

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
METALURJİ ve MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
METALURJİ ve MALZEME MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI**

**BAMYA MÜSİLAJİ VE METİL SELÜLOZ İÇEREN KANTARON YAĞI ve
GENTAMİSİN KATKILI FONKSİYONEL BİR YARA ÖRTÜ MALZEMESİNİN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyda Nur ÇOBAN

**Danışman
Doç. Dr. Erdal EROĞLU**



MANİSA-2023

Şeyda Nur
ÇOBAN

BAMYA MÜSİLAJI VE METİL SELÜLOZ İÇEREN KANTARON YAĞI VE
GENTAMİSİN KATKILI FONKSİYONEL BİR YARA ÖRTÜ MALZEMESİNİN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

2023

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Şeyda Nur ÇOBAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLO DİZİNİ	VIII
TEŞEKKÜR	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara ve Yara İyileşme Süreci	3
2.2. Yara Örtü Malzemeleri	4
2.3. Bamyra (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	6
2.4. Metil Selüloz	8
2.5. Sarı Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)	9
2.6. Literatür Özeti	11
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	16
3.1. Materyal	16
3.2. Hücre Kültürü	16
3.3. Bamyra Müsilajı ve Metil Selülozdan Sarı Kantaron Yağı ve Gentamisin Katkılı Bir Biyomalzemenin Üretimi	16
3.3.1. Müsilaj Ekstraksiyonu	16
3.3.2. Metil Selüloz Çözeltilisinin Hazırlanması	18
3.3.3. Bamyra Müsilajı ve Metil Selülozdan Yara Örtü Malzemesinin Üretimi	18
3.3.4. <i>Hypericum perforatum</i> (Hp) Yağı ve Gentamisin Katkılı Yara Örtü Malzemesinin Üretimi	19
3.4. Enstrümantal Karakterizasyonlar.	20
3.4.1. Kalınlık Ölçümü	20
3.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	20
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Morfoloji Analizi	20
3.4.4. Yüzey Temas Açısına Dayalı Analizler	21
3.4.5. Mekanik Performans Testi	22
3.4.6. Su Buharı Geçiş Testi	23
3.4.7. Şişme Performans Testi	24
3.4.8. Hidrolitik Bozunma Testi	25
3.5. Biyolojik Karakterizasyonlar.	25
3.5.1. Biyomalzeme Ekstraktının Eldesi	25
3.5.2. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini	26
3.5.3. Toplam Fenolik Madde Tayini	27
3.5.4. Antibakteriyel Testler	28
3.5.5. Bakteri Geçiş Testi	29
3.5.6. MTT Canlılık Testi	30
3.5.7. Çizik Testi	31
3.5.8. <i>in vitro</i> Hücre Tutunma Testi	32
3.6. İstatiksel Analiz.	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	34
4.1. Bamyra Müsilajı ve Metil Selülozdan Sarı Kantaron Yağı ve Gentamisin Katkılı Bir Biyomalzemenin Üretimi	34

4.2. BM:MS ve BM:MS/HpG Yara Örtü Malzemelerinin Enstrümantal Yöntemlerle Karakterizasyonu.....	36
4.2.1. Yara Örtü Malzemelerinin Kalınlıkları	36
4.2.2. FTIR Analizi	36
4.2.3. SEM Morfoloji Analizi	37
4.2.4. Yüzey Temas Açısına Dayalı Analizler	39
4.2.5. Mekanik Performans Testi	40
4.2.6. Su Buharı Geçışı	41
4.2.7. Şişme Performansı	42
4.2.8. Hidrolitik Bozunma	43
4.3. BM:MS ve BM:MS/HpG Yara Örtü Malzemelerinin <i>in vitro</i> Ortamda Biyolojik Karakterizasyonu.....	44
4.3.1. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini	44
4.3.2. Toplam Fenolik Madde İçeriği Tayini.....	45
4.3.3. Antibakteriyel Aktivite Tayini	47
4.3.4. Bakteri Geçiş Testi	50
4.3.5. MTT Canlılık Testi	51
4.3.6. Çizik Testi	52
4.3.7. <i>in vitro</i> Hücre Tutunma Testi	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans Analizi)
ATR	Attenuated Total Reflection (Azaltılmış Toplam Yansıma)
BM	Bamya Müsilajı
cm	Santimetre
cm²	Santimetrekare
cP	centipoise (yüzde birlik miktarı)
ÇM	Çekme Mukavemeti
dk	Dakika
dm²	Desimetrekare
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	Differential Scanning Calorimeter (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumı)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
G	Gentamisin
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
g	Gram
Gr (-)	Gram Negatif
Gr (+)	Gram Pozitif
Hp	<i>Hypericum perforatum</i> yağı
KU	Kopma Uzaması
LSD	Least Significant Difference (En Önemsiz Fark)
M	Molar
m²	Metrekare
mg	Miligram

mJ	Milijoule
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
MS	Metil Selüloz
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
N	Newton
nm	Nanometre
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen glikol
rcf	Relative Centrifugal Force (Göreceli Santrifüj Kuvveti)
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SEM/EDS	Scanning Electron Microscope/Energy Dispersive Spectrometry (Taramalı Elektron Mikroskobu / Enerji Dağılım Spektroskopisi)
TE	Troloks Eşdeğeri
TGA	Termogravimetrik Analiz
UV	Ultraviyole
v/v	Volume/volume (Hacim/hacim)
WVP	Water Vapour Permeability (Su Buharı Geçirgenliği)
w/v	Weight/volume (Kütle/hacim)
w/w	Weight/weight (Kütle/kütle)
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy (X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi)
XRD	X-ray Diffraction (X-Işınları Difraktometresi)

SİMGELER

Ca	Kalsiyum
CO₂	Karbondioksit
CuCl₂	Bakır (II) klorür
Fe	Demir
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NaN₃	Sodyum azotür
NH₄Ac	Amonyum asetat
Zn	Çinko
ZnO	Çinko oksit
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
δ	Çözünürlük Parametresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşme sürecinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. Bamyá bitkisinin meyveleri ve yaprakları.....	7
Şekil 2.3. Bamyá müsilajında bulunan polisakkaritin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.4. <i>H. perforatum</i> (sarý kantaron) bitkisi	9
Şekil 2.5. <i>H. perforatum</i> bitkisinden elde edilen zeytinyağı maseratı	10
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan; A) bamyá meyveleri ve B) kuru bamyá tozu..	17
Şekil 3.2. Bamyá müsilajı hazırlama aşamaları	18
Şekil 3.3. BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinin hazırlanma aşamaları	20
Şekil 3.4. Yüzey temas açısı ölçümü	21
Şekil 3.5. Mekanik performans testi.	23
Şekil 3.6. Su buharı geçiş testi için hazırlanan örnekler	24
Şekil 3.7. Biyolojik karakterizasyonlarda kullanılmak üzere; A) metanol ile ve B) DMEM-10 besiyeri ile hazırlanan biyomalzeme ekstraktları	26
Şekil 3.8. Toplam antioksidan kapasite tayini deneyinde; A) hazırlanan örnekler, B) farklı örnekler arasında görülen renk farkı.....	27
Şekil 3.9. Toplam fenolik madde tayini için hazırlanan örneklerde görülen renk değişimi	28
Şekil 3.10. Disk difüzyon testi için hazırlanan ve inkübatöre yerleştirilen örneklerin görünümü	29
Şekil 3.11. MTT canlılık testi için hazırlanan örneklerin absorbansının bir mikropłaka spektrofotometre cihazında ölçülmesi	31
Şekil 3. 12. Hücre tabakasında oluşturulmuş çizige ait ışık mikroskobu görüntüsü	32
Şekil 3.13. <i>in vitro</i> hücre tutunma testi için hazırlanan örnekler	33
Şekil 4.1. Bamyá müsilajı filmi	34
Şekil 4.2. Hp katkılı (%0,25-1,5 aralığında) BM:MS biyomalzemeleri. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri.....	35
Şekil 4.3. HpG içeren/içermeyen BM:MS/60:40 biyomalzemeler	35
Şekil 4.4. Hp, BM, MS, BM:MS, BM:MS/%0,25 Hp ve BM:MS/%1,5 Hp biyomalzemelerinin FTIR spektrumları	37
Şekil 4.5. BM:MS HpG içeren/içermeyen biyomalzemelerin SEM fotoğrafları. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri. A-F) BM:MS Kontrol, BG) %0,25 Hp, CH) %0,5 Hp, DI) %1 Hp, EJ) %1,5 Hp içeren biyomalzemeler	38
Şekil 4.6. Yüzey temas açısı ölçüleri. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri. AF) BM:MS Kontrol, BG) %0,25 Hp, CH) %0,5 Hp, DI) %1 Hp, EJ) %1,5 Hp içeren biyomalzemeler.....	40
Şekil 4.7. Su buharı geçiş hızı. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 Hp içeren/içermeyen biyomalzemeler	42
Şekil 4.8. BM:MS Hp içeren/içermeyen biyomalzemelerin % şişme performansları	43
Şekil 4.9. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının ekstraksiyon süresine bağı antioksidan kapasite değerleri. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 filmler.....	45

Şekil 4.10. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının ekstraksiyon süresine bağlı toplam fenolik madde içeriği. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 filmler.....	46
Şekil 4.11. Disk difüzyon testine bağlı antibakteriyel aktivite tayini.....	49
Şekil 4.12. HpG içeren BM:MS biyomalzemelerinden bakteri geçiş testi.....	50
Şekil 4.13. Bakteri geçiş testi sonrasında alınan örneklerin incelenmesi; A) kontrol grupları ve B) HpG içeren gruplar	51
Şekil 4.14. BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının sitotoksosite grafikleri. A) BM:MS 50:50 24 saat, B) BM:MS 50:50 48 saat, C) BM:MS 60:40 24 saat, D) BM:MS 60:40 48 saat inkübasyon analizi	52
Şekil 4.15. HpG içeren/içermeyen BM:MS film ekstraktlarının yara kapanma hızı üzerine etkisi	53
Şekil 4.16. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinde <i>in vitro</i> hücre tutunma testi. A) DAPI phalloidin boyası ile boyanan biyomalzemeler, B) Biyomalzeme yüzeyinde oluşan hücre kümeleri, C) Floresan mikroskobu görüntüsü	54

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Sentetik ve doğal polimerlerin karşılaştırılması.....	5
Tablo 2.2. Bazı doğal/sentetik/kompozit kaynaklı biyomalzemeler, içerdikleri aktif ajanlar, gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, kullanım amaçları ve çalışmamızın literatürdeki yeri.....	12
Tablo 4.1. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin yüzey temas açısı ölçümleri	39
Tablo 4.2. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerin kalınlıkları, çekme mukavemetleri ve % kopma uzamaları	41
Tablo 4.3. %1,5 Hp içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin % hidrolitik bozunma değerleri.....	44
Tablo 4.4. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin antioksidan kapasite değerleri.....	44
Tablo 4.5. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin toplam fenolik madde içeriği.....	46
Tablo 4.6. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin disk difüzyon testine bağlı antibakteriyel test sonuçları	47
Tablo 4.7. HpG içeren/içermeyen BM:MS film ekstraktlarının yara kapanma hızı üzerine etkisi	53

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında her yönden bana destek olan, lisans ve lisansüstü öğrenim hayatım boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve kendisini tanıtmaktan büyük onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erdal EROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra gerekli ekipmanlar konusunda yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. İlker POLATOĞLU'na ve çalışmalarım sırasında manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Yüksek Biyomühendis Ayşenur YARDIM'a şükranlarımı sunarım. Son olarak eleştirileri ile tezime katkıda bulunan ve değerlendirmelerini titizlikle gerçekleştiren değerli jüri üyelerim Sayın Doç. Dr. Nesrin HORZUM POLAT ve Dr. Öğr. Üyesi Seçil ÇELİK ERBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen, hep yanımda olan sevgili aileme ve beni her konuda destekleyen, her zaman yanımda olan sevgili eşime yardımları ve gösterdiği sabır için yürekten teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 121M744 numaralı 1002 Hızlı Destek bilimsel araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Şeyda Nur ÇOBAN
Manisa, 2023

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bamya Müsilajı ve Metil Selüloz İçeren Kantaron Yağı ve Gentamisin Katkılı Fonksiyonel Bir Yara Örtü Malzemesinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Şeyda Nur ÇOBAN

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Erdal EROĞLU

Yara iyileşmesi için uygulanan çeşitli tedavilerin arasında yara örtü malzemeleri en sık kullanılan yaklaşımlardan biridir. Son yıllarda, yara iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla aktif bileşenler içeren ve doğal malzemelerden üretilen fonksiyonel yara örtü malzemeleri geliştirilmektedir. Özellikle müsilajınöz bileşenlere sahip bitkilerden elde edilen doğal malzemeler, biyouyumlu, biyobozunur, kolay bulunabilen, düşük maliyetli ve toksik olmayan özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Müsilaj içeriği yüksek olan bitkilerden biri olan bamyanın (*Abelmoschus esculentus*), içerdiği çeşitli bileşikler sayesinde yara iyileştirme sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. *Hypericum perforatum* bitkisi gibi aktif doğal bileşenlerin biyomalzemelere eklenmesiyle fonksiyonel yara örtü malzemeleri elde edilmekte ve yara iyileşme sürecinde olumlu sonuçlar alınmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada, bamya müsilajı (BM) ve metil selülozdan (MS) sarı kantaron yağı (Hp) ve gentamisin (G) katkı fonksiyonel bir yara örtü malzemesi üretilmiştir. Enstrümantal ve biyolojik analizlerle kapsamlı bir şekilde karakterize edilen yara örtü malzemesinin yara iyileşme sürecine olan etkisi *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Üretilen biyomalzemelerin yapısal ve morfolojik özellikleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri ile incelenmiştir. FTIR analizi sonuçlarında, Hp'ye özgü pikler HpG katkı filmlerde açık bir şekilde gözlenmiştir. SEM analizi sonuçlarına göre, BM:MS filmlerinin yüzeyi pürüzsüz olarak gözlenirken, Hp katkı filmlerde 1,4-2,2 µm aralığında düzgün yuvarlak şekilli porların yer aldığı bir yapı gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Hp konsantrasyonundaki artış biyomalzemenin yapısında por oluşumuna sebep olmuş ve buna bağlı olarak su buharı geçirgenliğinin de arttığı tespit edilmiştir. Mekanik özellikleri incelemek amacıyla çekme testi gerçekleştirilmiş ve biyomalzemelerin çekme mukavemetleri 9,1-27,4 MPa aralığında bulunmuştur. Bunun yanı sıra, film kalınlıkları ideal aralığa (0,05-0,1 mm) uygun olacak şekilde 0,06-0,1 mm aralığında bulunmuştur. Biyomalzemelerin yüzey temas açıları bir gonyometre cihazı yardımıyla ölçülerek 70-110° aralığında bulunmuş ve Hp ilavesinin yüzey hidrofobisitesini azalttığı belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan kapasite tayini için sırasıyla Folin-Ciocalteu ve CUPRAC metotları uygulanmıştır. İçerdiği doğal bileşenler sayesinde, BM:MS/HpG biyomalzemelerinin fenolik madde içerdiği ve antioksidan özellik sergilediği görülmüştür. Antibakteriyel aktivite tespiti için gerçekleştirilen disk difüzyon ve bakteri geçiş testlerinden elde edilen sonuçlarda, HpG içeren biyomalzemelerde belirgin zonlar görülmüş ve bu filmlerin bakteri geçişini

engellediği gözlenmiştir. Ayrıca, ImageJ programında yapılan analizlerde, *S. aureus* için 2,0-2,2 cm ve *E. coli* için 2,1-2,4 cm aralığında zonlar ölçülmüştür. Çalışma kapsamında üretilen biyomalzemelerin sitotoksitesisi, *in vitro* ortamda BJ hücre hattı kullanılarak MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre, HpG içeren biyomalzeme ekstraktlarının tümünde %70'in üzerinde hücre canlılığı tespit edilmiştir. Diğer yandan aynı hücre hattı (BJ) kullanılarak gerçekleştirilen çizik testinde, Hp ilavesi ile yara kapama hızının arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, tamamen doğal ajanlar kullanarak geliştirdiğimiz yara örtü malzemesinin içeriğindeki BM, MS, Hp ve G arasındaki sinerjistik etkilerin ilk defa çalışılması ve farklı fonksiyonel özellikleri ile literatüre yenilik getirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular neticesinde, geliştirdiğimiz biyomalzemenin farklı biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılabileceği ve yara iyileşme sürecindeki etkisini daha iyi anlamak amacıyla *in vivo* yara modeli üzerinde denenebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yara örtü malzemesi, Biyomalzeme, Bamya müsilajı, Metil selüloz, *Hypericum perforatum*, Gentamisin

2023, 83 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Production and Characterization of St. John's Wort Oil and Gentamicin Supplemented Functional Wound Dressing Material From Okra Mucilage and Methyl Cellulose

Seyda Nur COBAN

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Metallurgical and Materials Engineering**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erdal EROGLU

Wound dressing materials are one of the most common approaches among various treatments for wound healing. In recent years, functional wound dressing materials with active components and natural materials have been developed to speed up the wound healing process. Natural materials, especially from plants with mucilaginous components, stand out with their biocompatible, biodegradable, easy-to-find, low-cost, and non-toxic features. Okra (*Abelmoschus esculentus*), one of the plants with high mucilage content, is known to be effective in the wound-healing process of its various compounds. Functional wound dressing materials were obtained by adding active natural components such as *Hypericum perforatum* plant to biomaterials and positive results were obtained during the wound healing process. In this study, a functional wound dressing material was produced from okra mucilage (OM) and methyl cellulose (MC) with the addition of St. John's wort oil (Hp) and gentamicin (G). The wound dressing materials (BM: MS and BM: MS/HpG) have been extensively characterized by instrumentation and biological analysis, and the effects on the wound healing process have been researched *in vitro* environment. The structural and morphological properties of the biomaterials have been examined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscope (SEM) analyses. Results of FTIR analysis showed that specific peaks of Hp have been observed in HpG-additive films. According to the SEM analysis results, the surface of the BM: MS films was observed smoothly, while Hp additive films have seen a structure with smooth round-shaped pores in the range of 1.4 to 2.2 μm . In line with these results, the increase in Hp concentration has increased the formation of pores and consequently increased water vapor permeability. In the results of the tensile test to examine the mechanical properties of the biomaterials, the tensile strengths have been found in the range of 9.1 to 27.4 MPa. Additionally, film thicknesses were within the range of 0.06 to 0.1 mm, which is suitable for the ideal range (0.05-0.1 mm). The surface contact angles of the biomaterials were measured using a goniometer device to be found within a range of 70° to 110° and determined that the addition of Hp reduces surface hydrophobicity. The Folin-Ciocalteu and CUPRAC methods were applied respectively for the determination of the total phenolic content and total antioxidant capacity of the biomaterial extracts. According to the results of the analysis, biomaterials have phenolic content and antioxidant properties due to the natural components they contain. The results of disk diffusion and bacterial transmission tests for the determination of antibacterial activity showed

significant zones in film samples containing HpG and found that these films prevented the transmission of bacteria. Also, in the analysis performed with Image J, the zones were measured in the range of 2.0 to 2.2 cm for *S. aureus* and 2.1 to 2.4 cm for *E. coli*. The cytotoxicity of biomaterial extracts was determined by *in vitro* MTT cell proliferation assay using the BJ cell line. For the biomaterial extracts containing HpG, BJ cell viability was determined more than 70%. On the other hand, in the scratch assay, it was determined that the wound closure rate increased with Hp added to the biomaterials. Eventually, the synergistic effects of the components (OM, MC, Hp, and G) in the wound dressing material that we developed using completely natural agents have been studied for the first time and the literature has been innovated with different functional properties of this wound dressing material. As a result of our findings, it was concluded that the biomaterial we developed could also be used in different biotechnological applications and could be tested on the *in vivo* models to better understand the impact of the wound healing process.

Keywords: Wound dressing material, Biomaterial, Okra mucilage, Methyl cellulose, *Hypericum perforatum*, Gentamicin

2023, 83 pages

1. GİRİŞ

Vücudumuzun en büyük organı olarak bilinen cildin herhangi bir nedenle biyokimyasal, hücrel ve anatomik devamlılığının bozulması sonucunda yara olarak adlandırılan kusurlar oluşur [1]. Yara iyileşmesi, yaralı dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü geri kazanması için gerekli olan bir süreçtir. Bu süreç hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon olarak adlandırılan farklı evreleri içermektedir [2]. Son yıllarda yaralı dokunun iyileşmesini hızlandırmak ve enfeksiyon riskini düşürmek amacıyla sentetik veya doğal polimerler, hidrojeller, köpükler, transparan filmler ve süngerler gibi farklı yara örtü malzemeleri geliştirilmektedir [3]. İdeal bir yara örtü malzemesinin gaz değişimine izin veren, nemli bir ortam sağlayan, enfeksiyon riskini minimize eden, toksik ve alerjik olmayan ve kolayca çıkarılabilen özelliklerde olması beklenmektedir [4, 5]. Bu özelliklere sahip olan biyouyumlu ve fonksiyonel yara örtü malzemesi üretiminde kullanılabilecek doğal kaynaklı ve kolay bulunabilen biyomalzemelere olan ilgi günden güne artmaktadır [6]. Bamya gibi zengin müsilaj içeriğine sahip olan farklı bitkilerden veya bitki tohumlarından üretilen doğal malzemeler biyouyumlu, biyobozunur, düşük maliyetli ve toksik olmayan özellikleri ile ön plana çıkmaktadır [7, 8].

Afrika'dan Asya'ya, Güney Avrupa'dan Amerika'ya kadar geniş alanlarda dağılım gösteren sıcaklığa dayanıklı tropikal bir bitki olan bamya (*Abelmoschus esculentus*), karbonhidrat, protein, lif, mineraller ve çeşitli vitaminler içermektedir [9–11]. Genellikle bamya meyvesinin kabuk kısmında biriken bamya müsilajı, galaktoz, ramnoz ve galakturonik asit içeriğiyle doğal bir polisakkarittir. Bamya müsilajı, yüksek çözünürlük (suda), esneklik, plastiklik ve viskozite özellikleri sergileyen yenilenebilir bir malzeme kaynağıdır [12]. Düşük maliyetli, biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmayan bir malzeme olduğu için sentetik malzemelere göre daha avantajlıdır [13].

Metil selüloz, düşük sıcaklıklarda suda çözünebilen, düşük maliyetli ve kolay işlenebilir doğal polimerlerden biridir. Gıdalar, kozmetik ve farmasötik ürünler ve inşaat malzemeleri gibi çeşitli uygulamalarda birçok amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır [14–16]. Ayrıca, içerdiği hidrojen bağları sayesinde oldukça yüksek

mekanik mukavemete sahip olan metil selüloz, biyobozunur, esnek ve yenilenebilen bir malzeme olması ile ön plana çıkmaktadır [17].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda fonksiyonel bir yara örtü malzemesi elde edebilmek için biyomalzemelere doğal bileşenler eklenmesiyle yara iyileşme sürecinin hızlandığı görülmüştür [18]. Dünya genelinde en çok çalışılan tıbbi bitkilerden biri olan *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*) bitkisinin yara iyileşmesi üzerinde terapötik bir etkisi olduğu bilinmektedir. Literatürde St. John otu olarak da bilinen *H. perforatum*, ülkemizde “sarı kantaron” olarak anılmakta ve yapısında uçucu yağlar, flavonoidler, hiperforin ve hiperisin gibi bileşikler barındırmaktadır [19, 20]. Yapılan çalışmalarda, *H. perforatum* bitkisinden elde edilen yağların ve zeytinyağı maseratlarının yara iyileşme sürecine olumlu bir katkısının olduğu görülmüştür. Ancak, yara üzerine doğrudan uygulandığında gaz değişimini engelleyerek biyouyumluluğu olumsuz etkilediği görülmüştür [21]. Bu sebeple, yaraya direkt uygulanması yerine, *H. perforatum* yağı ilave edilmiş yara örtü malzemelerinin kullanılması daha fazla önem kazanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, bamya müsilajı (BM) ve metil selüloz (MS) kullanarak bir yara örtü malzemesi üretmek ve bu yara örtü malzemesine sarı kantaron yağı (Hp) ve gentamisin (G) ilave ederek fonksiyonel bir hale getirmektir. Literatürde yapılan çalışmalardan farklı olarak tamamen doğal malzemelerle üretilen yara örtü malzemesini çeşitli analizlerle karakterize etmek ve yara iyileşme sürecine olan etkisini araştırmak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara İyileşme Süreci

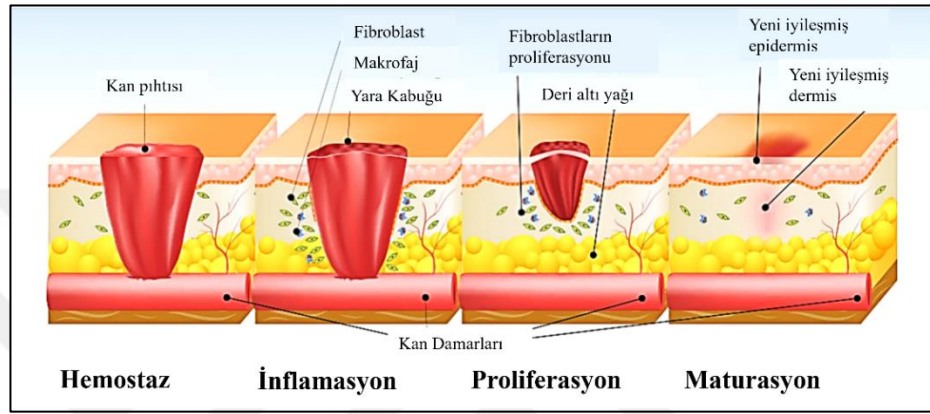
İnsan vücudunun en büyük organı olan cilt, vücut sıcaklığını kontrol etme, dış çevreyi algılama ve patojenlere karşı koruma gibi çeşitli işlevler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, vücudun en dış kısmında bulunan ve çeşitli dış etkenlere maruz kalan cilt, yumuşak ve elastik bir yapıya sahip olduğu için yara olarak adlandırılan kusurların oluşmasına yatkındır [22]. Yara, cildin veya bir dokunun herhangi bir nedenle biyokimyasal, hücresel ve anatomik devamlılığının bozulması olarak tanımlanır [1].

Genel anlamda yaralar, açık ve kapalı yaralar olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Kapalı yaralar kontüzyon (bere, ezilme), hematoma ve sıyrıklar olarak adlandırılan yumuşak dokularda, küçük kan damarlarında veya derin doku katmanlarında meydana gelen hasarları içermektedir. Açık yaralar ise genellikle yırtıklar, kesici-delici alet yaraları, cerrahi yaralar, vasküler nörolojik ve metabolik yaralar, radyonekroz, böcek ısırıkları ve sokmalar olarak nitelendirilmektedir. Klinik olarak incelendiğinde ise yaralar akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Radyasyon, aşırı sıcaklık değişiklikleri veya kimyasallarla temas gibi faktörlerden kaynaklanan yaralar akut yaralar olarak adlandırılmaktadır. Kronik yaralar ise tümörler, enfeksiyon veya fiziksel ajanlar gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Akut yaralar 8-12 hafta içinde kendiliğinden iyileşirken, kronik yaralar uzun süreli iltihaplanma sebebiyle daha uzun bir iyileşme süresine sahiptir [23].

Yara iyileşmesi, yaralı dokunun normal yapısını ve fonksiyonel bütünlüğünü geri kazanması için gerekli olan biyolojik ve moleküler bir süreçtir [24]. İnflamatuar hücreler, keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi spesifik hücreler, büyüme faktörleri ve enzimleriyle etkileşime girerek bu sürecin zamanında ve düzenli ilerlemesini sağlamaktadır [25].

Yara iyileşme süreci, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon maturasyon (yeniden şekillenme) olarak adlandırılan farklı evrelerden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Hemostaz evresinde koagülasyon gerçekleşmesi ile kanama durdurulurken daha sonraki inflamasyon evresinde, inflamatuvar hücreler (makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler) hasarlı bölgedeki ölü dokuyu ortadan kaldırmaktadır. Epitel hücrelerin

çoğalması, bağ dokunun oluşması, kolajen birikimi ve anjiyogenez gibi biyolojik süreçler proliferasyon evresinde gerçekleşmektedir. Bu esnada granülasyon dokusu oluşmaya ve yara kasılmaya başlamaktadır. Keratinositler, epitel hücreler ve büyük miktarda kolajen sentezleyebilen fibroblastlar bu evrede önemli bir yere sahiptir. Son evre olan maturasyon evresinde ise kolajen-kolajen ve kolajen-protein molekülleri arasında çapraz bağlantıların oluşması yaranın gerilme kuvvetini artırmakta ve bağ dokusu yeniden şekillenmektedir [26, 27].



Şekil 2.1. Yara iyileşme sürecinin şematik gösterimi [28].

2.2. Yara Örtü Malzemeleri

Geçmişten bugüne yaranın iyileşmesi için uygulanan çeşitli biyolojik, kimyasal ve fiziksel tedavilerin arasında yara örtü malzemeleri en sık kullanılan yaklaşımlardan biri olarak bilinmektedir. Yara örtü malzemeleri, yarayı nemli tutmak, mikroorganizmalardan korumak ve yara bölgesinde oluşan fazla eksüdalı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır [29, 30]. Steril gazlı bez, pamuk ve bandaj gibi geleneksel yara örtü malzemeleri basit bir fiziksel bariyer görevi görerek yaranın iyileşmesini etkili bir şekilde desteklememektedir [31]. Diğer yandan, yara örtü malzemeleri yüksek nem içermeleri ve uygun sıcaklıkları nedeniyle mikroorganizmalar için uygun bir ortam oluşturmaktadır [32]. Son yıllarda, yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve enfeksiyon riskini minimuma indirmek amacıyla biyoaktif bileşenler içeren, nemli bir ortam sağlayan ve uygun mekanik özelliklere sahip çeşitli yara örtü malzemeleri geliştirilmektedir [22].

Yara örtü malzemesi olarak sentetik veya doğal polimerler, hidrojel, köpükler, kompozitler, aerogel, süngerler, elektrospun nanofiberler ve transparan

filmler kullanılmaktadır [33]. Bu biyomalzemeler arasında aljinat, kitosan, kolajen, selüloz, hyaluronik asit, keratin, jelatin ve bakteriyel selüloz gibi doğal polimerler ile poli(vinil alkol), poli(laktik asit), poli(etilen glikol), poli(kaprolakton) ve poliüretan gibi sentetik polimerler öne çıkmaktadır [29]. Doğal polimer bazlı biyomalzemeler, hemostaz, antimikrobiyal aktivite, hücre proliferasyonunu artırma, antioksidasyon, biyobozunurluk ve yüksek biyouyumluluk gibi özellikleri açısından yara örtü malzemesi üretimi için daha çok tercih edilmektedir [34, 35]. Sentetik ve doğal polimerlerin avantajları ve dezavantajları açısından karşılaştırılması Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Sentetik ve doğal polimerlerin karşılaştırılması [23, 36].

	Avantajları	Dezavantajları	Örnekler
Sentetik Polimerler	- Uzun raf ömrü - Minimum kontaminasyon riski	- Sadece yüzeysel yaralar için uygun olması - Düşük absorpsiyon - Düşük geçirgenlik - Düşük tutunma	- Poliüretan ve türevleri - Teflon - Proplast - Metil metakrilat - Silikon
Doğal Polimerler	- Biyouyumluluk - Biyobozunurluk - Kolay rezorpsiyon - Hasarlı dokuyu onarma ve yenileme kapasitesi	- Mikrobiyal kontaminasyona eğilim	- Kitosan - Kolajen - Aljinat - Hyaluronik asit - Fukoidan - Poli-N-asetil glukozamin

İdeal bir yara örtü malzemesi; i) yara/örtü ara yüzeyinde nemli bir ortam sağlamalı ve gaz değişimine izin vermeli, ii) fazla eksüda ve toksik bileşenleri yara yüzeyinden uzaklaştırmalı, iii) enfeksiyon riskini minimize etmeli, iv) insan derisine benzer mekanik özelliklere sahip olarak yarayı dış etkenlerden korumalı, v) inflamasyona veya toksisiteye neden olmadan iyi bir biyouyumluluk göstermeli, vi)

hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklemek için uygun mikro yapıya sahip olmalı, vii) düşük yapışkanlığa sahip olarak herhangi bir travmaya sebep olmadan kolayca çıkarılabilir olmalıdır [31, 35]. Bu sebeple, film oluşumuna uygun ve fonksiyonel bir yara örtü malzemesi olarak kullanılabilecek doğal kaynaklı, kolay bulunabilen, biyouyumlu biyomalzemelere olan ilgi günden güne artmaktadır [6]. Farklı bitkilerden veya bitki tohumlarından kolayca elde edilebilen müsilağınöz bileşenlerden üretilen doğal malzemeler düşük maliyetli, biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmayan özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Bamya da zengin müsilağ ve besin içeriğiyle ilgi çeken bir bitkidir [7, 8].

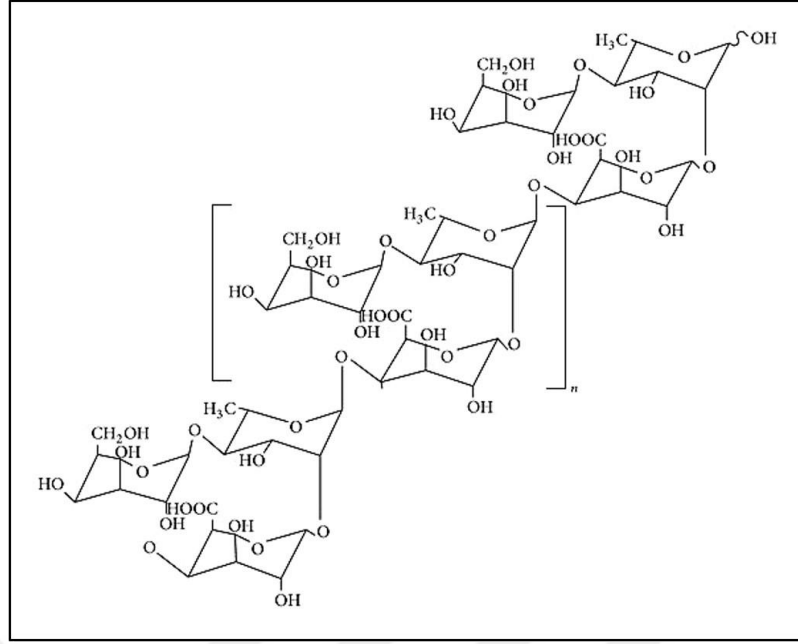
2.3. Bamya (*Abelmoschus esculentus*)

Bilimsel ismi *Abelmoschus esculentus* olarak bilinen bamya (Şekil 2.2), Afrika'dan Asya'ya, Güney Avrupa'dan Amerika'ya kadar geniş alanlarda dağılım gösteren, ebegümecigiller ailesine ait tıbbi bir bitkidir [37]. Bamya, içerdiği karbonhidrat, protein, lif, fenolikler, mineraller (K, Na, Mg, Ca, Fe ve Zn), vitaminler (B, C ve folik asit), polisakkarit ve mikro elementler ile insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [10, 11]. Ayrıca, bamyanın içeriğindeki saponinler, tanenler, flavonoidler ve alkaloidler sayesinde antiinflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan, antidepresan, antidiyabetik etki sergilediği ve anjiyogenezi hızlandırarak yara iyileştirme sürecine katkı sağladığı ifade edilmiştir [38–40]. Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen bamya, geleneksel Türk tıbbında yara iyileştirme amaçlı kullanılmaktadır. Bamya meyveleri ile hazırlanan yulaf lapası cilt hasarlarının tedavisinde kullanılırken yine meyvelerinden elde edilen kıvamlı sıvı yaralara uygulanarak kullanılmaktadır [41].



Şekil 2.2. Bamya bitkisinin meyveleri ve yaprakları [42].

Bamya, tüketilmediği durumlarda kurutularak saklanabilmekte ve genellikle bamya meyvesinin kabuk kısmında biriken müsilajınöz maddeler sebebiyle farklı alanlarda kullanılabilmektedir. Bamya müsilajı, gıda işleme, atık su arıtma ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli işlemlerde kullanılan doğal ve düşük maliyetli bir biyopolimer olarak gün geçtikçe daha fazla tercih edilmektedir [43]. Galaktoz, ramnoz ve galakturonik asitten oluşan rastgele sarmal polisakkaritlerden olan bamya müsilajı (Şekil 2.3), yüksek çözünürlük (suda), esneklik, plastiklik ve viskozite özellikleri sergileyen yenilenebilir bir malzeme kaynağıdır [12, 38]. Biyobozunur, biyoyumlu ve toksik olmayan bir malzeme olduğu için sentetik malzemelere göre daha avantajlıdır [13].



Şekil 2.3. Bamyamüsilajının polisakkaritinin kimyasal yapısı [44].

Bamyamüsilajı, gıda katkı maddesi olarak [45], doku mühendisliği uygulamalarında hidrojel olarak [46], farmasötik uygulamalarda bağlayıcı veya granülleştirici ajan olarak [47], ve küçük partikülleri pıhtılaştırabilen doğal polisakkaritleri sebebiyle doğal pıhtılaştırıcı olarak [48] kullanılabilir. Wistar tipi sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, bamyamüsilajının diş sökülmesi sonucu oluşan açık yaralara yüzeysel olarak uygulaması ile fibroblast proliferasyonunun hızlandığı ve yaranın daha çabuk kapandığı belirtilmiştir [39].

2.4. Metil Selüloz

Doğal polimerler arasında bir selüloz türevi olan metil selüloz, kolayca suda çözünebilen bir polisakkarittir. Metil selüloz, düşük maliyeti, şeffaflığı, kolay işlenebilme ve geniş kullanım alanına sahip olma gibi özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Gıdalar, farmasötik ürünler, seramikler, boyalar, inşaat malzemeleri ve kozmetik ürünler gibi çeşitli uygulamalarda kıvam artırıcı, bağlayıcı, stabilizör, emülgatör ve kaplama olarak kullanılmaktadır. Birçok sentetik veya doğal polimerlerle birleştirilerek elde edilen kompozitler ile metil selülozun kullanım alanı genişletilmeye çalışılmaktadır [14–16].

Ayrıca yüksek mekanik mukavemete ve kimyasal stabiliteye sahip olan metil selüloz, şeffaflığı sayesinde esnek katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. İçerdiği

hidroksil grupları sayesinde yenilenebilen, biyolojik olarak parçalanabilen, çevre dostu bir polimer olarak seçilmiştir [17]. Metil selülozdan elde edilen filmler, hidrojen bağları sayesinde yüksek gerilme mukavemetine sahiptir. Bu hidrojen bağları filmin sertliğini ve kırılgenliğini da etkilemektedir [49].

2.5. Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*)

Son zamanlarda, aktif doğal bileşenlerin biyomalzemelere eklenmesi ile elde edilen fonksiyonel yara örtü malzemelerinin (yara bölgesinde kontrollü ilaç salımı yapan, enfeksiyon riskinin azaltan, inflamasyonun kontrol eden, proliferatif etki sergileyen vb. özellikleri ile) yara iyileşme sürecini hızlandırdığı görülmüştür [18]. Tıbbi bitkilerin yara iyileşmesi üzerindeki antibakteriyel, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri üzerine yapılan araştırmalarda, bitkilerin içerdği uçucu yağların, flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin bu sürece katkı sağladığı gösterilmiştir [50].

Yara iyileşmesi üzerinde terapötik bir etkiye sahip olan *H. perforatum* bitkisi, dünya çapında en çok bilinen, en çok çalışılan ve en çok tüketilen tıbbi bitkilerden biridir. Ülkemizde “sarı kantaron” olarak anılan *H. perforatum* (Şekil 2.4), çok yıllık, sarı çiçekli bir bitki olup literatürde St. John otu olarak anılmaktadır [20]. Yapısında karoten, tanen, uçucu yağlar, flavonoidler, ksantonlar, amino asitler, biflavonlar, fenilpropanlar gibi bileşenleri barındırır [19, 51]. Bunların yanı sıra, içerdği hiperforin, hiperisin, kuersetin, kaempferol, klorojenik asit ve karotenoid gibi biyoaktif bileşiklerin miktarı oldukça yüksektir [52].



Şekil 2.4. *H. perforatum* (sarı kantaron) bitkisi [53].

H. perforatum, antik çağlardan beri depresyon, yanık, yara, viral enfeksiyon, iç ve dış hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [54]. Yapılan çalışmalarda, *H. perforatum* bitkisinin antimikrobiyal [55], antiinflamatuvar [56], antioksidan [57], antikanser [58, 59] antidiyabetik [60] ve antidepresan [61] aktivite sergilediği ortaya koyulmuştur.

Ayrıca, *H. perforatum* zeytinyağı maseratından elde edilen merhemlerin kolajen sentezini uyarak yara iyileşme sürecine olumlu katkı sağladığı belirtilmektedir [62, 63]. Diyabetik sıçanlar ile yapılan bir çalışmada ise *H. perforatum* zeytinyağı maseratının (Şekil 2.5) uygulanması ile epitelizasyonun arttığı, antiinflamatuvar etkinin gözlendiği ve nekrozun azaldığı bildirilmiştir [64]. *H. perforatum* yağı, yara üzerine doğrudan uygulandığında iltihaplanmayı azalttığı ve yara iyileşme sürecini hızlandırdığı ancak yaranın üzerinde oluşan yağ tabakasının gaz değişimini engelleyerek biyoyumluluğu olumsuz etkilediği ifade edilmiştir [21]. Bu sebeple, *H. perforatum* ve benzeri yağlı ajanların yaraya direkt uygulanması yerine biyoyumlu bir yara örtü malzemesine eklenmesiyle fonksiyonelleştirilmiş biyomalzemelerin üretimi daha fazla önem kazanmıştır.



Şekil 2.5. *H. perforatum* bitkisinden elde edilen zeytinyağı maseratı [65].

Kitosan temelli bir yara örtü malzemesine *H. perforatum* ilavesinin biyomalzemenin antimikrobiyal aktivitesini ve antioksidan kapasitesini artırdığı gösterilmiştir [3]. Diğer yandan antibiyotiklerin de yara örtü malzemelerine eklendiği çalışmalar dikkat çekmektedir [66]. Örneğin, gentamisin geniş spektrumlu (gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili), suda çözünebilen ve muadillerine

göre daha ucuz bir antibiyotik olup yara örtü malzemelerinde kullanıma oldukça elverişli doğal bir ajandır [67].

2.6. Literatür Özeti

Yapılan çalışmalarda, çeşitli doğal kaynaklı biyomalzemelere aktif ajanların eklenmesiyle üretilen fonksiyonel gıda ambalajları ve yara örtü malzemeleri mevcuttur. Literatürde, bamyâ müsilağının ya da bamyâ müsilağı ve diğer doğal/sentetik malzemelerin karışımından üretilen kompozitlerin gıda ambalajı olarak üretilmesi/karakterize edilmesi ile ilgili çalışmalara rastlanırken yara örtü malzemesi olarak tasarlanmış (bamyâ müsilağından) bir biyomalzemenin olmaması dikkat çekmektedir.

Yara örtü malzemesi olarak tasarlanan kitosan, sodyum aljinat, karboksi metil selüloz, PEG, PCL gibi biyomalzemeler veya antibiyotik katkılı doğal kompozitler kaliteli uluslararası dergilerde kabul görmektedir (Tablo 2.2). Yaptığımız bu çalışma bamyâ müsilağı filmlerine hem sarı kantaron yağı hem de gentamisin katkısı ile fark yaratmakla birlikte gerek enstrümantal gerek antimikrobiyal ve *in vitro* hücre kültürü testleri gibi kapsamlı analizlerle literatüre yenilik getirmiştir.

Tablo 2.2. Bazı doğal/sentetik/kompozit kaynaklı biyomalzemeler, içerdikleri aktif ajanlar, gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, kullanım amaçları ve çalışmamızın literatürdeki yeri.

Biyomalzeme	Türü	Aktif Ajan	Antimikrobiyal Ajan	Analizler	Kullanım Amacı	Referans
Bamya müsilağı filmi	Doğal	Kantaron/zeytin yağı maseratı	Gentamisin	- Kalınlık ölçümü - FTIR - SEM - Yüzey temas açısı ölçümü - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi - Şişme testi - Hidrolitik bozunma testi - Toplam antioksidan kapasite tayini - Toplam fenolik madde analizi - Antibakteriyel test - Bakteri geçiş testi - MTT canlılık testi - Çizik testi - <i>in vitro</i> hücre tutunma testi	Yara iyileştirme	Bizim Çalışmamız
Bamya müsilağı filmi	Doğal	YOK	YOK	- Yüzey temas açısı ölçümü - Suda çözünürlük testi - Nem miktarının ölçümü - Mekanik testler - Renk analizi	Gıda ambalajı	[12]
PVA-Bamya müsilağı filmi	Yarı sentetik	Gül antosiyanini	YOK	- Kalınlık ölçümü - SEM - FTIR - DSC - Kolorimetrik analiz - Su buharı geçiş testi - Mekanik testler - Reolojik özellik testleri	Gıda ambalajı	[68]

Bamya müsilajı-mısır nişastası filmi	Doğal	YOK	YOK	- Kalınlık ölçümü - FTIR - SEM - SEM / EDS - Termal analiz (DSC) - Suda çözünürlük testi - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi - Şişme testi - Akut toksisite testi	Gıda ambalajı	[13]
CMC-Bamya müsilajı filmi	Doğal	YOK	ZnO nanopartikülleri	- SEM - Kalınlık ölçümü - Mekanik testler - Suda çözünürlük testi - Su buharı geçiş testi -Antibakteriyel test	Gıda ambalajı	[38]
Bamya polisakkariti -PVA-boraks hidrojel	Yarı sentetik	YOK	YOK	- FTIR - XRD - XPS - SEM - Mekanik testler - Kendi kendine iyileşme testi - Elektriksel test - İnsan hareketini algılama testi	Sensör	[69]
Metil selüloz filmi	Doğal	Şili guavası ekstraktı	YOK	- FTIR - SEM - Kolorimetrik analiz - Termogravimetrik analiz - Şişme testi - Mekanik testler - Antioksidan aktivite testi (ABTS) - Antibakteriyel test	Gıda ambalajı	[14]
Zein-metil selüloz kompozit filmi	Doğal	YOK	Timol	- Kalınlık ölçümü - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi - Suda çözünürlük testi - FTIR - Antibakteriyel test	Gıda ambalajı	[49]

Buğday gluteni-metil selüloz filmi	Doğal	Biberiye ekstraktı	Natamisin	- FTIR - SEM - Kalınlık ölçümü - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi	Gıda ambalajı	[70]
PCL-jelatin nanofiber malzeme	Yarı sentetik	Kantaron/zeytin yağı maseratı ve aloe vera jeli	YOK	- FTIR - SEM - <i>in vivo</i> yara iyileşme testi - Biyokimyasal analizler - Kemometrik analizler	Yara iyileştirme	[71]
Kitosan kriyojel	Doğal	Kantaron/zeytin yağı maseratı	YOK	- SEM - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi - Şişme testi - Hidrolitik bozunma testi - Antioksidan aktivite testi (DPPH) - DNA bölünme aktivitesi -Antibakteriyel test	Yara iyileştirme	[3]
Polimerik membran (PEG ve PCL)	Sentetik	Soğuk sıkım kantaron yağı	YOK	- FTIR - SEM - Mekanik testler - Yüzey temas açısı ölçümü - Şişme testi - Gaz geçişi testi - <i>in vitro</i> ilaç salım testi - MTT canlılık testi - Apoptotik ve nektotik etki -Antibakteriyel test	Yara iyileştirme	[21]
Kitosan film	Doğal	Kantaron/zeytin yağı maseratı	YOK	- SEM - Kalınlık ölçümü - Mekanik testler - Yüzey temas açısı ölçümü - Su buharı geçiş testi - Şişme testi - MTT canlılık testi -Antibakteriyel test	Yara iyileştirme	[4]

Hidroksiapatit/ aljinat/ jelatin film	Doğal	YOK	Tetrasiklin (antibiyotik)	- Kalınlık ölçümü - SEM - Mekanik testler - Su buharı geçiş testi - Şişme testi - Hidrolitik bozunma testi - <i>in vitro</i> ilaç salım testi - Antibakteriyel test - XRD - TGA	Yara iyileştirme	[66]
NaAlg bazlı membran	Doğal	Kantaron yağı	Gümüş Sülfadiazin	- SEM - <i>in vitro</i> ilaç salım testi - Antibakteriyel test	Yara iyileştirme	[72]

Bu çalışmada, bamyâ müsilajı (BM) ve metil selülozdan (MS) kantaron yağı (Hp) ve gentamisin (G) katkılı fonksiyonel bir yara örtü malzemesi (BM:MS/HpG) üretilmiş olup, üretilen biyomalzeme enstrümantal ve biyolojik analizlerle kapsamlı şekilde karakterize edilerek yara iyileştirme sürecine olan etkisi *in vitro* hücre kültürü ortamında araştırılmıştır. Tamamen doğal ajanlar kullanarak geliştirdiğimiz yara örtü malzemesinin içeriğindeki BM, MS, Hp ve G arasındaki sinerjistik etkilerin (antimikrobiyal ve proliferatif etkiler) ilk defa çalışılması ve yukarıda maddeler halinde ayrıntılı olarak açıklanan farklı fonksiyonel özellikleri ile çalışmamız literatüre yenilik getirmiştir (Tablo 2.2).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Yara örtü malzemesinin üretiminde kullanılan bamyâ meyveleri, Balıkesir ilinde bulunan bir halk pazarından satın alınmıştır. Yara örtü malzemelerinin üretiminde katkı malzemesi olarak kullanılan *H. perforatum* yağı (Arifoğlu, Türkiye) ise yerel bir aktardan temin edilmiştir. Metil selüloz (400 cP), gentamisin, Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri (DMEM), fetal sığır serumu (FBS), MTT boyası (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür), tripan mavi boyası, amonyum asetat, bakır (II) klorür, neokuprin (2,9-dimetil-1,10- fenantrolin), Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), diiyodometan, gliserol, etanol ve metanol Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO), sodyum karbonat ve Folin-Ciocalteu ajanı Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Antibiyotik/antimikotik solüsyon, esansiyel olmayan amino asit solüsyonu ve tripsin ise sırasıyla Biological Industries (Cromwell, CT, ABD), Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Almanya) ve Biowest (MO, ABD) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Hücre Kültürü

İnsan dermal fibroblast hücre hattı olan BJ (ATCC CRL-2522) hücreleri, %10 FBS, %1 antibiyotik/antimikotik çözeltisi ve %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi içeren besiyerinde (DMEM-10) çoğaltılmış ve 37 °C'deki %5 CO₂ içeren bir inkübatörde (Nüve EC 160) inkübe edilmiştir. Tüm hücre kültürü çalışmalarında, tripsinize edilen hücrelerin canlılığı tripan mavi boyası kullanılarak bir Neubaur kabında yapılan sayım ile belirlenmiş ve hücre canlılığı %90 veya üzerinde kültürler kullanılmıştır.

3.3. Bamyâ Müsilajı ve Metil Selülozdan Sarı Kantaron Yağı ve Gentamisin Katkılı Bir Biyomalzemenin Üretimi

3.3.1. Müsilaj Ekstraksiyonu

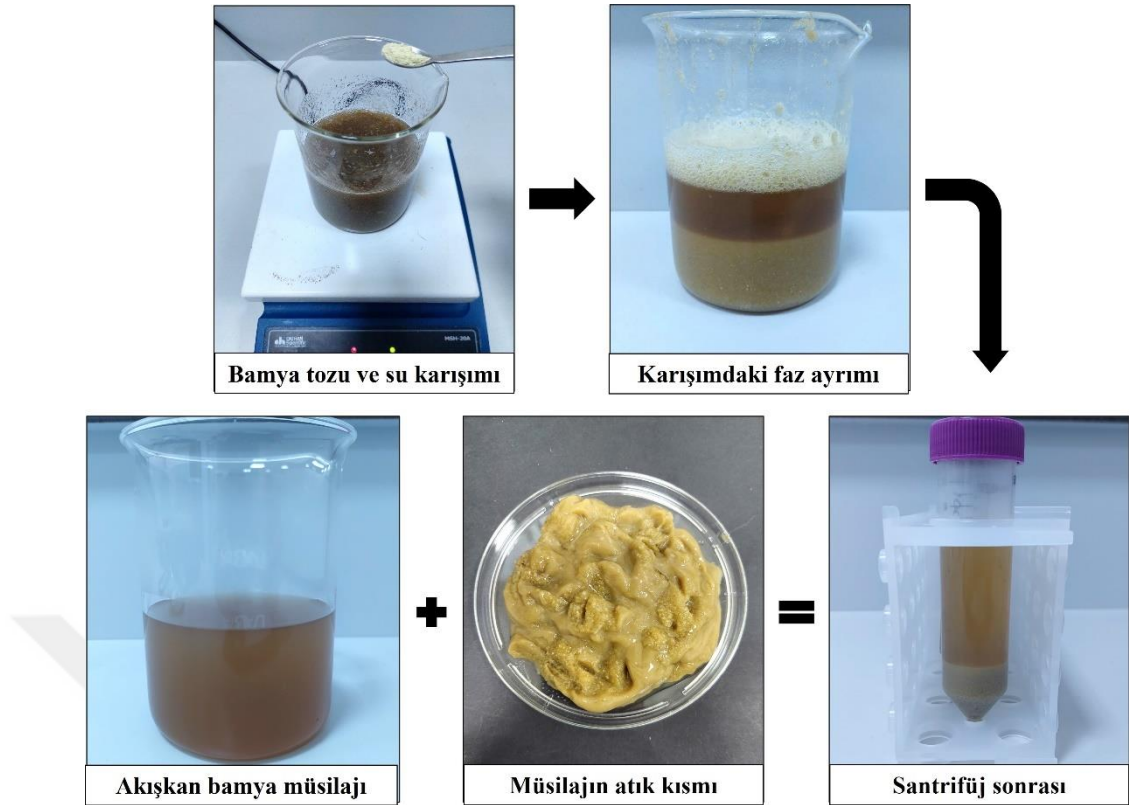
Bamyâ bitkisinin meyvelerinden müsilaj ekstraksiyonu için Mohammadi vd. (2018) önerdiği metot bazı değişikliklerle izlenmiştir [38]. Buna göre, bamyâ meyveleri laboratuvar ortamında deiyonize su (d-su) ile yıkandıktan sonra paslanmaz çelikten bir bıçak ile dilimlenmiştir. Müsilaj içermediği için tohumlar ayıklanarak

ekstraksiyon işlemine dahil edilmemiştir. Dilimlenen bamyalar 50 °C sıcaklıktaki fırında kurutulmuş, kurutulan bamya dilimleri elektrikli öğütücü (Lavion, HC 100) yardımıyla öğütülmüş ve elekten geçirilerek öğütülemeyen büyük parçacıklar ayrıştırıldıktan sonra elde edilen kuru bamya tozu müsilaj ekstraksiyonu gerçekleştirilinceye kadar kuru bir ortamda oda sıcaklığında kapaklı bir kutu içerisinde muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1’de çalışmada kullanılan bamya meyveleri ve elde edilen kuru bamya tozu gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan; A) bamya meyveleri ve B) öğütülmüş bamya tozu.

Bamya tozu: d(su) oranı 1:30 (w/v) olacak şekilde hazırlanan karışım, 700 rpm dönüş hızına ve 55 °C sıcaklığa sahip bir manyetik karıştırıcı (Daihan, MSH-20A) üzerinde 1 saat karıştırıldıktan sonra %75 genliğe sahip bir ultrasonik homojenizatör ile 5 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Ardından 1 saat daha karıştırılan karışım tüplere aktarıldıktan sonra 4100 rpm dönüş hızında 10 dakika santrifüj (Nüve, NF 1200R) edilmiştir. Elde edilen akışkan müsilaj, iki katlı müslin bezden geçirilerek süzölmüş ve film üretiminde kullanılmıştır. Şekil 3.2, bamya müsilajının hazırlama aşamalarını ve elde edilen bamya müsilajını göstermektedir.



Şekil 3.2. Bamya müsilajı hazırlama aşamaları.

3.3.2. Metil Selüloz Çözeltisinin Hazırlanması

Metil selüloz çözeltisinin hazırlanması için Türe vd. (2009) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır [70]. Buna göre, 3 g metil selüloz ile 50 ml etanol ısıtıcılı bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmış ve üzerine 50 ml d-su eklenerek metil selüloz solüsyonu 80 °C'ye ulaşıncaya kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilen karışım film oluşumunda kullanılmıştır.

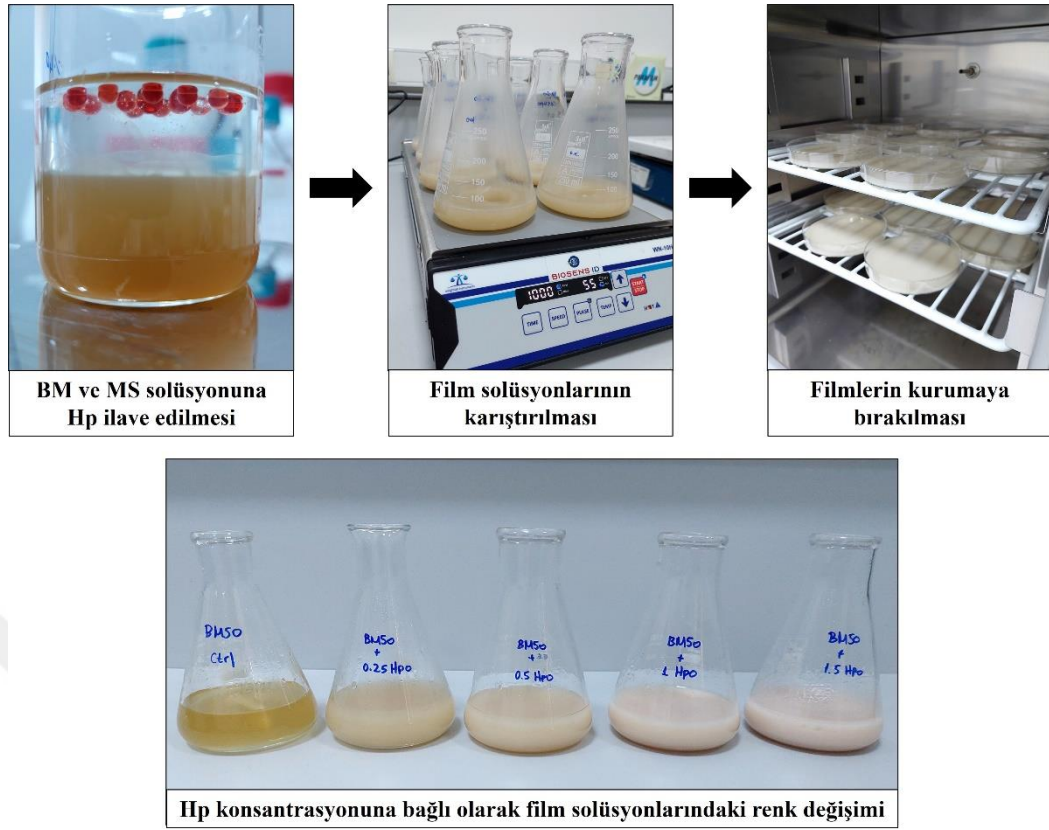
3.3.3 Bamya Müsilajı ve Metil Selülozdan Kompozit Bir Yara Örtü Malzemesinin Üretimi

Bamya müsilajı ve metil selülozdan kompozit bir yara örtü malzemesi üretimi için Mohammadi vd. (2018) tarafından önerilen yöntem takip edilmiştir [38]. Buna göre, hazırlanan bamya müsilajı ve metil selüloz çözeltisi farklı oranlarda (60:40 ve 50:50) karıştırıldıktan sonra %50 genliğe sahip bir ultrasonik homojenizatör (Bandelin, HD2070) ile 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Daha sonra karışıma plastikleştirici ajan gliserol (%1 w/w) eklenmiş ve elde edilen karışım 1000 rpm dönüş hızına ve 55 °C sıcaklığa sahip bir manyetik karıştırıcıda (Weightlab

Instruments, WN-10H-120) 30 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti hava kabarcığı kalmayacak şekilde 8,5 cm çapındaki dairesel polistiren petri kaplarına dökülerek bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 50 °C sıcaklığa sahip inkübatörde kurutulmuş ve bamy müsilajı-metil selüloz filminin (BM:MS) oluşumu sağlanmıştır. Petri kaplarından soyularak çıkarılan BM:MS filmleri oda sıcaklığında %50 nispi nem oranına sahip bir desikatör içerisinde saklanmıştır.

3.3.4. *Hypericum perforatum* (Hp) Yağı ve Gentamisin Katkılı BM:MS Yara Örtü Malzemesinin Üretimi

BM:MS filmlerine farklı konsantrasyonlarda Hp yağı (%0,25-%1.5 v/v aralığında;[4]) ve gentamisin (10 µg ml⁻¹;^[67]) eklenerek fonksiyonel bir yara örtü malzemesi (BM:MS/HpG) üretilmiştir. BM:MS/HpG biyomalzemelerinin hazırlanmasında bir önceki bölümde açıklanan yöntem benzer şekilde takip edilmiştir. Hazırlanan film solüsyonuna son aşamada Hp ve gentamisin ilavesi yapıldıktan sonra karışım %50 genliğe sahip bir ultrasonik homojenizatör ile 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Gliserol eklemesi (%1 w/w) yapıldıktan sonra 1000 rpm dönüş hızında ve 55 °C’de 30 dakika karıştırılmış ve önceki bölümde anlatıldığı şekilde polistiren petri kabına dökülerek belirtilen koşullarda BM:MS/HpG yara örtü malzemesi oluşumu sağlanmıştır. Şekil 3.3’te BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinin hazırlanma aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.3. BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinin hazırlanma aşamaları.

3.4. Enstrümantal Karakterizasyonlar

3.4.1. Kalınlık Ölçümü

Elde edilen BM:MS ve BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinin kalınlığı 15 farklı bölgeden elektronik bir kumpas yardımıyla ölçülmüş ve ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak yara örtü malzemesi kalınlığı belirlenmiştir.

3.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Yara örtü malzemelerinin (BM, BM:MS, BM:MS+0,25-1,5% HpG) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) analizleri bir spektrofotometre ile (Perkin Elmer Spectrum II) elde edilmiştir. Ölçümler ATR ile 400–4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte tarama sayısı 4 olacak şekilde analiz edilmiştir.

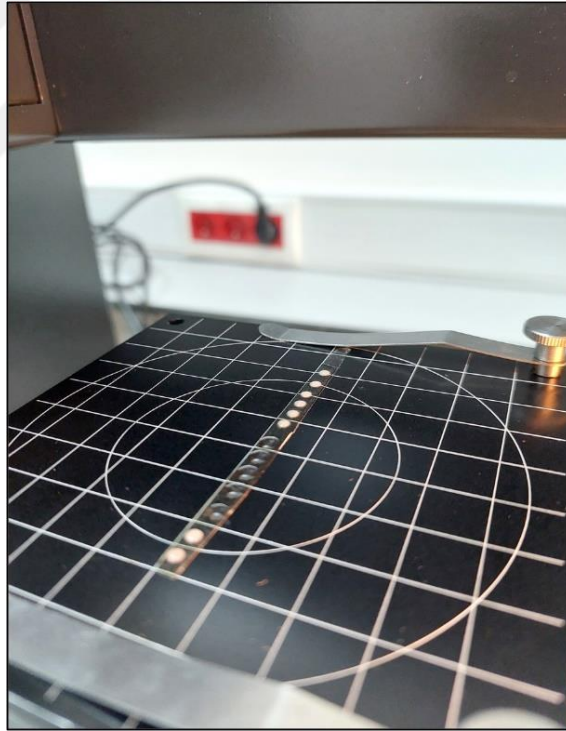
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfoloji Analizi

BM:MS ve BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Numuneler, numune tutucuya

monte edilmiş ve her iki tarafı ayrı ayrı vakum altında altın ile kaplanmıştır. Altın ile kaplanmış numuneler SEM (Carl Zeiss, Sigma 300VP) ile taranarak yüzeyden morfolojik olarak incelenmiştir.

3.4.4. Yüzey Temas Açısına Dayalı Analizler

Üretilen yara örtü malzemelerinin yüzey serbest enerjileri ve çözünürlük parametreleri (δ) Fernandez ve Khayet (2015) önerdiği iki farklı sıvının katı bir yüzey üzerinde oluşturduğu temas açısına dayanan geometrik ortalama metodu kullanılarak hesaplanmıştır [73]. Bu metoda göre, 2 μ l d-su ve akabinde diiyodometan damlacık oluşturacak şekilde film yüzeyine bırakılmış ve bir gonyometre cihazı (Krüss Advance Drop Shape Analyzer, DSA-100S) ile bu sıvıların yara örtü malzemesi yüzeyinde oluşturduğu temas açıları ölçülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Yüzey temas açısı ölçümü.

Ölçülen temas açılarına bağlı olarak aşağıdaki denklem (1) ile yara örtü malzemelerinin yüzey serbest enerjileri hesaplanmıştır [73].

$$2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + 2\sqrt{\gamma_s^{nd} \gamma_l^{nd}} = \gamma_l(1+\cos Q) \quad (1)$$

Denklemdede; γ_s^d katının dağılım bileşenini; γ_l^d sıvının dağılım bileşenini; γ_s^{nd} katının dağılım olmayan bileşenini; γ_l^{nd} sıvının dağılım olmayan bileşenini; γ_l sıvının toplam yüzey serbest enerjisini; Q biyomalzeme ile sıvı arasında ölçülen temas açısını belirtmektedir.

Yukarıda açıklanan denklemdeki yüzey gerilimi ve yüzey gerilim bileşenleri dikkate alınarak aşağıdaki denklemlere (2 ve 3) göre yara örtü malzemelerinin çözünürlük parametresi (δ) hesaplanmıştır.

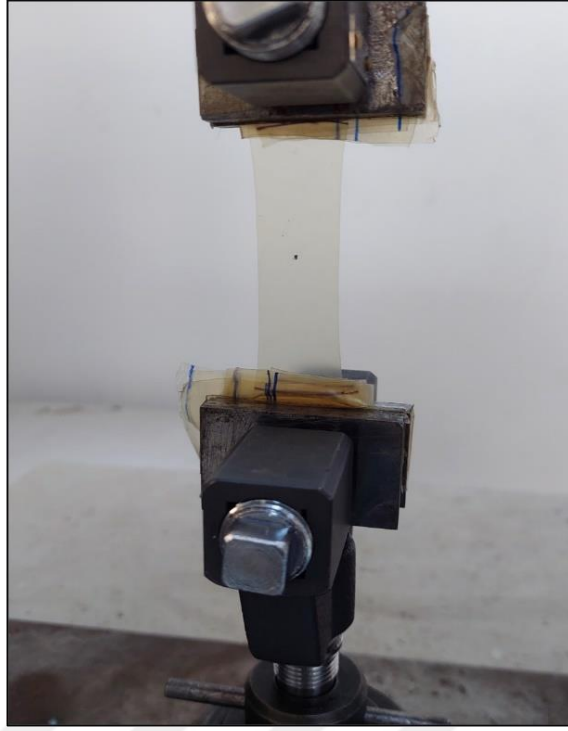
$$e_c = \left(\frac{\gamma_s}{0.75} \right)^{3/2} \quad (2)$$

$$\delta = (e_c)^{1/2} \quad (3)$$

Denklemdede; e_c (mJ m^{-3}), γ_s (mJ m^{-2})'ye bağlı koheziv enerji yoğunluğunu belirtmektedir.

3.4.5. Mekanik Performans Testi

Hazırlanan yara örtü malzemelerinin mekanik performans testi Türe vd. (2009) yaptığı çalışmaya benzer şekilde gerçekleştirilmiştir [70]. Yara örtü malzemeleri 25x50 mm boyutlarında kesilmiş ve testten önce en az 2 gün boyunca %50 nispi nem içeren desikatörde bekletilmiştir. Strese maruz kalacak yara örtü malzemesi uzunluğu 50 mm olacak şekilde bir çekme cihazına (Shimadzu, Autograph) iki ucundan tutturulmuş ve 50 mm dk^{-1} çekme hızında, 1000 N yük altında biyomalzeme deforme olana kadar çekme testi uygulanmıştır (Şekil 3.5). Test sonucu elde edilen verilerden malzemenin kopma uzaması (KU) ve çekme mukavemeti (ÇM) hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Mekanik performans testi.

3.4.6. Su Buharı Geçiş Testi

BM:MS ve BM:MS/HpG yara örtü malzemelerinden su buharı geçiş testi Türe vd. (2009) yaptığı çalışmaya benzer şekilde WVP düzeltme metoduna göre gerçekleştirilmiştir [70]. Bir cam kavanozun içerisine 25 ml d-su doldurulmuş ve üretilen BM:MS/HpG yara örtü malzemesi kavanozun ağzına yerleştirildikten sonra ortası kesilmiş olan kavanoz kapağı kapatılarak biyomalzeme sabitlenmiştir. Kavanozun ağız alanı $9,63 \text{ cm}^2$, kavanozdaki biyomalzeme ve d-su arasındaki mesafe ise 1,4 cm olarak ayarlanmıştır. Daha sonra BM:MS/HpG tutturulmuş cam kavanozlar %50 nispi nem içeren bir desikatörün içine yerleştirilip 37°C 'deki inkübatörde 4 gün boyunca bekletilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Su buharı geçiş testi için hazırlanan örnekler.

Farklı zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96 saat) cam kavanozun ağırlığı tartılarak BM:MS/HPG yara örtü malzemesinden su buharı geçişi ($\text{g/m}^2/\text{saat}$) aşağıdaki denkleme (4) göre hesaplanmıştır.

$$\text{Su buharı geçişi} = (W_0 - W_t) / (A \cdot T) \quad (4)$$

Denklemden; W_0 : başlangıç ağırlığı, W_t : t anındaki ağırlığı, A: kabın ağız açıklığı alanını (m^2) ve T: su buharı geçiş zamanını göstermektedir.

3.4.7. Şişme Performans Testi

Bir parça kuru yara örtü malzemesinin başlangıç ağırlığı (W_0) hassas bir terazide tartılarak belirlenmiş ve ardından yara örtü malzemesi d-su içerisine aktararak oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Farklı inkübasyon zamanlarında (t: 0, 1, 3, 5, 10, 15 ve 20'nci günlerde) yapılması planlanan testlerde film örneklerinin hızlı şekilde bozulduğu gözlemlendiği için inkübasyon süreleri t:1, 5, 15, 30 dakika olarak kısaltılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sudan çıkarılan biyomalzemenin yüzeyindeki su damlacıkları filtre kâğıdı ile kurutulmuş ve biyomalzemenin yaş ağırlığı (W_t) tartım işlemi tekrar edilerek belirlenmiştir. Biyomalzemelerin şişme değerleri (S) aşağıdaki formüle göre % cinsinden hesaplanmıştır (5).

$$S = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100 \quad (5)$$

3.4.8. Hidrolitik Bozunma Testi

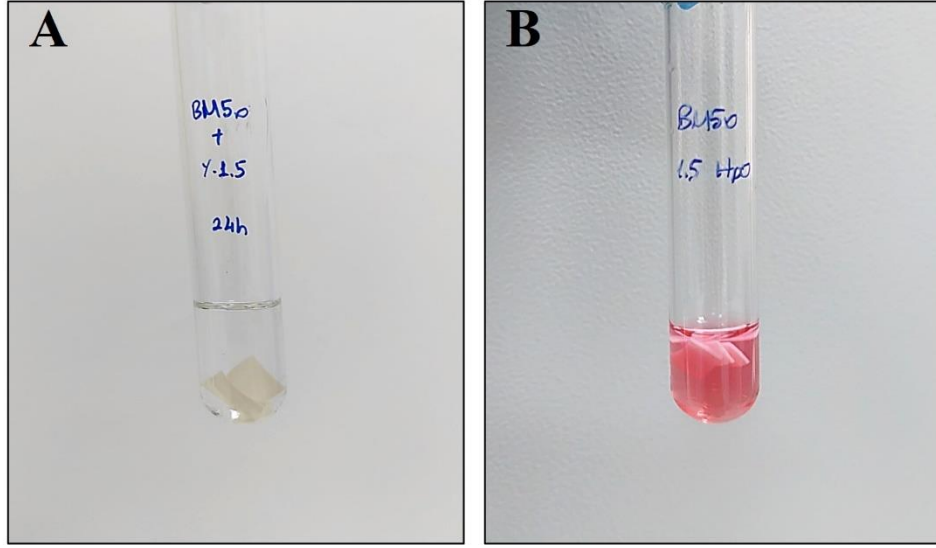
Hidrolitik bozunma testi için bir parça biyomalzeme NaN_3 (%0,02 w/v) içeren PBS içerisinde 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Biyomalzemeler farklı zaman aralıklarında (t:1, 5, 10, 20, 30 dakika) solüsyondan çıkarılarak d-su ile yıkandıktan sonra yapısındaki fazla suyu uçurmak için 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Biyomalzemelerin bozunma değeri (D_i) hassas bir terazi yardımıyla ölçülen başlangıç (W_0) ve t-anındaki ağırlıklarına (W_t) göre % cinsinden hesaplanmıştır (6).

$$D_i = [(W_0 - W_t) / W_0] \times 100 \quad (6)$$

3.5. Biyolojik Karakterizasyonlar

3.5.1. Biyomalzeme Ekstraktının Eldesi

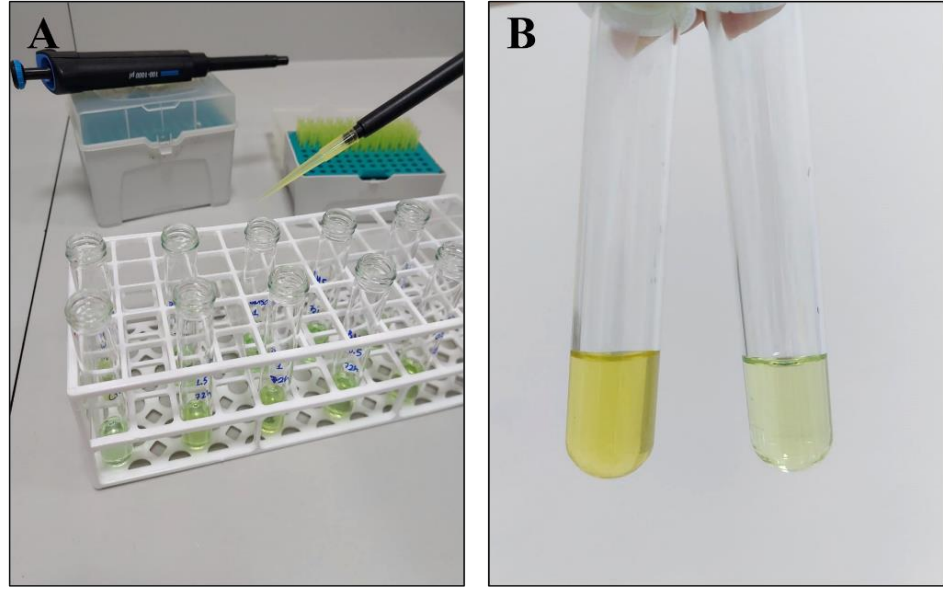
in vitro biyolojik analizlerde kullanılmak üzere biyomalzeme ekstraktı ISO 10993-5 standardına göre hazırlanmıştır. Bazı modifikasyonlarla Fern’andez-Marín vd. (2022) önerdiği metot uygulanmıştır [74]. Buna göre, UV altında 30 dk bekletilerek sterilizasyon işlemine tabi tutulan 25 mg biyomalzeme steril bir tüp içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 3 ml metanol eklenen örnekler 37°C %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. Inkübasyonun 1’inci, 2’nci ve 3’üncü günlerinde biyomalzeme ekstraktları biyolojik analizlerde kullanılmak üzere steril tüplere aktarılmış ve analiz edilene kadar +4 °C’de saklanmıştır. MTT ve çizik testlerinde kullanılan örnekler için metanol yerine DMEM-10 besiyeri kullanılarak aynı ekstraksiyon işlemi tekrar edilmiştir. Şekil 3.7, metanol ve DMEM-10 besiyeri kullanılarak hazırlanan farklı biyomalzeme ekstraktlarını göstermektedir.



Şekil 3.7. Biyolojik karakterizasyonlarda kullanılmak üzere; A) metanol ile ve B) DMEM-10 besiyeri ile hazırlanan biyomalzeme ekstraktları.

3.5.2. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

BM:MS ve BM:MS/HpG biyomalzeme ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi 450 nm dalga boyundaki absorbans değişimine dayanan CUPRAC yöntemine göre belirlenmiştir [75]. Bu metoda göre, 1 ml bakır (II) klorür (CuCl_2) solüsyonu (1.0×10^{-2} M), 1 ml alkolik neokuprin solüsyonu (7.5×10^{-3} M) ve 1 ml amonyum asetat (NH_4Ac) (1M) solüsyonu temiz bir tüp içerisinde fazla çalkalamadan karıştırılmıştır. Daha sonra karışım içerisine 100 μl analiz edilecek biyomalzeme ekstraktı ve 1 ml d-su eklenerek son hacim 4,1 ml'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde kör olarak hazırlanan tüpe ise 100 μl biyomalzeme ekstraktı yerine 100 μl d-su ilave edilmiştir. Analiz için hazırlanan örnekler ve örnekler arasındaki renk farkı Şekil 3.8'de görülmektedir.



Şekil 3.8. Toplam antioksidan kapasite tayini deneyinde; A) hazırlanan örnekler, B) farklı örnekler arasında görülen renk farkı.

Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk bekletilen örnekler 450 nm dalga boyunda bir UV görünür spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Evolution 201) yardımıyla analiz edilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan kapasitesi, kalibrasyon eğrisi kullanılarak Troloks eşdeğeri (TE) cinsinden hesap edilmiştir. UV ölçüm değeri 0,9 üzerinde çıkan örnekler su içerisinde seyreltilerek analiz tekrar edilmiştir.

3.5.3. Toplam Fenolik Madde Tayini

BM:MS ve BM:MS/HpG biyomalzeme ekstraktlarının toplam fenolik miktarı Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir [76]. Buna göre, 20 µl ekstrakt örneği ve 100 µl Folin-Ciocalteu ajanı mikropiçinin bir kuyusunda karıştırılmış ve oda sıcaklığında 2,5 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 80 µl sodyum karbonat (Na_2CO_3) kuyulara eklenerek 1 saat daha karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerde oluşan renk değişimleri Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Toplam fenolik madde tayini için hazırlanan örneklerde görülen renk değişimi.

Daha sonra kuyucukların absorbanası 775 nm dalga boyunda bir mikropilaka spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) yardımıyla ölçülmüş ve standart eğriye bağlı olarak toplam fenolik madde miktarı 1 ml'deki gallik asit (μg GAE/ml ekstrakt) eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

3.5.4. Antibakteriyel Testler

BM:MS/HpG biyomalzeme ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi Gr (-) *Escherichia coli* (*E. coli*) ve Gr (+) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bakterileri üzerinde disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Deneyde kullanılan bakteriler 2YT besiyerinde bir gece 37 °C'deki çalkalamalı inkübatörde 200 rpm çalkalama hızında büyütülmüş ve ertesi gün 100 μl bakteri kültürü 5 ml taze besiyerine aktararak 3 saat daha inkübasyona devam edilmiştir. Böylece deneyde kullanılan bakteriler eksponansiyel büyüme fazına getirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin 650 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu 0,6 olarak ayarlanmış ve Muller Hinton agar içeren petri plakalarına bir swap yardımıyla ekim yapılmıştır. Yüzeylerine bakteri yayılan agar plakaları oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra, plakanın ortasına 1x1 cm ebatında UV-sterilizasyonu yapılmış biyomalzeme örnekleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Disk difüzyon testi için hazırlanan ve inkübatöre yerleştirilen örneklerin görünümü.

37 °C'deki inkübatörde 24 saat bekletilen plakalarda zon oluşumu takip edilmiş ve zon oluşumu görülen örneklerde plakaların fotoğrafı çekilerek ImageJ programında zon çapı ölçümü yapılmıştır. Her plaka için 5 farklı noktadan zon çapı ölçülmüş ve sonuçlar bu 5 farklı ölçümün ortalaması şeklinde $\pm$ standart sapma ile mm cinsinden verilmiştir.

3.5.5. Bakteri Geçiş Testi

Bu test ile bakterilerin hazırlanan fonksiyonel BM:MS/HpG biyomalzemelerinden geçiş yapıp yapamadığı incelenmiştir. Kısaca, petri kabının kenarlarında boşluk kalacak şekilde kesilen BM:MS/HpG biyomalzemelerine UV-sterilizasyonu uygulanmış ve yüzeyine Bölüm 3.5.4'te anlatıldığı gibi hazırlanan bakteri kültürlerinden 1×10^7 bakteri $0,1 \text{ ml}^{-1}$ olacak şekilde yayılmıştır. BM:MS/HpG biyomalzemeleri agar yüzeyine yerleştirildikten sonra petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda agar yüzeyinde ve film yüzeyinde bakteri büyümesi olup olmadığı kontrol edilmiş ve plakaların fotoğrafları çekilmiştir. Kontrol grubu olarak gentamisin içermeyen BM:MS biyomalzemesi kullanılmıştır.

3.5.6. MTT Canlılık Testi

BM:MS ve BM:MS/HpG biyomalzeme ekstraktlarının hücre canlılığı üzerindeki aktivitesi insan dermal fibroblast hücre hattı olan BJ hücreleri üzerinde MTT hücre proliferasyon testi kullanılarak belirlenmiştir [77]. DMEM-10 besiyeri içeren flasklarda büyütülen hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanmıştır. Elde edilen süspansiyondaki hücre sayısı tripan mavi boyası ile Neubaur kabında sayım yapılarak belirlenmiş ve mikrolakanın her bir kuyusuna 100 µl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre eklenmiştir. Mikrolaka 1 gece 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kuyulardaki besiyeri, DMEM-10 ile hazırlanmış biyomalzeme ekstraktı ile yer değiştirilmiştir. Kontrol kuyularına biyomalzeme ekstraktı yerine 100 µl taze besiyeri eklenmiştir. Plaka inkübatöre geri alınarak inkübasyona devam edilmiştir. Farklı zaman aralıklarında (24 ve 48 saat) test edilmek üzere aynı şartlarda 2 farklı plaka hazırlanmıştır.

İnkübasyon sonunda kuyulara 10 µl MTT boyası (tiazolil mavi tetrazolyum bromür; 5mg/ml PBS) eklenerek plakalar 2 saat daha inkübe edilmiştir. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerine zarar vermeden besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO içerisinde çözülen kristallerin oluşturduğu renk 570 nm ve 690 nm (arka plan) dalga boylarında bir mikrolaka spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) ile ölçülmüştür (Şekil 3.11). Hücre canlılığı, denklem (7)'ye göre hesaplanmıştır.

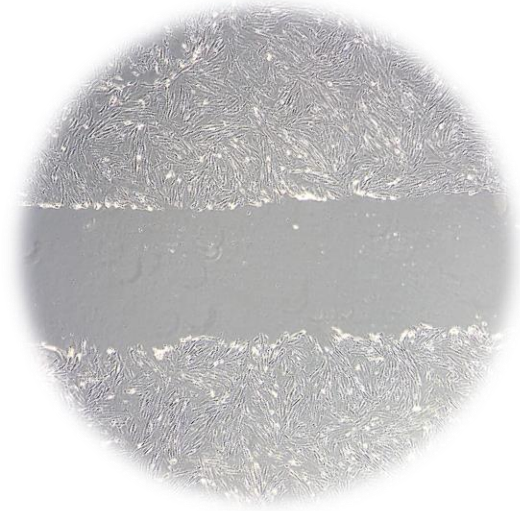
$$\% \text{ hücre canlılığı} = ((OD_{\text{uygulama}} - OD_{\text{kontrol}}) / OD_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (7)$$



Şekil 3.11. MTT canlılık testi için hazırlanan örneklerin absorbansının bir mikropilaka spektrofotometre cihazında ölçülmesi.

3.5.7. Çizik Testi

BM:MS/HPG biyomalzeme ekstraktlarının yara iyileştirme sürecine etkisi, hücre migrasyonunun ölçülmesine dayanan çizik testi ile belirlenmiştir [78]. Deneyde, insan kaynaklı BJ dermal fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Bölüm 3.5.6’da anlatıldığı gibi büyütülen ve sayımı yapılan hücreler besiyeri içerisinde 5×10^4 hücre $0,5 \text{ ml}^{-1}/\text{göz}$ olacak şekilde 24 gözlü plakanın her bir gözüne ekilmiştir. Plaka bir gece 37°C sıcaklıkta %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilerek tek katmanlı hücre tabakasının oluşumu sağlanmış ve steril bir mikropipet ucu yardımıyla hücre tabakasında düz bir çizik oluşturulmuştur. Şekil 3.12’de hücre tabakasında oluşturulan çizğin ışık mikroskobu görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Hücre tabakasında oluşturulmuş çizige ait ışık mikroskobu görüntüsü.

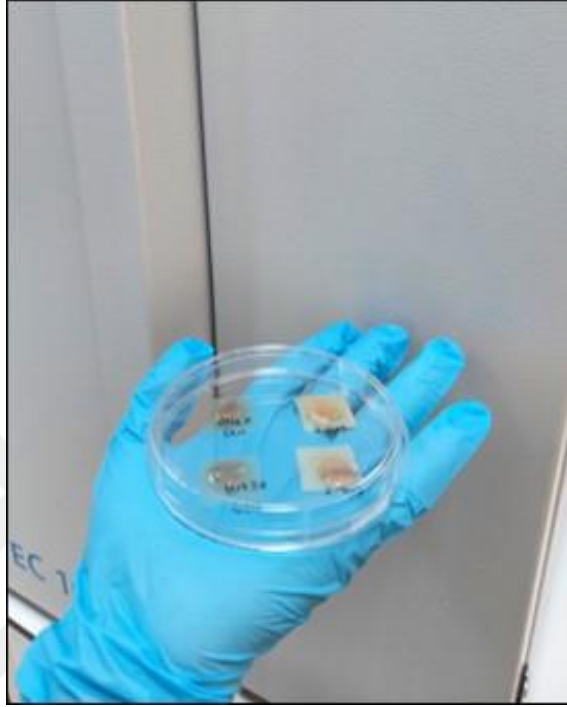
Kuyulardaki besiyeri DMEM-10 içinde hazırlanmış biyomalzeme ekstraktları ile değiştirilmiştir. Kontrol gruplarına biyomalzeme ekstraktı yerine 500 µl taze besiyeri eklenmiştir. İnkübasyona devam edilerek farklı zaman aralıklarında (0, 12, 24'üncü saat) bir ışık mikroskobu (Olympus CKX53) altında çizikin fotoğrafı çekilmiştir. Çizik alana doğru hücre migrasyonu sonucu gerçekleşen yara kapanma oranı Image J programı kullanılarak ölçülmüş ve yara kapanma yüzdesi aşağıdaki denkleme (8)'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kapanma} = ((\text{Başlangıç çizik alanı} - t \text{ anındaki çizik alanı}) / \text{Başlangıç çizik alanı}) \times 100 \quad (8)$$

3.5.8 *in vitro* Hücre Tutunma Testi

BJ hücrelerinin hazırlanan biyomalzemelerin yüzeyine tutunup tutunmadığı Güneş ve Tıhminlioğlu (2017) önerdiği yöntemle göre DAPI phalloidin boyası kullanılarak *in vitro* ortamda test edilmiştir [4]. Önceki bölümde anlatıldığı gibi büyütülen ve sayımı yapılan hücreler 1×10^5 hücre $0,1 \text{ ml}^{-1}$ olacak şekilde DMEM-10 içerisinde seyreltilip steril petri kabına yerleştirilen UV sterilizasyonu uygulanmış biyomalzeme yüzeyine ekilmiştir. Test için hazırlanan örneklerin fotoğrafı Şekil 3.13'te görülmektedir. Plaka 3 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %3,7 formaldehid solüsyonunda 20 dk bekletilerek fikse edilmiştir. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanan hücreler %0,1 triton X-100 (5 dk)

uygulanması ile geçirgen hale getirilmiştir. PBS ile yıkama işlemi tekrar edilmiş ve hücreler Phalloidin (F aktin boyası) ve DAPI (nükleus boyası) boyaları ile boyanmıştır. Son olarak, boyanan hücreler bir floresan mikroskobu (Olympus, IX53) altında incelenmiştir.



Şekil 3.13. *in vitro* hücre tutunma testi için hazırlanan örnekler.

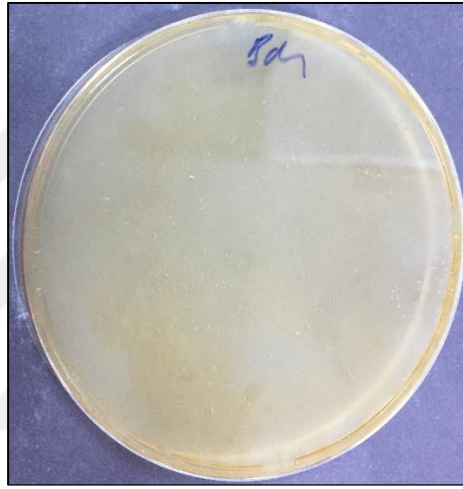
3.6. İstatiksel Analizler

Bu çalışmada yer alan tüm testler birbirinden bağımsız iki veya üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve bu deneylerden elde edilen verilerin ortalaması, hesaplanan $\pm$ standart sapmalar ile verilmiştir. Bu raporda kullanılan tüm grafikler SigmaPlot 14 programı kullanılarak çizilmiş ve elde edilen veriler Minitab istatistik programı ile analiz edilmiştir. Test grupları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA testi ve sonrasında uygulanan Fisher LSD (least significant difference, en önemsiz fark) testi ile belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

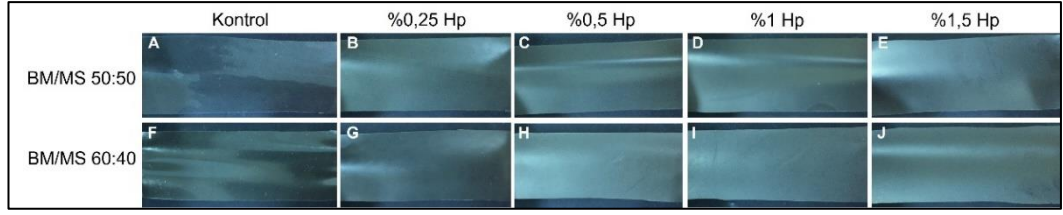
4.1 Bamya Müsilajı ve Metil Selülozdan Sarı Kantaron Yağı ve Gentamisin Katkılı Bir Biyomalzemenin Üretimi

Bu çalışmada, ilk defa bamya müsilajı ve metil selülozdan kompozit bir yara örtü malzemesi (BM:MS) geliştirilip, üretilen biyomalzemeye sarı kantaron yağı (Hp) ve gentamisin (G) ilave edilerek birçok fonksiyonel özellik kazandırılmıştır. Yapılan ön denemelerde, sadece bamya müsilajı (BM) kullanılarak hazırlanan BM filmleri oldukça yapışkan ve düşük mukavemete sahip olup kurutma işlemi sonrasında petri kabından soyularak çıkarılamamıştır (Şekil 4.1).



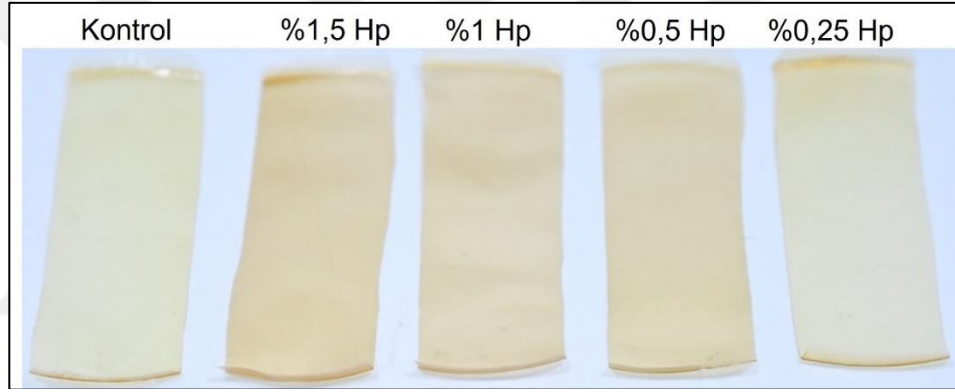
Şekil 4.1. Bamya müsilajı filmi.

Bunun üzerine doğal bir malzeme olarak seçilen metil selüloz (MS) ilavesiyle kompozit bir biyomalzeme (BM:MS) üretilmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan BM:MS karışımlarına (BM:MS/50:50 ve BM:MS/60:40 w/w) farklı konsantrasyonlarda (%0,25-1,5 w/w aralığında) sarı kantaron yağı (Hp) ve $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamisin (G) eklenerek üretilen BM:MS ve BM:MS/HpG biyomalzemeleri yüksek mukavemete sahip olup petri kaplarından rahatça soyularak çıkarılabilmektedir. Kontrol olarak üretilen biyomalzemeler parlak ve şeffaf görünümlü bir yapıya sahip iken, Hp içeren biyomalzemeler Hp konsantrasyonuna bağlı olarak mat bir görünüm sergilemişlerdir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hp katkılı (%0,25-1,5 aralığında) BM:MS biyomalzemeleri. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri. Not: Hp içeren gruplar $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamisin içermektedir.

Ayrıca, Hp konsantrasyonuna bağlı olarak düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru biyomalzemelerin hafif pembe bir renk aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. HpG içeren/içermeyen BM:MS/60:40 biyomalzemeleri.

Literatürde bamyâ müsilajından film üretimi ile ilgili bir çalışma [12] bulunsa da üretilen filmler yara örtü malzemesi niteliği taşımayıp malzemelerin mekanik ve biyolojik karakterizasyonları ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Bamyâ müsilajı filmlerine polivinil alkol [68], mısır nişastası [13], karboksimetil selüloz/ZnO nanoparçacıkları [38] gibi farklı malzemelerin eklenmesiyle çeşitli kompozit filmler üretilerek, biyomalzemenin mekanik ve fiziksel özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Ancak, üretilen bu filmler yetersiz mekanik ve fiziksel özelliklerinden dolayı genelde gıda paket malzemesi olarak tasarlanmışlardır. Ayrıca bu çalışmalarda ayrıntılı biyolojik analizlere (sitotoksikite, antibakteriyel, proliferatif etki, antioksidan kapasite tayini, toplam fenol içeriği tayini vb.) yer verilmemiştir.

Yaptığımız çalışmada, bamyâ müsilağına metil selüloz ilavesiyle biyomalzemenin mekanik özelliği dikkate değeri oranda iyileşme sergilerken, Hp içeriği ile *in vitro* ortamda yara iyileşme sürecine olumlu katkı sağlamaktadır. Ayrıca, Hp içeriği ile biyomalzemenin yapısında oluşan porlar sayesinde *in vivo* modelde yapılacak çalışmalarda yaranın hava almasına olanak tanınması beklenmektedir.

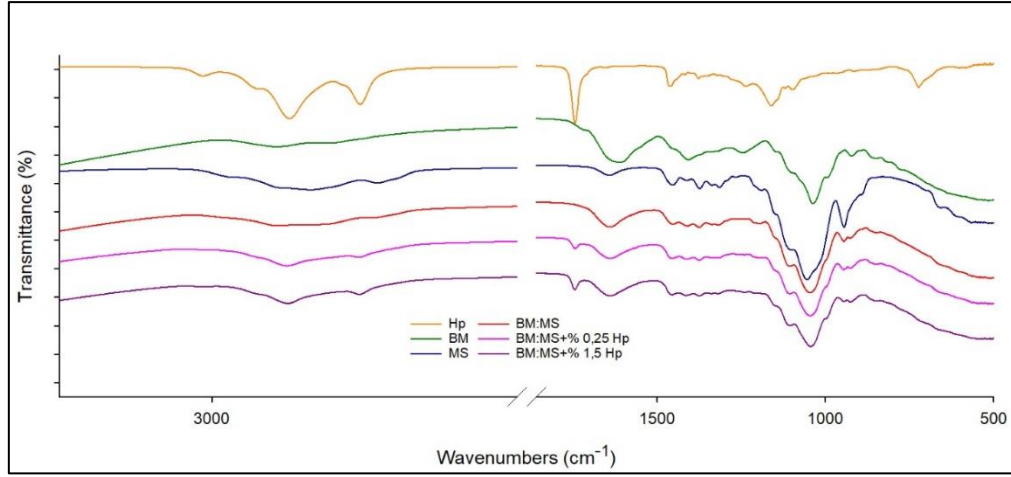
4.2 BM:MS ve BM:MS/HpG Yara Örtü Malzemelerinin Enstrümantal Yöntemlerle Karakterizasyonu

4.2.1. Yara Örtü Malzemelerinin Kalınlıkları

BM-MS/HpG yara örtü malzemelerinin kalınlıkları 0,06-0,1 mm aralığında ölçülmüştür. Bamyâ müsilağı oranının yüksek olduğu biyomalzemelerin nispeten daha fazla kalınlığa sahip olduğu ve Hp konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak biyomalzemelerin kalınlıklarında da artış gözlenmiştir. HpG içermeyen kontrol gruplarının kalınlıkları 0,06 mm olarak ölçülürken en yüksek Hp konsantrasyonu olan BM:MS/%1,5 HpG biyomalzemesinin kalınlığı 0,1 mm olarak ölçülmüştür. Üretilen yara örtü malzemelerinin literatürde 0,05-0,1 mm olarak belirtilen aralığa uygun kalınlıklara sahip olduğu görülmüştür [4, 79–81].

4.2.2 FTIR Analizi

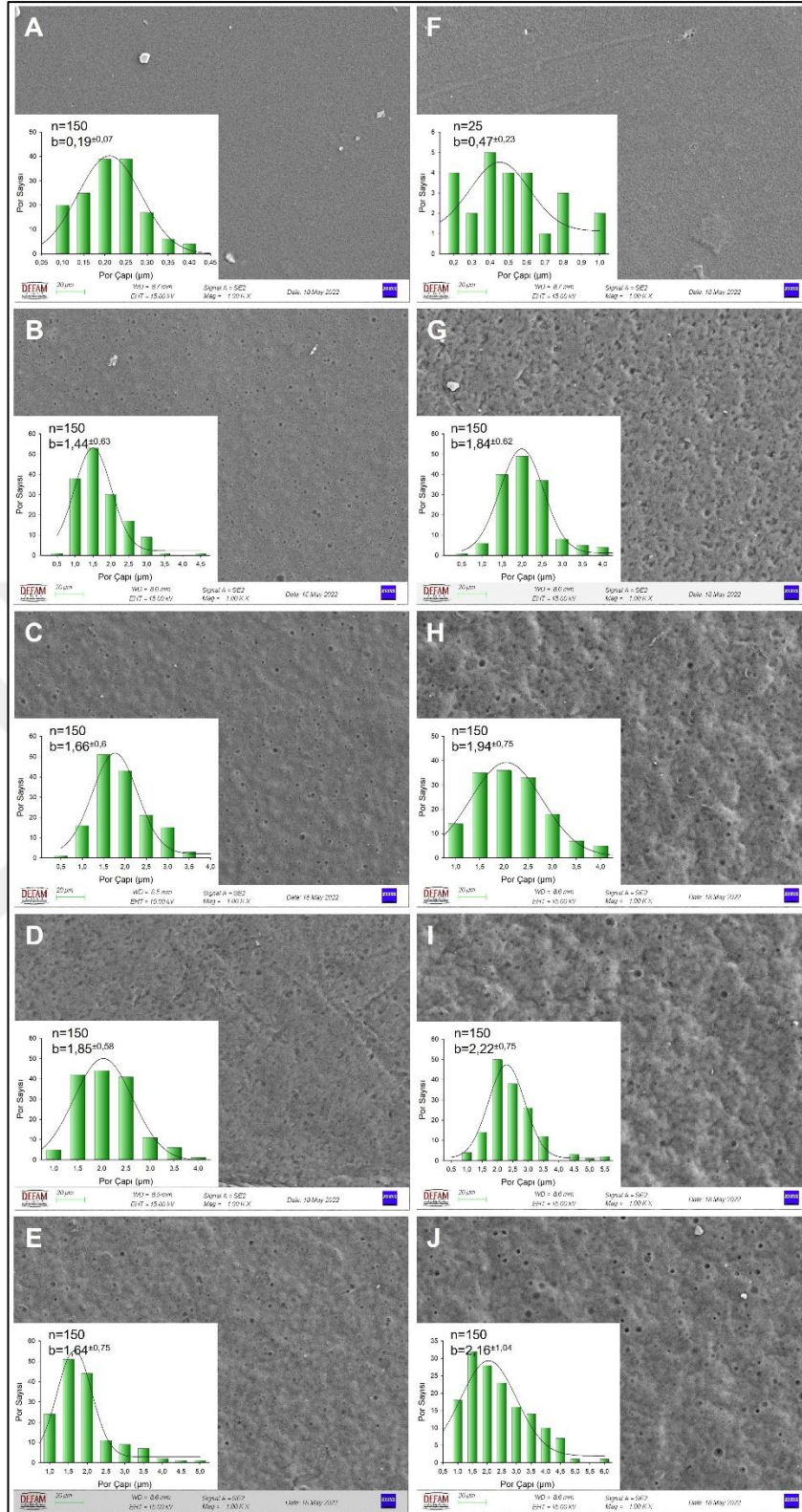
FTIR analizinde biyomalzeme içeriğinde kullanılan ajanlar olan Hp, BM, MS ve Hp içeren BM:MS biyomalzemelerin (BM:MS/%0,25 Hp ve BM:MS/%1,5 Hp) spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4). Yaklaşık olarak 1700, 2100, 2300 cm⁻¹ gözlenen Hp'ye özgü pikler HpG katkılı BM:MS biyomalzemelerde açık bir şekilde gözlenmiştir. Bu pikler en yüksek konsantrasyon olan %1,5 Hp katkılı biyomalzemelerde en düşük Hp konsantrasyonu olan %0,25 Hp biyomalzemelerine oranla daha belirgindir. Bunun yanı sıra, 1100-1500 cm⁻¹ dalga boyunda gözlenen MS parmak izi bölgesindeki pikler de Hp katkılı/katkısız BM:MS biyomalzemelerde belirgin şekilde gözlenmiştir. 900 cm⁻¹ dalga boyunda MS'ye özgü pik, Hp katkılı/katkısız BM:MS biyomalzemelerde sönümlenmiştir. Hp içeren gruplar 10 µg ml⁻¹ gentamisin içermekte olup, gentamisin bu konsantrasyonda FTIR analizinde pik sergilememiştir. Bu yüzden, FTIR spektrumlarını gösteren şekilde gentamisin analiz sonuçlarına yer verilmemiştir.



Şekil 4.4. Hp, BM, MS, BM:MS, BM:MS/%0,25 Hp ve BM:MS/%1,5 Hp biyomalzemelerinin FTIR spektrumları. Hp içeren tüm gruplar gentamisin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) içermektedir.

4.2.3 SEM Morfoloji Analizi

SEM analizlerine bakılarak biyomalzemelerin yüzey morfolojileri hakkında çıkarımlarda bulunulmuştur. Hp içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin yüzeyi 1.000x büyütmede pürüzsüz (porsuz) olarak gözlenirken, Hp ilavesi ile 1,4-2,2 μm aralığında düzgün yuvarlak şekilli belirgin porların olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). BM:MS biyomalzemelerine 20.000x büyütmede bakıldığında çapı yaklaşık 0,2-0,4 μm aralığında değişen düzensiz çatlaklar/çukurlar görülmüştür. SEM görüntülerinde Image J programı kullanılarak 150 farklı porun çapı ölçülmüş ve ortalama por çapları standart sapma değerleriyle birlikte sunulmuştur. Ayrıca por çaplarının dağılımını gösteren histogramlar Gaussian dağılım eğrileriyle birlikte Şekil 4.5'teki SEM fotoğrafları içerisinde (inset olarak) verilmiştir. Artan Hp oranıyla birlikte por çaplarında da ufak bir artış dikkati çekmektedir. Ayrıca, tüm gruplarda BM:MS 60:40 biyomalzemelerindeki por çaplarının BM:MS 50:50 biyomalzemelerine oranla daha büyük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. BM:MS HpG içeren/içermeyen biyomalzemelerin SEM fotoğrafları. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri. A-F) BM:MS Kontrol, BG) %0,25 Hp, CH) %0,5 Hp, DI) %1 Hp, EJ) %1,5 Hp içeren biyomalzemeler (n=boyutu ölçülen örnek sayısı, b= boyut).

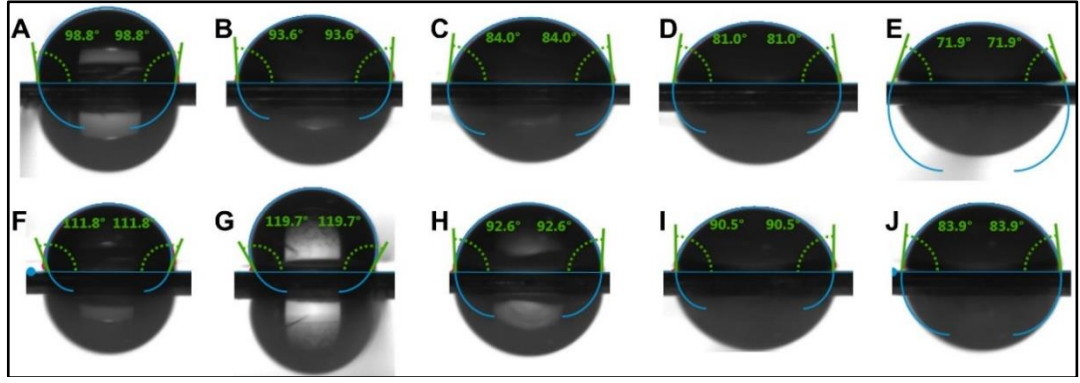
4.2.4 Yüzey Temas Açısı Ölçümleri

HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin yüzeylerine damlatılan su ve diiyodometan damlacıklarının yüzeyde oluşturdukları temas açıları Tablo 4.1’de, su damlacıklarının biyomalzemelerin yüzeylerinde oluşturduğu yüzey temas açıları ise Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Tablo 4.1’de verilen değerler 3 farklı damlacığın yüzeyde oluşturduğu açılarının ortalaması olarak ifade edilirken, Şekil 4.6’da o ölçümü temsil eden ortalama açığa en yakın görüntüye yer verilmiştir. HpG içeren/içermeyen BM:MS filmlerinin yüzey temas açıları 70-110° aralığında bulunmuştur. Literatürde ideal bir yara örtü malzemesinin yüzey temas açısı 50-90° aralığında belirtilmiştir [79]. Bu durumda, Hp içeren filmlerin sahip olduğu 70-90° aralığındaki yüzey temas açıları literatüre uymaktadır.

Tablo 4.1. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin yüzey temas açısı ölçümleri.

	*	su	diiyodometan	Yüzey Serbest Enerjisi	Çözünürlük Parametresi
BM:MS/50:50	Kontrol	97,30±7,98 ^a	56,57±1,25 ^a	30,57	16,13
	% 0,25 Hp	94,70±7,40 ^{ab}	49,70±1,18 ^b	34,49	17,66
	% 0,5 Hp	84,80±6,61 ^{bc}	37,07±3,39 ^c	41,13	20,15
	% 1 Hp	80,87±2,52 ^{cd}	21,83±2,18 ^d	47,28	22,37
	% 1,5 Hp	72,30±5,41 ^d	20,27±1,47 ^d	48,83	22,92
BM:MS/60:40	Kontrol	111,70±1,84 ^a	54,20±1,28 ^a	34,86	17,80
	% 0,25 Hp	119,30±0,71 ^b	43,97±1,64 ^d	45,93	21,89
	% 0,5 Hp	92,50±1,68 ^c	47,47±0,59 ^c	35,68	18,12
	% 1 Hp	89,77±8,24 ^c	50,00±3,31 ^b	34,36	17,61
	% 1,5 Hp	83,77±2,36 ^d	44,90±2,69 ^d	37,54	18,82
*Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplar gentamisin (10 µg ml ⁻¹) içermektedir. Tüm değerler üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması olarak, ± standart sapma değerleriyle birlikte ifade edilmiştir. Harfler grup içerisinde farkları ifade etmektedir (p<0,05).					

Genel olarak, BM:MS 60:40 biyomalzemelerinin yüzeyinde oluşan su damlacıklarının temas açıları BM:MS 50:50 biyomalzemelerine oranla daha yüksek ölçülürken, her iki grupta da Hp oranındaki artışa doğru orantılı olarak yüzey temas açılarında düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Yüzey temas açısı ölçümleri. A-E) BM:MS/50:50, F-J) BM:MS/60:40 biyomalzemeleri. AF) BM:MS Kontrol, BG) %0,25 Hp, CH) %0,5 Hp, DI) %1 Hp, EJ) %1,5 Hp içeren biyomalzemeler.

Hp içermeyen kontrol grupları oldukça hidrofobik özellik sergilerken, yağ eklenmesiyle birlikte yüzey hidrofobisitesinde düşüş gözlenmiştir. Hp ilavesi ile yüzey hidrofobisitesinin azalması biyomalzeme yüzeylerinde oluşan por çaplarındaki artış ile ilişkilendirilmektedir. Literatürde de por çapındaki azalma ile hidrofobisitenin artışı söylenmektedir [82]. SEM analizlerinde Hp ilavesi ile BM:MS biyomalzeme yüzeylerinde porların oluştuğu ve Hp konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak por çaplarında da artış gözlemlendiği daha önceki bölümde ifade edilmiştir.

4.2.5 Mekanik Performans Testi

Çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz ön denemelerde bamyaya müsilajından üretilen biyomalzemeler petri kabından tam olarak çıkarılamamış ve biyomalzemelerin mekanik mukavemetinin oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Petri kabının yüzeyinden parça parça sökülen biyomalzemenin yapışkan ve oldukça dayanıksız olduğu gözlenmiştir. Literatürde bulunan bir çalışmada çekme mukavemetinin oldukça iyi olduğu bilinen ve doğal bir malzeme olan metil selüloz [70] ilavesi ile bamyaya müsilajı biyomalzemelerinin dayanıklılığı kayda değer oranda artırılmıştır.

Çekme testi sonuçlarına göre, MS biyomalzemelerinin beklentiyi karşılayacak incelikte (0,06 mm) ve oldukça yüksek çekme mukavemetine (54,6 MPa) sahip olduğu belirlenmiştir. Üretilen farklı konsantrasyonlarda HpG içeren BM:MS kompozit biyomalzemelerinin çekme mukavemeti 9,1-27,4 MPa aralığında olduğu göz önünde bulundurulduğunda, MS ilavesinin bamyaya müsilajı

biyomalzemelerinin mukavemetine ciddi oranda katkı sağladığı görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin kalınlıkları, çekme mukavemetleri ve % kopma uzamaları.

	*	Kalınlık (mm)	Çekme mukavemeti (MPa)	% Kopma uzaması
BM: MS/50:50	% 0,25 Hp	0,07± 0,00 ^b	27,39 ± 0,40 ^a	93,06 ± 6,19 ^a
	% 0,5 Hp	0,08 ± 0,004 ^b	21,87 ± 1,27 ^b	93,60 ± 14,19 ^a
	% 1 Hp	0,09 ± 0,004 ^a	19,91 ± 1,29 ^b	87,93 ± 10,71 ^a
	% 1,5 Hp	0,09± 0,00 ^a	16,87 ± 0,85 ^c	85,25 ± 11,93 ^a
BM:MS/60:40	% 0,25 Hp	0,07 ± 0,004 ^b	17,02 ± 0,27 ^a	89,53 ± 5,97 ^a
	% 0,5 Hp	0,07± 0,00 ^b	13,72 ± 0,84 ^b	70,65 ± 15,67 ^a
	% 1 Hp	0,09 ± 0,008 ^a	11,47 ± 0,73 ^c	90,55 ± 4,92 ^a
	% 1,5 Hp	0,10 ± 0,008 ^a	9,13 ± 0,46 ^d	66,67 ± 8,96 ^a

* Tablodaki tüm gruplar gentamisin (10 µg ml⁻¹) içermektedir. Tüm değerler üç bağımsız deney sonuçlarının aritmetik ortalaması olarak, ± standart sapma değerleriyle birlikte ifade edilmiştir. Harfler grup içerisindeki farkları göstermektedir (p<0,05).

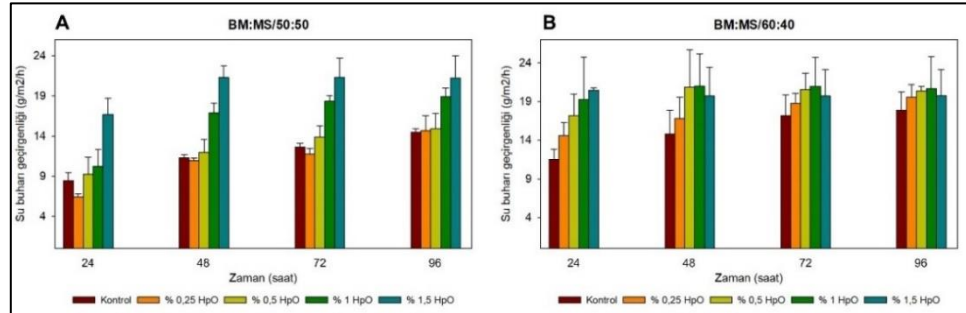
MS içerik oranı daha yüksek olan BM:MS 50:50 biyomalzeme gruplarının çekme mukavemetleri BM:MS 60:40 biyomalzeme gruplarına oranla daha yüksek olduğu açıkça anlaşılmaktadır. Çekme mukavemetleri Hp ilavesine orantılı bir şekilde düşüş sergilemektedir. En yüksek çekme mukavemeti BM:MS 50:50 %0,25 Hp katkılı biyomalzemesinde 27,4 MPa olarak ölçülürken, en düşük çekme mukavemeti BM:MS 60:40 %1,5 Hp biyomalzemesinde 9,1 MPa olarak ölçülmüştür.

İnsan derisinin kopma mukavemetinin bulunduğu bölgeye göre 5-50 MPa arasında değiştiği [79, 83] ifadesinden yola çıktığımızda HpG içeren/içermeyen tüm biyomalzemelerin istenilen seviyede dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.6 Su Buharı Geçiş

Su buharı geçiş analizleri SEM bulgularını destekler nitelikte olup, Hp içeren örneklerde su buharı geçiş hızının Hp içermeyen BM:MS kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). Yine benzer şekilde, por çaplarının daha büyük olduğu gözlenen BM:MS 60:40 biyomalzemelerindeki su buharı geçiş hızı BM:MS 50:50 biyomalzemelerine oranla daha yüksek bulunmuştur. Çalışmanın

başlangıcında öngördüğümüz şekilde Hp ilavesiyle su buharı geçişine izin veren dolayısıyla hava alabilen ideal bir yara örtü malzemesi üretilmiştir.

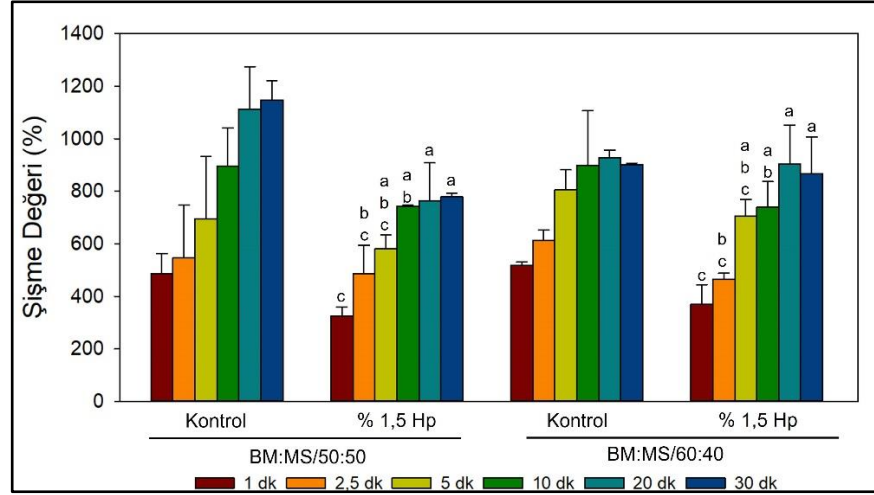


Şekil 4.7. Su buharı geçiş hızı. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 Hp içeren/içermeyen biyomalzemeler. * işareti grup içerisindeki farkları ifade etmek için kullanılmıştır ($p<0,05$).

İyi bir yara örtü malzemesinin sahip olduğu su buharı geçirgenliği yaranın hava aldığına işaret etmesi bakımından önem arz etmektedir. Yaptığımız çalışmada, Hp konsantrasyonu artışına -dolayısıyla por oluşumuna- bağlı olarak su buharı geçirgenliği de artış göstermiştir. Güneş ve Tihmınlıoğlu (2017)'nin Hp katkılı kitosan filmler üzerine yaptığı çalışmalar por çapı ve su geçirgenliği ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir [4].

4.2.7 Şişme Performansı

Biyomalzeme gruplarındaki fazlalık sebebiyle, Hp içermeyen (kontrol) ve en yüksek Hp konsantrasyonunu (%1,5 Hp) içeren BM:MS örnekleri üzerinde şişme testleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, test edilen Hp içeren/içermeyen tüm biyomalzeme örneklerinin suya daldırıldıktan sonra 1 dakika içerisinde %300-500 kat arasında şişme gösterdiği, bu oranın 20'nci dakikada %800-1100 oranına çıktığı görülmüştür. Genel olarak, BM:MS/50:50 biyomalzemelerinin BM:MS/60:40 biyomalzemelerine oranla daha fazla şiştiği ve her iki biyomalzeme örneği gruplarında da yağ içeren örneklerin kontrol gruplarına göre daha az şişme sergilediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.8). Hp içeren gruplar Fisher LSD testine ($p<0,05$) göre analiz edildiğinde, farklı zaman aralıklarındaki şişme değerleri arasında (özellikle kısa ve uzun inkübasyon süreleri arasında) dikkate değer farklar olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. BM:MS Hp içeren/içermeyen biyomalzemelerin % şişme performansları.

Yara yüzeyinde oluşan toksik bileşenleri ve eksüdayı tutması iyi bir yara örtü malzemesinde aranan özelliklerden biridir. Hp ilavesi ile biyomalzemelerin su tutma kapasitesinde azalma gözlenirse de ürettiğimiz biyomalzemelerin yüksek su tutma kapasitesi (1 dakika içerisinde %300-500 kat arasında) sergilemesi olumlu bir özellik olarak değerlendirilmektedir.

4.2.8 Hidrolitik Bozunma

Biyomalzeme gruplarındaki fazlalık sebebiyle, Hp içermeyen (kontrol) ve en yüksek Hp konsantrasyonunu (%1,5 Hp) içeren BM:MS örnekleri üzerinde hidrolitik bozunma testleri gerçekleştirilmiştir. Hidrolitik bozunma testinde ürettiğimiz malzemelerin su ortamında hızlı bir şekilde şiştiği ve zamana bağlı olarak hızlı şekilde bozunmaya uğradığı gözlenmiştir. Bu yüzden hidrolitik bozunma testinde inkübasyon zamanı düşürülerek 1'inci, 5'inci, 15'inci ve 30'uncu dakikalarda ölçüm yapılmıştır. Sonuç olarak, tüm biyomalzeme gruplarının 1 dakikalık inkübasyon sonrasında %22-30 aralığında hidrolitik olarak bozunduğu gözlenirken, en uzun inkübasyon süresi olan 30'uncu dakika sonunda bozunma değerinin %27-39 oranına ulaştığı belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. %1,5 Hp içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin % hidrolitik bozunma değerleri.

	BM:MS/50: 50		BM:MS/60:40	
Zaman (dakika)	Kontrol*	%1,5 Hp	Kontrol*	%1,5 Hp
1	31,24±1,45 ^{abc}	22,80±0,67 ^{cd}	25,25±3,03 ^b	28,65±2,65 ^b
5	36,32±1,98 ^a	21,51±0,89 ^d	39,90±1,19 ^a	29,33±1,00 ^b
15	36,70±2,01 ^a	25,58±3,10 ^{bcd}	39,25±5,82 ^a	26,93±0,74 ^b
30	34,85±6,15 ^a	31,74±0,85 ^{ab}	39,17±3,32 ^a	27,64±3,40 ^b
*Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplar gentamisin (10 µg ml ⁻¹) içermektedir. Deney sonuçlarının ortalaması ± standart sapma değerleriyle birlikte ifade edilmiştir. Harfler grup içerisindeki farkları göstermektedir (p<0,05).				

Hp içeren ve içermeyen gruplar arasındaki hidrolitik bozunma değerleri karşılaştırıldığında, Hp içeren grupların kontrol gruplarına oranla daha az bozunduğu görülmektedir. Fisher LSD testine (p<0,05) göre, kontrol grubu ve Hp içeren örneklerin bozunma hızları arasında anlamlı farkların olduğu belirlenmiştir.

4.3 BM:MS ve BM:MS/HpG Yara Örtü Malzemelerinin *in vitro* Ortamda Biyolojik Karakterizasyonu

4.3.1. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

HpG içeren/içermeyen tüm BM:MS biyomalzemelerinin antioksidan kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.4). En düşük antioksidan kapasite değeri 0,12-0,19 mM Troloks eşdeğeri ile BM:MS kontrol gruplarında tayin edilirken en yüksek değerler 0,93-1,16 ile %1,5 Hp ilave edilen gruplarda tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin antioksidan kapasite değerleri.

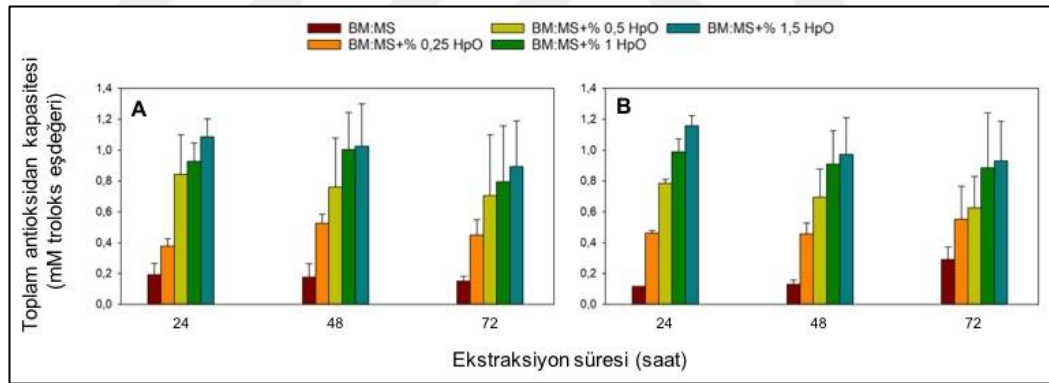
	*	24h	48h	72h
BM:MS/50:50	Kontrol	0,19±0,07 ^b	0,18±0,09 ^c	0,15±0,03 ^b
	% 0,25 Hp	0,38±0,05 ^b	0,53±0,06 ^{bc}	0,45±0,10 ^{ab}
	% 0,5 Hp	0,84±0,26 ^a	0,76±0,32 ^{ab}	0,71±0,39 ^{ab}
	% 1 Hp	0,93±0,12 ^a	1,00±0,24 ^{ab}	0,80±0,36 ^a
	% 1,5 Hp	1,09±0,11 ^a	1,03±0,27 ^a	0,89±0,29 ^a
BM:MS/60:40	Kontrol	0,12±0,00 ^e	0,13±0,03 ^c	0,29±0,08 ^b

	% 0,25 Hp	0,46±0,01 ^d	0,46±0,07 ^{bc}	0,55±0,22 ^{ab}
	% 0,5 Hp	0,79±0,03 ^c	0,70±0,18 ^{ab}	0,62±0,20 ^{ab}
	% 1 Hp	0,99±0,09 ^b	0,91±0,22 ^a	0,89±0,35 ^a
	% 1,5 Hp	1,16±0,06 ^a	0,97±0,24 ^a	0,93±0,26 ^a

*Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplar gentamisin (10 µg ml⁻¹) içermektedir. Tüm değerler üç bağımsız deney sonuçlarının aritmetik ortalaması olarak Troluks (mM) eşdeğeri cinsinden verilmiş olup, ± standart sapma değerleriyle birlikte ifade edilmiştir. Harfler grup içerisindeki farkları göstermektedir (p<0,05).

Toplam antioksidan kapasite değerleri Hp oranındaki artış ile doğru orantılı olarak daha yüksek olarak ölçülmüştür. Ancak, farklı BM:MS oranlarının ve uzatılmış ekstraksiyon sürelerinin (24-48-72 saat) antioksidan kapasite değerlerini kayda değer oranda değiştirmedeği gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Gruplar arasındaki farklar Fisher LSD testi (p<0,05) ile analiz edildiğinde, yüksek Hp içeren grupların antioksidan kapasite değerleri kontrol/düşük Hp içeren gruplardan anlamlı derecede farklılık sergilediği görülmüştür (Tablo 4.4).



Şekil 4.9. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının ekstraksiyon süresine bağlı antioksidan kapasite değerleri. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 filmler.

4.3.2 Toplam Fenolik Madde İçeriği Tayini

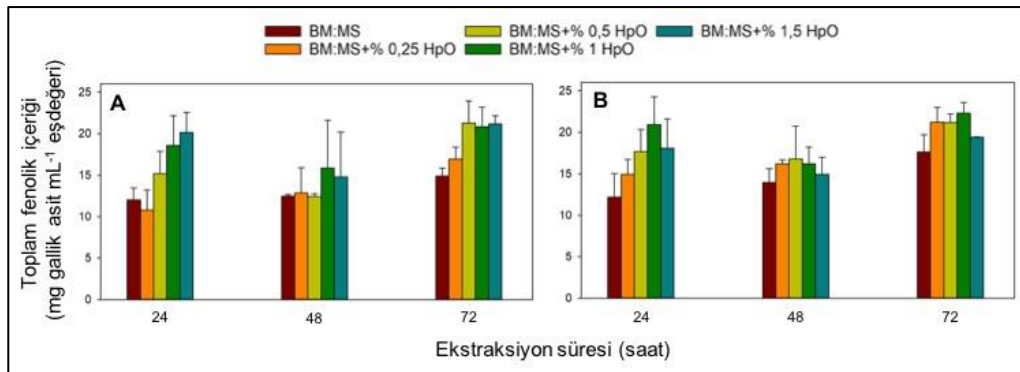
HpG içeren/içermeyen tüm BM:MS biyomalzemelerinde toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiştir (Tablo 4.5). En düşük toplam fenolik madde içeriği BM:MS kontrol gruplarında tayin edilirken en yüksek değerler yüksek konsantrasyonda Hp içeren gruplarda tespit edilmiştir.

Tablo 4.5. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin toplam fenolik madde içeriği.

	*	24h	48h	72h
BM:MS/50:50	Kontrol	12,09±1,43 ^b	12,54±0,16 ^a	14,90±0,98 ^b
	% 0,25 Hp	10,86±2,38 ^c	12,92±3,03 ^a	16,99±1,42 ^{ab}
	% 0,5 Hp	15,23±2,66 ^{abc}	17,83±7,61 ^a	21,31±2,63 ^a
	% 1 Hp	16,78±3,88 ^{ab}	13,44±5,86 ^a	19,16±3,06 ^a
	% 1,5 Hp	16,94±4,95 ^a	12,49±5,49 ^a	18,78±3,52 ^a
BM:MS/60:40	Kontrol	12,22±2,85 ^a	13,97±1,67 ^a	17,67±2,04 ^b
	% 0,25 Hp	13,49±2,57 ^a	16,23±0,50 ^a	21,23±1,81 ^{ab}
	% 0,5 Hp	15,88±3,37 ^a	16,83±3,91 ^a	19,76±2,22 ^{ab}
	% 1 Hp	17,43±5,69 ^a	16,26±1,99 ^a	22,31±1,26 ^a
	% 1,5 Hp	13,76±6,81 ^a	13,84±2,32 ^a	19,41±0,08 ^{ab}

*Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplar gentamisin (10 µg ml⁻¹) içermektedir. Tüm değerler üç bağımsız deney sonuçlarının aritmetik ortalaması olarak mg gallik asit ml⁻¹ eşdeğeri cinsinden verilmiş olup, ± standart sapma değerleriyle birlikte ifade edilmiştir. Harfler grup içerisindeki farkları göstermektedir (p<0,05).

Antioksidan madde içeriği sonuçlarına benzer şekilde, biyomalzemelerin toplam fenolik madde içerikleri Hp oranındaki artışa doğru orantılı olarak artış sergilemiştir. En yüksek değerler 72 saat ekstraksiyona tabi tutulan örneklerde tespit edilmiştir. Ancak, farklı BM:MS oranlarının toplam fenolik madde içeriğini kayda değer oranda değiştirmedeği gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının ekstraksiyon süresine bağlı toplam fenolik madde içeriği. A) BM:MS/50:50, B) BM:MS/60:40 filmler.

Tamamen doğal bileşenler kullanılarak üretilen HpG içeren/içermeyen tüm biyomalzemelerin toplam fenolik madde içerdiği ve antioksidan özellik sergilediği gözlenmiştir. Bamya bitkisinin toplam fenolik maddece zengin olup antioksidan aktivite sergilediği 5 farklı bamya türü üzerinde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [84]. Benzer şekilde zengin fenolik madde içeriğine ve kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen [54, 58, 85] ve eski çağlardan beri yara tedavisinde kullanılan sarı kantaron yağı [86–88] ilavesi beklentimizi karşılayarak ürettiğimiz BM:MS biyomalzemelerinin antioksidan kapasitesine ve toplam fenolik madde içeriğine katkı sağlamıştır.

4.3.3 Antibakteriyel Aktivite Tayini

Disk difüzyon testi kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, herhangi bir aktif bileşen içermeyen kontrol grubu BM:MS biyomalzemelerinde antibakteriyel aktivite gözlenmez iken, HpG içeren tüm BM:MS biyomalzemelerinde her iki test bakterisi (*E. coli* ve *S. aureus*) üzerinde de kuvvetli antibakteriyel aktivite görülmüştür. Biyomalzemelerin antibakteriyel aktiviteleri zon çapı mm cinsinden Tablo 4.6'da sunulmuştur.

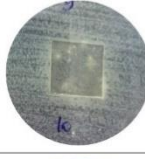
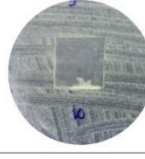
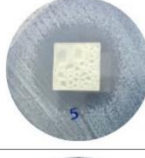
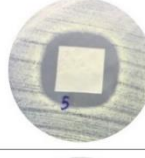
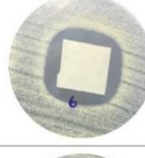
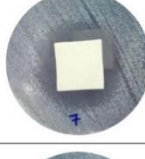
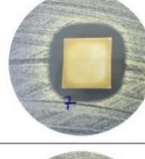
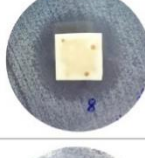
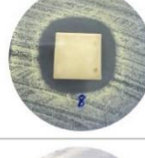
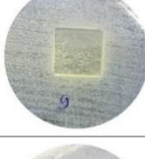
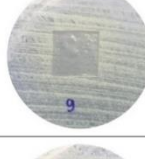
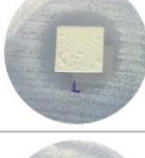
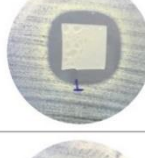
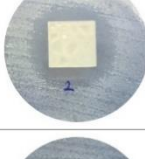
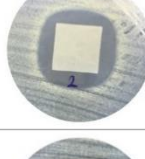
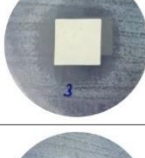
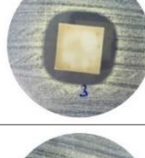
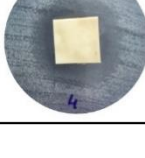
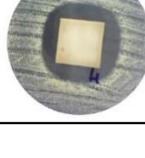
Tablo 4.6. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinin disk difüzyon testine bağlı antibakteriyel test sonuçları.

		Zon çapı (mm)	
BM:MS 50:50	*	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	Kontrol film	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
	0,25 Hp	22,81±1,35 ^a	20,59±2,08 ^a
	0,5 Hp	23,40±1,11 ^a	21,04±1,71 ^a
	1 Hp	24,23±1,76 ^a	22,64±2,56 ^a
	1,5 Hp	24,87±1,24 ^a	22,38±2,53 ^a
BM:MS 60:40	Kontrol film	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
	0,25 Hp	21,38±1,10 ^a	20,67±0,58 ^a
	0,5 Hp	21,25±1,65 ^a	20,87±1,66 ^a
	1 Hp	21,67±1,53 ^a	20,23±1,73 ^a
	1,5 Hp	21,86±1,94 ^a	20,59±1,98 ^a
*Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplar gentamisin (10 µg ml ⁻¹) içermektedir. Antibakteriyel aktivite değerleri zon çapı cinsinden (mm) üç bağımsız deney sonuçlarının aritmetik ortalaması olarak ± standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir. Harfler grup içerisindeki			

farkları göstermektedir ($p<0,05$).

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite testlerinde, zon çapı büyüdükçe test edilen malzemenin daha yüksek antibakteriyel özellik sergilediği yorumu yapılmaktadır. Her grup kendi içerisinde benzer antibakteriyel aktivite sergilerken, özellikle *E. coli* bakterisi üzerinde daha geniş zon çaplarının gözlemlendiği HpG içeren BM:MS 50:50 biyomalzemelerinde aynı oranda HpG içeren BM:MS 60:40 biyomalzemelerine oranla daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur. Ayrıca, farklı oranlarda BM:MS ve Hp içerecek şekilde hazırlanan tüm biyomalzeme gruplarının *E. coli* bakterisi bulunan plakalarda daha büyük çapta zonlar oluşturduğu, dolayısıyla aktif ajan içeren biyomalzemelerin *E. coli* bakterisi üzerindeki antibakteriyel aktivitelerinin *S. aureus* bakterisine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.11).

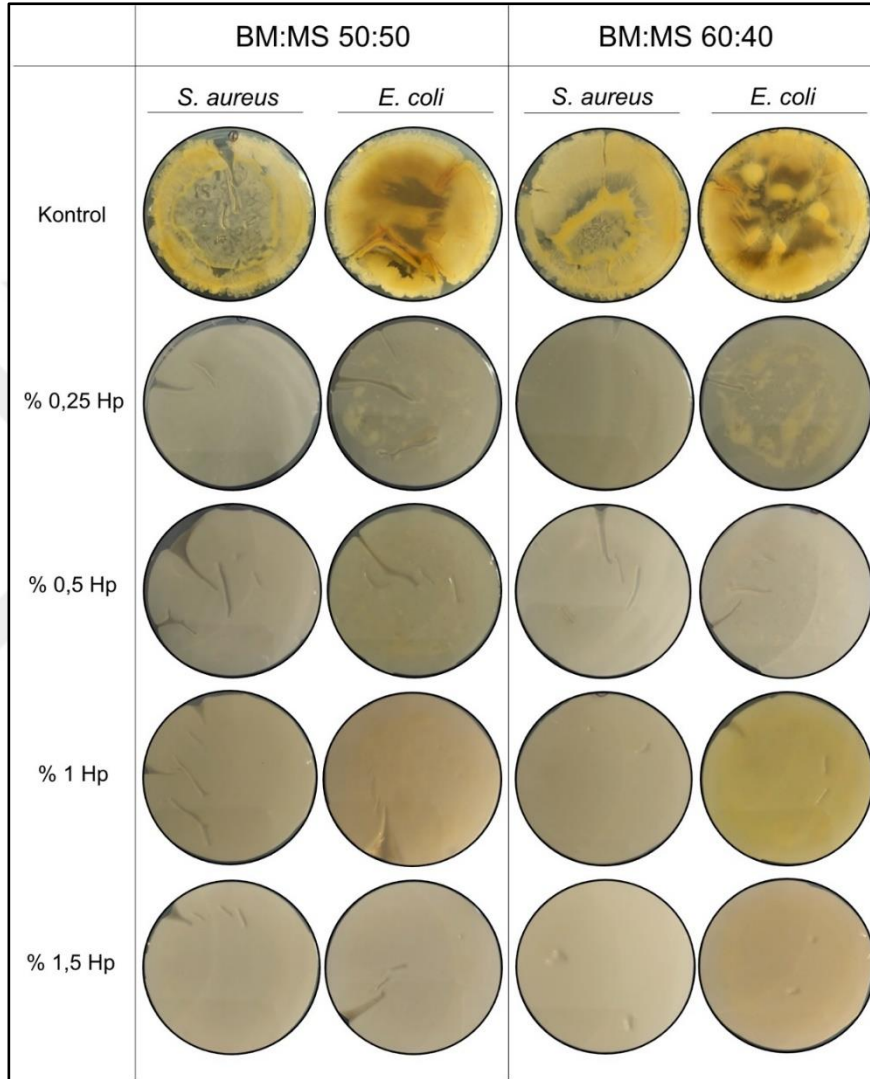
Gentamisin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki gösteren, suda kolayca çözünen, geniş spektrumlu kuvvetli bir antibiyotiktir [67]. Hp ilavesinin antibakteriyel aktiviteye kayda değer bir katkı sağlayamaması, BM:MS/HpG biyomalzemelerine antibakteriyel etkiyi sağlayan temel bileşenin gentamisin olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, tüm grupların kendi içerisinde istatistiksel ($p<0,05$) olarak benzer aktivite sergilemesi, antibakteriyel özelliğin Hp'den ziyade (kontrol grubu hariç) tüm gruplarda eşit miktarda bulunan gentamisin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) antibiyotiğinden kaynaklandığı sonucunu desteklemektedir.

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
BM/MC 50:50	Kontrol film		
	%0,25 Hp		
	%0,5 Hp		
	%1 Hp		
	%1,5 Hp		
BM/MC 60:40	Kontrol film		
	%0,25 Hp		
	%0,5 Hp		
	%1 Hp		
	%1,5 Hp		

Şekil 4.11. Disk difüzyon testine bağlı antibakteriyel aktivite tayini. Kontrol grubu hariç tüm biyomalzemeler gentamisin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) içermektedir.

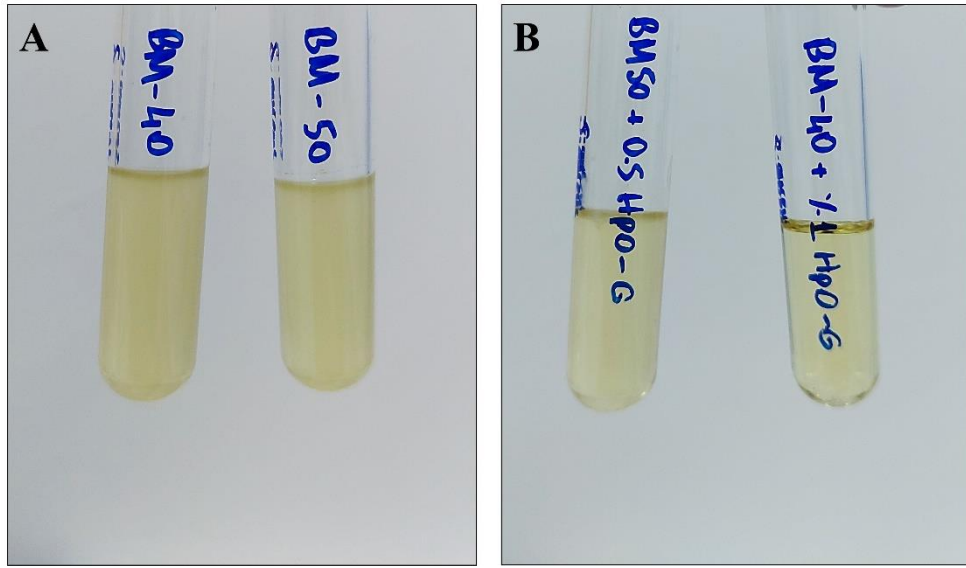
4.3.4 Bakteri Geçiş Testi

Bakteri geçiş testi sonuçları antibakteriyel test sonuçlarını destekler nitelikte olup, herhangi bir aktif ajan içermeyen BM:MS kontrol grubu biyomalzemelerinde agar yüzeyinde yoğun bakteri büyümesi görülürken, özellikle yüksek HpG içeren BM:MS biyomalzemelerinden bakteri geçişi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HpG içeren BM:MS biyomalzemelerinden bakteri geçiş testi. Kontrol grubu hariç tüm biyomalzemeler gentamisin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) içermektedir.

Sadece yüzeyine *E. coli* yayılan düşük Hp konsantrasyonları (%0,25 ve %0,5 Hp) içeren biyomalzemelerden çok az miktarda bakteri geçişi gözlenirse de kontrol grubu dışındaki tüm HpG içeren BM:MS biyomalzemelerinden *S. aureus* geçişi görülmemiştir. Sonuçları desteklemek amacıyla yüzeylerden örnek alınarak sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 24 saat sonra incelenen sonuçlarda kontrol grupları (Şekil 4.13. A) hariç HpG içeren BM:MS örneklerinde (Şekil 4.13. B) bakteri büyümesi görülmemiştir.



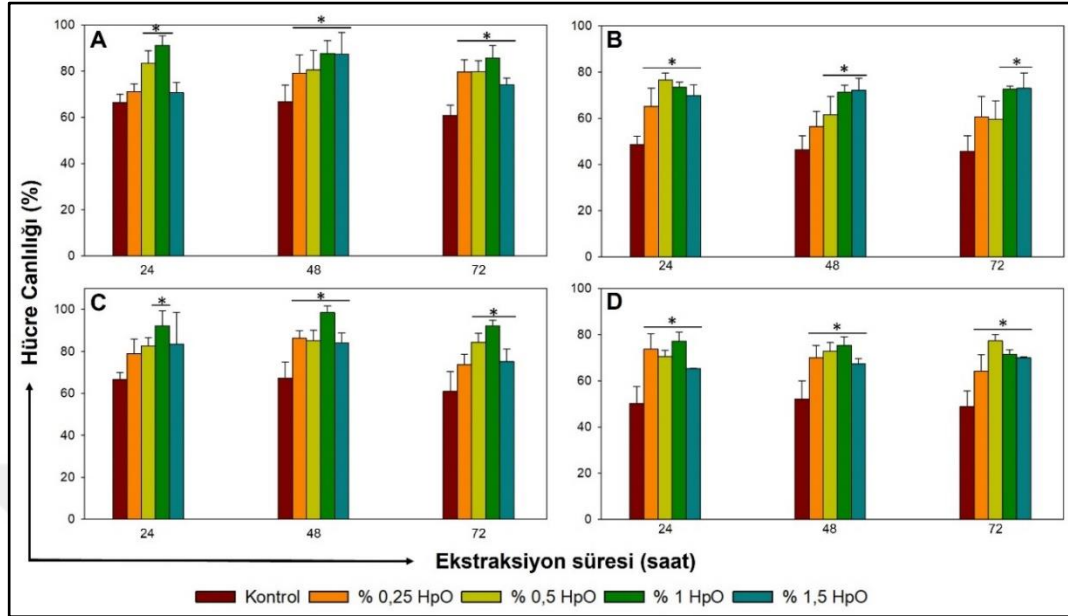
Şekil 4.13. Bakteri geçiş testi sonrasında alınan örneklerin incelenmesi;
A) kontrol grupları ve B) HpG içeren gruplar.

Genel olarak HpG içeren biyomalzemelerin aktif bileşen içeriğinin bakteri geçişini engellemede önemli bir rol oynadığı söylenebilmektedir. Neredeyse tüm Hp konsantrasyonlarında bakteri geçişi kayda değer oranda az/hiç gözlenmemesinden dolayı, gentamisin antibiyotiklerinin bakteri geçişinde görev alan temel etken ajan olduğu sonucuna varılmaktadır.

4.3.5. MTT Canlılık Testi

Hücre proliferasyonuna dayalı sitotoksosite analizi sonucuna göre, özellikle HpG ilave edilmiş BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının BJ insan derisi hücre canlılığını kayda değer oranda etkilemediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.14). MTT testi ile yapılan analizlerde 24 saatlik inkübasyon sonunda BM:MS kontrol gruplarındaki

canlılık %70 seviyesinde iken Hp ilavesiyle bu oranın %80-90 seviyesine çıktığı görülmektedir (Şekil 4.14. A ve C).



Şekil 4.14. BM:MS biyomalzeme ekstraktlarının sitotoksosite grafikleri. A) BM:MS 50:50 24 saat, B) BM:MS 50:50 48 saat, C) BM:MS 60:40 24 saat, D) BM:MS 60:40 48 saat inkübasyon analizi. Kontrol grubu hariç tüm biyomalzemeler gentamisin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) içermektedir. * işareti grup içerisinde kontrol grubundan farklı olan uygulama gruplarını ifade etmek için kullanılmıştır ($p < 0,05$).

Farklı inkübasyon süreleri (24-48-72 saat) sonunda elde edilen biyomalzeme ekstraktlarında benzer canlılık oranları gözlenmiştir. Ancak, MTT testinde 48 saatlik inkübasyonlarda tüm gruplardaki hücre canlılıklarında %10-15 seviyesinde düşüş görülmüştür (Şekil 4.14. B ve D). Sonuç olarak tüm inkübasyon dilimlerinde HpG katkılı BM:MS biyomalzeme ekstraktlarındaki hücre canlılıkları aktif ajan içermeyen BM:MS kontrol gruplarına oranla daha yüksektir.

4.3.6. Çizik Testi

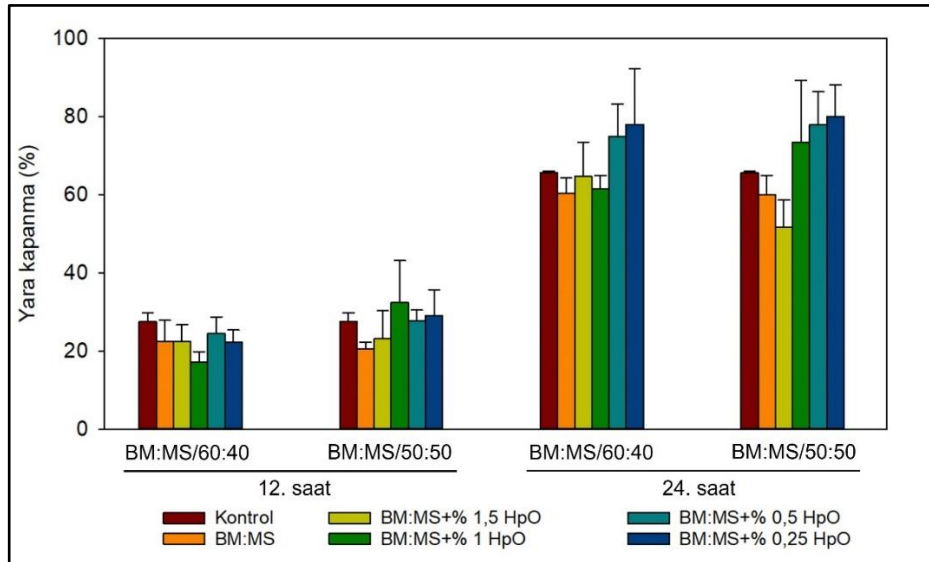
in vitro çizik testi sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon sonunda özellikle düşük Hp konsantrasyonlarında (%0,25 ve %0,5) yara kapanma hızının BM:MS kontrol grubuna göre biraz daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.15).

Tablo 4.7. HpG içeren/içermeyen BM:MS film ekstraktlarının yara kapanma hızı üzerine etkisi.

	*	Yara Kapanma (%)	
		12h	24h
BM:MS/50:50	Kontrol	22,55±5,31	60,33±4,00
	% 0,25 HpO	22,29±3,09	77,98±14,29
	% 0,5 HpO	24,51±4,19	74,87±8,31
	% 1 HpO	17,12±2,71	61,61±3,25
	% 1,5 HpO	22,42±4,29	64,67±8,82
BM:MS/60:40	Kontrol	20,50±1,78	60,08±4,89
	% 0,25 HpO	29,07±6,67	79,94±8,21
	% 0,5 HpO	27,71±2,77	77,90±8,48
	% 1 HpO	32,38±10,74	73,41±15,81
	% 1,5 HpO	23,19±7,18	51,75±6,89

*Kontrol grubu yalnızca belirtilen oranlarda BM ve MS içermektedir. Kontrol grupları hariç, diğer tüm gruplarda 10 µg/ml Gentamisin bulunmaktadır. Tüm değerler üç bağımsız deney sonuçlarının aritmetik ortalaması olup, ± standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

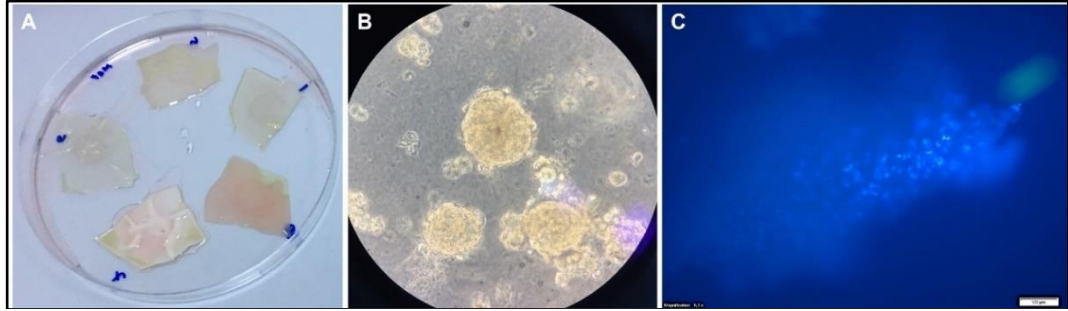
Özellikle HpG içeren BM:MS biyomalzemeleri hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermemiş ve çizik testinde yara kapanma sürecini hızlandırmıştır. Literatürde doğal ajanlar olan banya ve Hp'nin proliferatif etkisi bilinmektedir [64, 89].



Şekil 4.15. HpG içeren/içermeyen BM:MS film ekstraktlarının yara kapanma hızı üzerine etkisi. Kontrol grubu hariç tüm filmler gentamisin (10 µg ml⁻¹) içermektedir.

4.3.7 *in vitro* Hücre Tutunma Testi

in vitro hücre tutunma testinde BJ hücreleri HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemeler üzerinde 3 gün süreyle inkübe edilerek büyütülmüş ve inkübasyon süresi sonunda DAPI/phalloidin boyaları ile boyama protokolü uygulanmıştır. Bu protokolde biyomalzemeler toplamda 6 kez PBS ile yıkanmış, bir kez %0,1 Triton 100x ve bir kez de DAPI/phalloidin boya karışımı ile muamele edilmiştir. Tüm bu boyama ve yıkama işlemleri biyomalzemelerin yüzeyinde ciddi aşınmalara sebep olmuştur (Şekil 4.16A). Bu aşınmanın bir sonucu olarak, floresan mikroskobu analizinde biyomalzeme yüzeyinde tutunmuş hücreler gözlenememiştir. Ancak, beklentimiz dışında biyomalzeme üzerinde hücre kümelerinin (sferoid) oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.16B).



Şekil 4.16. HpG içeren/içermeyen BM:MS biyomalzemelerinde *in vitro* hücre tutunma testi. A) DAPI phalloidin boyası ile boyanan biyomalzemeler, B) Biyomalzeme yüzeyinde oluşan hücre kümeleri, C) Floresan mikroskobu görüntüsü.

Boyama ve yıkama aşamalarında bu hücre kümelerinin çoğu biyomalzeme yüzeyinden akıp gitse de floresan mikroskobu analizlerinde çekirdekleri DAPI ile boyanmış üç boyutlu bir hücre kümesinin fotoğrafı çekilebilmiştir (Şekil 4.16C). Özellikle yüksek hidrofobik yüzeylerde hücre kümelerinin oluştuğu literatürde sıklıkla yer almaktadır [90]. Hücre kümelerinde büyüyen hücreler yüzeye yapışarak büyüyen hücrelerden farklı bir morfolojiye sahip olup, kültür kabında kültüre edilen hücreler gibi klasik hücre morfolojisi yerine, daha ziyade küresel bir yapı sergilemektedirler. Bu sebeple, phalloidin boyamasından verimli sonuç alınamadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, ürettiğimiz biyomalzeme yüzeylerinde yüzeye yapışarak büyüyen hücrelerden ziyade hücre kümeleri gözlenmiştir. Biyomalzeme yüzeyinde

büyüeyebilen bu canlı hücre kümeleri biyomalzemelerin hücrelere sitotoksik etki göstermediğinin kanıtı olup, elde edilen bulgular MTT canlılık testi sonuçları ile uyumludur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışma için, ilk defa bamya müsilajı ve metil selülozdan kompozit bir yara örtü malzemesi (BM:MS) geliştirilmiş ve üretilen biyomalzeme sarı kantaron yağı (Hp) ve gentamisin (G) ilavesi ile fonksiyonel hale getirilmiştir.
2. Literatürde belirtilen 0,05-0,1 mm aralığında kalınlıklara sahip biyomalzemeler üretilmiştir. Hp içermeyen BM:MS film kalınlıkları 0,06 mm olarak ölçülürken, en yüksek Hp konsantrasyonunda (%1,5) kalınlık 0,1 mm olarak ölçülmüştür.
3. FTIR analizi sonuçlarında 1700, 2100, 2300 cm^{-1} olarak gözlenen Hp yağına özgü pikler, HpG katkılı filmlerde açık bir şekilde gözlenmiştir.
4. SEM analizi sonuçlarına göre, Hp içermeyen filmlerin yüzeyi 1.000x büyütmede porsuz olarak görülürken, Hp ilavesi ile filmlerin yüzeyinde 1,4-2,2 μm aralığında porlar görülmüştür.
5. Üretilen biyomalzemelerin yüzey temas açıları 70-110° aralığında bulunmuştur. Hp içermeyen kontrol gruplarının yüzey temas açıları (97-110°) ideal olan 50-90° aralığından daha yüksek ölçülse de %0,25'in üzerinde Hp içeren filmlerin yüzey temas açıları 70-90° aralığındadır. Bu sonuçlardan hareketle, Hp ilavesi ile yüzey hidrofobisitesinin azaldığı ve bu durumun por çaplarındaki artış ile alakalı olduğu belirlenmiştir.
6. BM:MS biyomalzemelerinin çekme mukavemetleri literatürde verilen aralığa (5-50 MPa) uyacak şekilde 9,1-27,4 MPa aralığında bulunmuştur.
7. İdeal olarak kabul edilen su buharı geçiş hızı (0,90-28,90 $\text{g/dm}^2/\text{gün}$), Hp içermeyen BM:MS filmleri için 2,4-4,8 $\text{g/dm}^2/\text{gün}$ aralığında bulunmuştur. Ayrıca, daha büyük por çapına sahip olan BM:MS 60:40 filmlerindeki su buharı geçiş hızı BM:MS 50:50 filmlerine göre daha yüksek bulunmuştur.

8. Şişme kapasitesi %100-300 aralığında olması beklenen biyomalzemelerin, su tutma kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu ve 1 dakika içerisinde %300-500 kat arasında şişme gösterdikleri belirlenmiştir. İdeal olarak aralıktan daha yüksek bir sonuç elde edilse su tutma kapasitesi iyi bir yara örtü malzemesinde aranan bir özelliktir.
9. Hidrolitik bozunma testinde, en kısa inkübasyon süresinden (1 dakika) sonra %22-30 aralığında hidrolitik bozunma görülürken, en uzun inkübasyon süresi (30 dakika) sonunda bozunma değeri %27-39 aralığında bulunmuştur. Filmlerin %50 veya daha az çözünürlükte olmasını beklenmekteydi, sonuçlar buna uygun olsa da %27-39 aralığındaki bozunma değeri hızlı bir bozunmaya işaret etmektedir. Filmlerin su ortamındaki dayanıklılığı üzerine yapılan araştırmamız sonucunda farklı bir yöntem ile suda çözünmeyen filmlerin üretildiği görülmüştür [91]. İlerleyen zamanlarda bu yöntem üzerine çalışmalar yapılacaktır.
10. Tamamen doğal bileşenler içeren BM:MS/HpG biyomalzemelerinin fenolik madde içerdiği ve antioksidan özellik sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle Hp konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hem fenolik madde hem de antioksidan özelliğinde artış görülmüştür.
11. Antibakteriyel özelliği tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen disk difüzyon testinde, aktif ajanları (HpG) içermeyen biyomalzemelerde zon oluşumu gözlenmezken HpG içeren tüm biyomalzemelerde belirgin zonlar oluşmuştur. ImageJ programında yapılan analizler sonucunda, *S. aureus* için 2,0-2,2 cm ve *E. coli* için 2,1-2,4 cm aralığında zonlar ölçülmüştür.
12. Üretilen biyomalzemelerden HpG içermeyenlerin bakteri geçişine izin verdiği görülmüştür. Diğer yandan, %0,25'in üzerinde HpG içeren tüm filmlerden bakteri geçişi gözlenmemesi ve disk difüzyon testi sonuçları

doğrultusunda BM:MS/HpG filmlerinin kuvvetli antibakteriyel özellik sergilediğine işaret etmektedir

13. Biyomalzemelerin sitotoksitesini belirlemek için yapılan MTT canlılık testi sonuçlarında, HpG içeren filmlerin tümünde %70'in üzerinde hücre canlılığı gözlenmiştir.
14. *in vitro* yara kapama sonuçlarına göre Hp içeren BM:MS film ekstraktlarının yara kapama hızının Hp içermeyen kontrol gruplarına göre daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, Hp ilavesi ile filmlerin hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırarak yara iyileşme sürecini hızlandırıcı bir etkiye sahip olabileceği söylenebilmektedir.
15. Sonuç olarak, doğal bileşenler sayesinde proliferatif ve antibakteriyel özellikler kazandırılan bir biyomalzeme üretimi gerçekleştirilmiştir.
16. İnce ve esnek yapıda olan biyomalzemelerin mekanik mukavemetinin yüksek olması, mikro boyutlu gözenekli yapısı ile su buharı geçişine izin vermesi, yara bölgesinde oluşan eksüdayı yüksek oranda tutabilme kapasitesi sergilemesi gibi üstün özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.
17. Bu özellikleri sayesinde geliştirdiğimiz kompozit filmin iyi bir yara örtü malzemesi olabilme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.
18. Yara örtü malzemesi olması dışında farklı biyoteknolojik uygulamalar için de kullanılabilecek birçok fonksiyona sahip bir biyomalzeme geliştirilmiştir.
19. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, geliştirmiş olduğumuz BM:MS/HpG biyomalzemesinin *in vivo* yara modeli üzerinde denenmesi konulu yeni projeler hazırlanması üzerine olan motivasyonumuzu artırmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Yadav, S., Mishra, A., P., Kumar, S., Negi, A., Asha, Maurya, V., K. Chapter 8- Herbal wound healing agents, Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders. Ed.: Chukwuebuka Egbuna, Abhay Prakash Mishra, Megh R. Goyal, Academic Press, Cambridge, ABD, 2021, 169-184 s.
- [2] Çobanoğlu, A., Şendir, M. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on wound healing. Advances in Complementary & Alternative Medicine. 2018, 2(5), 1-2.
- [3] Bölgen, N., Demir, D., Yalçın, M.S., Özdemir, S. Development of *Hypericum perforatum* oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. International Journal of Biological Macromolecules. 2020, 161, 1581–1590.
- [4] Güneş, S., Tihminlioğlu, F. *Hypericum perforatum* incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material. International Journal of Biological Macromolecules. 2017, 102, 933–943.
- [5] Thu, H., Zulfakar, M., H., Ng, S. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. International Journal of Pharmaceutics. 2012, 434(1-2), 375-383.
- [6] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P.T., Nair, S.V., Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances. 2011, 29(3), 322-337.
- [7] Vardar, U.S., Özcan, Y., Özmen, D., Toker, Ö.S. Bitki tohum müsilağları ve gıdalarda kullanımı. Gıda. 2021, 46(2), 269-278.
- [8] Glaue Öncü, Ş. Bamya Müsilağının Termo-Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, 2018, 96 s. (Doktora Tezi).
- [9] Çalışır, S., Özcan, M., Haciseferoğulları, H., Yıldız, M.U. A study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. Journal of Food Engineering. 2005, 68(1), 73-78.
- [10] Santos, I.F., Santos, A.M.P., Barbosa, U.A., Lima, J.S., Santos, D.C., Matos, G.D. Multivariate analysis of the mineral content of raw and cooked okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Microchemical Journal. 2013, 110, 439-443.
- [11] Mohammadi, S., Pourakbar, L., Moghaddam, S.S., Popović-Djordjević, J. The effect of EDTA and citric acid on biochemical processes and changes in phenolic compounds profile of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under mercury stress. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021, 208, 111607.
- [12] Cotrim, M., Mottin, A.C. and Ayres, E. Preparation and Characterization of Okra Mucilage (*Abelmoschus esculentus*) Edible Films. Macromolecular.

Symposia. 2016, 367(1), 90-100.

- [13] Araújo, A., Galvão, A., Filho, C.S., Mendes, F., Oliveira, M., Barbosa, F., Filho, M.S., Bastos, M. Okra mucilage and corn starch bio-based film to be applied in food. *Polymer Testing*. 2018, 71, 352-361.
- [14] López de Dicastillo, C., Bustos, F., Guarda, A., Galotto, M.J. Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*. 2016, 60, 335-344.
- [15] Liu, H., Liu, C., Peng, S., Pan, B., Lu, C. Effect of polyethyleneimine modified graphene on the mechanical and water vapor barrier properties of methyl cellulose composite films. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 182, 52-60.
- [16] Coughlin, M.L., Liberman, L., Ertem, S.P., Edmund, J., Bates, F.S., Lodge, T.P. Methyl cellulose solutions and gels: fibril formation and gelation properties. *Progress in Polymer Science*. 2021, 112, 101324.
- [17] Atta, A., Abdelhamied, M.M., Abdelreheem, A.M., Althubiti, N.A. Effects of polyaniline and silver nanoparticles on the structural characteristics and electrical properties of methylcellulose polymeric films. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022, 135, 109085.
- [18] Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D.C., Gil, M.H., Mendes, A., Bártolo, P. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 52, 221-230.
- [19] Uçkaya, F., Kıvrak, Ş., Demir, N., Demir, Y. Yüksek Etkinliğe Sahip Kantaron Yağının Eldesi ve Saklama Koşullarının Optimize Edilmesi. 3. Kozmetik Kongresi, 15-17 Şubat, 2013, Antalya.
- [20] Altan, A., Damlar, İ., Aras, M.H., Alpaslan, C. Sarı Kantaronun (*Hypericum perforatum*) Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2015, 24(4), 578-591.
- [21] Eğri, Ö., Erdemir, N. Production of *Hypericum perforatum* oil loaded membranes for wound dressing material and *in vitro* tests. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019, 47(1), 1404-1415.
- [22] Yu, R., Zhang, H., Guo, B. Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering. *Nano-Micro Letters*. 2022, 14(1), 2-46.
- [23] Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., d'Ayala, G.G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2020, 233, 115839.
- [24] Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H.,

- Amrati, F., Lyoussi, B., Derwich, E. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022, 298, 115663.
- [25] Aslam, Z., Roome, T., Razzak, A., Aslam, S.M., Zaidi, M., B., Kanwal, T., Sikandar, B., Bertino, M.F., Rehman, K., Shah, M.R. Investigation of wound healing potential of photo-active curcumin-ZnO-nanoconjugates in excisional wound model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022, 39, 102956.
- [26] Schoukens, G. Chapter 5 - Bioactive dressings to promote wound healing, *Advanced Textiles for Wound Care*. Ed.: Subbiyan Rajendran, Woodhead Publishing, Cambridge, ABD, 2019, 135-167 s.
- [27] Li, D., Wu, N. Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2022, 187, 109882.
- [28] Sainani, J. Virginia Commonwealth University, Journal of Comprehensible Results; <http://www.people.vcu.edu/~sainanij/Wijesinghe-2014/index.html> Son erişim tarihi: 28.12.2022
- [29] Fan, C., Xu, Q., Hao, R., Wang, C., Que, Y., Chen, Y., Yang, C., Chang, J. Multi-functional wound dressings based on silicate bioactive materials. *Biomaterials*. 2022, 287, 121652.
- [30] Naseri, E., Ahmadi, A. A review on wound dressings: Antimicrobial agents, biomaterials, fabrication techniques, and stimuli-responsive drug release. *European Polymer Journal*. 2022, 173, 111293.
- [31] Peng, W., Li, D., Dai, K., Wang, Y., Song, P., Li, H., Tang, P., Zhang, Z., Li, Z., Zhou, Y., Zhou, C. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, 208, 400-408.
- [32] Parham, S., Kharazi, A.Z. Cellulosic textile/clove nanocomposite as an antimicrobial wound dressing: *in vitro* and *in vivo* study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022, 217, 112659.
- [33] Han, Z., Dong, L., Li, A., Li, Z., Fu, L., Zhang, Z., Li, X., Li, X. Efficient angiogenesis-based wound healing through hydrogel dressing with extracellular vesicles release. *Materials Today Bio*. 2022, 16, 100427.
- [34] Echavarría, J.O., Gómez Vanegas, N.A., Ossa Orozco, C.P. Chitosan/carboxymethyl cellulose wound dressings supplemented with biologically synthesized silver nanoparticles from the ligninolytic fungus *Anamorphous Bjerkandera sp.* R1. *Heliyon*. 2022, 8(9), 10258.
- [35] Ji, M., Li, J., Wang, Y., Li, F., Man, J., Li, J., Zhang, C., Peng, S., Wang, S. Advances in chitosan-based wound dressings: Modifications, fabrications, applications and prospects. *Carbohydrate Polymers*. 2022, 297, 120058.

- [36] Üner Bahar, D. Yara İyileştirme Özellikli Polimerlerin Yara Örtülerinde Kullanımı. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2021, 13 , 157-181.
- [37] Nikpayam, O., Safaei, E., Bahreini, N., Saghafi-Asl, M. The effects of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) products on glycemic control and lipid profile: A comprehensive systematic review. Journal of Functional Foods. 2021, 87, 104795.
- [38] Mohammadi, H., Kamkar, A., Misaghi, A. Nanocomposite films based on CMC, okra mucilage and ZnO nanoparticles: Physico mechanical and antibacterial properties. Carbohydrate Polymers. 2018, 181, 351-357.
- [39] Luthfi, M., Juliastuti, W.S., Risky, Y.A., Wijayanti, E.H., Rachmawati, A.E., Asyhari, N.P.O. Expression of fibroblast cells after extraction of Wistar rat teeth after topical application of okra fruit (*Abelmoschus esculentus*) gel. Infectious Disease Reports. 2020, 12(s1), 8726.
- [40] Aleissa, M.S., AL-Zharani, M., Alneghery, L.M., Hasnain, M.S., Almutairi, B., Ali, D., Alarifi, S., Alkahtani, S. Comparative study of the anti-diabetic effect of mucilage and seed extract of *Abelmoschus esculentus* against streptozotocin-induced diabetes in rat model. Journal of King Saud University - Science. 2022, 34(8), 102297.
- [41] Sipahi, H., Orak, D., Reis, R., Yalman, K., Şenol, O., Palabıyık-Yücelik, S.S., Deniz, İ., Algül, D., Güzelmeriç, E., Çelep, M.E., Argın, S., Özkan, F., Halıcı, Z., Aydın, A., Yeşilada, E. A comprehensive study to evaluate the wound healing potential of okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit. Journal of Ethnopharmacology. 2022, 287, 114843.
- [42] Smith, P., Polomski, R.F., Shaughnessy, D. Okra. Clemson Üniversitesi. 2020. <https://hgic.clemson.edu/factsheet/okra/> Son erişim tarihi: 30.12.2022
- [43] Nath, H., Saikia, A., Goutam, P.J., Saikia, B.K., Saikia, N. Removal of methylene blue from water using okra (*Abelmoschus esculentus* L.) mucilage modified biochar. Bioresource Technology Reports. 2021, 14, 100689.
- [44] Zaharuddin, N.D., Noordin, M.I., Kadivar, A. The use of *Hibiscus esculentus* (Okra) gum in sustaining the release of propranolol hydrochloride in a solid oral dosage form. Biomed Research International. 2014, 2014, 735891.
- [45] Ghorı, M.U., Alba, K., Smith, A.M., Conway, B.R., Kontogiorgos, V. Okra extracts in pharmaceutical and food applications. Food Hydrocolloids. 2014, 42(3), 342-347.
- [46] Archana, G., Sabina, K., Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Fayidh, M.A., Babu, P., Sivarajan, M., Sukumar, M. Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. Carbohydrate Polymers. 2013, 98(1), 89-94.

- [47] Ameena, K., Dilip, C., Saraswathi, R., Krishnan, P.N., Sankar, C., Simi, S.P. Isolation of the mucilages from *Hibiscus rosasinensis* linn. and Okra (*Abelmoschus esculentus* linn.) and studies of the binding effects of the mucilages. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010, 3(7), 539-543.
- [48] Lee, C.S., Chong, M.F., Robinson, J., Binner, E. Optimisation of extraction and sludge dewatering efficiencies of bio-flocculants extracted from *Abelmoschus esculentus* (okra). Journal of Environmental Management. 2015, 157, 320-325.
- [49] Zhou, L., Wang, Y. Physical and antimicrobial properties of zein and methyl cellulose composite films with plasticizers of oleic acid and polyethylene glycol. LWT. 2021, 140, 110811.
- [50] Manisha, U.K., Ghosh, T., Apoorva, V.P., Divya, B., Swathy, S.P., Paul, A., Basavraj, B.V. Isolation, phytochemical elucidation, and wound healing potential of chitosan-based film loaded with *Tagetes erecta*. Materials Today: Proceedings. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.225>
- [51] Şengün, D.N., Karaca, İ.R., Saraç, N., Uğur, A., Fırat, A., Kaymaz, F.F., Öztürk, H.S. Evaluation of the chemopreventive effects of *Hypericum perforatum* L on DMBA-applied rat oral mucosa. Archives of Oral Biology. 2021, 127, 105139.
- [52] Bayram, S., Kutlu, N., Gerçek, Y.C., Çelik, S., Bayram, N.E. Bioactive compounds of deep eutectic solvents extracts of *Hypericum perforatum* L.: Polyphenolic- organic acid profile by LC-MS/MS and pharmaceutical activity. Food Bioscience. 2022, 49, 101926.
- [53] Bakırcı, Ç.M., Aydın, R., Ersoy, E. Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*). 2022. <https://evrimagaci.org/sari-kantaron-hypericum-perforatum-11306> Son erişim tarihi: 22.12.2022
- [54] Klemow, K.M., Bartlow, A., Crawford, J., Kocher, N., Shah, J., Ritsick, M. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Ed.: Iris F.F Benzie, Sissi Wachtel-Galor, CRC Press/Taylor & Francis, New York, ABD, 2011.
- [55] Avcı, H., Gergeroğlu, H. Synergistic effects of plant extracts and polymers on structural and antibacterial properties for wound healing. Polymer Bulletin. 2019, 76, 3709–3731.
- [56] Hohmann, M.S.N., Cardoso, R.D.R., Fattori, V., Arakawa, N.S., Tomaz, J.C., Lopes, N.P., Casagrande, R., Verri, W.A. *Hypericum perforatum* Reduces Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. Phytotherapy Research. 2015, 29, 1097–1101.
- [57] Napoli, E., Siracusa, L., Ruberto, G., Carrubba, A., Lazzara, S., Speciale, A., Cimino, F., Saija, A., Cristani, M. Phytochemical profiles, phototoxic and

antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry*. 2018, 152, 162–173.

- [58] Eroğlu, E., Girgin, Ş.N. A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of *in vitro* anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *South African Journal of Botany*. 2021, 139, 6-11.
- [59] Sarrou, E., Giassafaki, L.P., Masuero, D., Perenzoni, D., Vizirianakis, I.S., Irakli, M., Chatzopoulou, P., Martens, S. Metabolomics assisted fingerprint of *Hypericum perforatum* chemotypes and assessment of their cytotoxic activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 114, 325–333.
- [60] Can, O.D., Öztürk, Y., Öztürk, N., Sagratini, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., Maggi, F. Effects of treatment with St. John's Wort on blood glucose levels and pain perceptions of streptozotocin-diabetic rats. *Fitoterapia*. 2011, 82(4), 576-584.
- [61] Ng, Q.X., Venkatanarayanan, N., Ho, C.Y.X. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) in depression: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*. 2017, 210, 211–221.
- [62] Süntar, İ., Küpeli Akkol, E., Keleş, H., Oktem, A., Başer, K.H.C., Yeşilada, E. A novel wound healing ointment: A formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, 134(1), 89-96.
- [63] Prisăcaru, A.I., Andrițoiu, C.V., Andriescu, C., Hăvârneanu, E.C., Popa, M., Motoc, A.G., Sava, A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*. 2013, 54(4), 1053-1059.
- [64] Altan, A., Aras, M.H., Damlar, İ., Gökçe, H., Özcan, O., Alpaslan, C. The effect of *Hypericum perforatum* on wound healing of oral mucosa in diabetic rats. *European Oral Research*. 2018, 52(3), 143-149.
- [65] Memorial Sağlık Grubu. Sarı kantaron nedir? Sarı kantaron yağının faydaları. 2021. <https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberi/sari-kantaron-nedir-sari-kantaron-yaginin-faydalari> Son erişim tarihi: 23.12.2022
- [66] Türe, H. Characterization of hydroxyapatite-containing alginate–gelatin composite films as a potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 123, 878-888.
- [67] Zou, Y., Xie, R., Hu, E., Qian, P., Lu, B., Lan, G., Lu, F. Protein-reduced gold nanoparticles mixed with gentamicin sulfate and loaded into konjac/gelatin sponge heal wounds and kill drug-resistant bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 148, 921–931.
- [68] Kang, S., Wang, H., Xia, L., Chen, M., Li, L., Cheng, J., Li, X., Jiang, S.

Colorimetric film based on polyvinyl alcohol/okra mucilage polysaccharide incorporated with rose anthocyanins for shrimp freshness monitoring. *Carbohydrate Polymers*. 2020, 229, 115402.

- [69] Ma, Y., Liu, K., Lao, L., Li, X., Zhang, Z., Lu, S., Li, Y., Li, Z. A stretchable, self-healing, okra polysaccharide-based hydrogel for fast-response and ultra-sensitive strain sensors. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, 205, 491-499.
- [70] Türe, H., Eroğlu, E., Özen, B., Soyer, F. Physical properties of biopolymers containing natamycin and rosemary extract. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009, 44(2), 402–408.
- [71] Güleken, Z., Depciuch, J., Ege, H., İlbay, G., Kalkandelen, C., Özbeyli, D., Bulut, H., Şener, G., Tarhan, N., Erdem Kuruca, S. Spectrochemical and biochemical assay comparison study of the healing effect of the *Aloe vera* and *Hypericum perforatum* loaded nanofiber dressings on diabetic wound. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021, 254, 119639.
- [72] Kondolot Solak, E., Kaya, S. *Hypericum perforatum* Releasing from Silver Sulphadiazine Loaded Sodium Alginate Membranes. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*. 2020, 2(1), 11-17.
- [73] Fernández, V., Khayet, M. Evaluation of the surface free energy of plant surfaces: Toward standardizing the procedure. *Frontiers in Plant Science*. 2015, 6, 1–11.
- [74] Fernández-Marín, R., Fernandes, S.C.M., Sánchez, M.Á.A., Labidi, J. Halochromic and antioxidant capacity of smart films of chitosan/chitin nanocrystals with curcuma oil and anthocyanins. *Food Hydrocolloids*. 2022, 123, 107119.
- [75] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik Karademir, E., Erçağ, E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2006, 57(5-6), 292–304.
- [76] Uslu, M.E., Erdoğan, I., Bayraktar, O., Ateş, M. Optimization of extraction conditions for active components in *Equisetum arvense* extract. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013, 18(2), 8115–8131.
- [77] Eroğlu, E. A Resveratrol-Loaded Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-Chitosan Based Nanotherapeutic: Characterization and *in vitro* Cytotoxicity Against Prostate Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2021, 21(4), 2090-2098.
- [78] Eroğlu, E., Öksüz, C. Eşek sütü ve bazı bileşenlerinin *in vitro* ortamda antikanser/yara iyileştirme aktivitesinin incelenmesi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2020, 22(2) , 649-659.

- [79] Beigomi, M., Mohsenzadeh, M., Salari, A. Characterization of a novel biodegradable edible film obtained from *Dracocephalum moldavica* seed mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 108, 874-883.
- [80] Draczynski, Z., Kolesinska, B., Latanska, I., Sujka, W. Preparation method of porous dressing materials based on butyric-acetic chitin co-polyesters. *Materials* (Basel, Switzerland). 2018, 11(12), 2359.
- [81] Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. D. O., Flôres, S. H. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 130, 198–205.
- [82] McGaughey, A.L., Karandikar, P., Gupta, M., Childress, A.E. Hydrophobicity versus Pore Size: Polymer Coatings to Improve Membrane Wetting Resistance for Membrane Distillation. *ACS Applied Polymer Material*. 2020, 2(3), 1256-1267.
- [83] Doğan, Z. Nanolif Yara Örtücü Yüzeylerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 2012, 103 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [84] Graham, J.O., Agbenorhevi, J.K., Kpodo, F.M. Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Okra Seeds from Different Genotypes. *American Journal of Food and Nutrition*. 2017, 5(3), 90-94.
- [85] Linde, K. St. John's Wort - An overview. *Forschende Komplementarmedizin*. 2009, 16(3), 146-155.
- [86] Seyhan, N. Evaluation of the Healing Effects of *Hypericum perforatum* and Curcumin on Burn Wounds in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020, 2020, 6462956.
- [87] Han, M.C., Durmuş, A.S., Sağlıyan, A., Günay, C., Özkaraca, M., Kandemir, F.M., Çomaklı, S., Fırat Öztöpalan, D. Effects of *Nigella sativa* and *Hypericum perforatum* on wound healing. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2017, 41, 99-105.
- [88] Nayak, S.B., Işık, K., Marshall, J.R. Wound-Healing Potential of Oil of *Hypericum perforatum* in Excision Wounds of Male Sprague Dawley Rats. *Advances in Wound Care*. 2017, 6(12), 401-406.
- [89] Durazzo, A., Lucarini, M., Novallino, E., Souto, E.B., Daliu, P., Santini, A. *Abelmoschus esculentus* (L.): Bioactive Components' Beneficial Properties-Focused on Antidiabetic Role-For Sustainable Health Applications. *Molecules*. 2019, 24, 38.
- [90] Eroğlu, E. *In vitro* 3D Spheroid Culture Developed on the Parafilm Surface

Using HEK-293 Cells. The Academic Perspective Procedia. 2020, 3(1), 220-227.

- [91] Wang, M., Jia, X., Liu, W., Lin, X. Water insoluble and flexible transparent film based on carboxymethyl cellulose. Carbohydrate Polymers. 2021, 255, 117353.

