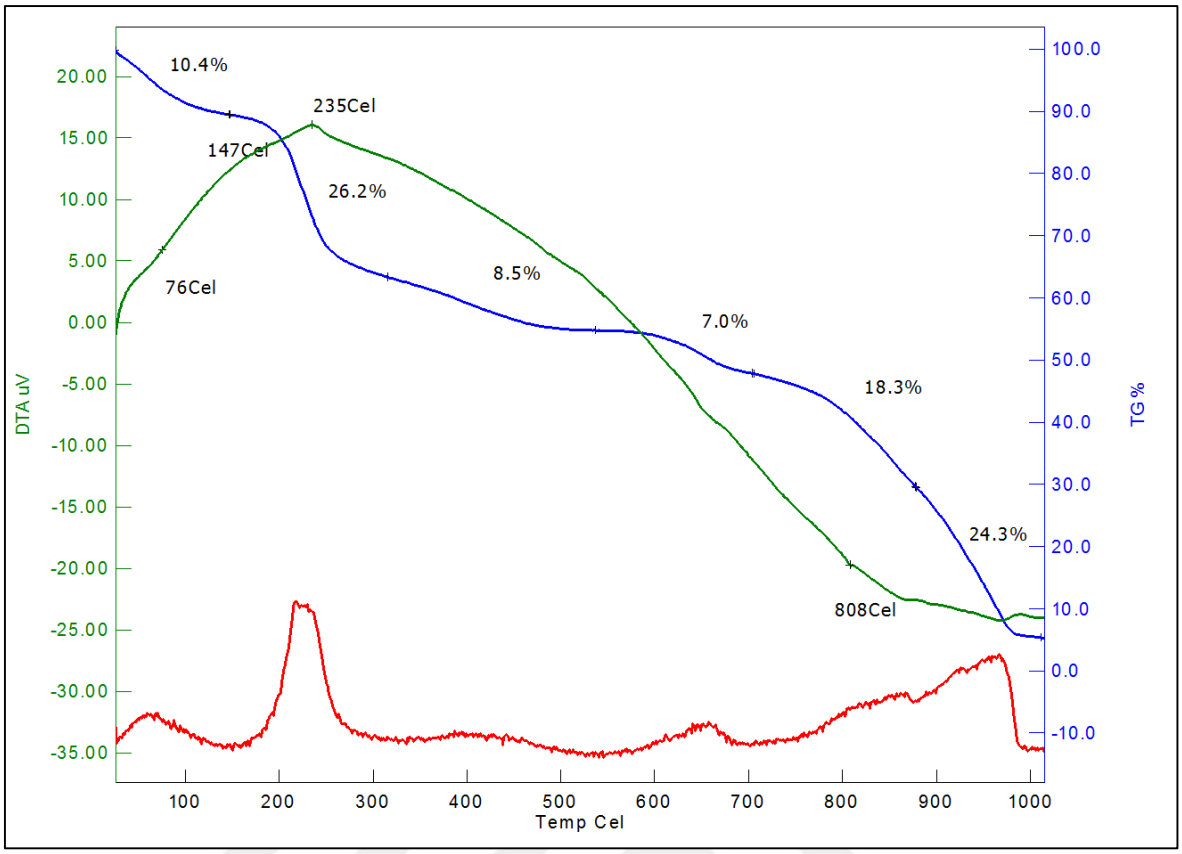
3.2.2.3 **Termogravimetrik analiz**

Termogravimetrik (TG) ölçümler bir malzemenin zamanla ısıtılması ve ısınmayla beraber gelen kütle kaybının ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Maddelerde ısınmayla beraber meydana gelen kütle kaybı, maddenin dekompozisyon (bozulma) sıcaklığını göstermektedir [69].

Diferansiyel termal analiz (DTA) maddeye eneji verilerek maddenin sıcaklık artışının gözlenmesine dayanan bir metoddur. Verilmekte olan enerji miktarına göre maddenin sıcaklığı takip edilmekle beraber madde ısı almaya devam ederken sıcaklık değişimi göstermiyor ise maddenin hal değişim sıcaklığı ve enerjiside bu yöntem ile hesaplanabilmektedir [70], [71].

TG/DTA cihazı aynı anda bir numunenin hem termogravimetrik (TG) hem de diferansiyel termal analizini (DTA) yapabilen bir cihazdır. İki analizin sonuçları aynı grafik üzerinde gösterilerek TG/DTA sonuçlarına ulaşılmaktadır. Şekil 3.4'de görüldüğü üzere mavi renkli eğri maddedeki kütle kaybının sıcaklık ile olan ilişkisini göstermektedir. Yeşil renkli eğri ise maddenin sıcaklık ile enerji miktarı arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Aljinat-hümik asit ve aljinat içeren doku iskelelerinin termal özellikleri termogravimetrik (TG) ölçümler ile belirlenmiştir (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300). Aliminyum penlere yerleştirilen örnekler dinamik bir hava ve azot atmosferi altında, 10 °C/dk ısıtma hızlarında ıstılmış ve kütle kaybı kaydedilmiştir. Analiz 25^{o}C-1000^{o}C aralığında 90 dakika sürmüştür.



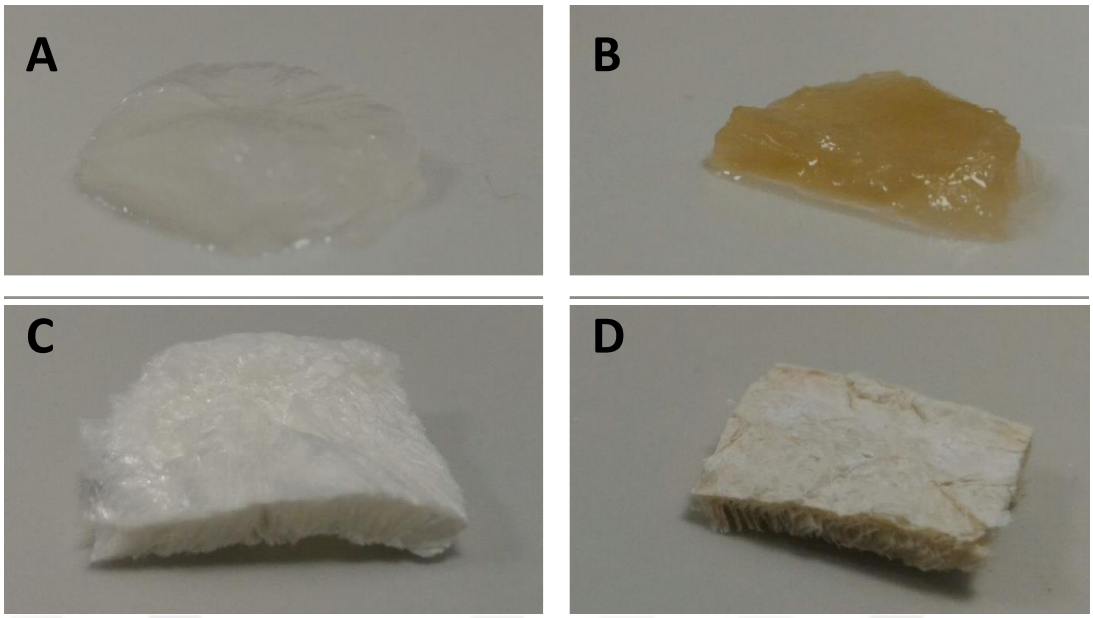
Şekil 3.4 TG/DTA analiz grafiği

3.2.2.4 **Şişme analizi**

Aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojelleri su çekme performanslarının belirlenmesi için şişme testi yapılmıştr. Kuru ağırlıkları tartılan hidrojeller distile su içerisinde bekletilmiştir. 1, 24 ve 48. saatlerde hidrojellerin ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. Hidrojellerin su çekme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır[72].

$$\% \text{ Şişme} = (Wf - Wo / WXo) \times 100$$

Wf: son, ıslak ağırlık, Wo başlangıç, kuru ağırlık.



Şekil 3.5Hidrojellerin kuru ve su tutmuşgörüntüleri **A** Su tutmuş aljinat bazlı hidrojel, **B** Su tutmuş hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, **C** Kuru Aljinat bazlı hidrojel, **D** Kuru hümik asit-aljinat bazlı hidrojel

3.2.2.5 **Biyodegredasyon analizi**

Biyodegredasyon analizi için lizozim içeren PBS çözeltisi kullanıldı. PBS çözeltisi içine 1,5 µg/ml olucak şekilde lizozim enzimi eklendi. Aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojeller boyutları 10mm X 5mm olucak şekilde küçük parçalara ayırıldı. Hidrojel örneklerinin kuru ağırlıkları ölçüldü ve sterilizasyon için 120^{o}C 'de 20 dakika otoklavlandı. Hazırlanan hidrojel örnekleri, 1,5 µg/mL olarak hazırlanan lizozim içeren PBS çözeltisini içerisine bırakıldı. Örnekler hafif mekanik hareket altında 37 ^{o}C'de bir ay boyunca lizozim çözeltisine maruz bırakıldı. Örneklerin kuru ağırlıkları 7, 14, 21 ve 28. günlerde ölçüldü. Lizozim çözeltisi ölçümün yapıldığı günlerde tazelenmiştir. Kütle kaybı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

% Degradasyon (Kütle Kaybı) = (Wf-Wo / Wo) x 100

Wf: son, ıslak ağırlık, Wo başlangıç, ıslak ağırlık.

3.2.3 **Hücre kültür çalışmaları**

Sentezlenen aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojellerin hücre kültürü çalışmaları sitotoksisite, immünotoksisite, kollajen salınım ve antioksidant kapasite çalışmaları olmak üzere 4 ana çalışma başlığına ayrılmıştır.

3.2.3.1 **Sitotoksisite çalışmaları**

Sitotoksisite çalışmalarının amacı test edilecek maddenin hücreler için toksik bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesidir. Günümüzde kullanılmakta olan birçok sitotoksisiste testleri vardır. Örneğin; MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilide), INT (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorit), Nötral red (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorür). Bu testlerden MTT ve Nötral en çok kullanılan iki tanesidir[73].

MTT en çok kullanılan sitotoksisite testlerinden bir olup çeşitli hücre hatlarında geçerliliği test edilmiştir. Ayrıca iso (10993.5) standartları içinde bulunmaktadır. MTT (3- [4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür), suda çözünür bir tetrazolyum tuzu olup, mitokondri içerisinde sukinat dehidrojenaz ile tetrazolyum halkasının ayrılmasıyla çözünmez bir mor formazana dönüştürülmektedir. Formazan ürünü, hücre zarları için geçirimsizdir ve bu nedenle sağlıklı hücrelerde birikmektedir. Biriken formazan ürünleri uygun solventte çözdürüldükten sonra optik yoğun eliza reader yardımıyla belirlenmektedir. Formazan ürünlerin optik yoğunluğu hücre canlılık oranın gösteren bir araç (Şekil 3.6) olarak kullanılmaktadır[74].

NötralRed (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorür),bir supravital boya kırmızı bir boyadır ve canlı hücrelerin lizozomlarında birikmektedir (Şekil 3.7). Ölü hücrelerde biriktirilmediği için boya test içindeki yıkama aşamalarında ortamdan uzaklatırılmaktadır. Lizozomlarda birikmiş olan nötral red boyası uygun bir çözücü (50:49:1 Etanol:Su:Galicial asetik asit) yardımıyla çözülmektedir. Çözünmüş nötral red'in optik yoğunluğu ölçülerek hücre canlılığı tayini yapılmış olmaktadır[74], [75].

Time h	Procedure
00:00	Seed 96-well plates: 1×10^4 cells/100 µl MEM culture medium/well Incubate (37 °C/5 % CO_2/22 h to 26 h) ↓
24:00	Remove culture medium ↓
24:00	Treat with ⩾ 4 concentrations of test sample extract in treatment medium (100 µl) (untreated blank = treatment medium) Incubate (37 °C/5 % CO_2/24 h) ↓
48:00	Microscopic evaluation of morphological alterations Remove culture medium Add 50 µl MTT solution Incubate (37 °C/5 % CO_2/2 h) ↓
51:00	Remove MTT solution Add 100 ml isopropanol to each well Sway plate ↓
51:30	Detect absorption at 570 nm (reference 650 nm)

Şekil 3.6 MTT prösedürü (iso10993.5 2009 yılı)

HaCaT ve L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37^{o}C'de, %5 CO_2 atmosferinde ayrı ayrı kültüre edilmiştir. Sitotoksite çalışmaları aseptik ortamda yapılmıştır. Doku iskelesinin sterilizasyonu %70 etanol içerisinde 1 saat UV ışık altında bekletilerek yapılmıştır. Daha sonra doku iskeleleri PBS ile yıkanmıştır. Doku iskelelerinin indirekt sitotoksisiteleri belirlenmiştir. Ekstrakt eldesi için doku iskeleleri 0,2g/mL konsantrasyonunda standart hücre kültür vasatı içerisinde 72 saat süre ile 37^{o}C'de, %5 CO_2 atmosferinde bekletilmiştir. Ekstrakt 96 kuyucuklu plaklara daha önceden ekilmiş ve bir gün boyunca bekletilmiş L929 ve HaCaT hücreleri üzerine hücrelerin besi yeri döküldükten sonra pipetlenmiştir. Plaklar 37C^o'de, %5 CO_2 atmosferinde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan ekstrakt atılmış ve kuyucuklara 10µL MTT çözeltisi (25mg/mL, PBS ile) içeren 100µL taze vasat pipetlenmiştir. 4 saat inbübasyondan sonra kuyucuklardaki vasat atılarak kuyucuklara 100µL DMSO çözeltisi (distile su içerinde %10 DMSO) ilave edilmiştir. DMSO ile çözülen formazan boyanın optik yoğunluğu 570nm de incelenmiştir.

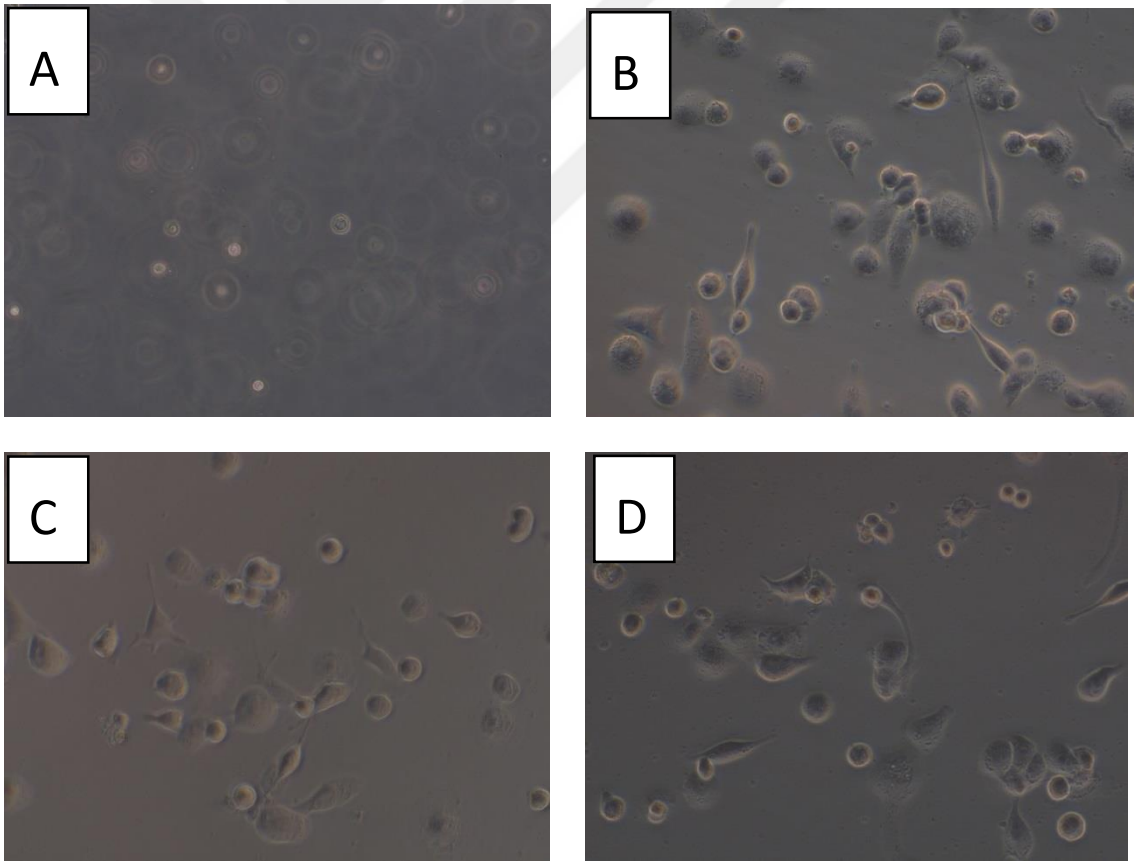
Time h	Procedure
00:00	Seed 96-well plates: 1×10^4 cells/100 µl DMEM culture medium/well Incubate (37 °C/5 % CO_2/22 h to 24 h) ↓
24:00	Remove culture medium ↓
24:00	Treat with eight concentrations of test sample extract in treatment medium (100 µl) (untreated blank = treatment medium) Incubate (37 °C/5 % CO_2/24 h) ↓
48:00	Microscopic evaluation of morphological alterations Remove treatment medium Wash once with 150 µl PBS Add 100 µl NR medium Incubate (37 °C/5 % CO_2/3 h) ↓
51:00	Discard NR medium Wash once with 150 µl PBS Add 150 µl NR desorbing fixative (ETOH/acetic acid solution) ↓
51:40	Shake plate for 10 min
51:50	Detect NR absorption at 540 nm (i.e. cell viability)

Şekil 3.7 Nötral Red prösedürü (iso10993.5 2009 yılı)

HaCaT ve L929 hücreleri %10 FCS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37C°'de, %5 CO_2 atmosferinde kültüre edilmiştir. Yukarıdaki paragrafta anlatılan aynı sterilizasyon ve ekstrakte etme yöntemleri kullanılarak elde edilen aljinat ve hümik asit-aljinat hidrojelleri ekstraktı ile nötral red testi (Şekil 3.7) yapılmıştır.

3.2.3.2 **İmmünotoksisite çalışmaları**

THP-1 hücre hattı kullanılmıştır. THP-1 hücreleri 24 kuyucuklu plakaya 100.000 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. THP-1 hücreleri ekilen kuyucuklara 20mM PMA pipetlenmiştir. PMA uyarımı ile monositlerin makrofaja dönüşmesi sağlanmıştır. Monositlerin makrofaj hücrelerine dönüşümü inverted mikroskop ile izlenmiştir (Şekil 2.8). Makrofaj hücrelerinin elde edilmesinden sonra, makrofaj hücreleri üzerine 5mm X 5mm boyutunda doku iskeleleri yerleştirilmiştir ve plaklar 48 saat süre ile 37^{o}C'de, %5 CO_2 atmosferinde kültüre edilmiştir. Vasatlar toplanarak ve 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Vasatlardaki sitokin seviyeleri TNFα (Sigma, Human Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit)ve interlökin-1β (Thermo Fisher, IL-1 beta Human ELISA Kit) elisa kitleri kullanılarak firmanın önerdiği metod ile belirlenmiştir.



Şekil 3.8 THP-1 hücre hattının Makrofaj hücrelerine farklılaşması **A** PMA uygulanmış THP-1 hücreleri 1. gün, **B** PMA uygulanmış THP-1 hücreleri 2. Gün, **C-D** PMA uygulanmış THP-1 hücreleri 3. Gün

Elisa yöntemi antijen-antikor ilişkisine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Kuyuların diplerine analizi yapılmak istenen proteine spesifik antikorlar sabitlenmektedir. Kuyulara örnek ya da standart solusuyonları eklendiği zaman örnek tayin etmek istenilen protein antikorlarla etkileşime girerek kuyuların dibine sabitlenmiş olmaktadır. Yıkama aşamalarıyla ortamdaki istenmeyen kompnentler uzaklaştırılırken tayini yapılmak istene proteinler antikorlara bağlı bir şekilde kuyunun dibine sabitlenmiş bir şekilde durmaktadır. Daha sonrasında sabitlenmiş proteinin antikordan koparılması ve renkli bir çözelti oluşturması için çeşitli reaktiflerin eklendiği basamaklar yer almaktadır. Son olarak çözeltinin optik yoğunluğu elisa reader ile okunmuştur. Optik yoğunluğu ölçüldükten sonra tayini yapılmak istenilen proteinin konstarasyonu standart eğri referans alınarak hesaplanmaktadır.

Şekil 3.9 Eliza yöntemi (Thermo fisher eliza kit prosüdürü)

3.2.3.3 **Kollajen salınım çalışmaları**

L929 hücre hattı kullanılmıştır. L929 hücreleri 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. L929 hücreleri 24 kuyucuklu plakaya 100.000 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir.L929 hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine 5mm X 5mm boyutunda doku iskeleleri yerleştirilmiştir ve plaklar 48 saat süre ile 37^{o}C'de, %5 CO_2 atmosferinde kültüre edilmiştir. Vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Vasatlardaki kollajen tip1 ve tip 3 seviyeleri elisa kitleri (Mybiosource, Mouse Collagen Type I, Col I ELISA Kit ve Mybiosource, Mouse Collagen Type III, ELISA Kit) kullanılarak firmanın önerdiği metod ile hesaplanmıştır.

3.2.3.4 **Antioksidant kapasite çalışmaları**

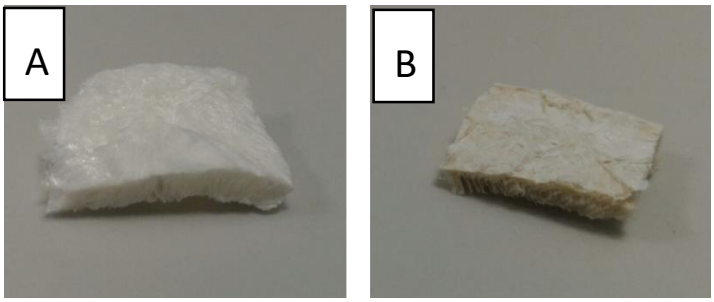
HaCaT hücreleri kullanılarak oluşturulacak stres modelinde oksidant-antioksidant performansı belirlenmesi için HaCaT hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besi yerinde; 37^{o}C'de, %5 CO_2 atmosferinde kültüre edilmiştir. İnkübe edilen HaCaT hücreleri 24 kuyrulu plakaya 100.000 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 5x5mm olacak şekilde hidrojeller HaCaT hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 2 saat boyunca incübe edilmiştir. Doku iskelesi ile inkübe edildikten sonra kuyulara 50µM, 100µM ve 200µM gibi farklı H_2O_2 konsantrasyonları eklenerek ve 24 saat tekrar inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oksidatif strese uğratılmış HaCaT hücreleri TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status kit) kiti kullanarak hidrojellerin antioksidant performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 **Yara örtü malzemelerinin hazırlanması**

Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel yara örtü malzemesinin hazırlanması iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak hümik asidin hücreler için toksik olmayan en yüksek konsantrasyonu bulunmuştur. Şekil 4.2 'de görüldüğü üzere hücre canlılığının en yüksek olduğu, en büyük konstantrasyon 125 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Daha sonra Hümik asit – Aljinat hidrojelinin hazırlanması için öncelikle %2'lik aljinat çözeltisi (distile suda) hazırlanmıştır. Aljinat çözeltisi içine 125 µg/mL olucak şekilde hümik asit eklenerek freze drying yöntemi ile hümik asit-aljinat bazlı hidrojel sentezlenmiştir (Şekil 4.1).

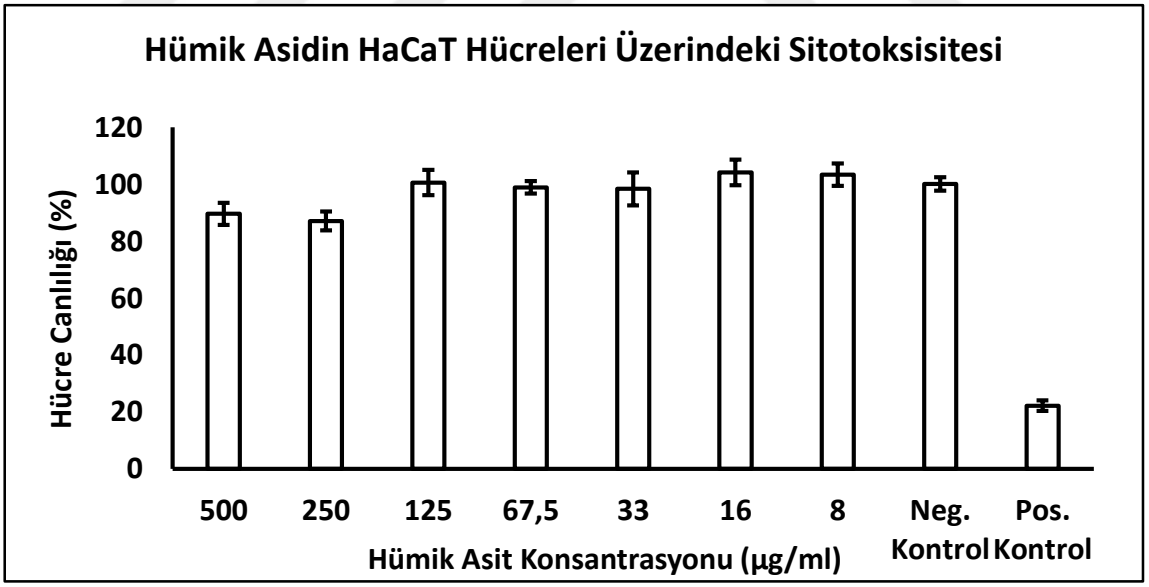


Şekil 4.1 Hidrojeller, **A** aljinat bazlı hidrojel, **B** Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel

Hümik asidin in-vitro sitotoksisitesini belirmek amacıyla HaCaT hücre hattı üzerinde, MTT testi yapılmıştır. MTT testi en az beş tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Hümik asidin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri Şekil 4.2 'de tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak normal besi yerinde inkübe edilen hücreler, pozitif kontrol olarak ise %20'lik DMSO içeren besi yerinde inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. Hümik asidin 500

µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %89,63 (Standart hata = ± 3,87) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 250 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %87,14 (Standart hata = ± 3,30) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 125 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %100,6 (Standart hata = ± 4,44) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 67,5 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %98,94 (Standart hata = ± 2,19) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 33 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %98,40 (Standart hata = ± 5,80) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 16 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %104,20 (Standart hata = ± 4,51) olarak hesaplanmıştır. Hümik asidin 8 µg/ml'lik konsantrasyonunda hücre canlılığı %103,37 (Standart hata = ± 3,93) olarak hesaplanmıştır. Hücre canlılığına ait istatiksel hesaplamalar EK A'da belirtilmiştir.

Hümik asidin tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığı sitotoksisite sınırı olan %70'in üzerinde çıkmıştır ve toksik etkisi gözlenmemiştir. Literatürde hümik asidin SK-N-MC (insan beyin hücreleri)[76], CHO (Çin hamsterı ovaryum hücreleri)[77] ve insan vasküler endotel [78] gibi hücre hatları üzerinde sitototoksik etkisi bulunmadığı belirtilmiştir.



Şekil 4.2 Hümik asidin in-vitro sitotoksisitesini (negatif kontrol sağlıklı hücreler, pozitif kontrol %20 DMSO içeren hücreler)

4.2 **Yara örtüsünün karakterizasyon çalışmaları**

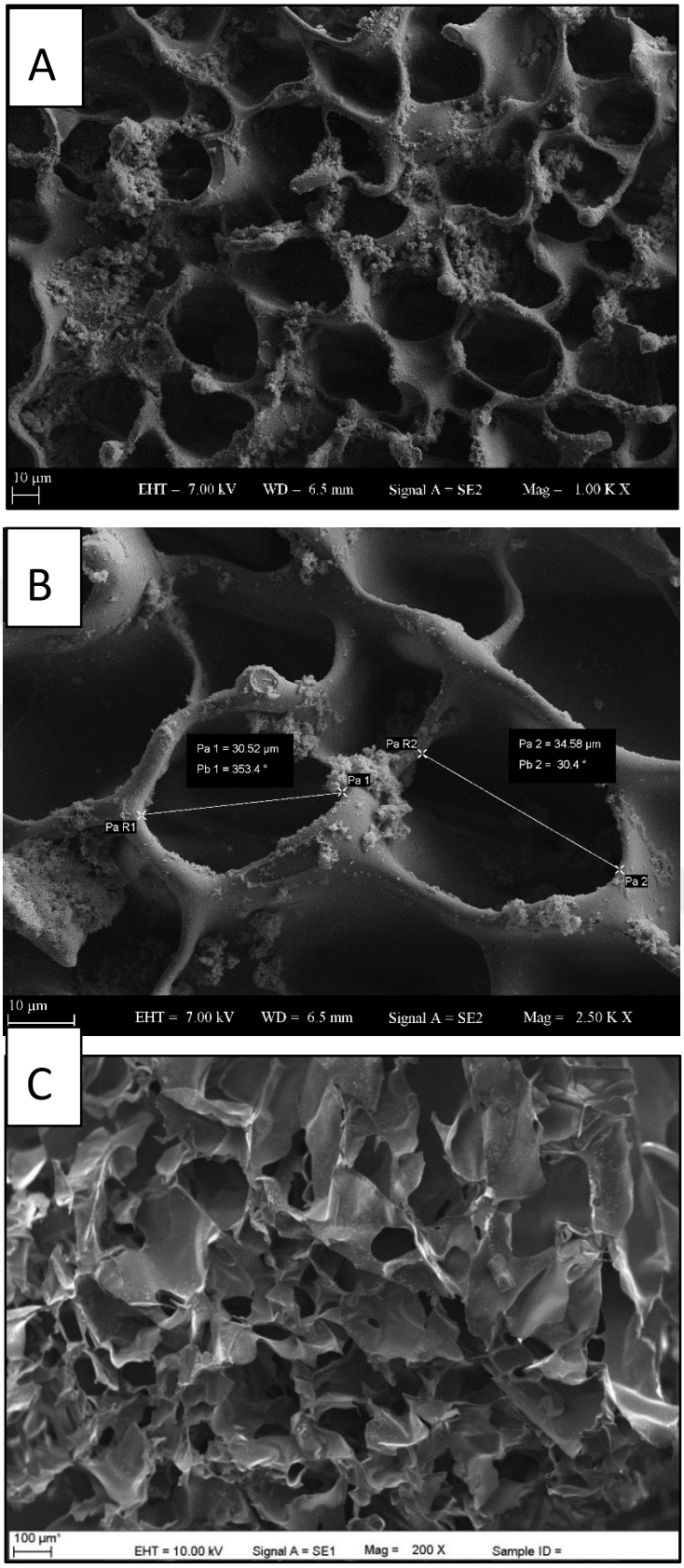
Hazırlanan yara örtü malzemleri olan aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojellerin karakterizasyonu için yüzey alanı analizi, yüzey morfoloji analizi, termogravimetrik, şişme ve biyodegredasyon analizleri yapılmıştır.

4.2.1 **Yüzey morfoloji analizi**

70µm-300 µm arası gözenek çaplarına sahip kalsiyum aljinattan sentezlenen hidrojeller literatürde bulunmaktadır [79]. Yapılan bir araştırmaya göre farklı malzemelerden yapılan doku iskelelerinin farklı gözenek çapları hücre canlılığını etkilemektedir. Bu iki değişken birbirinden bağımsız olarak hücre canlılığına etki etmektedir [80]. Gözenek çapı ile hücre canlılığı arasında belirli bir korelasyon bulunmamaktadır. Gözenek çapı ile su tutma kapasitesi arasında belirli bir korelasyon görülmektedir[81]. Kitosan-hiyalüronik asit içeren bir hidrojel çalışmasında sentezlenen hidrojellerin gözenek çaplarının 10 µm - 100 µm arasında olduğu belirtilmiştir [82].

Hidrojeller 75 saniye boyunca altın kaplanmıştır. SEM kullanılarak hidrojellerin yüzey morfolojileri 1000x-2500x büyütme oranlarında incelendi. Hidrojellerin makro gözenekleri belirlenip gözenek çapları 30 µm ve 34 µm olarak (Şekil 4.3) ölçülmüştür.

Literatürdeki örnekler göz önüne alındığında sentezlenen her iki hidrojelin de yüzey morfolojisinin istenilen seviyede olduğu gözlenmiştir.

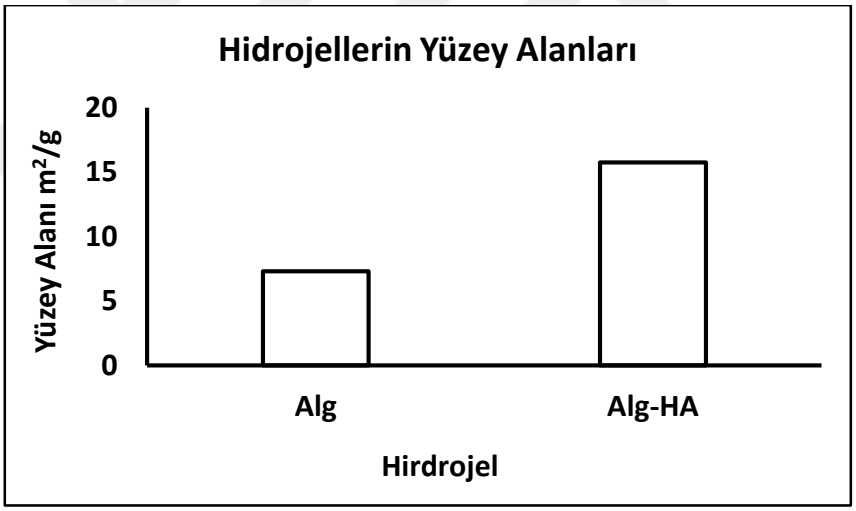


Şekil 4.3 Hidrojellerin SEM görüntüleri. **A** Hümik asit-aljinat içeren hidrojel 1000x büyütme, **B** Hümik asit-aljinat içeren hidrojel 2500x büyütme, **C** Aljinat içeren hidrojel

4.2.2 **Yüzey alanı analizi**

Litaratüre bakıldığında kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) kullanılarak yapılan aljinat hidrojellerin yüzey alanın 40 m^2/g olarak ölçüldüğü görülmüştür [83], [84]. Hidrojelin yüzey alanın büyük olması gözenek büyüklüğü ile ilişkili olmakla beraber yüzey alanı büyük olan hidrojellerin suyu hapsetme kapasitelerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir [85]. Hidrojellerin yapısına farklı komponenetler eklenerek hidrojellerin yüzey alanı artırılabilmektedir [86].

Yüzey alanının belirlenmesi için yapılan BET analizinin sonuçlarına göre; aljinat bazlı hidrojelin yüzey alanı 7.3 m^2/g ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin yüzey alanı 15.7 m^2/g olduğu tespit (Şekil 4.4) edilmiştir. Elden edilen bu sonuçlara göre hümik asit içeren hidrojelin yüzey alanın daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Hümik asidin yüzey alanı %215 arttırdığı tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında hümik asit içeren aljinat hidrojel örnekleri olmadığı tespit edilmiştir.

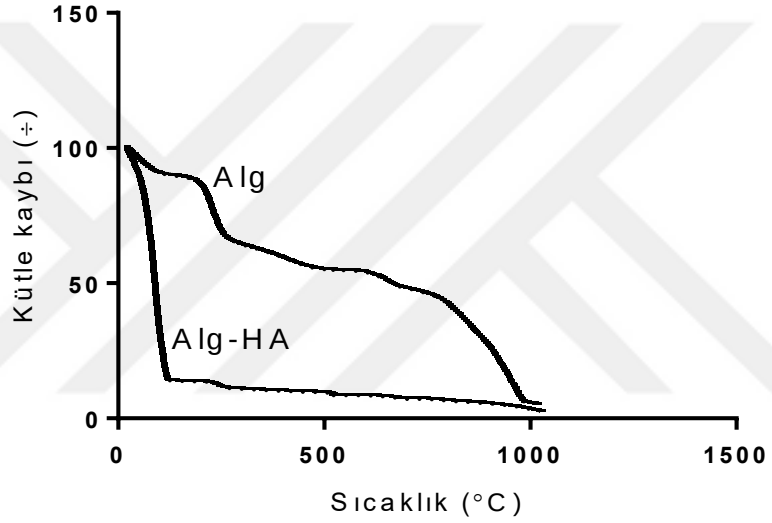


Şekil 4.4 Hümik asit-aljinat bazlı ve aljinat bazlı hidrojelin yüzey alanları

4.2.3 **Termogravimetrik analiz**

Aljinat ve hümik asit katkılı aljinat doku iskelelerinin termal davranışları termal gravimetrik yöntem ile belirlenmiştir. Aljinat doku iskelelerinin yüzdece kütle kaybının dört basamakta, hümik asit içeren aljinat doku iskelelerinin ise yüzdece kütle kaybının ise tek basamakta gerçekleştiği görülmüştür. Aljinat doku iskelelerinin kütle kaybı 184 ˚C'de (% 11,77 kütle kaybı) başlamıştır. Daha sonra 604 (% 46,22 kütle kaybı), 777 (%

54,95 kütle kaybı) ve 988˚C'de (% 94,43 kütle kaybı) kütle kaybı görülmüştür. Hümik asit içeren doku iskeleleri incelendiğinde 61,87 ˚C'de (% 17,1 kütle kaybı), 284,8 ˚C'de (% 88,97 kütle kaybı), 567,6 ˚C'de (% 91,49 kütle kaybı) kütle kaybı görülmüştür (Şekil 4.5). İki doku iskelesinin kütle kaybı birlikte incelendiğinde yaklaşık 61-184 ˚C'de dehidratasyon, daha sonra da dekompozisyon görülmüştür. Hümik asit içeriğinin aljinat polimer zincirlerini daha kompakt bir hale getirdiği ve bu durumun dekompozisyonun daha hızlı ve neredeyse tek basamaklı hale getirdiği görülmüştür[87].Elde edilen sonuçların aksine Gizele Cardoso Fontes ve arkadaşları aljinata penisilin ve nişasta eklemenin dekompozisyon oranını düşürdüğünü belirlemişlerdir[88].

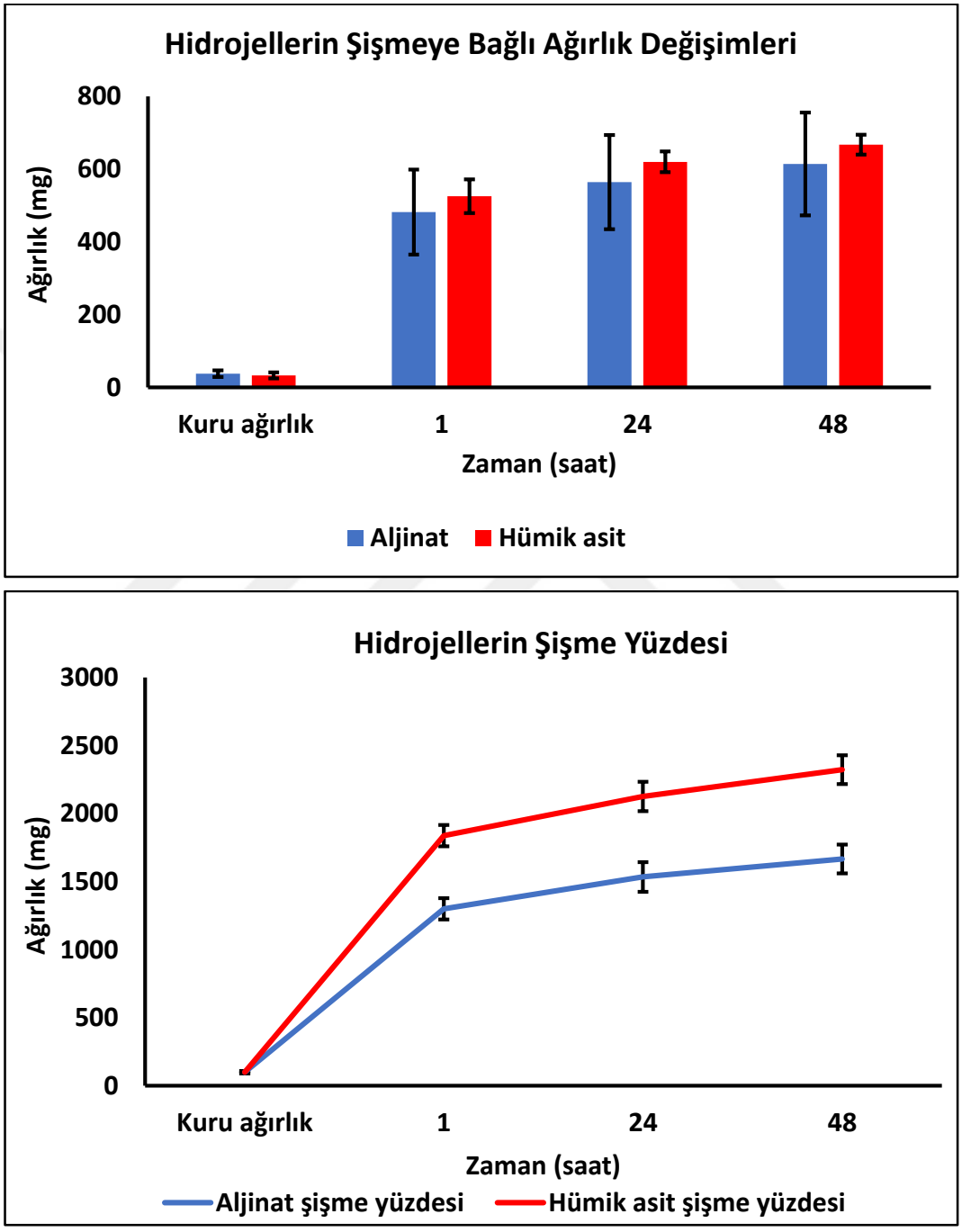


Şekil 4.5 Hidrojellerin sıcaklığa bağlı kütle kaybı grafiği

4.2.4 **Şişme analizi**

Su tutma kapasitesinin yüksek olması bir hidrojelin en önemli özelliklerindendir. Selüloz membranda yapılan bir çalışmaya göre membranın yirmi dört saattede ağırlığının 43 katı su tuttuğu belitilmiştir. Bu tip kendi ağrılığının 60 katından daha fazla su tutabilen malzemeler süper absorbans olarak isimlendirilmektedir [89]. Hidrojellerin suyu tutma kapasiteleri genellikle çapraz bağlanmış moleküllerin yoğunluğuna bağlı olmaktadır. Çapraz bağlanan molekül yoğunluğu fazla olan hidrojeller az miktarda su tutabilirken düşük çapraz bağlanmış molekül yoğunluğuna sahip hidrojeller genellikle fazla miktarda

su tutma kapasitesine sahiptirler [90]. Aljinat gibi çapraz bağlanmış molekülleri yoğun olan hidrojellere çapraz bağlanma özelliği düşük moleküller eklenerek hidrojelin yapısında bulunan çapraz bağlanmış moleküllerin yoğunluğu düşürülebilmekte ve hidrojelin sus tutma kapasitesi artırılabilmektedir [91].



Şekil 4.6 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin şişme yüzdeleri ve ağırlık değişimleri

Aljinat ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojellerin su tutma kapasitelerini ölçmek için şişme analizi yapılmıştır. Şişme analizi beş tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Birinci saatte hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %1837, aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %1300 olarak tespit edilmiştir. Yirmi dördüncü saatte ise hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %2124, aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %1534 olarak tespit edilmiştir. Kırk sekizinci saatte ise hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %2321, aljinat bazlı hidrojelin şişme yüzdesi %1666 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Elde edilen sonuçlara göre hümik aist-aljinat bazlı hidrojel kendi ağırlığının birinci satte 18 katı, yirmi dördüncü saatte 21 ve kırk sekizinci saatte ise 23 katı kadar su tutabildiği belirlenmiştir. Aljinat bazlı hidrojel kendi ağırlığının birinci satte 13 katı, yirmi dördüncü saatte 15 ve kırk sekizinci saatte ise 16 katı kadar su tutabildiği belirlenmiştir. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre birinci saatte 5 kat, yirmi dördüncü saatte 6 kat ve kırk sekizinci saatte 7 kat daha fazla su tutma kapasitesi olduğu gözlenmiştir.

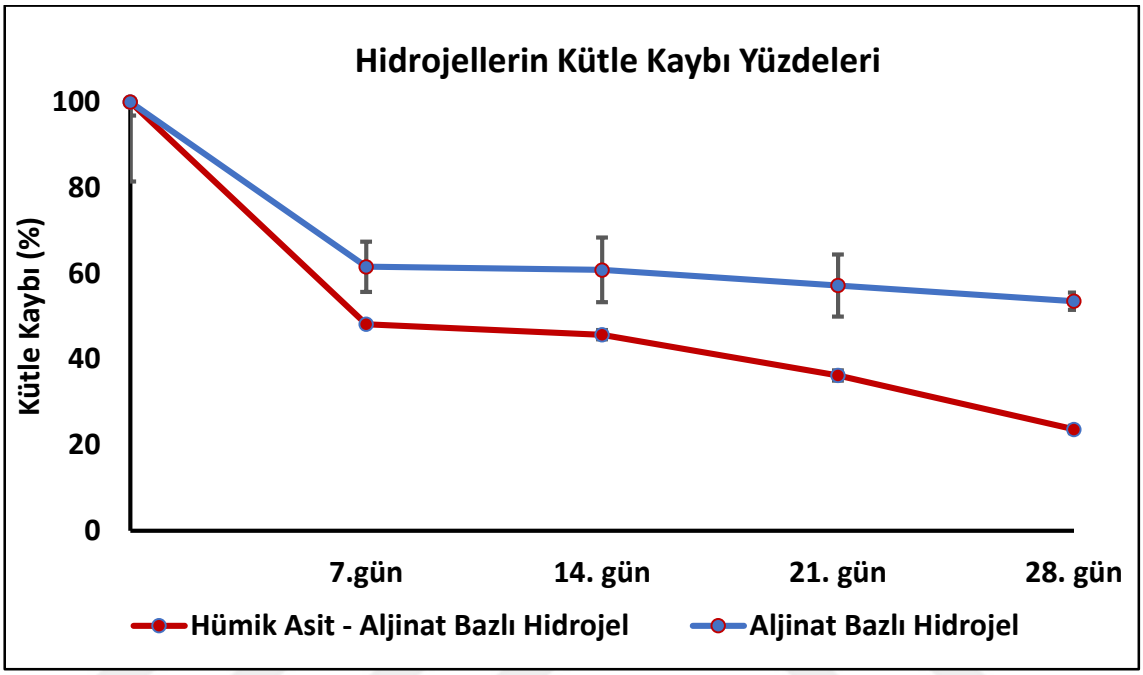
4.2.5 **Biyodegradasyon analizi**

Bir biyomalzemenin biyo-bozunmasının doku formunun sağlıklı bir şekilde oluşabilmesi için çok önemlidir[92]. Işık kullanılarak çapraz bağlanmış çeşitli aljinat hidrojellerin biyo degradasyonlarının 2-5 hafta arası sürdüğü yapılan bir çalışmada belirtilmiştir. Aljinat hidrojellerde içerdikleri başka komponentlere göre biyodegradasyon süresinin değiştiği belirtiştir [93].

Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin biyodegradasyon analizi hidrojellerin kütle kaybının yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Biyodegredasyon analizi 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Biyodegredasyon analizi sonuçlarına göre hümik asit-aljinat içeren hidrojelin birinci hafta kütlesinin %52'sini (standart hata = ± 5,86), ikinci hafta %54'ünü (standart hata = ± 7,56), üçüncü hafta %64'ünü (standart hata = ± 7,26) ve dördüncü hafta %76'sını (standart hata = ± 2,01), kaybettiği gözlenmiştir. Aljinat içeren hidrojelin, birinci hafta kütlesinin %38'ini (standart hata = ± = 0,64), ikinci hafta %39'unu (standart hata = ± 1,06), üçüncü hafta %42'sini (standart hata = ± 1,21) ve dördüncü hafta

%46'sını(standart hata = ± 0,88) kaybettiği gözlenmiştir. Dört haftalık takip boyunca edilen hümik asit-aljinat içeren hidrojelin kütle kaybı aljinat içreren hidrojelinkine göre birinci hafta %14, ikinci hafta %15, üçücü hafta %22 ve dördüncü hafta %30 daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin biyodegradasyonu

4.3 **Hücre kültür çalışmaları**

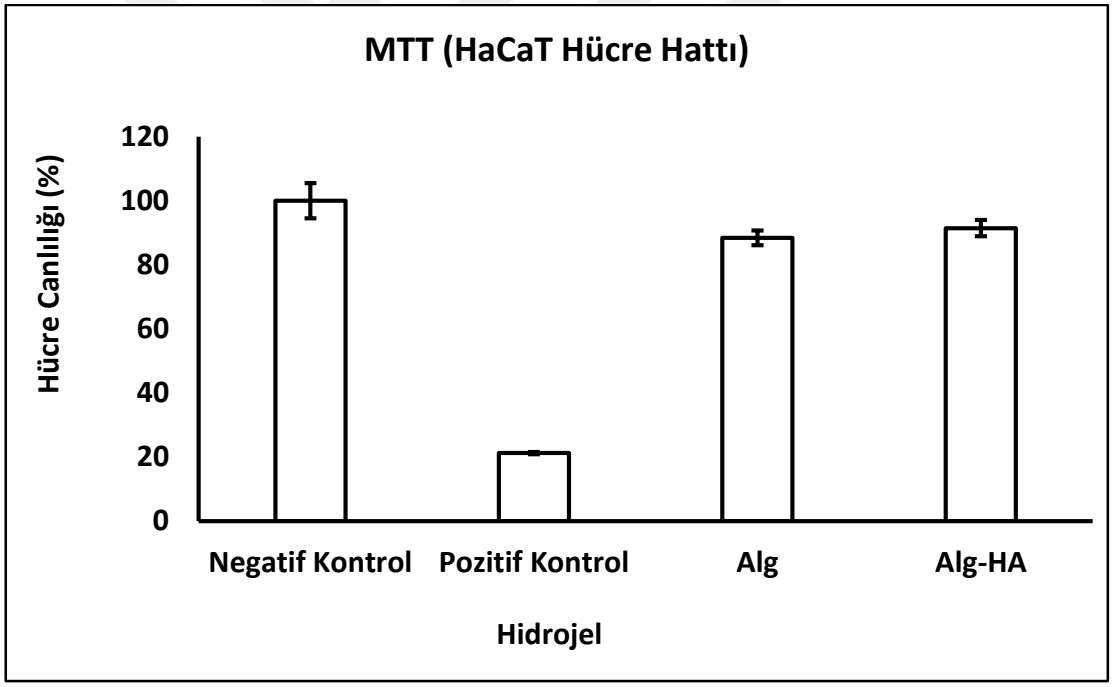
Hücre kültürü çalışmalarında hidrojellerin sitotoksisiteleri, immünotoksisiteleri, kollajen salınımına olan etkileri ve antioksidant kapasiteleri incelenmiştir. Yara örtüsü olarak sentezlenen aljinat bazlı ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojellerin hücre canlılığına olan etkisini belirlemek için MTT ve Nötral Red olmak üzere iki farklı sitotoksisite testi yapılmıştır. Hidrojellerin immünotoksisitesi belirlemek için makrofaj hücreleri üzerinde MTT hücre canlılığı testi yapılmıştır ve pro-enflamatuar sitokinlerin salınım seviyeleri belirlenmiştir. Yara örtü malzemesinin yara iyilişmesindeki kollajen düzenlenmesine olan etkisinin araştırılması için in vitro kollajen salınım modellemesi yapılmıştır. Hümik asidin ve aljinatın antioksidant kapasitelerini belirlenmek amacıyla in vitro oksidatif strese maruz bırakılmış hücreler ile antioksidant kapasite modellemesi yapılmıştır.

4.3.1 **Sitotoksisite çalışmaları**

Hidrojellerin hücre canlılıklarının belirlenmesi amacıyla MTT ve Nötral red sitotoksisite testleri yapılmıştır. Tüm MTT ve Nötral Red testleri sekiz tekrarlı olarak çalışılmıştır.

4.3.1.1 **MTT**

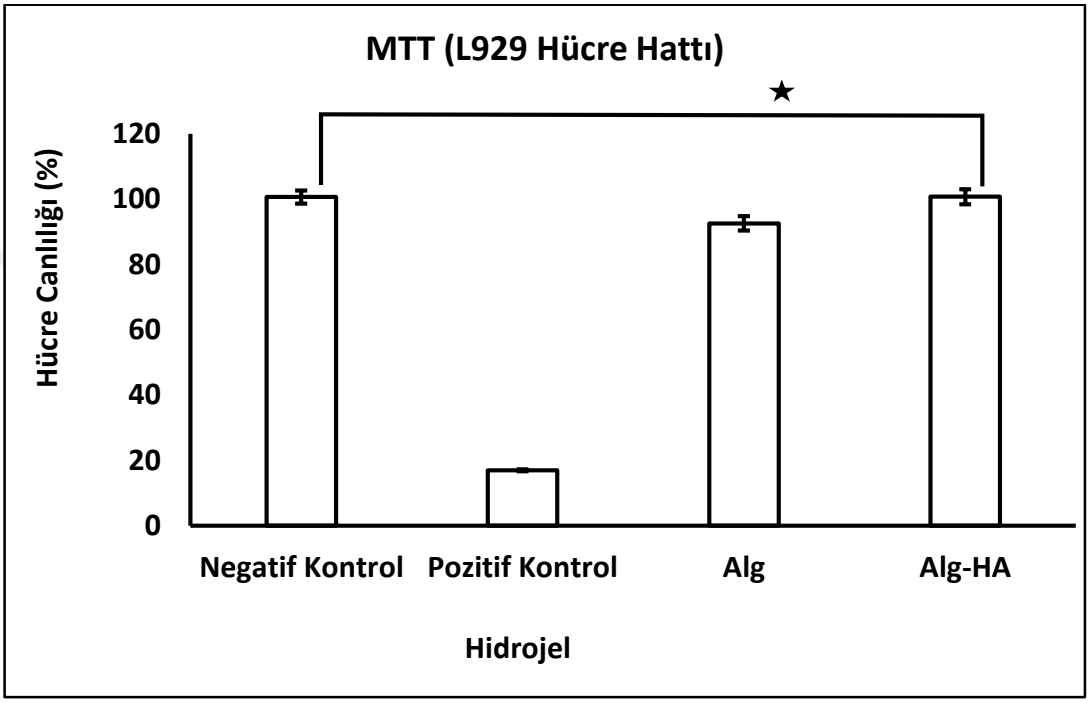
HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan MTT sonuçlarına (Şekil 4.8) göre; hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin hücre canlılığı % 91,46 (standart hata= ± 2,51), aljinat bazlı hidrojelin ise hücre canlılığı % 88,40 (standart hata = ± 2,31) olarak tespit edilmiştir. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre hücre canlılığı % 3,06 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatiksel analizlere (EK A-1) göre negatif kontrol, aljinat ve hümik asit-aljinat içeren grupların hiçbiri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunamamıştır (tüm grupların biri arasındaki p değeri P>0,05).



Şekil 4.8 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin Hacat hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi(MTT)

L929 hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testi sonuçlarına (Şekil 4.9) göre; hümik asit- aljinat bazlı hidrojelin hücre canlılığı % 100,80 (standart hata= ± 2,32), aljinat bazlı hidrojelin ise hücre canlılığı % 92,61 (standart hata = ± 2,19) olarak tespit edilmiştir.

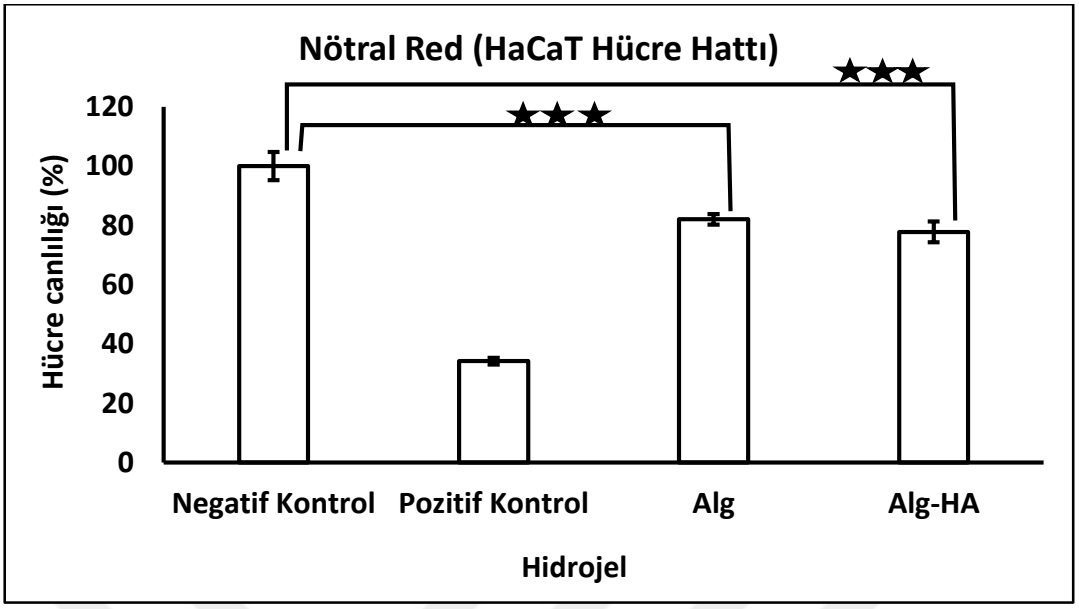
Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre hücre canlılığı % 8,18 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatiksel analizlere (EK A-2) göre negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunamamıştır (P>0,05). Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunamamıştır (P>0,05). Negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (P<0,05).



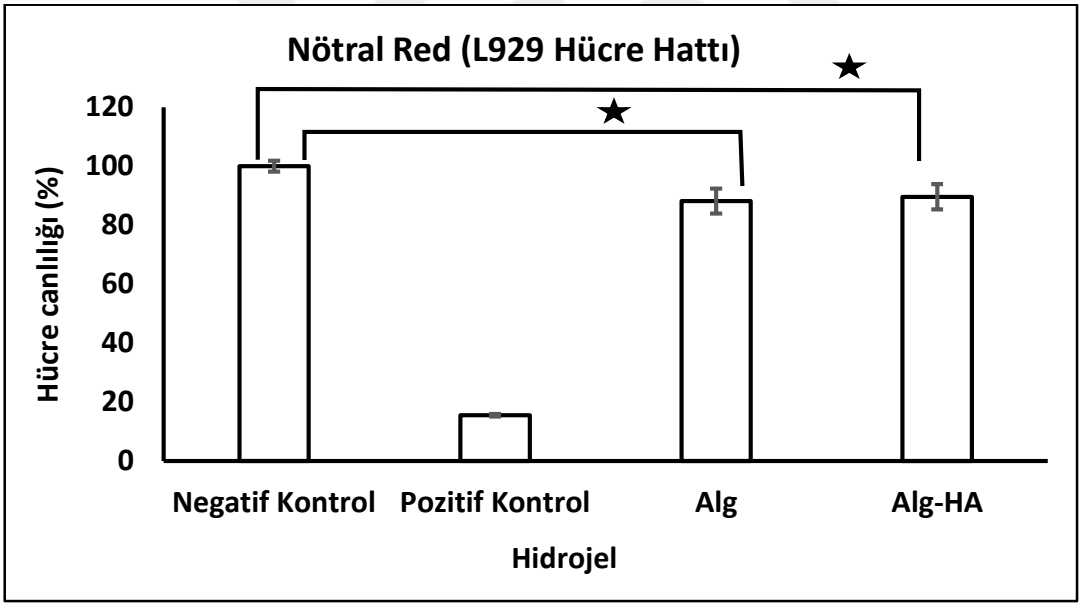
Şekil 4.9 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin L929 hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi(MTT)

4.3.1.2 **Nötral Red**

HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testi sonuçlarına (Şekil 4.10) göre; hümik asit- aljinat bazlı hidrojelin hücre canlılığı % 77,77(standart hata= ± 3,51), aljinat bazlı hidrojelin ise hücre canlılığı % 82,02 (standart hata = ± 1,81) olarak tespit edilmiştir. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre hücre canlılığı % 4,26 daha az olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatiksel analizlere (EK A-3) göre negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (P<0,01). Negatif kontrol ve aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (P<0,01). Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmamıştır (P>0,05).



Şekil 4.10 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin HaCaT hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi (Nötral Red)



Şekil 4.11 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin L929 hücre hattı üzerindeki in-vitro sitotoksisitesi (Nötral Red)

HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testi sonuçlarına (Şekil 4.11) göre; hümik asit- aljinat bazlı hidrojelin hücre canlılığı % 89,62 (standart hata= ± 4,32), aljinat bazlı hidrojelin ise hücre canlılığı % 88,16 (standart hata = ± 4,25) olarak tespit edilmiştir. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre hücre canlılığı %1,46 daha

fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatiksel analizlere (EK A-4) göre negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($P<0,05$). Negatif kontrol ve aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($P<0,05$). Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmamıştır ($P>0,05$).

Literatüre bakıldığında aljinat türevi birçok hidrojel bulunmaktadır. Kitin/kitosan [94], karbosimetil [95] ve düşük kalsiyum iyonlarına sahip[96] aljinat hidrojellerin sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir. NIH3T3 ve HeLa Hücre hattı üzerinde yapılan MTT ve Nötral Red test sonuçlarına göre poliakrilamid-kitosan hidrojellerin sitotoksik etkisi bulunmadığı belirtilmiştir [97]. Hidrojellerle yapılan başka bir çalışmadaki MTT testi sonuçlarına göre Poli(propilen fumarat-ko-etilen glikol) hidrojellerin sitotoksik etkisi bulunmadığı belirtilmiştir[97].N-karboksietil kitosan ve okside dekstran içeren hidrojellerle yapılan başka bir çalışmada da hidrojellerin sitotoksik bir etkisi olmadığı bulunmuştur [98]. Literatürde sonuçlarında gösterdiği gibi hümik asit-aljinat ve aljinat bazlı hidrojellerin sitotoksik etkisi olmadığı bulunmuştur. Sitotoksisite deneylerinde bulunan sonuçların literatürdeki bilgilerle uyumlu olduğu görülmektedir

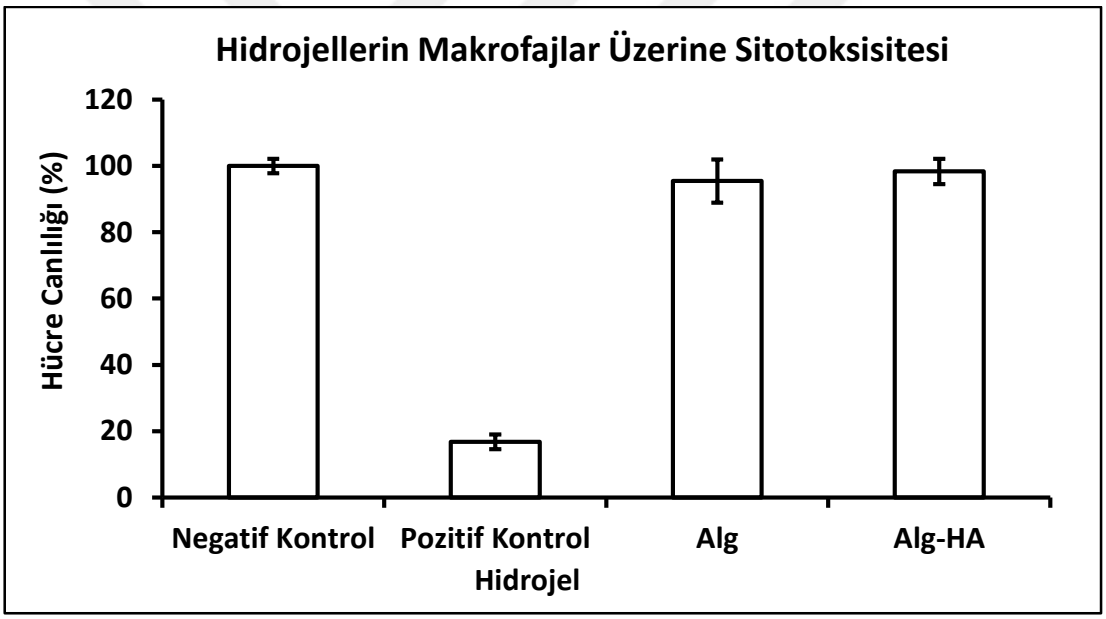
4.3.2 **İmmünotoksisite çalışmaları**

Hümik asit-aljinat ve aljinat hidrojellerin enflamasyona etkisini modellemek için THP-1 hücre hattı makrofaja dönüştürülmüştür. Dönüşüm invert mikroskopta takip edilmiştir. Makroja dönüşen hücreler üzerinde hidrojellerin sitotoksisitesi ve pro-enflamatuar olan IL-1β ve TNFα sentezine olan etkileri elisa kitleri (Sigma, Human Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit ve Thermo Fisher, IL-1 beta Human ELISA Kit) vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Elisa kitleri kullanılarak elde edilen absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri standart (Şekil 4.13 ve çizelge 4.15) grafiklerinden yaralanılarak IL-1β ve TNFα konsantrasyonları belirlenmiştir. Sitotoksite çalışması için makrofajlar üzerinde MTT testi yapılmışıtr.

4.3.2.1 **Makrofaj sitotoksisite çalışmaları**

Makrofaj hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonuçlarına (Şekil 4.11) göre; hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin hücre canlılığı %98,36(standart hata= ± 3,82), aljinat bazlı hidrojelin ise hücre canlılığı % 95,43 (standart hata = ± 6,51) olarak tespit edilmiştir. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin aljinat bazlı hidrojele göre hücre canlılığı % 2,92 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.

Yapılan istatiksel analizlere (EK B-1) göre negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmamıştır (P>0,05). Negatif kontrol ve aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmamıştır(P>0,05). Aljinat ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmamıştır (P>0,05).

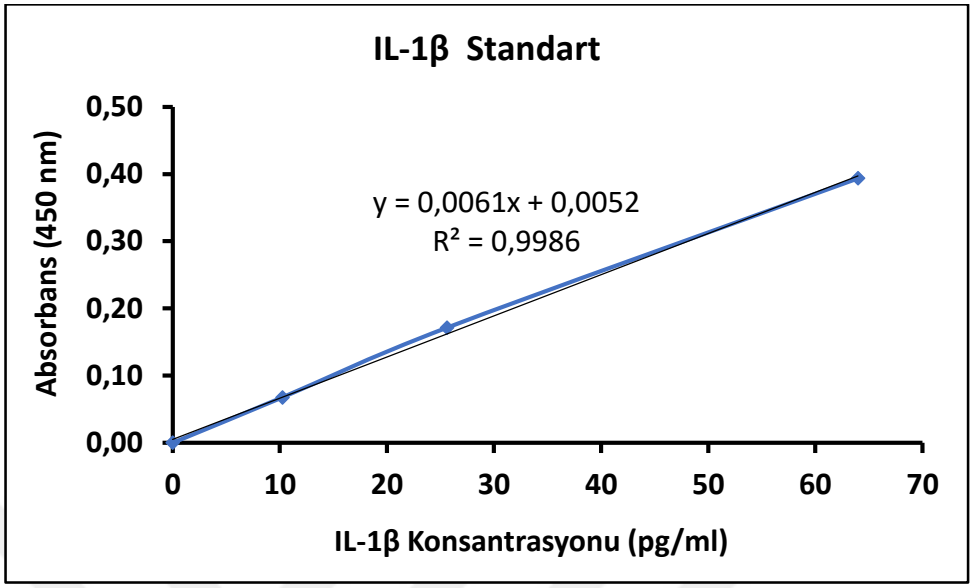


Şekil 4.12 Hümik asit-aljinat ve Aljinat içeren hidrojellerin immünotoksisitesi

4.3.2.2 **İnterlökin-1β salınımı**

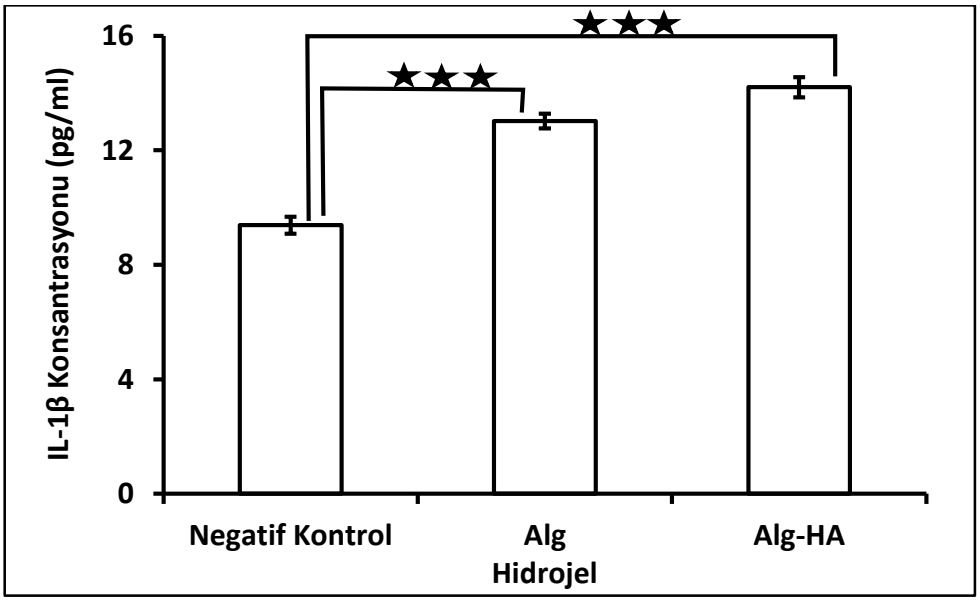
Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, aljinat bazlı hidrojel ve hidrojele maruz bırakılmamış (kontrol grubu) hücre ekstraklarından oluşan üç grubun interlökin-1β konstrasyonları şekil 4.14'deki gibi belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunun interlökin-1β konstrasyonu 9,38 pg/mL (standart hata= ± 0,30), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun grubunun interlökin-1β konstrasyonu 13,02 pg/mL (standart hata= ± 0,26), hümik asit-aljinat bazlı

hidrojel içeren grubun interlökin-1β konstrasyonu 14,20 pg/mL (standart hata= ± 0,35) olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.13 İnterlokin-1β için standart grafiği

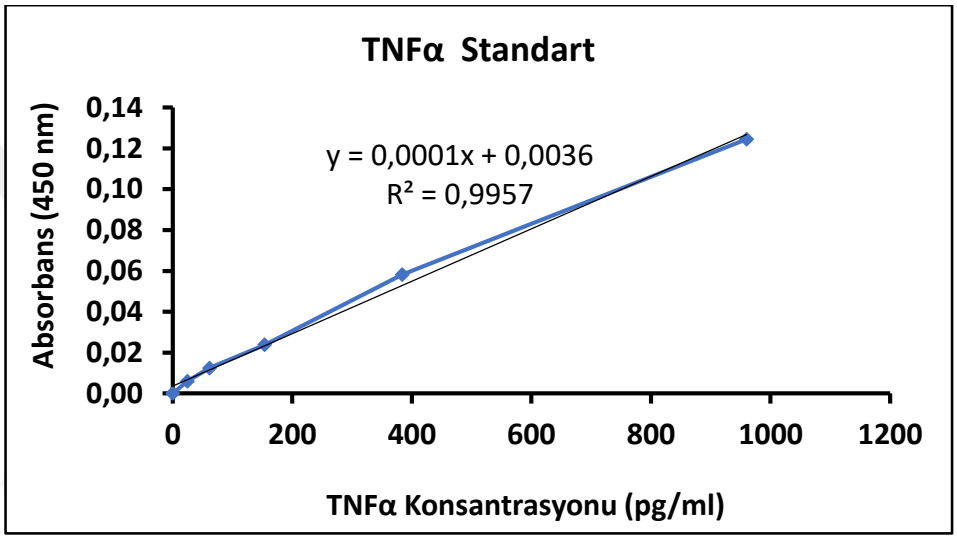
Yapılan istatistiksel analizlere (EK B-2) göre kontrol grubu ve aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında istatistiksel bir fark belirlenmiş olup (P<0,01), aljinat bazlı hidrojelin interlökin-1β salınımını 3,64 pg/mL arttırdığı tespit edilmiştir. Hümik asit–aljinat bazlı hidrojel ve konrol grubu arasında istatistiksel bir fark belirlenmiş olup (P<0,01), hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin interlökin-1β salınımını 4,82 pg/mL arttırdığı tespit edilmiştir.



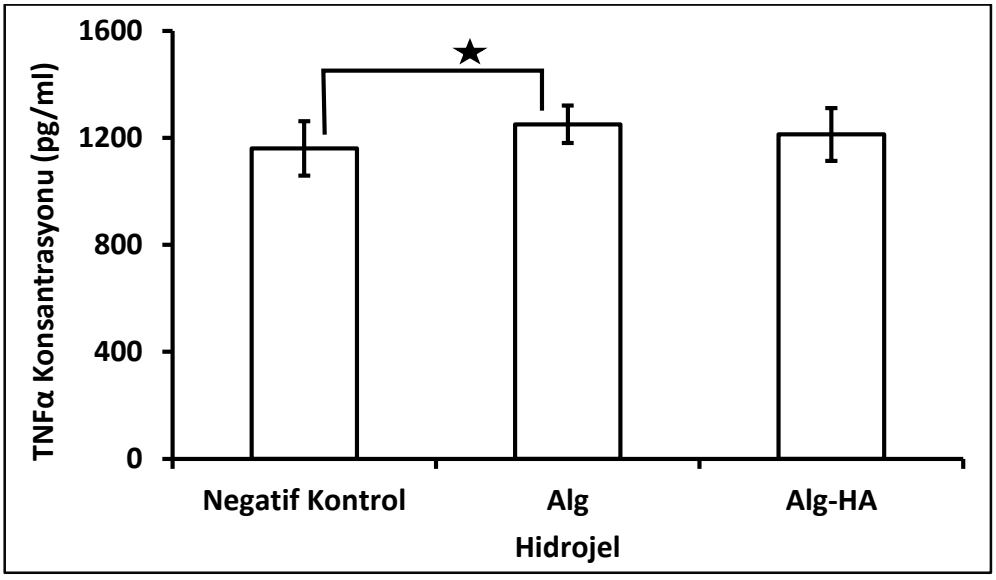
Şekil 4.14 Hidrojellerin İnterlokin-1β sentezine etkisi

4.3.2.3 **Tümör Nekroz Faktörü α salınımı**

Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, aljinat bazlı hidrojel ve hidrojele maruz bırakılmamış (kontrol grubu) hücre ekstraklarından oluşan üç grubun da TNFα konstrasyonları şekil 4.16'deki gibi belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunun TNFα konstrasyonu 1160,50 pg/mL (standart hata= ± 101,88), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun TNFα konstrasyonu 1250,63 pg/mL (standart hata= ± 70,50), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun TNFα konstrasyonu 1212,50 pg/mL (standart hata= ± 98,63) olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.15 TNFα için standart grafiği



Şekil 4.16 Hidrojellerin TNFα sentezine etkisi

Kontrol grubu ve aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında TNFα seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark (P<0,05) bulunmakla beraber aljinat bazlı hidrojelin TNFα salınımını 90,13 pg/mL arttırdığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında TNFα seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamaktadır (P>0,05).

Aljinat hidrojellerle yapılan bir çalışmada [95] aljinat hidrojelin IL-1β seviyesinde artışa neden olurken TNFα seviyesinde bir değişikliğe neden olmadığı belirtilmiş. Literatür tarandığında yara örtü malzemelerinin sitonkin seviyelerine olan etkileriyle ilgili pek fazla makaleye rastlanmamıştır.

4.3.3 **Kollajen salınım çalışmaları**

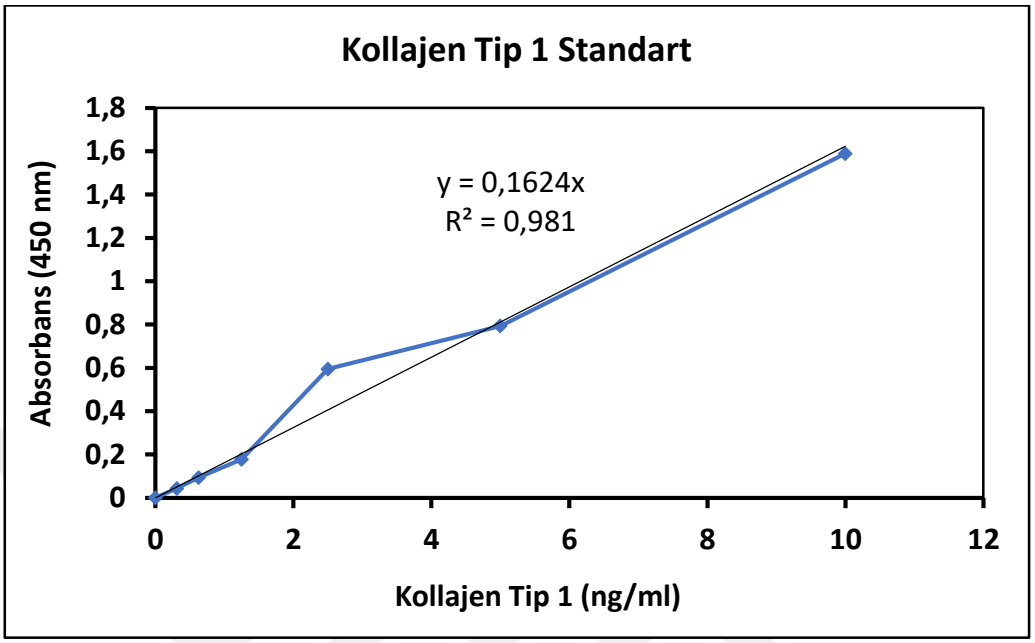
Hümik asit-aljinat ve aljinat hidrojellerin kollajen tip 1 ve kollojen tip 3 sentezine olan etkilerinin değerlendirilmesi için L929 hücre hattı ile çalışılarak elisa kitleri (Mybiosource, Mouse Collagen Type I, Col I ELISA Kit ve Mybiosource, Mouse Collagen Type III, ELISA Kit) kullanılmıştır. Elisa kitleri kullanılarak elde edilen absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri standart (Şekil 4.17 ve çizelge 4.19) grafiklerinden yaralanılarak kollajen tip 1 ve tip 3 konsantrasyonları belirlenmiştir.

4.3.3.1 **Kollejen Tip 1 salınımı**

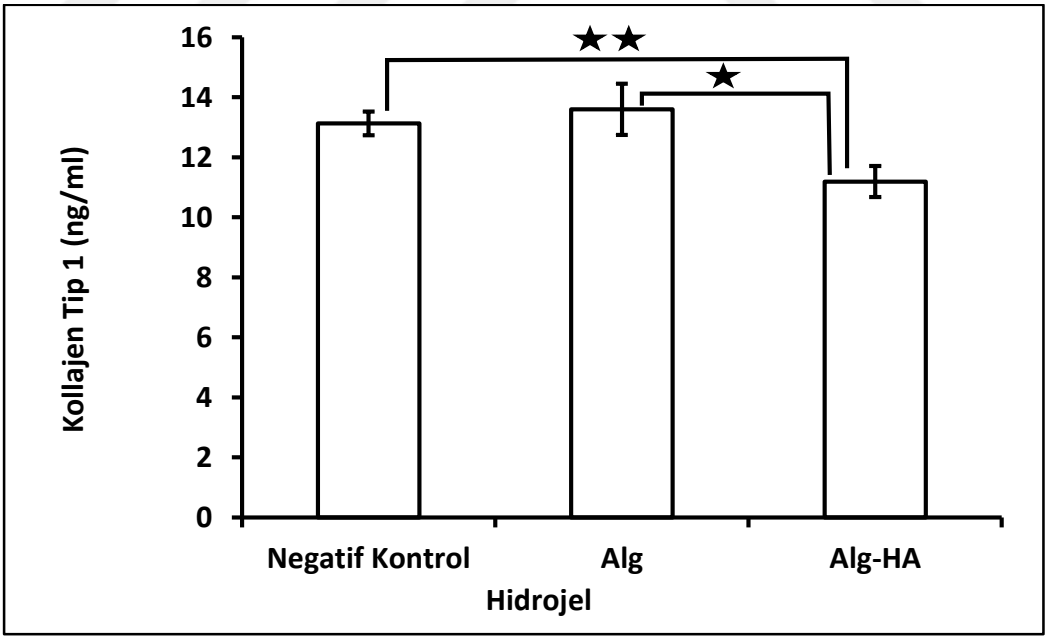
Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, aljinat bazlı hidrojel ve hidrojele maruz bırakılmamış (kontrol grubu) hücre ekstraklarından oluşan üç grubun kollejen tip 1 konstrasyonları Şekil 4.17'daki gibi belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunun kollajen tip 1 konstrasyonu 13,13 ng/mL (standart hata= ± 0,39), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun kollajen tip 1 konstrasyonu 13,59 ng/mL (standart hata= ± 0,85), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun kollajen tip 1 konsantrasyonu 11,19 ng/mL (standart hata= ± 0,52)olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.

Kontrol grubu ve aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında kollajen tip 1 seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0,05). Kontrol grubu ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında kollajen tip

1 seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuş (P≈0,01) olup, hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin kollajen tip 1 salınımını 1,94ng/mL azalttığı tespit edilmiştir.

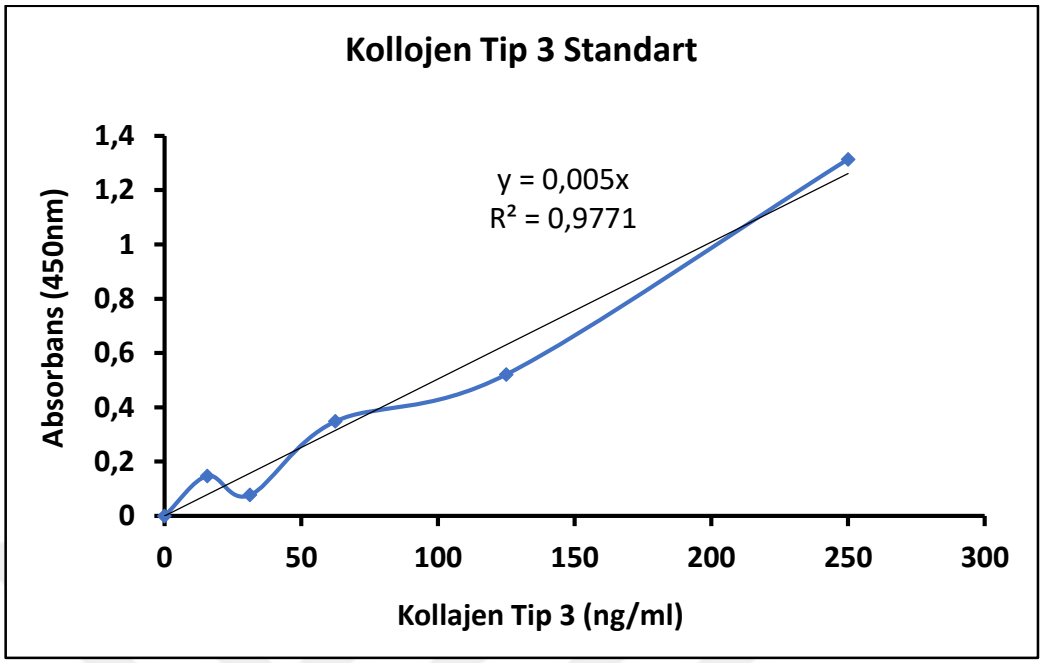


Şekil 4.17Kollajen tip 1 içinstandart grafiği

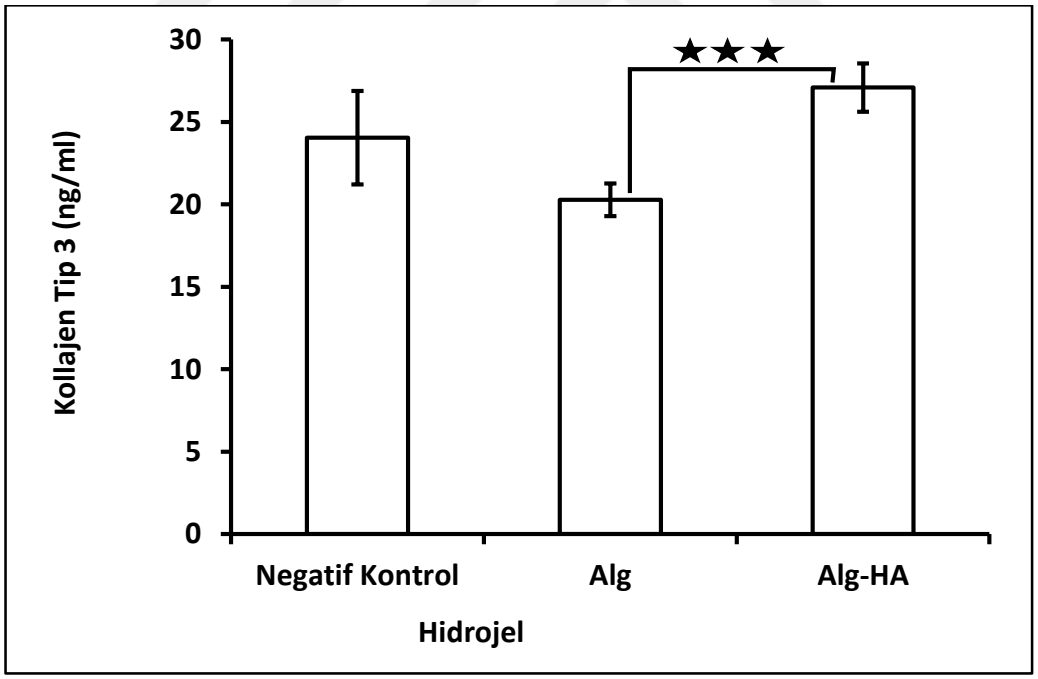


Şekil 4.18 Hidrojellerin kollojen tip 1 sentezine etkisi

4.3.3.2 **Kollajen Tip 3 salınımı**



Şekil 4.19 Kollajen tip 3 için standart grafiği



Şekil 4.20 Hidrojellerin kollojen tip 3 sentezine etkisi

Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, aljinat bazlı hidrojel ve hidrojele maruz bırakılmamış (kontrol grubu) hücre ekstraktlarından oluşan üç grubun kollejen tip 3 konstrasyonları Şekil 4.19'daki gibi belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunun kollajen tip 3 konstrasyonu

24 ng/mL (standart hata= ± 2,84), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun kollajen tip 3 konstrasyonu 20,28 ng/mL (standart hata= ± 0,99), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun kollajen tip 3 konstrasyonu 27,09 ng/mL (standart hata= ± 1,47) olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.

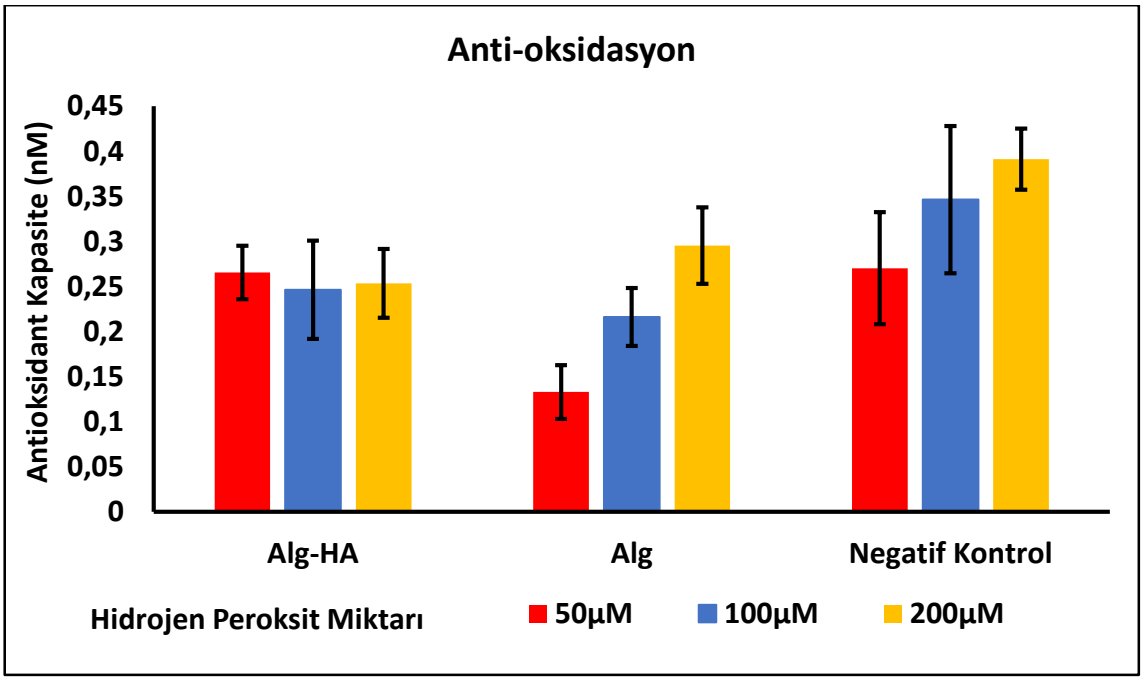
Kontrol grubu ve aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında kollajen tip 3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0,05). Kontrol grubu ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojele maruz bırakılmış örnekler arasında kollajen tip 3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (P>0,05).

4.3.4 **Antioksidant kapasite çalışmaları**

Hümik asit-aljinat ve aljinat hidrojellerin total anti-oksidant kapasitesine olan etkilerinin değerlendirilmesi için 50μM, 100μM ve 200μM H_2O_2 kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılan HaCaT hücre hattı ile çalışılarak TAS kiti(Rel assay, Total Antioxidant Status kit) kullanılmıştır. TAS kiti kullanılarak elde edilen absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden firmanın önerdiği metod kullanılarak anti-oksidant kapasite belirlenmiştir (Şekil 4.21).

Hümik asit-aljinat bazlı hidrojel, aljinat bazlı hidrojel ve hidrojele maruz bırakılmamış (kontrol grubu) hücre ekstraklarından oluşan üç grubun, 50μM, 100 μM ve 200μM H_2O_2 kullanılarak oksidatis stress maruz bırakılan 3 farklı HaCaT hücre hattı grubunun anti oksidant kapasiteleri Şekil 4.20'daki gibi belirlenmiştir. 50μM kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerdeki negatif kontrol grubunun anti-oksidant kapasitesi 0,27 nM (standart hata = ± 0,06), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,13nM (standart hata = ± 0,02), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,27nM (standart hata = ± 0,03), olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol ve ajinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (P<0,05) ve aljinat bazlı hidrojelin anti-oksidant kapasiteyi 0,14 nM azalttığı tespit edilmiştir. Negatif kontrol ve hümik asit-ajinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (P>0,05).

100µM kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerdeki negatif kontrol grubunun anti-oksidant kapasitesi 0,34nM (standart hata = ± 0,08), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,22nM (standart hata = ± 0,03), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,25nM (standart hata = ± 0,05), olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol ve ajinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (P>0,05). Negatif kontrol ve hümik asit-aljinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (P>0,05). Bu çalışma sekiz tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.21 Hidrojellerin antioksidant kapasitesi

200µM kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerdeki negatif kontrol grubunun anti-oksidant kapasitesi 0,39 nM (standart hata = ± 0,03), aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,29nM (standart hata = ± 0,04), hümik asit-aljinat bazlı hidrojel içeren grubun anti-oksidant kapasitesi 0,25nM (standart hata = ± 0,04), olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol ve ajinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (P>0,05). Negatif kontrol ve hümik asit-ajinat içeren hidrojel grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (P<0,05) ve hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin anti-oksidant kapasiteyi 0,14 nM azalttığı tespit edilmiştir.

Hidrojen peroksit konsantrasyonu artıkça negatif kontrol ve aljinat içeren hidrojel grubunda antioksidantların miktarı artmıştır. Bununla birlikte hidrojen peroksit konsantrasyonu arttıkça hümik asit-aljinat içeren hidrojel grubunda antioksidantların miktarlarında anlamlı bir artış görülmemiştir (Şekil 4.21). Bu durum hümik asit-aljinat içeren hidrojel uygulanmış grupta hücrelerin korunması için antioksidantların tükendiğini göstermektedir. Sonuç olarak hümik asit katkısının oksidant-antioksidant dengesinde, hücreleri oksidatif stresden korumak için etkili olduğu anlaşılmıştır.

Hümik asit gibi birçok hümik bileşiğin anti-oksidant etkisi olduğu literatürde belirtilmiştir [99], [100]. Özellikle bitkiler üzerinde yapılan çok sayıdaki araştırmada hümik asidin antioksidant özelliği belirtilmiştir [101], [102]. Hümik bileşiklerin içine bulunan radikal grupları sayesinde H_2O_2 gibi reaktif oksijen türevlerini, zarar hale getirdiği bilinmektedir [103]. Hümik asit-aljinat bazlı hidrojelin anti-oksidant kapasitesiyi arttırarak hücreleri oksidadif stresten koruduğunu gösteren sonuçlarımız literatürdeki bilgilerle uyuşmaktadır.

4.4 **Tartışma**

Hümik asit üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmaları sonucunda, 125 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı % 100 çıkmış ve hücreler için toksik bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında hidrojellerin gözenek boyutlarının literatürdeki örneklerine benzer olduğu tespit edilmiştir. Hümik asidin yüzey alanını arttırdığı BET analizi ile tespit edilmiştir. Yapının termogrevimetrik ve diferansiyel termo analizleri sonucunda da bir yara örtü malzemesi için uygun değerler içerisinde olduğu belirlenmiştir. Hümik asidin şişme ve biyodegredayonu arttığı tespit edilmiştir.

Sentezlenen hidrojellerin her ikisinden L929 ve HaCat hücre hatları üzerinde toksik etki göstermediği iki farklı sitotoksisite testleriyle belirlenmiştir. Aynı şekilde makrofajlar üzerinde yapılan MTT sitotoksisite testinde de hücre canlılığında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Hidrojellerin yara iyileşmesi için önemli olan sitokinlerden İnterlökin-1β salınımını azaltırken TNFα salınımında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur. Hümik asit içeren hidrojel, kollejen tip 1 salınımında azalmaya neden olurken her iki hidrojel de kollajen tip 3 salınımında anlamlı bir değişlikliğe neden olmamıştır. Son olarak hidrojellerin antioksidant kapasiteyi arttığı görülmüştür. Tüm bu

veriler göz önüne alındığında hümik asit-aljinat içeren hidrojelin umut vaad eden bir yara örtü malzemesi olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

[1] Van Langenhove, L., (2007). Smart textiles for medicine and healthcare: materials, systems and applications: Elsevier.

[2] Altay, P. ve Başal, G., (2010). "Yara örtüleri", Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 4: 109-121.

[3] van Middendorp, J.J. Sanchez, G.M. ve Burridge, A.L., (2010). "The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries", Eur Spine J, 19: 1815-1823.

[4] Sezer, A.D. ve Cevher, E., (2011). Biopolymers as wound healing materials: challenges and new strategies, ed. Biomaterials Applications for Nanomedicine. InTech.

[5] Boateng, J.S. Matthews, K.H. Stevens, H.N. ve Eccleston, G.M., (2008). "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review", Journal of pharmaceutical sciences, 97: 2892-2923.

[6] Kurtoğlu, A.H., and Karataş A. (2009 "Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri." Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 38.3): 211-232.

[7] Sood, A. Granick, M.S. ve Tomaselli, N.L., (2014). "Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data", Adv Wound Care (New Rochelle), 3: 511-529.

[8] Hanna, J.R. ve Giacopelli, J.A., (1997). "A review of wound healing and wound dressing products", The Journal of Foot and Ankle Surgery, 36: 2-14.

[9] Kanji, S. ve Das, H., (2017). "Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration", Mediators of Inflammation, 2017.

[10] Sorg, H. Tilkorn, D.J. Hager, S. Hauser, J. ve Mirastschijski, U., (2017). "Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts", European Surgical Research, 58: 81-94.

[11] Wang, P.-H. Huang, B.-S. Horng, H.-C. Yeh, C.-C. ve Chen, Y.-J., (2017). "Wound healing", Journal of the Chinese Medical Association.

[12] Singer, A.J. ve Clark, R.A., (1999). "Cutaneous wound healing", New England journal of medicine, 341: 738-746.

[13] Anderson, J.M., (2013). Inflammation, wound healing, and the foreign-body response, ed. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition. Elsevier Inc.

[14] Singer, A. ve Clark, R., (1999). Mechanisms of Disease: cutaneous wound healing.

[15] Anderson, J.M., (2001). "Biological responses to materials", Annual review of materials research, 31: 81-110.

[16] Sgonc, R. ve Gruber, J., (2013). "Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review", Gerontology, 59: 159-164.

[17] Werner, S. ve Grose, R., (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines", Physiological reviews, 83: 835-870.

[18] JUTILA, M.A., (1992). "Leukocyte traffic to sites of inflammation", Apmis, 100: 191-201.

[19] Kovacs, E.J., (1991). "Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue", Immunology today, 12: 17-23.

[20] Golden, M.A. Au, Y. Kirkman, T.R. Wilcox, J.N. Raines, E.W. Ross, R. ve Clowes, A.W., (1991). "Platelet-derived growth factor activity and mRNA expression in healing vascular grafts in baboons. Association in vivo of platelet-derived growth factor mRNA and protein with cellular proliferation", Journal of Clinical Investigation, 87: 406.

[21] Sporn, M.B. ve Roberts, A.B., (1991). "MINIREVIEW: Interactions of Retinoids and Transforming Growth Factor-β in Regulation of Cell Differentiation and Proliferation", Molecular Endocrinology, 5: 3-7.

[22] Shaw, T.J. ve Martin, P., (2009). "Wound repair at a glance", Journal of cell science, 122: 3209-3213.

[23] Midwood, K.S. Williams, L.V. ve Schwarzbauer, J.E., (2004). "Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 1031-1037.

[24] Sivamani, K. Garcia, M.S. ve Isseroff, R.R., (2007). "Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing", Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 12: 2849-2868.

[25] Suh, W. Kim, K.L. Kim, J.M. Shin, I.S. Lee, Y.S. Lee, J.Y. Jang, H.S. Lee, J.S. Byun, J. ve Choi, J.H., (2005). "Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization", Stem cells, 23: 1571-1578.

[26] Demaria, M. Ohtani, N. Youssef, Sameh A. Rodier, F. Toussaint, W. Mitchell, James R. Laberge, R.-M. Vijg, J. Van Steeg, H. Dollé, Martijn E.T. Hoeijmakers, Jan H.J. de Bruin, A. Hara, E. ve Campisi, J., (2014). "An Essential Role for

Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA", Developmental Cell, 31: 722-733.

[27] Qing, C., (2017). "The molecular biology in wound healing & non-healing wound", Chinese Journal of Traumatology, 20: 189-193.

[28] Leoni, G. Neumann, P. Sumagin, R. Denning, T. ve Nusrat, A., (2015). "Wound repair: role of immune–epithelial interactions", Mucosal immunology, 8: 959-968.

[29] Gensel, J.C. ve Zhang, B., (2015). "Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury", Brain Research, 1619: 1-11.

[30] Clark, R., (2013). The molecular and cellular biology of wound repair: Springer Science & Business Media.

[31] Novak, M.L. ve Koh, T.J., (2013). "Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair", The American journal of pathology, 183: 1352-1363.

[32] Sun, B.K. Siprashvili, Z. ve Khavari, P.A., (2014). "Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds", Science, 346: 941.

[33] Shah, J.M.Y. Omar, E. Pai, D.R. ve Sood, S., (2012). "Cellular events and biomarkers of wound healing", Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 45: 220-228.

[34] Brancato, S.K. ve Albina, J.E., (2011). "Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function", The American journal of pathology, 178: 19-25.

[35] Levenson, S. Geever, E. Crowley, L. Oates III, J. Berard, C. ve Rosen, H., (1965). "Healing of rat skin wounds", Annals of surgery, 161: 293.

[36] Al-Nuaimi, Y. Sherratt, M.J. ve Griffiths, C.E.M., (2014). "Skin health in older age", Maturitas, 79: 256-264.

[37] Rohrich, R.J. ve Broughton, G., (2005). "Wounds and scars", SRPS, 10: 7.

[38] Jayakumar, R. Prabaharan, M. Kumar, P.S. Nair, S. ve Tamura, H., (2011). "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications", Biotechnology advances, 29: 322-337.

[39] Balakrishnan, B. Mohanty, M. Umashankar, P.R. ve Jayakrishnan, A., (2005). "Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin", Biomaterials, 26: 6335-6342.

[40] Choises, W.D., "Yara Örtüsü Seçimi".

[41] Soyaslan, D.D. ve Koyutürk, A., (2016). "Yara ve Yanık Tedavisinde Kullanılan Örtüler". YMehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, (1), 58-65.

[42] Purser, K., (2010). "Wound dressing guidelines", Royal United Hospital Bath NHS Trust, 747: 1-25.

[43] Williams, C., (1996). "Granugel: hydrocolloid gel", British Journal of Nursing, 5: 188-190.

[44] Jones, V. Grey, J.E. ve Harding, K.G., (2006). "ABC of wound healing: Wound dressings", BMJ: British Medical Journal, 332: 777.

[45] George, M. ve Abraham, T.E., (2006). "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review", Journal of controlled release, 114: 1-14.

[46] Williams, C., (1998). "Tegagen alginate dressing for moderate to heavily exuding wounds", British Journal of Nursing, 7: 550-552.

[47] Gulrez, S.K. Al-Assaf, S. ve Phillips, G.O., (2011). Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications, ed. Progress in molecular and environmental bioengineering-from analysis and modeling to technology applications. InTech.

[48] Kamoun, E.A. Kenawy, E.-R.S. ve Chen, X., (2017). "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings", Journal of advanced research.

[49] Patel, A. ve Mequanint, K., (2011). Hydrogel biomaterials, ed. Biomedical engineering-frontiers and challenges. InTech.

[50] Kołodyńska, D. Skiba, A. Górecka, B.e. ve Hubicki, Z., (2016). Hydrogels from Fundaments to Application, ed. Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels. InTech.

[51] Bhatnagar, D. Simon, M. ve Rafailovich, M.H., (2016). Hydrogels for Regenerative Medicine, ed. Recent Advances in Biopolymers. InTech.

[52] Finnegan, S. ve Percival, S.L., (2015). "Clinical and antibiofilm efficacy of antimicrobial hydrogels", Advances in wound care, 4: 398-406.

[53] Sato, R. Noma, R. ve Tokuyama, H., (2015). "Preparation of macroporous poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels using a suspension–gelation method", European Polymer Journal, 66: 91-97.

[54] Sood, A. Granick, M.S. ve Tomaselli, N.L., (2014). "Wound dressings and comparative effectiveness data", Advances in wound care, 3: 511-529.

[55] Niiyama, H. ve Kuroyanagi, Y., (2014). "Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative", Journal of Artificial Organs, 17: 81-87.

[56] Tummalapalli, M. Berthet, M. Verrier, B. Deopura, B. Alam, M. ve Gupta, B., (2016). "Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents", International journal of biological macromolecules, 82: 104-113.

[57] Pereira, G.G. Guterres, S.S. Balducci, A.G. Colombo, P. ve Sonvico, F., (2014). "Polymeric films loaded with vitamin E and Aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds", BioMed research international, 2014.

[58] Gainza, G. Villullas, S. Pedraz, J.L. Hernandez, R.M. ve Igartua, M., (2015). "Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound

healing and skin regeneration", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11: 1551-1573.

[59] Martin, C. Low, W.L. Amin, M.C.I.M. Radecka, I. Raj, P. ve Kenward, K., (2013). "Current trends in the development of wound dressings, biomaterials and devices", Pharmaceutical patent analyst, 2: 341-359.

[60] Ovington, L.G., (2007). "Advances in wound dressings", Clinics in dermatology, 25: 33-38.

[61] Siritientong, T. Angspatt, A. Ratanavaraporn, J. ve Aramwit, P., (2014). "Clinical potential of a silk sericin-releasing bioactive wound dressing for the treatment of split-thickness skin graft donor sites", Pharmaceutical research, 31: 104-116.

[62] Chen, J.-P. ve Chiang, Y., (2010). "Bioactive electrospun silver nanoparticles-containing polyurethane nanofibers as wound dressings", Journal of nanoscience and nanotechnology, 10: 7560-7564.

[63] Schneider, A. Wang, X. Kaplan, D. Garlick, J. ve Egles, C., (2009). "Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing", Acta Biomaterialia, 5: 2570-2578.

[64] Mano, J. Silva, G. Azevedo, H.S. Malafaya, P. Sousa, R. Silva, S.S. Boesel, L. Oliveira, J.M. Santos, T. ve Marques, A., (2007). "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends", Journal of the Royal Society Interface, 4: 999-1030.

[65] Clark, R.A. Ghosh, K. ve Tonnesen, M.G., (2007). "Tissue engineering for cutaneous wounds", Journal of Investigative Dermatology, 127: 1018-1029.

[66] Pourmoussa, A. Gardner, D.J. Johnson, M.B. ve Wong, A.K., (2016). "An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice", Annals of translational medicine, 4.

[67] McMullan, D., (1995). "Scanning electron microscopy 1928–1965", Scanning, 17: 175-185.

[68] Güzel, F. ve Tez, Z., (1987). "B.E.T. Tek nokta ve çok nokta yöntemiyle yüzey alanı belirlemesi", Available at: https://www.researchgate.net/publication/283477800_BET_Tek_Nokta_ve_Cok_Nokta_Yonteniyle_Yuzey_Alani. Accessed.

[69] Gabbott, P., (2008). Principles and applications of thermal analysis: John Wiley & Sons.

[70] Haines, P.J., (2012). Thermal methods of analysis: principles, applications and problems: Springer Science & Business Media.

[71] Gaisford, S. Kett, V. ve Haines, P., (2016). Principles of thermal analysis and calorimetry: Royal society of chemistry.

[72] Espadín, A. Vázquez, N. Tecante, A. Dios, L.T. Gimeno, M. Velasquillo, C. ve Shirai, K., (2014). "Fibroblast viability and inhibitory activity against Pseudomonas aeruginosa in lactic acid–grafted chitosan hydrogels", Journal of Applied Polymer Science, 131.

[73] Weyermann, J. Lochmann, D. ve Zimmer, A., (2005). "A practical note on the use of cytotoxicity assays", International journal of pharmaceutics, 288: 369-376.

[74] Fotakis, G. ve Timbrell, J.A., (2006). "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride", Toxicology letters, 160: 171-177.

[75] Borenfreund, E. Babich, H. ve Martin-Alguacil, N., (1988). "Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests", Toxicology in vitro, 2: 1-6.

[76] Li, H.-H. Lu, F.-J. Hung, H.-C. Liu, G.-Y. Lai, T.-J. ve Lin, C.-L., (2015). "Humic Acid Increases Amyloid β-Induced Cytotoxicity by Induction of ER Stress in Human SK-N-MC Neuronal Cells", International Journal of Molecular Sciences, 16: 10426-10442.

[77] Plewa, M.J. Wagner, E.D. ve Mitch, W.A., (2011). "Comparative Mammalian Cell Cytotoxicity of Water Concentrates from Disinfected Recreational Pools", Environmental Science & Technology, 45: 4159-4165.

[78] Kihara, Y. Yustiawati Tanaka, M. Gumiri, S. Ardianor Hosokawa, T. Tanaka, S. Saito, T. ve Kurasaki, M., (2014). "Mechanism of the toxicity induced by natural humic acid on human vascular endothelial cells", Environmental Toxicology, 29: 916-925.

[79] Shapiro, L. ve Cohen, S., (1997). "Novel alginate sponges for cell culture and transplantation", Biomaterials, 18: 583-590.

[80] Loh, Q.L. ve Choong, C., (2013). "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size", Tissue Engineering Part B: Reviews, 19: 485-502.

[81] Chan, A.W. ve Neufeld, R.J., (2009). "Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials", Biomaterials, 30: 6119-6129.

[82] Tan, H. Chu, C.R. Payne, K.A. ve Marra, K.G., (2009). "Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering", Biomaterials, 30: 2499-2506.

[83] Liu, H. Wang, C. Gao, Q. Liu, X. ve Tong, Z., (2008). "Fabrication of novel core-shell hybrid alginate hydrogel beads", International journal of pharmaceutics, 351: 104-112.

[84] Wang, C. Liu, H. Gao, Q. Liu, X. ve Tong, Z., (2008). "Alginate–calcium carbonate porous microparticle hybrid hydrogels with versatile drug loading capabilities and variable mechanical strengths", Carbohydrate Polymers, 71: 476-480.

[85] Siangsanoh, C. Ummartyotin, S. Sathirakul, K. Rojanapanthu, P. ve Treesuppharat, W., (2018). "Fabrication and characterization of triple-responsive composite hydrogel for targeted and controlled drug delivery system", Journal of Molecular Liquids, 256: 90-99.

[86] Sadhan, C. ve Matthew, P., (2012). "New Antifouling Silica Hydrogel", Langmuir.

[87] Soares, J. Santos, J. Chierice, G. ve Cavalheiro, E., (2004). "Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt", Eclética Química, 29: 57-64.

[88] Fontes, G.C. Calado, V.M.A. Rossi, A.M. ve Rocha-Leão, M.H.M.d., (2013). "Characterization of antibiotic-loaded alginate-OSA starch microbeads produced by ionotropic pregelation", BioMed research international, 2013.

[89] Laçin, N.T., (2014). "Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing", International journal of biological macromolecules, 67: 22-27.

[90] Hoffman, A.S., (2012). "Hydrogels for biomedical applications", Advanced drug delivery reviews, 64: 18-23.

[91] Lee, K.Y. Rowley, J.A. Eiselt, P. Moy, E.M. Bouhadir, K.H. ve Mooney, D.J., (2000). "Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density", Macromolecules, 33: 4291-4294.

[92] Li, Y. Rodrigues, J. ve Tomas, H., (2012). "Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications", Chemical Society Reviews, 41: 2193-2221.

[93] Jeon, O. Bouhadir, K.H. Mansour, J.M. ve Alsberg, E., (2009). "Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties", Biomaterials, 30: 2724-2734.

[94] Murakami, K. Aoki, H. Nakamura, S. Nakamura, S.-i. Takikawa, M. Hanzawa, M. Kishimoto, S. Hattori, H. Tanaka, Y. ve Kiyosawa, T., (2010). "Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings", Biomaterials, 31: 83-90.

[95] Li, X. Kong, X. Zhang, Z. Nan, K. Li, L. Wang, X. ve Chen, H., (2012). "Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N, O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application", International journal of biological macromolecules, 50: 1299-1305.

[96] Suzuki, Y. Nishimura, Y. Tanihara, M. Suzuki, K. Nakamura, T. Shimizu, Y. Yamawaki, Y. ve Kakimaru, Y., (1998). "Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 39: 317-322.

[97] Risbud, M.V. ve Bhonde, R.R., (2000). "Polyacrylamide-chitosan hydrogels: in vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies", Drug Delivery, 7: 69-75.

[98] Weng, L. Romanov, A. Rooney, J. ve Chen, W., (2008). "Non-cytotoxic, in situ gelable hydrogels composed of N-carboxyethyl chitosan and oxidized dextran", Biomaterials, 29: 3905-3913.

[99] Zhang, X. ve Ervin, E., (2004). "Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance", Crop science, 44: 1737-1745.

[100] Aeschbacher, M. Graf, C. Schwarzenbach, R.P. ve Sander, M., (2012). "Antioxidant properties of humic substances", Environmental Science & Technology, 46: 4916-4925.

[101] Ghasemi, K. Bolandnazar, S. Tabatabaei, S. Pirdashti, H. Arzanlou, M. Ebrahimzadeh, M. ve Fathi, H., (2015). "Antioxidant properties of garlic as affected by selenium and humic acid treatments", New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 43: 173-181.

[102] Zhang, X. Ervin, E. ve Schmidt, R., (2003). "Physiological effects of liquid applications of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass", Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 492-496.

[103] Namiki, M., (1988). Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens, ed. Advances in food research. Elsevier, 115-184.

EK-A

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (SİTOTOKSİSİTE)

Deneylerde elde edilen ham veriler exell (Microsoft Office 2016) programı kullanılarak işlenmiştir. Verierin istatiksel hesaplamalarının yapılması amacıyla exell'in veri çözümleme araç takımından yararlanılmıştır. Veri çözümleme araç takımı içinde bulunun tanımlayıcı istatik ve t-testi (eşit varyanslar ve eşit olmayan varyanslar) araçları kullanılmıştır. Bu çalışmadaki grafiklerde yer alan veriler ve standart hatalar tanımlayıcı istatik aracı kullanlarak hesaplanmıştır. P değerleri ise t-testi (eşit varyanslar ve eşit olmayan varyanslar) aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

A-1 HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı

Bu bölüm HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabını içermektedir (Çizelge A.1).

Çizelge A.1 HaCaT hücrelerin canlılk yüzdelerini (MTT)hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı

Negatif kontrol		*Pozitif Kontrol*		*Alg*		*Alg-HA*	
Ortalama	100,00	Ortalama	21,24	Ortalama	88,40	Ortalama	91,46
Standart H	5,49	Standart H	0,37	Standart H	2,31	Standart H	2,51
Ortanca	104,43	Ortanca	20,79	Ortanca	86,85	Ortanca	92,75
Kip	#YOK	Kip	21,91	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	12,28	Standart S	0,98	Standart S	5,17	Standart S	6,15
Örnek Var	150,78	Örnek Var	0,96	Örnek Var	26,74	Örnek Var	37,86
Basıklık	-1,61	Basıklık	-1,12	Basıklık	2,22	Basıklık	-0,93
Çarpıklık	-0,72	Çarpıklık	0,62	Çarpıklık	1,52	Çarpıklık	-0,06
Aralık	27,83	Aralık	2,58	Aralık	12,58	Aralık	15,96
En Büyük	82,83	En Büyük	20,22	En Büyük	84,38	En Büyük	84,16
En Küçük	110,67	En Küçük	22,81	En Küçük	96,97	En Küçük	100,11
Toplam	500,00	Toplam	148,65	Toplam	442,02	Toplam	548,76
Say	5,00	Say	7,00	Say	5,00	Say	6,00
Güvenirlik	15,25	Güvenirlik	0,90	Güvenirlik	6,42	Güvenirlik	6,46
Negatif kontrol		*Pozitif Kontrol*		*Alg*		*Alg-HA*	

Çizelge A.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (HaCaT MTT)

	Negatif kontrol		*Pozitif Kontrol*		*Alg*		*Alg-HA*	
V^2	22733,95		0,91		715,11		1433,68	
Fhesap			24912,98		31,79		15,86	
						2,00		
Ftablo	9,20							

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge A.2) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge A.2) exell içindeki Fters (Çizelge A.2) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge A.3 t-testi sonuçları (HaCaT MTT)

*Negatif-pozitif kontrol ****		
Ortalama	100,00	21,24
Varyans	150,78	0,96
Gözlem	5,00	7,00
Öngörüler	0,00	
df	4,00	
t Stat	14,31	
P(T<=t) te	0,00	
t Kritik tek	2,13	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-	2,78	

negatif kontrol-alg		
Ortalama	100,00	88,40
Varyans	150,78	26,74
Gözlem	5,00	5,00
Öngörüler	0,00	
df	5,00	
t Stat	1,95	
P(T<=t) te	0,05	
t Kritik tek	2,02	
P(T<=t) iki	0,11	
t Kritik iki-	2,57	

Al-AlHA		
Ortalama	88,40	91,46
Varyans	26,74	37,86
Gözlem	5,00	6,00
Birikimli V	32,92	
Öngörüler	0,00	
df	9,00	
t Stat	-0,88	
P(T<=t) te	0,20	
t Kritik tek	1,83	
P(T<=t) iki	0,40	
t Kritik iki-	2,26	

Negatif kontrol-algHA		
Ortalama	100,00	91,46
Varyans	150,78	37,86
Gözlem	5,00	6,00
Öngörüler	0,00	
df	6,00	
t Stat	1,41	
P(T<=t) te	0,10	
t Kritik tek	1,94	
P(T<=t) iki	0,21	
t Kritik iki-	2,45	

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge A.3). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge A.3).

A-2 L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı

Bu bölüm L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabını içermektedir (Çizelge A.4).

Çizelge A.4 L929 hücrelerin canlılk yüzdelerini (MTT) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı

Negatif kontrol		*Pozitif Kontrol*		*Alg*		*Alg-HA*	
Ortalama	100,68	Ortalama	16,95	Ortalama	92,61	Ortalama	100,80
Standart H	2,04	Standart H	0,29	Standart H	2,19	Standart H	2,32
Ortanca	100,91	Ortanca	16,70	Ortanca	90,91	Ortanca	99,77
Kip	#YOK	Kip	16,70	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	4,57	Standart S	0,72	Standart S	4,89	Standart S	4,02
Örnek Var	20,87	Örnek Var	0,52	Örnek Var	23,93	Örnek Var	16,15
Basıklık	1,50	Basıklık	2,95	Basıklık	-1,13	Basıklık	#SAYI/0!
Çarpıklık	0,23	Çarpıklık	1,62	Çarpıklık	0,81	Çarpıklık	1,07
Aralık	12,73	Aralık	2,05	Aralık	11,36	Aralık	7,84
En Büyük	94,55	En Büyük	16,25	En Büyük	88,30	En Büyük	97,39
En Küçük	107,27	En Küçük	18,30	En Küçük	99,66	En Küçük	105,23
Toplam	503,41	Toplam	101,70	Toplam	463,07	Toplam	302,39
Say	5,00	Say	6,00	Say	5,00	Say	3,00
Güvenirlik	5,67	Güvenirlik	0,76	Güvenirlik	6,07	Güvenirlik	9,98

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge A.5) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge A.5) exell içindeki Fters (Çizelge A.5) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge A.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (L929 MTT)

	Negatif kontrol	*Pozitif Kontrol*	*Alg*	*Alg-HA*
V^2	435,46	0,27	572,87	260,97
Fhesap		1618,64	1,32	1,67
			2,20	
Ftablo	39,33			

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge A.6). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge A.6).

Çizelge A.6 T-testi sonuçları (L929 MTT)

*N. Kontrol-P.kontrol ****		
Ortalama	100,68	16,95
Varyans	20,87	0,52
Gözlem	5,00	6,00
Öngörüler	0,00	
df	4,00	
t Stat	40,57	
P(T<=t) te	0,00	
t Kritik tek	2,13	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-	2,78	

*N.kontrol-Alg **		
Ortalama	100,68	92,61
Varyans	20,87	23,93
Gözlem	5,00	5,00
Birikimli V	22,40	
Öngörüler	0,00	
df	8,00	
t Stat	2,70	
P(T<=t) te	0,01	
t Kritik tek	1,86	
P(T<=t) iki	0,03	
t Kritik iki-	2,31	

*Alg-AlgHA **		
Ortalama	92,61	100,80
Varyans	23,93	16,15
Gözlem	5,00	3,00
Birikimli V	21,34	
Öngörüler	0,00	
df	6,00	
t Stat	-2,43	
P(T<=t) te	0,03	
t Kritik tek	1,94	
P(T<=t) iki	0,05	
t Kritik iki-	2,45	

N.kontrol-AlgHA		
Ortalama	100,68	100,80
Varyans	20,87	16,15
Gözlem	5,00	3,00
Birikimli V	19,30	
Öngörüler	0,00	
df	6,00	
t Stat	-0,04	
P(T<=t) te	0,49	
t Kritik tek	1,94	
P(T<=t) iki	0,97	
t Kritik iki-	2,45	

A-3 HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabı

Bu bölüm HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabını içermektedir (Çizelge A.7).

Çizelge A.7 HaCaT hücrelerin canlılk yüzdelerini (Nötral Red) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı

N.kontrol		*P. Kontrol*		*Alg-HA*		*Alg*	
Ortalama	99,99	Ortalama	34,21	Ortalama	77,77	Ortalama	82,03
Standart H	4,79	Standart H	1,15	Standart H	3,51	Standart H	1,81
Ortanca	103,57	Ortanca	33,89	Ortanca	71,38	Ortanca	82,28
Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	13,55	Standart S	3,24	Standart S	9,29	Standart S	5,13
Örnek Var	183,65	Örnek Var	10,49	Örnek Var	86,29	Örnek Var	26,34
Basıklık	2,51	Basıklık	0,73	Basıklık	-2,07	Basıklık	1,30
Çarpıklık	-1,41	Çarpıklık	1,03	Çarpıklık	0,58	Çarpıklık	0,88
Aralık	43,75	Aralık	9,68	Aralık	20,95	Aralık	16,48
En Büyük	71,53	En Büyük	30,75	En Büyük	69,60	En Büyük	75,59
En Küçük	115,27	En Küçük	40,43	En Küçük	90,55	En Küçük	92,07
Toplam	799,94	Toplam	273,66	Toplam	544,38	Toplam	656,22
Say	8,00	Say	8,00	Say	7,00	Say	8,00
Güvenirlik	11,33	Güvenirlik	2,71	Güvenirlik	8,59	Güvenirlik	4,29

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge A.8) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge A.8) excel içindeki Fters (Çizelge A.8) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanslara göre yapılmıştır.

Çizelge A.8 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (HaCaT Nötral Red)

	N.kontrol		P. Kontrol		Alg-HA		Alg
V^2	33726,61		110,03		7445,68		693,76
Fhesap			306,51		4,53		48,61
						10,73	
Ftablo	4,99						

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge A.9). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge A.9).

Çizelge A.9 t-testi sonuçları (HaCaT Nötral Red)

N.kontrol-P.kontrol ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	34,21
Varyans	183,65	10,49
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	8,00	
t Stat	13,35	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,86	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,31	

N.kontrol-Alg ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	82,03
Varyans	183,65	26,34
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli Va	104,99	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	3,51	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,14	

N.kontrol-AlgHA***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	77,77
Varyans	183,65	73,96
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	12,00	
t Stat	3,92	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,78	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,18	

Alg-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	82,03	77,77
Varyans	26,34	73,96
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	11,00	
t Stat	1,20	
P(T<=t) tel	0,13	
t Kritik tek	1,80	
P(T<=t) iki	0,25	
t Kritik iki-ı	2,20	

A-4 L929 hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabı

Bu bölüm L929 hücre hattı üzerinde yapılan Nötral Red testinin istatiksel hesabını içermektedir (Çizelge A.10).

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge A.11) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge A.11) exell içindeki Fters (Çizelge A.11) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge A.10 L929 hücrelerin canlılk yüzdelerini (Nötral Red) hesaplamak için kullanılan tanımlayacı istatistik aracı

N.kontrol		*P.Kontrol*		*Alg-Ha*		*Alg*	
Ortalama	99,99	Ortalama	15,52	Ortalama	89,62	Ortalama	88,16
Standart H	1,81	Standart H	0,42	Standart H	4,32	Standart H	4,25
Ortanca	101,20	Ortanca	15,63	Ortanca	93,64	Ortanca	91,07
Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	4,80	Standart S	1,20	Standart S	11,44	Standart S	11,23
Örnek Var	23,00	Örnek Var	1,43	Örnek Var	130,84	Örnek Var	126,21
Basıklık	-1,81	Basıklık	0,05	Basıklık	-0,47	Basıklık	-0,42
Çarpıklık	-0,45	Çarpıklık	-0,83	Çarpıklık	-0,04	Çarpıklık	-0,97
Aralık	11,70	Aralık	3,45	Aralık	34,19	Aralık	29,41
En Büyük	93,28	En Büyük	13,31	En Büyük	72,66	En Büyük	69,24
En Küçük	104,98	En Küçük	16,76	En Küçük	106,85	En Küçük	98,66
Toplam	699,95	Toplam	124,16	Toplam	627,32	Toplam	617,09
Say	7,00	Say	8,00	Say	7,00	Say	7,00
Güvenirlik	4,44	Güvenirlik	1,00	Güvenirlik	10,58	Güvenirlik	10,39

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge A.12). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge A.12).

Çizelge A.11 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (L929 Nötral Red)

	N.kontrol		*P.Kontrol*		*Alg-Ha*		*Alg*	
V^2		528,98		2,04		17120,23		15928,10
Fhesap				259,08		32,36		30,11
							1,07	
Ftablo	4,99							

Çizelge A.12 t-testi sonuçları (L929 Nötral Red)

N.kontrol-P.kontrol ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	15,52
Varyans	19,71	1,43
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	8,00	
t Stat	51,96	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,86	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,31	

N.kontrol-Alg **		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	88,16
Varyans	19,71	108,18
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	9,00	
t Stat	2,96	
P(T<=t) tel	0,01	
t Kritik tek	1,83	
P(T<=t) iki	0,02	
t Kritik iki-ı	2,26	

N.kontrol-AlgHA *		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	99,99	89,62
Varyans	19,71	112,15
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	9,00	
t Stat	2,56	
P(T<=t) tel	0,02	
t Kritik tek	1,83	
P(T<=t) iki	0,03	
t Kritik iki-ı	2,26	

Alg-ALlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	88,16	89,62
Varyans	108,18	112,15
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-0,28	
P(T<=t) tel	0,39	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,78	
t Kritik iki-ı	2,14	

EK-B

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (İMMÜNOTOKSİSİTE)

B-1 Makrofaj hücreleri üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabı

Bu bölüm makrofaj hücreleri üzerinde yapılan MTT testinin istatiksel hesabını içermektedir (Çizelge B.1).

Çizelge B.1 Makrofaj hücrelerinin canlılık yüzdelerini (MTT) hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

AlgHA		Alg		Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
Ortalama	98,36	Ortalama	95,43	Ortalama	100,01	Ortalama	16,80
Standart H	3,82	Standart H	6,51	Standart H	2,16	Standart H	2,24
Ortanca	95,52	Ortanca	98,40	Ortanca	100,16	Ortanca	17,48
Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	10,79	Standart S	18,42	Standart S	6,12	Standart S	6,33
Örnek Var	116,49	Örnek Var	339,47	Örnek Var	37,49	Örnek Var	40,07
Basıklık	-0,16	Basıklık	-0,66	Basıklık	-0,51	Basıklık	0,80
Çarpıklık	0,60	Çarpıklık	-0,73	Çarpıklık	0,02	Çarpıklık	-0,27
Aralık	32,52	Aralık	47,86	Aralık	18,01	Aralık	21,09
En Büyük	84,66	En Büyük	67,80	En Büyük	91,78	En Büyük	5,55
En Küçük	117,19	En Küçük	115,67	En Küçük	109,79	En Küçük	26,64
Toplam	786,84	Toplam	763,45	Toplam	800,04	Toplam	134,42
Say	8,00	Say	8,00	Say	8,00	Say	8,00
Güvenirlik	9,02	Güvenirlik	15,40	Güvenirlik	5,12	Güvenirlik	5,29

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge B.2) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge B.2) Excel içindeki Fters (Çizelge B.2) işleminden

hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge B.2 Çizelge Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Makrofaj MTT)

	Negatif kontrol		pozitif kontrol		Alg		Alg-ha
V^2	1405,13		1605,38		115238,03		13570,36
Fhesap			1,14		82,01		9,66
						8,49	
Ftablo	4,99						

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge B.3). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge B.3).

Çizelge B.3 t-testi sonuçları (Makrofaj MTT)

Negatif pozitif		
Ortalama	100,01	16,80
Varyans	37,49	40,07
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli Va	38,78	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	26,72	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-u	2,14	

Alg-algha		
Ortalama	95,43	98,36
Varyans	339,47	116,49
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	11,00	
t Stat	-0,39	
P(T<=t) tek	0,35	
t Kritik tek-	1,80	
P(T<=t) iki-	0,71	
t Kritik iki-u	2,20	

Alg-negatif kontrol		
Ortalama	95,43	100,01
Varyans	339,47	37,49
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	9,00	
t Stat	-0,67	
P(T<=t) tel	0,26	
t Kritik tek	1,83	
P(T<=t) iki	0,52	
t Kritik iki-u	2,26	

algha-negatif kontrol		
Ortalama	98,36	100,01
Varyans	116,49	37,49
Gözlem	8,00	8,00
Öngörülen	0,00	
df	11,00	
t Stat	-0,38	
P(T<=t) tek	0,36	
t Kritik tek-	1,80	
P(T<=t) iki-	0,71	
t Kritik iki-u	2,20	

B-2 İnterlökin-1β salınımı

İnterlökin-1β salınım seviyelerinin belirlenmesi ilk önce konstantrasyonları bilinen standartları optik yoğunluk ölçümüne göre standart grafiği çizilmiştir. Standart grafiğinden excel kullanılarak eğim denklemi (Şekil 4.12) elde edilmiştir. Eğim grafiğinden elde edilen formüle kullanılarak eliza reader'da okunan optik yoğunluk değerlerinden örneklerin içindeki IL-1β konstrasyon değerleri elde edilmiştir.

Eğim dekleminden elde edilen IL-1β konstrasyon değerlerinin tanımlayıcı istatistik aracı kullanılarak ortalamalarına ve standart hata değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge B.4).

Çizelge B.4 IL-1β konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

Negatif Kontrol			*Alg*			*AlgHA*	
Ortalama	9,38		Ortalama	13,02		Ortalama	14,20
Standart H	0,30		Standart H	0,26		Standart H	0,35
Ortanca	9,18		Ortanca	13,09		Ortanca	14,21
Kip	#YOK		Kip	#YOK		Kip	#YOK
Standart S	0,84		Standart S	0,72		Standart S	0,99
Örnek Var	0,71		Örnek Var	0,52		Örnek Var	0,99
Basıklık	1,24		Basıklık	-0,29		Basıklık	-1,39
Çarpıklık	0,63		Çarpıklık	-0,38		Çarpıklık	0,21
Aralık	2,85		Aralık	2,20		Aralık	2,61
En Büyük	8,11		En Büyük	11,79		En Büyük	12,98
En Küçük	10,97		En Küçük	13,98		En Küçük	15,59
Toplam	75,05		Toplam	104,18		Toplam	113,61
Say	8,00		Say	8,00		Say	8,00
Güvenirlik	0,71		Güvenirlik	0,60		Güvenirlik	0,83

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge B.5) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge B.5) Excel içindeki Fters (Çizelge B.5) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge B.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (IL-1β)

	Negatif Kontrol			*Alg*			*AlgHA*	
V^2	0,51			0,27			0,97	
Fh				1,86			1,92	
Ft	4,99				3,57			

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge B.6). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge B.6).

Çizelge B.6 t-testi sonuçları (IL-1β)

Negatif Kontrol-Alg ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	9,38	13,02
Varyans	0,71	0,52
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli V	0,62	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-9,27	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,14	

Negatif Kontrol-AlgHA ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	9,38	14,20
Varyans	0,71	0,99
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli V	0,85	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-10,46	
P(T<=t) tel	0,00	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,00	
t Kritik iki-ı	2,14	

Alg-AlgHA **		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	13,02	14,20
Varyans	0,52	0,99
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli V	0,75	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-2,71	
P(T<=t) tel	0,01	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,02	
t Kritik iki-ı	2,14	

B-3 Tümör nekroz faktörü α salınımı

Tümör nekroz faktörü α salınım seviyelerinin belirlenmesi ilk önce konstantrasyonları bilinen standartları optik yoğunluk ölçümüne göre standart grafiği çizilmiştir. Standart grafiğinden excel kullanılarak eğim denklemi (Şekil 4.14) elde edilmiştir. Eğim grafiğinden elde edilen formüle kullanılarak eliza reader'da okunan optik yoğunluk değerlerinden örneklerin içindeki TNFα konstrasyon değerleri elde edilmiştir.

Eğim dekleminden elde edilen TNFα konstrasyon değerlerinin tanımlayıcı istatistik aracı kullanılarak ortalamalarına ve standart hata değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge B.7).

Çizelge B.7 TNFα konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

Negatif Kontrol			Alg			AlgHA	
Ortalama	1160,50		Ortalama	1250,63		Ortalama	1212,50
Standart Hata	101,88		Standart Hata	70,50		Standart Hata	98,63
Ortanca	1138,50		Ortanca	1213,50		Ortanca	1239,50
Kip	#YOK		Kip	#YOK		Kip	#YOK
Standart Sapma	288,16		Standart Sapma	199,39		Standart Sapma	278,96
Örnek Varyans	83038,57		Örnek Varyans	39757,41		Örnek Varyans	77816,00
Basıklık	2,44		Basıklık	-1,56		Basıklık	2,52
Çarpıklık	1,39		Çarpıklık	0,34		Çarpıklık	-1,26
Aralık	887,00		Aralık	522,00		Aralık	922,00
En Büyük	879,00		En Büyük	1007,00		En Büyük	632,00
En Küçük	1766,00		En Küçük	1529,00		En Küçük	1554,00
Toplam	9284,00		Toplam	10005,00		Toplam	9700,00
Say	8,00		Say	8,00		Say	8,00
Güvenirlik Düzey	240,91		Güvenirlik Düzey	166,70		Güvenirlik Düzey	233,21

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge B.8) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge B.8) Excel içindeki Fters (Çizelge B.8) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge B.8 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (TNFα)

	Negatif Kontrol			Alg			AlgHA
V^2	6895404344,90			1580651706,70			6055329856,00
Fh				0,23			0,88
Ft	4,99					3,83	

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge B.9). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge B.9).

Çizelge B.9 t-testi sonuçları (TNFα)

Negatif Kontrol-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	1160,50	1212,50
Varyans	83038,57	77816,00
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli Va	80427,29	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-0,37	
P(T<=t) tel	0,36	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,72	
t Kritik iki-t	2,14	

Negatif Kontrol-Alg *		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	1160,50	1250,63
Varyans	83038,57	39757,41
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli Va	61397,99	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	-0,73	
P(T<=t) tel	0,24	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,48	
t Kritik iki-t	2,14	

Alg-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	1250,63	1212,50
Varyans	39757,41	77816,00
Gözlem	8,00	8,00
Birikimli Va	58786,71	
Öngörülen	0,00	
df	14,00	
t Stat	0,31	
P(T<=t) tel	0,38	
t Kritik tek	1,76	
P(T<=t) iki	0,76	
t Kritik iki-t	2,14	

EK-C

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (KOLLAJEN SALINIMI)

C-1 Kollajen tip 1 salınımı

Kollajen tip 1 salınım seviyelerinin belirlenmesi ilk önce konstantrasyonları bilinen standartları optik yoğunluk ölçümüne göre standart grafiği çizilmiştir. Standart grafiğinden excel kullanılarak eğim denklemi (Şekil 4.16) elde edilmiştir. Eğim grafiğinden elde edilen formüle kullanılarak eliza reader'da okunan optik yoğunluk değerlerinden örneklerin içindeki kollajen tip 1 konstrasyon değerleri elde edilmiştir.

Eğim dekleminden elde edilen kollajen tip 1 konstrasyon değerlerinin tanımlayıcı istatistik aracı kullanılarak ortalamalarına ve standart hata değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge C.1).

Çizelge C.1 Kollajen tip 1 konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

HA		*Alg*		*Neg*	
Ortalama	11,19	Ortalama	13,60	Ortalama	13,13
Standart H	0,52	Standart H	0,85	Standart H	0,40
Ortanca	10,71	Ortanca	13,16	Ortanca	12,85
Kip	10,71	Kip	11,98	Kip	12,13
Standart S	1,46	Standart S	2,40	Standart S	1,12
Örnek Var	2,14	Örnek Var	5,77	Örnek Var	1,26
Basıklık	2,02	Basıklık	0,87	Basıklık	-2,09
Çarpıklık	1,33	Çarpıklık	1,06	Çarpıklık	0,32
Aralık	4,74	Aralık	7,09	Aralık	2,56
En Büyük	9,44	En Büyük	11,22	En Büyük	12,13
En Küçük	14,18	En Küçük	18,31	En Küçük	14,68
Toplam	89,53	Toplam	108,78	Toplam	105,02
Say	8,00	Say	8,00	Say	8,00
Güvenirlik	1,22	Güvenirlik	2,01	Güvenirlik	0,94

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge C.2) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge C.2) Excel içindeki Fters (Çizelge C.2) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge C.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Kollajen tip 1)

	HA		Alg		Neg	
V^2	4,56		33,26		1,59	
Fhesap	2,88		20,97			
		7,29				
Ftablo	4,99					

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge C.3). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge C.3).

Çizelge C.3 t-testi sonuçları (Kollajen tip 1)

Ha -konrol**			AL-kontrol			Ha-al *		
	Değişken 1	*Değişken 2*		*Değişken 1*	*Değişken 2*		*Değişken 1*	*Değişken 2*
Ortalama	13,13	11,19	Ortalama	13,13	13,60	Ortalama	11,19	13,60
Varyans	1,26	2,14	Varyans	1,26	5,77	Varyans	2,14	5,77
Gözlem	8,00	8,00	Gözlem	8,00	8,00	Gözlem	8,00	8,00
Birikimli V	1,70		Öngörülen	0,00		Öngörülen	0,00	
Öngörülen	0,00		df	10,00		df	12,00	
df	14,00		t Stat	-0,50		t Stat	-2,42	
t Stat	2,97		P(T<=t) tel	0,31		P(T<=t) tel	0,02	
P(T<=t) tel	0,01		t Kritik tek	1,81		t Kritik tek	1,78	
t Kritik tek	1,76		P(T<=t) iki	0,63		P(T<=t) iki	0,03	
P(T<=t) iki	0,01		t Kritik iki-	2,23		t Kritik iki-	2,18	
t Kritik iki-	2,14							

C-2 Kollajen tip 3 salınımı

Kollajen tip 3 salınım seviyelerinin belirlenmesi ilk önce konstantrasyonları bilinen standartları optik yoğunluk ölçümüne göre standart grafiği çizilmiştir. Standart grafiğinden excel kullanılarak eğim denklemi (Şekil 4.18) elde edilmiştir. Eğim

grafiğinden elde edilen formüle kullanılarak eliza reader'da okunan optik yoğunluk değerlerinden örneklerin içindeki kollajen tip 3 konstrasyon değerleri elde edilmiştir.

Eğim dekleminden elde edilen kollajen tip 3 konstrasyon değerlerinin tanımlayıcı istatistik aracı kullanılarak ortalamalarına ve standart hata değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge C.4).

Çizelge C.4 Kollajen tip 3 konstrasyon değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

HA		Alg		Negatif	
Ortalama	27,09	Ortalama	20,28	Ortalama	24,04
Standart H	1,47	Standart H	0,99	Standart H	2,84
Ortanca	27,40	Ortanca	21,54	Ortanca	26,51
Kip	27,40	Kip	21,54	Kip	31,24
Standart S	4,15	Standart S	2,81	Standart S	8,03
Örnek Var	17,19	Örnek Var	7,91	Örnek Var	64,43
Basıklık	4,75	Basıklık	-0,53	Basıklık	-2,33
Çarpıklık	-1,63	Çarpıklık	-0,35	Çarpıklık	-0,26
Aralık	14,86	Aralık	8,66	Aralık	17,52
En Büyük	17,84	En Büyük	15,78	En Büyük	13,72
En Küçük	32,70	En Küçük	24,44	En Küçük	31,24
Toplam	216,72	Toplam	162,26	Toplam	192,34
Say	8,00	Say	8,00	Say	8,00
Güvenirlik	3,47	Güvenirlik	2,35	Güvenirlik	6,71

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge C.5) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge C.5) Excel içindeki Fters (Çizelge C.5) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge C.5 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Kollajen tip 3)

	HA		Alg		Negatif
V^2	295,42		62,63		4151,21
Fhesap	14,05		66,28		
		4,72			
Ftablo	4,99				

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge C.6). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge C.6).

Çizelge C.6 t-testi sonuçları (Kollajen tip 3)

Ha-kontrol		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	24,0425	27,09
Varyans	64,42988	17,18789
Gözlem	8	8
Öngörülen	0	
df	10	
t Stat	-0,95411	
P(T<=t) tel	0,181262	
t Kritik tek	1,812461	
P(T<=t) iki	0,362524	
t Kritik iki-ı	2,228139	

Al-kontrol		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	24,0425	20,2825
Varyans	64,42988	7,913993
Gözlem	8	8
Öngörülen	0	
df	9	
t Stat	1,250351	
P(T<=t) tel	0,121351	
t Kritik tek	1,833113	
P(T<=t) iki	0,242702	
t Kritik iki-ı	2,262157	

Ha-al ***		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	20,2825	27,09
Varyans	7,913993	17,18789
Gözlem	8	8
Birikimli Va	12,55094	
Öngörülen	0	
df	14	
t Stat	-3,84308	
P(T<=t) tel	0,000896	
t Kritik tek	1,76131	
P(T<=t) iki	0,001792	
t Kritik iki-ı	2,144787	

EK-D

İSTATİKSEL HESAPLAMALAR (ANTİOKSİDAN KAPASİTE)

D-1 Antioksidant kapasite

Antioksidan kapasite çalışmalarında kit firmasının önerdiği yöntem ile hesaplamalar yapılmıştır. Eliza reader'dan A1 ve A2 diye kodlanmış iki optik yoğunluk değeri elde edilmiştir. Firmanın önerdiği [(A2-A1 su)-(A2-A1 örnek)]/[(A2-A1 su)-(A2-A1 standart)] formülü ile değerleri hesaplanmıştır. Antioksidant kapasitedeğerlerinin tanımlayıcı istatistik aracı kullanılarak ortalamalarına ve standart hata değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge D.1).

Çizelge D.1 Antioksidant kapasite değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı

QC1		*QC2*		*50m Ha*		*50m Al*		*50m Kontrol*	
Ortalama	0,48	Ortalama	1,92	Ortalama	0,27	Ortalama	0,13	Ortalama	0,27
Standart H	0,02	Standart H	0,02	Standart Hata	0,03	Standart H	0,03	Standart H	0,06
Ortanca	0,47	Ortanca	1,92	Ortanca	0,29	Ortanca	0,12	Ortanca	0,25
Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	0,04	Standart S	0,04	Standart Sapm	0,07	Standart S	0,07	Standart S	0,15
Örnek Var	0,00	Örnek Var	0,00	Örnek Varyans	0,01	Örnek Var	0,01	Örnek Var	0,02
Basıklık	-2,49	Basıklık	-1,38	Basıklık	-1,53	Basıklık	2,87	Basıklık	-1,18
Çarpıklık	0,28	Çarpıklık	-0,24	Çarpıklık	-0,76	Çarpıklık	1,60	Çarpıklık	0,50
Aralık	0,09	Aralık	0,11	Aralık	0,18	Aralık	0,20	Aralık	0,39
En Büyük	0,44	En Büyük	1,86	En Büyük	0,16	En Büyük	0,07	En Büyük	0,11
En Küçük	0,53	En Küçük	1,97	En Küçük	0,34	En Küçük	0,27	En Küçük	0,50
Toplam	2,90	Toplam	11,52	Toplam	1,59	Toplam	0,80	Toplam	1,62
Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00
Güvenirlik	0,04	Güvenirlik	0,04	Güvenirlik Düz	0,08	Güvenirlik	0,08	Güvenirlik	0,16

Çizelge D.1 Antioksidant kapasite değerlerini hesaplamak için kullanılan tanımlayıcı istatistik aracı (devamı)

100m Ha		*100m Al*		*100m Kontrol*		*200m Ha*		*200m Al*		*200m Kontrol*	
Ortalama	0,25	Ortalama	0,22	Ortalama	0,35	Ortalama	#SAYI!	Ortalama	0,30	Ortalama	0,39
Standart H	0,05	Standart H	0,03	Standart H	0,08	Standart H	0,04	Standart H	0,04	Standart H	0,03
Ortanca	0,22	Ortanca	0,22	Ortanca	0,30	Ortanca	0,24	Ortanca	0,27	Ortanca	0,37
Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK	Kip	#YOK
Standart S	0,13	Standart S	0,08	Standart S	0,20	Standart S	0,09	Standart S	0,10	Standart S	0,08
Örnek Var	0,02	Örnek Var	0,01	Örnek Var	0,04	Örnek Var	0,01	Örnek Var	0,01	Örnek Var	0,01
Basıklık	2,23	Basıklık	1,13	Basıklık	-0,96	Basıklık	-1,36	Basıklık	-1,24	Basıklık	-0,99
Çarpıklık	1,42	Çarpıklık	0,25	Çarpıklık	0,51	Çarpıklık	0,15	Çarpıklık	0,65	Çarpıklık	0,60
Aralık	0,36	Aralık	0,24	Aralık	0,54	Aralık	0,25	Aralık	0,27	Aralık	0,22
En Büyük	0,13	En Büyük	0,10	En Büyük	0,11	En Büyük	0,13	En Büyük	0,18	En Büyük	0,30
En Küçük	0,49	En Küçük	0,34	En Küçük	0,64	En Küçük	0,38	En Küçük	0,45	En Küçük	0,52
Toplam	1,48	Toplam	1,30	Toplam	2,08	Toplam	1,52	Toplam	1,77	Toplam	2,35
Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00	Say	6,00
Güvenirlik	0,14	Güvenirlik	0,08	Güvenirlik	0,21	Güvenirlik	0,10	Güvenirlik	0,11	Güvenirlik	0,09

Tanımlayıcı istatik kullanılarak elde edilen verilerden olan örnek varyansın karesi alınmıştır. Örnek varyansların karelerinin oranı Fhesap (Çizelge D.2) değerini vermektedir. Ftablo (Çizelge D.2) Excel içindeki Fters (Çizelge D.2) işleminden hesaplanmıştır. Fhesap değeri Ftablo değerinden büyük ise t-testi eşit olmayan varyanslara göre yapılmıştır. Ftablo değeri Fhesap değerinden büyük ise t-testi eşit varyanlara göre yapılmıştır.

Çizelge D.2 Tanımlayıcı istatiklikle elde edilen verilen değerlendirilmesi (Antioksidant kapasite)

	50m Ha		*50m Al*		*50m Kontrol*		*100m Ha*		*100m Al*	
V^2	2,76918E-05		2,82E-05		0,000538		0,000319		3,85E-05	
Fhesap	19,42238729		19,07276				5,035536		41,68614	
		1,018331						8,278391		
Ftablo	7,146381829						7,146382			

	100m Kontrol		*200m Ha*		*200m Al*		*200m Kontrol*	
V^2	0,00		0,00		0,00		0,00	
Fhesap			1,60		2,46			
				1,54				
Ftablo			7,15					

T-testi sonuçlarına göre P değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.30). P>0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı, P<0,05 ise karşılaştırılan iki grıup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu belirtilmiştir. 0,01<P<0,05 ise (*), P≈0,01 ise (**) ve P<0,01 ise (***) işaretleri kullanılmıştır (Çizelge D.3).

Çizelge D.3 t-testi sonuçları (Antioksidant kapasite)

N.kontrol-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,27	0,27
Varyans	0,02	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Öngörülen	0,00	
df	7,00	
t Stat	0,07	
P(T<=t) tel	0,47	
t Kritik tek	1,89	
P(T<=t) iki	0,95	
t Kritik iki-ı	2,36	

N.kontrol-Alg **		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,27	0,13
Varyans	0,02	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Öngörülen Ort	0,00	
df	7,00	
t Stat	1,99	
P(T<=t) tek-uç	0,04	
t Kritik tek-uçlu	1,89	
P(T<=t) iki-uçlu	0,09	
t Kritik iki-uçlu	2,36	

Alg-AlgHA **		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,13	0,27
Varyans	0,01	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Birikimli Va	0,01	
Öngörülen	0,00	
df	10,00	
t Stat	-3,16	
P(T<=t) tel	0,01	
t Kritik tek	1,81	
P(T<=t) iki	0,01	
t Kritik iki-ı	2,23	

N.kontrol-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,35	0,25
Varyans	0,04	0,02
Gözlem	6,00	6,00
Birikimli Va	0,03	
Öngörülen	0,00	
df	10,00	
t Stat	1,02	
P(T<=t) tel	0,17	
t Kritik tek	1,81	
P(T<=t) iki	0,33	
t Kritik iki-ı	2,23	

N.kontrol-Alg		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,35	0,22
Varyans	0,04	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Öngörülen	0,00	
df	7,00	
t Stat	1,48	
P(T<=t) tel	0,09	
t Kritik tek	1,89	
P(T<=t) iki	0,18	
t Kritik iki-ı	2,36	

Alg-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,25	0,22
Varyans	0,02	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Öngörülen	0,00	
df	8,00	
t Stat	0,48	
P(T<=t) tel	0,32	
t Kritik tek	1,86	
P(T<=t) iki	0,65	
t Kritik iki-ı	2,31	

N.kontrol-AlgHA *		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,39	0,25
Varyans	0,01	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Birikimli Va	0,01	
Öngörülen	0,00	
df	10,00	
t Stat	2,70	
P(T<=t) tel	0,01	
t Kritik tek	1,81	
P(T<=t) iki	0,02	
t Kritik iki-ı	2,23	

N.kontrol-Alg		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,39	0,30
Varyans	0,01	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Birikimli Varya	0,01	
Öngörülen Ort	0,00	
df	10,00	
t Stat	1,77	
P(T<=t) tek-uç	0,05	
t Kritik tek-uçlu	1,81	
P(T<=t) iki-uçlu	0,11	
t Kritik iki-uçlu	2,23	

Alg-AlgHA		
	Değişken 1	*Değişken 2*
Ortalama	0,25	0,30
Varyans	0,01	0,01
Gözlem	6,00	6,00
Birikimli Va	0,01	
Öngörülen	0,00	
df	10,00	
t Stat	-0,73	
P(T<=t) tel	0,24	
t Kritik tek	1,81	
P(T<=t) iki	0,48	
t Kritik iki-ı	2,23	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Volkan YALMAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 27.07.1993, Üsküdar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : volkanyalman@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi	2012

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017-günümüz	Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Merkez Laboratuvarı	Kısmi zamanlı asistan öğrenci

YAYINLARI

Bildiri

1. Senel I., **Yalman V.**, Alkan F., Caliskan Z., (15-21 August 2016). "The synthesis of benzofuranone and indole derivatives and examination of their cytotoxic and anticarcinogenic effects on NIH 3T3 and MCF7 cells ", 28th National Chemistry Congress, Mersin University, p 272: 529

2. **Yalman V.**, Turkoglu L. N., Kaplan E., (23-24 Şubat 2018). " Yara iyileşmesinde skar Doku Oluşumunu Önlemek Üzere Yara Örtü Malzemesi Geliştirilmesi ve In vitro ortamda değerlendirilmesi " 3. Yaşam Bilimleri kongresi, Abdullah Gül Üniversitesi, p 122: 32

Proje

1. **Yalman V.**, Turkoglu L. N., Yara iyileşmesinde skar Doku Oluşumunu Önlemek Üzere Yara Örtü Malzemesi Geliştirilmesi ve In vitro ortamda değerlendirilmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi BAP projesi. FYL-2017-3193. 2017

ÖDÜLLERİ

1. En iyi bilimsel çalışma ödülü, Yara iyileşmesinde skar Doku Oluşumunu Önlemek Üzere Yara Örtü Malzemesi Geliştirilmesi ve In vitro ortamda değerlendirilmesi, 3. Yaşam bilimleri kongresi,23-24 Şubat 2018, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye