

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



PEO/PVA/NANOKİTİN NANOKOMPOZİT HİDROJELLERİNİN
İNSAN DERİ FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDEF KIRDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
 Prof. Dr. Ümit ÇAKIR

BALIKESİR, HAZİRAN - 2022

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**PEO/PVA/Nanokitin Nanokompozit Hidrojellerinin İnsan Deri Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sedef KIRDAR
(imza)

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (2019/114) nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**PEO/PVA/NANOKİTİN NANOKOMPOZİT HİDROJELLERİNİN İNSAN DERİ
FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEDEF KIRDAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2022**

Hidrojeller, yara ortamını nemli tutarak ağrısız kullanım imkânı sağlamaları ve yara iyileşmesi sırasında fibroblast göçünü kolaylaştırmaları sebebiyle özellikle kronik yaralarda tercih edilmektedir. Bu çalışmada yara örtüsü olarak kullanımının araştırılması için, hidrojel yapısındaki; hidrofilik polietilen oksit (PEO) ve polivinil alkol (PVA) polimerleri ve bu polimerlerin %1, %2.5 ve %5 oranlarındaki nanokitinle karıştırılmasıyla elde edilen formlarının insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkileri indirekt ve direkt sitotoksikite yöntemleri kullanılarak MTT ve MTS testleriyle belirlenmiştir. Sitotoksikite sonuçlarına göre; fibroblastlarla indirekt testte 48 saat, direkt testte hem 24 hem de 48 saat inkübe edilen %1, %2.5 ve %5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın yüzde metabolik aktiviteyi negatif kontrole kıyasla anlamlı ölçüde artırdığı ve sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir.

İnsanlarla ortak birçok gen bulunduran ve nanopartikül toksisitesi araştırmalarında sıklıkla kullanılan *Drosophila melanogaster*, toksik ajana maruz kaldığında hem gelişim evresinin hem de nöral hasar sonucu davranış bozukluklarının rahatlıkla takibinin yapıldığı bir model organizmadır. Bu amaçla bu çalışmada *in vitro* test sonuçlarında anlamlı etki gösteren %2.5 kitin ilaveli PEO ve PVA, % 5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın 50 ve 100 µg/mL'lik dozlarının *Oregon-R* suşları üzerindeki toksik etkileri; puparasyon, pupadan çıkma ve canlılık oranından oluşan gelişim testleri, larva sürünme ve yetişkin tırmanma testinden oluşan davranış testleri ile incelenmiştir. Gelişim ve davranış testleri sonuçlarına göre tüm testlerde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azalış gösteren %5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın 100 µg/ mL'lik dozları larva-pupa-yetişkine dönme sayılarının, sürünme testinde larvaların hızının ve tırmanma testinde yetişkin sinek tırmanma sayısının azalmasına sebep olarak *Drosophila melanogaster* üzerinde toksik bir etki oluşturmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Yara örtü malzemesi, sitotoksikite, nanokompozit hidrojel, *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF NANOCOMPOSITE HYDROGELS OF PEO/PVA/NANOCHITIN ON HUMAN SKIN FIBROBLAST CELLS

MSC THESIS

SEDEF KIRDAR

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, JUNE - 2022

Hydrogels are especially preferred in chronic wounds, as they keep the wound environment moist, provide painless use and facilitate fibroblast migration during wound healing. In this study, in order to investigate its use as a wound dressing, the cytotoxic effects of hydrophilic polyethylene oxide (PEO) and polyvinyl alcohol (PVA) polymers in the hydrogel structure and the forms obtained by mixing these polymers with 1%, 2.5% and 5% nanochitin on human dermal fibroblast cells were determined by MTT and MTS tests using indirect and direct cytotoxicity methods. According to the results; it was observed that PEO/PVA supplemented with 1%, 2.5% and 5% chitin, incubated for 48 hours in the indirect test with fibroblasts and for both 24 and 48 hours in the direct test, increased the percent metabolic activity significantly compared to the control and did not show cytotoxic effects.

Drosophila melanogaster, which has many genes in common with humans, is a frequently used model organism in nanoparticle toxicity studies, because both the developmental stages and behavioral disorders as a result of neural damage can be easily followed when exposed to a toxic agent. For this purpose, the toxic effects of 50 and 100 µg/mL doses of PEO and PVA with 2.5% chitin and PEO/PVA with 5% chitin, which showed significant effects according to the *in vitro* test results in this study, were examined by the developmental tests (pupation, larval eclosion and survival rate) and behavioral tests (larval crawling and adult climbing test) on *Oregon-R* strains. According to the results of developmental and behavioral tests, 100 µg/mL of PEO/PVA with 5% chitin, which showed a significant decrease in all tests compared to the control, decreased the number of larva-pupa-adult ratio, the speed of larvae in the crawling test and the number of climbing adult flies in the climbing test. As a result, it had a toxic effect on *Drosophila melanogaster*.

KEYWORDS: Wound dress material, cytotoxicity, nanocomposite hydrogel, *Drosophila melanogaster*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Deri: Anatomisi ve Fonksiyonu	1
1.2 Yara ve Yara İyileşmesi Mekanizmaları.....	3
1.3 Kronik Yara ve Bakımı	5
1.4 Biyomalzemeler ve Yara Örtüleri	6
1.5 Hidrojeller	7
1.5.1 Nanokompozit Hidrojeller	8
1.5.2 Hidrojel Örtülerde Kullanılan Polimerler	8
1.5.2.1 Polivinil Alkol (PVA)	8
1.5.2.2 Polietilen Oksit (PEO).....	9
1.5.2.3 Kitin.....	9
1.6 Biyomalzemeler ve Doku-Hücre Etkileşimi	11
1.7 Toksisite Testleri.....	12
1.7.1 <i>In vitro</i> Sitotoksisite Testleri	12
1.7.1.1 İnsan Dermal Fibroblastları.....	14
1.7.2 <i>In vivo</i> Toksisite Testleri	15
1.7.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.8 Literatür Özeti	16
1.9 Amaç ve Kapsam	20
2. MATERYAL VE METOT.....	21
2.1 Materyal	21
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	21
2.1.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	21
2.1.1.2 <i>Drosophila in vivo</i> Toksisitesinde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler ..	23
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	24
2.2 Metot	24
2.2.1 Hidrojel Örneklerinin Hazırlanması.....	25
2.2.2 <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	26
2.2.2.1 Sterilizasyon	27
2.2.2.2 Kültür Ortamı Bileşenlerinin Hazırlanması	27
2.2.2.3 Hücre Çözdürülmesi.....	28
2.2.2.4 Pasajlama.....	29
2.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması	29
2.2.2.6 Hücre Sayısı Optimizasyonu	29
2.2.2.7 Indirekt Sitotoksisite Testleri	30

2.2.2.8	Direkt Sitotoksisite Testleri.....	31
2.2.3	<i>In vivo Drosophila</i> Çalışmaları	31
2.2.3.1	<i>Drosophila</i> Besiyerinin Hazırlanması	32
2.2.3.2	Ekstraktların Hazırlanması	32
2.2.3.3	Gelişim Testleri	32
2.2.3.4	Davranış Testleri	33
2.2.4	İstatistik	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1	<i>In vitro</i> Sitotoksisite Sonuçları.....	36
3.1.1	İndirekt Sitotoksisite Sonuçları	36
3.1.2	Direkt Sitotoksisite Sonuçları	40
3.2	<i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları.....	43
3.2.1	Gelişim Testleri Sonuçları.....	44
3.2.2	Davranış Testleri Sonuçları.....	45
3.2.2.1	Larval Sürünme Testi Sonuçları.....	45
3.2.2.2	Yetişkin Tırmanma Testi Sonuçları	47
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	48
4.1	<i>In vitro</i> Sitotoksisite Sonuçları.....	48
4.1.1	İndirekt Sitotoksisite Sonuçları	48
4.1.2	Direkt Sitotoksisite Sonuçları	51
4.2	<i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları.....	55
4.2.1	Gelişim Testleri Sonuçları.....	55
4.2.2	Davranış Testleri Sonuçları.....	57
4.2.2.1	Larval Sürünme Testi Sonuçları.....	57
4.2.2.2	Yetişkin Tırmanma Testi Sonuçları	60
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
6.	KAYNAKLAR	63
	ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Derinin anatomik kesiti.....	2
Şekil 1.2: Zamana göre yara iyileşme aşamaları.....	5
Şekil 1.3: Kitin ve kitosan yapısı.	10
Şekil 1.4: Biyoyumluluk parametreleri.	11
Şekil 1.5: MTT ve formazan bileşiğinin yapısı.....	14
Şekil 1.6: MTS ve formazan yapısı.....	14
Şekil 1.7: <i>Drosophila melanogaster</i> gelişimsel süreci.....	16
Şekil 2.1: Tez çalışmasının genel metodolojisi.....	25
Şekil 2.2: Direkt ve indirekt test için kuyucuklara yerleştirilen hidrojel örnekleri.....	26
Şekil 2.3: Hemasitometre lamı ve sayım ızgarası alanı görünümü.	30
Şekil 2.4: Larva sürünme testi platformu.	34
Şekil 2.5: Yetişkin tırmanma testi platformu.	35
Şekil 3.1: Indirekt MTT sonuçlarına göre hidrojel kompozitlerinin % metabolik aktivite oranları.....	36
Şekil 3.2: 24 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	37
Şekil 3.3: 24 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	37
Şekil 3.4: 24 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	38
Şekil 3.5: 48 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	38
Şekil 3.6: 48 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	39
Şekil 3.7: 48 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	39
Şekil 3.8: Direkt MTS sonuçlarına göre hidrojel kompozitlerinin % metabolik aktivite oranları.....	40
Şekil 3.9: 24 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	41
Şekil 3.10: 24 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	41
Şekil 3.11: 24 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	42
Şekil 3.12: 48 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	42
Şekil 3.13: 48 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	43
Şekil 3.14: 48 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.....	43
Şekil 3.15: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % puparasyon oranları.....	44
Şekil 3.16: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % pupadan çıkma oranları.....	44

Şekil 3.17: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % canlılık oranları.....	45
Şekil 3.18: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PVA (B), 100 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PVA (C).....	45
Şekil 3.19: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PEO (B), 100 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PEO (C).	46
Şekil 3.20: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu %5 kitin ilaveli PEO/PVA (B), 100 µg/mL dozlu %5 kitin ilaveli PEO/PVA (C).....	46
Şekil 3.21: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu kompozit ilave edilmiş 3.evre larva hızları (cm.dk ⁻¹).....	46
Şekil 3.22: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu kompozitlere maruz kalmış yetişkin sinek tırmanma oranları.....	47



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Hücre büyütülmesi ve pasajlanması için gerekli kimyasallar.	211
Tablo 2.2: Diğer kimyasallar ve sarf malzemeler.....	22
Tablo 2.3: <i>Drosophila</i> testlerinde gerekli kimyasallar ve malzemeler.....	23
Tablo 2.4: Çalışmada kullanılan cihazlar.	24
Tablo 2.5: Hidrojel örnekleri sınıflandırması.	25
Tablo 2.6: İnsan dermal fibroblast hücre hattı genel özellikleri.	27
Tablo 2.7: Fibroblast büyüme kiti bileşenleri.....	28



SEMBOL LİSTESİ

CeO₂	: Seryum dioksit
CO₂	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal growth factor
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal bovine serum
FDA	: Food Drug Agency
Fe₃O₄	: Demir 2-3 oksit
GO	: Grafen oksit
hBN	: Hekzagonal bor nitrür
HDFa	: Human dermal fibroblast adult
HJ	: Deri fibroblast hücre hattı
IDF	: International Diabetes Federation
ISO	: International Organization for Standardization
LDH	: Laktat dehidrogenaz
L929	: Fare fibroblast hücre hattı
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MTS	: 5-3-karboksimetoksifenil-3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NIH-3T3	: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
PAA	: Poliakrilik asit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet derived growth factor
PEG	: Polietilen glikol
PEO	: Polietilen oksit
PMMA	: Polimetil metakrilat
PVA	: Polivinil alkol
PVP	: Polivinil pirolidin
rh FGF	: Rekombinant human fibroblast growth factor
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SiO₂	: Silisyum dioksit
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TiO₂	: Titanyum dioksit
ZnO	: Çinko oksit
ZrO₂	: Zirkonyum dioksit
XTT	: 2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

ÖNSÖZ

Kabul sürecinden başlayarak yüksek lisansımın her aşamasında bana güvenen ve desteklerini benden esirgemeyen; takıldığım her aşamada paylaştığı bilimsel tecrübeleri ve bilgisi, motivasyonumu yüksek tutmam için verdiği tavsiyeleri ve her koşulda gösterdiği şefkati için danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a,

Her sıkıştığım da tecrübesiyle imdadıma yetişen, güleryüzü ve sabrıyla deneylerimin ve deney sonuçlarımın yorumlanması sırasında büyük emekler veren ve tezim haricinde de manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Araş. Gör. Dr. Begümhan Yılmaz KARDAŞ'a; yüksek lisans eğitimim boyunca takıldığım her noktada gösterdiği özveri ve bildiği tüm bilimsel bilgileri benimle paylaşmak adına verdiği çaba için değerli hocam Dr. Öğr. Gör. Mehmet Emin DİKEN'e,

Hücre hattı arayışım sırasında hiç düşünmeden destek sunan ve laboratuvarındaki hücre hattını benimle paylaşan değerli Dr. Öğr. Üyesi Sevede ALTUNTAŞ'a, hücre hattının yollanması sırasında verdiği değerli destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL'a,

Pozitif enerjileri ve koşulsuz destekleriyle tez süreci ve dışında yanımda olan, laboratuvarı paylaşmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Franziska WILD KORKMAZ, Hamza BAYHAN ve Saliha AYDIN'a,

Varlıklarıyla hayatımda önemli yere sahip olan ve hayatımı anlamlandıran dostlarım Goncagül DÖNMEZ ve Zehra DEMİRAY ASOĞLU'na,

Hayat boyu her zaman örnek aldığım ve gurur duyduğum, ahlaklı ve adaletli bir birey olarak yetişmem için çaba göstermiş ve göstermeye devam eden canım annem Cahide KIRDAR ve canım babam Ahmet KIRDAR'a; neşe kaynağım canım kardeşim Ömer Samet KIRDAR'a ve yanlarında huzuru bulduğum, evladım olarak gördüğüm kedilerim İnci ve Teo'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Balıkesir, 2022

Sedef KIRDAR

1. GİRİŞ

Vücudun en karmaşık hücresel olaylarının gerçekleştiği yara iyileşmesinde oluşan aksamalar, özellikle kronik yaralarla yaşayan hastaların yaşam kalitesini düşürerek amputasyondan ölüme kadar uzanabilen ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır. Ülkemizde ve dünyada sayısı her geçen yıla göre artan diyabetik ayak ülserleri, venöz yetmezlik gibi kronik yaralara uygun yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi, hastalar ve sağlık sistemi üzerindeki yükü azaltmak adına kritik bir adımdır [1].

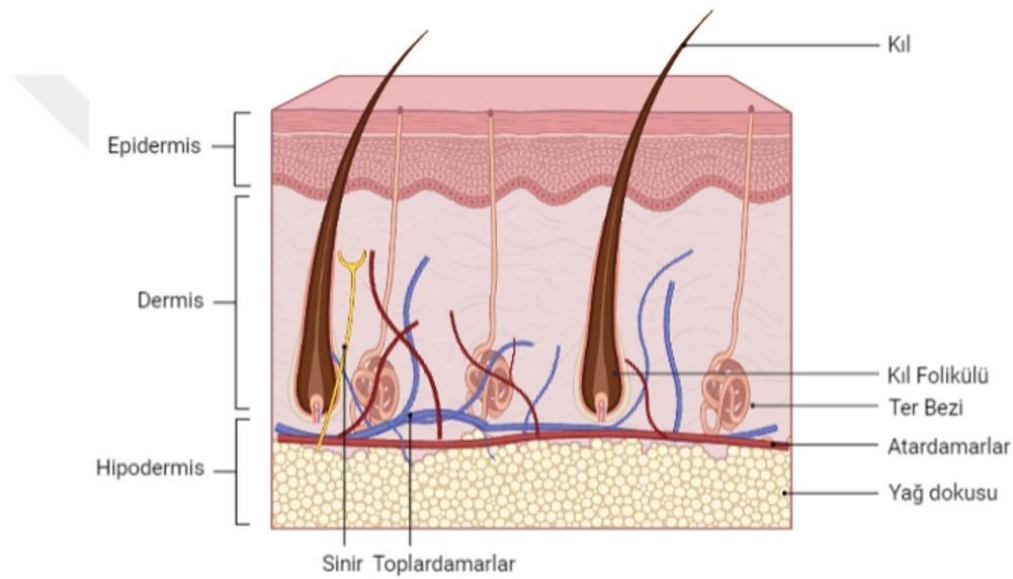
Yara iyileşmesine katkı sağlayan farklı biyopolimer içerikli çok sayıda yara örtüsü geliştirilmiş olmasına rağmen bütün yara tipleri için belirli bir yara örtüsü uygun olmayabilir ve her biyopolimer yara iyileşmesine olumlu katkı göstermeyebilir. Son yıllarda yara iyileşmesinde kullanılmak üzere sentezlenmiş hidrojel yapısındaki biyomalzemelerin; yapılarındaki yüksek su kapasitesi ile yara iyileşmesi için altın standart olan nemli ortam koşullarını oluşturması ve bu sayede yara iyileşmesinde sorumlu olan temel hücre tiplerinin göçünü kolaylaştırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. Doku ile uyumlu çalışabilecek, insan hücrelerinin canlılığını azaltıp sitotoksik etki göstermeyecek hidrojel örtülerinin sentezlenebilmesi için hidrojel yapısında bulunan polimerlerin hücrelerde oluşturduğu sitotoksik etkilerinin araştırılması; bu malzemelerin insan vücudunda kullanımı öncesi gerekli adımlardan biridir. *In vitro* testlerden oluşan sitotoksik aktivite testlerinin gerektiğinde farklı model organizmalarla *in vivo* toksisitesinin değerlendirilmesi insan sağlığında kullanılacak olan yara örtü malzemelerinin kalitesini ve verimini artırmış olacaktır [2].

1.1 Deri: Anatomisi ve Fonksiyonu

Vücudun en geniş ve kompleks organı olan deri, koruyucu ve düzenleyici fonksiyonlara sahip bir yapıdır. Deri bezleri, kıl, tırnak, pul gibi türevlenmiş yapılarıyla birlikte deri, integument sistem veya örtü sistemi olarak da adlandırılır. Bu sistem, fiziksel, kimyasal ve enfeksiyöz hasara karşı bir bariyer görevi görerek (ısı ve su içeriğindeki değişimleri kontrol eder) basınç, kesi, darbe gibi fiziksel uyarılara karşı bir cevap oluşturur [3].

Bazı kaynaklarda 2 katmanlı olarak geçse de insan derisinin normal fizyolojik koşullarda kendini yenileyebilen 3 ayrı anatomik katmandan oluştuğu kabul edilmektedir [3–6]. Şekil 1.1’de derinin 3 ayrı anatomik katmanları görülmektedir (BioRender ile tasarlanmıştır).

Bu katmanlar dıştan içe doğru epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarıdır [7]. En dıştaki katman olan epidermis tabakası; ince, sinir hücreleri ve damarlardan yoksun bir yapıdan oluşan, dış ortam ve vücut arasında bariyer görevi gören, ana koruyucu fonksiyona sahip bir tabakadır [8, 9]. Epidermis içte; daha kalın bir yapı olan, temelde bağ doku ve yağdan oluşan, besin akışı ve zararlı bileşenlerin atılmasını sağlayan, epidermisin aksine damarsız ağ yapısı içeren ve sinirlerden oluşan ve deriye mekanik destek sağlayan dermis tabakasına bağlıdır [6, 8, 10, 11]. Dermisin altında ise derinin en alt katmanını oluşturan; yağ dokuca zengin, ısı yalıtımı ve mekanik destek sağlayan ve enerji deposu olarak görev yapan hipodermis tabakası bulunur [12].



Şekil 1.1: Derinin anatomik kesiti.

Ciltte fiziksel ve kimyasal hasara karşı savunmanın ilk basamağı olan epidermis temel olarak; epidermisdeki hücrelerin çoğunluğunu oluşturan ve keratin üretimini sağlayan keratinositler, melanin pigmenti üreten melanositler, bağışıklık yanıtına yardımcı olan Langerhans hücreleri ve sinir iletimine destek sağlayan Merkel hücrelerinden oluşur [6, 13, 14].

Dermisteki temel hücre tipi fibroblastlardır fakat yapısında bazı bağışıklık hücrelerini (makrofajlar, mast hücreleri) de içerir [15]. Fibroblastlar, ekstraselüler matriks (ECM) tabakasının bileşenlerinin üretiminden sorumludurlar [6]. Kollajen, elastin, fibronektin, proteoglikandan oluşan ECM tabakasının temel bileşeni kollajendir ve dermise mekanik sağlamlık kazandırır [11, 16].

En içteki hipodermis tabakası temelde adiposit hücrelerinden oluşmaktadır [11]. Adipositlerin yağ depolama görevi haricinde de dermal tabaka ile etkileşim halinde olduğu, hipodermal-dermal tabaka arasında bulunan fibroblastların dermis tabakasındaki fibroblast tiplerine göre ECM'in şekillenmesinde farklı karakteristiklere sahip olduğu ve adiposit hücrelerinin fibroblast göçüne katkı sağladığı da bilinmektedir [17–19].

1.2 Yara ve Yara İyileşmesi Mekanizmaları

Deri; yaralanma, yanık, altta yatan hastalık gibi içsel veya dışsal birçok hasar sonucu hasarın türüne göre derecelenecek şekilde bütünlüğünü, yapısını ve işlevini kaybedebilir [20, 21]. The Wound Healing Society (Yara İyileşmesi Derneği) yarayı; “organın normal anatomik yapısının ve fonksiyonlarının bozulması” olarak tanımlar [22]. Derinin hasara uğramayıp bütünlüğünü kaybetmesi ile başlayan ve skar doku oluşumu ile tamamlanan; farklı hücre tipleri, hormonlar ve kimyasal faktörlerin rol aldığı hücre-sinyal yolağı genel olarak yara iyileşmesi olarak ifade edilir [23]. Yara iyileşmesinin temel amacı hızlı bir şekilde yaranın kapatılıp derinin işlevinin gerçekleştirilebilir hale getirilmesidir [24]. Yara iyileşme safhaları; sıra ile gerçekleşen ve birbiri ile çakışan; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamalarından oluşmaktadır [25].

Deride oluşan hasar sonrası; yara iyileşmesinin ilk aşaması olan hemostaz evresinde, kanamayı önlemek için plateletler aracılığı ile kan pıhtısı oluşturulur [26, 27]. Pıhtı oluşumu bir sonraki aşamalarda gerekli olacak inflamatuvar hücrelerin salınımı için depo görevi görür. PDGF, EGF gibi plateletler ile salınan büyüme faktörleri yara bölgesine fibroblastlar, nötrofil ve makrofajları çekerek inflamatuvar fazı başlatırlar [28, 29].

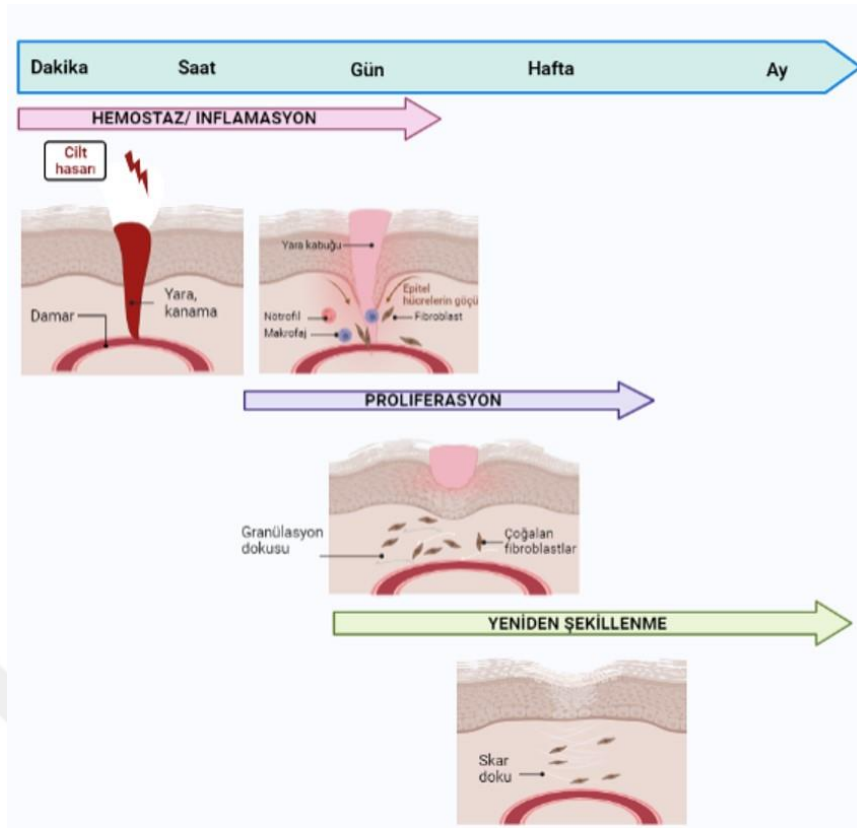
Savunma fazı olarak bilinen inflamasyon aşaması; büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığı ile dokuya geçen nötrofiller, lenfositler ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin yara yatağını temizledikleri bir aşamadır [30]. Nötrofiller fagositoz aktiviteleri ve proteaz salgılarıyla yarayı yabancı maddeler ve bakteriden arındırırlar [31]. Ardından fagositik aktiviteleri ile büyüme hormonlarının üretilmesi ve MMP'ler gibi enzimler salgılayarak daha önce oluşmuş pıhtıyı parçalama görevleriyle makrofajlar, bu aşamanın en belirteç hücreleridir [32, 33].

Proliferasyon aşaması; göç eden hücrelerin yeniden-epitalizasyon, damar büyümesi, kollajen üretimi ve granülasyon dokusu oluşumunu gerçekleştirmek için çoğaldığı

aşamadır [34, 35]. PDGF ve EGF hormonları tarafından aktive olan fibroblastlar yara bölgesine göç ederek kollajen, fibronektin gibi ECM tabakası elemanlarını üretmeye başlarlar [36]. Fibroblastlar tarafından kollajen birikimi bu aşamada gerçekleşir [26]. Yara bölgesi çoğunlukla kollajen tip III ile kollajen fibrilleri arasında çapraz bağlanmalar oluşumu sonucu doldurulur [35]. Endotel hücreleri hasarlı damarların yerine geçecek yeni damar oluşumunda görev alırlar [37]. Aktifleşmiş keratinositler, yara bölgesine göç eder ve epidermise farklılaşırlar [26].

Yeniden şekillenme aşaması; yara iyileşmesinin en son başlayan ve tamamlanması yara tipi ve şiddetine bağlı olarak uzun zaman alabilen aşamasıdır [38]. Bu aşamada gerçekleşen en önemli olay MMP'ler aracılığıyla daha düzensiz yapıda olan kollajen tip III'ün belirli düzen içerisinde olan kollajen tip I ile değişimidir ve bu değişim iyileşme süreci tamamlanıncaya kadar devam eder [39, 40]. Anjiogenez ve proliferasyon durunca fazla hücreler apoptoza uğrayarak ECM'den uzaklaştırılır [41, 42]. Böylelikle normal dermal yapıyı kazanmış ve gerilim gücü artmış skar doku oluşumu ile süreç tamamlanır.

Şekil 1.2'de görüldüğü gibi normal yara iyileşmesi birkaç hafta veya ay içinde tamamlanır (BioRender ile tasarlanmıştır) [43]. Normal süreler içerisinde iyileşen yaralar akut yara olarak adlandırılır ve ortalama 8-12 hafta içerisinde yara kapanır. Akut yaranın aksine iyileşmesi aylar hatta yıllar alan ve genellikle inflamatuvar fazda kalan yaralar ise kronik yara olarak adlandırılır [44].



Şekil 1.2: Zamana göre yara iyileşme aşamaları.

1.3 Kronik Yara ve Bakımı

Akut yaralardan farklı bir yara biyolojisine sahip olan kronik yaralar, normal yara iyileşme sürecinin aksamasına ve uzamasına sebep olup; otoimmün hastalıklar, diyabet, venöz yetmezlik gibi iyileşmeyi etkileyen birçok farklı sistemik sebepler sonucu oluşabilir. Kronik yara ortamına bakıldığında akut yaralara kıyasla kronik yaraların daha fazla mikroorganizma ile kolonize olduğu, inflamasyonu tetikleyen artmış büyüme faktörü seviyeleri içerdiği, büyüme hormonlarını ve ECM bileşenlerini parçalayan proteolitik enzim seviyelerinin fazla olduğu görülmektedir [45]. Ülkemizde ve dünyada önemli bir sağlık sorunu teşkil eden kronik yaralar hem hasta sağlığı açısından hem de tedavisi için ayrılan bütçe ile ekonomik açıdan toplumları etkilemeye devam etmektedir. Kronik yaralardan olan diyabetik ayak ülseri, tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında görülen en yaygın komplikasyonlardan biri olup uzun bir hospitalizasyon süreci gerektirir ve normal diyabet hastalarına kıyasla bu hastalara ayrılan bütçe daha fazladır [46]. IDF'e göre 537 milyon diyabet hastası vardır ve ülkemizde diyabet prevalansı Avrupa ülkeleri arasında en yüksek seviyededir [47]. 2011-2014 Türkiye Diyabet Programı verilerine göre ülkemizde 400.000 diyabetik ayak ülseri ve buna bağlı olarak 6000 amputasyon vakası görülmektedir [48].

Giderek artan diyabetle birlikte diyabetin getirisi olarak kronik diyabet yaralarındaki artış uzun hospitalizasyon sonucu amputasyon veya ölümlerle sonuçlanmakta ve bu oran her geçen yıl daha da artmaktadır [49]. Yara iyileşmesi vücudun gösterdiği en kompleks süreçlerden biridir ve bu sebeple geç iyileşen kronik yaraların bakımı oldukça zordur. Kronik yara kaynaklı zararların en aza indirilebilmesi için interdisipliner olarak farklı tedavi yaklaşımları geliştirilmeye devam edilmektedir [50]. Bu yaklaşımlardan olan yara örtüleri, son yıllarda biyomalzeme çalışmalarıyla birlikte ivme kazanmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen henüz yara örtüleri çoğu yara tedavisi için yeterli olmamaktadır. Bu sebeple bu hastalar ve tedavileri üzerindeki yükü kaldırmak için alternatif, yenilikçi ve kombine yara örtülerinin literatüre kazandırılması tedavi gelişimine katkı sağlayacaktır.

1.4 Biyomalzemeler ve Yara Örtüleri

Biyolojik ortamla etkileşmek üzere tasarlanan materyallere biyomalzemeler denir. Sadece *in vivo* ortamlarla sınırlı olmayıp hücre kültürü ve biyoteknolojik işlemler gibi *in vitro* ortamlarda da kullanılırlar. Literatürdeki en doğru ve genellenebilir tanımlama yapılacak olursa David S. Williams'a göre biyomalzemeler "canlı sistemlerin bileşenleri ile olan etkileşimin kontrolüyle, herhangi bir terapötik veya teşhis sürecinin gidişatını yönlendirmek için tek başına veya kompleks bir sistemin parçası olmak üzere tasarlanmış bir madde" olarak ifade edilir [51]. Farklı karakteristiğe sahip doğal veya sentetik malzemelerden tasarlanan ve kemik, kalp implantlarından doku mühendisliğine kadar geniş yelpazede ve farklı disiplinlerde kullanımı bulunan biyomalzemelerin, kullanıldığı ortamı taklit etmesi ve herhangi bir eşleşme sorunu çıkarmaması amaçlanır [52]. Bu sebeple biyomalzeme bilimi biyoyumlu biyomalzemeler tasarlamaya çalışır. Biyoyumluluk, biyolojik ortam ile etkileştirilen biyomalzemenin pıhtılaşma, inflamatuvar yanıt, mikrobiyal ajanlara karşı direnç gibi oluşabilecek mekanizmalara ideal süre ve boyutlarda göstermiş olduğu yanıtıdır [53]. Biyoyumlu biyomalzemeler normal biyolojik mekanizmaların oluşum sürecini kısıtlamaz ya da geciktirmez, bunları geciktirecek veya olumsuz etkileyecek bağışıklık yanıtı oluşturmazlar.

Yaraların tedavisinde doğru yara örtüsü seçimi tedavi için en kritik aşamadır. Yara örtüleri, yara ile doğrudan temas ederek iyileşmeyi hızlandıran ve yara ortamını hasardan koruyan steril malzemelerdir. Farklı yaralarda farklı yara örtüleri kullanılmasına rağmen tüm yara örtüleri; genellenebilir, ortak bazı standartları taşımalıdır [54]. Yara örtüsü çalışmalarında daha önceden kuru ortam ideal olarak düşünülse de George Winter'ın

domuzlarda yaptığı çalışmalarda epitelizasyonun nemli ortamda kuru ortama göre daha hızlı olduğunu göstermesinden sonra yara örtülerinde nemli ortam kullanımı altın standart olarak kabul edilmiştir [55]. Nemli ortam yara iyileşme sürecinde görev alan hücrelerin ve büyüme faktörlerinin etkileşimine izin verir ve dokuyu dehidrasyon ve hücre ölümünden korur [56]. Genel olarak ideal bir yara örtüsünde; yara bölgesi için nemli bir ortam sağlayan, biyouyumlu ve antibakteriyel, gaz değişimine izin veren, fazla eksudanın absorpsiyonunu ve uygun pH, sıcaklığı sağlayan, kullanım açısından rahat ve konforme edilebilir bir yapı bulunmalı; bu yapının değişim ihtiyacı az, raf ömrü uzun, maliyeti ucuz olmalı, toksik ve alerjik etkileri bulunmamalıdır [57, 58].

Literatürdeki farklı sınıflandırmalar göz önüne alınarak yara örtüleri en genel şekilde geleneksel ve modern yara örtüleri olarak sınıflandırılmaktadır [57, 59–61].

Geleneksel yara örtüleri uzun yıllardan beri kullanılan gazlı bez, pamuk, keten gibi malzemeleri içeren ve basit yaralarda yara sıvısının emdirilmesi ve kontaminasyonun engellenmesi amacıyla kullanılan örtülerdir [57]. Bu örtülerin dezavantajı fazla sıvı içeren yaralara maruz kaldıklarında yara bölgesinde bıraktıkları iplik, kumaş kalıntılarıyla kontamisyona sebep olmaları ve yaraya yapışarak değişim sırasında ağrıya sebep olmalarıdır [62]. Yara iyileşmesine katkı sağlayamadıkları, pasif şekilde koruma sağladıkları için akut yaralarda kullanımları mümkün olsa da kronik yaralarda kullanımları mümkün değildir [63].

Hidrojel, hidrokolloid, köpük, film formlarında bulunan modern örtüler geliştirilerek geleneksel örtülerin getirdiği kısıtlamaların aşılması sağlanmıştır [1]. Yara için ideal nemli ortam sağlayan ve yara iyileşmesini tetikleyen modern örtüler, doğal ve sentetik biyomalzemelerin de bu örtülere eklenmesiyle farklı formlarda geliştirilmiştir [21]. Modern yara örtüler arasında çok amaçlı kullanılabilen en ileri formlardan biri hidrojel örtülerdir [64].

1.5 Hidrojeller

Hidrojeller yüksek seviyede su tutma kapasitesine sahip hidrofilik çapraz bağlı polimerik ağısı yapıdan oluşan üç boyutlu yapılardır. Polimerik zincirler kovalent veya kovalent olmayan hidrofobik, elektrostatik ve Van der Waals bağlarıyla bağlanarak üç boyutlu yapıyı oluştururlar ve bu yapı orijinal kuru ağırlığının birkaç katı su absorblayabilmesini

sağlar. Selüloz, nişasta gibi doğal polimerler veya PVA, PVP, PAA, PEO gibi sentetik polimerler ile hidrofilik özellik kazanan hidrojeller bu yapıları sayesinde jelatin yapısını koruyarak şişebilme potansiyeli taşırlar [65, 66].

Yüksek su içeriği, bulunduğu yara ortamının nemli tutulmasını ve bu sayede epitel hücrelerin göçünün kolaylaştırılmasını sağlar. Özellikle kuru nekrotik yaralarda ölü dokuyu nemlendirme ve yara yüzeyini serinletme özellikleri ile inflamasyonu azaltırlar ve hasta tarafından kullanım kolaylığı sağlarlar [67]. Yüksek su içeriği, yapışkan olmayan yapısı ve biyouyumluluğu ile normal dokuya olan benzerliği hidrojelleri ideal yara örtüsü olarak konumlandırmayı sağlar ve bunun dışında doku mühendisliği ve ilaç salınımı çalışmalarında da en sık tercih edilen materyallerdendir.

1.5.1 Nanokompozit Hidrojeller

Nanoteknoloji ve biyomalzemeler iç içe bir alandır. Biyomalzemeler tasarlanırken nanoteknolojik yöntemler kullanılarak biyomalzemelerin biyolojik sistemlere uyum sağlaması hedeflenir. Hidrojellerin sentezi sırasında sağlamlığını artırmak için kullanılan nanokompozit yapılar nano boyuttaki partiküller ile çapraz bağlanarak elde edilen polimer yapılardır [68]. Çözücü ortamında etkileştirme yöntemi nanokompozit hidrojeller hazırlanırken kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem ile hidrojel yapısının destek malzemesini oluşturacak olan nanopartikül yapı sıvı polimer ile karıştırılır ve ardından çözücünün uzaklaştırılmasıyla hidrojel ağına gömülü ve homojen dağılmış nanokompozit hidrojeller oluşturulur. Nano boyuta getirilmiş yapılarla desteklenen hidrojeller ile polimerin yüzey morfolojisi değiştirilmiş olur [69].

1.5.2 Hidrojel Örtülerde Kullanılan Polimerler

Doğal veya sentetik kaynaklı, fizikokimyasal ve biyouyumlu özellikleriyle yara örtülerinde birçok polimer tercih edilmektedir. Hidrojeller tasarlanırken sıklıkla kullanılan ve bu çalışmaya öncül olan bazı polimerler aşağıda anlatılmıştır.

1.5.2.1 Polivinil Alkol (PVA)

PVA, yapısındaki fazla miktarda bulunan -OH grupları sayesinde oldukça polar ve hidrofilik yapıda olan bir polihidroksi sentetik polimerdir. Biyouyumlu, biyobozunur olması, transparan ve kokusuz yapıda olması ve nemli ortam sağlama özellikleriyle yara bakımında tercih edilir. Uygun miktarda su ile karıştırıldığında jelleşen PVA dokuyu taklit

eden bir yapıdadır. Yapısındaki -OH grupları sayesinde akışkanlık, çözünürlük, şişme kapasitesi gibi özellikleri olan PVA, bu gruplara farklı yöntemlerle çapraz bağlanabilen polimerler ile desteklenerek daha yüksek su kapasitesine ve daha biyouyumlu özelliklere sahip hidrojelleri oluşturabilir [70, 71].

1.5.2.2 Polietilen Oksit (PEO)

PEO sentetik, yarı kristal, linear yapıda, tekrarlayan eter gruplarından oluşan bir polimerdir. Aynı zamanda daha düşük ağırlıklı olan formları polietilen glikol olarak da bilinir. Yapısındaki eter grupları sayesinde metal iyonlarıyla yüksek etkileşime girebilir ve polar yapısı ile farklı çözücülerle etkileşime girerek farklı amaçlara uygun kompozitler oluşturabilir. Yüksek hidrofilliği, biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve yüzey proteinlerine olan düşük adsorbsiyonu gibi kendine has özellikleriyle PEO yara örtüsü çalışmalarında en sık tercih edilen polimerlerden biridir. FDA tarafından onaylanmış olması da biyouyumlu malzeme olarak kullanımını artırmıştır. Yara örtüsü olarak kullanımlarının en önemli avantajı doğal polimerler ile desteklendiklerinde doğal polimerlerin aksine yüksek mekanik özellikleri sayesinde hücre adezyonunu kolaylaştıran yapı iskeleleri olarak görev yapabilmeleridir [72, 73].

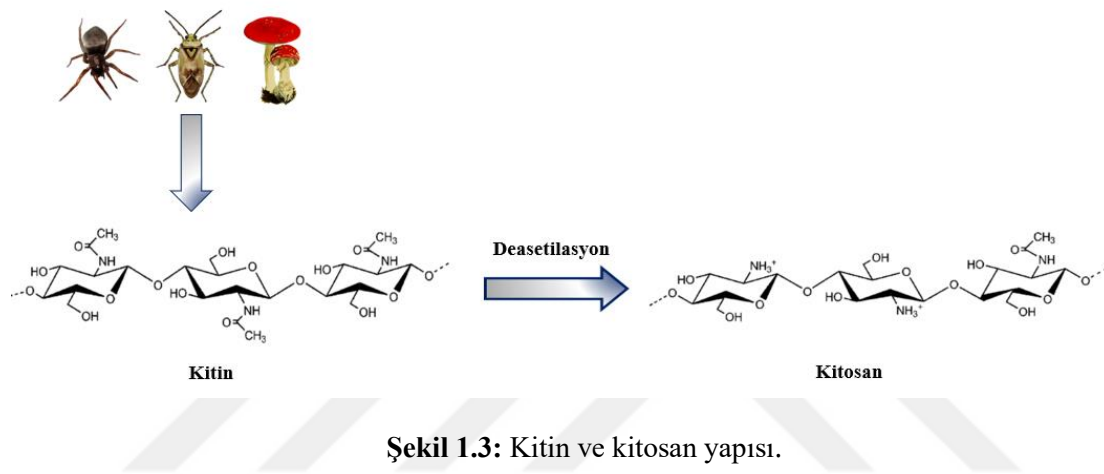
1.5.2.3 Kitin

Kitin, kitosan, kollajen gibi biyolojik malzemelerden elde edilen ve biyoaktif örtüler olarak da bilinen biyomalzemeler yara iyileşme aşamasında aktif rol oynayarak yeni doku oluşumu sağlarlar. Hidrojeller tasarlanırken polimerik matriks olarak kullanılan PEO, PVA gibi sentetik materyallerin tek başlarına kullanılmaları o materyallerin elastiklik, membran sertliği ve hidrofilik özelliklerinde eksikliğe sebep olduğundan, sentetik polimerlerin doğal polimerler ile desteklenmeleri ihtiyacı duyulur. Kitin ve türevi kitosan gibi doğal polimerlerle desteklenmiş biyomalzemeler; şişme kapasitesi, termal kararlılık ve elastiklik gibi hidrojel özelliklerinin iyileştirilerek yara iyileşmesine destek sağlanmasına sebep olurlar [74]. Polisakkaritlerin deride ekstraselüler matriks glikoproteinleri ve hücre adezyon molekülleriyle etkileşme özellikleri kitinin yara iyileşmesinde avantajlı olduğu diğer bir durumdur [75].

Kitin doğada selülozdan sonra en yaygın bulunan, omurgasızların iskeletinden veya mantarların hücre duvarından kolaylıkla elde edilebilen, düşük maliyetli doğal bir polimerdir [76]. Şekil 1.3’de görüldüğü gibi deasetilasyon ile kitosana dönüşebilen kitin,

N-asetil-D-glukozamin birimlerinin β -(1-4) glikozidik bağlanmasından oluşan linear bir polisakkarittir [76, 77]. Kendine has kimyasal ve biyolojik özellikleriyle biyomalzeme araştırmalarında tercih sebebidir.

Kitinin vücut sıvılarında bulunan lizozim, N-asetilglukoaminidaz gibi enzimler tarafından parçalanması ile açığa çıkan N-asetilglukozamin ve glukozamin ürünleri kito-oligomer olarak adlandırılır. Yara iyileşmesinde makrofaj üretimi ve kollajen birikimi gibi olumlu etkileri bulunan kito-oligomerler, toksik ve alerjen değildir [78].

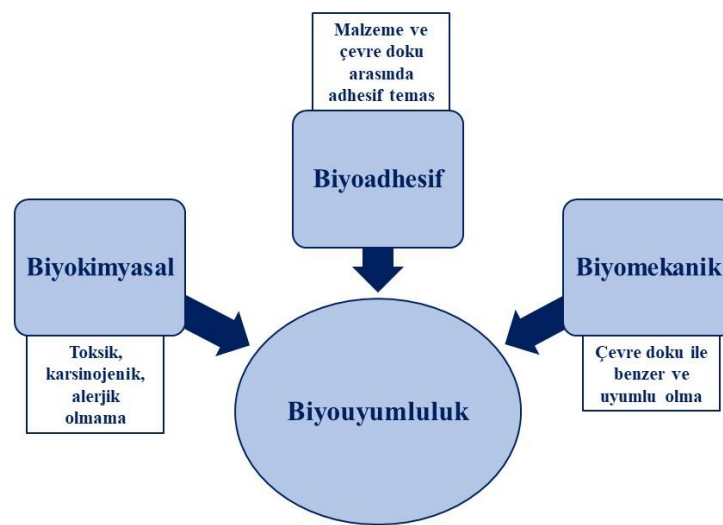


Biyouyumlu, biyobozunur, antimikrobiyal, hemostatik özellikleriyle kitin destekli yara örtüleri, yaranın kapanması ve iyileşme sırasında inflamatuvar hormonların salgılanmasını kolaylaştırır. Fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, granülasyon dokusu oluşumu, makrofaj göçünü kolaylaştırarak yara iyileşmesini hızlandırırlar [76]. Kronik yaralarda kullanımı; özellikle kronik yaralarda yüksek seviyede artmış MMP seviyelerini, kitooligosakkaritlerin MMP-2 ekspresyonu ve transkripsiyonel aktivitesi üzerine engelleyici etkisi ile düşürmesi bakımından elverişlidir [79]. Kitin, yapısal olarak dış hasara karşı degrade olabilme özelliğinden dolayı uygun polimerlerle desteklenerek mekanik sağlamlığı artırılmalıdır. Yara örtü malzemelerinin yeni doku oluşurken dokuda kalmayıp parçalanması ve doku ile uyum sağlayacak biyoyumlu özellikler bulundurması önemlidir. Biyobozunur özelliği ile kitin özellikle deri çalışmalarında ve yara örtülerinde bu sebeple tercih edilir.

1.6 Biyomalzemeler ve Doku-Hücre Etkileşimi

Derinin temel bileşeni olan ECM tabakasını taklit edebilme, hücrel fonksiyonları ve davranışları doğrudan etkileme özellikleriyle biyomalzemelerin hücrelerde bıraktığı etkiler yara iyileşmesi için elverişli olacak biyomalzemeler tasarlanırken en kritik adımlardan biridir. Bu sebeple biyomalzemeler ve hücrelerin etkileşiminin nasıl olduğunu anlamak gereklidir. Substrat görevi gören ve ECM yapısını taklit eden hidrojelere hücrenin vereceği ilk yanıt adezyon; ardından yayılma, migrasyon, çoğalma ve farklılaşmadır [80]. Moleküler boyutta kompleks ve farklı hücre tipleri ile iç içe olan bu sürecin aydınlatılması için sitotoksikite testlerine başvurulurken hücrelerin biyomalzemeye verdiği yanıt incelenir. Bu çalışmada kompleks yara iyileşme sürecinde yer alan farklı hücre tiplerinden biri olan dermal fibroblastlar kültüre edilerek biyomalzemelerin sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir.

Biyomalzeme ve biyomalzemeye maruz bırakılacak canlı doku etkileşirken; biyomalzemedan medikal anlamda beklenen yanıtın alınması, canlı doku ve biyomalzemenin bir bütün olarak var olmasını engelleyecek, birbiri üzerinde beklenmeyen ve istenmeyen yan etkiler oluşturmaması ve alıcı canlı üzerinde lokal veya sistemik yan etkiler oluşmaması biyoyumluluk olarak tanımlanır [81, 82]. Şekil 1.4'te özetlendiği gibi yeni bir biyomalzeme geliştirirken araştırmacıların hem malzemenin fizikokimyasal özelliklerini hem de hücrenin ihtiyaçlarını göz önüne alarak biyoyumluluğu birbirini tamamlayan farklı parametrelerle değerlendirmeleri gerekir [83].



Şekil 1.4: Biyoyumluluk parametreleri.

İnsan vücudunda kullanılacak yeni bir biyomalzeme test edilirken araştırmacıların bu malzemeleri klinik çalışmalarda kullanabilmeleri ve piyasaya sürebilmeleri için; FDA tarafından uygulanması zorunlu kılınan, uluslararası geçerli ve bir dizi protokoller içeren ISO 10993 standartlarını biyoyuymuluk testleri sırasında kullanmaları gerekmektedir [84, 85].

1.7 Toksisite Testleri

Yara örtüleri tasarlanırken insan vücudunda kullanımının güvenilir olup olmadığı göz önünde bulundurulması gereken en önemli parametredir. Yara örtülerinin yapısındaki herhangi bir bileşen yara iyileşmesini bozar veya geciktirirse, bu bileşenlerin yara iyileşmesinde rol olan cilt hücrelerini olumsuz etkilediği söylenebilir. İnsanlarda aktif olarak kullanımının ve güvenilirliğinin onaylanması için oluşabilecek toksisitenin incelenmesi yara örtüleri dışında herhangi bir ilaç geliştirilirken de araştırmaların temel basamağını oluşturur. İnsan hücreleri kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmalarına dayanan *in vitro* testler ve hayvan modellerine dayanan *in vivo* testler klinik çalışmaların öncüsüdür.

Yara örtülerinde toksisite incelenirken *in vivo* modeller kullanmak, kullanılan malzemenin hayvanlarda ağrı ve rahatsızlığa sebep olabileceğinden etik sorunlar doğurması ve özel onaylar gerektirmesi bakımından dezavantajlı testlerdir. Kullanılan model hayvan ve insan cildi arasındaki morfolojik farklılıklar da bu testlerdeki diğer bir sorundur. Ciltte kullanılacak herhangi bir formülasyonun ve bu tezde de amaçlanan yara örtüsü malzemesinin insan cildindeki toksik etkisi için kullanılacak en ideal testler *in vitro* sitotoksisite testleridir. Tek başına *in vitro* testler bir biyomalzemenin biyoyuymuluğunu doğrulamak için yeterli olmasa da elde edilecek güvenilir verilerle bir sonraki adım olan *in vivo* testlerde hayvan kullanımını azaltarak klinik çalışmaları hızlandırabilirler [86].

1.7.1 *In vitro* Sitotoksisite Testleri

Hücrenin sağlıklı olduğunun en önemli belirteci hücre canlılığı ve hücre proliferasyon hızlarıdır. Yabancı maddeye maruz bırakılan hücrelerin membran geçirgenliğinde, enzimatik aktivitelerinde, metabolik faaliyetlerinde oluşan bozulmalar hücrenin sağlığını etkileyerek hücre ölümüne ve dolayısıyla toksisiteye sebep olabilirler. Biyomalzemelerden salınan farklı dozlardaki maddeler genellikle 24 saat gibi kısa bir zaman içerisinde hücrenin ölümüne veya proliferasyonunun durmasına sebep olarak toksisite gösterebilirler.

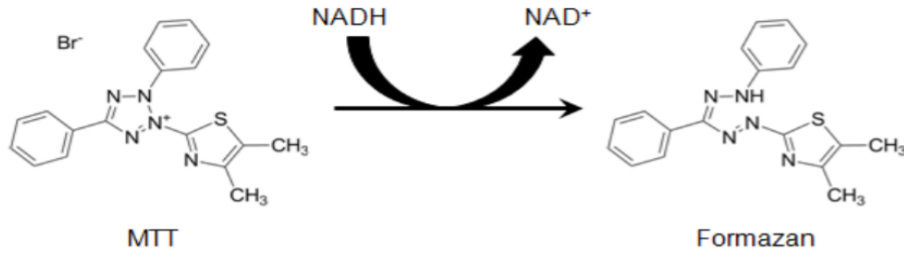
Toksikliği araştırılan maddelerin hücrelerin proliferasyon hızı, üremesi ve morfolojik şekillerinde yaptıkları değişiklikler incelenerek normal hücrelere zarar vermeyen en uygun dozunun bulunması sitotoksikite çalışmalarının temel prensibidir [87].

In vitro sitotoksikite testleri yapılırken kullanılan hücre kültürü çalışmaları tekrarlanabilen, kolay kontrol edilebilen ve hızlı yanıt alınabilen bir yöntemdir. Bununla beraber düşük bütçeli olması ve hayvan deneylerinin getirdiği etik problemleri taşımaması bakımından da avantajlıdır. Hücre kültürü herhangi bir dokunun mekanik veya enzimatik olarak parçalanmasıyla açığa çıkan hücrelerin süspansiyon veya monolayer yani herhangi bir yüzeye tutunmasıyla büyütüldüğü canlı dışı ortamlardır. Kültüre edilen hücrelerin çeşidine ve ihtiyaçlarına göre hücrelerin çoğalmasına uygun yüzey ve besiyeri sağlanarak hücrelerin yapısal organizasyonlarını ve metabolik faaliyetlerini korumaları sağlanır [88].

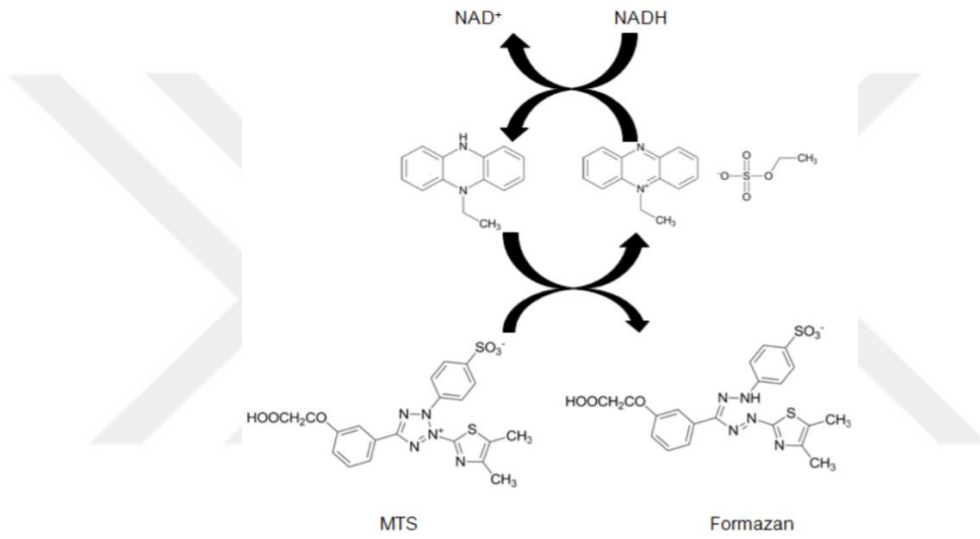
Biyomalzeme ile temas halinde bulunan besiyeri ile hücrelerin temas ettirilmesi ile indirekt veya hücrelerin doğrudan biyomalzemelerin üzerinde çoğaltılmasıyla yapılan direkt testler ile herhangi bir biyomalzemenin sitotoksik aktivitesi farklı şekillerde kültür ortamında incelenebilir [85].

Sitotoksikite testlerinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan kalorimetrik yöntem ile canlı hücrelerin metabolik aktivitesi kantitatif olarak incelenir. Metabolik olarak aktif hücreler mitokondrilerinin sitokrom b ve sitokrom c bölgelerinde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimleriyle tetrazolyum tuzlarındaki tetrazolyum halkasını, indirgeyici moleküllerin elektron transferleri aracılığıyla indirgerler [89, 90]. Sadece aktif mitokondriye sahip canlı hücrelerde bulunan bu aktivite sayesinde MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ve MTS 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3-(4-sülfofenil) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak canlı hücrelerin bu tuzları indirgemesiyle elde edilen renk değişimleri ölçülür. Şekil 1.5'te görüldüğü gibi katyonik bir tuz olan ve normalde sarı renkli olan MTT bileşiği anyonik hücre membranı ile elektrostatik etkileşim sonucu canlı hücrelere nüfuz eder ve canlı hücrelerde mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşürken; Şekil 1.6'da görüldüğü gibi anyonik ve sarı renkli bir tuz olan MTS ise canlı hücrelere nüfuz edebilmek için ara elektron alıcısına ihtiyaç duyar ve bu elektron alıcısının indirgemesiyle çözünebilir renkli formazan bileşiklerine dönüşür [89, 91]. Temelde aynı prensibe sahip bu yöntemler sayesinde oluşan

renk değişimi, farklı absorbanlarda ölçölerek canlı hücre ve metabolizması hakkında pozitif bir bağlantı kurulmasını sağlar.



Şekil 1.5: MTT ve formazan bileşinin yapısı.



Şekil 1.6: MTS ve formazanın yapısı.

1.7.1.1 İnsan Dermal Fibroblastları

Sitotoksosite testlerinde kullanıma uygun farklı hücre hatları bulunmaktadır. Çalışılan hastalık veya tedavi yöntemini ilgilendiren insan dokusuyla homolog hücre hatları tercih edilmesi önemlidir. Yara iyileşmesi çalışmalarında insan derisi ile eş değer ortamın sağlanması adına en sık tercih edilen hücre hatlarından biri insan dermal fibroblastlarıdır.

Embriyonik mezoderm tabakasından köken alan mezenkimal hücreler olan dermal fibroblastlar; morfoloji, aktivite, diğer hücre tipleriyle etkileşim gibi özellikler bakımından farklılık gösteren heterojen bir hücre popölasyonundan oluşan ve deri fizyolojisini düzenlemede aktif rol alan hücre tipleridir [92, 93]. Normalde sessiz (quiescent) halde bulunan fibroblast hücreleri, yara oluşumuyla TGF- β , PDGF gibi büyüme hormonlarının

salınımı ve ECM tabakasındaki mekanik uyarıların sonucu aktifleşerek migrasyon özelliği kazanırlar ve myofibroblastlara dönüşürerek yara iyileşme kaskadına katılırlar. Fibronektin, kollajen, proteoglikandan oluşan granülasyon dokusunun oluşmasında, inflamatuvar sinyal özellikleriyle salgıladıkları sitokin ve hormonlar ile derinin diğer katmanlarındaki hücreler ile iletişimin kurulmasında rol olan fibroblastlar yara iyileşmesi sırasında yaranın kontraksiyonuna ve kapanmasına da katkı sağlayan bir fenotip kazanırlar [94, 95].

Yara iyileşmesi safhasında birbirleri ve diğer hücrelerle etkileşerek yaranın kapanmasına kadar oluşan süreçte aktif rol alan insan dermal fibroblastlarının hücre kültürü ortamında yara örtü malzemeleriyle etkileştirilmesi, yara örtü malzemesinin insan derisinde doğrudan temasta yara iyileşmesine sağlayacağı katkı araştırılırken dokunun vereceği yanıtın aydınlatılması adına oldukça kullanışlıdır.

1.7.2 *In vivo* Toksisite Testleri

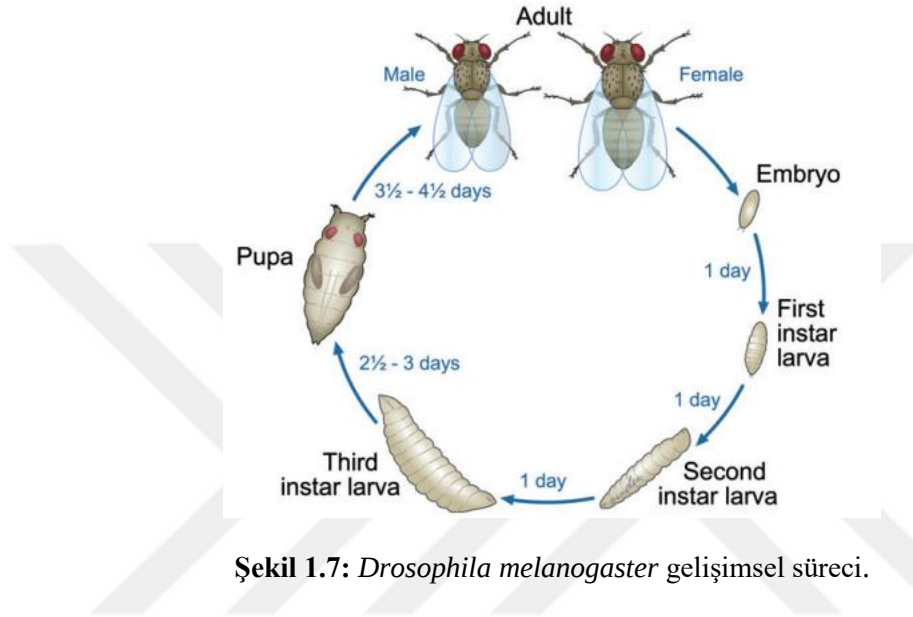
Toksikoloji çalışmalarında *in vitro* testlerden alınan verilerin güvenilirliğinin artırılması ve doğrulanması adına *in vivo* testlerin yapılmasına ihtiyaç duyulur. Kemirgen ve memeli hayvanlar kullanılarak yapılan bu testler, gerçekleştirilmesi zor, pahalı ve beraberinde etik problemler de getiren testlerdir. Biyomalzeme alanında birçok *in vivo* test yapılmasına rağmen biyomalzeme ile etkileşen canlı dokusunda oluşacak uzun dönemli etki ve biyomalzeme kaynaklı toksisitenin altında yatan moleküler mekanizmalar gibi önemli parametrelerin henüz kesin bir yanıtı bulunmamaktadır. Bu testlerin gerekliliği sebebiyle araştırmacılar, hayvan kullanımını azaltacak ve hızlı yanıt alınabilecek alternatif, pratik modeller kullanmaya yönelmişlerdir. *Drosophila melanogaster* toksikoloji çalışmalarında sık kullanılan model organizmalardan biridir [96].

1.7.2.1 *Drosophila melanogaster*

Sirke veya meyve sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster* 4 kromozomdan oluşan basit genetik yapısı ile uzun yıllardır genetik çalışmalarda tercih edilen bir model organizmadır. Bu kadar basit bir organizmanın insan hastalıklarının veya insanlarda kullanılacak bir malzemenin toksikliğinin araştırılması sırasında tercih edilme sebeplerinden en önemlileri; tüm genom dizilimi tamamlanmış olan bu canlının genlerinin, insanlarda hastalıkla ilgili yaklaşık 700'den fazla gen ile eşleşmesi ve gen ekspresyonunun

düzenlenmesinde görev alan *Drosophila* proteinlerinin insandaki eşdeğer proteinlerle oldukça fazla benzerlik göstermesidir [97].

Şekil 1.7'deki döngüyü takip ederek sırasıyla embriyo, larva, pupa ve yetişkin olarak gelişim gösteren *Drosophila*, yaklaşık 10 gün gibi kısa bir sürede gelişimsel sürecini tamamlar [96].



Şekil 1.7: *Drosophila melanogaster* gelişimsel süreci.

Larva oluşumundan sonra 40-60 gün kadar yaşayabilen ve kısa sürede diğer jenerasyonları üretilen *Drosophila*; toksik etkisi incelenecek malzemenin akut etkisi dışında özellikle kronik etkisi araştırılırken, canlılık, gelişim, üreme ve davranış faaliyetlerinin kolaylıkla takip edilebilmesi bakımından araştırmacılara büyük bir avantaj sağlar [96]. Daha önceleri memeli canlı yerine omurgasız canlı tercih kullanımı pek tercih edilmezken; düşük üretim maliyeti, hızlı üreme evresi, kolaylıkla belirlenebilen mutant fenotip gösterebilmesi gibi özellikleriyle *Drosophila*, drosphotoksikoloji olarak da bilinen yeni bir araştırma kolunun oluşmasına ve *in vivo* toksisite çalışmalarında model organizma olarak kullanımının artmasına yol açmıştır [98].

1.8 Literatür Özeti

Literatürde yara örtüsü olarak geliştirilen; PEO, PVA ve kitinden birini veya ikisini yapısında bulunduran biyomalzemelerin toksik etkilerinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Ionescu ve arkadaşları yara örtüsü malzemesi olarak kullanılmak üzere sentezledikleri hyalüronik asit/PEO temelli nanofiberlerin indirekt olarak HDF hücreleri

üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişlerdir. 96-kuyucuklu plakalarda 0.5×10^5 hücre/mL olarak ektikleri hücrelerin 24 saatlik tutunmasından sonra farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları nanofiber ekstraktlarını 72 saat boyunca hücrelerle inkübe etmişler ve ardından 20 μ L MTS çözeltisini hücre-ekstrakt karışımına ekleyip 490 nm’de absorbanslarını ölçmüşlerdir. Kontrol grubuna göre yüzdelik olarak hesapladıkları hücre canlılığına göre 500 μ g/mL konsantrasyona kadar olan ekstraktlarda herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemişler aksine propolis ve *Calendula officinalis* ekledikleri 500 μ g/mL dozlu ekstraktlarının fibroblast proliferasyonunu kontrol grubuna kıyasla %37 oranında artırdıklarını tespit etmişlerdir. PEO temelli biyomalzemelerin sitotoksik etki oluşturmamasının dışında doğal bileşenler ile desteklendiklerinde yara iyileşmesinde temel hücre tipi olan fibroblast proliferasyonunu artırmalarıyla, PEO’nun yara örtülerinde kullanılacak ideal bir iskele oldukları gösterilmiştir [99]. ECM tabakasını taklit edebilme yeteneği ile yara iyileşme sürecine katkı sağlayabilen fakat düşük mekanik özelliği ile dezavantajlı olan kitosanın yara örtüsü olarak kullanılabilmesi için fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesi gerekir. Ionescu ve ark. bir önceki çalışmalarını destekleyici nitelikte olan farklı bir çalışmalarında; elektrospin tekniği ile sentezledikleri, aktif bileşenler içeren kitosan-PEO nanoliflerinin farklı konsantrasyonlarını aynı indirekt temas yöntemi ile HDF hücreleriyle etkileştirip sitotoksik etkilerini MTS ile ölçmüşlerdir. 100 μ g/mL konsantrasyonlu örneğin canlılığı %90’ın altındayken diğerlerinde daha yüksek olup malzemelerin hiçbirinin hücrelerde sitotoksik etki oluşturmadığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ile PEO’nun destek materyali olarak kullanıldığında yara iyileşmesini olumsuz etkilemediği bulunmuştur [100]. PEO ile aynı kimyasal yapıya sahip fakat daha düşük ağırlıklı polimer olan PEG, literatürde PEO ile aynı işlevi gerçekleştirmek amacıyla sıklıkla kullanılmıştır. Wang ve ark. antibiyotikler ile konjuge ettikleri dekstran-PEG hidrojellerinin fare fibroblast hücre hattı olan NIH 3T3 üzerindeki sitotoksik etkisini XTT testi ile direkt olarak incelemişlerdir. DMEM içerisinde 1 saat bekletilip kültüre edilmiş hücrelerle temas ettirdikleri hidrojeller fibroblastlar üzerinde sitotoksik aktivite göstermemiş ve antibiyotik eklenmemiş hidrojellerle benzer hücre canlılığı göstermişlerdir [73]. PEO’nun, kronik yaralarda kullanılmak üzere tasarlanan yara örtü malzemelerinde de temel iskele olarak kullanıldığı birçok çalışma vardır. Bu çalışmalardan biri olan Nosrati ve ark.’nın yaptığı çalışmada elektrospin tekniği ile üretilmiş PEO-ZnO membranlarını, yetişkin insan dermal fibroblastları ile direkt olarak temas ettirmişler ve hücre canlılığını MTT testi ile ölçmüşlerdir. Optimum uyumlu konsantrasyon seçildikten sonra membranlara tutunan fibroblast hücreleri SEM ile görüntülenmiştir. ZnO partiküllerinin en

yüksek olduğu konsantrasyonda hücre canlılığı zamanla azalırken diğer konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir. %2 ZnO içeren PEO membranların en iyi biyouyumluluğu gösterdiği ve SEM görüntülerine göre fibroblastların membran üzerinde tutunmasının daha homojen dağıldığı rapor edilmiştir. PEO'nun porlu yapısının hücrelerde besin ve gaz değişimini olumlu etkilediği ve hücrelerin proliferasyon ve migrasyonunu artırdığı bulunmuştur. Hidrofilik yapıları ile hücre adhezyonunu destekleyen PEO iskelelerinin hücreler üzerindeki bu olumlu etkilerinin, kronik yaralarda oldukça kritik olan yara yeniden şekillenme aşaması gibi aşamalarda yara bölgesini koruma ve onarma adına oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir [72].

Sankari ve ark. büyüme faktörleri ekledikleri PVA hidrojellerinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini, doku ortamında büyüme faktörleri ve hücrelerin biyomalzeme ile temasıyla olan etkisini anlamak adına incelemişlerdir. Neutral Red yöntemi ile analiz edilen hidrojellerin, PVA konsantrasyonu arttıkça fibroblast canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Bu azalışın sebebinin PVA kompozitlerinin yapısındaki etanol konsantrasyonunun da artışından kaynaklı oluşan stresle, apoptoza uğrayan hücrelerin artışı kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Buna rağmen, PVA ile temas eden hücrelerin proliferasyonundaki artışın, sadece hücre besiyeri ile temas eden kontrol grubundaki artış ile aynı olduğu bulunmuştur. Yapısında bulunan etanole rağmen böyle bir oran elde edilmesiyle PVA'nın ECM olarak hücreler tarafından kabul edildiği tespit edilmiştir [101]. Hsieh ve ark. diyabetik yaralarda oluşan örtü değişimi zorlukları ve ikincil doku hasarı gibi sebepleri de göz önüne alarak PMMA ve PVA kopolimerlerini sentezlemişler ve L929 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini anlamak için bu polimerlerden hazırladıkları ekstraktları kullanarak indirekt temas yöntemi ile 12 saat aralıklarla hücreleri kültüre etmişlerdir. Araştırmacılar, MTT testi sonucuna göre ekstraktların hücre canlılığını etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Laktat dehidrogenaz yöntemi kullanılarak, tekrar kültüre edilen hücre ve polimerlerin toksisiteleri incelenmiş ve fibroblast hücrelerinden salınan LDH oranının kontrol grubunda deneysel grupla aynı olduğu ve ekstraktların hücre membranına herhangi bir zarar vermediği anlaşılmıştır [102].

Yara iyileşmesinde hidrojellerin optimal sertlik derecesinde olması fibroblastların myofibroblastlara dönüşmesi, yara kapanması, ECM sentezi gibi yara iyileşmesini tetikleyen olayları da doğrudan etkiler. Xia ve ark. kristal formda kitin ve kitosan nanopartikülleri ile sentezlenen hidrojellerin, L929 hücrelerinde yaptıkları MTT testinde

herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemişler ve *in vivo* ile destekledikleri çalışmada hidrojenlerin yeniden epitelleşme ve damar oluşumunu tetikleyip hızlı iyileşme sağladığını ve kronik yaralara uygun olduğunu bulmuşlardır [103]. Tyliczak ve ark. kitosan ve nanoaltın kullanarak fotopolimerizasyon ile hazırladıkları hidrojenlerin fibroblast BJ hücrelerinde etkisini incelemek için indirekt temas metodu kullanarak hazırladıkları ekstraktlarla hücreleri muamele etmişler ve MTT, XTT testleri ile canlılığı ölçmüşlerdir. Altın nanopartikülünün yüksek konsantrasyonu dışında hidrojenlerin tüm formunun hücrelerin proliferasyonunu olumlu etkilediği bulunmuştur [104].

Literatürde doku mühendisliği ve biyomalzeme alanında tercih edilen, farklı yöntemlerle sentezlenen ve farklı bileşenlerle birleştirilerek tasarlanan çeşitli sayıda biyoyumlu hidrojel bulunmaktadır. PEO ve PVA ile desteklenen hidrojenler olduğu gibi kitin yerine daha çok kitosan formu tercih edilmiştir. Spesifik olarak bakıldığında ise bu tezde kullanılan PEO/PVA/Nanokitin kompozit hidrojenlerin yara iyileşmesi üzerine etkisine dair herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Literatürdeki *in vivo* toksisite testlerine bakıldığında hidrojenlerin ve yara örtü malzemelerinin fare, sıçan, domuz gibi hayvanlarda etkisine daha fazla bakıldığı görülmüştür. *Drosophila melanogaster* üzerindeki *in vivo* toksisite çalışmalarında ise özellikle nanopartikül içerikli kompozit çalışmalarına daha sık rastlanmıştır. Yara örtü çalışmaları için kullanılan biyomalzemeler veya hidrojenlerin *Drosophila melanogaster* üzerindeki toksik etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Örneğin Sood ve ark. GO-ZnO nanopartiküllerinin *Drosophila melanogaster Oregon-R* suşlarında toksik etkilerini incelemek için yumurtadan yetişkin sinek olana kadar olan gelişimin takibi, mortalite hızı, larva sürünme testi, tırmanma testi gibi farklı yöntemleri kullanmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanokompozitlerin kontrol grubuna göre gelişim süresini yavaşlattıkları, yüksek konsantrasyonlu (100 ve 300 µg/mL) nanokompozitlerin %100 mortaliteye sebep olduğu bulunmuştur. Toksisitenin neden olduğu davranışsal zararları gözlemlmek için yapılan larval sürünme testine göre yüksek doz nanokompozitli ortamda larvalar daha az kıvrılma hareketi göstermişlerdir [105]. Gautam ve ark. biyomedikal uygulamalarda kullanmak üzere sentezledikleri hBN-ZrO₂ kompozitlerinin farklı dozlarını *Drosophila melanogaster Oregon-R* suşlarının besiyerlerine ilave edip gelişimini tamamlamalarını beklemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda sentezledikleri kompozitlerin bazılarının larvadan pupaya dönüşümü

geciktirdiği bazılarının ise herhangi bir etki oluşturmadiğı gözlenmiştir. Larva sürünme testine göre de bazı dozlardaki kompozitler larvaların agar üzerinde daha karışık ve petrinin periferinden uzak bir hareket sergilediklerini tespit etmişlerdir [106]. Toksik etkisi olan nanokompozitlerin larvaların motor nöron gelişimini etkileyerek nöral sağlığını bozmaları toksik etkinin getirdiği ve doğrudan gözlemlenebilen bir sonuçtur. Farklı dozlarda farklı etkileri bulunan nanokompozitlerin biyomedikal uygulamalarda kullanım için uygun formunun seçilmesini sağlama adına *Drosophila melanogaster* oldukça verimli bir model organizmadır.

1.9 Amaç ve Kapsam

Güncel yara örtüsü geliştirme amaçlı yapılan biyomalzeme çalışmalarında, biyomalzeme sentezinden sonra kullanılış amacına uygun hücre hatlarında sitotoksik etkisinin incelenmesi yara örtü malzemelerinin insan vücudunda kullanımından önceki en önemli adımlardan biridir. Farklı özelliklerde farklı materyallerin birleştirilmesiyle oluşturulan çok sayıda yara örtü malzemesi bulunmasına rağmen, yara iyileşmesinin kompleks mekanizması ve yara oluşumuna bağılı altta yatan farklı sebepler sonucu her yara için kesin sonuç verecek yara örtü malzemesi geliştirmesi oldukça zordur. Özellikle geç iyileşen kronik yaralar için geliştirilecek yara örtü malzemelerinin etkinliğinin incelenmesi, yara örtü malzemelerinin kalitesinin artırılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır [107].

Bu çalışmada öncelikle yara iyileşmesi sürecinde önemli görevleri bulunan temel hücre tipi olan insan dermal fibroblastları hücre kültür ortamında çoğaltılarak PEO, PVA ve nanokitin kompozitlerinden oluşan hidrojellerle indirekt ve direkt olarak temas ettirilmiş ve sitotoksitesi MTT ve MTS yöntemleri ile incelenmiştir. Ardından *in vitro* testler sonucu anlamlı sonuçlar elde edilen kompozitler seçilerek *Drosophila melanogaster* gelişimi ve davranışları üzerine olan toksik etkileri incelenmiştir. *In vivo* toksisite testleri için; pupaya dönüşme başarısı olan puparasyon, pupadan yetişkine dönme başarısı olan pupadan çıkma ve yetişkin/larva oranının kıyaslandığı canlılık oranı hesaplanarak gelişimsel testler, ardından da larval sürünme ve yetişkin tırmanma testlerinden oluşan davranış testleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle *in vitro* koşullar ile *in vivo* koşullar kıyaslanarak biyomateryallerin hücreler üzerindeki sitotoksik ve *Drosophila melanogaster* üzerindeki toksik etkisi hakkında kıyaslamalar yapılmış ve insanda kullanımı öncesi biyoyuumluluk profilleri hakkında bilgi edinilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

2.1.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Yetişkin primer insan dermal fibroblast hücre hattı ticari olarak ATCC firmasından temin edilmiştir (Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult, ATCC® PCS-201-012™). Hücre kültüründe rutin olarak gerçekleştirilen işlemler için ticari olarak satın alınan kimyasallar Tablo 2.1’de, kullanılan diğer kimyasal ve sarf malzemeler Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Hücre büyütülmesi ve pasajlanması için gerekli kimyasallar.

Bileşen	Marka
Fibroblast Growth Kit-Low serum	ATCC® PCS-201-041™
Fibroblast Basal Medium	ATCC® PCS-201-030™
Phosphate Buffered Saline Tablet	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA for Primary Cells	ATCC® PCS-999-003™

Tablo 2.2: Diğer kimyasallar ve sarf malzemeler.

Malzeme	Marka
Hücre kültür şişesi 25 cm ² delikli kapak	ISOLAB 120.01.025
Hücre kültür şişesi 75 cm ² delikli kapak	ISOLAB 120.01.075
24 well plate (hücre kültürü plakası)	ISOLAB 122.11.024
96 well plate (hücre kültürü plakası)	ISOLAB 122.11.096
Mikrosantrifüj tüpü-P.P 2 mL	ISOLAB
Şırınga Filtresi Steril- 0,22 µm-PVDF	ISOLAB
Tüp santrifüj P.P 15 mL DNA/RNA free	ISOLAB
Tüp santrifüj P.P 50 mL DNA/RNA free	ISOLAB
Pipet ucu (10,200,1000 µL şeffaf)	ISOLAB
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	ISOLAB
Ethanol %96 Extra Pure	ISOLAB
Hemasitometre Neubauer Lamı	ISOLAB
Lamel	ISOLAB
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich
Cryovial Tüp (2 mL)	Sarstedt
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega
Cell Proliferation Kit 1 (MTT)	Roche
Enjektör (5 mL)	Setecoject
Virkon S	Refarm

2.1.1.2 *Drosophila in vivo* Toksisitesinde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Kullanılan *Drosophila melanogaster* suşu yabancı *Oregon-R* tipidir ve kendileştirilerek saf soy elde edilmiştir. Testler sırasında kullanılan kimyasal ve malzemeler Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3: *Drosophila* testlerinde gerekli kimyasallar ve malzemeler.

Dietil Eter (ISOLAB)
Propiyonik Asit (Merck)
Mikostatin Oral Süspansiyon (Deva)
Agar (Sigma Aldrich)
Maya
İrmik
Toz Şeker
Polistiren Steril Petri Kabı (ISOLAB)
Cam Şişe
Milimetrik Kâğıt
Boya Fırçası
Mezür
Pamuk

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

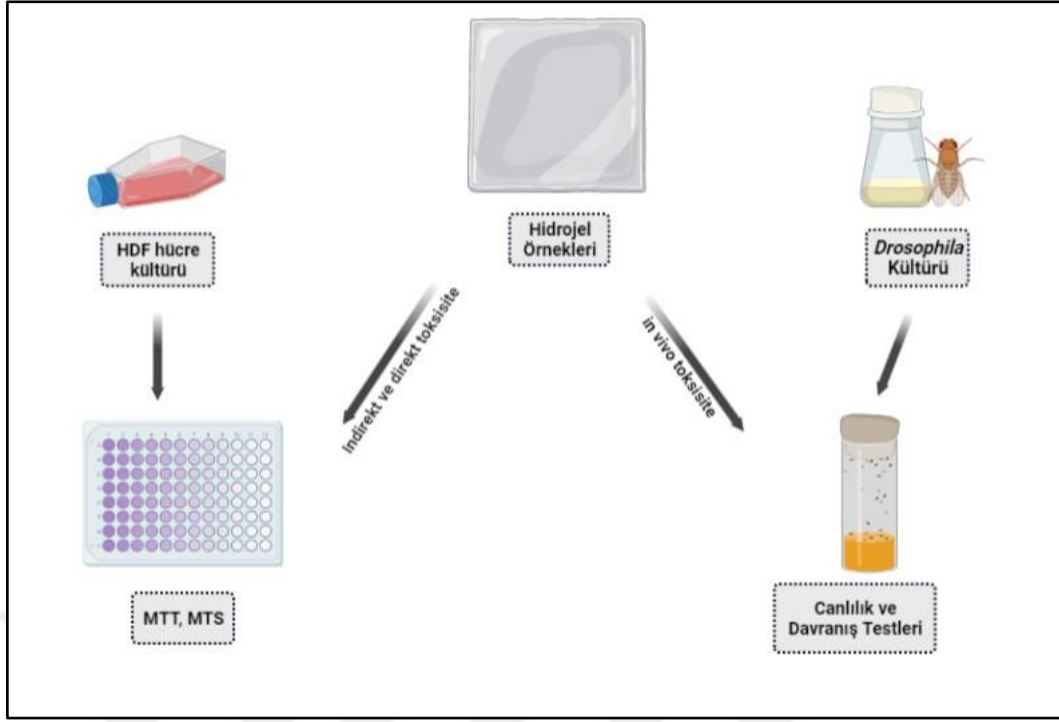
Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka
Analitik Terazî	Denver Instrument
Biyogüvenlik Kabini	Labconco
Buzdolabı (+4°C)	Regal
Buzdolabı (-20°C)	Altus
Dondurucu (-80°C)	Nuaire Glacier
Canlı Hücre Görüntüleyicisi (JuLI)	Nano Entek
CO ₂ 'li inkübatör	Nuaire
Faz Kontrast Mikroskobu	Olympus
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikropipet Seti	Eppendorf
Mikroplaka Okuyuculu Spektrofotometre	Thermo Scientific
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	Human Power I
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 380R
Su Banyosu	Elma Sonic

2.2 Metot

Hidrojel örneklerinin yara örtü malzemesi olarak kullanımının uygunluğunun araştırıldığı bu tezde biyomalzemelerin HDFa hücrelerindeki sitotoksik etkisi *in vitro* ve *Drosophila melanogaster* üzerindeki toksik etkisi *in vivo* toksisite testleri ile yapılmış ve tez çalışmasının genel metodolojisi Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1: Tez çalışmasının genel metodolojisi.

2.2.1 Hidrojel Örneklerinin Hazırlanması

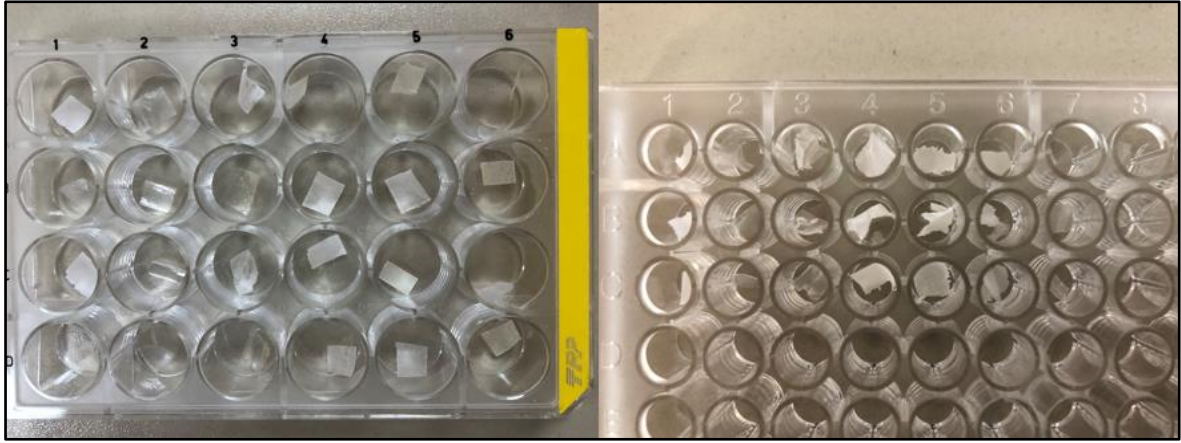
Daha önceden sentezlenen PEO, PVA ve kitinden oluşan hidrojeller %1, %2.5 ve %5 kitin ilaveli ve ilavesiz olarak 12 farklı şekilde Tablo 2.5'teki gibi sınıflandırılmıştır.

Tablo 2.5: Hidrojel örnekleri sınıflandırması.

PEO	PVA	PEO/PVA
PEO %1 Kitin	PVA %1 Kitin	PEO/PVA %1 Kitin
PEO % 2.5 Kitin	PVA % 2.5 Kitin	PEO/PVA % 2.5 Kitin
PEO %5 Kitin	PVA %5 Kitin	PEO/PVA %5 Kitin

ISO 10993-5 ve ISO 10993-12 standartları kapsamında gerçekleştirilen sitotoksikite testleri için hidrojeller; ekstrakt oluşturmaya dayanan indirekt kontakt test ve test edilecek hidrojelin kendisini doğrudan kullanmaya dayanan direkt kontakt test için farklı formlarda

deney öncesi hazırlanmıştır (Şekil 2.2). Indirekt test için kullanılacak hidrojel örnekleri, 24-kuyucuklu plakaların içine sığacak büyüklükte ($\sim 1.5-1.9 \text{ cm}^2$), direkt test için kullanılacak hidrojeller ise 96-kuyucuklu plakaların içine sığacak büyüklükte ($\sim 0.32 \text{ cm}^2$) kesilmiş ve her örnek ayrı kuyucukta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Malzemeler kesilirken her malzemenin eşit boyutlarda ve düz bir yüzeye sahip olmasına, boyutlarının testin gerçekleşeceği alanlar olan plakalardaki kuyucuk hacminin çoğunluğunu kaplamasına dikkat edilmiştir. Malzemelerin sterilizasyonu için hazırlanan plakalar ağzı açık bir şekilde 24 saat boyunca laminar kabinin içerisinde UV ışığa maruz bırakılmış ve sonrasında örneklerin kullanımı yalnızca kabinin içerisinde ve steril forsep kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.2: Direkt ve indirekt test için kuyucuklara yerleştirilen hidrojel örnekleri.

2.2.2 *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

ATCC® PCS-201-012™ kodlu insan dermal fibroblast hücrelerinin ihtiyaçlarına uygun şekilde hücre kültürü ortamında gerekli işlemler gerçekleştirilmiştir. Hücre hattının genel özellikleri Tablo 2.6'da verilmiştir.

Tablo 2.6: İnsan dermal fibroblast hücre hattı genel özellikleri.

Hücre: Human Dermal Fibroblast (HDFa)

Ürün Kodu: ATCC; PCS-201-012™

Hücre Tipi: Primer

Hücre Çeşidi: Fibroblast

Hücre Morfolojisi: İğsi şekil, çift kutuplu hücre

Donör canlı: *Homo sapiens*, insan

Donör durumu: Normal, yetişkin

Doku: Deri

Büyüme tipi: Adherent (yapışkan)

2.2.2.1 Sterilizasyon

Hücre kültür laboratuvarı, çalışmalara başlanmadan önce mikrobiyal kontaminasyonun engellenmesi için detaylıca sterilize edilmiştir. CO₂'li inkübatör boşaltılıp her rafı ayrı ayrı çıkarılarak virkon çözeltisi, ardından %70'lik EtOH ile temizlenmiş ve bu işlem inkübatör 37°C'de bir süre çalıştırıldıktan sonra tekrarlanmıştır. Laminar kabin için de aynı şekilde virkon, ardından %70'lik EtOH ile kullanılacak alanlar ve cam yüzey detaylıca temizlenmiş ve kabin temizliği her çalışma öncesi ve sonrası tekrarlanmıştır. Hücre kültürü laboratuvarında bulunan santrifüj cihazı, mikroskop, çalışma yüzeyleri %70'lik EtOH ile, laboratuvar zemini ise çamaşır suyuyla silinmiştir. Bu işlemler periyodik olarak tekrarlanmış ve laboratuvar kullanılmadığında laminar kabinin ve odanın UV ışığı açılarak sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Kabin içerisinde çalışılırken kullanılacak pipet ucu, santrifüj tüpü, beher gibi malzemeler 121°C, 1.02 atm basınçta 20 dakika otoklavlandıktan sonra etüv içerisinde kurutulmuş ve kabin içerisine sokulmadan önce %70'lik EtOH ile yüzeyleri silinmiştir.

2.2.2.2 Kültür Ortamı Bileşenlerinin Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan ve esansiyel ve non-esansiyel aminoasitler, vitamin, mineral ve inorganik tuzları içeren fibroblast bazal medyum (ATCC® PCS-201-030™), yine ticari olarak satın alınan fibroblast büyüme kiti (ATCC® PCS-201-041™) bileşenleriyle

karıştırılarak fibroblast büyümesi için ideal koşulları sağlayan ve hücre sağlayıcısı firma tarafından önerilen bir tamamlanmış besiyeri oluşturulmuştur. Bileşenlere ek olarak Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B çözeltisinden de 0.5 mL bu besiyerine eklenmiştir. Bunun için öncelikle -20°C’de bulunan büyüme kiti çıkarılmış, kit bileşenleri 37°C’ye ısıtılmış su banyosunda çözündürülmüş ve L-glutamin çökeltisinin iyice çözünmesi için hafifçe çalkalanmıştır. Bileşen şişelerinin yüzeyleri %70’lik EtOH ile silinip kabin içerisine alınmış ve +4°C’den çıkarılan bazal medyum içerisine, aseptik koşullar gözetilerek Tablo 2.7’deki hacimlere göre ayrı ayrı eklenmiştir. Bileşenlerin homojen dağılması için medyum şişesi hafifçe çalkalanmış, bileşenler eşit dağıldıktan sonra sonraki kullanımlar için medyum 15 mL’lik falkonlarda alikotlanmış ve +4°C’de saklanmıştır.

Tablo 2.7: Fibroblast büyüme kiti bileşenleri.

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyonu
rh FGF basic	0.5 mL	5 ng/mL
L-glutamin	18.75 mL	7.5 mM
Askorbik asit	0.5 mL	50 µg/mL
Hidrokortizon hemisüksinat	0.5 mL	1 µg/mL
rh Insulin	0.5 mL	5 µg/mL
Fetal Bovin Serum	10 mL	%2

Tablet formunda bulunan ticari PBS kimyasalı 1 tablet/100 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözündürüldükten sonra 121°C’de 20 dakika otoklavlanmış ve çökeltmenin engellenmesi için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2.2.2.3 Hücre Çözdürülmesi

Ticari olarak cryovial tüp içerisinde dondurulmuş olarak gelen ve -80°C’de muhafaza edilen HDFa hücre stoğunun daha önce 37°C’ye ısıtılan su banyosunda kapağından tutulmak suretiyle, tüpün yarısı suyun içine girecek şekilde 1-2 dakika boyunca yavaşça sallanarak çözülmesi sağlanmıştır. Tüpün içerisinde az miktar buz parçası kalınca su banyosundan alınıp %70’lik EtOH ile spreylendikten sonra laminar kabinin içerisine alınmıştır. Besiyeri/yüzey alanı oranı 1 mL / 5 cm² olacak şekilde daha önceden 37°C’de ısıtılan tamamlanmış besiyerinden 15 mL alınarak T-75 flaskına aktarılmıştır. Hücre stoğunun kapağı açılıp yavaşça pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu homojenize edilmiş

ve buradan 1 mL hücre süspansiyonu alınarak 15 mL besiyeri içeren flaska eklenmiştir. Kapağı kapatılan flask yavaşça sallanıp hücrelerin eşit dağılması sağlanmış ve 37°C, %5 CO₂'li inkübatör ortamına konulmuştur. Bir sonraki işlemler için en az 24 saat boyunca inkübatörün kapağının açılmamasına dikkat edilmiştir.

2.2.2.4 Pasajlama

Morfolojileri ve büyüme oranları mikroskop altında günlük olarak kontrol edilen hücreler %80-90 konfluent olduklarında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için gerekli olan Tripsin-EDTA çözeltisi ve tamamlanmış besiyeri 37°C'de ısıtılmıştır ve steril koşullarda kabin içerisine alınmıştır. İnkübatörden çıkarılan hücre flaskı içerisindeki besiyeri atık kabına atılmış ve ardından tutunmuş hücreleri içeren flask, yüzeyde kalan serum izlerinin giderilmesi için 2 kez 10 mL PBS kullanılarak yıkanmıştır. 3 mL Tripsin-EDTA çözeltisi flaska eklenmiş, yüzeyi eşit kaplaması sağlanmış ve inkübatör içerisinde 37°C'de 5-10 dakika bekletilmiştir. Yaklaşık 5 dakika içinde hücrelerin birbirlerinden uzaklaştığı ve yukarı yuvarlanmaya başladığı görüldüğünde yapışık kalan hücrelerin kopması için yavaşça farklı noktalardan flask tabanına vurulmuştur. 10 dakikadan fazla tripsinizasyona maruz bırakmamaya dikkat edilerek, hücrelerin çoğunluğu koptuktan sonra 7 mL tamamlanmış besiyeri (complete medium) eklenerek tripsin nötralize edilmiştir. Falcon tüpüne alınan hücreler 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş, supernatant atılmış ve pellet 7 mL tamamlanmış besiyeri eklenerek çözdürülmüştür. İçerisine 15 mL besiyeri konulan ayrı bir flaska, bu nötralize edilmiş hücre solüsyonundan 1 mL alınarak eklenmiş ve flask 37°C, %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır.

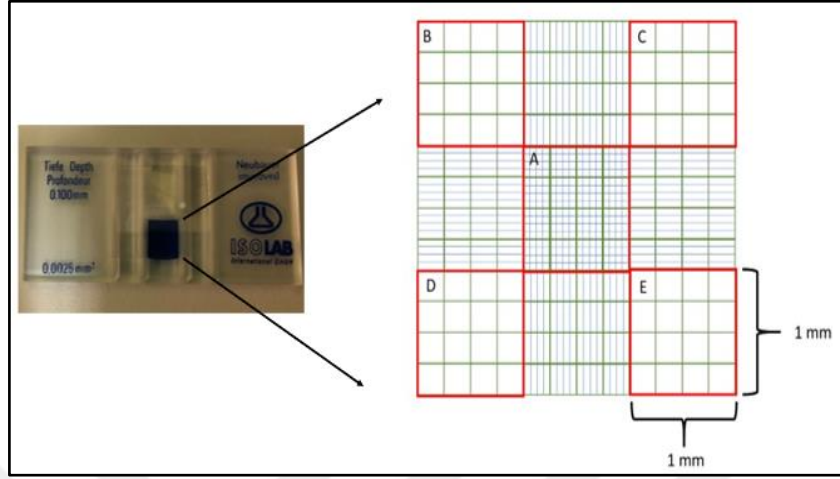
2.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması

Falcon tüpte kalan 9 mL hücre çözeltisi iki ayrı tüpe bölünerek bir tüp dondurulacak hücreler için ayrılmıştır. 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant yavaşça dökülmüştür. %10 DMSO, %10 FBS ve %80 tamamlanmış besiyeri içeren dondurma çözeltisi taze olarak hazırlanmış ve pellet bu çözelti içerisinde çözdürülmüştür. Her bir cryovial tüpe 1 mL bu çözeltiden eklenerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.2.2.6 Hücre Sayısı Optimizasyonu

Membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerden geçemeyen tripan mavisi, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerden geçerek intraselüler proteinlere bağlanır ve ölü

hücrelerin koyu, mavi renkte gözükmelerini sağlar [108]. Boya dışlama yöntemi olarak da bilinen bu yöntemle; her biri 1mm² alana sahip 9 ızgaradan oluşan hemasitometre lamına (Şekil 2.3) hücre çözeltisi alınarak birim hacimde ne kadar hücre bulunduğu hesaplanır.



Şekil 2.3: Hemasitometre lamı ve sayım ızgarası alanı görünümü.

Önceden sayım için ayrılan hücreleri içeren falkon tüpü, 1500 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırılmış ve pellet 5 mL tamamlanmış besiyeri içerisinde çözülmüştür. Hemasitometre lamı ve lamel kullanımdan önce %70’lik alkolle temizlendikten sonra 10 µL hücre ve 10 µL tripan mavisi (1:1 dilüsyon) homojen olarak karıştırıldıktan sonra 10 µL karışım lamelin altındaki çukura, hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat ederek eklenmiştir. Mikroskop altında 4 köşede bulunan canlı hücreler sayılarak 1 mL’deki ortalama hücre sayısı;

$(4 \text{ bölgede bulunan toplam hücre sayısı} / 4) \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$ formülü ile hesaplanmıştır.

2.2.2.7 Indirekt Sitotoksisite Testleri

İndirekt sitotoksistede kullanılmak üzere öncelikle hidrojellerin ekstraktları hazırlanmıştır. Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde kesilen ve sterilize edilen hidrojeller, deney öncesi kullanıma hazır olacak şekilde; 24 kuyucuklu plakalar içerisine yerleştirilmiş ve üzerine her kuyucuğa 2 mL tamamlanmış besiyeri ilave edilerek 120 saat 37°C’de bekletilmiştir. Süre sonunda hidrojeller steril forsepe ile atılmış ve ekstraktlar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Ekstraksiyon ortamı olarak tamamlanmış medyum seçilmesinin sebebi hem içerdiği serum ile hücresel büyümeyi desteklemesi hem de polar ve polar olmayan bileşenler içermesidir. Ekstraksiyon sıcaklığının 37°C’yi geçmemesi, besiyeri

bileşenlerinin ve serumun kimyasal yapısının bozulmaması adına önemlidir [85]. Ekstraksiyon sırasında filtrasyon veya pH ayarlanması gibi değişiklikler test sonuçlarını etkilememek adına yapılmamıştır.

Hazırlanan ekstraktlar kullanılarak HDFa fibroblast hücreleri üzerinde MTT testi gerçekleştirilmiştir. Yeterli pasaj sayısına ulaşan ve hemasitometre ile sayımı yapılan hücrelerden 96 kuyucuklu plakalara, $7,4 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 100 µL eklenmiştir. 24 saat ve 48 saat için ayrı ayrı hazırlanan plakalarda hücre tutunması gerçekleşene kadar takip edilmiş, hücreler tutunduktan sonra besiyeri atılmış ve hazırlanan ekstraktan 100 µL eklenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri atılmış ve MTT testi yapılacak hücrelerin üzerine 100 µL taze besiyeri ve 10 µL MTT reaktifi eklenmiştir ve 37°C’de 4 saat bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan sıvılar çekilmiş ve kit içerisinde bulunan ve formazan kristallerini çözmek için kullanılan reaktiften 100 µL eklenmiş, 24 saat 37°C’de bekletilmiş ve 570 nm’de mikropilaka okuyucu spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır. Aynı işlemler 48 saatlik plaka için de tekrarlanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir ekstrakt eklenmemiştir. Her bir grup için test 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. MTT testi sonucunda elde edilen absorbans değerleri yüzde olarak kontrol grubu değerlerine oranlanarak hesaplanmıştır.

2.2.2.8 Direkt Sitotoksite Testleri

96 kuyucuklu plakalara 100 µL hücre çözeltisi eklenmiş ve 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler yapışmışsa 100 µL taze besiyeri eklenmiş ve Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı gibi kesilen ve sterilize edilen örnekler hücrelerin üstüne yerleştirilmiştir. Kontrol grubuna kompozit eklenmemiştir. Ertesi gün kompozitler steril forsepe ile kaldırıldıktan sonra kuyucuklara 20 µL MTS reaktifi eklenmiş ve 4 saat sonunda 490 nm’de ölçüm alınmıştır. Aynı işlemler bir sonraki gün 48 saat plakası için de tekrarlanmıştır. MTS testi sonucunda elde edilen absorbans değerleri yüzde olarak kontrol grubu değerlerine oranlanarak hesaplanmıştır. Her bir grup için test 3 tekrarlı çalışılmıştır.

2.2.3 In vivo Drosophila Çalışmaları

Testler boyunca *Oregon-R* yabanıl tip (wild type) soy kullanılmış ve 22°C ve %60 nem içeren inkübatörde üretim gerçekleştirilmiştir. İnkübatörden sadece testler sırasında çıkarılan *Oregon-R* soyları birkaç jenerasyon boyunca üretimi gerçekleştirilip kendileştirildikten sonra testler için kullanılmıştır.

2.2.3.1 *Drosophila* Besiyerinin Hazırlanması

Yaklaşık olarak 250 mL'lik cam şişelerde, şişe tabanına yerleştirilen standart bir besiyeri kullanılarak yetiştirilen *Drosophila* suşları için taze besiyeri hazırlanmalı ve pasajlamalar sırasında sinekler yeni besiyerlerine aktarılmalıdır. Besiyeri hazırlanırken 500 mL saf su içerisinde, su kaynarken sırasıyla 43 g toz şeker ve 9 g agar çözdürülmüş, ardından 90 g irmik eklenmiş ve şişinceye kadar karıştırılmıştır. 3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 25 g maya, 0.3 g mikostatin ve son olarak 5 mL propiyonik asit eklenerek homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Önceden otoklavlanmış cam şişelere beklemeden karışım 25'er g olarak aktarılmış ve şişelerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak soğumaya ve katılaşmaya bırakılmıştır. Pasajlama işlemleri için sonradan kullanılacak olan şişeler ağızları kapatılarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.2 Ekstraktların Hazırlanması

Önceden sterilize edilmiş hidrojel örnekleri 20 mg/mL olacak şekilde stok konsantrasyonlar halinde distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok konsantrasyonlar 50 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde iki farklı dozda seyreltilmiştir. Besiyerler hazırlandıktan sonra malzeme ekstraktları besiyerlerine eklenmiş ve besiyerine eşit dağılması sağlanmıştır. Kontrol grubunda sadece besiyeri kullanılmıştır. Hidrojel örneklerinden *in vitro* sonuçlarda her grupta en anlamlı aktivite gösteren gruplar seçilmiştir (%2.5 kitin ilaveli PEO ve PVA, %5 kitin ilaveli PEO/PVA).

2.2.3.3 Gelişim Testleri

Toksik etkisi incelenecek olan hidrojellerle beslenen *Drosophila* larvalarının pupa ve yetişkine dönme oranlarını ve canlılıklarını takip etmek amacıyla yapılan gelişim testleri Liu ve ark.'larının yöntemi kullanılarak modifiye edilmiştir [109]. Farklı dozlara maruz bırakılacak larvaların oluşturulması için standart besiyeri bulunan şişeler içerisine 25 dişi ve 25 erkek yetişkin *Drosophila* aktarılmış ve 48±4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan 1.evre larvalar besiyerinden temizlenerek bir fırça yardımıyla sayılarak toplanmış ve eşit sayılarda olacak şekilde ekstraktlarla muamele edilmiş deney şişeleri ve ekstrakt içermeyen kontrol grubu şişelerine aktarılmıştır. Şişeler pupa ve yetişkin oluşumu için 22°C'ye kaldırılmış ve gelişimleri takip edilmiştir. Yaklaşık 10 gün süren larvadan pupaya ve pupadan yetişkine dönüşme süresi boyunca her gruptaki pupa ve yetişkin sayıları ayrı ayrı not edilmiştir. Yetişkinlerin sayılabilmesi için eter ile bayıltma işlemi gerçekleştirilmiştir. *Drosophila* yetişkinleri yer çekiminin tersine, ışığa ve

kokuya yönelim göstererek şişe içerisinde uçarlar ve şişe dışından gözle sayılmaları oldukça zordur. Bu sebeple şişenin pamuğu hızlı bir şekilde dietil etere batırılmış pamuk ile değiştirilerek eterizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Uzun süre dietil etere maruz bırakmamaya dikkat edilerek yaklaşık 2-3 dakika içinde hareketsiz kalıp tabana düşen sinekler ayrı bir kaba alınıp sayımı gerçekleştirilmiş ve ardından eski ortamlarına aktarılmıştır. Deney her grup için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna göre yüzdelik alınarak hesaplanan puparasyon, pupadan çıkma ve canlılık yüzdeleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır;

% Puparasyon: $\text{Pupa sayısı/Larva sayısı} \times 100$

% Canlılık: $\text{Yetişkin sayısı/Larva sayısı} \times 100$

% Pupadan çıkma: $\text{Yetişkin sayısı/Pupa sayısı} \times 100$

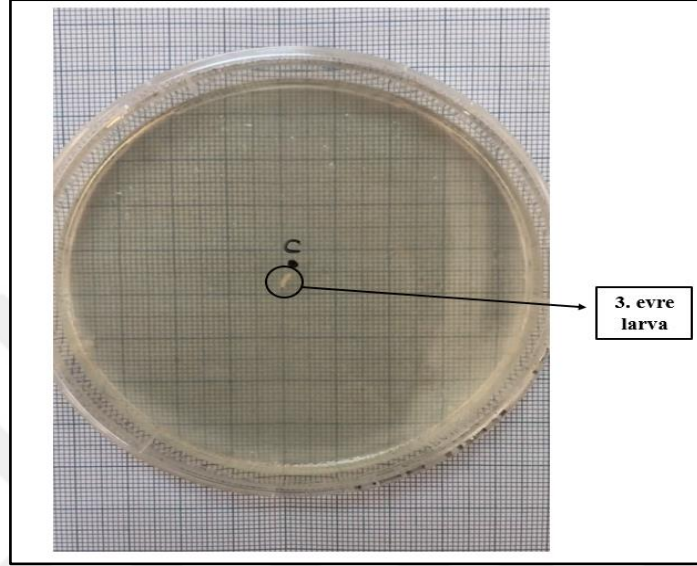
2.2.3.4 Davranış Testleri

Farklı gelişimsel evrelerde, herhangi bir organizmanın toksisitesi araştırılan uyarana karşı verdiği yanıtlar, organizmanın fizyolojisinde gerçekleşen fiziksel ve kimyasal değişimler sonucu gerçekleşir ve davranış olarak adlandırılır. Kronik dönemli toksisitenin belirlenmesi adına kullanışlı bir parametre olan davranış toksisitesi, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidrojel ekstraktlarına maruz bırakılan *Drosophila* larva ve yetişkinlerinde incelenerek larval sürünme testi ve yetişkin tırmanma testi gerçekleştirilmiştir.

Larvalar kas ve sinir sistemlerinin bir fonksiyonu olarak; büzülme ve genişleme ile karakterize koordineli bir hareket gösterirler. Sağa-sola kıvrılma, düz sürünme, kazarak ilerleme, ağır hareket etme gibi normalden farklı hareketler içeren davranışların incelendiği bu testte toksik ajana bağlı olarak gelişen erken nöral hasarların etkisiyle, larvaların hareketlerinde gerçekleşen değişimler takip edilir [110]. Gautam ve ark.'larının yöntemi modifiye edilerek test gerçekleştirilmiştir [106].

Daha önceden farklı dozlarda hazırlanan ve besiyerlerine eklenen hidrojellere maruz bırakılan yetişkin dişi ve erkek sineklerden elde edilen 3.evre larvalar her bir test grubu için ayrı ayrı olacak şekilde toplanmış ve üzerlerindeki besiyerlerinden arındırılmıştır. Her bir kontrol ve test grubu için 90 mm'lik petri kaplarına %2'lik agar eklenmiş ve katılaşması için bir süre beklenmiştir. Sırasıyla her gruptan alınan larvalar Şekil 2.4'teki

gibi petri kaplarının ortasına yerleştirilmiş ve konuldukları andan itibaren olan hareketleri işaretlenmiştir. Hareketin gözlenmesi için petri kaplarının arkasına milimetrik kâğıt yerleştirilerek ortalanmış, eş zamanlı olarak sabit bir uzaklıktan yerleştirilen kamera ile hareketler kayıt altına alınmıştır. Larvaların 1 dakika içerisinde aldıkları yol cm cinsinden hesaplanmış ve deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.4: Larva sürünme testi platformu.

Çiftleşme, besin arayışı gibi aktivitelerde önemli bir rolü olan uçuş kabiliyeti, yetişkin *Drosophila* davranışında gözlenebilen standart bir parametre olup, toksik ajana bağlı olarak duyuşal ve motor faaliyetlerde oluşan dengesizliğin bir sonucu olarak etkilenebilen lokomotor bir aktivitedir [111]. Mishra ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek test gerçekleştirilmiştir [112].

Farklı dozlarda hidrojel içeren besiyeri ortamında yetişkin hale gelen sinekler ve herhangi bir bileşen eklenmeyen kontrol grubunda yetişkin hale gelen sinekler; her grup ayrı olacak şekilde Şekil 2.5'teki gibi 100 mL'lik dereceli silindire aktarılmıştır. Dereceli silindire 80 mL çizgisinde bir işaret konulmuştur. Silindir içerisine aktarılan sinekler ortama uyum sağlamaları için birkaç dakika bekletilmiş ve kaçmamaları için dereceli silindirin ağzı pamuk ile kapatılmıştır. Dereceli silindirin arkasına beyaz bir düzlem yerleştirilmiş ve sabit bir noktadan kamera kaydı alınmıştır. Ortama alışan sinekler 3-4 defa silindire vurulmak kaydıyla tabana indirilmiş ve 1 dakika içerisinde işaret çizgisini geçebilen sinekler gözlenmiştir. Her grup için ayrı ayrı 1 dakika içerisinde belirli çizgiyi geçen sayısı

yüzdelik olarak hesaplanmış ve deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her tekrar öncesi sineklerin ortama alışması için birkaç dakika süre verilmesine dikkat edilip deney gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.5: Yetişkin tırmanma testi platformu.

2.2.4 İstatistik

İstatistiki analiz için Microsoft Office Excel programı kullanılmıştır. N=3 olacak şekilde tekrarlı gerçekleştirilen testlerdeki örneklemelerin ortalama standart sapma ve standart hata değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık değerlerinin belirlenmesi için Excel'in Paired Student T Testi fonksiyonu kullanılmış ve $p < 0.05$ olan tüm değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

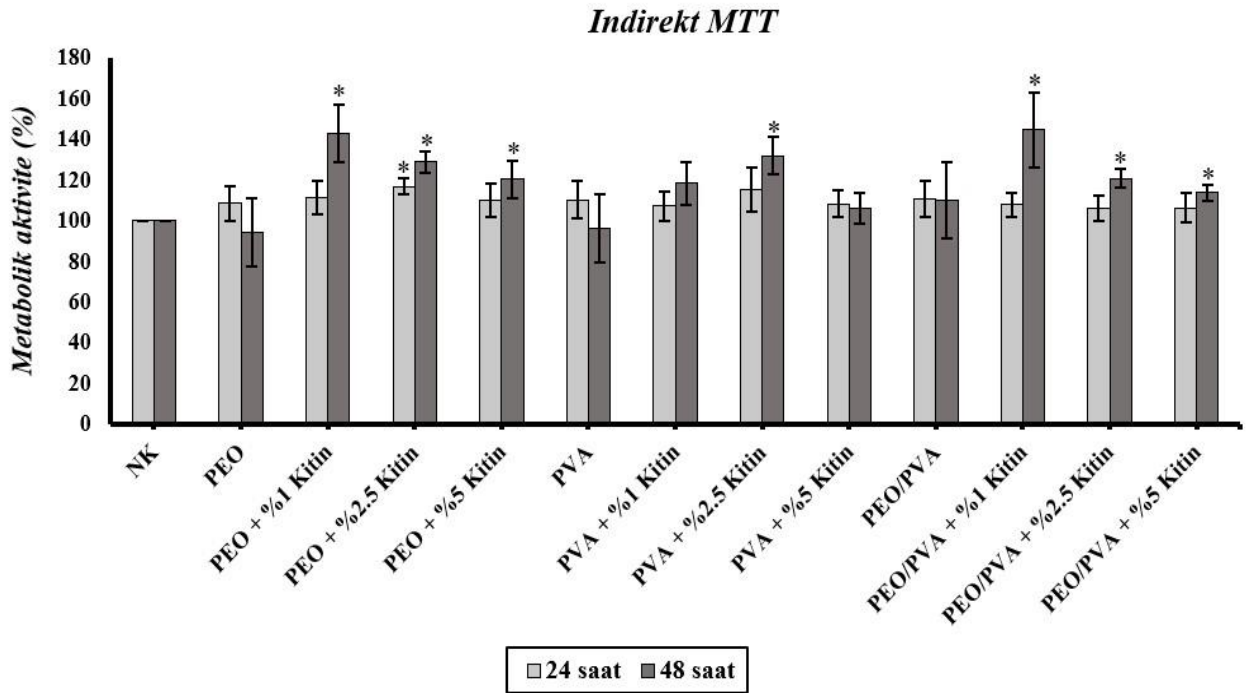
3. BULGULAR

3.1 *In vitro* Sitotoksosite Sonuçları

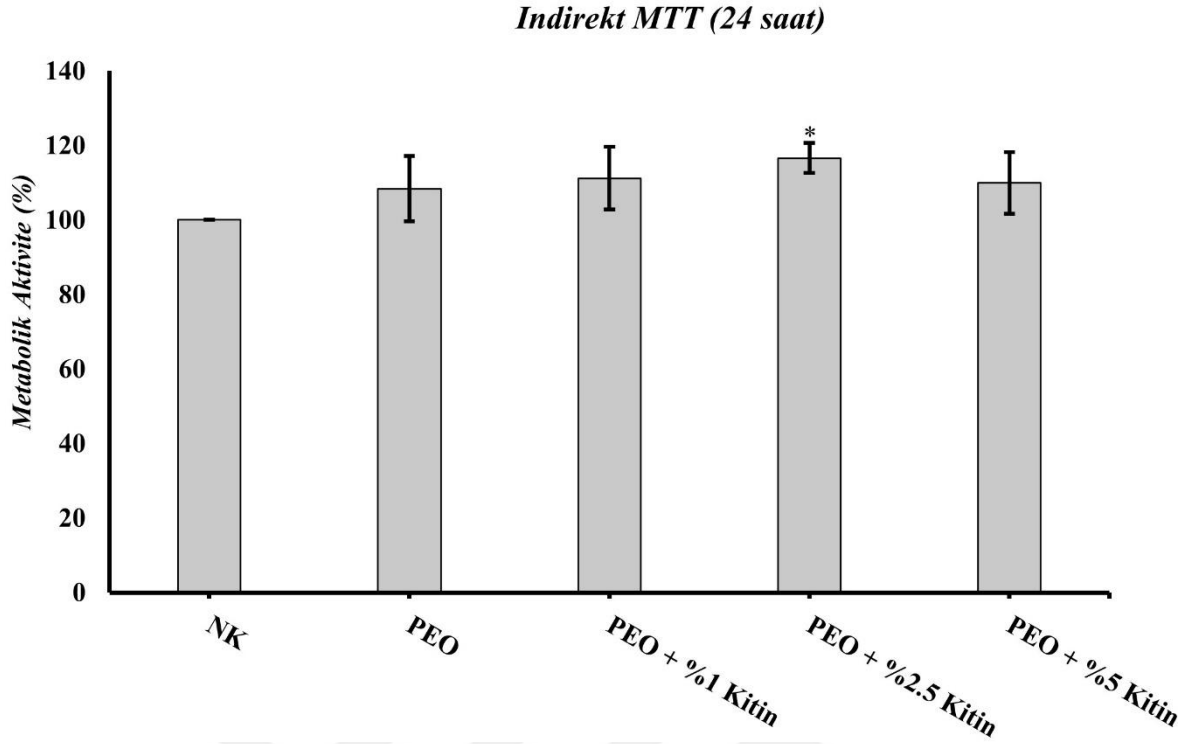
MTT ve MTS testlerinden elde edilen absorbans verileri, kontrol grubunun aktivitesinin ortalama değerleri oranlanarak kontrole kıyasla yüzde metabolik aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.1.1 Indirekt Sitotoksosite Sonuçları

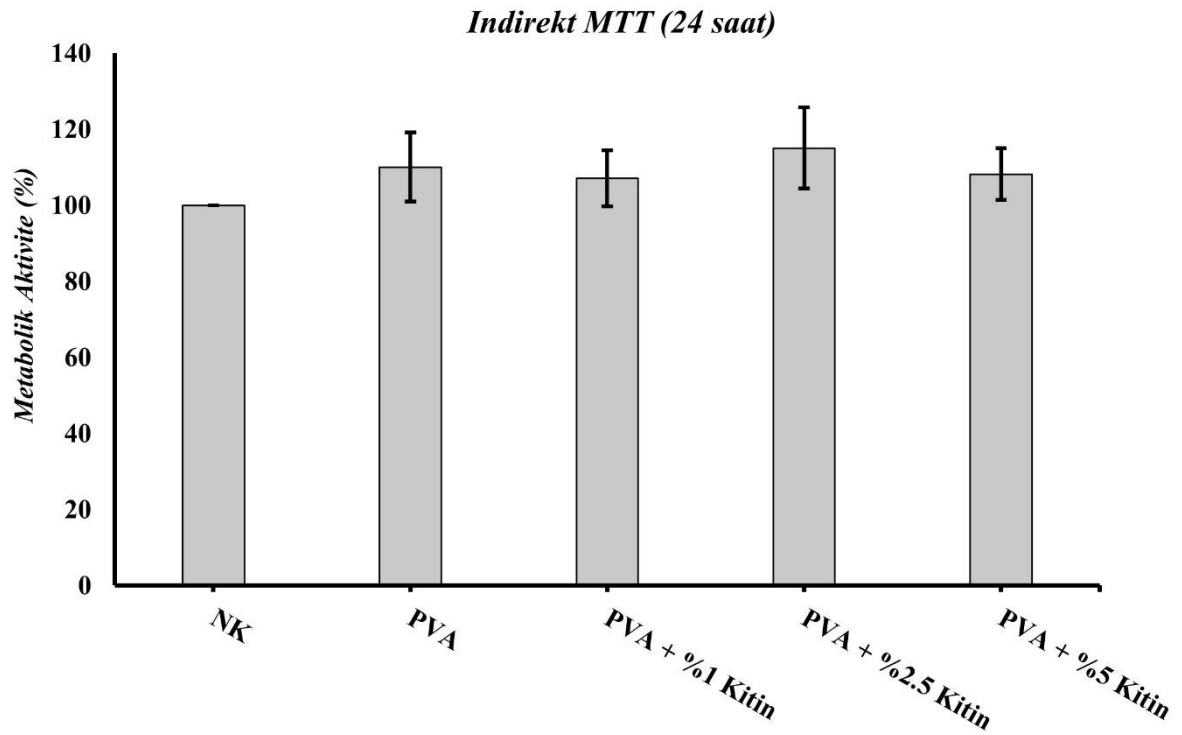
HDFa hücre hattı üzerinde indirekt temas yöntemi ile 24 saat ve 48 saat boyunca maruz bırakılan hidrojel ekstraktlarının, kitin ilaveli ve ilavesiz olarak farklı metabolik aktiviteleri yüzde olarak hesaplanmış ve negatif kontrol grubuna göre (NK) kıyaslanmıştır. 570 nm’de absorbans ölçülerek gerçekleştirilen indirekt MTT testi sonuçlarının tüm gruplardaki 24 ve 48 saatlik sonucu Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Sırasıyla PEO, PVA ve PEO/PVA içeren kompozitlerin 24 saatlik indirekt MTT sonuçları Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4’te; 48 saatlik indirekt MTT sonuçları Şekil 3.5, 3.6 ve 3.7’de gösterilmiştir. Grafiklerde kontrole göre istatistiksel anlamlı olan $p < 0.05$ değerleri, * olarak gösterilmiştir.



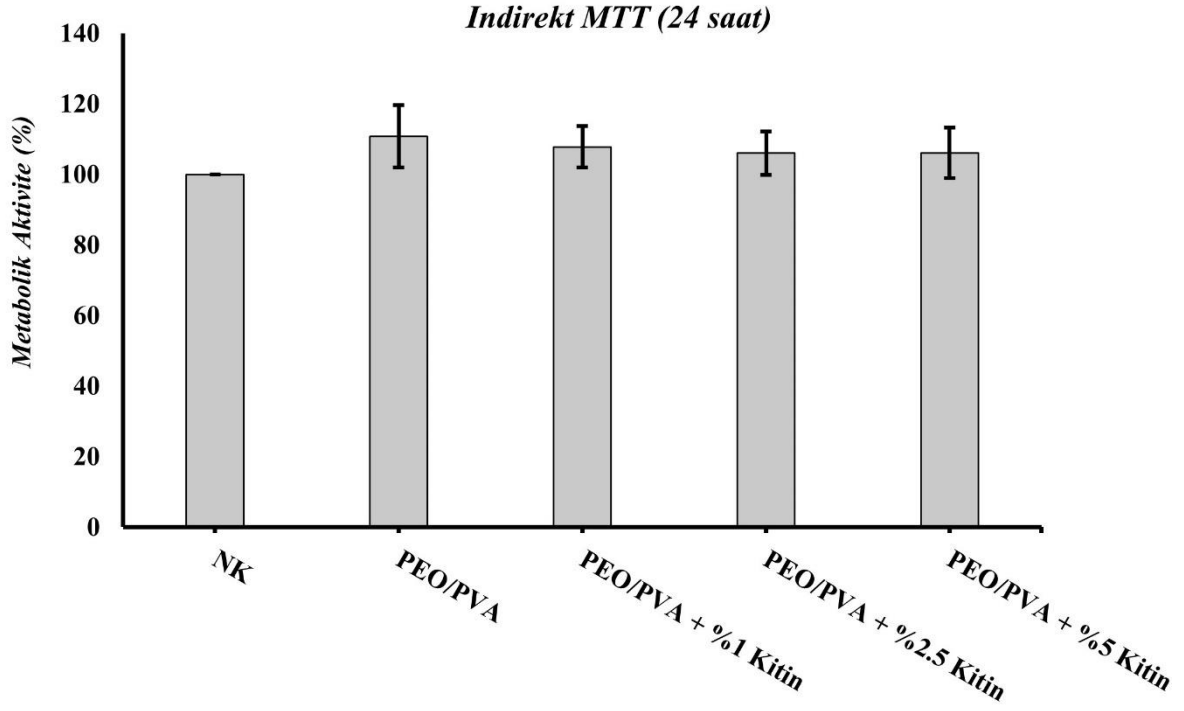
Şekil 3.1: Indirekt MTT sonuçlarına göre hidrojel kompozitlerinin % metabolik aktivite oranları.



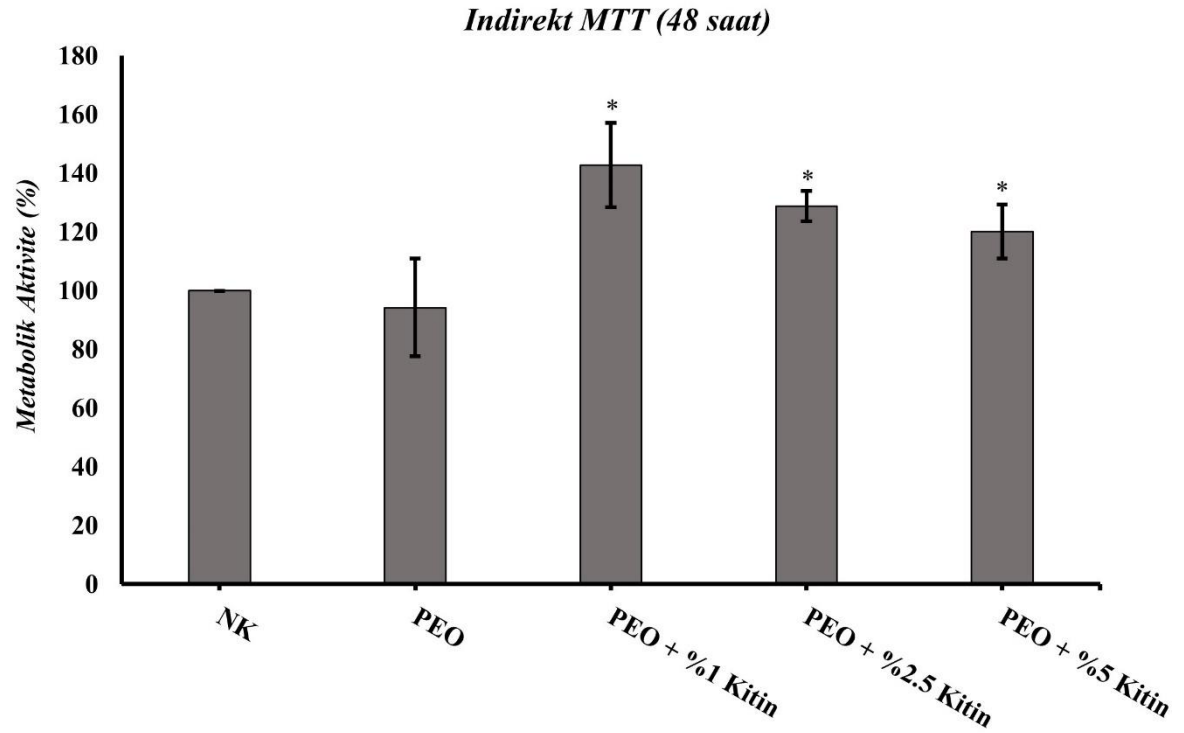
Şekil 3.2: 24 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



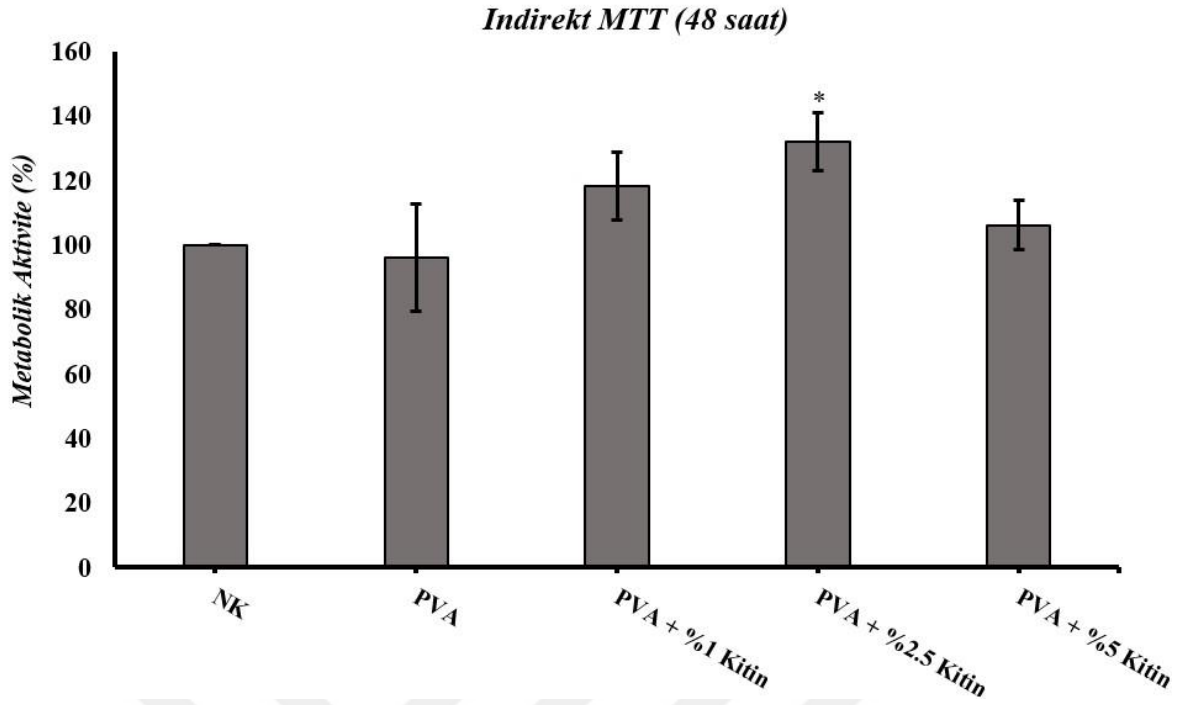
Şekil 3.3: 24 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



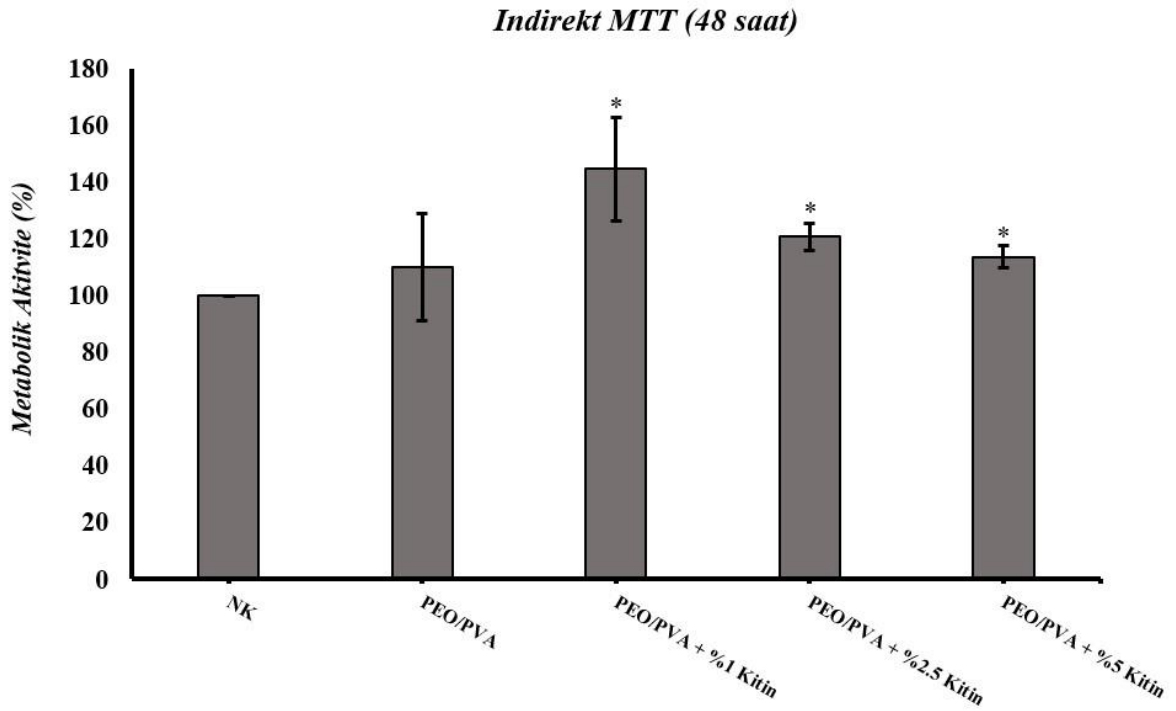
Şekil 3.4: 24 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



Şekil 3.5: 48 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



Şekil 3.6: 48 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.

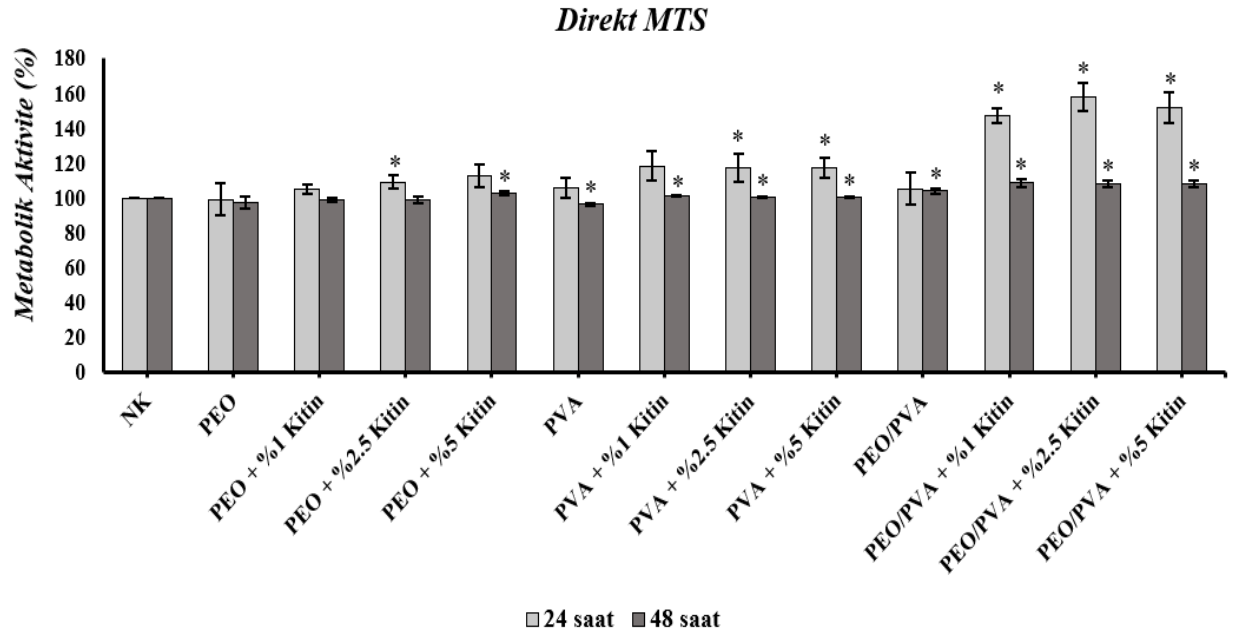


Şekil 3.7: 48 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.

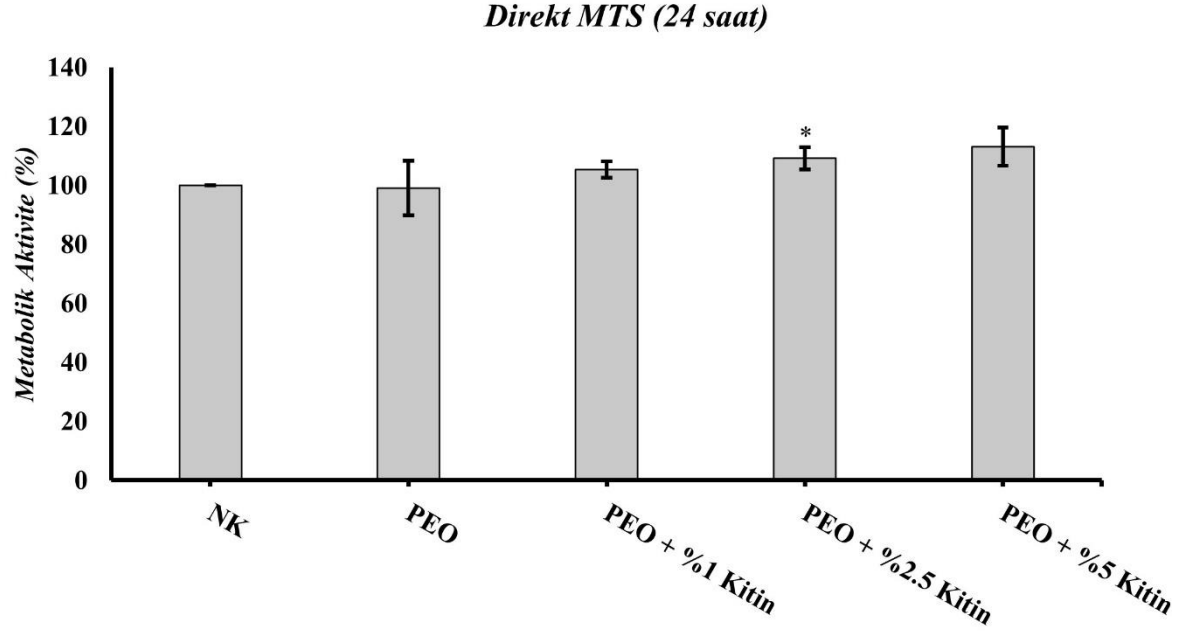
3.1.2 Direkt Sitotoksosite Sonuçları

HDFa hücre hattı üzerinde direkt temas yöntemi ile 24 saat ve 48 saat boyunca maruz bırakılan hidrojel ekstraktlarının, kitin ilaveli ve ilavesiz olarak farklı metabolik aktiviteleri yüzde olarak hesaplanmış ve kontrol grubuna göre (NK) kıyaslanmıştır.

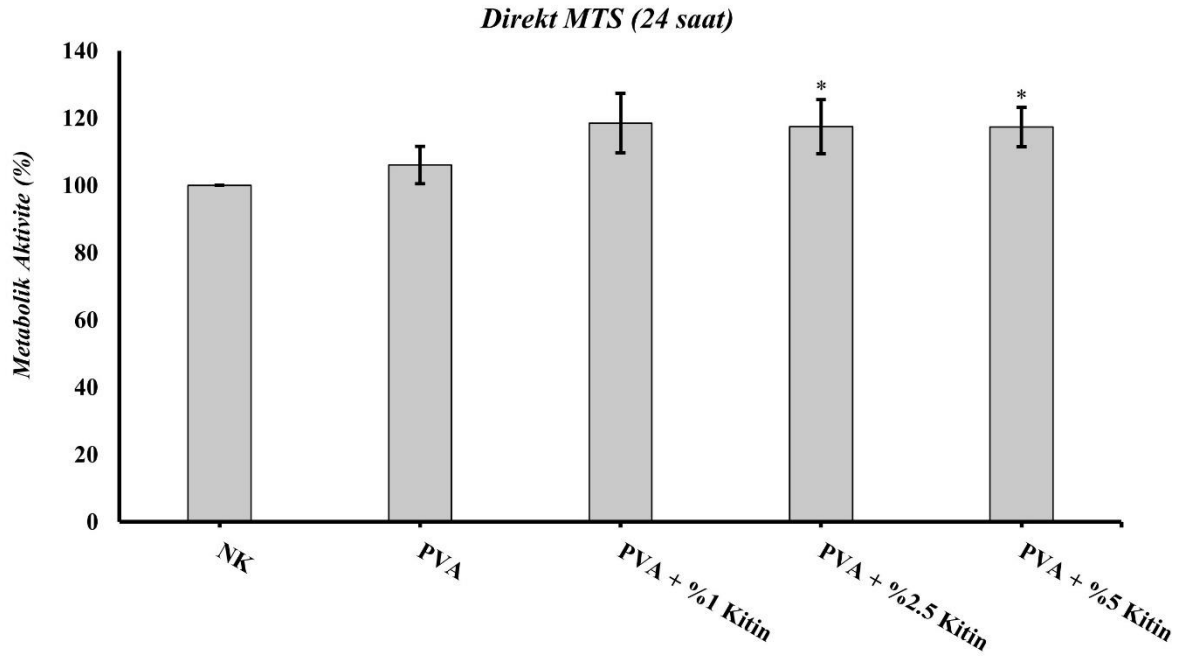
490 nm’de absorbans ölçülerek gerçekleştirilen direkt MTS testi sonuçlarının tüm gruplardaki 24 ve 48 saatlik sonucu Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Sırasıyla PEO, PVA ve PEO/PVA içeren kompozitlerin 24 saatlik direkt MTS sonuçları Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11’de; 48 saatlik direkt MTS sonuçları Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14’te gösterilmiştir. Grafiklerde kontrole göre istatistiksel anlamlı olan $p < 0.05$ değeri, * olarak gösterilmiştir.



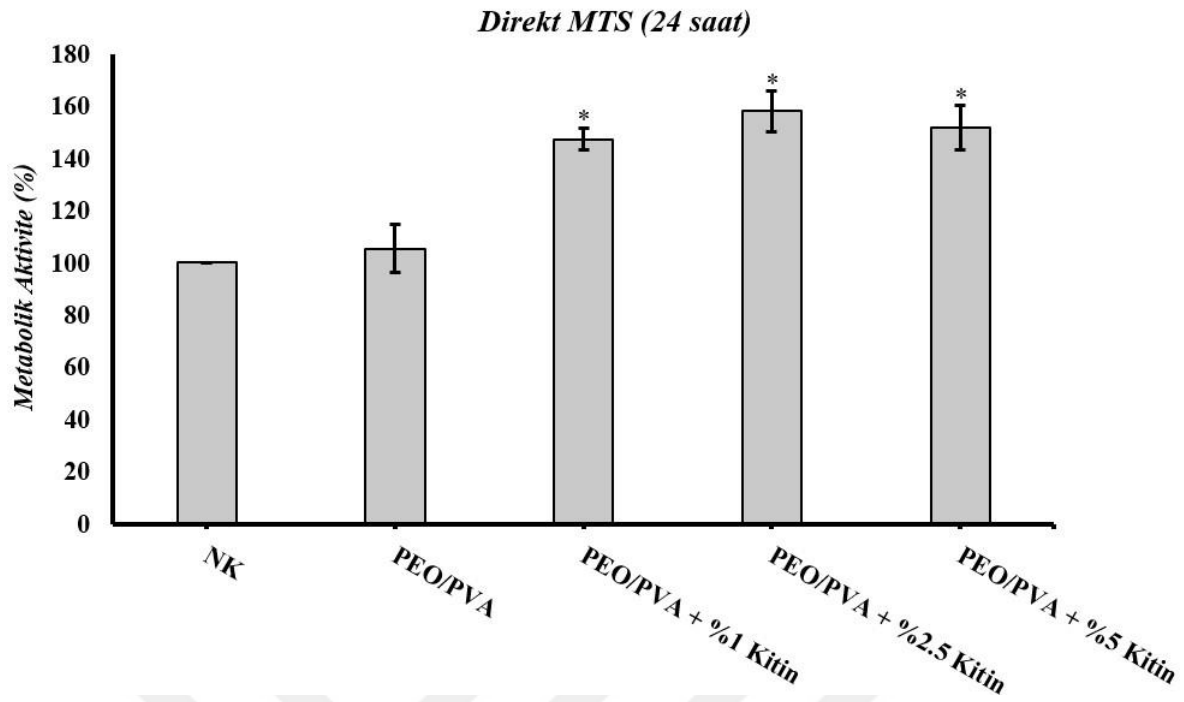
Şekil 3.8: Direkt MTS sonuçlarına göre hidrojel kompozitlerinin % metabolik aktivite oranları.



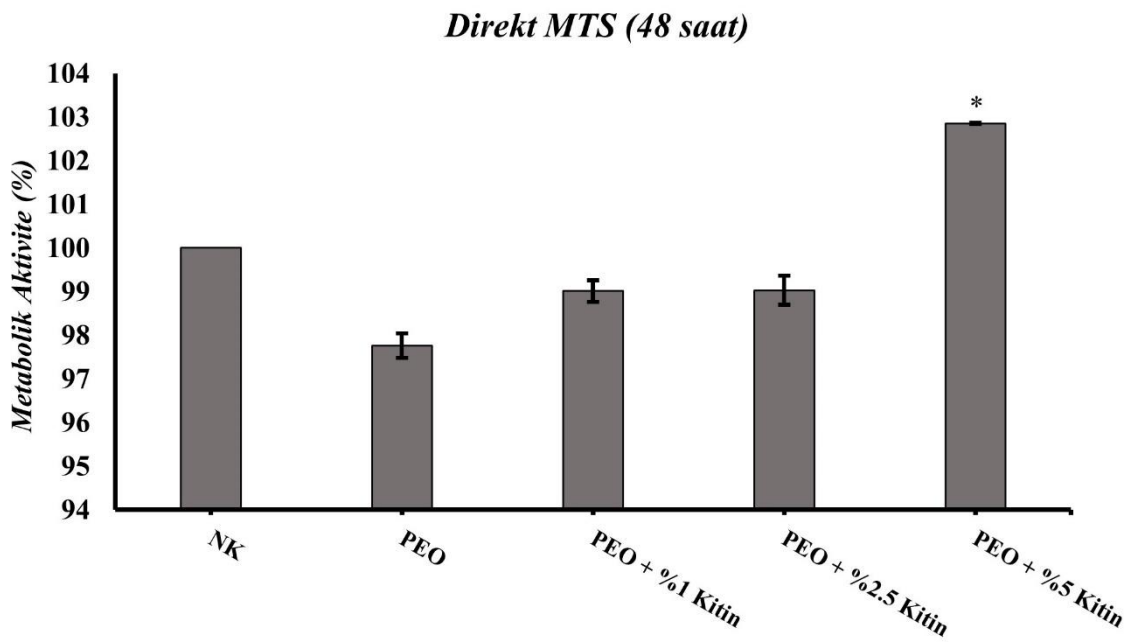
Şekil 3.9: 24 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



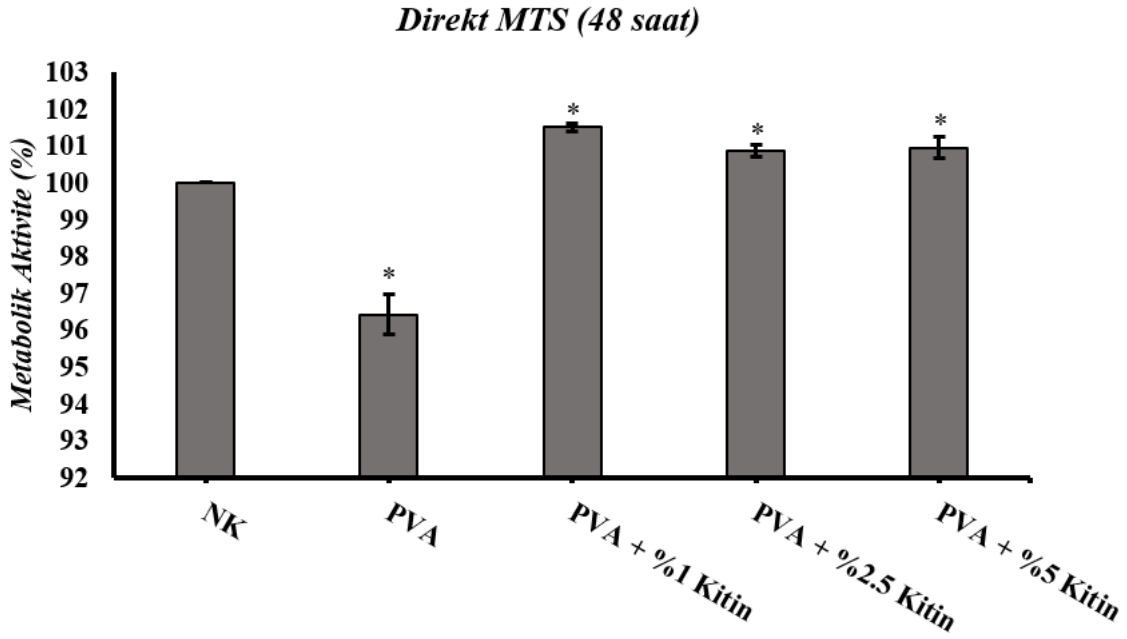
Şekil 3.10: 24 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



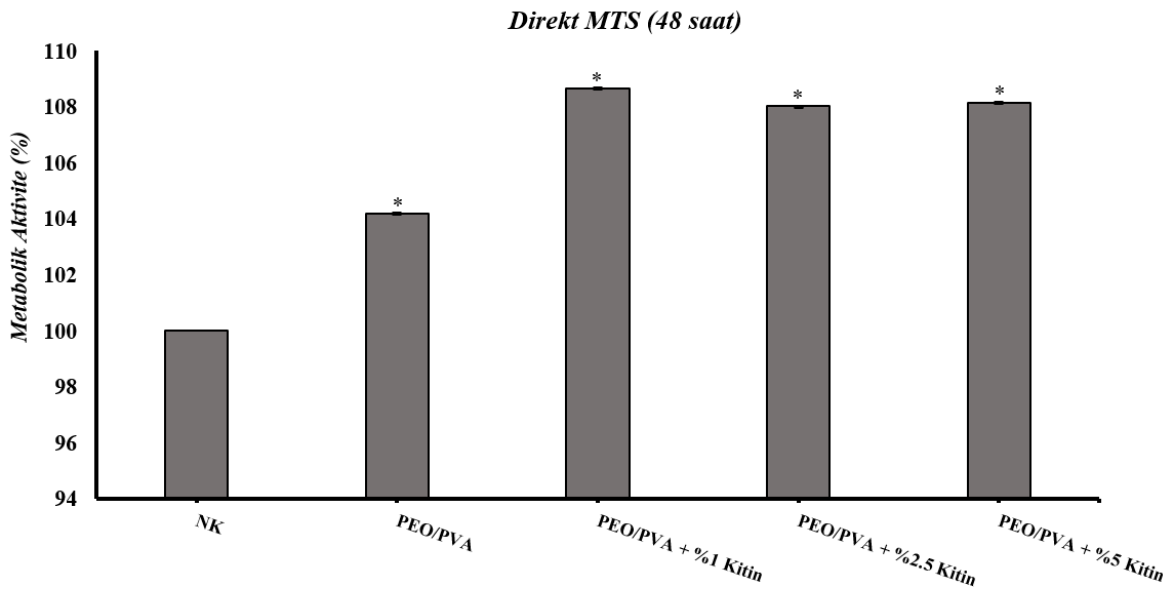
Şekil 3.11: 24 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



Şekil 3.12: 48 saat inkübasyon sonucu PEO içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



Şekil 3.13: 48 saat inkübasyon sonucu PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.



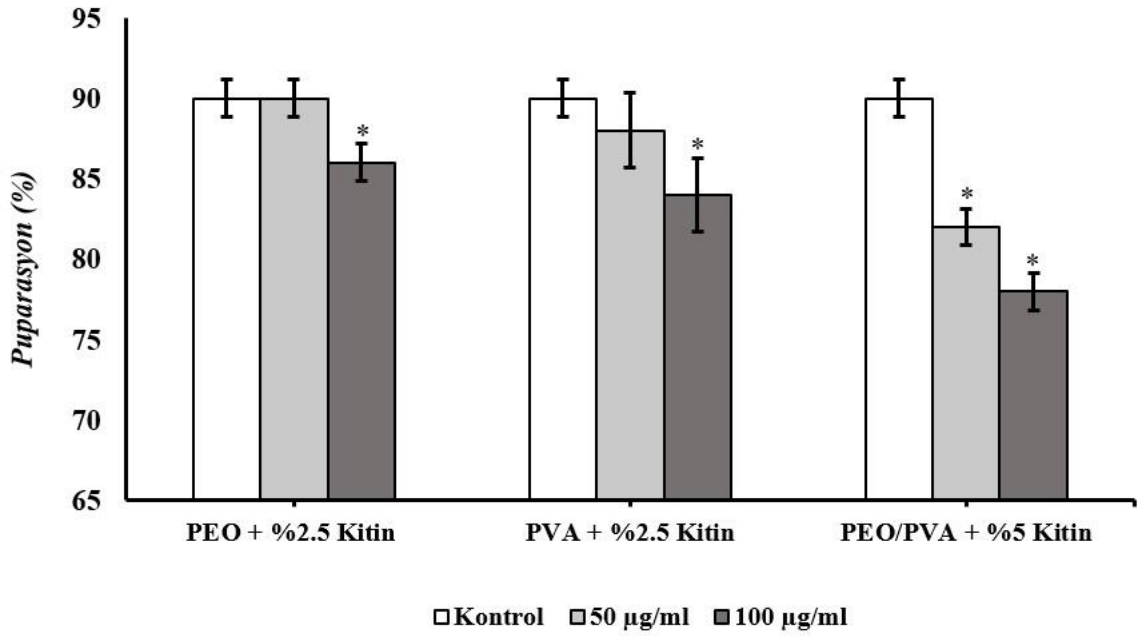
Şekil 3.14: 48 saat inkübasyon sonucu PEO/PVA içeren kompozitlerin % metabolik aktivite oranları.

3.2 *In vivo* Toksisite Sonuçları

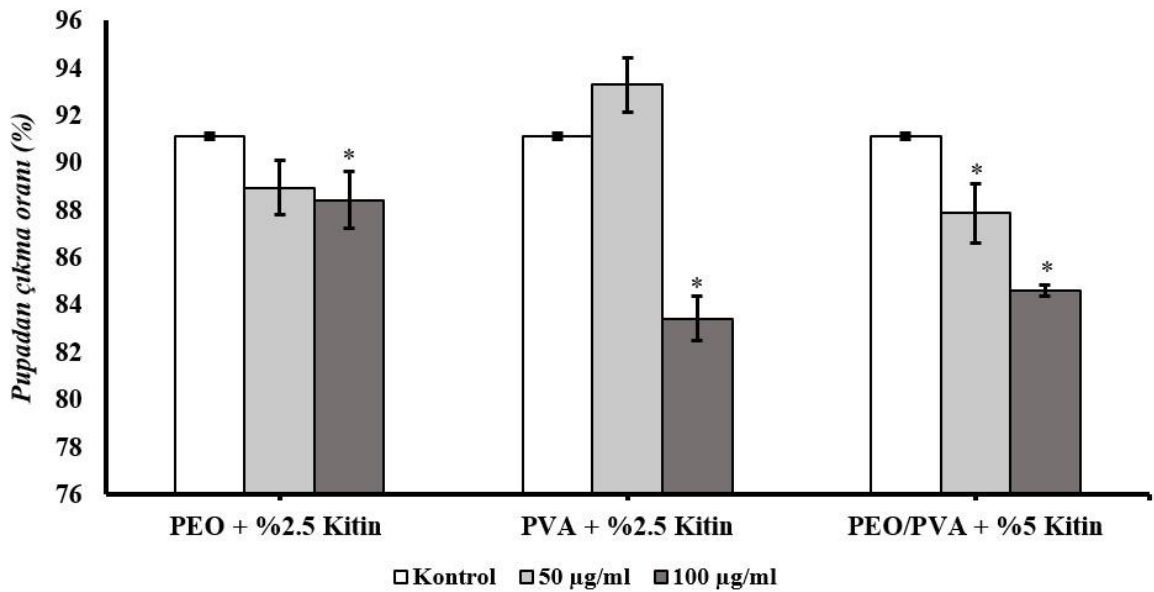
In vitro sitotoksosite testlerinden anlamlı etkiler gösteren % 2.5 kitin ilaveli PEO, % 2.5 kitin ilaveli PVA ve % 5 kitin ilaveli PEO/PVA seçilerek *Drosophila melanogaster*'de toksik etkileri incelenmiştir.

3.2.1 Gelişim Testleri Sonuçları

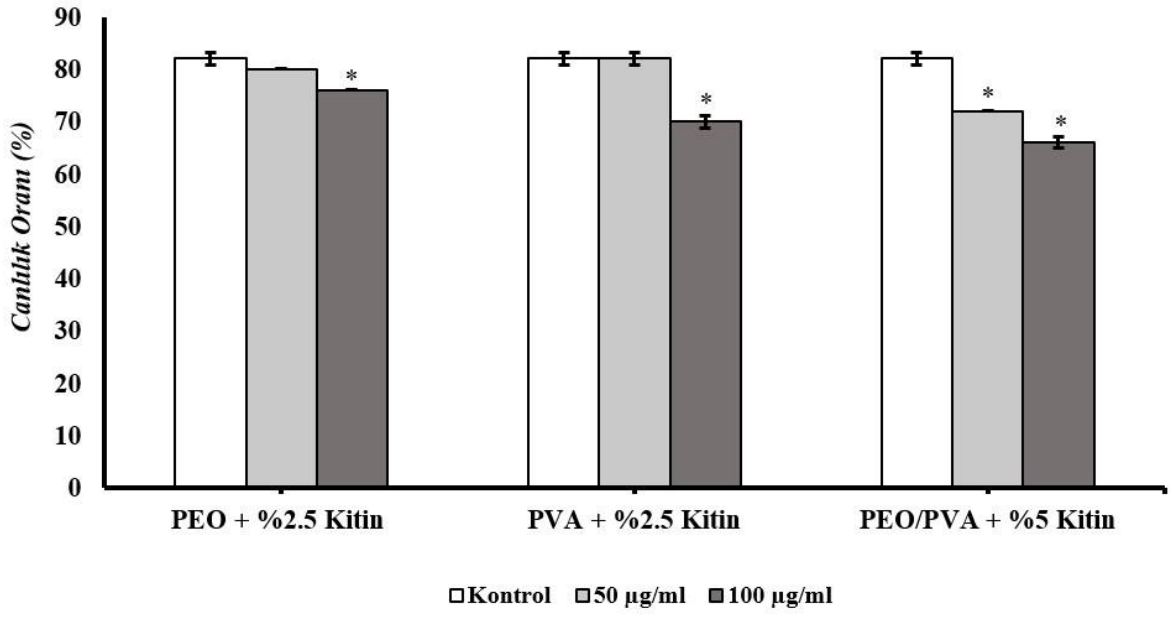
Larvadan pupaya dönüşümün gerçekleştiği puparasyon, pupadan yetişkine dönüşümün gerçekleştiği pupadan çıkma ve yetişkin/larva oranını kıyaslayan canlılık oranları kontrol grubu ile kıyaslanarak yüzde olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17’de sırasıyla puparasyon, pupadan çıkma ve canlılık oranları gösterilmiştir. Grafiklerde kontrole göre istatistiksel anlamlı olan $p < 0.05$ değeri, * olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.15: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % puparasyon oranları.



Şekil 3.16: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % pupadan çıkma oranları.

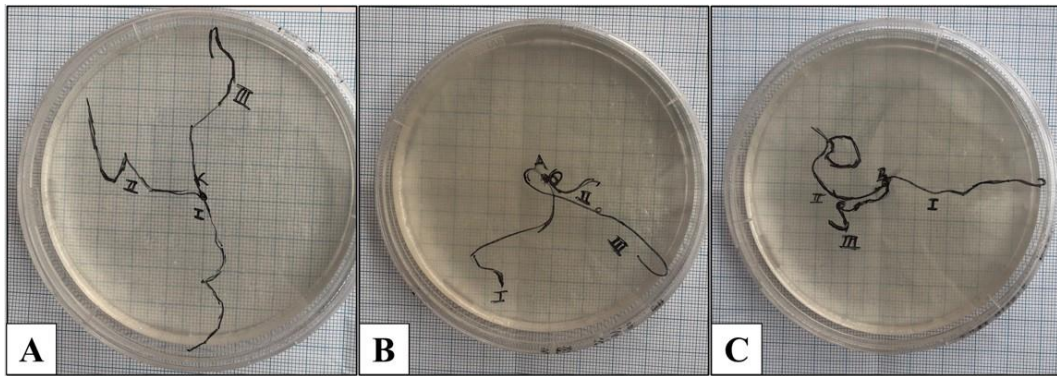


Şekil 3.17: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu ekstraktların kontrole kıyasla % canlılık oranları.

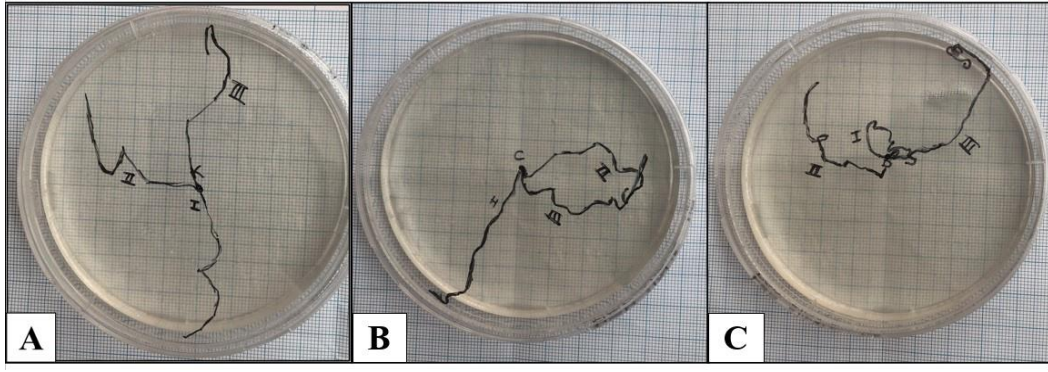
3.2.2 Davranış Testleri Sonuçları

3.2.2.1 Larval Sürünme Testi Sonuçları

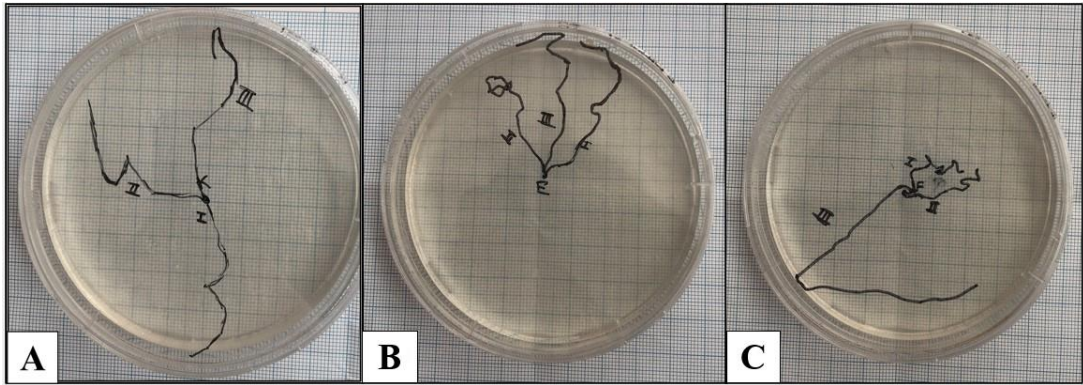
50 µg/mL ve 100 µg/mL ekstraktları ile muamele edilen 3.evre larvaların petri kabında agar üzerindeki hareketleri 1 dk boyunca kaydedilerek, hareket motifleri Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’de verilmiştir. Larval sürünme hızları Şekil 3.21’deki grafikte verilmiştir.



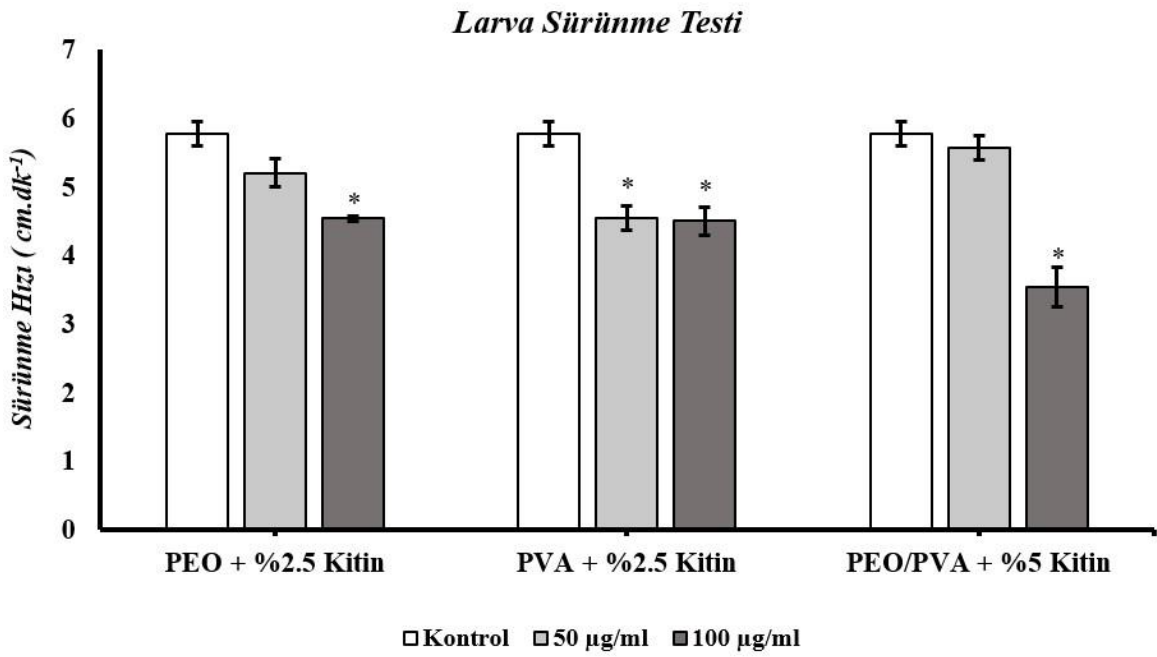
Şekil 3.18: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PVA (B), 100 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PVA (C).



Şekil 3.19: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PEO (B), 100 µg/mL dozlu % 2.5 kitin ilaveli PEO (C).



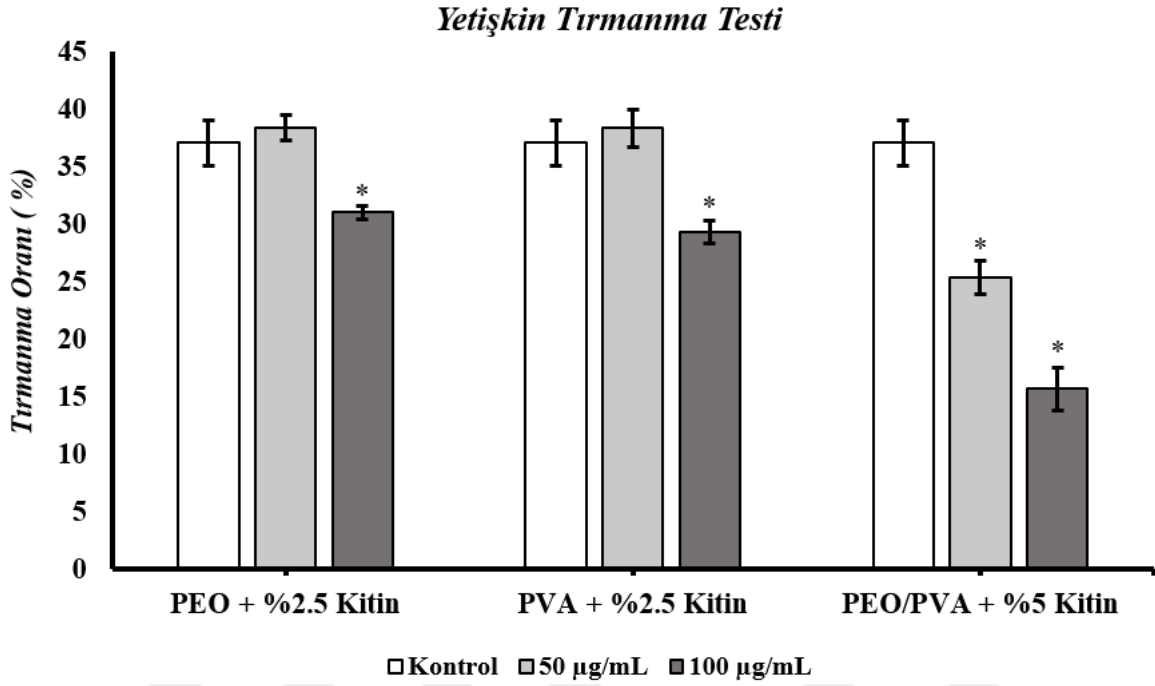
Şekil 3.20: Kontrol (A), 50 µg/mL dozlu %5 kitin ilaveli PEO/PVA (B), 100 µg/mL dozlu %5 kitin ilaveli PEO/PVA (C).



Şekil 3.21: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu kompozit ilave edilmiş 3.evre larva hızları (cm.dk⁻¹).

3.2.2.2 Yetişkin Tırmanma Testi Sonuçları

100 mL’lik dereceli silindirde 1 dakika boyunca 80 mL’yi geçebilen yetişkin sinekler yüzde olarak hesaplanmış ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. şekil 3.22’de tırmanma oranları yüzde cinsinden gösterilmiştir.



şekil 3.22: 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlu kompozitlere maruz kalmış yetişkin sinek tırmanma oranları.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 *In vitro* Sitotoksosite Sonuçları

4.1.1 Indirekt Sitotoksosite Sonuçları

Biyouyumluluk tespiti için kullanılan parametrelerden indirekt testte Bölüm 2.2.1’de bahsedildiği gibi hazırlanan hidrojel ekstratları, 96 kuyucuklu plakalara ekilen insan fibroblast hücreleri ile etkileştirilmiş ve hücrelerin metabolik aktiviteleri yani canlılık oranları zaman içerisinde incelenmiştir (24 ve 48 saat). Metabolik aktivite tespiti için MTT testi gerçekleştirilmiş ve 570 nm’de absorbans alınmıştır. Absorbans sonuçları kontrol grubu %100 olacak şekilde diğer gruplar arasında oranlanarak % metabolik aktivite cinsinden hesaplanmıştır.

24 saatlik indirekt temas sonucu elde edilen MTT verilerine (Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4) göre 24 saat boyunca hücrelerle etkileşen hidrojel ekstraktlarının hepsi inkübasyon süresince hücre canlılığını, kontrol grubuna göre artırmasına rağmen bu artışlardan % 2.5 kitin ilaveli PEO hariç hiçbirisi istatistiki olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Şekil 3.2’de verildiği üzere kitin eklenmemiş PEO ve % 1, % 2.5, % 5 oranlarında kitin ilave edilen PEO örnekleri arasında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını en fazla artıran grup % 2.5 kitin ilaveli PEO grubu olmuştur. Kontrol grubundan % 16.6 (± 6.9) daha fazla canlılığı artırmış ve bu artış istatistiki olarak anlamlı değerlendirilmiştir ($p < 0.05$). Şekil 3.3’de kitin eklenmemiş saf PVA ve % 1, % 2.5 ve % 5 kitin ilaveli PVA grubunun metabolik aktiviteye olan etkisine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını en fazla artıran grubun % 2.5 kitin ilaveli PVA grubu olduğu görülmektedir fakat buradaki artış anlamlı değildir ($p > 0.05$). Şekil 3.4’te PEO/PVA ve kitin ilaveli PEO/PVA grupları kıyaslandığında ise kontrol grubuna kıyasla canlılığı en fazla artıran grubun kitin eklenmemiş PEO/PVA olduğu görülmüştür. Kitin ilavesi kontrol grubuna kıyasla canlılığı düşürmese de saf PEO/PVA’ya kıyasla canlılığın azalmasına sebep olmuştur fakat bu azalış istatistiki olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

48 saatlik indirekt temas sonucu elde edilen MTT verilerine (Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7) göre 48 saat boyunca hücrelerle etkileşen hidrojel ekstraktlarında bazı gruplarda kontrole kıyasla yüzde canlılık aktivitesinde düşüşler görülse de hiçbirinde canlılık oranı % 90’ın altına düşmemiştir. Şekil 3.5’de verildiği üzere PEO ve kitin ilaveli PEO grubunda kontrol grubuna göre canlılığı azaltan tek grup saf PEO olmuştur. % 94.27 (± 16.68)

oranında aktivite göstermiştir ve bu oran istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Kitin ilavesi kontrol grubuna kıyasla canlılığı artırmıştır fakat bu artış miktarı ve kitin konsantrasyonu arasında ters bir orantı vardır. % 1, % 2.5 ve % 5 kitin ilaveli PEO grubu arasında canlılığı en fazla arttıran grup %1 kitin ilaveli PEO'dur ve kontrolden % 42.8 (± 14.34) daha fazla bir artış göstermiştir. Kontrole kıyasla % 2.5 kitin ilavesi % 28.8 (± 5.11) ve % 5 kitin ilavesi % 20.2 (± 9.17) daha fazla canlılık artışına sebep olmuşlardır. Üç kitin grubu da canlılığı desteklemiş ve kitin konsantrasyonu arttıkça yüzde canlılık artan konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır ve bu oran istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Şekil 3.6'da saf PVA ve kitin eklenmiş PVA grupları kıyaslandığında; % 2.5 kitin ilaveli PVA kontrole kıyasla canlılığı % 31.89 (± 8.98) daha fazla artırmıştır ($p<0.05$). Şekil 3.7'de saf PEO/PVA ve kitin ilaveli PEO/PVA grupları kıyaslandığında ise PEO grubunun sonuçlarıyla uyumlu bir sonuç elde edilmiştir. % 1 kitin ilaveli PEO/PVA grubu tüm gruplar arasında canlılığı en fazla artıran grup olmuştur ($p<0.05$). Kontrole göre % 44.6 (± 18.3) daha fazla canlılık aktivitesine sebep olan % 1 kitin ilaveli PEO/PVA grubuna kıyasla % 2.5 ve % 5 kitin ilave edilmiş PEO/PVA grupları canlılığı düşürmüştür fakat kontrole göre canlılığı artırdığı gözlenmiştir. % 2.5 kitin ilaveli PEO/PVA kontrole göre % 20.68 (± 4.72) ve % 5 kitin ilaveli PEO/PVA kontrole göre % 13.67 (± 3.78) daha fazla canlılık aktivitesine sebep olmuşlardır ($p<0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 24 saat sonunda canlılığı artırsa da 48 saat sonunda canlılığı azaltan gruplar kitin ilavesiz saf PEO ve PVA grupları olmuştur. Yine de canlılıktaki bu azalış anlamlı olmamakla birlikte bu malzemelerin sitotoksik olarak değerlendirilebilmesi için gerekli olan sınırı aşmamaktadır. ISO-10993-5'e göre hücre canlılığında azalışın %30'dan fazla olması sitotoksik etki olarak kabul edilir [85]. ISO standartlarına göre hazırlanan biyomalzeme ekstraktlarında 24 ve 48 saat sonunda hiçbir grubunda sitotoksik etki görülmemiştir. Sentezlenen biyomalzemelerin insan deri fibroblast hücreleri üzerindeki indirekt sitotoksik etkilerine göre tüm grupların biyouyumlu yara örtü malzemesi adayı olarak değerlendirilmeye uygun olduğu bulunmuştur.

Kitin ile desteklenen biyomalzemeler ile yapılan literatür çalışmalarıyla bu tezde elde edilen saf PEO ve PVA'nın aksine kitin ile desteklenmiş PEO ve PVA'nın daha yüksek metabolik aktivite göstermesinin uyumlu olduğu görülmüştür. 24 saat ve 48 saat sonundaki hücre metabolik aktiviteleri karşılaştırıldığında; 24 saat sonunda kitinsiz bazı gruplarda metabolik aktivite kitinli gruplara kıyasla daha fazla iken 48 saat sonunda tüm gruplarda

kendi içlerinde kontrole kıyasla en fazla aktivite gösteren grupların kitin içerenler olduğu bulunmuştur. Charernsriwilaiwat ve ark. ağırlıkça farklı oranlarda karıştırıp elektroeğirme yöntemiyle hazırladıkları kitosan/PVA nanofiberlerinin farklı dozlardaki ekstraktlarında yaptıkları indirekt sitotoksikite testi ile karışımların hiçbirinin insan fibroblast hücrelerine sitotoksik etki göstermediklerini bulmuşlardır ve potansiyel yara örtü malzemesi adayı olarak değerlendirmişlerdir [113]. Islam ve ark. kitosan ve PVA'yı kütlece farklı oranlarda kullanarak sentezledikleri hidrojellerde farklı fibroblast hücre hatlarında indirekt sitotoksikite yöntemiyle MTT testi gerçekleştirmişlerdir ve hidrojellerin fibroblast hücrelerinin aktivitesini desteklediklerini, kitosan ile desteklenmiş yapıların hücre iskelesi olarak destekleyici olduklarını bulmuşlardır. Ayrıca PVA oranı kütlece yüksek olan hidrojellere kıyasla kitosan oranının daha fazla olduğu hidrojellerde metabolik aktivitenin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir [114]. He ve ark. kitin/PVA kompozit hidrojelleri ekstraktlarına L929 hücrelerinde gerçekleştirdikleri MTT testi ile hidrojellerin biyoyumlu olduklarını ve kitinin sağladığı porlu yapının hücrelerin tutunması için mekanik destek görevi görerek hücre canlılığına olumlu etkisi olduğunu belirtmişlerdir [115].

Trinca ve ark. elektroeğirme yoluyla sentezledikleri çift tabakalı iskelede yara yatağıyla doğrudan temasta bulunacak ve primer yara örtüsü işlevi görecek ikincil katman için kitosan/PEO blendleri hazırlamışlar ve bu iskelelerin ekstraktlarını indirekt sitotoksikite yöntemini kullanarak L929 hücreleri ile inkübe etmişlerdir. MTT sonuçlarına göre canlı hücre sayısı % 84'ün üzerinde bulunmuş ve iskelelerin sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir. Hidrofilik ortam sağlayan PEO'nun kitosanla birlikte yara yatağı için elverişli koşulları sağladığı bulunmuştur [116]. Alishahi ve ark. PEO/jelatinden oluşan dış tabaka ve PVA/kitosandan oluşan glukantime yüklü iç tabakaya sahip nanofiberleri, Leishmania hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere topikal örtü olarak geliştirmişlerdir. İlaç yüklü ve ilaç yüksüz olarak farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları nanofiberlerin NIH-3T3 hücreleri üzerindeki MTT sonuçlarına göre hiçbir sitotoksik etki gözlenmemiş ve nanofiberlerin canlılığı her grupta kontrol grubuna kıyasla artırdığı bulunmuştur [117].

Şekil 3.1'de gösterilen genel olarak tüm gruplar içerisinde değerlendirilen indirekt toksisite sonuçlarına göre, sitotoksik herhangi bir etki göstermemeleri dışında kitin ilavesinin 48 saat sonunda canlılığı çoğu grupta daha fazla artırdığı, literatürde çoğunlukla kitosan yerine tercih edilmesine rağmen bu çalışmada PEO ve PVA ile desteklendiğinde kitinin deri hücrelerinde oldukça anlamlı etkiler sergilediği görülmüştür. Kitosan destekli

malzemeler biyouyumlu özellikler göstermesine rağmen özellikle yara örtüsü olarak hidrojel tasarımında hidrojinin sağlamlığı nanoboyutta kitin ilavesiyle artırılabilir. Mekanik sağlamlık yara iyileşmesi sırasında myofibroblast transformasyonu, keratinosit göçü, ECM bileşenlerinin sentezi ve yara kapanması gibi yara iyileşmesi sürecinde kritik olan adımlar üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir [103]. Özellikle kronik yaralarda görülen yara iyileşme mekanizmalarının aksaması ve uzaması mekanik sağlamlık kazanmış hidrojel yara örtülerinin geliştirilmesiyle engellenebilir. Bu sebeple bu tez çalışmasında gerçekleştirilen indirekt sitotoksikite sonuçlarının hücreler üzerinde sitotoksik etki yaratmamış olması ve kitin desteğinin hücrelerdeki canlılığı artırması olumlu bir gelişme olarak görülmektedir.

4.1.2 Direkt Sitotoksikite Sonuçları

Hidrojel kompozitlerinin biyouyumlulukları ikincil yöntem olan direkt sitotoksikite yöntemi ile MTS testi kullanılarak incelenmiştir. Hücreler ve biyomalzemeler arasında herhangi bir bariyer olmadığı, biyomalzemelerin hücrelerle doğrudan temas ettirilmesiyle gerçekleştirilen direkt temas sitotoksikitesi için Bölüm 2.2.1’de bahsedildiği gibi hazırlanan hidrojel örnekleri HDFa hücreleri ile inkübe edilmiş, 24 ve 48 saat sonunda MTS testi yapılarak 490 nm’de absorbans alınmıştır. Absorbans sonuçları kontrol grubu %100 olacak şekilde diğer gruplar arasında oranlanarak % metabolik aktivite cinsinden hesaplanmıştır. ISO standartlarında belirtilen ve biyomalzemelerin sitotoksikitesi için yapılması uygun bulunan farklı testlerin yapılarak sonuçlarının kıyaslanması biyomalzemelerin sitotoksik koşullarının daha doğru değerlendirilebilmesi adına önemlidir [118].

Direkt sitotoksikite yönteminde; hücrelerin teste maruz bırakılacak malzemelerin üzerlerine ekilmesi, malzemedan salınabilecek toksik maddeler veya malzemenin fizikokimyasal yapısı gibi faktörlerin hücre büyümesini olumsuz etkileyerek test sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine sebep olabilir [118]. Hücrelerin, hücre kültürü plakalarında monolayer oluşturacak şekilde büyütüldükten sonra malzemelerin direkt olarak hücrelerin üzerine ekilmesi daha doğru bir yaklaşımdır. Hücrelerin üzerine malzemelerin ekilmesi sırasında hücrelere mekanik hasar vermemek ve sitotoksik etki olarak yorumlanmaya sebep olacak sonuçlar yaratmamak için hassas davranılması gerekir. Bu sebeple test yöntemi olarak daha az adımlı MTS yöntemi direkt sitotoksikite testi için tez kapsamında kullanılmıştır.

24 saatlik direkt temas sonucu elde edilen verilere (Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) göre hücrelerin metabolik aktivitelerine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda bir artış gözlenmiştir. Şekil 3.9’da verildiği üzere PEO grupları kendi aralarında kıyaslandığında % 2.5 kitin ilaveli PEO’nun kontrole göre canlılığı % 9.17 ($\pm$ 3.74) daha fazla artırdığı görülmüştür ($p<0.05$). Bu sonuç PEO’nun 24 saatlik indirekt sitotoksosite sonucu ile benzer bir etki oluşturmuştur. PVA grupları kendi aralarında kıyaslandığında %2.5 kitin ilaveli PVA’nın kontrole kıyasla metabolik aktiviteyi % 17.46 ($\pm$ 8.07) ve %5 kitin ilaveli PVA’nın % 17.36 ($\pm$ 5.86) daha fazla artırdığı görülmüştür ($p<0.05$). PEO ve PVA’nın kitin ilaveli ve ilavesiz olarak bir arada bulunduğu tüm gruplarda metabolik aktivitede artış görülmüştür ve bu artışlar saf PEO/PVA hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. % 1 kitin eklenmiş PEO/PVA % 47.37 ($\pm$ 4.28), % 2.5 kitin eklenmiş PEO/PVA % 58.16 ($\pm$ 7.76) ve % 5 kitin eklenmiş PEO/PVA’da % 51.7 ($\pm$ 8.7) oranında kontrole göre daha fazla artış gözlenmiştir ($p<0.05$).

48 saatlik direkt temas sonucu elde edilen MTS verilerine (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14) göre hücrelerin metabolik aktivitelerine bakıldığında bazı gruplarda yüzde metabolik aktivitenin kontrole göre azaldığı görülmüştür. Saf PVA hariç bu azalışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). PEO grupları kendi aralarında kıyaslandığında en fazla artışı kontrol grubuna kıyasla aktiviteyi % 2.8 ($\pm$ 0.9) daha fazla artıran % 5 kitin ilaveli PEO göstermiştir ($p<0.05$). PVA grupları kendi aralarında kıyaslandığında saf PVA’nın kontrole kıyasla aktiviteyi % 3.59 ($\pm$ 0.55) oranında azalttığı görülmüştür ($p<0.05$). Kitin eklenmiş PVA gruplarında kontrole göre en fazla artış sırasıyla % 1 kitin eklenmiş PVA % 1.51 ($\pm$ 0.11), % 5 kitin eklenmiş PVA % 0.95 ($\pm$ 0.18) ve % 2.5 kitin eklenmiş PVA’da % 0.86 ($\pm$ 0.30) oranlarında görülmüştür ($p<0.05$). PEO/PVA gruplarında ise tüm gruplarda kontrole göre artış gözlenmiştir ($p<0.05$) ve en fazla artışın % 1 kitin ilaveli PEO/PVA % 8.6 ($\pm$ 2.33) olduğu bulunmuştur.

24 saat sonundaki indirekt ve direkt sitotoksosite sonuçları beraber karşılaştırıldığında indirekt testte kontrole kıyasla anlamlı artış göstermeyen kitin ilaveli PEO/PVA yüzeyleri, direkt testte anlamlı artış göstermiş ve bu artış bu yüzeylerin, hücre çoğalmasını en iyi destekleyen yüzeyler olduğunu göstermiştir. 48 saat sonunda direkt testte en yüksek metabolik aktiviteyi gösteren % 1, % 2.5 ve % 5 kitin destekli PEO/PVA’nın indirekt testte daha yüksek aktivite göstermesinin indirekt test koşulları kaynaklı artış sebepli olabileceği

düşünülmektedir. En yüksek aktiviteyi, 48 saat sonunda kontrole kıyasla % 144.63 metabolik aktivite gösteren % 1 kitin ilaveli PEO/PVA'nın gösterdiği bulunmuştur.

İndirekt test için kullanılan ekstrakt koşulları toksisite sonuçlarında farklılıklar yaratabilir. Ekstraksiyon için kullanılan besiyeri içeriği test materyallerinin ekstraksiyon sırasında homojen olarak dağılmalarında farklı etkilere sahiptir. Yapı içerisinde bazı kısımların aşınması ve tüm yapının homojen çözünmemesi gibi sebepler sonucu yüzeyden salınan iyon miktarları değişiklik göstererek ekstraksiyon ortamını ve dolayısıyla test sonuçlarını etkileyebilir. Besiyeri içerisindeki FBS toksik iyon salınımı üzerinde maskeleyici etkiye sahiptir [119]. Ekstraksiyon koşullarının eşit olabilmesi için eşit oranda FBS içeren aynı besiyerleri tercih edilmesine rağmen indirekt toksisite ve direkt toksisite kaynaklı farklılıkların ekstraksiyon koşullarından bağımsız olduğunun anlaşılabilmesi için farklı FBS içerikli ve farklı besiyerleri içeren koşullarda tekrarlanması gerekmektedir. Bunun dışında genellikle hücre besiyeri içerisinde bekletilen malzeme yüzeyi ekstraselüler protein absorblayarak hücrelerin bu yüzeylere tutunmasını sağlayabilir [115]. Bu gibi parametreler sonucu indirekt test sonuçları ve direkt test sonuçları arasında farklılıklar gözlemlenmesi normaldir.

Literatürde de kitin ilavesi sonucu direkt toksisitenin hücre canlılığını artırdığına ve direkt-indirekt toksisite sonuçlarının karşılaştırılmasına dair çalışmalar mevcuttur. İslam ve ark. farklı oranlarda kitosan ve PVA içeren hidrojel iskelelerinin HDFa hücreleri üzerindeki etkisini direkt sitotoksisite yöntemi ile MTT testi kullanarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, kitosan oranlarından bağımsız olarak PVA/kitosan içeren tüm yüzeylerin kontrole kıyasla hücre metabolik aktivitesini artırdığını bulmuşlar ve kitosanın ECM tabakasındaki glikozaminoglikanı taklit ederek hücre tutunması ve çoğalması için ideal bir iskele görevi görerek hücre çoğalmasını teşvik ettiğini açıklamışlardır. Besin alışverişine izin vererek hücre iskelesinde büyümeyi teşvik eden kitosanlı yapıların fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olmadığı ve bu sonuçların indirekt sitotoksisite sonuçlarıyla uyumlu olduğu bulunmuştur [114].

Lin ve ark. PVA ve kobalt-hidroksiapatit katkılı PVA bileşenlerinin L929 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisini direkt ve indirekt olarak incelemişler ve MTT sonuçlarına göre diyabetik ayak ülserleri için uygun bir yara örtüsü olup olmayacağını belirlemişlerdir. Direkt temas sonuçlarında PVA yüzeylerindeki aktivitenin kontrol

grubuna kıyasla azalmasının PVA'nın hücreler için düşük tutunma yüzeyi sağlaması kaynaklı olduğu ve PVA'lı membranların yara ortamında kullanıldığında yaraya yapışmayarak ikincil enfeksiyonlara sebep olabileceği belirtilmiştir. İndirekt sonuçlarıyla uyumlu olmayan direkt temas sonuçlarının ortama salınan kobalt iyonlarının hücre büyümesi üzerinde olumsuz etkisinden dolayı farklılık gösterdiğine ve PVA'nın sitotoksik bir etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır [120].

Sobhanian ve ark. PVA/jelatin/aljinat nanofiber iskelelerini kollajen ile destekleyerek insan deri fibroblast hücreleri üzerindeki etkisini direkt sitotoksisite yöntemi ile incelemişlerdir. MTT absorbans değerlerine göre kontrol grubuna kıyasla nanofiberlerin absorbans değerlerinin daha yüksek olduğu ve bunun sebebinin tek boyutlu besiyerinde büyüyen kontrol grubuna göre nanofiberlerin üç boyutlu yapısı üzerinde büyüyen hücrelerin MTT boyasının rengini alarak absorbans değerini etkilemesi olduğu açıklanmıştır. Araştırmacılar direkt temas yönteminin MTT ile kullanılmaya uygun olmadığını belirterek çalışmalarında indirekt sitotoksisite sonuçlarını baz almışlar ve PVA içeren nanofiberlerin hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı sonucuna ulaşmışlardır [121].

Mignon ve ark. farklı moleküler ağırlıklarda hazırladıkları ve laponit nanokili ile birleştirdikleri PEO hidrojellerini direkt temas yöntemi kullanarak insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkisini AlamarBlue testi ile incelemişlerdir. Laponit ilavesi ile PEO hidrojellerinin hücre tutunması ve çoğalmasında anlamlı bir artış sağladığı ve hidrojel yüzeyinde homojen dağılan laponitin saf PEO'ya göre hücre çoğalmasında olumlu etkileyerek hidrojelin iskele yapısını desteklediği bulunmuştur [122].

Yara örtüsü olarak kullanılacak malzemelerin sitotoksik test sonuçlarının farklı parametrelerde değerlendirilmesi adına indirekt ve direkt olarak gerçekleştirilen sitotoksisite sonuçları literatürle uyumlu bulunmuştur ve her iki test tipinde de kitin ilavesinin hidrojellerin iskele görevi görmesi için daha uygun ortam yarattığı ve ayrı ayrı herhangi bir sitotoksik etki oluşturmamalarına rağmen bir arada kullanıldıklarında PEO ve PVA'nın hücre çoğalmasında olumlu etkilediği tespit edilmiştir. Testler arasındaki farklılıkların elimine edilmesi ve bu sonuçların daha netlik kazanabilmesi adına farklı hücre hatları ve farklı sitotoksisite testleri de kullanarak sonuçların doğruluğunun artırılmasının, bu tezde biyouyumlu olduğu değerlendirilen hidrojellerin sitotoksik sonuçlarını daha güvenilir kılacağı düşünülmektedir.

4.2 *In vivo* Toksisite Sonuçları

50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlarda hazırlanan % 2.5 kitin ilaveli PEO ve PVA ile % 5 kitin ilaveli PEO/PVA ekstraktları *Drosophila* besiyeri ile muamele edildikten sonra gelişim ve davranış testleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.1 Gelişim Testleri Sonuçları

Larvadan pupaya dönüşme oranı olan puparasyon, pupadan yetişkine dönüşme oranı olan pupadan çıkma ve yetişkine dönme sayısının larva sayısı ile oranlandığı canlılık oranı hesaplanarak 3 ayrı gelişimsel evrede gelişim testleri gerçekleştirilmiştir. Tüm test sonucu oranları kontrol grubu ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplanmıştır.

Şekil 3.15'te verilen puparasyon oranlarına bakıldığında kontrol grubunda % 90 (± 1) olarak gözlemlenen puparasyon oranı besiyerine % 2.5 kitin içeren 100 µg/mL dozlu PVA ekstraktı eklendiğinde % 84 (± 2) olarak gözlenmiştir ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna karşılık 50 µg/mL dozunun kontrole kıyasla puparasyon oranını düşürdüğü gözlenirse de bu azalış anlamlı bulunmamıştır ve puparasyon oranı ile doz arasında ters bir orantı bulunduğu gözlenmiştir. % 2.5 kitin içeren PEO'nun da 100 µg/mL dozunda kontrole göre puparasyonda azalış görülmüştür. % 86 (± 1) puparasyon oranı istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). %5 kitin içeren PEO/PVA gruplarında ise tüm dozlarda kontrole kıyasla azalış görülmüştür. 50 µg/mL dozu % 82 (± 1) ve 100 µg/mL dozu % 78 (± 1) oranında puparasyon göstermişlerdir ($p < 0.05$). Larvadan pupaya dönüşüm sonucu olan puparasyon sonucuna göre % 2.5 kitin ilaveli PVA ve % 2.5 kitin ilaveli PEO'nun 100 µg/mL'lik dozları ve % 5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın her iki dozu da larvaların puparasyonunu yavaşlatmışlardır. Saf PEO ve PVA gruplarının 50 µg/mL dozlarında görülen düşük toksisitenin sebeplerinden birinin ekstraktın doku ve organlara düşük biyoyararlanımı kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [120].

Şekil 3.16'daki pupadan çıkma başarısı sonuçlarına göre kontrol % 91.106 (± 0.114) oranında pupadan yetişkine dönüşme başarısı göstermiştir. Puparasyon ile benzer sonuçlar gösteren pupadan yetişkine dönme başarısında % 2.5 kitin ilaveli PEO ve % 2.5 kitin ilaveli PVA'nın 100 µg/mL dozları kontrole göre daha az pupadan çıkma oranı göstermişlerdir. Sırasıyla % 88.41 (± 1.18) ve % 83.4 (± 0.91) pupadan çıkma oranı gösteren bu sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). En fazla yetişkine dönme başarısı gösteren grup %2.5 kitin ilaveli PVA'nın 50 µg/mL'lik dozu olmuştur

($p>0.05$). %5 kitin ilaveli PEO/PVA gruplarında artan doza bağılı olarak pupadan çıkma oranı da azalmıştır ($p<0.05$).

Şekil 3.17'deki larvadan yetişkine dönüşümün hesaplandığı canlılık oranlarına göre kontrol grubu oranı %82 (± 1) iken kontrole kıyasla çoğu grupta azalış görülmüştür. Canlılık oranı sonuçları da puparasyon ve pupadan çıkma oranlarıyla eş değer sonuçlar vermiştir. % 2.5 kitin ilaveli PEO ve % 2.5 kitin ilaveli PVA'nın 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozları kontrole kıyasla anlamlı azalış göstermişlerdir ve sırasıyla % 76 (± 0) ve % 70 (± 1) oranlarında pupadan çıkmışlardır ($p<0.05$). % 5 kitin ilaveli PEO/PVA grubunun her iki dozu da kontrole kıyasla anlamlı oranda düşüş göstermiştir ve tüm gruplar içerisinde en az pupadan çıkma oranını, 100 $\mu\text{g/mL}$ dozu % 66 (± 1) olarak göstermiştir ($p<0.05$).

Genel olarak 3 ayrı gelişim aşamasının ele alındığı bu testlerde grupların doz oranı arttıkça kontrole kıyasla gelişimde yavaşlamalar görülmüştür. Özellikle PEO ve PVA'nın bir arada bulundukları form olan % 5 kitin ilaveli PEO/PVA her iki dozunda da kontrole kıyasla anlamlı düşüş sergilemiş ve bu düşüş gelişim evlerinin hepsinde görülmüştür. Gelişim evrelerinin sonuçlarına göre yüksek dozlardaki ekstraktlar ve PEO/PVA'nın bir arada bulunduğu ekstraktlar larva ve pupaların gelişimini etkileyerek bazılarının ölümüne yol açmış ve toksisiteye sebep olmuştur.

Literatürde daha çok nanopartiküllerin, *Drosophila* gelişim toksisitesine etkileri incelenmiş ve morfolojik veya davranış testleriyle desteklenen bu testler sonucu nanopartikül maruziyetinin insan sağlığına olan etkilerinin aydınlatılması ve ilaç taşınmasında alternatif dozlarda nanopartiküllerin kullanımının belirlenmesi amaçlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Literatürdeki bu testleri baz alarak planladığımız *Drosophila* çalışmalarında, nanokitin destekli hidrojenlerle yapılan herhangi bir çalışmaya rastlamadık ve biyomalzemelerin *in vivo* etkinliklerinin araştırılmasında *Drosophila* model organizmasının kullanımının farklı yaklaşım getireceğini umuyoruz.

Vecchio ve ark. farklı dozlarda hazırlanan altın nanopartiküllerinin *Drosophila* üzerindeki *in vivo* toksik etkisini, canlılık ve üreme faaliyetleri üzerinden incelemiştir. Canlılık sonuçlarına göre zaman içerisinde nanopartiküller ile muamele edilen *Drosophila* 'ların yaklaşık %50'sinde kontrole kıyasla azalma görülmüş ve bu azalışın cinsiyete bağlı olmadığı ancak doz-bağımlı azalış gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre farklı yüzey

kaplamasıyla devam ettirdikleri testlerde PEG kaplı nanopartiküllerin toksik etki oluşturmadağı ve kontrolle eş değeri canlılık oranları gösterdiği bulunmuştur. Nanopartikül yapısında bulunan farklı fonksiyonel grupların toksisiteyi farklı etkilediğı sonucuna ulaşılmıştır [123]. Mishra ve ark. selüloz nanofibrillerinin ilaç taşınmasında kullanımı için *Drosophila Oregon-R* suşları üzerinde gelişimsel olarak toksisitesini incelemiştir. Araştırmacılar farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları selüloz nanofibrillerini besiyerlerine ekleyerek gelişimsel süreçlerini takip ettikleri testte selüloz nanofibrillerinin yüksek dozlarının kontrole kıyasla pupa oluşturma ve pupadan çıkma sürelerini uzatıp pupa-yetişkin oluşum sayılarını azalttığını gözlemlemiştir. Buna rağmen reaktif oksijen türleri seviyelerini de ölçerek nanofibrillerin düşük dozlarının ilaç taşınımında kullanılmak üzere uygun olduğu ve *Drosophila* üzerinde toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır [112]. Key ve ark. % 0.05 ve % 5'lik dozlar aralığında hazırladıkları gümüş nanopartiküllerini *Drosophila* besiyeri şişelerine eklemişler ve yumurtadan çıkma, larval gelişim, puparasyon ve pupadan çıkma gibi gelişimsel süreçlerin takibi için *Drosophila* evrelerini takip etmişlerdir. Araştırmacılar gümüş nanopartiküllü besiyerine bırakılan P jenerasyonu yetişkin sineklerin yumurtlama oranı ve F1 jenerasyonunun gelişimi ile normal besiyerine bırakılan P jenerasyonu arasında anlamlı bir farklılık gözlemlememişlerdir. Buna karşılık F1 jenerasyonunun gümüş nanopartikülleri ile muamelesinin larval gelişimi negatif etkilediğı ve yetişkin sinek ömrünü azalttığı bulunmuştur. Pigmentasyon azalışı gözlemlenen yetişkin sineklerde yapılan davranış testleriyle de gümüş nanopartiküllerinin dopamin yolağını etkiledikleri tahmin edilmiştir [124].

4.2.2 Davranış Testleri Sonuçları

4.2.2.1 Larval Sürünme Testi Sonuçları

Besinlerindeki hidrojel ekstraktlarını tüketme yoluyla farklı dozlardaki ekstraktlara maruz kalan larvaların, nöral hasarın varlığına bağlı oluşan hareket motiflerinin tespiti için larva sürünme testi uygulanmıştır. Yabanıl tip yani kontrol grubu larvaları petri kabının merkezinden periferi doğru, yaklaşık olarak düz seyreden bir hareket sergilemişlerdir. Ekstraktlara maruz bırakılan gruplar ise kontrol grubundaki gibi sabit ve düze yakın bir motif yerine daha karışık ve kıvrımlı bir motif sergilemişler ve bazı grup larvalarındaki hareket oranı ihmal edilecek kadar az olmuştur.

Şekil 3.18'de gösterildiğı üzere % 2.5 kitin ilaveli PVA ile muamele edilen larvalar kontrol grubundan farklı ve karışık bir hareket yolu izlemişlerdir. Şekil 3.18 (B)'de 50 µg/mL dozu

ile test edilen bazı larvalar, karışık hareketlerden sonra kontrol grubundaki gibi perifere doğru düz bir hareket sergilemeye çalışsalar da genel olarak izledikleri yol düz değildir. Şekil 3.18 (C)'de 100 µg/mL dozu ile test edilen larvaların hareketi ise sadece bir larva hariç daha kıvrımlı ve periferden uzakta gerçekleşmiştir. Özellikle III numaralı larva diğer larvalara kıyasla daha az hareket etmiş ve periferden en uzak kalan larva olmuştur.

Şekil 3.19'da gösterildiği üzere % 2.5 kitin ilaveli PEO ile muamele edilen larvalarda da görülen hareket motifi kontrol grubundaki gibi düz ve perifere yakın gözlenmemiştir. Şekil 3.19 (B)'de 50 µg/mL dozu ile test edilen larvalarda yalnızca I numaralı larva perifere yaklaşabilmiş, diğer larvaların (II ve III) hareket etme kabiliyetleri ise sınırlı kapasitede gerçekleşmiş ve kıvrımlı bir yol izlemişlerdir. Şekil 3.19 (C)'de 100 µg/mL dozu ile test edilen larvaların izledikleri yol ise önceki doza göre daha düzensiz gerçekleşmiş ve bazı larvalar (I, II) daha fazla kıvrılma göstererek sınırlı hareket sergilemişlerdir.

Şekil 3.20'de gösterildiği üzere % 5 kitin ilaveli PEO/PVA ile muamele edilen larvalardaki hareket motifleri kontrol grubundan farklı gerçekleşmiştir. Şekil 3.20 (B)'de 50 µg/mL dozu ile test edilen larvalar perifere yaklaşmış gözükseler de daha yavaş bir hareket sergilemişler ve zikzaklar çizerek kıvrılma gerçekleştirmişlerdir. Şekil 3.20 (C)'de 100 µg/mL dozu ile test edilen larvalar önceki doza kıyasla daha kıvrımlı ve düzensiz bir motif sergilemişlerdir. III numaralı larva perifere yaklaşan düz bir çizgide hareket ettikten sonra kıvrılarak periferden uzaklaşmış, diğer larvalar (I ve II) ise daha çok kıvrımlı ve sınırlı bir yol izlemişlerdir.

Kıvrılma testinin gözlemsel sonuçlarının doğrulanması için kontrol ve test gruplarının hızları cm.dk^{-1} cinsinden hesaplanmıştır. Şekil 3.21'de görüldüğü üzere kontrol grubunun hızı $5.76 \pm 0.17 \text{ cm.dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. % 2.5 kitin ilaveli PVA'nın 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlarında anlamlı bir fark görülmüştür. Sırasıyla hızları 4.53 ± 0.17 ve $4.5 \pm 0.2 \text{ cm.dk}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve kontrole göre hızlarında azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Bu azalış kıvrılma hareketleri ile tutarlı bir sonuç vermiş ve her iki doz ile muamele edilen larvaların kıvrılma hareketlerinde bir hasar oluşturmuştur. Özellikle yüksek dozlarda daha fazla gerçekleşen karmaşık hareket davranışları larvaların motor nöronlarının bu konsantrasyonlarda hasara uğradığının bir göstergesidir [125].

% 2.5 kitin ilaveli PEO'nun 50 µg/mL'lik dozu kontrole kıyasla hızı $5.2 \pm 0.2 \text{ cm.dk}^{-1}$ ya düşürse de bu sonuç istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Doz artışına bağlı olarak hızın da azaldığı görülmüş ve 100 µg/mL dozunda hız $4.53 \pm 0.03 \text{ cm.dk}^{-1}$ olarak gözlenmiştir ($p<0.05$). En yüksek dozda görülen bu anlamlı azalışın kıvrılma motifleri ile uyumlu olup doza bağımlı olarak artan nöral hasara uğrayan larva hareketinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [126].

%5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın 50 µg/mL'lik dozu kontrole yakın, $5.56 \pm 0.18 \text{ cm.dk}^{-1}$ oranında bir hız sergilemiştir ($p>0.05$). 100 µg/mL dozunda görülen $3.53 \pm 0.29 \text{ cm.dk}^{-1}$ oranındaki hız kontrole göre anlamlı bir düşüş sergilemiştir ($p<0.05$). Yüksek dozda görülen anlamlı azalış yüksek dozla muamele edilen larvaların sergilediği motiflerle uyumlu bir sonuç oluşturmıştır. Diğer gruplar arasında da kontrole kıyasla en fazla hız düşüşü gösteren 100 µg/mL dozu, PEO ve PVA'nın 100 µg/mL dozlarında da görülen anlamlı düşüşle uyumludur. PEO ve PVA'nın hem ayrı formlarında hem de bir arada bulunan formlarında doz oranı arttıkça nöral hasara yol açarak davranış tutarsızlığına sebep oldukları gözlenmiştir [126].

Larval kıvrılma testi sırasında gözlemlenen hareket davranışı ve hız oranlarının test materyallerinin larvalarda oluşturdukları hasara bağlı değişim göstermesi çıkarımı literatürde bu alanda yapılan çalışmalarla uyumludur. Ekka ve ark. SiO_2 ve TiO_2 nanokompozitlerinin farklı dozlarının *Drosophila* davranışları üzerindeki etkisini incelemek için larva sürünme testi gerçekleştirmişler ve bunun için % 2 agaroz içeren petri içerisinde larva hareketlerini gözlemlemişlerdir. En yüksek doz hariç diğer dozlarda kontrole kıyasla larva hızında azalma gözlenmiş ve nanokompozitlerin gelişimin erken evresi olan larva evresinde dokulara alınmasının sensör nöronları etkileyerek davranış üzerinde bir etkisi olduğuna sonucuna ulaşılmıştır [127]. Gautam ve ark. h-BN ve ZrO_2 kompozitlerinin *in vivo* sitotoksitesini inceledikleri çalışmada % 2 agar içeren petri kaplarında kompozitlere maruz bırakılan larva ve yabanıl tip larvaların hareketlerini gözlemleyip hızlarını hesaplamışlardır. Kontrol grubu larvaları periferde doğru düz bir hareket sergilerken test malzemeleri ile muamele edilen larvaların durarak veya birkaç defa yön değiştirerek daha uzun bir hareket yolu izledikleri gözlenmiştir. Gözlemsel sonuçların hız oranları ile kıyaslanmasıyla; kontrole göre hızlarında anlamlı azalış görülen larvaların nöral aktivitelerinin hasara uğrayarak, bu hareketlere sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar davranış testi sonuçlarından yola çıkarak daha az toksisite gösteren dozların

nano formülasyonlarının ilaç taşınmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir [106]. Bag ve ark. ise Fe_3O_4 ile kaplı guar gum nanopartiküllerinin *Drosophila* davranışları üzerindeki etkisini incelemek için larva sürünme testi kullanmışlar ve % 2 agar içeren petri kaplarına yerleştirdikleri nanopartiküllere maruz kalan larvaların hareketlerini gözlemlemişlerdir. Kontrol grubu larvalarının düz bir hareket sergilerken nanopartiküle maruz kalan test larvalarının birçok noktada durarak hareket ettikleri gözlenmiş ve hızlarının kontrole kıyasla azaldığı hesaplanmıştır. Araştırmacılar nanokompozit miktarı arttıkça larva hızlarının da arttığını gözlemlemişler ve bu testin gelişimin erken evresindeki nöral fonksiyonların kontrolünü sağladığını belirtmişlerdir [128].

4.2.2.2 Yetişkin Tırmanma Testi Sonuçları

Farklı dozlarda hidrojel ekstraktlarına maruz bırakılan yetişkin *Drosophila* davranışlarını incelemek için yer çekiminin tersine doğru gösterdikleri uçuş aktivitelerinden yararlanılarak yetişkin tırmanma testi gerçekleştirilmiştir. 1 dakika içerisinde 100 mL'lik dereceli silindir içerisinde 80 mL sınırını geçen yetişkin sinekler sayılmış ve % cinsinden hesaplanarak kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

Şekil 3.22'deki sonuçlara göre yetişkin kontrol grubunun % 37.03 (± 1.96)'ü 80 ml çizgisine kadar olan sınırı 1 dakika içerisinde geçmişlerdir. Test gruplarında doz artışına bağlı olarak sınırı geçme oranı azalmıştır.

% 2,5 kitin ilaveli PVA ekstraktlarının 50 $\mu\text{g/mL}$ dozuna maruz kalmış yetişkin sinekler kontrol ile eş değer tırmanma hareketi sergileseler de 100 $\mu\text{g/mL}$ dozunda % 29.2 (± 0.98)'si sınırı geçerek kontrole kıyasla azalış göstermişlerdir ($p < 0.05$). % 2.5 kitin ilaveli PEO ekstraktlarının 50 $\mu\text{g/mL}$ dozuna maruz kalmış sineklerde de PVA ile benzer sonuçlar görülmüş ve kontrol grubu ile eş değer bir tırmanma oranı gözlenmiştir ($p > 0.05$). 100 $\mu\text{g/mL}$ dozuna maruz kalan sineklerde kontrole göre tırmanma oranı azalmış ve sineklerin % 31.0 (± 0.5)'i sınır çizgisini aşabilmiştir ($p < 0.05$).

% 5 kitin ilaveli PEO/PVA ekstraktlarına maruz kalmış sineklerde ise kontrole kıyasla her iki dozda da anlamlı oranda azalış görülmüştür. 50 $\mu\text{g/mL}$ dozunda tırmanma oranı % 25.33 (± 1.45) ve 100 $\mu\text{g/mL}$ dozunda ise tırmanma oranı % 15.66 (± 1.85) oranında hesaplanmıştır ($p < 0.05$).

Larva sürünme testi ile benzer sonuçlar gösteren yetişkin tırmanma testinde de yüksek dozlarda yetişkin sineklerin lokomotor aktiviteleri etkilenmiş ve sınırı geçen sineklerin oranı kontrole kıyasla azalmıştır. Bu testle yetişkinlerin nöral aktivitelerinde oluşan hasara bağlı olarak, normalde sergiledikleri negatif geotropism davranışının aksine pozitif geotropism davranışı sergiledikleri görülmüştür [129].

Literatüre bakıldığında da bu sonuçlarla uyumlu olarak yetişkin tırmanma testinde görülen tırmanma oranlarındaki farklılıkların *Drosophila* toksisitesini belirlemede önemli bir parametre olduğu görülmektedir. Sundararajan ve ark. CeO₂ nanopartiküllerinin *in vivo* toksisitesini incelemek amaçlı yetişkin tırmanma testi gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları nanopartiküllerle 1 ay boyunca muamele ettikleri yetişkin sinekleri 10 cm'lik tüplere alarak 3 cm sınırını 15 saniye içinde tırmanabilen sinek yüzdesini hesaplamışlardır. Kontrol ve test gruplarında anlamlı ölçüde fark bulunmamış ve nanopartiküllerin yetişkin sineklerde nörodejeneratif hasar yaratmadığı ve toksik etki oluşturmadığı sonucuna ulaşılmıştır [130]. Sabat ve ark. TiO₂ nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının *Drosophila* davranışı ve duyu organlarında yaptığı toksisiteyi araştırdıkları çalışmada nanopartiküllere maruz kalan yetişkin sineklere tırmanma testi uygulamışlardır. Testin sonuçlarına göre artan konsantrasyon miktarına bağlı olarak tırmanma faaliyetleri kontrole kıyasla azalmış ve yüksek konsantrasyonlarda %20'den fazla tırmanma hızında azalma görülmüştür. Azalan tırmanma aktivitesi; larval dönemde oluşan hasarın metamorfoz ile giderilmeyerek anormal yetişkin davranışına sebep olması ile açıklanmıştır. Nanopartiküllerin nöronlar üzerindeki toksik etkisi sonucu sineklerde gözlemlenen anormal davranışların önemli bir belirteç olduğu ve medikal alanda nanopartikül kullanımı öncesi dikkate alınması gereken bir parametre olduğu belirtilmiştir [131].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın sonuçlarına göre,

1. İndirekt sitotoksistide 24 saat boyunca hiçbir grup, insan dermal fibroblast canlılığını kontrole göre azaltmamış, 48 saat sonunda bazı gruplarda azalış görülse de bu azalış sitotoksik etki sınırı olan % 30'u aşmamaktadır. İndirekt sitotoksistide için hazırlanan hidrojel ekstraktlarının fibroblastlar üzerinde toksik etkiler oluşturmadığı gözlenmiştir.
2. 48 saat indirekt method ile inkübe edilen fibroblast hücrelerinin canlılığı, kompozitlere kitin ilavesi ile çoğu grupta artış göstermiştir. PEO ve PVA'nın ayrı kompozit formlarının aksine PEO/PVA ve kitin ilaveli formunun tüm gruplarında canlılık artışları görülmüştür. Kitin ilaveli PEO/PVA, hücreler üzerinde iskele görevi görerek hücre canlılığını desteklemiş ve yara örtüsü için uygun bir materyal olarak belirlenmiştir.
3. İndirekt aktiviteyi destekler nitelikte direkt aktivitede de %1, %2.5 ve %5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın tüm formlarının canlılığı en fazla artıran gruplar olduğu bulunmuştur.
4. Kitin ilavesinin hidrojin yüzey özelliklerini artırarak hücre canlılığını desteklediği gözlenmiştir.
5. *In vivo Drosophila* ile yapılan testlerde, % 2.5 kitin ilaveli PVA, % 2.5 kitin ilaveli PEO'nun 50 µg/mL ve 100 µg/mL'lik dozları canlılık testlerinde kontrole yakın oranlar göstermesine rağmen %5 kitin ilaveli PEO/PVA canlılık testlerinde önemli oranda düşüş sergilemiştir. Davranış testleri ile de özellikle 100 µg/mL dozuna maruz kalan larva ve yetişkin sineklerin hareket motifleri bozulmuştur. %5 kitin ilaveli PEO/PVA'nın *Drosophila* üzerinde toksik bir etki oluşturduğu gözlenmiştir.
6. Yara örtüsü olarak geliştirilecek malzemelerin fibroblastlar üzerinde sitotoksik etki oluşturmaması önemli bir bulgu iken *Drosophila* suşlarında toksik etkiler oluşturmaması insan üzerinde bu malzemeler kullanılmadan önce farklı testlerle desteklenmesi gereken bir sonuçtur. Farklı hücre hatları kullanılarak ve devamında farklı canlılarla *in vivo* testler ile desteklenerek hidrojellerin biyouyumluluğu hakkında kapsamlı bir bilgi edinilebileceği ve bunun sonucunda kronik yaralarda kullanılmaya aday yara örtü malzemesinin sitotoksik profili detaylandırılarak gerektiğinde hidrojel yapısında iyileştirmelere gidilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] R. Zeng *et al.*, “Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions,” *Cell Tissue Res.*, vol. 374, no. 2, pp. 217–232, 2018, doi: 10.1007/s00441-018-2830-1.
- [2] S. A. Eming, P. Martin, and M. Tomic-Canic, “Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 265, Dec. 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
- [3] M. Balasubramani, T. R. Kumar, and M. Babu, “Skin substitutes: A review,” *Burns*, vol. 27, no. 5, pp. 534–544, 2001, doi: 10.1016/S0305-4179(01)00018-3.
- [4] R. R. Wickett and M. O. Visscher, “Structure and function of the epidermal barrier,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 34, no. 10 SUPPL., pp. 98–110, 2006, doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.295.
- [5] L. Yildirim, N. T. K. Thanh, and A. M. Seifalian, “Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 12, pp. 638–648, 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.08.004.
- [6] C. A. Brohem, L. B. da Silva Cardeal, M. Tiago, M. S. Soengas, S. B. de Moraes Barros, and S. S. Maria-Engler, “Artificial skin in perspective: concepts and applications,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 35–50, Feb. 2011, doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x.
- [7] R. F. Pereira, C. C. Barrias, P. L. Granja, and P. J. Bartolo, “Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair,” *Nanomedicine*, vol. 8, no. 4, pp. 603–621, 2013, doi: 10.2217/nnm.13.50.
- [8] G. Rolin *et al.*, “Development and characterization of a human dermal equivalent with physiological mechanical properties,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 251–258, 2012, doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00564.x.
- [9] S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann, and E. Reichmann, “Tissue engineering of skin,” *Burns*, vol. 36, no. 4, pp. 450–460, 2010, doi: 10.1016/j.burns.2009.08.016.
- [10] I. Jones, L. Currie, and R. Martin, “A guide to biological skin substitutes The function of normal skin,” *Br. J. Plast. Surg. Br. Assoc. Plast. Surg.*, vol. 55, pp. 185–193, 2002, doi: 10.1054/hips.2002.3800.
- [11] J. Fenner and R. A. F. Clark, “Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin,” in *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2016, pp. 1–17.

- [12] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, and R. Wolf, "Structure and function of the epidermis related to barrier properties," *Clin. Dermatol.*, vol. 30, no. 3, pp. 257–262, 2012, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- [13] E. Proksch, J. M. Brandner, and J. M. Jensen, "The skin: An indispensable barrier," *Exp. Dermatol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1063–1072, 2008, doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
- [14] A. D. Metcalfe and M. W. J. Ferguson, "Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5100–5113, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.031.
- [15] Z. Zhang and B. B. Michniak-Kohn, "Tissue engineered human skin equivalents," *Pharmaceutics*, vol. 4, no. 1, pp. 26–41, 2012, doi: 10.3390/pharmaceutics4010026.
- [16] S. MacNeil, "Progress and opportunities for tissue-engineered skin," *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 874–880, 2007, doi: 10.1038/nature05664.
- [17] V. Haydont *et al.*, *Fibroblasts from the Human Skin Dermo-Hypodermal Junction are Distinct from Dermal Papillary and Reticular Fibroblasts and from Mesenchymal Stem Cells and Exhibit a Specific Molecular Profile Related to Extracellular Matrix Organization and Modeling*, vol. 9, no. 2. 2020.
- [18] B. A. Schmidt and V. Horsley, "Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing," *Dev.*, vol. 140, no. 7, pp. 1517–1527, 2013, doi: 10.1242/dev.087593.
- [19] J. Zimoch *et al.*, "Bio-engineering a prevascularized human tri-layered skin substitute containing a hypodermis," *Acta Biomater.*, vol. 134, pp. 215–227, 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.07.033.
- [20] A. Demir and E. Cevher, "Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies," *Biomater. Appl. Nanomedicine*, 2011, doi: 10.5772/25177.
- [21] J. Boateng and O. Catanzano, "Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 11, pp. 3653–3680, 2015, doi: 10.1002/jps.24610.
- [22] G. S. Lazarus *et al.*, "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing," *Wound Repair Regen.*, vol. 2, no. 3, pp. 165–170, 1994, doi: 10.1046/j.1524-475X.1994.20305.x.
- [23] N. B. Menke, K. R. Ward, T. M. Witten, D. G. Bonchev, and R. F. Diegelmann, "Impaired wound healing," *Clin. Dermatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 19–25, 2007, doi:

- 10.1016/j.clindermatol.2006.12.005.
- [24] M. G. Tonnesen, X. Feng, and R. A. F. Clark, “Angiogenesis in wound healing,” *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, vol. 5, no. 1, pp. 40–46, 2000, doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.
 - [25] S. Hamdan *et al.*, “Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications,” *ACS Cent. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 163–175, 2017, doi: 10.1021/acscentsci.6b00371.
 - [26] G. Broughton, J. E. Janis, and C. E. Attinger, “The basic science of wound healing,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, no. 7 SUPPL., pp. 12–34, 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2.
 - [27] M. B. Witte and A. Barbul, “General principles of wound healing,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 77, no. 3, pp. 509–528, 1997, doi: 10.1016/S0039-6109(05)70566-1.
 - [28] M. C. Robson, “Wound healing: biologic features and approaches to maximum healing trajectories. Curr Prob Surg 2001:38; 61-148.,” *Curr. Probl. Surg.*, vol. 38, no. 2, pp. 72–141, 2001.
 - [29] R. Lobmann, G. Schultz, and H. Lehnert, “Proteases and the diabetic foot syndrome: Mechanisms and therapeutic implications,” *Diabetes Care*, vol. 28, no. 2, pp. 461–471, 2005, doi: 10.2337/diacare.28.2.461.
 - [30] C. T. Hess, *Clinical Guide to Skin and Wound Care*, 7th editio. Lippincott Williams&Wilkins, 2013.
 - [31] P. Martin and S. J. Leibovich, “Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly,” *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 599–607, 2005, doi: 10.1016/j.tcb.2005.09.002.
 - [32] S. enoch David John Leaper, “Basic science surgery 26:2 31 Basic science of wound healing,” vol. 26, no. 2, pp. 37–42, 2008.
 - [33] S. Gorgieva and V. Kokol, “Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives,” *Biomater. Appl. Nanomedicine*, no. May 2014, 2011, doi: 10.5772/24118.
 - [34] S. Guo and L. A. DiPietro, “Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 219–229, 2010, doi: 10.1177/0022034509359125.
 - [35] Z. Zhu, J. Ding, and E. E. Tredget, “The molecular basis of hypertrophic scars,” *Burn. Trauma*, vol. 4, no. 1, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1186/s41038-015-0026-4.
 - [36] I. A. Darby, B. Laverdet, F. Bonté, and A. Desmoulière, “Fibroblasts and

- myofibroblasts in wound healing,” *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 7, pp. 301–311, 2014, doi: 10.2147/CCID.S50046.
- [37] S. J. M. Yussof, E. Omar, D. R. Pai, and S. Sood, “Cellular events and biomarkers of wound healing,” *Indian J. Plast. Surg.*, vol. 45, no. 2, pp. 220–228, 2012, doi: 10.4103/0970-0358.101282.
- [38] C. C. Johnstone, A. Farley, and C. Hendry, “The physiological basics of wound healing,” *Nurs. Stand.*, vol. 19, no. 43, pp. 59–65, Jul. 2005, doi: 10.7748/ns2005.07.19.43.59.c3906.
- [39] J. Li, J. Chen, and R. Kirsner, “Pathophysiology of acute wound healing,” *Clin. Dermatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 9–18, 2007, doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007.
- [40] M. Xue and C. J. Jackson, “Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring,” *Adv. Wound Care*, vol. 4, no. 3, pp. 119–136, 2015, doi: 10.1089/wound.2013.0485.
- [41] J. M. Reinke and H. Sorg, “Wound repair and regeneration,” *Eur. Surg. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 35–43, 2012, doi: 10.1159/000339613.
- [42] D. G. Greenhalgh, “The role of apoptosis in wound healing,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 30, no. 9, pp. 1019–1030, 1998, doi: 10.1016/S1357-2725(98)00058-2.
- [43] N. Mayet *et al.*, “A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 8, pp. 2211–2230, 2014, doi: 10.1002/jps.24068.
- [44] T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, and I. M. Herman, “Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes and Approaches to Care,” *Adv. Ski. Wound Care*, vol. 25, no. 8, pp. 349–370, 2012.
- [45] J. A. D. Whitney, “Overview: Acute and chronic wounds,” *Nurs. Clin. North Am.*, vol. 40, no. 2, pp. 191–205, 2005, doi: 10.1016/j.cnur.2004.09.002.
- [46] İ. H. Açar, N. G. Açar, Z. A. Sayiner, M. Araz, and E. Akarsu, “Hospitalisation cost of diabetic patients with foot ulcers: A retrospective descriptive analysis from Turkey,” *Turkish J. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 3, pp. 255–260, 2021, doi: 10.25179/tjem.2021-82008.
- [47] “IDF Diabetes Atlas 10th edition.” [Online]. Available: www.diabetesatlas.org.
- [48] E. Planı, “Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı,” 2011. [Online]. Available: <http://www.anilmatbaasi.com>.
- [49] N. Saltoğlu *et al.*, “Diyabetik ayak yarası ve İnfeksiyonunun tanısı, tedavisi ve

- önlenmesi: Ulusal uzlaşısı raporu,” *Klimik Derg.*, vol. 28, no. June, pp. 2–34, 2015, doi: 10.5152/kd.2015.29.
- [50] L. C. Andersson, H. C. Nettelblad, and G. Kratz, “From Basic Wound Healing to Modern Skin Engineering,” *Artif. Organs*, no. October, pp. 93–105, 2009, doi: 10.1007/978-1-84882-283-2_6.
- [51] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [52] P. Aramwit, *Introduction to biomaterials for wound healing*, vol. 2, no. December. Elsevier Ltd, 2016.
- [53] H. K. Raut, R. Das, Z. Liu, X. Liu, and S. Ramakrishna, “Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement,” *Biotechnol. J.*, vol. 15, no. 12, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1002/biot.202000160.
- [54] C. Shi *et al.*, “Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. March, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00182.
- [55] G. D. WINTER, “Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig,” *Nature*, vol. 193, no. 4812, pp. 293–294, Jan. 1962, doi: 10.1038/193293a0.
- [56] K. Nuutila and E. Eriksson, “Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings,” *Adv. Wound Care*, vol. 10, no. 12, pp. 685–698, 2021, doi: 10.1089/wound.2020.1232.
- [57] S. Dhivya, V. V. Padma, and E. Santhini, “Wound dressings - A review,” *Biomed.*, vol. 5, no. 4, pp. 24–28, 2015, doi: 10.7603/s40681-015-0022-9.
- [58] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, and G. M. Eccleston, “Wound healing dressings and drug delivery systems: A review,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 2892–2923, 2008, doi: 10.1002/jps.21210.
- [59] T. S. Stashak, E. Farstvedt, and A. Othic, “Update on wound dressings: Indications and best use,” *Clin. Tech. Equine Pract.*, vol. 3, no. 2 SPEC. ISS., pp. 148–163, 2004, doi: 10.1053/j.ctep.2004.08.006.
- [60] T. M. Freyman, I. V. Yannas, and L. J. Gibson, “Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 46, no. 3–4, pp. 273–282, 2001, doi: 10.1016/S0079-6425(00)00018-9.
- [61] A. E. Stoica, C. Chircov, and A. M. Grumezescu, “Nanomaterials for wound dressings: An Up-to-Date overview,” *Molecules*, vol. 25, no. 11, 2020, doi:

10.3390/molecules25112699.

- [62] C. Daunton, S. Kothari, L. Smith, and D. Steele, “A history of materials and practices for wound management,” *Wound Pract. Res. J. Aust. Wound Manag. Assoc.*, vol. 20, no. 4, pp. 174–176, 2012.
- [63] Y. Guo *et al.*, “Anisotropic swelling wound dressings with vertically aligned water absorptive particles,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 15, pp. 8173–8180, 2018, doi: 10.1039/c7ra13764h.
- [64] S. Varghese and C. Jamora, “Hydrogels: A versatile tool with a myriad of biomedical and research applications for the skin,” *Expert Rev. Dermatol.*, vol. 7, no. 4, pp. 315–317, 2012, doi: 10.1586/edm.12.28.
- [65] E. M. Ahmed, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review,” *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [66] M. Li, G. Pan, H. Zhang, and B. Guo, “Hydrogel adhesives for generalized wound treatment: Design and applications,” *J. Polym. Sci.*, no. January, pp. 1–32, 2022, doi: 10.1002/pol.20210916.
- [67] K. Skórkowska-Telichowska, M. Czemplik, A. Kulma, and J. Szopa, “The local treatment and available dressings designed for chronic wounds,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 68, no. 4, 2013, doi: 10.1016/j.jaad.2011.06.028.
- [68] S. Merino, C. Martín, K. Kostarelos, M. Prato, and E. Vázquez, “Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 5, pp. 4686–4697, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b01433.
- [69] S. Murugesan and T. Scheibel, “Chitosan-based nanocomposites for medical applications,” *J. Polym. Sci.*, vol. 59, no. 15, pp. 1610–1642, 2021, doi: 10.1002/pol.20210251.
- [70] E. A. Kamoun, E. R. S. Kenawy, and X. Chen, “A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings,” *J. Adv. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 217–233, 2017, doi: 10.1016/j.jare.2017.01.005.
- [71] S. Noori, M. Kokabi, and Z. M. Hassan, “Poly(vinyl alcohol)/chitosan/honey/clay responsive nanocomposite hydrogel wound dressing,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 21, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1002/app.46311.
- [72] H. Nosrati *et al.*, “Preparation and characterization of poly(ethylene oxide)/zinc oxide nanofibrous scaffold for chronic wound healing applications,” *Polym. Med.*, vol. 50, no. 1, pp. 41–51, 2020, doi: 10.17219/pim/128378.

- [73] L. Wang, X. Li, T. Sun, Y. H. Tsou, H. Chen, and X. Xu, "Dual-Functional Dextran-PEG Hydrogel as an Antimicrobial Biomedical Material," *Macromol. Biosci.*, vol. 18, no. 2, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1002/mabi.201700325.
- [74] A. Shabunin *et al.*, "Composite Wound Dressing Based on Chitin/Chitosan Nanofibers: Processing and Biomedical Applications," *Cosmetics*, vol. 6, no. 1, p. 16, Mar. 2019, doi: 10.3390/cosmetics6010016.
- [75] T. L. Yang, "Chitin-based materials in tissue engineering: Applications in soft tissue and epithelial organ," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 1936–1963, 2011, doi: 10.3390/ijms12031936.
- [76] R. Singh, K. Shitiz, and A. Singh, "Chitin and chitosan: biopolymers for wound management," *Int. Wound J.*, vol. 14, no. 6, pp. 1276–1289, 2017, doi: 10.1111/iwj.12797.
- [77] I. Latańska, B. Kolesińska, Z. Draczyński, and W. Sujka, "The use of chitin and chitosan in manufacturing dressing materials," *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.*, vol. 25, pp. 16–36, 2020, doi: 10.15259/PCACD.25.002.
- [78] R. A. A. Muzzareui, "Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients," *Carbohydr. Polym.*, vol. 20, pp. 7–16, 1993, [Online]. Available: http://ac.els-cdn.com/0144861793900272/1-s2.0-0144861793900272-main.pdf?_tid=192c08dc-4552-11e7-8bd1-00000aabb0f02&acdnat=1496160637_6fd043af5c8f5d6625a3131287d6dd9c.
- [79] M. M. Kim and S. K. Kim, "Chitooligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 11, pp. 2661–2666, 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.015.
- [80] P. K. Dutta, Ed., *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*. New Delhi: Springer India, 2016.
- [81] B. Basu and S. Nath, "Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility," in *Advanced Biomaterials*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 1–18.
- [82] *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century*. 2019.
- [83] T. J. Webster, D. A. Stout, S. Kalmodia, and B. Basu, "Experimental Methods and in Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity of Nanomaterials," *Nano Life*, vol. 03, no. 01, p. 1340008, 2013, doi: 10.1142/s1793984413400084.
- [84] US-FDA, "Use of International Standard ISO 10993-1, 'Biological evaluation of medical devices-Part 1: evaluation and testing within a risk management process'

- guidance for industry and Food and Drug Administration staff,” *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, no. 301, pp. 1–68, 2020, [Online]. Available: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-%0Ahttp://www.fda.gov.proxy1.library.jhu.edu/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm348890.pdf>.
- [85] International Organization for Standardization, “Biological evaluation of medical devices-from IHS Copyright Protected Document,” vol. 2009, 2009.
- [86] J. M. Anderson, “Biological Responses to Materials,” *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 81–110, Aug. 2001, doi: 10.1146/annurev.matsci.31.1.81.
- [87] L. Tolosa, M. T. Donato, and M. J. Gómez-Lechón, “General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay,” 2015, pp. 333–348.
- [88] C.-P. Segeritz and L. Vallier, “Cell Culture,” in *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Elsevier, 2017, pp. 151–172.
- [89] M. A. T. Freeberg, J. G. Kallenbach, and H. A. Awad, *Assessment of cellular responses of tissue constructs in vitro in regenerative engineering*, vol. 1–3. Elsevier, 2019.
- [90] W. LI, J. ZHOU, and Y. XU, “Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices,” *Biomed. Reports*, vol. 3, no. 5, pp. 617–620, 2015, doi: 10.3892/br.2015.481.
- [91] T. L. Riss *et al.*, “Cell Viability Assays,” *Assay Guid. Man.*, no. Md, pp. 1–25, 2004, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>.
- [92] J. M. Sorrell and A. I. Caplan, “Fibroblast heterogeneity: More than skin deep,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 5, pp. 667–675, 2004, doi: 10.1242/jcs.01005.
- [93] M. A. Kisiel and A. S. Klar, “Isolation and culture of human dermal fibroblasts,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1993, pp. 71–78, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9473-1_6.
- [94] M. E. Smithmyer, L. A. Sawicki, and A. M. Kloxin, “Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease,” *Biomater. Sci.*, vol. 2, no. 5, pp. 634–650, 2014, doi: 10.1039/c3bm60319a.
- [95] I. A. Darby and T. D. Hewitson, “Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 257, no. 07, pp. 143–179, 2007, doi: 10.1016/S0074-7696(07)57004-X.
- [96] C. Ong, L. Y. L. Yung, Y. Cai, B. H. Bay, and G. H. Baeg, “Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity,” *Nanotoxicology*, vol. 9,

- no. 3, pp. 396–403, 2015, doi: 10.3109/17435390.2014.940405.
- [97] L. T. Reiter, L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, and E. Bier, “A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*,” *Genome Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 1114–1125, 2001, doi: 10.1101/gr.169101.
- [98] M. C. Chifiriuc, A. C. Ratiu, M. Popa, and A. Al Ecovoiu, “Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3390/ijms17020036.
- [99] O. M. Ionescu *et al.*, “New Hyaluronic Acid / Polyethylene Oxide-Based Electrospun Biological Evaluation,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, p. 1291, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/polym13081291%0AAcademic>.
- [100] O. M. Ionescu *et al.*, “Design, preparation and in vitro characterization of biomimetic and bioactive chitosan/polyethylene oxide based nanofibers as wound dressings,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 193, no. May, pp. 996–1008, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.166.
- [101] L. Sankari, B. L. Fernandes, C. L. K. Rebelatto, and P. R. S. Brofman, “Evaluation of PVA hydrogel as an extracellular matrix for in vitro study of fibroblast proliferation,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 69, no. 10, pp. 653–658, 2020, doi: 10.1080/00914037.2019.1596915.
- [102] H. T. Hsieh, H. M. Chang, W. J. Lin, Y. T. Hsu, and F. Der Mai, “Poly-Methyl Methacrylate/Polyvinyl Alcohol Copolymer Agents Applied on Diabetic Wound Dressing,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10193-5.
- [103] G. Xia *et al.*, “Nanoparticles/thermosensitive hydrogel reinforced with chitin whiskers as a wound dressing for treating chronic wounds,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 17, pp. 3172–3185, 2017, doi: 10.1039/c7tb00479f.
- [104] B. Tyliczek, S. Kudłacik-Kramarczyk, A. Drabczyk, and A. Sobczak-Kupiec, “Synthesis, characterization, and in vitro cytotoxicity of chitosan hydrogels containing nanogold,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 68, no. 4, pp. 175–182, 2019, doi: 10.1080/00914037.2018.1429438.
- [105] K. Sood, J. Kaur, H. Singh, S. Kumar Arya, and M. Khatri, “Comparative toxicity evaluation of graphene oxide (GO) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles on *Drosophila melanogaster*,” *Toxicol. Reports*, vol. 6, no. April, pp. 768–781, 2019, doi: 10.1016/j.toxrep.2019.07.009.

- [106] A. Gautam *et al.*, “Enhanced mechanical properties of hBN-ZrO₂ composites and their biological activities on: *Drosophila melanogaster*: Synthesis and characterization,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 70, pp. 40977–40996, 2019, doi: 10.1039/c9ra07835e.
- [107] R. Z. Murray, Z. E. West, A. J. Cowin, and B. L. Farrugia, “Development and use of biomaterials as wound healing therapies,” *Burn. Trauma*, vol. 7, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1186/s41038-018-0139-7.
- [108] F. Piccinini, A. Tesei, C. Arienti, and A. Bevilacqua, “Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay,” *Biol. Proced. Online*, vol. 19, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s12575-017-0056-3.
- [109] Q. F. Liu *et al.*, “In vivo screening of traditional medicinal plants for neuroprotective activity against A β 42 cytotoxicity by using drosophila models of Alzheimer’s disease,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 38, no. 12, pp. 1891–1901, 2015, doi: 10.1248/bpb.b15-00459.
- [110] B. K. Barik and M. Mishra, “Nanoparticles as a potential teratogen: a lesson learnt from fruit fly,” *Nanotoxicology*, vol. 13, no. 2, pp. 258–284, 2019, doi: 10.1080/17435390.2018.1530393.
- [111] N. Agrawal and P. Shah, *Toxicology of Nanoparticles: Insights from Drosophila*. 2020.
- [112] P. K. Mishra *et al.*, “Wood-based cellulose nanofibrils: Haemocompatibility and impact on the development and behaviour of drosophila melanogaster,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 8, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3390/biom9080363.
- [113] N. Charernsriwilaiwat, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, and P. Opanasopit, “Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing,” *Int. Wound J.*, vol. 11, no. 2, pp. 215–222, 2014, doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01077.x.
- [114] A. Islam *et al.*, “Fabrication and performance characteristics of tough hydrogel scaffolds based on biocompatible polymers,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.010.
- [115] M. He *et al.*, “Construction of chitin/PVA composite hydrogels with jellyfish gel-like structure and their biocompatibility,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 9, pp. 3358–3365, 2014, doi: 10.1021/bm500827q.
- [116] R. B. Trinca, C. B. Westin, J. A. F. da Silva, and Â. M. Moraes, “Electrospun

- multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions,” *Eur. Polym. J.*, vol. 88, pp. 161–170, 2017, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021.
- [117] M. Alishahi *et al.*, “Glucantime-loaded electrospun core-shell nanofibers composed of poly(ethylene oxide)/gelatin-poly(vinyl alcohol)/chitosan as dressing for cutaneous leishmaniasis,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 163, pp. 288–297, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.240.
- [118] T. Groth, P. Falck, and R. R. Miethke, “Cytotoxicity of biomaterials - Basic mechanisms and in vitro test methods: A review,” *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, vol. 23, no. 6, pp. 790–799, 1995, doi: 10.1177/026119299502300609.
- [119] E. Jablonská, J. Kubásek, D. Vojtěch, T. Ruml, and J. Lipov, “Test conditions can significantly affect the results of in vitro cytotoxicity testing of degradable metallic biomaterials,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-85019-6.
- [120] W. C. Lin and C. M. Tang, “Evaluation of polyvinyl alcohol/cobalt substituted hydroxyapatite nanocomposite as a potential wound dressing for diabetic foot ulcers,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/ijms21228831.
- [121] P. Sobhanian, M. Khorram, S. S. Hashemi, and A. Mohammadi, “Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 977–987, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.045.
- [122] A. Mignon *et al.*, “Combined effect of Laponite and polymer molecular weight on the cell-interactive properties of synthetic PEO-based hydrogels,” *React. Funct. Polym.*, vol. 136, no. September 2018, pp. 95–106, 2019, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.017.
- [123] G. Vecchio *et al.*, “In vivo nanotoxicity assessment: The role of size, surface coating, nanostructuration, and dose-metrics,” *Tech. Proc. 2011 NSTI Nanotechnol. Conf. Expo, NSTI-Nanotech 2011*, vol. 3, pp. 509–512, 2011.
- [124] S. C. Silver Key, D. Reaves, F. Turner, and J. J. Bang, “Impacts of Silver Nanoparticle Ingestion on Pigmentation and Developmental Progression in *Drosophila*,” *Atlas J. Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 52–61, 2011, doi: 10.5147/ajb.2011.0048.
- [125] D. S. Vicario, N. H. Naqvi, and J. N. Raksin, “Conditional modification of behavior in *drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in

- defined neurons,” *J. Neurobiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 81–92, 2001, doi: 10.1002/neu.1018.
- [126] J. Riedl and M. Louis, “Behavioral neuroscience: Crawling is a No-brainer for fruit fly larvae,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 20, pp. R867–R869, 2012, doi: 10.1016/j.cub.2012.08.018.
- [127] B. Ekka, G. Dhar, S. Sahu, M. Mishra, P. Dash, and R. K. Patel, “Removal of Cr(VI) by silica-titania core-shell nanocomposites: In vivo toxicity assessment of the adsorbent by *Drosophila melanogaster*,” *Ceram. Int.*, vol. 47, no. 13, pp. 19079–19089, 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.03.254.
- [128] J. Bag *et al.*, “Fe₃O₄ coated guar gum nanoparticles as non-genotoxic materials for biological application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 165, pp. 333–345, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.144.
- [129] S. Priyadarsini, S. K. Sahoo, S. Sahu, S. Mukherjee, G. Hota, and M. Mishra, “Oral administration of graphene oxide nano-sheets induces oxidative stress, genotoxicity, and behavioral teratogenicity in *Drosophila melanogaster*,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 19, pp. 19560–19574, 2019, doi: 10.1007/s11356-019-05357-x.
- [130] V. Sundararajan *et al.*, “*Drosophila melanogaster* as an in vivo model to study the potential toxicity of cerium oxide nanoparticles,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 490, no. December 2018, pp. 70–80, 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.06.017.
- [131] D. Sabat, A. Patnaik, B. Ekka, P. Dash, and M. Mishra, “Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of *Drosophila melanogaster*,” *Physiol. Behav.*, vol. 167, pp. 76–85, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.08.032.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sedef KIRDAR

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2019-2022
	Uludağ Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji	2018-2019
Lisans	İnönü Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik (%100 İngilizce)	2013-2017
	İnönü Üniversitesi Yabancı Diller Meslek Yüksekokulu İngilizce Hazırlık	2012-2013
Lise	Tekirdağ Anadolu Lisesi	2008-2012