

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



**KİTİN NANOKRİSTAL KATKILI PEO VE PVA BAZLI
HİDROJEL NANOKOMPOZİT ANTİBAKTERİYEL YARA
ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ULAŞ KUMRAL

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

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



**KİTİN NANOKRİSTAL KATKILI PEO VE PVA BAZLI
HİDROJEL NANOKOMPOZİT ANTİBAKTERİYEL YARA
ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ULAŞ KUMRAL

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Yasemin TURHAN

Dr. Öğr. Üy. Ümran ALAN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ulaş KUMRAL tarafından hazırlanan “KİTİN NANOKRİSTAL KATKILI PEO ve PVA BAZLI HİDROJEL NANOKOMPOZİT ANTİBAKTERİYEL YARA ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 21.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Serap DOĞAN

Üye
Doç. Dr. Yasemin TURHAN

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ümran ALAN

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018/178 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**KİTİN NANOKRİSTAL KATKILI PEO VE PVA BAZLI HİDROJEL
NANOKOMPOZİT ANTİBAKTERİYEL YARA ÖRTÜ
MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ULAŞ KUMRAL
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. GÖR. MEHMET EMİN DİKEN)
BALIKESİR, HAZİRAN – 2019**

Yara örtü malzemeleri, yarayı nemli tutan, yaradan çıkan fazla sıvıyı absorplayan, oksijen ve su buharı geçirgenliği olan, bakterilere karşı engel oluşturan, antijenik veya toksik olmayan, antibakteriyel, biyouyumlu, ucuz ve kullanımı kolay olan malzemelerdir. Son yıllarda yara örtü malzemeleri enfeksiyon ve yangıyı azaltmak, yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve hastanın hayat kalitesini artırmak amacıyla uzun süreli antibiyotik ve anti-inflamatuvar ilaç salımı yapan sistemler olarak tasarlanmaktadır. Nanokompozit hidrojeller nano boyuttaki takviye edici malzemeler sayesinde geliştirilmiş kimyasal, morfolojik ve mekanik pek çok özelliğe sahiptir. Yapılan çalışmalar kitin nanokristallerin eklenmesi ile hazırlanan nanokompozit hidrojellerin geliştirilmiş su tutma kapasitesi, mekanik dayanım ve biyouyumluluk özelliklerinin yanında uzun süreli ilaç salımına olanak sağladığı ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışması ile hedeflenen kitin nanokristal katkı PVA hidrojel nanokompozitlerin hazırlanması ve yara örtü malzemesi olarak performanslarının belirlenmesidir. Bu amaçla ilk aşamada, kitin nanokristaller hazırlanmıştır. Daha sonra, PEO ve PVA çözeltileri ile birleştirilerek nanokompozit hidrojeller elde edilmiştir. Bu nanokompozit hidrojeller farklı derişimlerde kitin nanokristaller ve farklı derişimlerde PEO/PVA çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kitin nanokristal katkı PEO/PVA bazlı nanokompozit hidrojellerin karakterizasyonu FTIR, Optik Temas Açısı ve SEM ile incelenmiştir. Son olarak da hazırlanan nanokompozit hidrojellerin antibakteriyel özellikleri incelenmiş ve çalışılan bakterilere karşı yüksek antibakteriyel özellik göstermişlerdir. Yapılan MTS deneylerinde hücre canlılığını yüksek oranda koruduğunu göstermiştir. Bu şekilde elde edilen ve son derece avantajlı özelliklere sahip nanokompozit hidrojeller son derece biyouyumlu, biyobozunur, mekanik dayanımı ve su tutma kapasitesi yüksek, hazırlanması kolay ve ucuz olan antibakteriyel yara örtü malzemelerinin geliştirilebileceği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: Antibakteriyel yara örtü malzemesi, nanokompozit hidrojeller, kitin nanokristaller.

ABSTRACT

THE DEVELOPMENT OF PEO AND PVA HYDROGEL NANOCOMPOSITE INCORPORATED WITH CHITIN NANOCRYSTALS AS AN ANTIBACTERIAL WOUND DRESSING MATERIAL

MSC THESIS

ULAŞ KUMRAL

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

(CO-SUPERVISOR: DR. MEHMET EMİN DİKEN)

BALIKESİR, JUNE 2019

The wound dressing materials that moisturize wound, absorb exudate and that are permeable to oxygen and water vapor and barrier to microorganisms, that are not antigenic or toxic, that are biocompatible, cheap and easy-to-use. Recently, wound dressing materials are designed as antibiotic and anti-inflammatory drug release systems for a prolonged time to minimise infection and inflammation, to enhance wound healing and to improve the patient's life quality. Nanocomposite hydrogels with nanosized additives have improved chemical, morphological and mechanical properties. The previous studies show that the nanocomposite hydrogels prepared with the incorporation of chitin nanocrystals have improved water absorptivity, mechanical strength and biocompatibility enabling prolonged drug release and antibacterial activity. The preparation of the PVA nanocomposite hydrogels and the determination of their performances as wound dressing materials is aimed in this thesis study. Firstly, chitin nanocrystals were prepared and thereafter the resultant chitin nanocrystals were mixed with PEO and PVA aqueous solutions. The nanocomposite hydrogel was prepared using both chitin nanocrystals and PEO/PVA solutions at different concentrations. The PEO/PVA nanocomposite hydrogel was prepared with incorporation of chitin nanocrystals, which are characterised by FTIR, Optical Contact Angle and SEM. The nanocomposite hydrogels were prepared as biocompatible, biodegradable, easy-to-prepare and affordable antibacterial wound dressing materials which have high mechanical strength and water absorptivity.

KEYWORDS: Antibacterial wound dressing material, nanocomposite hydrogels, chitin nanocrystals.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyomalzemeler.....	1
1.1.1 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması	3
1.1.1.1 Seramik Biyomalzemeler	3
1.1.1.2 Metalik Biyomalzemeler	3
1.1.1.3 Polimerik Biyomalzemeler	4
1.1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler	5
1.1.1.4.1 Kompozit Malzemelerin Bileşenleri	6
1.1.1.4.1.1 Matriks.....	6
1.1.1.4.1.1.1 Polivinil Alkol (PVA)	6
1.1.1.4.1.1.2 Polietilen Oksit (PEO).....	7
1.1.1.4.1.2 Takviye Edici Malzeme.....	8
1.1.1.4.1.2.1 Kitin.....	8
1.1.1.4.2 Kompozit Malzemelerin Hazırlanması	8
1.1.1.4.2.1 Polimerizasyon Yöntemi	9
1.1.1.4.2.2 Eritme Yöntemi	9
1.1.1.4.2.3 Çözelti Ortamında Etkileştirme Yöntemi	10
1.2 Polimerik Kompozit Malzemelerin Karakterizasyonu	10
1.3 Biyouyumluluk	11
1.3.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite.....	12
1.3.1.1 MTS Testi	13
1.3.2 Hemouyumluluk	13
1.3.3 Antibakteriyel Aktivite	14
1.4 Literatür Özeti	14
1.5 Amaç ve Kapsam.....	15
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1 Materyal.....	17
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	17
2.2 Metot	18
2.2.1 Nanokompozit Sentezi	18
2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu	20
2.2.2.1 FTIR-ATR Analizleri.....	20
2.2.2.2 SEM Analizleri.....	21
2.2.2.3 Optik Temas Açısı Analizleri	21
2.2.3 Hemouyumluluk	21
2.2.4 Hücre Kültürü Aşamaları.....	22
2.2.4.1 Malzemelerin Sterilizasyonu.....	22

2.2.4.2	Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	22
2.2.4.3	Kandan Lenfosit Hücrelerinin Eldesi	23
2.2.5	Sitotoksosite Testleri	23
2.2.5.1	MTS Testi	23
2.2.6	Antibakteriyel Aktivite Testi (Adherence Test)	24
3.	BULGULAR	25
3.1	Nanokompozitlerin Sentezi	25
3.2	Nanokompozitlerin Karakterizasyonu	26
3.2.1	FTIR-ATR Analiz Sonuçları	26
3.2.2	Sem Analizi	30
3.2.3	Optik Temas Açısı Analizi	32
3.3	Sitotoksosite Testi	36
3.3.1	MTS Testi	36
3.3.1.1	Kitin Konsantrasyonuna Göre MTS Testi Sonuçları	36
3.4	Hemouyumluluk Analizi	43
3.5	Antibakteriyel Aktivite Testi	43
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	46
4.1	Nanokompozitlerin Karakterizasyonu	46
4.1.1	PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin FTIR-ATR Sonuçları	46
4.1.2	PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin SEM Analizleri	48
4.1.3	PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin Optik Temaz Açısı Analizleri	49
4.2	Nanokompozitlerin Sitotoksosite Testi	50
4.3	Nanokompozitlerin Hemouyumluluk Testi Sonuçları	52
4.4	Nanokompozitlerin Antibakteriyel Aktivite Sonuçları	53
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	54
6.	KAYNAKLAR	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:	Polivinil alkol (PVA)'ün kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.2:	Polietilen oksit (PEO)'in kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.3:	Kitinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 1.4:	Polimerizasyon yöntemi ile kompozit sentezi.....	9
Şekil 1.5:	Çözelti ortamında etkileştirme yöntemine göre nanokompozit sentezi.....	10
Şekil 1.6:	MTS tetrazolyum ve formazan ürünü.....	13
Şekil 2.1:	Kitinin partikül boyutu dağılımı.....	19
Şekil 3.1:	Kitinin partikül boyutu dağılımı.....	25
Şekil 3.2:	Kitinin FTIR-ATR spektrumu.....	27
Şekil 3.3:	PVA'nin FTIR-ATR spektrumu.....	27
Şekil 3.4:	PEO'in FTIR-ATR spektrumu.....	28
Şekil 3.5:	PEO matriks ve PEO/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.....	28
Şekil 3.6:	PVA matriks ve PVA/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.....	29
Şekil 3.7:	PEO/PVA matriks ve PEO/PVA/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.....	29
Şekil 3.8:	PEO/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.....	30
Şekil 3.9:	PVA/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.....	30
Şekil 3.10:	PEO/PVA/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.....	31
Şekil 3.11:	Kitinin SEM görüntüsü.....	31
Şekil 3.12:	Nano boyuttaki kitinin SEM görüntüsü.....	32
Şekil 3.13:	PEO'ye ait temas açısı görüntüsü.....	33
Şekil 3.14:	PEO/kitin (% 1) (a), PEO/kitin (%2.5) (b), PEO/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.....	34
Şekil 3.15:	PVA'e ait temas açısı görüntüsü.....	34
Şekil 3.16:	PVA/kitin (% 1) (a), PVA/kitin (%2.5) (b), PVA/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.....	35
Şekil 3.17:	PEO/PVA'e ait temas açısı görüntüsü.....	35
Şekil 3.18:	PEO/PVA/kitin (% 1) (a), PEO/PVA/kitin (%2,5) (b), PEO/PVA/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.....	36
Şekil 3.19:	Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	37
Şekil 3.20:	PEO nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	37
Şekil 3.21:	PVA nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	38
Şekil 3.22:	PEO/PVA nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	38
Şekil 3.23:	Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	39
Şekil 3.24:	PEO nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	39

Şekil 3.25: PVA nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	40
Şekil 3.26: PEO/PVA nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	40
Şekil 3.27: Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	41
Şekil 3.28: PEO nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	41
Şekil 3.29: PVA nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	42
Şekil 3.30: PEO/PVA nanokompozitleri 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.....	42
Şekil 3.31: PVA/kitin (%5) nanokompozitinin E. coli (a) ve S. aureus'a (b) karşı antibakteriyel aktiviteleri ve her iki bakteri türüne ait kontrol örnekleri.....	44
Şekil 3.32: PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin S. aureus'a karşı % antibakteriyel aktivite oranları.....	45
Şekil 3.33: PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin E. coli'ye karşı % antibakteriyel aktivite oranları.....	45
Şekil 4.1: Kitinin kimyasal yapısı.....	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Doku ve organlarda meydana gelen hasarlar için üretilen biyomalzemeler	2
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi.....	17
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	17
Tablo 2.3: PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitlerinin oranları.	20
Tablo 3.1: PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitlerinin oranları.	26
Tablo 3.2: PVA, PEO, PEO/PVA polimerlerin ve nanokompozitlerin optik temas açısı değerleri.....	32
Tablo 3.3: PEO ve PEO/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.	43
Tablo 3.4: PVA ve PVA/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.	43
Tablo 3.5: PEO/PVA ve PEO/PVA/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.....	43
Tablo 4.1: Caridea kitinin standart kitine kıyasla fonksiyonel grupları	47

SEMBOL LİSTESİ

PVA	: Polivinil Alkol
PEO	: Polietilen Oksit
FTIR-ATR	: Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
FBS	: Fetal Bovine Serum
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCl	: Sodyum Klorür
GPa	: Gigapascal

ÖNSÖZ

Bilimsel çalışmalara olan inancı; öğrenmek ve çalışmak isteyen öğrencilerine karşı verdiği destek ve tükenmeyen azmi ile lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bana kapılarını açarak, her türlü yardımı esirgemediği, hep ileriye bakmamı sağladığı ve bana güvendiği için sevgi ve saygı duyduğum Sayın danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a hayatım boyunca teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Eş danışmanlığımı yaparak yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmam süresince çok büyük emekleri olan, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman anlayışla yaklaşan çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Gör. Mehmet Emin DİKEN'e çok teşekkür ederim.

Bilgi, deneyim ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet DOĞAN'a, Doç. Dr. Yasemin TURHAN'a, Arş. Gör. Begümhan YILMAZ'a, Öğr. Gör. Berna KIZILDUMAN'a ve Arş. Gör. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca, her türlü zorluğun birlikte üstesinden geldiğimiz ve başarılarımızı paylaştığımız çok sevgili laboratuvar arkadaşlarım Pakize ÖZKAYA'ya, Şeyman KIRMIZI'ya, Nurdan AKICI'ya, Ahmet Cenkay ORBAY'a, İrem AKINCI'ya ve çok değerleri hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a Kübra PASPAL'a, Derya OKUYAN'a, Ayşe Tuğşen AYDEMİR'e, Esra TOKAY'a, Nelin HACIOĞLU'na ve yüksek lisans arkadaşlarım Candan AKDIR'a, Ehed AYMAZ'a, Kamil TOK'a, Mevlüt KOÇAK'a, Nil OCAK'a, Derya KESKİN'e, Emre YANIK'a, Ayşe SELEK'e, Fatih PEHLİVAN'a, Eda KIZILTEPE YILMAZ'a, Tuğçe BEYÇİÇ'e, Taner KUŞKU'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda duran ve beni destekleyen, emeğini, inancını, sevgisini üzerimde hissettiğim, maddi manevi her ne olursa olsun arkamda olan benim başarıyı kendi başarıları bilen canım annem Ayşe BÜLTE'ye ve canım abim Deniz KUMRAL'a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim. Yaşantım boyunca, tanıdığım ve iyisiyle kötüsüyle yanımda olan ve beni hiç yalnız bırakmayan canım arkadaşlarım Behice BAYDAR'a, Jerzy Robert WILK'e ve Görkem OKUR'a çok teşekkür ederim.

Bu tez insanlığa ithafımdır...

ULAŞ KUMRAL

1. GİRİŞ

Her gün gelişmekte olan biyomühendislik, immünoloji, moleküler biyoloji ve genetik, malzeme bilimi, kimya, biyoloji ve tıp bilimi ile ilgili alanlarını genelleyen bir çok malzeme üretilmiş ve üretilmektedir. Malzeme alanındaki hızlı gelişmeler ile çoğunlukla insanın hayatsal isteklerine bağlı yapısal sonuçlar ve çözümler hızlıca artmaktadır. Bu tür yapısal çözüm odaklı gelişmelerde insanın yapısına uygun olup olmadıkları nedeniyle ve en önemlisi de kullanılmakta olan malzeme gruplarından en başta geleni biyomalzemelerdir. Biyouyumluluk, bir biyomateryalin en kritik yeteneğidir. Biyomalzemelerin kullanım alanları içinde sağlık alanında başı çekmekteyken veterinerlik uygulamaları, sanayi uygulamaları ve polimer teknoloji uygulamaları da sayılabilir [1].

1.1 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, canlı sistemlerdeki dokuların işleyişlerini yerine getirebilmesini sağlamanın yanı sıra bunu da destekleyebilecek bir amaçla kullanılır ve yapıları doğal veya sentetik olabilmektedir. Bilimsel yönden yeni yapılacak olan bir çalışma alanı gibi görünse de aslında biyomalzemelerin kullanımı tarihin çok eski zamanlarına dayanmaktadır. 19. Yüzyılın üçüncü ve dördüncü çeyreğinde fildişi, tahta gibi metal özelliğe sahip olmayan malzemeler ile gümüş, altın ve bakır gibi metal malzemeler de kullanılmıştır. Süregelen uygulamarda, geniş bir yelpazesi olan iskelet sistemi uygulaması da başarı sağlamış ilk biyomalzeme aplikasyonudur. Geçen 30 yıl boyunca malzemelerin canlı sistemler ile etkileşmesini anlayabilmek için yeni malzemeler geliştirilmiş ve bu yolda oldukça emin adımlar atılmıştır [2]. Asırlar boyunca cerrahi uygulamalar, bunları yaparken ortamın, maddelerin sterilizasyonu ve bunlar için geliştirilmiş yöntemler ve ayrıca sentetik olan materyallerin gelişmesi için de pek çok biyomalzemenin üretilmesinin önünü açmıştır.

Süre gelen zamanda artık pek çok biyomalzeme işitme kayıpları, kalp yetmezliği, implantlar ve tıbbi alandaki cihazlar gibi işlevini kaybetmiş ve artık dejenere olmuş doku veya organlarda biyomalzeme olarak kullanılmasını ve bunun getirisi olan hayat kalitesini arttırmaktadır. En önemli özellikleri ise biyolojik ortamlarda işlevlerini kaybetmeden ve bozulmadan çalışması ve devamlılığını sürdürebilmesidir. Vücutta bulunan biyomalzemeler çevrelerindeki vücut sıvıları ve diğer yapılarla temas halindedirler ve hareket gibi fiziksel etkilere maruz kalmaktadırlar [3]. Bu tür nedenlerden dolayı tasarlanıp hazırlandığı ve uygulandığı bölgeye göre uygun sürtünme kuvveti özelliği ve esnekliğinin yanında kimyasal ve sıcaklığa dayanıklı olmalıdırlar ve hali hazırda temasta olduğu çevresindeki doku ve vücut sıvılarına zarar vermemelidirler. Biyomalzemeler uygun olarak tasarlanmadığında aplikasyon yapılan alanda beklenmeyen sonuçlar ve hatta hasarlar yaratabilirler. Önemli diğer özellikleri de yorulma dayanımı, ideal yoğunluk ve dizan, steril edilebilirlik, uzun süreli dayanıklılık ve işlenebilirliktir [4].

Tablo 1.1: Doku ve organlarda meydana gelen hasarlar için üretilen biyomalzemeler [5].

Organ / doku	Örnekler
Kalp	Kalp pili, yapay valf, yapay kalp
Göz	Kontakt lens, intraoküler lens
Kulak	Yapay üzenge kemiği, koklea implantı
Kemik	Kemik plakaları, eklem protezleri
Böbrek	Diyaliz makineleri
Mesane	Katater ve stent
Kas	Diş iplikleri, kas uyarıcılar
Kan dolaşımı	Yapay kan damarları
Deri	Yanık sargıları, yapay deri
Endokrin	Enkapsüle edilmiş pankreatik adacık hücreleri

1.1.1 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Biyomalzemeler 4 ana başlık altında sıralanmaktadır. Bunlar; seramik biyomalzemeler, metalik biyomalzemeler, polimerik biyomalzemeler ve kompozit biyomalzemelerdir [5].

1.1.1.1 Seramik Biyomalzemeler

Vücutta hasar görmüş veya işlevlerini yitirmiş organ ve dokuların onarılması, yeniden yapılandırılması veya özel durumlarda bu yapıların yerini alması amacıyla tasarlanabilen seramiklere biyoseramikler denilmektedir. Seramikler kırılğan, sert ve porlu bir yapıya sahiptirler. Genel olarak sert iskelet dokuların onarımında ve dokuların yerini alması için biyomedikal alanlarda kullanılırlar. Seramik biyomalzemeler biyo inert, biyoaktif ve emilebilir olmaları ile üç temel grupta toplanırlar. Vücuttaki dokular ile iyi uyum sağlamaları biyoseramikleri seçilebilir kılar ancak işlenmelerinin zor olması, kırılğan olmaları, dayanımlarının düşük olması, esnemeyen malzeme olmaları ve yüksek yoğunluğa sahip yapıda olmaları gibi dezavantajları vardır. Biyoseramikler içinde Alümina (Al_2O_3), pirolitik karbon, zirkonya (ZrO_2), cam seramikler, kalsiyum fosfatlar en çok kullanılan malzemelerdendir [6].

1.1.1.2 Metalik Biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler, kristal kafes özelliklerinin ve atomlarının arasındaki dayanıklı metalik bağlarının olması nedeniyle oldukça iyi mekanik özelliklere sahiptirler. Elektriksel ve mekanik yetenekleri ve termal iletkenliklerinden dolayı biyomalzeme olarak kullanılmaya yatkındırlar. Bununla birlikte malzemelerin kolaylıkla sterilize edilebilmeleri, belirli sınırlarda, ağır, uzun süreli, değişken ve ani yüklemelere karşı özelliklerini koruyarak dayanabilmelerinden dolayı biyomalzeme olarak tercih edilmektedirler [3, 7]. Metalik biyomalzemeler korozyona karşı olan dayanıklılıkları oldukça kuvvetlidir ve diz-kalça eklem yerlerinde, omurga ve dişteki kırık bölgelerin vida yardımıyla birleştirelerek iyileşme işlemine katkıda bulunurlar.

İskelet ve kas sistemimizin şartlarına en iyi uyumluluğu da metalik biyomalzemeler göstermektedirler. Bu nedenle diz, kalça gibi ağırlık taşıyan bölgelerimizde ve diş için olan implantlarda oldukça yaygın olarak kullanılır. Paslanmaz çelik malzemeler, titanyum ve bunun alaşımları, Co-Cr alaşımları, gümüş ve altın metalik biyomalzemeler içinde en fazla kullanılanlardır. Gümüş bazlı olan metalik biyomalzemeler, anti-mikrobiyal özelliği nedeniyle mikrobiyal enfeksiyon riskini azalttığı için bu bölgelerde kullanılırlar. Metalik biyomalzemeler ayrıca canlı dokularında ve organlarında biyomalzeme işlevi olarak kullanıldıklarından buralarda bulunan vücut sıvılarıyla ve bazı istenmeyen korozyon ürünlerinin oluşturduğu durumlar meydana gelebilir. Diğer farklı metaller birbirleriyle etkileşim halinde olduklarında vücut sıvısı içerisinde indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarıyla galvanik pil oluşturarak bu korozyonu meydana getirirler [8]. Bu nedenle de biyoyumlu malzemeler açısından uyumsuzluk sorunu ortaya çıkabilir. Böyle durumlarda da metalik biyomalzemelerin vücudun içerisindeyken çıkarılması gerekebilir ve böylelikle bununla ilgili yapılan çalışmalar bu malzemelerin biyoyumluluğunun geliştirilmesi içindir.

1.1.1.3 Polimerik Biyomalzemeler

Polimerler tekrarlanabilen, ufak birimlerden oluşan ve uzun zincirli yapıdaki moleküllerdir. Polimerlerin elde edildikleri yere göre değişen çeşitlilik özelliği vardır; hali hazırda doğada var olanlar olarak adlandırılan doğal polimerler, doğada var olmayan ve yapay olarak sentezlenebilen polimerler ise sentetik polimerler olarak adlandırılırlar. Genel olarak polimerlerin özellikleri yapı taşları olarak monomerlerine göre oldukça büyük farklılık gösterirler. Uygulama alanlarına yönelik en uygun biyomalzeme seçimi ise dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Polimerik biyomalzemeler sentezlendiklerinde içerlerine katkı maddeleri eklenmektedir ve bu da maddelerin polimerik yapılarından salgılandıklarında çevrelerindeki hücrelerin üzerlerinde herhangi bir toksik etkisinin olmaması gerekmektedir [9]. Polimerik biyomalzemeler oldukça kolay işlenebilirler, farklı şekillerde de üretilebilme özelliklerinden, modifiye edilebilme özelliklerinden, istenilen fiziksel ve mekanik özelliklerinden ve bunların kazanımlarından dolayı malzeme alanında kullanılmaktadırlar.

Medikal aplikasyonlarda biyouyumluluk, hücre-hücre etkileşimi ve biyobozunurluk özelliklerinin göz önüne alınarak en uygun malzemelerin seçimi yapılmalıdır. Polimer biyomalzemeler günümüzde vücut içi ilaç salınımı, kontak ve göz içi lenslerde, diyaliz sistemlerinde, kalp damarlarında, göğüs protezlerinde ve yapay organların parçalarında kullanılmaktadır [10].

1.1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler

Kompozit malzemeler, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı en az iki farklı maddenin belirli doğrultuda ve bir amaca yönelik olarak bir araya getirilmesiyle oluşurlar. Bu malzemelerin sahip oldukları özelliklerinden en iyi şekilde faydalanmak için bir araya gelmeleri ve hali hazırda var olan kendi özelliklerinden daha üstün bir özellik kazanmaları bu malzemelerin en bilindik özelliklerindedir [11]. Biyomalzeme anaçlı sentezlenen kompozitlerin bileşenlerinin biyolojik ve mekaniksel olarak malzemeyi daha iyi hale getiren özelliklerinden yararlanmak esastır [12]. Biyoaktif seramikler ve bozunabilen polimer bileşenlerini bir araya getiren kompozit sistemi, sert dokuların rejeneratif malzemelerce tasarımları ve bunların sürekliliğinde uzun gelecek vadede bir yaklaşımdır. Kompozit malzemeler, matriks (reçine) yani kalıp ve takviye yani güçlendirici bileşenlerden oluşurlar. Bu bileşenler birbirleri içinde çözünmezler veya birbirleriyle karışma özellikleri yoktur. Kompozit malzeme, kalıp içerisine çeşitli takviyelerin yani güçlendirici maddelerin eklenmesiyle oluşmaktadır. Bu güçlendirici maddeler genellikle cam, karbon veya polimer lifler, çeşitli toz seramik malzemeler ve mikadır. Matriks olarak polimerler tercih edilir. Böyle bir biyokompozit malzeme vücudun içinde ya da temas halindeki medikal uygulamalarda kullanılır. Kompozitlerin yüksek dayanıklılık ve düşük elastik özelliği nedeniyle genellikle ortopedik aplikasyonlarda tercih edilirler. Ortopedik cerrahi uygulamalarında bu biyomalzemelerin kullanımı bazı sorunlara neden olabilir. Bu sorunlardan en önemlisi kullanılmakta olan implantların sertlik derecelerinin ayarlanamamasıdır. İmplantlar vücut içinde çevresiyle temas halinde olduklarından bu bölgelerdeki sertlik derecesi her bölgede aynı olmalıdır, aksi halde deformasyona neden olabilirler.

Gün geçtikçe geliştirilmekte olan biyomalzemeler ve bunlarla ilgili çalışmalar ile kompozitlerin kullanımı bu istenmeyen durumların ortadan kaldırılmasını amaçlanmaktadır [13].

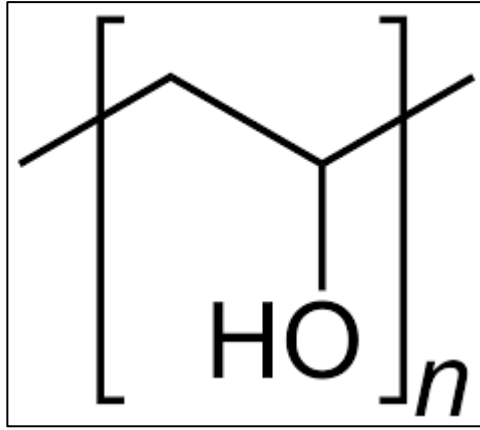
1.1.1.4.1 Kompozit Malzemelerin Bileşenleri

1.1.1.4.1.1 Matriks

1.1.1.4.1.1.1 Polivinil Alkol (PVA)

Polivinil alkol (PVA) yalnızca karbon-karbon bağlarıyla oluşmuş bir vinil polimerdir. Bu bağ tipik plastikler olan polietilen, polipropilen, polistiren ve suda çözünen polimerler yani poliakrilamid ve poliakrilik asit gibi bağlarla aynıdır. Endüstriyel olarak sentezlenen vinil polimerlerin arasında PVA mikroorganizmalar tarafından mineralize edilebilir olmasıyla bilinmektedir. PVA suda eriyen ve biyobozunur yapıdadır; bu sebeple de suda çözünme ve biyobozunma özelliklerinden dolayı gübreler, pestisitler ve herbisitler gibi kimyasal sistemlerin taşınma sistemlerinin ticaretinde kullanılması uygundur.

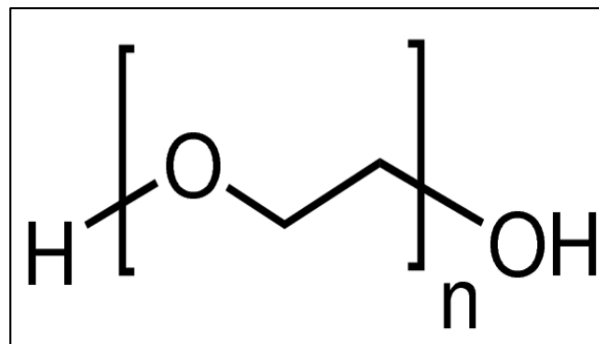
PVA bakteriyel organizmalar tarafından tamamen degrade edilip değerlendirilirler, *Pseudomonas* O-3, bunu karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır. Bununla birlikte, PVA-degrade eden mikroorganizmalar çevremizde her yerde bulunmazlar. Neredeyse degrade edebilen bütün organizmalar *Pseudomonas* cinsindedir, diğer organizmalar ise farklı cinslere aittir [14]. Genel formülü $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$ 'dir. Süpermarket zincirlerinde, tekstil sektöründe ve diğer kaplama çeşitlerinde kullanılmaktadır. Beyaz renkli (renksiz) ve kokusuzdur [15].



Şekil 1.1: Polivinil alkol (PVA)'ün kimyasal yapısı.

1.1.1.4.1.1.2 Polietilen Oksit (PEO)

Polietilen oksitin, endüstriyel uygulamalardan tıp alanına kadar geniş bir alanı kapsayan uygulama alanı vardır. PEO aynı zamanda polietilen glikol (PEG) veya polioksietilen (POE) olarak da bilinir ve bu isim değişikliği molekül ağırlığına göre değişmektedir, moleküler ağırlığı (Mw) 900000 olan polietilen oksit olarak bilinmektedir. PEO'in yapısı genellikle $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ olarak ifade edilir. Polietilen oksit çeşitli proteinlere bağlandığında, kanda taşınan proteinin temizlenmesini yavaşlatmakta ve ilaç taşınımı için mükemmel bir çözücü haline gelmektedir. PEO hidrofilik bir yapıya sahiptir. PEO düşük toksik özelliğine sahiptir ve birçok üründe kullanılmaktadır. Biyokimyada hücrelerin zarlarına uyguladığı osmotik basınç sayesinde oldukça kullanışlı bir polimer olup biyomembran deneylerinde ve stres tekniklerinde de kullanılmaktadır [16].

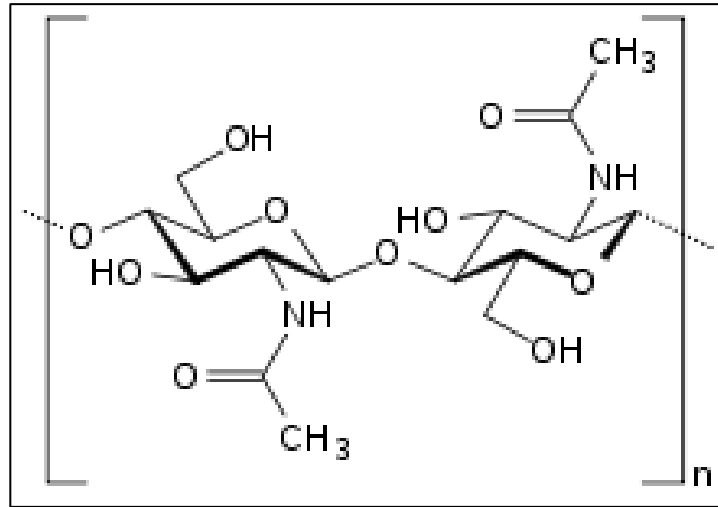


Şekil 1.2: Polietilen oksit (PEO)'in kimyasal yapısı.

1.1.1.4.1.2 Takviye Edici Malzeme

1.1.1.4.1.2.1 Kitin

Kitin ($C_8H_{13}O_5N$)_n, N-asetilglukozaminin uzun zincirli polimeridir. Mantarlarda, kabuklular ve böcekler gibi eklem bacaklıların dış iskeletlerinde hücre duvarının ilkin yapısıdır. Yapısal olarak polisakkariddir ve nanofibril kristalize yapısındadır. Nitrojen barındıran modifiye edilmiş bir polisakkarit olan kitin; N-asetil-D-glukozamin [2-(asetilamino)-2-deoksi-D-glukos] birimlerinin sentezlenmesiyle oluşur ve β -(1-4) bağları içeren kovalent bir yapıya sahiptir. Her bir monomer grubun asetil amin grubuyla yer değiştirmesinden dolayı bir hidroksil grubuyla birlikte selüloz olarak da izah edilebilir. Bulunduğu ortamdaki polimerlerle yapılan hidrojen bağlarını güçlendirdiği için kitin polimer matriksinin özelliklerini iyileştirir [17].



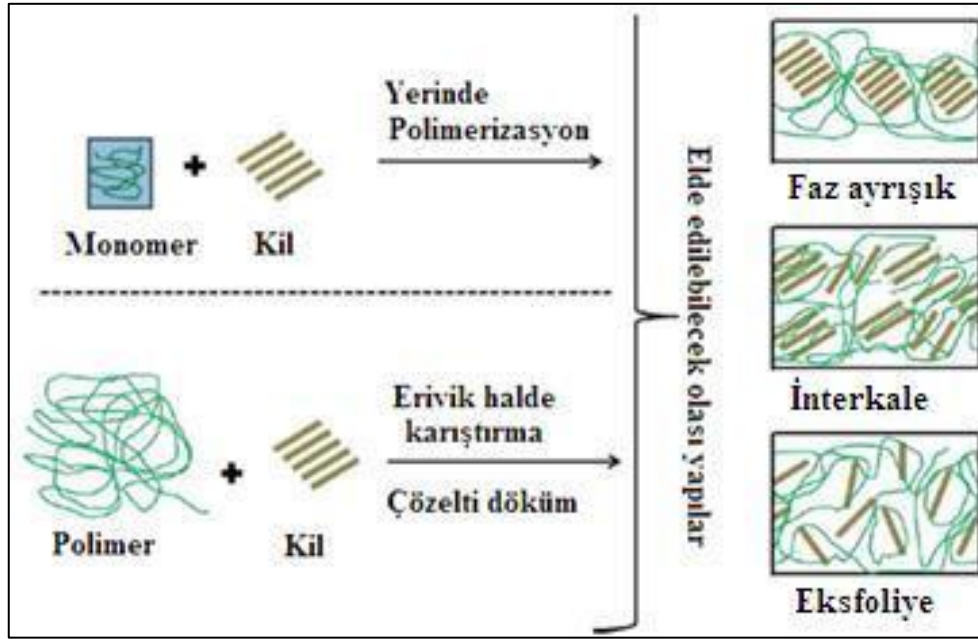
Şekil 1.3: Kitinin kimyasal yapısı.

1.1.1.4.2 Kompozit Malzemelerin Hazırlanması

Polimer kompozitlerin hazırlanması ve sentezlenmesinde en çok kullanılan üç yöntem sırasıyla polimerizasyon yöntemi, eritme yöntemi ve çözelti ortamında etkileştirme yöntemidir [18].

1.1.1.4.2.1 Polimerizasyon Yöntemi

Polimerizasyon yönteminde, polimerizasyon optimum bir sıcaklıkta ve uygun bir başlatıcı ile başlatılır. Takviye edici malzeme arasına monomer difüzyonu gerçekleşir. Bununla birlikte zincir büyür ve polimerin içerisine takviye edici malzeme tamamen disperse olur ve kompozit oluşur. Şekil 1.4'te bu yöntem ile kompozitlerin sentezi şematik olarak gösterilmektedir [19].



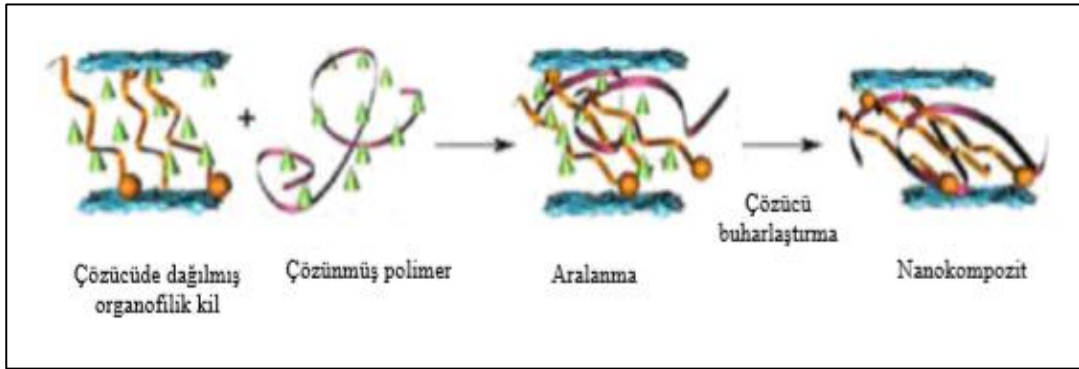
Şekil 1.4: Polimerizasyon yöntemi ile kompozit sentezi.

1.1.1.4.2.2 Eritme Yöntemi

Eritme yönteminde, takviye edici malzeme direkt olarak polimer ile etkileştirilir. Hazırlanan karışım, polimerin camsı geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkla ısıtılarak tekrar soğutulur ve sertleşmesi sağlanır ve bunun sonucu olarak kompozit elde edilmiş olur [20].

1.1.1.4.2.3 Çözelti Ortamında Etkileştirme Yöntemi

Çözelti ortamında etkileştirme yönteminde, çözücünün veya çözücü karışımının takviye edici malzemeyi disperse etmesi ve polimer matriksinin çözünmesi için kullanılır. Çözücü ortamında etkileştirme yöntemi için ilk basamak çözücü ortamına alınan takviye edici malzemenin tamamen dağıtılmasıdır. Bu ortam için koşulları bilinen bir çözücü ile çözmek istediğimiz polimer süspansiyona ilave edilerek polimer zincirlerinin dolgu maddesi arasında eşit dağılması sağlanır. Bir sonraki aşama ise çözücünün uzaklaştırılarak kompozitin oluşumunu tamamlamaktır. Şekil 1.5 bu yöntemle kompozit sentezini şematik olarak göstermektedir [20].



Şekil 1.5: Çözelti ortamında etkileştirme yöntemine göre nanokompozit sentezi.

1.2 Polimerik Kompozit Malzemelerin Karakterizasyonu

PVA/Kitin, PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin kompozitlerinin yapısının karakterize edilebilmesi için en çok kullanılan teknikler FTIR-ATR ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM)'dir. FTIR-ATR, polimer ve takviye edici malzeme arasındaki birebir etkileşimin en iyi şekilde incelememizi ve kompozitler hakkında bilgi sahibi olup yorum yapabilmemize olanak sağlar. TEM ise taneciklerin dağılımı hakkında bize kesin sonuçlar vermektedir [20].

1.3 Biyouyumluluk

Biyoyumluluk, herhangi bir biyomalzemenin dokularda veya fizyolojik olan sistemler üzerinde yan etkisinin olup olmadığını, aynı zamanda bu fizyolojik çevrenin kullanılan biyomalzemenin üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını incelemesi ve anlamlandırılmasıdır. Biyoyumluluk hakkında geleneksel bir yaklaşım olarak, biyomalzemeyi saran biyolojik ortamların bununla uyumlu olup olmadığı ve nasıl bir etkileşim halinde olduğunu göstermek için yapılmış bir yapıdaki materyallerin seçilmesi ve bunların üretilmesidir [9, 21]. Biyomalzemeler tasarlanıp yapılırken özen gösterilmesi gereken maddelerin başında kimyasal, fiziksel ve biyolojik yönden uyumlu olup olmadığı ve bunun uzun yaşam süresine uygun olması gibi ölçütlenmesi gelmektedir. Çevresindeki dokuya uyumlu biyomalzemelerin bağışıklık sisteminde meydana getirebileceği tepkiye, mutasyona, kansere ve toksik bir reaksiyona sebebiyet vermemesi gerekmektedir. Kan ile uygunluk gösteren materyallerin ise kanda pıhtılaşma, hücre tahribi, plazma proteini ve enzimlerin değişimine neden olma gibi yan etkileri istenmeyen durumlardır [22]. Ancak istenilen biyolojik özellikleri taşımayan biyomateryallerin başarısından söz etmek imkânsızdır. Bir biyomateryal veya implantın gösterdiği başarı çok büyük oranda bu implantın özelliği ve biyoyumluluğuna, kullanıcı kişinin durumuna ve uygulaması yapan kişinin yeteneğine bağlıdır. Polimerlerin canlı doku ve organlara uygulanışı polimer-doku ilişkisini de su yüzüne çıkartmaktadır. Konuyla ilgili bir çok araştırma yapılmış ve bu çalışmaların ortak hedefi ise istenilmeyen herhangi bir doku ile etkileşimlerinin nasıl elimine edilmesi olmuştur. Bu nedenlerle kimyasal ve fiziksel açıdan inert, aynı zamanda da biyoyumlu polimerlerin tasarlanması son derece önemlidir. Biyoyumluluk; polimerin varlığında etrafındaki doku veya dokularla hiç bir yolla herhangi bir reaksiyon gerçekleşmemesi demektir. Bu yapı dinamik, devam edebilecek olan bir durumdur. Vücut, hastalıklar veya yaşlanmanın etkileriyle, materyalde meydana gelebilecek olan herhangi bir korozyon, yorulma ve dış etmenlerin etkisiyle sürekli bir değişim içindedir. Bu etkileşim ve değişim süreci de, vücut ile materyal arasındaki farklılaşmaya cevap vermektedir. Buradaki şartların değişmesiyle birlikte, başlangıçta biyoyumlu olan materyal zamanla uyumsuz hale gelebilmektedir. Materyal ve vücut arasında sürekli bir etkileşim vardır ve bu sürecin devamlı olması materyale karşı oluşabilecek yanıtın da sürekli olması gerektiğini göstermektedir [23].

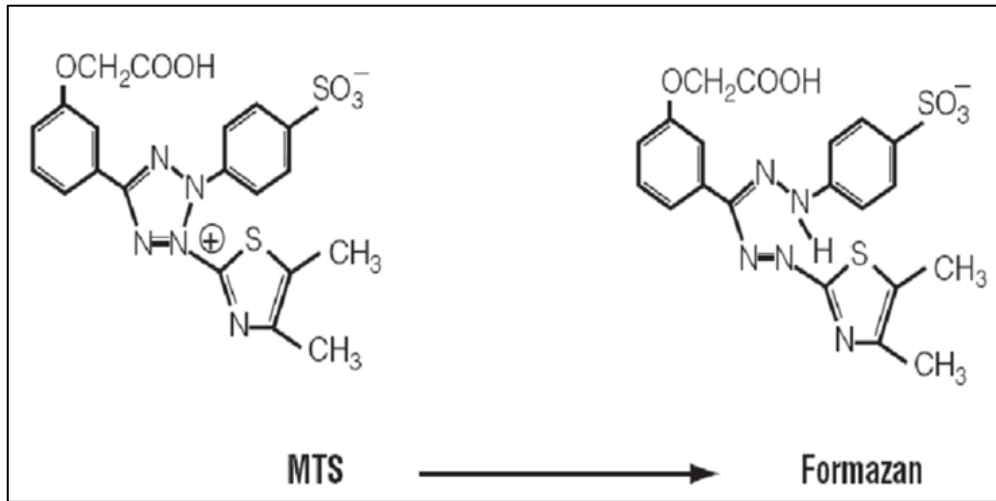
1.3.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

Hücre kültürü, doku veya dokulardan direkt izole edilmiş ya da mekanik ve enzimatik yollar ile ayrıştırılmış hücrelerden, uygun olarak hazırlanan *in vitro* koşulların oluşturulması, yaşamasının ve üremesinin amaçlandığı bir disiplindir. Hücre kültürü özetle hücrelerin kontrol edilerek çoğaltılma işlemi demektir ve bu yöntem, istenilen hücrelerin oldukça kısa bir sürede yetiştirilmesini sağlar. Dünya genelinde tıbbi alandaki araştırmalar sahasında en çok yer verilen çalışmalardan bir tanesi de hücre kültürü işlemleridir. Bunun sayesinde kişilerde bulunan herhangi bir hastalığın veya rahatsızlığın nasıl işlediği hakkında bize bilgiler vermesidir. Bu durum tıp alanında olabildiğince pozitif etkiler oluşturduğundan günümüz tıbbının daha da gelişmesine olanak sağlamaktadır. Korunmuş ve günümüz zamanına gelmiş olan eski hayvan hücreleri üzerinde de uygulanabilmektedir. Bu disiplin için uygunluğu belirlenmiş koşulları sağlamak da mümkün olduğu kadar birden fazla kontrollü deneylerin de yapılması gerekmektedir. Hücre kültürü tüm hücreler için ortak gerçekleşen olaylar veya spesifikleşmiş hücreler için de bu fonksiyonların toksisite tayini için de kullanılmaktadır. HeLa hücreleri, karaciğer kanseri hücreleri ve fibroblastlar gibi hücre tipleri için de; test etmek istediğimiz maddelerin biyolojik olarak aktivitesinin belirlenip bunu sağlayan toksisite testleri uygulanabilmektedir [24].

In vitro sitotoksosite testleri, moleküler boyuttaki olayların getirisi olarak çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin bloke edilmesini ve bunun getirisi olarak da hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında hasarlanma gerçekleşmesinin incelenmesini esas alır. Bu tür testler araştırma alanında, hücre canlılığı ve ölümü, hücre membranı ve organelleri, protein veya DNA sentezi ve hücre bölünmesi ve hücre artış katları veya azalış katları ile ilgili bize oldukça derin bilgiler vermektedir [25]. Test etmek istediğimiz malzemenin morfolojik özelliği ve çalışmak istediğimiz hücreler ile ilişkilendirilmesi yöntemi oldukça önem arz eder ve hücreler ile malzemenin ilişkisi ekstrat yolu, direkt olarak ya da direkt olmayarak gerçekleştirilebilmektedir. Sitotoksosite testleri ile aynı zamanda bir çok örneği de, kısa zamanda test edebileceğimiz gibi deneylerin sonucunda da kantitatif olan sonuçlara ulaşabiliriz [26].

1.3.1.1 MTS Testi

MTS, canlı tutulan hücrelerin duyarlı bir şekilde ölçülmesi ve bunun için gerçekleştirilen kalorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, MTS tetrazolyum bileşiğinin [3-(4,5 dimetiltiyazol-2-i1)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)2H-tetrazolyum, MTS], hücre kültürü ortamında çözünebilir ve renkli bir yapıda hali hazırda var olan formazan bileşiğine, canlı hücreler tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. MTS, tetrazolyum bileşiğinin hücrelerdeki aktif yürütülen metabolik olaylardandır, dehidrogenaz enzimlerinin de ürettiği ve yükseltgen nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) veya yükseltgen nikotinamid adenine dinükleotit fosfat (NADPH) tarafından indirgendiği düşünülmektedir [27].



Şekil 1.6: MTS tetrazolyum ve formazan ürünü [30].

1.3.2 Hemouyumluluk

Kan ile etkileşimin incelendiği deneyler, kan veya kanın herhangi bir bileşeni ile etkileştirdiğimiz materyalin arasındaki kan, doku veya organları nasıl değiştirdiğini anlamamızı sağlayan ve bize bilgiler veren bir yöntemdir. Ayrıca nano partiküller, tedavi edici ve görüntüleme maddesi olarak da kullanılmaktadır. Doğrudan damar yolu ile etkileşim içerisindedir [28].

Hemouyumluluk deneyi çerçevesinde, hemolitik maddelerin kan ile temasının sonucu olarak eritrositlerin kaybı / eritrositlerin hasarlanması gibi serbest plazma hemoglobin seviyesinde gerçekleşen artışın ifade edilmesidir. Bu yöntem ile amaçlanan, hemoglobin seviyelerini spektrofotometrik olarak karşılaştırılmasıdır [29].

1.3.3 Antibakteriyel Aktivite

Modern insan vücudunda kullanılacak ve aynı süreçte günlük yaşantıda etkileşim halinde olabileceğimiz en çok arzu edilen özelliklerden bir tanesi de sentezlenen malzemenin antibakteriyel özellikte olup olmadığıdır. Antibakteriyel, bakterilerin yaşamlarının durdurulması veya ürememesini amaçlar ve bunu gerçekleştirmek için de birçok aktivite yöntemleri vardır. Antibakteriyeller, kullanılacak olan malzemelerin kalite ve güven özelliklerine sahip olmasını amaçlamasıyla akademik ve endüstriyel araştırmaların dikkatini çekmektedir. Vücut içerisinde kullanmak istediğimiz bir malzemenin kullanılan alanda bir iltihaplanmaya neden olup olmayacağı bu yöntem ile tayin edilip öngörülebilir. Sorunsuz bir antibakteriyel aktiviteyi başarabilmek için implant yüzeyi modifiye edilebilen antibakteriyel materyallerin geliştirilmesi sonucu önem kazandığı görülmektedir. Böylece sentezlenip geliştirilen polimerlerin daha da geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar ve çalışmalar, hem akademik hem de endüstriyel uygulamalar açısından oldukça önem arz eder [30].

1.4 Literatür Özeti

Bu çalışma kapsamında PEO, PVA ve kitinin kullanılmasıyla elde edilen herhangi bir nanokompozit araştırma ve çalışmasına literatürde rastlanılmamıştır. Aşağıda bu konu ile ilgili olduğu düşünülen çalışmaların kısa bir özeti verilmektedir.

Schlichting ve arkadaşları, biyouyumlu implantlar ile ilgili bir çalışmayı yayınlamışlardır. Karışım olan implantlardaki biyouyumluluğun artırılması ile ilgili yapmış oldukları araştırmalarında seramik parçaların kullanımı ile ilgili yapılan deneysel çalışmalar anlatılmıştır [31].

Punke ve arkadaşları çok gözenekli yeni bir hidroksilapatite (HA) seramiğinin geniş açık mastoid çukurlarını kapatmada ve yok olmasını sağlamada kullanabilecekleri üzerine klinik araştırmalar ve çalışmalar yapmışlardır ve nanokemiğin hastalarda bulunan mastoid oyukluklarını yok edip giderilmesinde kullanılabilir bir özelliğe sahip bir materyal olup olmadığını araştırmışlardır [32]. Sionkowska ve arkadaşları yapay karaciğer aplikasyonlarıyla alakalı alanda kollajen-kitosan matrikslerini geliştirdikleri çalışmalar yapmışlardır ve sonuç olarak da yüksek biyouyumluluk, orta düzeyde mekanik dayanıklılık özelliği ve hepatosit uyumu özelliği olduklarını belirlemişlerdir [33]. Gong J. ve arkadaşları, adsorban madde olacak şekilde kullandıkları polistiren matrikslerini divinilbenzeni çapraz bağlayıcı olacak şekilde çalışma yapmışlardır ve süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile de çalışmışlardır. Matriksin polarlığını polimerizasyon yönteminde bu sisteme metil metakrilat veya metalrilat monomerleri ekleyerek opsiyonlamışlardır. Sentezledikleri matriks kısmının gözenek boyutunun ve yüzey alanının adsorpsiyon işlemleri esnasından sonra buna fazlasıyla etkili olduğunu belirtmişlerdir [34].

1.5 Amaç ve Kapsam

Biyomateryaller, modern insan vücudundaki dokuların ve organların işleyişlerinin yerine gelmesi ya da bunları desteklemek amacıyla kullanılmakta olan malzemelerdir ve doğal formda ya da sentetik formda olabilirler. Bütün biyomateryaller kendine has aplikasyon alanına sahiptir. Biyomalzemeler genel olarak vücut içerisinde kullanıldığından ve çevresiyle temas halinde olduğundan biyouyumluluklarının büyük oranla yüksek olması beklenmektedir. Biyomalzemeler ile temas etmekte olan hücrelerin verdiği tepkiler oldukça farklı olabilmektedir. Hücreler kimi zaman biyomalzemeye karşı inflamatuvar bir yanıt verebilirken kimi zaman da sanki kendi dokusuymuş gibi de yanıt verebilmektedirler. Biyouyumluluk seviyesi oldukça iyi olan PVA ve PEO da malzeme alanında oldukça fazla kullanılmakta olan polimerlerden bazılarıdır. Hali hazırda kullanılan çözücülerde çözünebilmesi, hidrofobik ve hidrofilik yüzeylere yatkın olması, film oluşturma özelliklerine sahip olmaları, yapıştırıcı, tamamlayıcı ve bağlayıcı özelliklerinden dolayı PVA ve PEO uygulamada avantaj sağlar. Taşıyıcı polimer yapı için endüstride de oldukça geniş yelpazede kullanılmaktadırlar.

PVA ve PEO, kimyasal yapılarından ötürü farmasötik aktif maddeler de dâhil olmak üzere birçok madde ile kompleks bir yapı oluşturma özelliklerine sahiptirler. Damar yoluyla aplikasyonunda vücut polimeri tamamen metabolize edemeyip yüksek molekül ağırlığına sahip polimerik kısımlar vücutta kalabilmektedir ve bu problem ağız yoluyla yapılan uygulamalarda ortadan kaldırılmaktadır.

Bu çalışmada farklı moleküler ağırlıkları olan PEO ve PVA polimerleri ile farklı oranlardaki kitin kullanılarak sentezlenen kompozitlerin sağlıklı insanların lenfosit hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı ve antibakteriyel özelliğinin olup olmadığı *in vitro* olarak farklı testler uygulanıp araştırılmıştır. Ayrıca kompozitlerin kanda hemolize neden olup olmadığı belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılmış olan kimyasalların listesi Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi.

Kitin	Polivinil Alkol (PVA)
Poliyeten Oksit (PEO)	RPMI 1640 Besiyeri
Fetal Bovin Serum	Penisilin / Streptomisin
Ficoll-Paque PLUS	Tripan Mavisi
MTS reaktifi	Etil Alkol
<i>S. aureus</i> ATCC-6538	<i>E. coli</i> ATCC-8739

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Cihaz	Firması
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Analitik terazi	Denver Instrument
Saf su cihazı	Human Power I
pH metre	Hanna Instruments

Tablo 2.2: (devamı).

Soğutmalı santrifüj	Hettich Rotina 380R
Biyogüvenlik kabini	Labconco
Etüv	Memmert
CO ₂ 'li inkübatör	Nuaire
Su banyosu	Elma Sonic
Otoklav	Hirayama
Faz kontrast mikroskobu	Olympos
Mikropipet seti	Eppendorf
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Thermo Scientific
Spektrofotometre	PerkinElmer Spektrum 100
FTIR-ATR görüntüleme cihazı	PerkinElmer Spektrum 100
Buzdolabı (+4°C)	Regal
Partikül analiz cihazı	Zetasizer Malvern Nano SZ-90
Buzdolabı (-20°C)	Altus

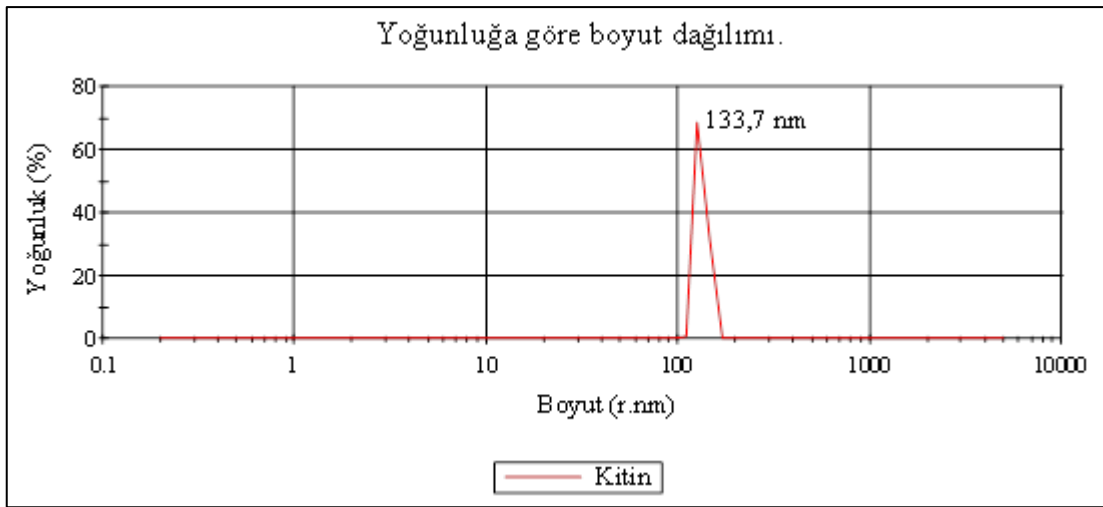
2.2 Metot

2.2.1 Nanokompozit Sentezi

Bu çalışmada, erime noktası düşük olan PVA ve PEO tercih edildiği için eritme yöntemi yerine çözücü ortamında etkileştirme yöntemi kullanılarak nanokompozitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

Polimerik nanokompozitler, makroskopik organik veya inorganik dolgu maddelerinin polimerik matrislere dâhil edildiği geleneksel takviyeli polimerlerden farklıdır.

Geleneksel polimerik kompozitlerde, belirli makroskopik takviye edici malzemenin eklenmesiyle belirli özelliklerin geliştirilmesine genel olarak başka önemli özelliklerin kaybı eşlik eder. Örneğin, sertlik, bariyer özelliği veya alev geciktiriciliğinin artması, sırasıyla tokluk, şeffaflık veya mekanik özelliklerde bir kayba neden olabilir. Nanopartiküller söz konusu olduğunda, bazı özelliklerin kaybı en aza indirilebilir veya önlenir. Aslında, bir dizi istenen özellik, tek tip mühendislik nanopartikülleri dağıtmak suretiyle eşzamanlı olarak geliştirilebilir. Ayrıca, polimer içine nanoparçacıkların dâhil edilmesinden dolayı yeni fiziki özellik ortaya çıkabilir, bu durum makro-makro parçacıklar kullanıldığında mümkün olmaz [35]. Elde edilen nano boyuta öğütülmüş kitinin boyutunun ölçümü için ise Zetasizer Malvern Nano SZ-90 partikül analiz cihazı kullanılmış ve grafik Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Kitinin partikül boyutu dağılımı.

Çözücü ortamında etkileştirme yöntemine göre nanokompozitleri sentezlerken uygun olan bir çözücü seçilmelidir. Çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Tercih edilen çözücü ile polimerler çözülmüş ve yine aynı çözücü ile belirli oranlarda (% 1, % 2,5 ve % 5) kitin disperse edilmiştir. Tablo 2.1’de elde edilen nanokompozitlerin kütlece oranları verilmiştir. Farklı erlenlerde hazırlanan polimer solüsyonları ve homojenizasyon yöntemleriyle disperse edilmiş kitin solüsyonları

magnetik karıştırıcıda belirli bir süre etkileştirilmiştir. Kitin solüsyonu önce ultrasonik banyoda daha sonra da magnetik karıştırıcıda belirli sürelerde tutularak ve bu işlemlerin tekrarlanması sayesinde homojenize edilmiştir.

Polimer çözüldükten ve kitin disperse olduktan sonra, kitin çözeltisi polimer çözeltisi içerisine aktarılmış ve en az 24 saat magnetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Daha sonra çözelti uygun teflon petri kaplarına alınmış ve çözücü tamamen uzaklaşmaya kadar ilk önce kurutmalı etüvde 24 saat daha sonra 24 saat vakumlu etüvde bekletilmiştir. Çözücü tamamen uzaklaştıktan sonra da film şeklinde nanokompozitler elde edilmiştir.

Tablo 2.3: PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitlerinin oranları.

Nanokompozit	Kitin	PVA	PEO	PVA/PEO
içerisindeki				
takviye edici				
malzeme yüzdesi				
% 1	0,001 g	0,999 g	0,999 g	0,999 g
% 2,5	0,025 g	0,975 g	0,975 g	0,975 g
% 5	0,05 g	0,950 g	0,950 g	0,950 g

2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

Sentezlenen film görünümündeki biyoyumlu nanokompozitlerin karakterizasyonları FTIR-ATR, SEM ve optik temas açısı cihazları ile yapılmıştır.

2.2.2.1 FTIR-ATR Analizleri

FTIR-ATR, kimyasal yapıların karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerden birisidir. Nanokompozitlerin FTIR-ATR analizleri ise, Perkin Elmer Spektrum 100 model Fourier transform infrared spektroskopisi ile 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında alınmıştır.

2.2.2.2 SEM Analizleri

Biyonanokompozit örneklerinin morfolojik özellikleri için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizleri için örnekler, karbon bant üzerine yapıştırılarak 15 mA akım altında 15 sn süresince tutularak, Au-Pd kaplanması ile hazırlanmıştır.

2.2.2.3 Optik Temas Açısı Analizleri

Biyonanokompozit filmlerinin, polimerin ve kitinin temas açısı ölçümleri oda sıcaklığında Attension Theta Lite cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm alınırken saf su kullanılmıştır.

2.2.3 Hemouyumluluk

Bu çalışmanın temel hedeflerinden birisi de kan hücrelerinin polimer ve kompozitler ile etkileşime uğradıklarında hemoliz olayının olup olmadığını tayin etmektir. Metlog ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek hemouyumluluk testi gerçekleştirilmiştir [36]. Nanokompozit örnekleri eşit boyutlarda olacak şekilde hazırlanmıştır. %0.9'luk 20 mL NaCl çözeltisi içerisinde 400 µL antikoagülanlı kan pipetaj yöntemi ile seyreltilmiştir. 2 mL'lik eppendorf tüpleri içerisine de UV ışık altında sterilize edilmiş olan nanokompozit örneklerin üzerlerine 1 mL seyreltilmiş kandan ilave edilmiştir. 200 µL antikoagülanlı kan 10 mL sterilize edilmiş ultra saf su içerisinde seyreltikten sonra bunun içerisinde 1 mL alınıp boş bir tüpe aktarılıp pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak belirlenen tüpe de NaCl çözeltisi içerisinde seyreltilmiş olan kandan 1 mL eklenmiş ve içerisine hiçbir nanokompozit eklenmemiştir. Hazırlanan tüm tüpler ve eppendorflar 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Supernant kısmı alınarak 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL olacak şekilde pipetle eklenmiştir. 545 nm'de mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır.

Aşağıdaki formül kullanılarak % hemoliz oranı hesaplanmıştır;

$$\%Hemoliz = \frac{[Absorbans(test\ polimeri) - Absorbans(negatif\ kontrol)]}{[Absorbans(pozitif\ kontrol)]} \times 100$$

2.2.4 Hücre Kültürü Aşamaları

2.2.4.1 Malzemelerin Sterilizasyonu

Hücre kültürü laboratuvarı, deneylere başlamadan önce ve deneyin gerçekleşeceği süre boyunca her kullanımdan önce UV lamba ile sterilize edilmiştir. Biyogüvenlik kabini, çalışmalara başlamadan önce en az yarım saat önceden çalıştırılarak kültür ortamının sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Deneyler süresince kullanılan santrifüj tüpleri ve pipet uçları, 121°C'de 20 dk (1.02 atm basınçta) otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışma kabini, deney çalışmalarına başlamadan önce ve deney aşamalarını bitirdikten sonra çamaşır suyu ile ve % 70'lik etil alkol ile temizlenmiş ve sterilize edilmiştir. Kabin içerisine alınacak olan sterilize edilmiş bütün malzemeler % 70'lik etil alkol ile temizlenerek sterilize edilip kullanılmıştır.

2.2.4.2 Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılmak üzere besiyerinin hazırlanmasından önce -20 °C' de saklanan fetal bovine serum (FBS) ve penisilin / streptomisin'in önceden 37 °C'ye ayarlanmış ultrasonik banyoda çözünmesi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri hazırlanmasında ise 392.5 mL RPMI 1640 mediumun içerisine lenfositlerin büyüme faktörü olan 100 mL FBS ilave edilmiştir. Bakteriyel kontaminasyonlara karşın 2.5 mL Penisilin / Streptomisin ve hücre bölünmesini teşvik eden 5 mL Pthohemaglutinin besi ortamına eklenmiştir ve hazırlanan besiyeri +4 °C'de saklanmaya hazır hale gelmiştir.

2.2.4.3 Kandan Lenfosit Hücrelerinin Eldesi

Kandan lenfosit hücrelerin izolasyonu için, sağlıklı ve gönüllü bireylerden EDTA'lı vakumlu 3 mL'lik tüplerle alınan kan 7 mL'lik Ficoll-Paque üzerine birbirleriyle karışmasına izin vermeyecek şekilde çok yavaşça bırakılmıştır. Daha sonra bütün tüpler 30 dakika 1500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir ve santrifüj sonucunda oluşan dört katmandan en üst katman atılarak hemen altında bulunan lenfosit hücrelerin bulunduğu katman pipetlelenerek temiz tüplere aktarılmıştır. Temiz tüplere alınan lenfosit hücreleri her bir tüpe 10 mL serum fizyolojik solüsyonu ile pipetaj yöntemiyle yıkanması gerçekleştirilmiştir. Tekrardan 10 dakika boyunca 1500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda oluşan süpernatant kısmı atılıp pellet kısmı ise hazırlanan 0.5 mL'lik besiyerlerine çözülmüştür. Her bir yara örtü malzemesi için hazırlanan 5 mL'lik besiyerlerine 100 µL hücre eklenir. Hücreler belirli sayıya ulaşmaları ve strese girmemeleri için 37 °C'de 24 saat inkübasyon yapılmıştır.

2.2.5 Sitotoksisite Testleri

2.2.5.1 MTS Testi

Bu test (MTS Assay) tetrazolyum maddesinin istenilen hücrelerin içinde renkli farmazon ürününe indirgenmesini temsil eder. Bu değişimin metabolik açıdan aktif halde olan hücrelerdeki mitokondriyal bir enzim olan dehidrogenaz enzimleri tarafından sentezlenen NADPH veya NADH sayesinde oluştuğu bilinmektedir. Tetrazolium halkasının canlı hücrelerde parçalanması nedeniyle sarı bir renk olan MTS, mavi-mor bir renge dönüşmektedir. 490 nm'de alınan ölçüm sonucunda tetrazolyum oranı ile hücre oranı kıyaslanmaktadır. Birbiriyle eşit boyutlarda hazırlanmış olan nanokompozitler petri kapları içinde bir gece boyunca UV lamba altında bırakılarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yeni izole edilen lenfositler her bir nanokompozit üzerine birertane eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan lenfosit çözeltisi için herhangi bir nanokompozit eklenmesi gerçekleşmemiştir.

Tüm örnekler ve kontrol grupları 37 °C'de % 5'lik CO₂ ortamında 3 gün boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda lenfosit hücreleri 96-Well Plate içerisine her bir kuyucuğa 100 µL gelecek şekilde eklenmiştir ve üzerlerine 20 µL MTS reagent eklenip 4 saat boyunca inkübasyon sürecine başlanılmıştır. Daha sonra da mikropilaka okuyuculu spektrofotometre ile 490 nm'de oda sıcaklığında ölçüm alınmıştır.

2.2.6 Antibakteriyel Aktivite Testi (Adherence Test)

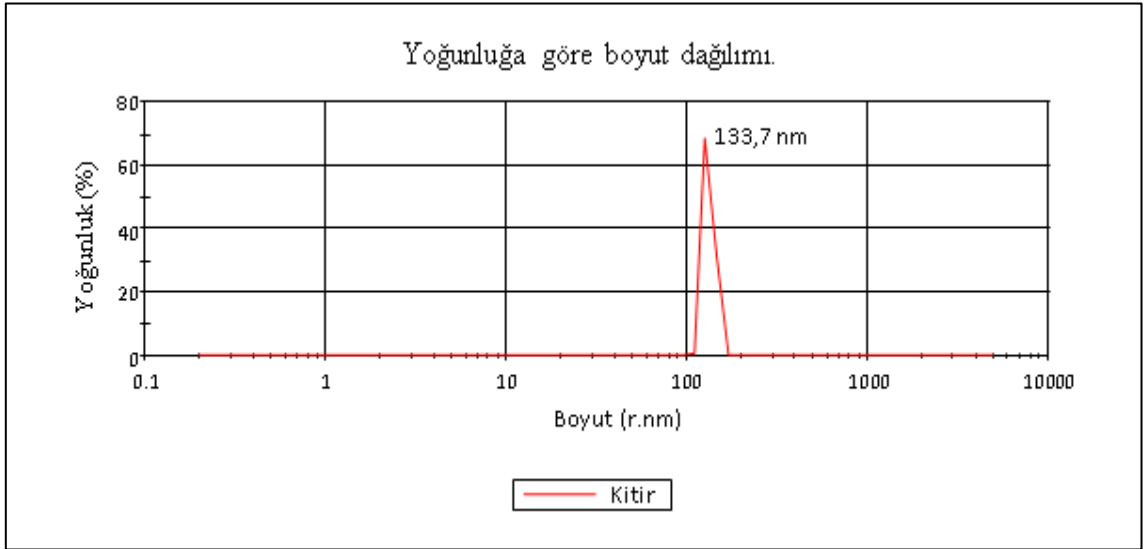
Antibakteriyel aktivite analizini gerçekleştirmek için gram-negatif olan *Escherichia coli* ve gram-pozitif olan *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılmıştır. Stok kültürler besiyerine ekilerek üremeleri sağlanmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiş ve sonra da bakteri kolonileri belirlenerek hesaplama yapılmıştır. Adherence testiyle sentezlenen nanokompozitlerin *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı yapışkanlığını incelemek için kullanılmıştır. Yapılan çalışmada *E. coli* ve *S. aureus* standart suşları kullanılmıştır. Mueller-Hinton agar (MHA) ve Mueller-Hinton broth (MHB) medyum olarak kullanılmıştır. *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri Mueller-Hinton broth (MHB)'a ekilmiştir. Nanokompozitler mikroorganizma süspansiyonları içerisine eklenmiş ve 37°C'de 2 saat ve 3 saat, sırasıyla inkübe edilmiştir. Nanokompozitler süspansiyondan çıkartılmış ve fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile yapışmayan mikroorganizmaları ayırmak için yıkanmıştır. Bu işlemde sonra yapışmayan mikroorganizmaları ayırmak için, nanokompozitler steril PBS içeren ayrı tüplere aktarılmış ve 2 dakika boyunca vortekslenmiştir. Her bir süspansiyondan bir seri dilüsyon yapılmıştır ve süspansiyonlardan 10 µL Mueller-Hinton agar (MHA)'a ekilmiştir. Ekimden sonra 37°C'de gece boyunca inkübasyon edilmiştir ve koloniler sayılmıştır. Steril nanokompozitler negatif kontrol olarak kullanılmıştır ve bakteriyel kültür süspansiyonları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [37].

3. BULGULAR

3.1 Nanokompozitlerin Sentezi

Bu çalışmada, erime noktası düşük olan PVA ve PEO tercih edildiği için eritme yöntemi yerine çözücü ortamında etkileştirme yöntemi kullanılarak nanokompozitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen nano boyuta öğütülmüş kitinin boyutunun ölçümü için ise Zetasizer Malvern Nano SZ-90 partikül analiz cihazı kullanılmış ve grafik Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Kitinin partikül boyutu dağılımı.

Çözücü ortamında etkileştirme yöntemine göre nanokompozitleri sentezlerken uygun olan bir çözücü seçilmelidir. Çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Tercih edilen çözücü ile polimerler çözülmüş ve yine aynı çözücü ile belirli oranlarda (% 1, % 2,5 ve % 5) kitin disperse edilmiştir. Tablo 3.1'de elde edilen nanokompozitlerin kütlece oranları verilmiştir. Farklı erlenlerde hazırlanan polimer solüsyonları ve homojenizasyon yöntemleriyle disperse edilmiş kitin solüsyonları magnetik karıştırıcıda belirli bir süre etkileştirilmiştir.

Kitin solüsyonu önce ultrasonik banyoda daha sonra da magnetik karıştırıcıda belirli sürelerde tutularak ve bu işlemlerin tekrarlanması sayesinde homojenize edilmiştir. Polimer çözüldükten ve kitin disperse olduktan sonra, kitin çözeltisi polimer çözeltisi içerisine aktarılmış ve en az 24 saat magnetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Daha sonra çözelti uygun teflon petri kaplarına alınmış ve çözücü tamamen uzaklaşmaya kadar ilk önce kurutmalı etüvde 24 saat daha sonra 24 saat vakumlu etüvde bekletilmiştir. Çözücü tamamen uzaklaştıktan sonra da film şeklinde nanokompozitler elde edilmiştir.

Tablo 3.1: PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitlerinin oranları.

Nanokompozit	Kitin	PVA	PEO	PVA/PEO
içerisindeki takviye edici malzeme yüzdesi				
% 1	0,001 g	0,999 g	0,999 g	0,999 g
% 2,5	0,025 g	0,975 g	0,975 g	0,975 g
% 5	0,05 g	0,950 g	0,950 g	0,950 g

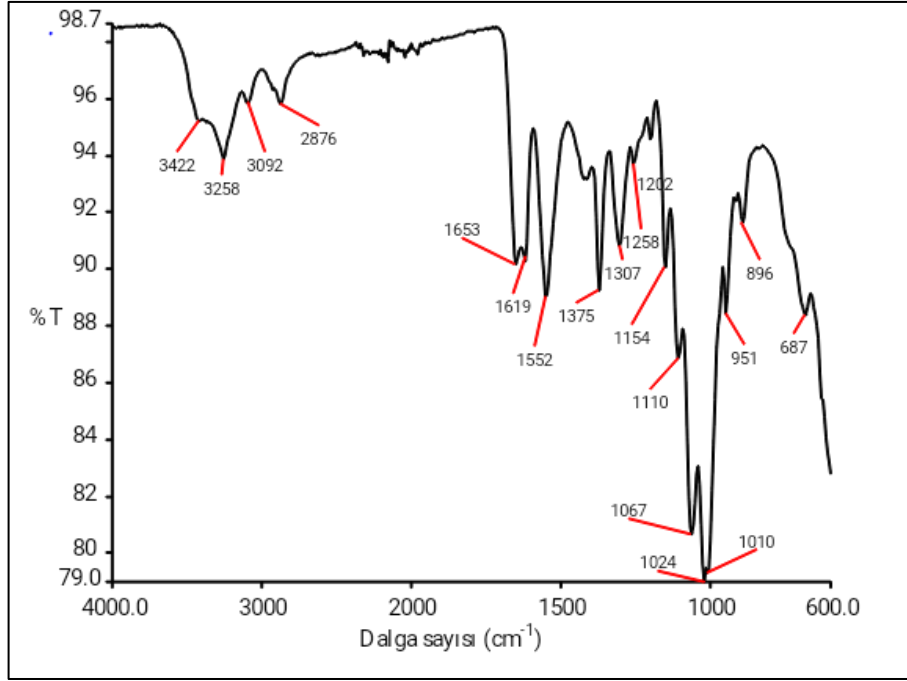
3.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

PVA ve PEO polimeri ve farklı oranlardaki kitin takviye malzemesi kullanılarak PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitleri sentezlenmiştir. Sentezi yapılan nanokompozitler FTIR-ATR, SEM ve optik temas açısı ile karakterize edilmiştir. Bu bölümde karakterizasyon analizlerinden elde edilen bulgular yer almaktadır.

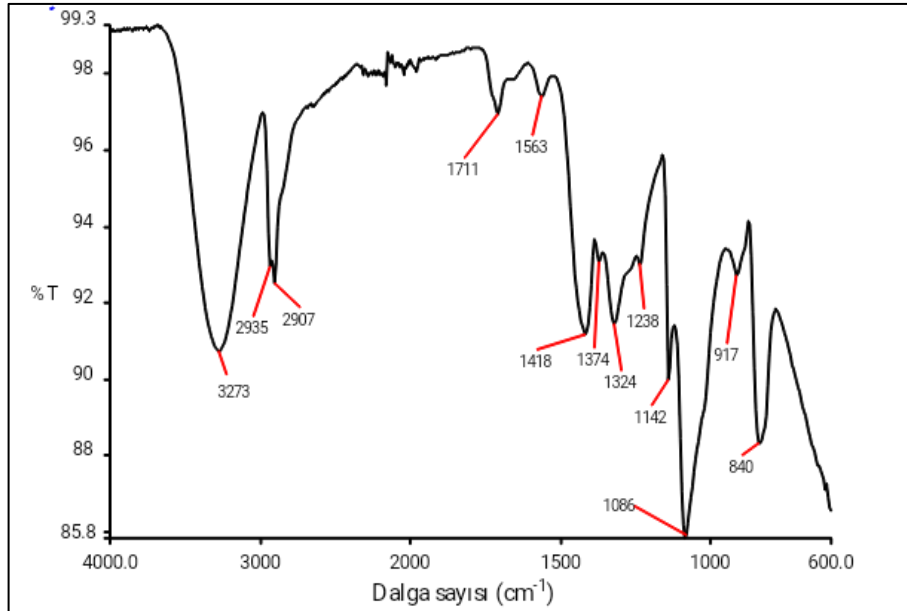
3.2.1 FTIR-ATR Analiz Sonuçları

Kitin ile sentezlenen nanokompozitlere ait FTIR-ATR spektrumları sırası ile Şekil 3.5, 3.6 ve 3.7’de verilmiştir. Nanokompozitlerin FTIR-ATR analizleri

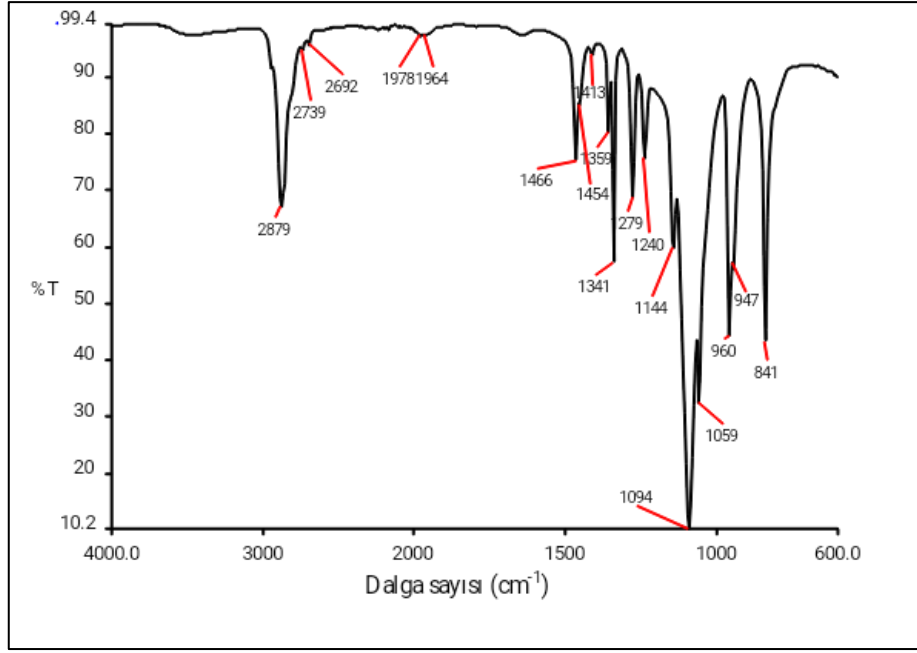
değerlendirilirken kullanılan polimerin spektrumu baz alınmıştır. Örneklere ait karakteristik pikler spektrumlar üzerinde belirtilmiştir.



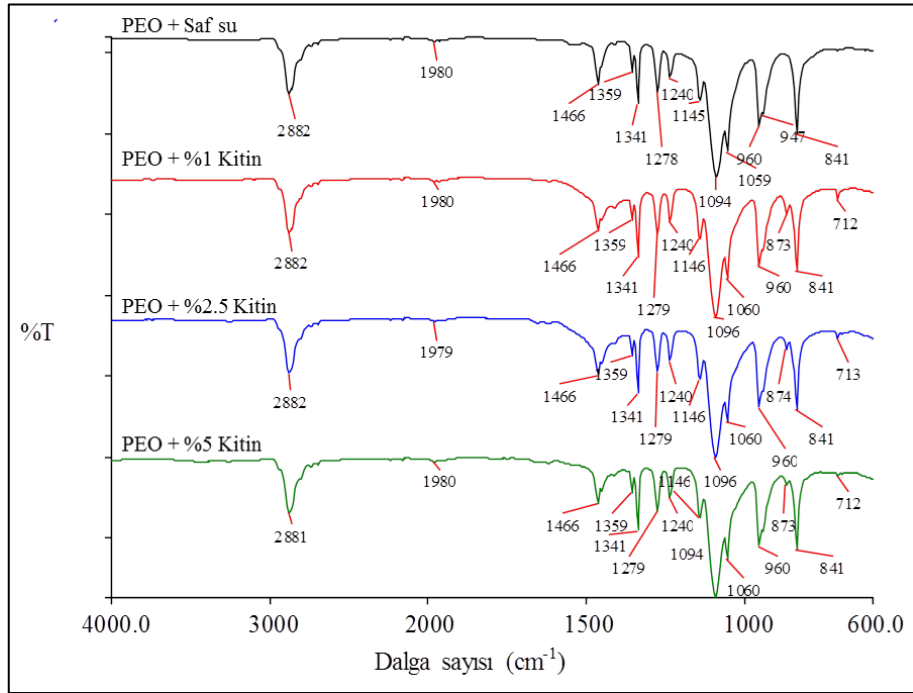
Şekil 3.2: Kitinın FTIR-ATR spektrumu.



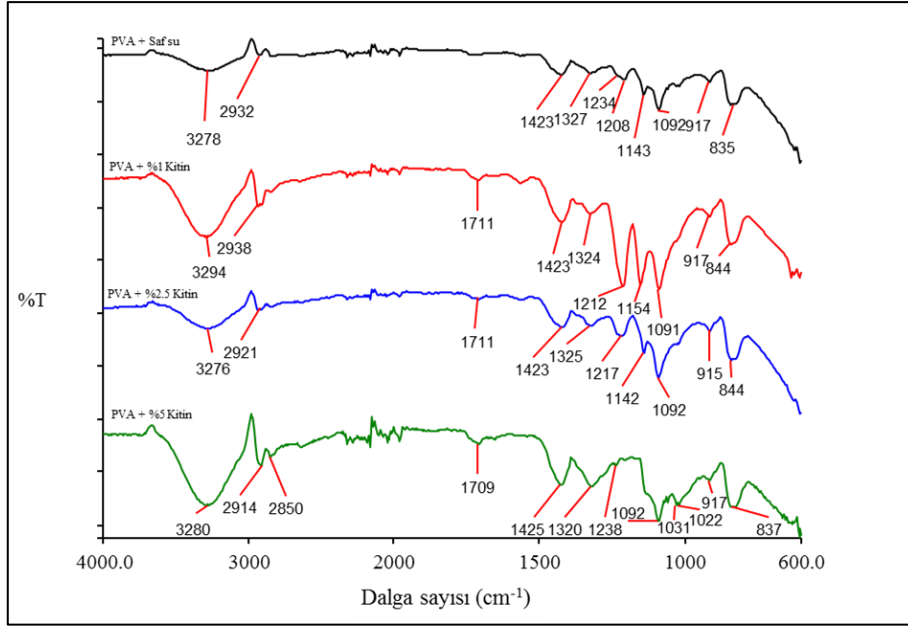
Şekil 3.3: PVA'nin FTIR-ATR spektrumu.



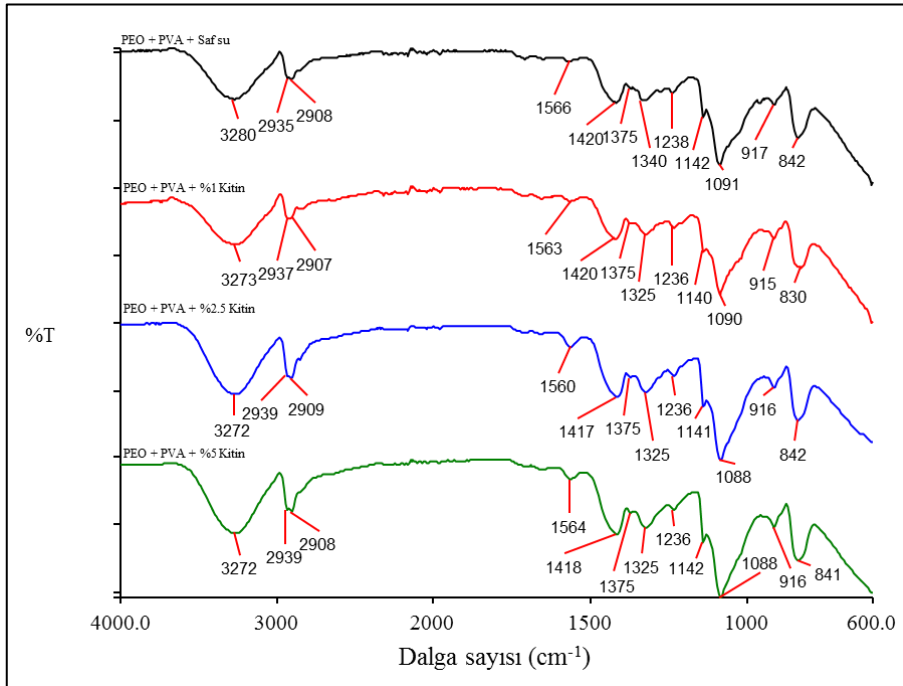
Şekil 3.4: PEO'in FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 3.5: PEO matriks ve PEO/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.



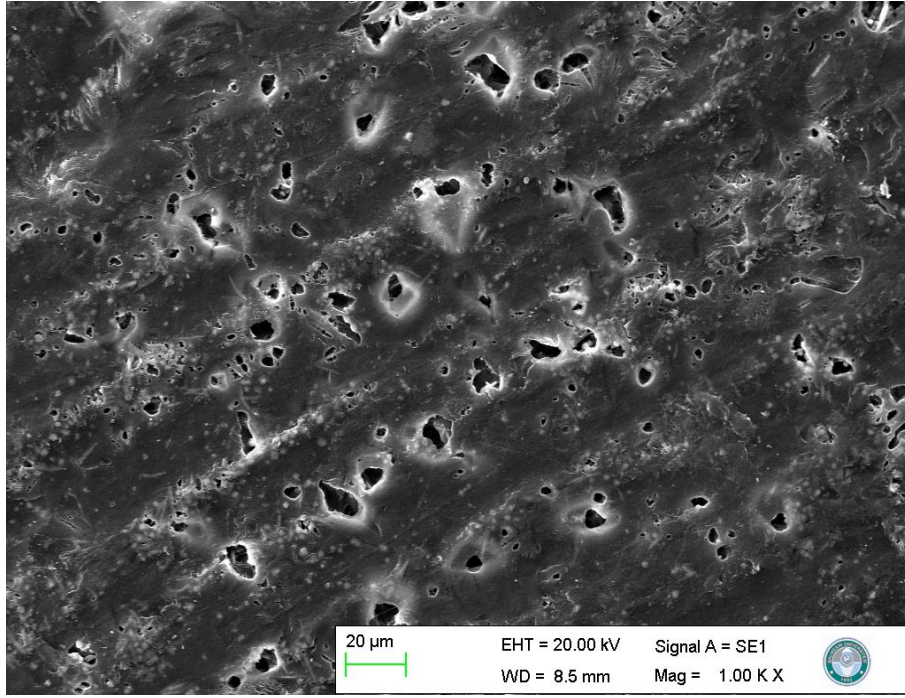
Şekil 3.6: PVA matriks ve PVA/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.



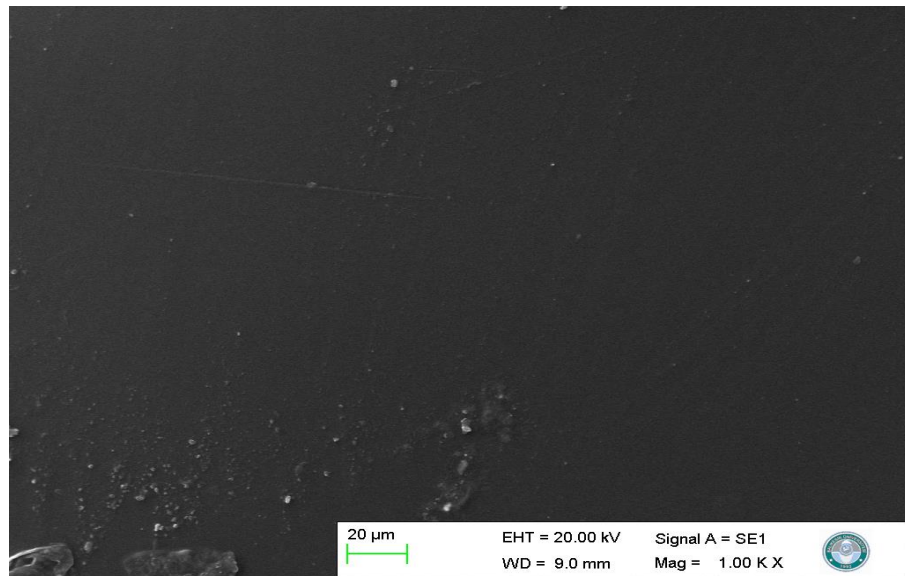
Şekil 3.7: PEO/PVA matriks ve PEO/PVA/Kitin nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumu.

3.2.2 Sem Analizi

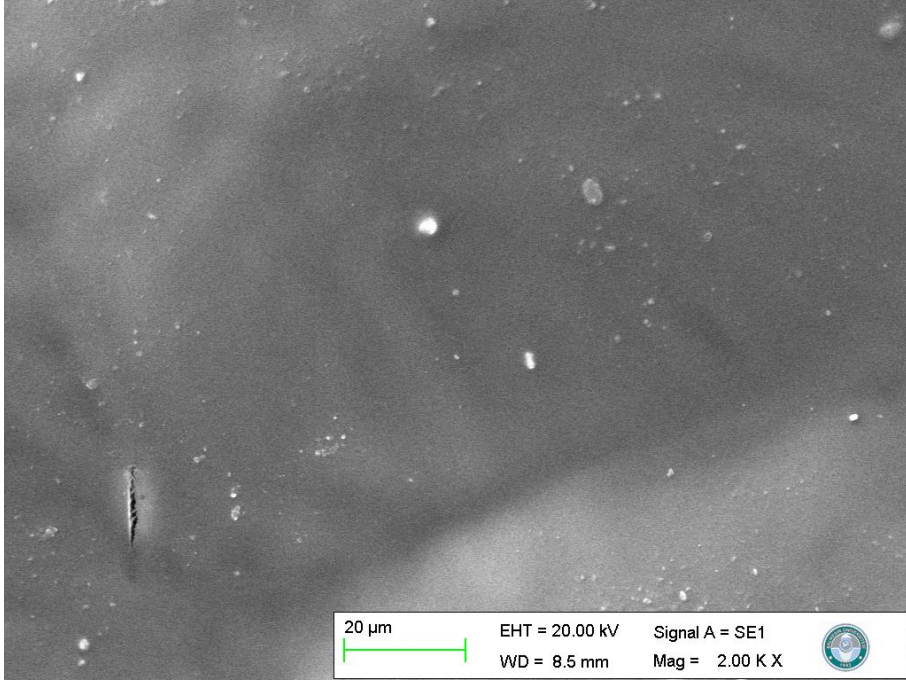
Şekil 3.8’de PEO/kitin (%5), Şekil 3.9’da PVA/kitin (%5),Şekil 3.10’da PEO/PVA/kitin (%5) nanokompozitlerine ait, Şekil 3.11’de kitine, Şekil 3.12’de ise nano boyuta getirilmiş kitine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri verilmiştir.



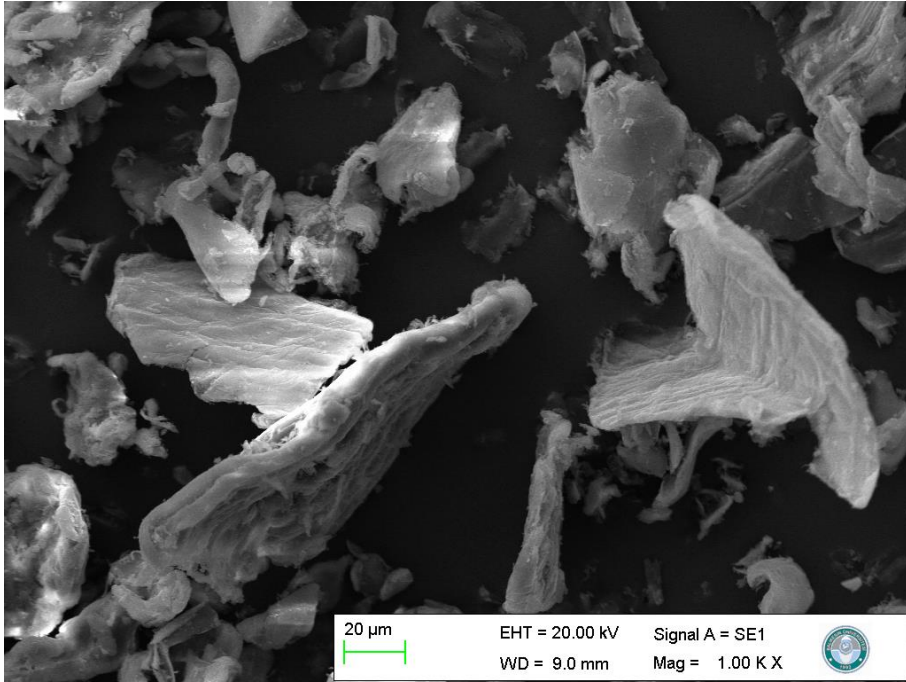
Şekil 3.8: PEO/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



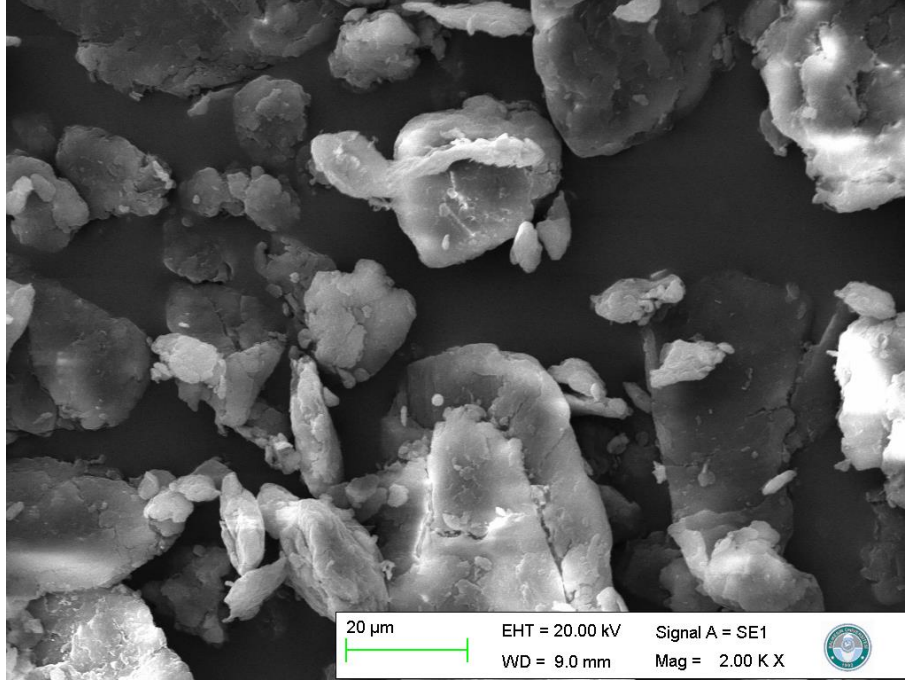
Şekil 3.9: PVA/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.10: PEO/PVA/kitin (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.11: Kitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.12: Nano boyuttaki kitinin SEM görüntüsü.

3.2.3 Optik Temas Açısı Analizi

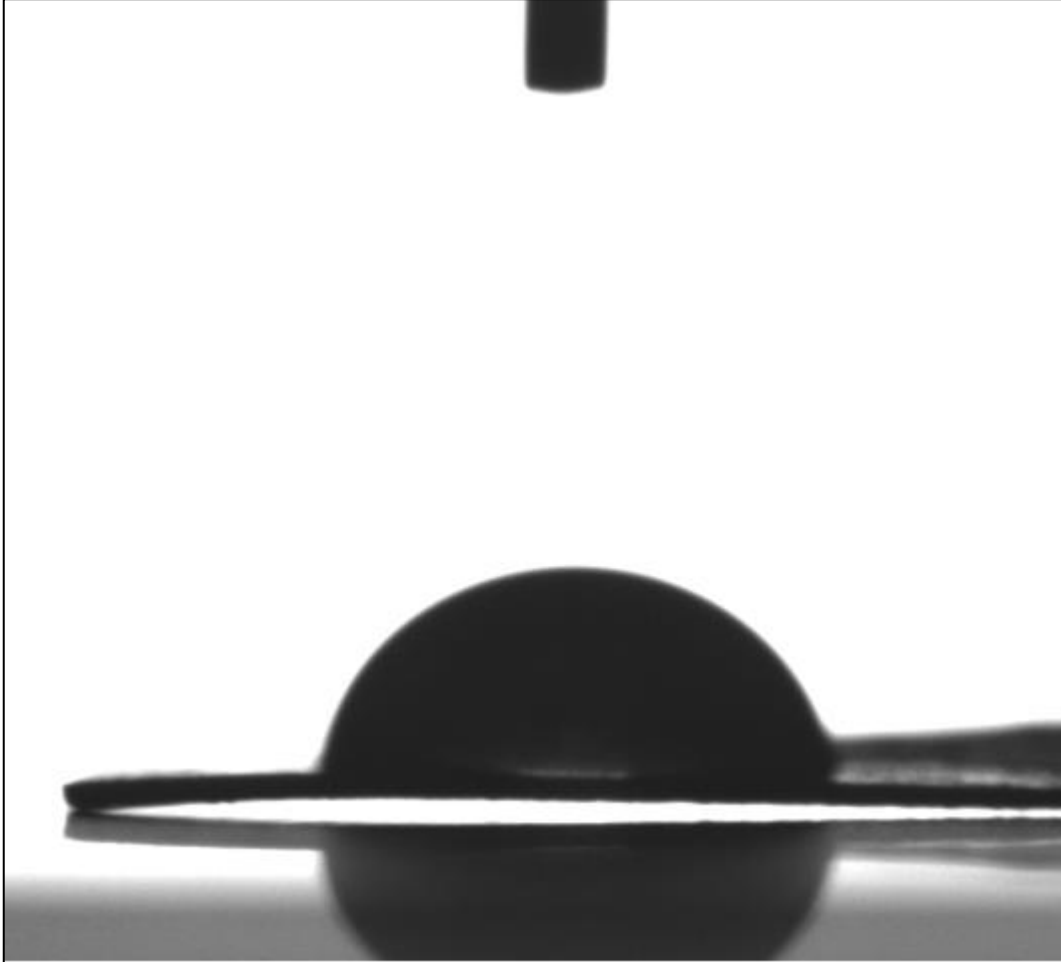
Polimerler ile PEO/kitin, PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin (%1, %2.5 ve %5) temas açısı ölçümleri Tablo 3.2’de ve Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18’de verilmiştir. Saf polimerler ve nanokompozitler bulundukları yüzey gruplarına göre farklı temas açıları göstermişlerdir.

Tablo 3.2: PVA, PEO, PEO/PVA polimerlerin ve nanokompozitlerin optik temas açısı değerleri.

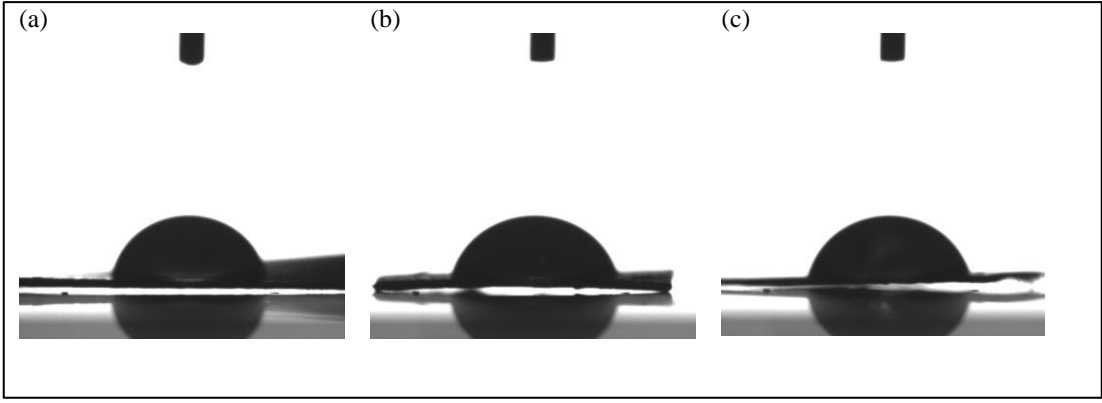
Örnekler	Temas açısı (°)
PVA	67.82
PVA/kitin (%1)	65.17
PVA/kitin (%2.5)	66.35
PVA/kitin (%5)	65.65
PEO	80.11
PEO/kitin (%1)	77.92

Tablo 3.2: (devamı).

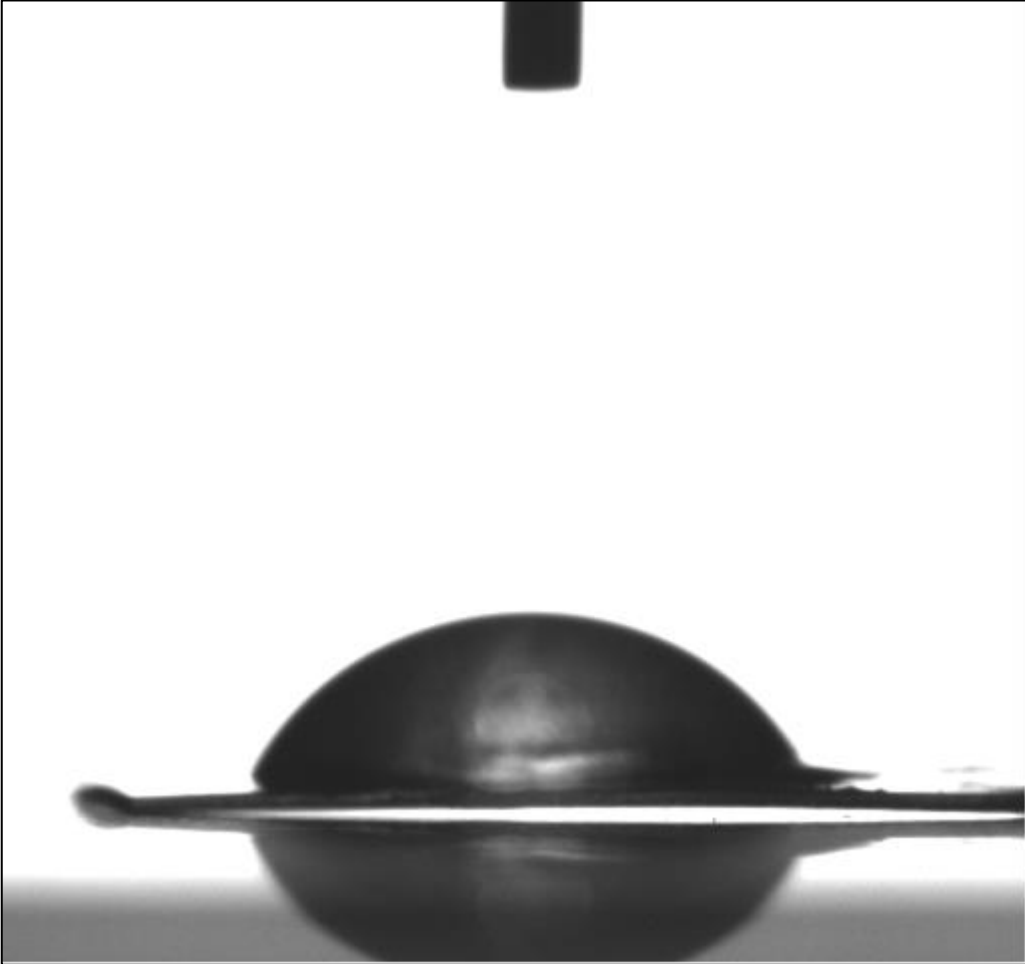
PEO/kitin (%2.5)	75.11
PEO/kitin (%5)	75.56
PEO/PVA	75.50
PEO/PVA/kitin (%1)	89.85
PEO/PVA/kitin (%2.5)	87.11
PEO/PVA/kitin (%5)	83.61



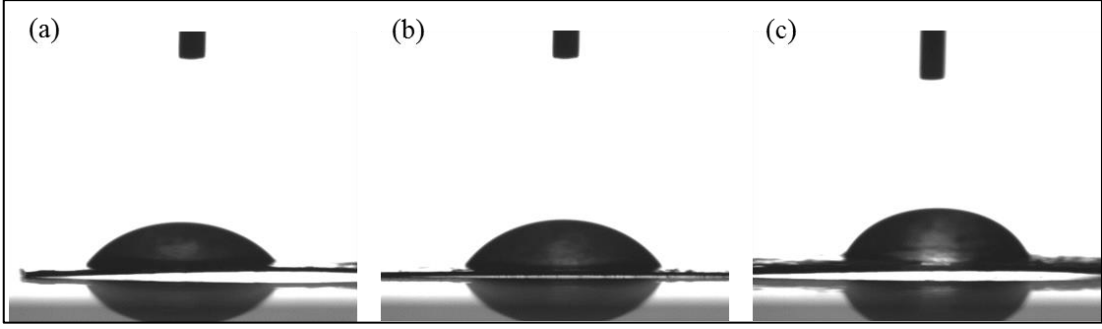
Şekil 3.13: PEO'ye ait temas açısı görüntüsü.



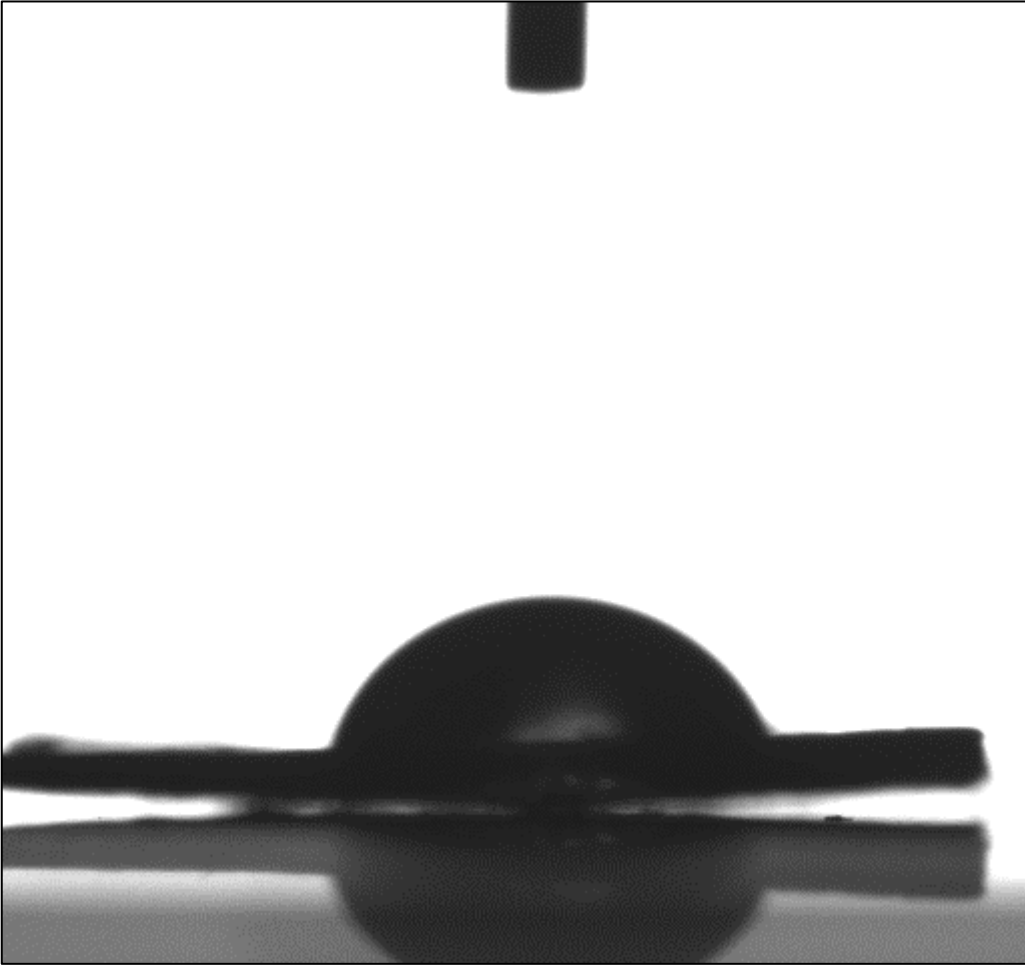
Şekil 3.14: PEO/kitin (%1) (a), PEO/kitin (%2.5) (b), PEO/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.



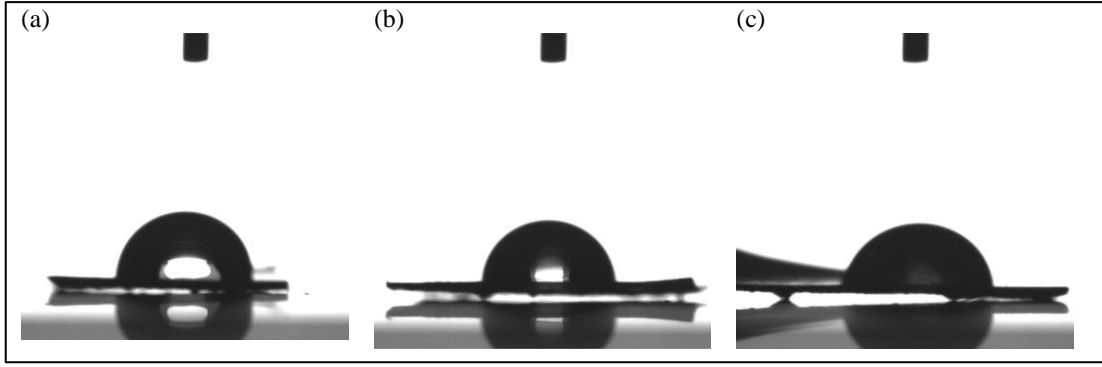
Şekil 3.15: PVA'e ait temas açısı görüntüsü.



Şekil 3.16: PVA/kitin (%1) (a), PVA/kitin (%2.5) (b), PVA/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.



Şekil 3.17: PEO/PVA'e ait temas açısı görüntüsü.



Şekil 3.18: PEO/PVA/kitin (%1) (a), PEO/PVA/kitin (%2,5) (b), PEO/PVA/kitin (%5) (c) nanokompozitlerine ait temas açısı görüntüsü.

3.3 Sitotoksosite Testi

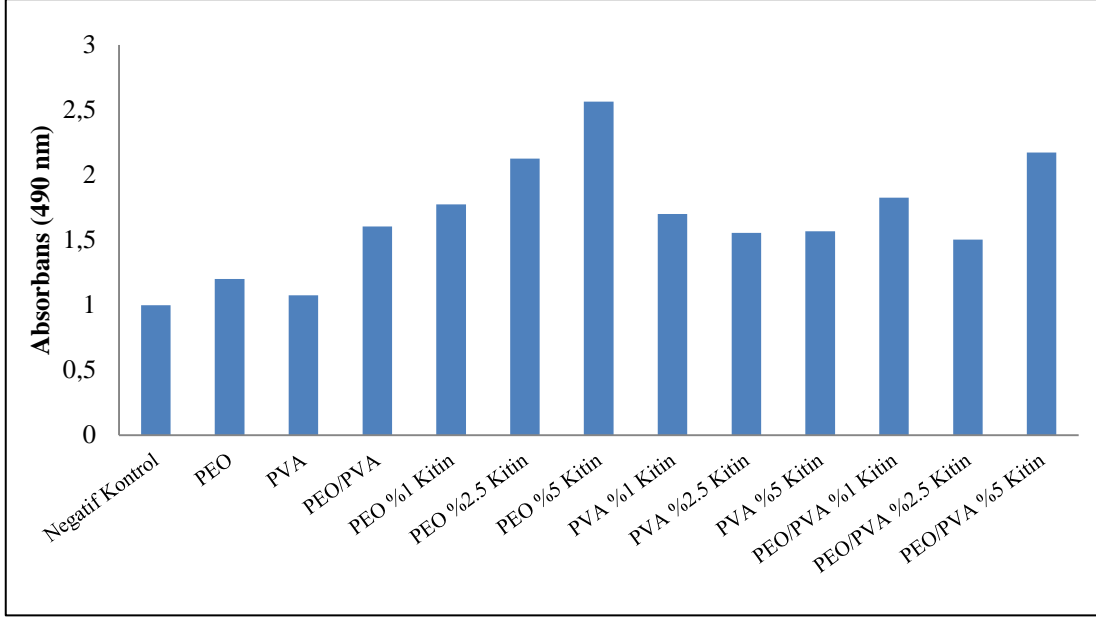
Yapılan çalışmalar ile sentezlenen PEO/kitin, PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin hücreler içerisinde herhangi bir toksik etkilerinin olup olmadığını MTS testi ile gerçekleştirilen analizlerle aydınlatılmıştır.

3.3.1 MTS Testi

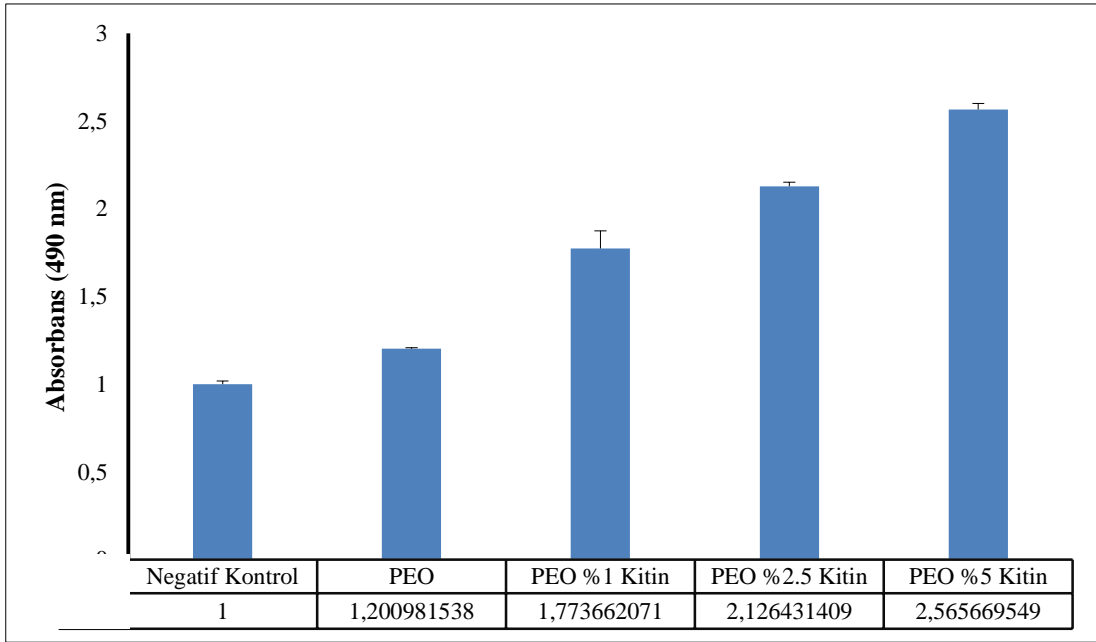
Sentezlediğimiz nanokompozitler ile inkübe edilmiş lenfosit hücrelerinin belirlediğimiz oranlarla inkübasyon sürelerinden sonra gerçekleştirilen MTS testi ile 490 nm’de verdikleri absorbanans verileri belirlenmiştir.

3.3.1.1 Kitin Konsantrasyonuna Göre MTS Testi Sonuçları

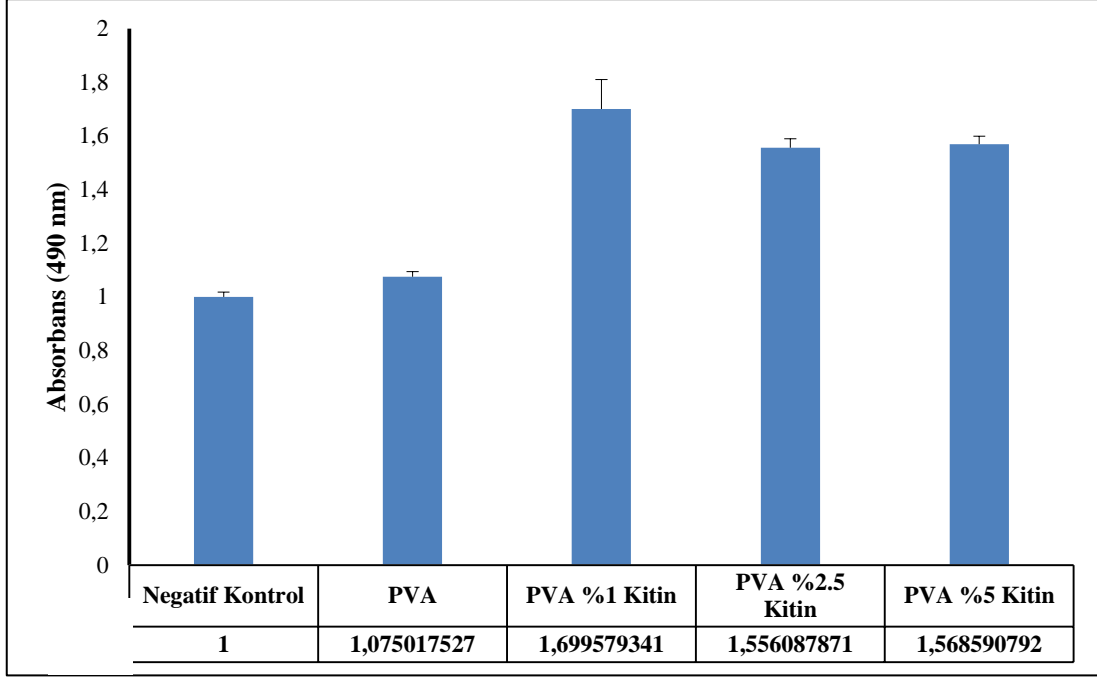
Farklı konsantrasyonlardaki kitin dolu maddesinin MTS testine ait absorbanans verileri Şekil 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29 ve 3.30’da gösterilmiştir.



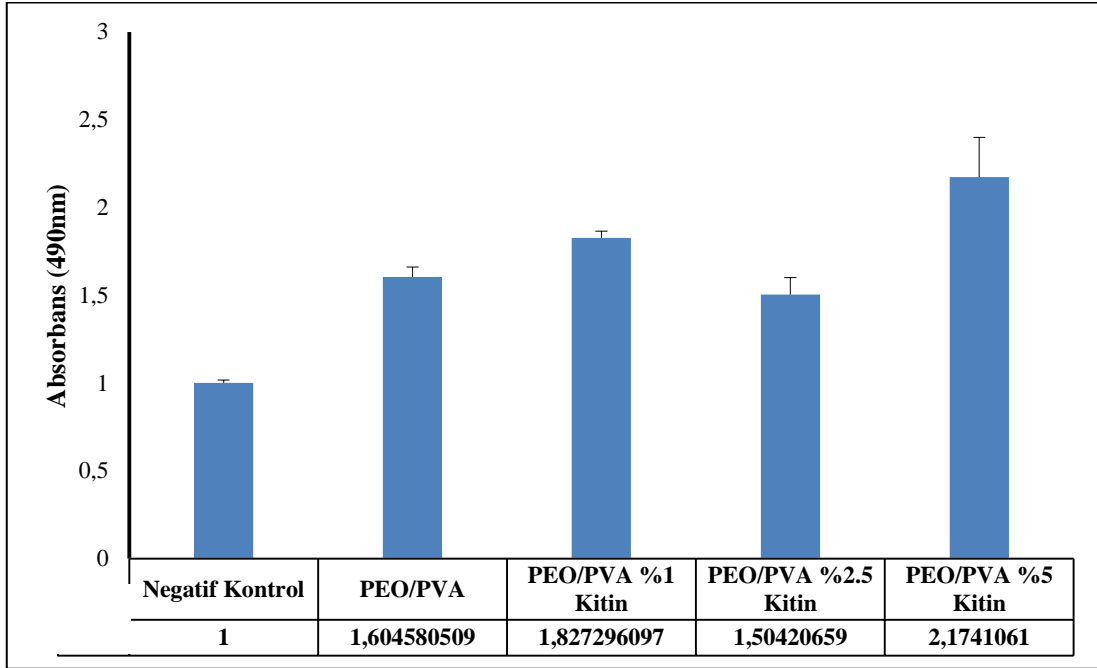
Şekil 3.19: Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



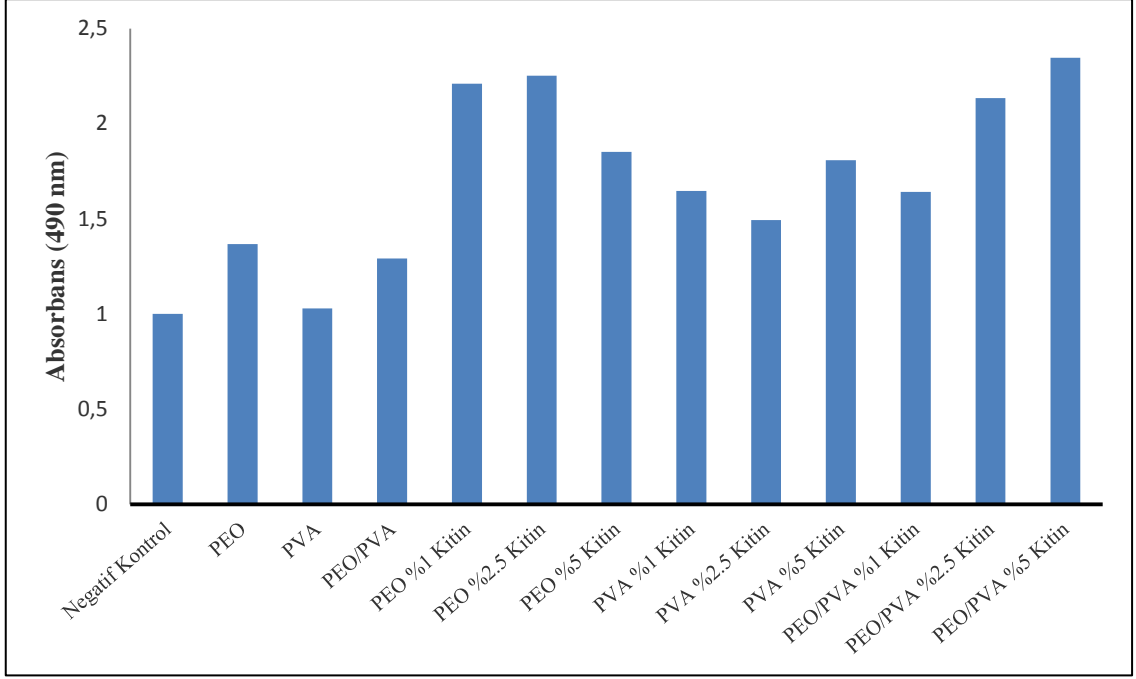
Şekil 3.20: PEO nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



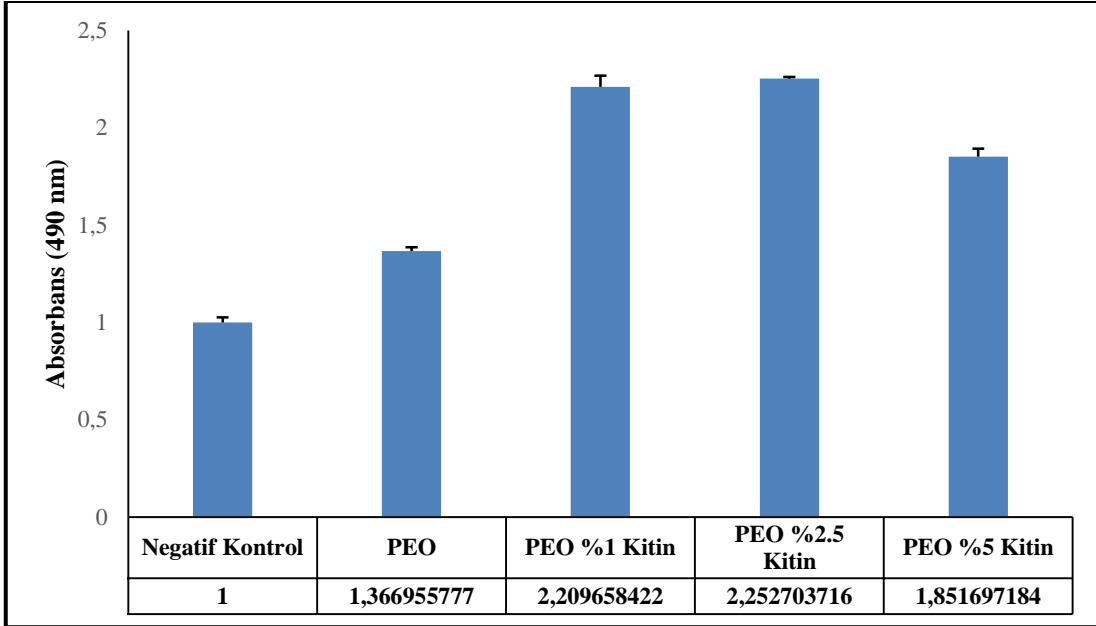
Şekil 3.21: PVA nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



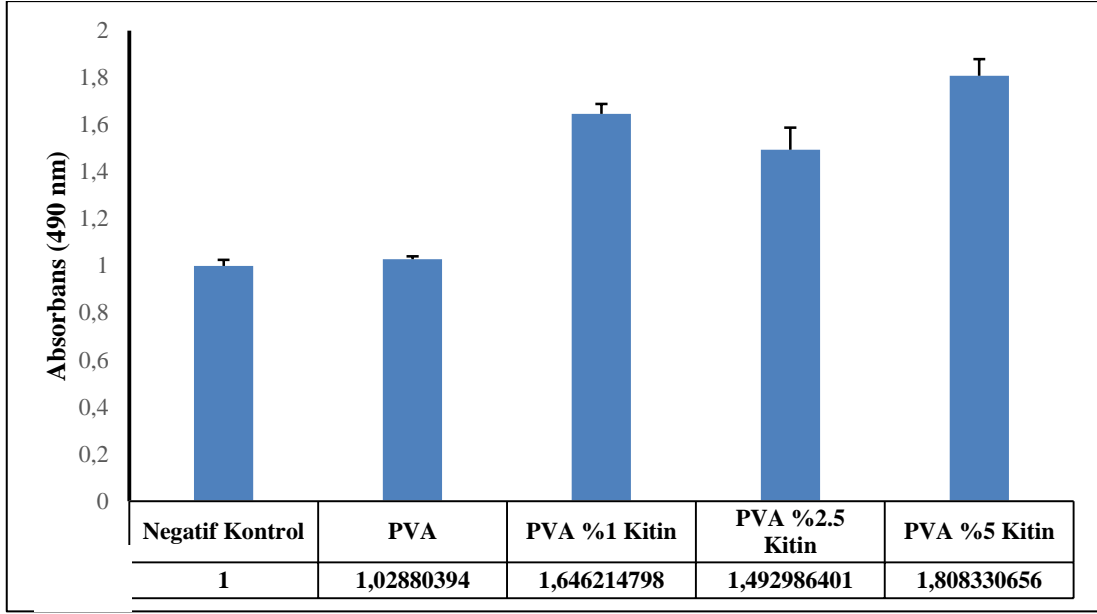
Şekil 3.22: PEO/PVA nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



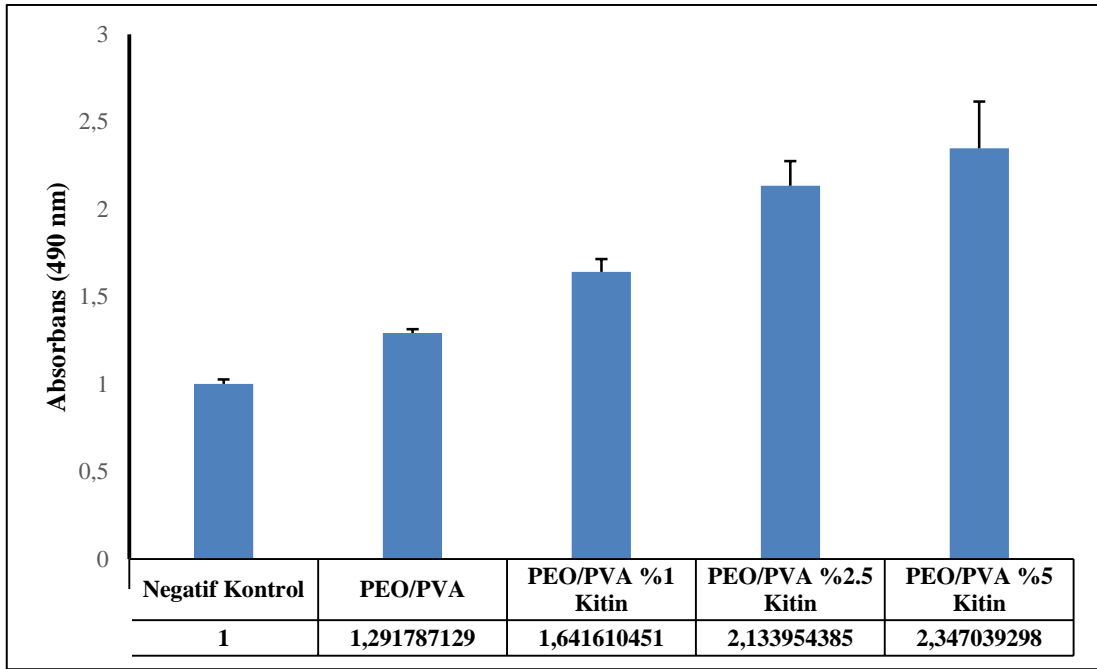
Şekil 3.23: Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verileri.



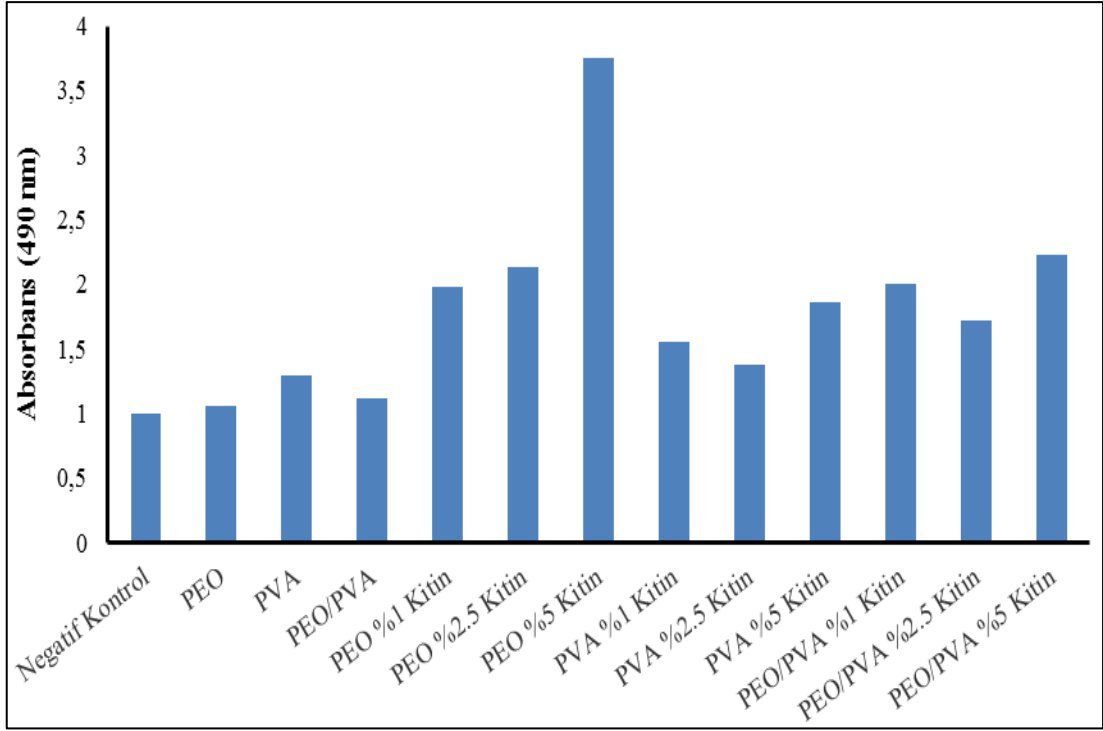
Şekil 3.24: PEO nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verileri.



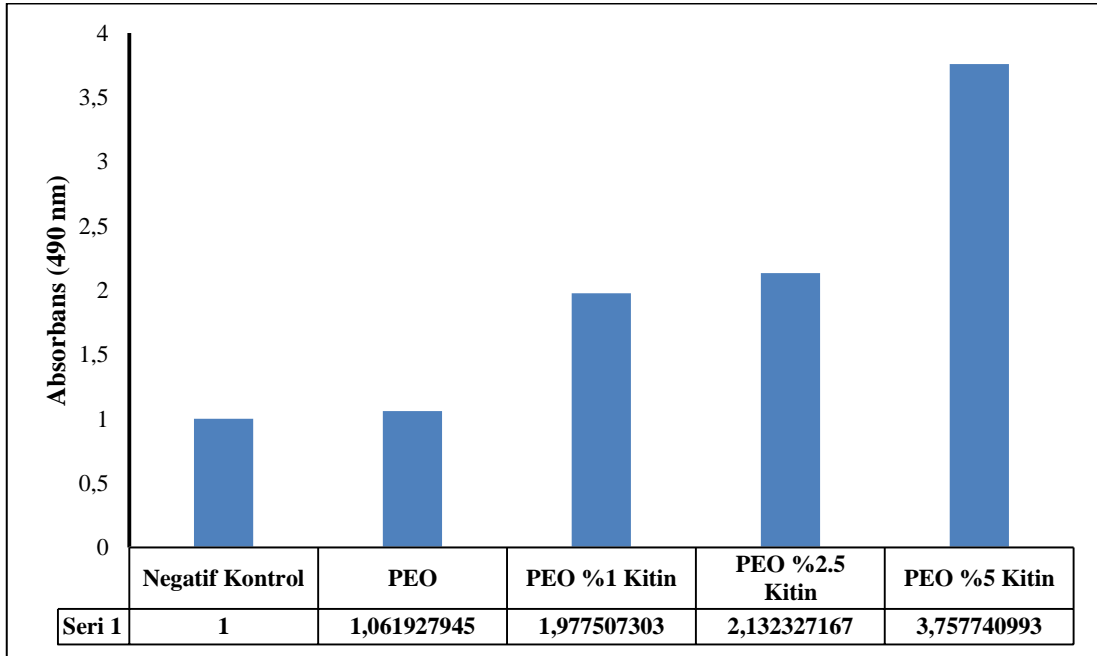
Şekil 3.25: PVA nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



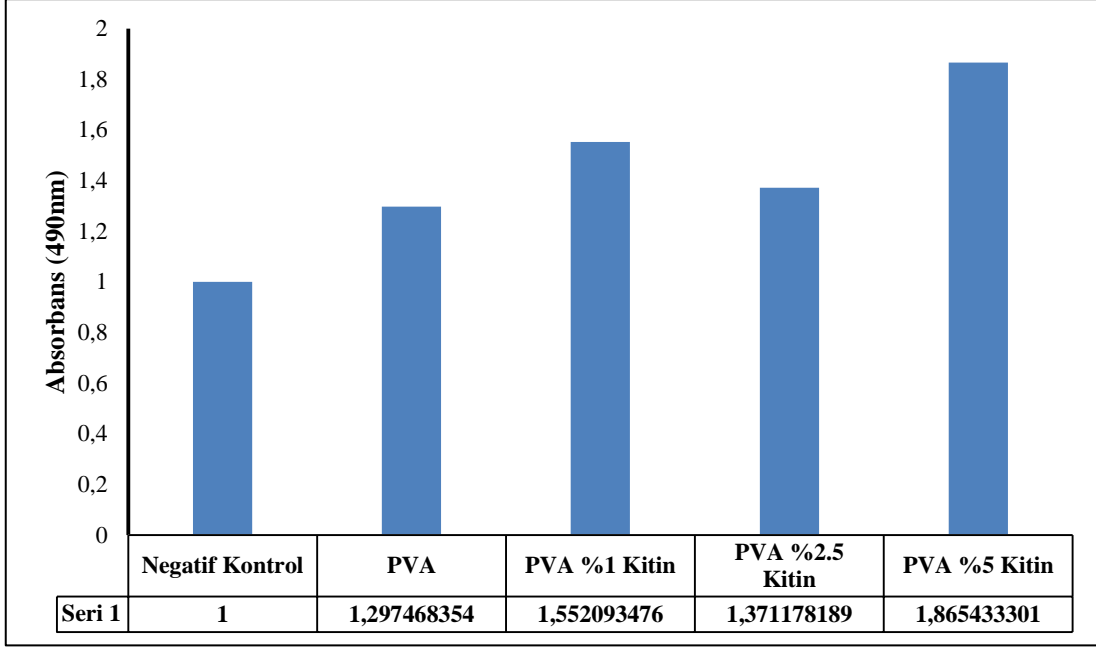
Şekil 3.26: PEO/PVA nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbands verileri.



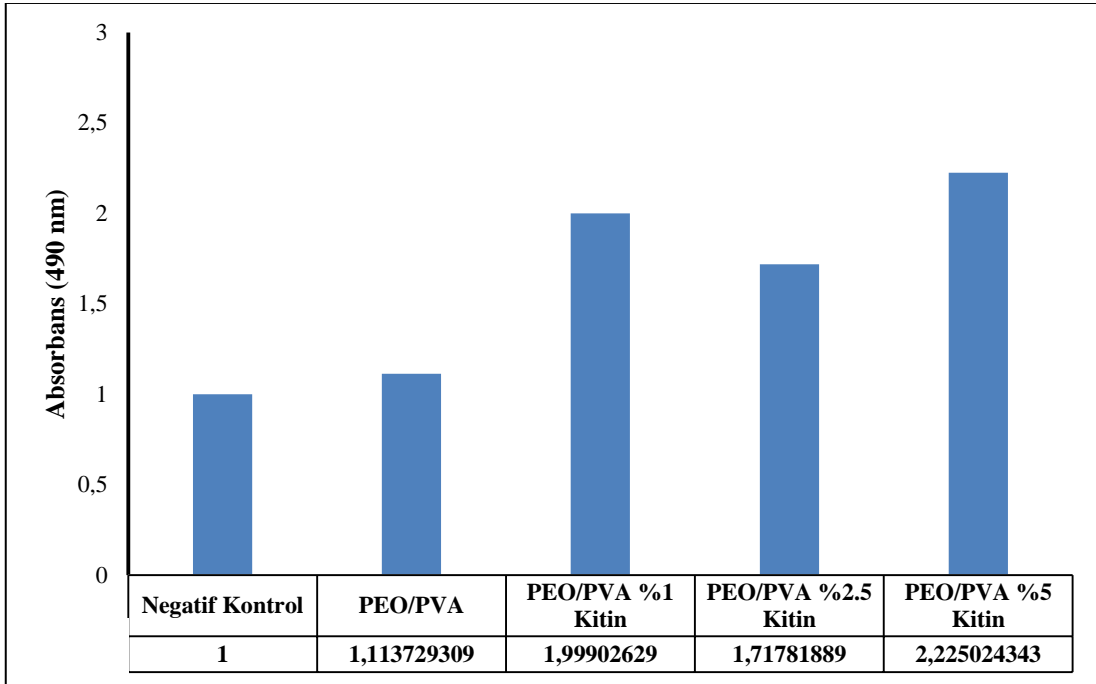
Şekil 3.27: Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verileri.



Şekil 3.28: PEO nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verileri.



Şekil 3.29: PVA nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorpsiyon verileri.



Şekil 3.30: PEO/PVA nanokompozitleri 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorpsiyon verileri.

3.4 Hemouyumluluk Analizi

Nanokompozitlere ve polimerlere ait hemouyumluluk değerleri Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.3: PEO ve PEO/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.

	PEO	PEO/kitin (%1)	PEO/kitin (%2.5)	PEO/kitin (%5)
% Hemoliz	0.08	0.01	0.02	0.01

Tablo 3.4: PVA ve PVA/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.

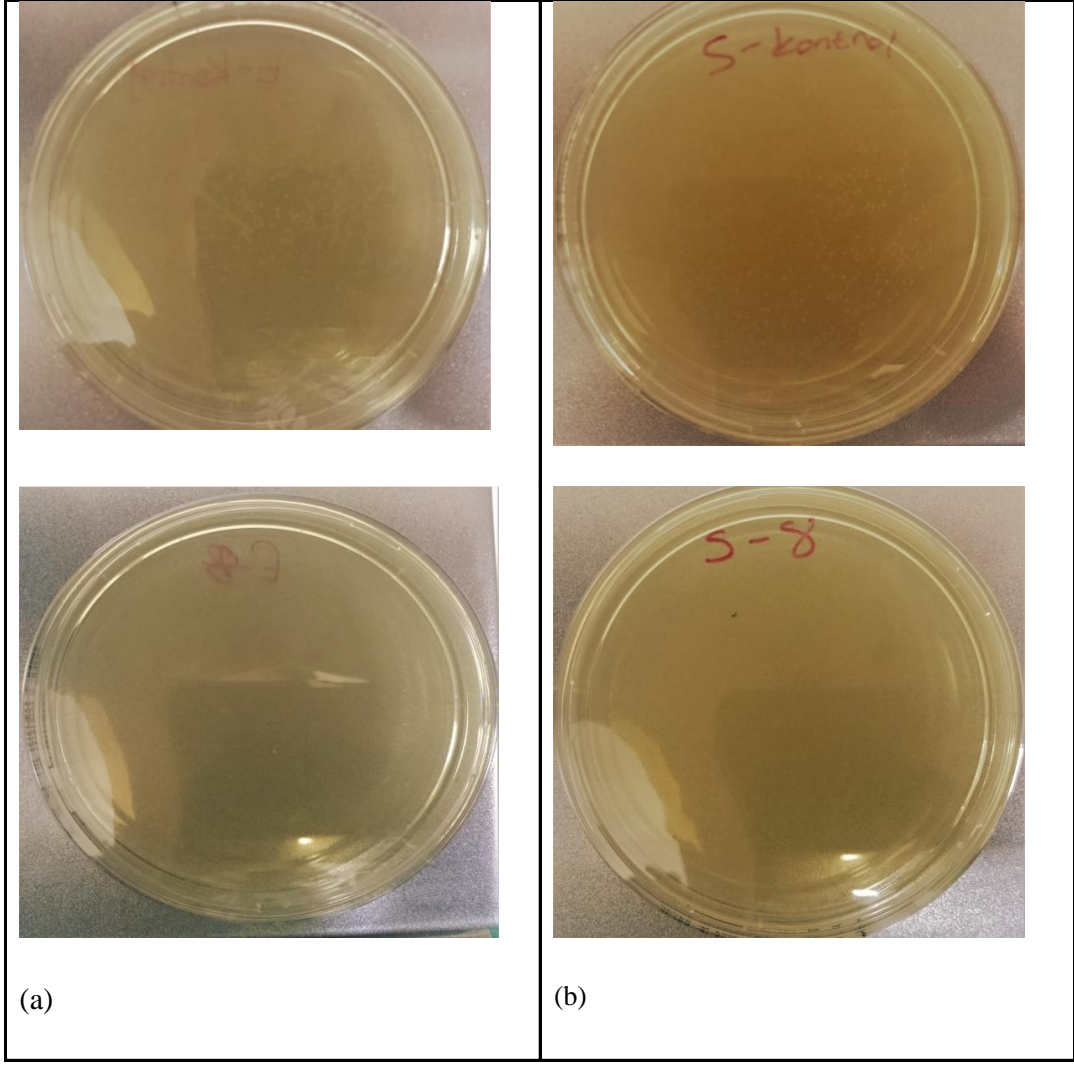
	PVA	PVA/kitin (%1)	PVA/kitin (%2.5)	PVA/kitin (%5)
% Hemoliz	5.01	10.31	9.51	5.08

Tablo 3.5: PEO/PVA ve PEO/PVA/kitin nanokompozit örneklerinin hesaplanan % hemoliz değerleri.

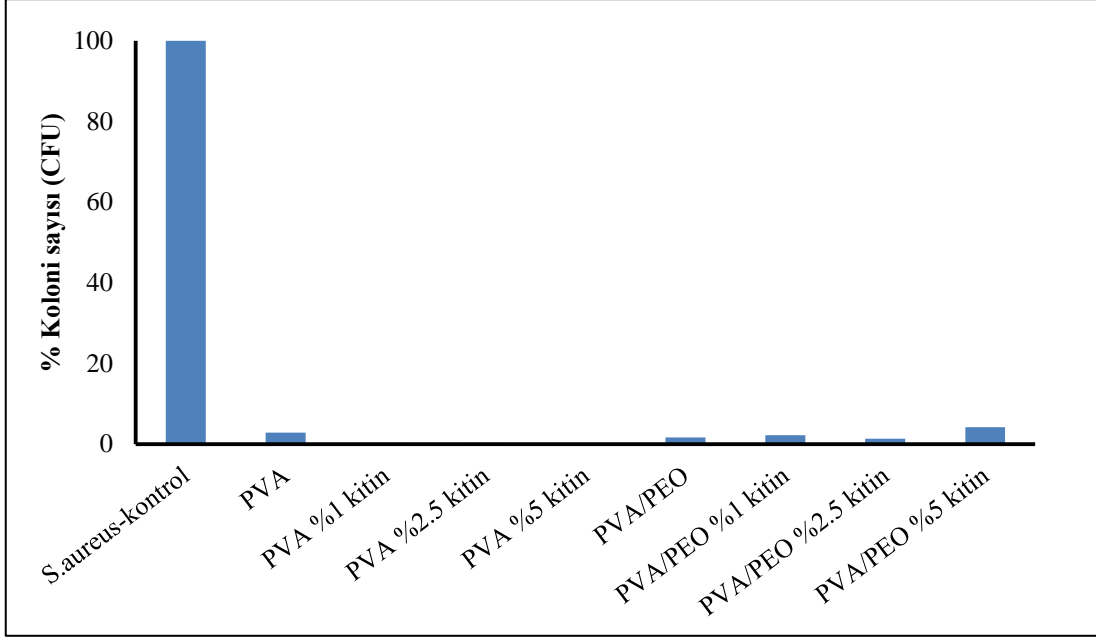
	PEO/PVA	PEO/PVA/kitin (%1)	PEO/PVA/kitin (%2.5)	PEO/PVA/kitin (%5)
% Hemoliz	23.32	0.01	25.33	17.60

3.5 Antibakteriyel Aktivite Testi

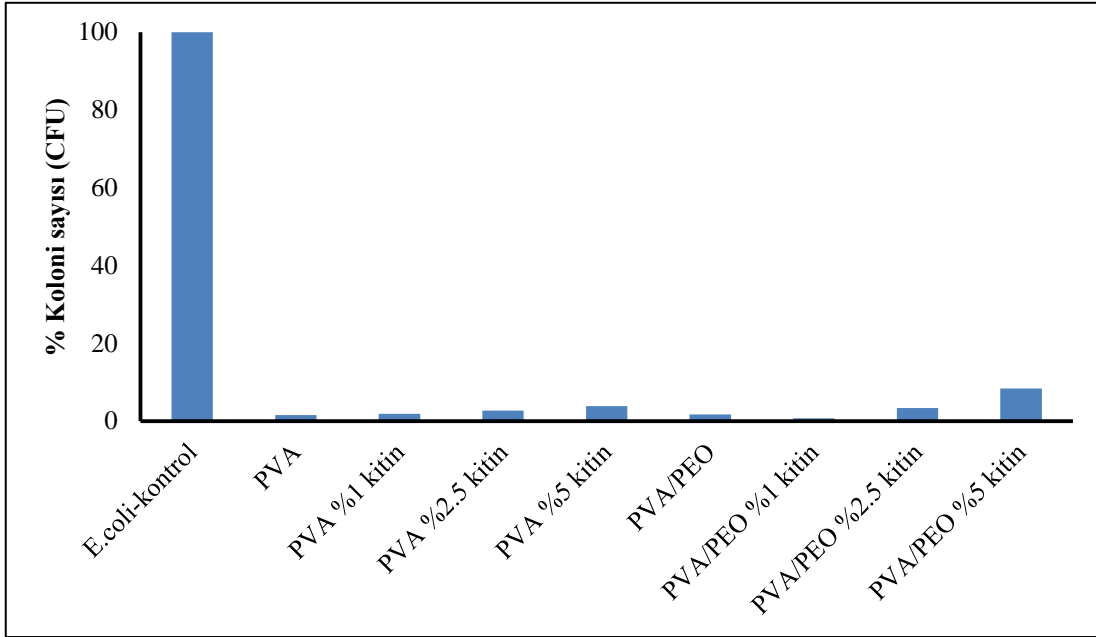
Nanokompozitlerin gram-negatif olan *Escherichia coli* ve gram-pozitif olan *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı olan antibakteriyel aktivitelerine ait fotoğrafları Şekil 3.31'de, grafikleri ise Şekil 3.32 ve 3.33'de verilmiştir. Nanokompozitlerin her iki bakteri türüne karşı antibakteriyel özellik gösterdiği Őekiller incelenerek anlaşılmaktadır.



Şekil 3.31: PVA/kitin (%5) nanokompozitinin *E. coli* (a) ve *S. aureus*'a (b) karşı antibakteriyel aktiviteleri ve her iki bakteri türüne ait kontrol örnekleri.



Şekil 3.32: PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin *S. aureus*'a karşı % antibakteriyel aktivite oranları.



Şekil 3.33: PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin *E. coli*'ye karşı % antibakteriyel aktivite oranları.

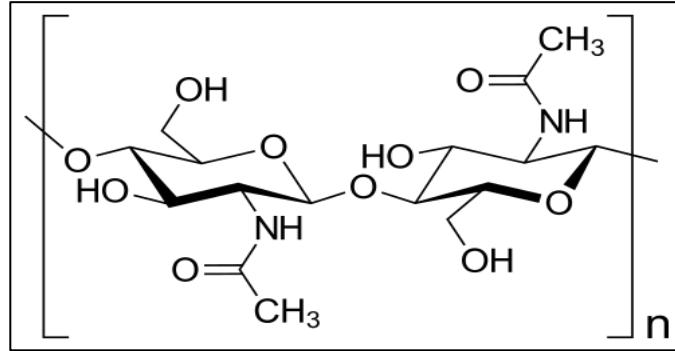
4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

4.1.1 PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin FTIR-ATR Sonuçları

FTIR-ATR spektroskopisi, sıvı, katı ve gaz halde olan maddelerin kimyasal yapılarının analizi için kullanılan karakterizasyon yöntemidir. 4000 cm^{-1} ve 650 cm^{-1} dalga sayıları arasında ölçüm yapan bu cihazdan, hızlı ve oldukça yüksek bir çözünürlükte spektrumlar elde edebilir. FTIR-ATR spektrumları ile maddelerin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi işlemleri gerçekleştirilir.

Şekil 3.1’de kitine ait FTIR-ATR spektrumu verilmektedir. Literatür incelendiğinde, *Caridea* kitinin karakteristik olan 3422 cm^{-1} ’deki bandı -NH ve -OH gruplarının gerilme titreşimlerine atfedilmektedir. 2876 cm^{-1} ’deki band ise alifatik C-H gerilme titreşimlerine aittir. Kitinin 1653 cm^{-1} ’deki karakteristik band karbonil C=O gerilmesine atfedilmektedir. 1375 cm^{-1} ’deki keskin band ise CH_3 grubunun eğilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1552 cm^{-1} ’deki band ise amid grubundaki N-H titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1067 cm^{-1} ’deki titreşim bandları kitin halkasının içindeki C-O-C gruplarının varlığını göstermektedir [38].



Şekil 4.1: Kitinin kimyasal yapısı.

Tablo 4.1: *Caridea* kitinin standart kitine kıyasla fonksiyonel grupları [39].

Grup	Standart kitin (cm^{-1})	<i>Caridea</i> kitin (cm^{-1})
OH	3448	3422
N-H esnemesi	3300-3250	3258
C-H esnemesi	2891,1	2876
C = O esnemesi	1680-1660	1653
N-H bükülmesi	1560-1530	1552
CH ₃	1419,5	1375
C-O-C	1072,3	1067
N-H	750-650	687

Şekil 3.4'te verilen FTIR-ATR spektrumu PEO/kitin nanokompozit oluşumuna aittir. FTIR-ATR ile nanokompozit oluşumunu açıklamak için polimerin IR spektrumu referans alınır. Nanokompozit IR spektrumundan beklenen saf polimerdeki bazı bantların kayması veya yeni bağ oluşumunu destekleyen yeni piklerin gözlenmesidir. Ayrıca nanokompozitte dolgu maddesinin IR spektrumlarından elde edilen piklerinin yer almaması gerekir. Çünkü nanokompozit IR spektrumunda dolgu maddesine ait pikin çıkması, polimer matrisi içerisinde kitinin yığın halinde kaldığını, disperse olmadığını ve homojen bir dağılıma gerçekleşmediğini açıklar. Bu spektrumlardan görüldüğü gibi 3422 cm^{-1} 'de kitine ait olan -OH fonksiyonel grubunun nanokompozit spektrumlarında var olmadığı ve titreşimlerdeki birkaç cm^{-1} 'lik kaymalar polimer matris-dolgu maddesi arasındaki etkileşimin kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni de matrisin ortamdaki miktarının çok fazla olması ve dolgu maddesinin (kitin) çok az olmasıdır. Ayrıca 3258 cm^{-1} 'deki kitine ait olan N-H gerilme bandının da var olmadığını göstermektedir. 2882 cm^{-1} 'deki C-H gerilmesini, 1466 cm^{-1} CH₃ ve CH₂ eğilme titreşimlerini ve 1279 cm^{-1} çıkan band ise C-N fonksiyonel gruplarının gerilme titreşimlerini göstermektedir.

Şekil 3.5'te PVA/kitin nanokompozitlerine ait FTIR-ATR spektrumları verilmektedir. Bu spektrumlardan görüldüğü üzere nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumları PVA matrisine benzemekle birlikte bir takım kaymalar görülmektedir. Bu bantlardaki kaymalar PVA ile kitin arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Özellikle OH- bandında yüksek oranda bir kayma mevcuttur ve artan dolgu maddesi miktarı ile artmaktadır. Bu durum etkileşim mekanizmasının bu fonksiyonel grup üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Şekil 3.6, PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumlarını göstermektedir. Bu nanokompozit oluşumunda eş değer oranda iki farklı polimer matrisi kullanılmıştır. Spektrumlar dikkatli incelendiğinde yine kaymanın gerçekleştiğini ve bu kaymanın gerçekleştiği bandın 3280 cm^{-1} 'de çıkan OH-fonksiyonel grubu üzerinden olduğu açıktır. Matrisin iki farklı polimerden oluşturulmuş olması matris-dolgu maddesi etkileşim mekanizmasını değiştirmemiştir.

4.1.2 PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin SEM Analizleri

Elektron mikroskopları, bir elektron kaynağından salınan elektronların numune ile etkileşimleri sonucunda elde edilen bulguların, algılayıcılar tarafından işlenerek görüntünün oluşmasını sağlarlar. Günümüzde SEM'in bir çok alanda görüntü ve numune analizi yapmak üzere kullanılmaya devam edilmektedir [39]. Yüksek çözünürlükte ve çeşitli yakınlaştırmalarda görüntü alır. Bu çalışmada 10 kV potansiyelde, çeşitli yakınlaştırma değerlerinde kitin ve nanokompozitlerin morfolojileri araştırılmıştır.

Şekil 15 ve 16'da yaklaşık olarak 6000 kat yakınlaştırma oranlarında elde edilmiş kitin örneklerine ait SEM fotoğrafı gösterilmektedir. Görüntü kitinin plakalı yapısını doğrulamaktadır.

SEM görüntüleri, matris içerisinde takviye edici malzemelerinin dağılımı hakkında kesin olan sonuçlar vermektedir.

PVA/kitin (%5), PEO/kitin (%5) ve PVA/PEO/kitin (%5) nanokompozitlerine ait SEM görüntüleri Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9'da verilmiştir. Fotoğraflardan da görüldüğü gibi kitin PVA, PEO ve PVA/PEO matrikslerinde homojen olarak dağılmıştır. Görüntüdeki aydınlık bölümler kitini, koyu bölgeler polimerleri göstermektedir. Sonuç olarak PVA, PEO ve PVA/PEO ve kitin ile hazırlanan nanokompozitler SEM görüntülerinden takviye edici malzemenin polimer içerisinde homojen olarak dağıldığı görülmektedir.

4.1.3 PVA/Kitin ve PEO/Kitin ve PVA/PEO/Kitin Nanokompozitlerinin Optik Temaz Açısı Analizleri

Çözücünün katı pellet üzerindeki davranışını sonucunu temas açısı ölçülerek hesaplanan bir yöntemdir. Sıvının katı pellet ile temas etme derecesi $\theta < 90^\circ$ ise hidrofilik özellikte, $\theta > 90^\circ$ ise de hidrofobik özellikte bir örnek olduğu tespit edilir [40]. PVA, PEO ve PVA/PEO'ya ait temas açıları Tablo 3.1'de verilmektedir. Bu veriler incelendiğinde ölçümlerin 65.17° ile 89.85° arasında değişiklik gösterdikleri saptanmıştır. Nanokompozitlere eklenen kitin oranı arttığında, temas açılarının değiştiği görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuca göre nanokompozitlerin saf PVA, saf PEO'e göre hidrofobik özelliklerinin azaldığı ve saf PVA/PEO'e göre kitin miktarı hidrofobik özelliğin artmasına sebep olmuştur. En yüksek hidrofobik özellik gösteren nanokompozit PVA/PEO/kitin (%1) örneğinde gözlenmiştir. Ancak PVA/PEO/kitin nanokompozitlerindeki kitin oranı arttığında hidrofobik özellik %1 kitin oranı içeren örneğe göre biraz düştüğü görülmüştür. Ayrıca, saf PVA/PEO kompozitindeki iki polimer arasındaki kimyasal etkileşim saf PVA ve saf PEO'e göre hidrofobik özelliği arttırdığı Tablo 3.1'de görülmektedir. Hidrofobiklik, sentezlenen malzeme suda hemen çözünmeyip kolay dağılmadığından yara örtü malzemesi olarak kullanıldığında istenilen bir özellik değildir.

4.2 Nanokompozitlerin Sitotoksosite Testi

Yapılan çalışmada, sentezlenen nanokompozitler sağlıklı ve gönüllü bireylerden alınan kandan izole edilerek elde edilmiş lenfosit hücreleri ile belirlenen bir zaman aralığında etkileşime sokulmuştur. Böylece elimizdeki hücrelerin canlılığı belirlendikten sonra hücrelerin yaşam periyodunda herhangi bir değişimin olup olmadığı araştırılmıştır.

Şekil 3.7, 3.11 ve 3.15'te sentezlenen nanokompozitlerin lenfosit hücreleri ile inkübasyon periyodları sonucunda gerçekleştirilen MTS testi sonucunda elde edilmiş absorbans verileri gösterilmiştir. PVA/kitin, PEO/kitin ve PVA/PEO/kitin nanokompozitleri ile etkileşime sokulmuş hücrelerde, tüm nanokompozitlerin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyod sonucunda kitin yüzde oranının (%1, %2.5 ve %5) artması ile doğru orantılı olarak yaşamlılığın da arttığı gözlenmiştir. Özellikle PEO %2.5 ve %5 ve ayrıca PEO/PVA %5 kitin katkılı nanokompozitlerin etkisi ile hücrelerdeki canlılığın önemli oranda devam ettiği görülmüştür. Örneklerimiz negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, absorbans verilerinde önemli bir artış görülmektedir. PVA'nın ve 72. saatteki PEO'nun negatif kontrol kontrol ile hemen hemen aynı olan grafik değerlerine bakılarak göstermiş olduğu az da olsa toksisitesinin kitin takviyesi ile giderildiği nanokompozitlerin durumundan anlaşılmaktadır. Çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre, nanokompozitlerin hücrelere sitotoksik etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Ve böylece de PEO/kitin, PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmalarda varılan sonuçlar literatürde yer alan çalışmalar ile uygunluk göstermektedir. Örneğin, Sanford ve arkadaşları kitinin kimyasal yapısından dolayı uygulanabilirliğin daha fazla olduğunu ve bunun nedeninin ise moleküler yapısının yüksek moleküler ağırlıklı polimer olduğundan ve amino gruplarının kimyasal reaksiyonlar ve asitlerle tuz oluşumu için hazır olan doğrusal bir poliamin olmasından kaynaklandığını söylemişlerdir [41]. Fan L ve arkadaşları gama radyasyonunu kullanarak PEO/PVA/kitin hidrojelleri hazırlamışlardır. Hidrojellerin kimyasal yapılarını FTIR-ATR kullanarak karakterize etmişler ve sonuç olarak PEO/PVA/kitin'in hidrojen bağları yardımıyla birbirlerine bağlandıklarını ve muhteşem bir şekilde uyumluluk gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Bu yapılan hidrojelilerin de iyi şişme özelliklerinin, su buharlaşma oranı ve mekanik özelliklerin de iyi olduğunu göstermişlerdir [34]. Jankovic ve arkadaşları ise polimer nanofiberlerin mekanik özelliklerinden yararlanıp kompozit olarak da bilinen fiber boyutunu değiştirerek Yaung'un modüllerini atomik güç mikroskobu kullanarak açıklamışlardır ve tek materyal olarak da PVA, PEO ve kompozit nanofiber olarak da PVA/hiyalüronik asit ve PEO/kitin kullanmışlardır. Sulu ortamlardaki erozyona karşı gösterdikleri direncin oldukça fazla olduğunu kanıtlamışlardır ve kemik, tendon ve kıkırdak dokular için yapılacak olan uygulamalarında yapı mühendisliğinde kullanılabilirliğinin uygun olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca PVA (6 GPa) ve PEO (3 GPa) olan nanofiberlerin de daha elastik olduklarını ve bunların da deri ve doku hasarı iskelesine en uygun olduklarını göstermişlerdir [42]. Khoo ve arkadaşları da hidrofilik olan PVA, PEO ve PVP polimerleriyle kitin karışımları yapmışlar ve oral dişeti dağıtım sistemleri için denekler araştırmışlardır. Denek olarak kullanılan köpeklerdeki çalışmalardan elde edilen kitin harmanı dağıtım sistemleri tarafından sağlanan biyoyararlanımın, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı hidrofilik polimerleri içeren harmanlar için, tek başına kitin bazlı olanlarla karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetri ve dinamik mekanik termal analiz sonuçları ve FTIR-ATR ve çekme testi sonuçları, PEO/kitin ve PVP/kitin karışımlarının ve incelenen tüm karışım oranlarında yanlış olduğuna dair kanıt gösterirken, sadece PVA/kitin karışımının (20:80) oranı hariç (50:50) ve (80:20) oranlarındaki karışımların kanıt olarak gösterilebileceğini ispatlamıştır. Çalışmada ayrıca, kitin karışımlarının sadece kitinin tek başına olduğundan daha üstün olduğunu belirtilmiştir. Bu özellikler arasında da yumuşatma özelliğinde artış, tahrişi azaltıcı, daha iyi film kalitesi, daha fazla esneklik ve daha fazla çözünme yer almaktadır. Kitinin farklı hidrofilik polimerler ile karışımları bu nedenlerden dolayı oral mukozal dağıtım sistemlerinde formülasyon için umut verici aday olabilir [35].

4.3 Nanokompozitlerin Hemouyumluluk Testi Sonuçları

Nanokompozit örneklerinin hemoliz testi sonucunda 545 nm’de elde edilen absorpsiyon verileri ile hesaplanmış % Hemoliz oranları Tablo 3, 4 ve 5’te verilmiştir. Shanthini G. ve arkadaşları, malzemelerin neden oldukları hemoliz oranları % 5’ten küçük ise oldukça hemouyumlu olduğunu, % 10’a kadar ise hemouyumlu olduğunu ve % 20’den fazla ise hemouyumlu olmayanlar olarak sınıflandırmışlardır [43]. Tablo 3.2’deki verilere göre tüm PEO/kitin nanokompozitlerinin % hemoliz değerleri % 5’ten küçük olduğu için hemouyumlu malzemeler sınıfına dâhil edilebilirler. Tablo 3.3’teki verilere bakıldığında % hemoliz değerleri açısından PVA/kitin (%1), PVA/kitin (%2.5) ve PVA/kitin (%5) olan nanokompozitler oldukça hemouyumlu malzemeler sınıfına dâhil edilebilirler. Tablo 3.4’e bakıldığında ise % hemoliz değerleri açısından PEO/PVA/kitin (%1), PEO/PVA/kitin (%2.5), PEO/PVA/kitin (%5) oldukça hemouyumlu olduğundan hemouyumlu malzemeler sınıfına dahil edilebilirler. Elde edilen sonuçlar literatür incelendiğinde daha önceki çalışmalar ile uyum içerisindedir. PEO, biyomedikal uygulamalarda kullanılan ve toksik olmayan bir polimerdir ve *in vitro* ortamlarda insan göbek damar endotel hücrelerinde (HUVECs) ve insan göbek arter düz kas hücrelerinde (HUASMCs) kullanıldığı bilinmektedir [44]. Ortama kitin eklenmesinin polimerin bu özelliklerine herhangi bir zarar vermediği, hemoliz değerlerine bakıldığında da polimer gibi nanokompozitlerin de hemouyumlu olduğu görülmektedir. Bu durum sentezlenen nanokompozitlerin vücut içerisinde kullanılabilmesini kanıtlamaktadır. Membranlardaki protein absorpsiyonu membranların hemouyumluluğunu değerlendirmede önemli bir faktördür [45, 46]. Membran yüzeyi ve protein arasındaki hidrofobik etkileşim yüzey protein absorpsiyonunda oldukça büyük etkisi olabilir [47]. PVA/kitin etkileşiminde kabul edilebilir protein absorpsiyonu olmuştur ve etkileri membran yüzeyi, hidrofilik polimer, sıklık, çözücü ortamı ve protein tipi arasındadır [48].

4.4 Nanokompozitlerin Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Nanokompozitlerin bakterisit etkileri *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı test edilmiştir. Her iki bakteri türüne karşı %1, %2.5 ve %5 oranlarında kitin içeren nanokompozitlerin antibakteriyel aktivite tayinleri Şekil 3.31 ve 3.32’de gösterilmiştir. Farklı oranlardaki nanokompozitlerin iki bakteri türünün gelişimini engellediği gözlenmiştir. Nanokompozitlerin antibakteriyel aktivitesi *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı %1, %2.5 ve %5 oranlarındaki bütün nanokompozitlerin çok etkili oldukları ve bakteri gelişimini %95 ve üzeri oranda durdurduğu Şekil 3.30, 3.31 ve 3.32’de görülmektedir. Gutha Y. ve arkadaşları kitin ve hidrofilik polimerlerden PVA ile geliştirdikleri çinko oksit bilye çalışmalarında yaptıkları antibakteriyel *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı inhibisyon zonu oluşumunu tespit etmişlerdir. Yapılan kompozit ile tek başına olan kitinden daha fazla bir zon oluşumu görülmüştür. Fare derisi üzerinde yaptıkları deneylerle yara kaplama denemelerinde kullanılan kompozit sayesinde güçlü bir antibakteriyel özellik, yara iyileştirme etkisi, hemouyumluluk ve biyouyumluluk olduğunu ispatlamışlardır. Elde edilen sonuç ise sentezlenen kompozitin antibakteriyel uygulamalarda kullanılmasını desteklemektedir [48]. Antibakteriyel bir özelliğe sahip olan kitinin sentezlenen nanokompozitlerde bu özelliğini devam ettirdiği ve hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerine karşı oldukça etkili antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, sonuçların literatürdeki çalışmalar ile olan uyumları çalışmamızın doğruluğunu ispatlamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Temas Açısı ve SEM görüntüleri, kitin partiküllerin PEO, PVA ve PEO/PVA polimerleri içerisinde homojen bir şekilde disperse olduğunu ve nanokompozit oluşumunun meydana geldiğini göstermektedir.
2. FTIR-ATR cihazından elde edilen nanokompozitlere ait spektrumlar kitinin IR spektrumu ile kıyaslandığında matriks ile takviye edici malzeme arasında bir etkileşme olduğu yeni piklerin oluşumu ve bazı bantlardaki kaymalardan gözlenmiştir.
3. PEO/kitin, PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin % hemoliz değerleri % 5 değerlerinden düşüktür. Buna bağlı olarak bu çalışmada sentezlenen tüm nanokompozitler oldukça hemouyumludur ve hemouyumlu malzemeler sınıfına dâhil edilebilirler.
4. *In vitro* olarak değerlendirdiğimiz bu çalışmada PEO, PVA ve PEO/PVA polimerlerinin kullanıldığı PEO/kitin, PVA/kitin ve PEO/PVA/kitin nanokompozitlerinin biyoyumlu olduğu ve kültür ortamlarındaki hücrelerde hiçbir toksik etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.
5. Antibakteriyel aktivite sonucuna göre nanokompozitlerin bakteriler üzerindeki etkileri oluşturdukları zonlar ile belirlenmiştir. *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerindeki etkileri oldukça iyi olduğu gözlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Jiang, B., Akar, B., Waller, T.M., Larson, J.C., Appel, A.A., and Brey, E.M., "Design of a Composite Biomaterial System for Tissue Engineering Applications", *Acta Biomaterialia*, 10(3), 1177-1186, (2014).
- [2] Patel, N.R. and Gohil, P., "A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance" *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2(4), 91-101, (2012).
- [3] Gümüşderelioğlu, M., "Yeni Ufuklara Biyomalzemeler", *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dersigi*, 4-23, (2002).
- [4] Bronzino, J.D., Wong, J.Y., and Peterson, D.R., "Biomaterials: Principles and Practices", *CRC Press*, (2012).
- [5] Parida, P., Behera, A., & Mishra, S. C. "Classification of Biomaterials used in Medicine", *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3), 125-129, (2012).
- [6] Gür, A., "Şekil Hafıza Özelliğine Sahip Ni-Ti Alaşımının Biyoyumluluğu", Yüksek Lisans Semineri, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalürji Eğitimi Anabilim Dalı*, (2003).
- [7] Güven, Ş.Y. and Delikanlı, K., "Metalik Biyomalzemelerde Son Gelişmeler", TİMAK-Tasarım İmalat Analiz Kongresi, (2006).
- [8] Güven, Ş.Y., "Biyoyumluluk Ve Biyomalzemelerin Seçimi", *SDÜ Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*; 2(3), 303-311, (2014).
- [9] Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., and Lemons, J.E., "Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor", *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 1-9, (2004).
- [10] Tüylek, Z., "Biyomateryaller Ve Sağlıkta Kullanımı", *Bozok Tıp Dergisi*, 7(4), 80-89, (2017).
- [11] Kainer, K., "Metal Matrix Composites: Custom-Made Materials for Automotive and Aerospace Engineering", *Wiley*, (2006),
- [12] Salernitano, E. and Migliaresi, C., "Composite Materials for Biomedical Applications: A Review", *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 1(1), 3-18, (2003).

- [13] Gökçek, E., "Ortopedik İmplant Ve Profitez Tasarımı İçin Biyomalzemelerin Mekanik Özelliklerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2006).
- [14] Doble, M. and Kumar, A., *Chapter 9 - Degradation of Polymers*, in *Biotreatment of Industrial Effluents*, M. Doble and A. Kumar, Editors. 2005, Butterworth-Heinemann: Burlington. p. 101-110.
- [15] Finch, C. A. (Ed.). *Polyvinyl alcohol: properties and applications* (p. 622). London: Wiley, (1973).
- [16] Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., and Müller, R.H., "'Stealth' Corona-Core Nanoparticles Surface Modified by Polyethylene Glycol (Peg): Influences of the Corona (Peg Chain Length and Surface Density) and of the Core Composition on Phagocytic Uptake and Plasma Protein Adsorption", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3), 301-313, (2000).
- [17] Brittain, H. G. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology* (Vol. 41). Academic Press, (2016).
- [18] Jin, X., Ruiz Beguerie, J., Sze, D.M., and Chan, G.C., "Ganoderma Lucidum (*Reishi Mushroom*) for Cancer Treatment", *Cochrane Database Syst Rev*, 4: Cd007731 (2016).
- [19] Turhan, Y., "Kil/Polivinil Türevleri Nanokompozitlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu" Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, (2010).
- [20] Yakupoglu, G. and Peksen, A., "Çay Atığından Hazırlanan Farklı Kompost Ve Partikül Büyüklüğünün Ganoderma lucidum Mantarının Verimi Ve Bazı Morfolojik Özellikleri Üzerine Etkisi" *Ekoloji*, 20(78), 41-47 (2011).
- [21] Piner, R.D., Xu, T.T., Fisher, F.T., Qiao, Y., and Ruoff, R.S., "Atomic Force Microscopy Study of Clay Nanoplatelets and Their Impurities", *Langmuir*, 19(19), 7995-8001, (2003).
- [22] Kornmann, X., "Synthesis and Characterisation of Thermoset-Clay Nanocomposites", Published PhD Thesis, Luleå tekniska universitet. (1999).
- [23] Uzun, İ. and Bayındır, F., "Testing Procedures for Biocompatibility of Dental Materials", *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28, 115-22 (2011).

- [24] Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., and Zucco, F., "Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures", *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*, 41, 75-82, (1990).
- [25] Yılmaz, B. "PMMA/Nanohidroksiapatit Nanokompozitlerinin Sitotoksik Etkilerinin ve Hemouyumluluğunun Araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2015).
- [26] Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G., "Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo", *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517-5527, (2015).
- [27] Kümbüloğlu, Ö. and Oral, O., "Biyomateryaller", *Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 34(1), 27-33, (2013).
- [28] Karaul, A., "Dental Restoratif Malzemelerin Sitotoksitesine Işık Kaynağının Ve Hidroksiapatit İlavesinin Etkilerinin İncelenmesi", Doktora Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. (2008).
- [29] Cai, X., Yuan, J., Chen, S., Li, P., Li, L., and Shen, J., "Hemocompatibility Improvement of Poly (Ethylene Terephthalate) Via Self-Polymerization of Dopamine and Covalent Graft of Zwitterions", *Materials Science and Engineering*, 36, 42-48 (2014).
- [30] Gürtürk, S., "Viroloji". Fırat Üniversitesi (1977).
- [31] Koziara, J., Oh, J., Akers, W., Ferraris, S., and Mumper, R., "Blood Compatibility of Cetyl Alcohol/Polysorbate-Based Nanoparticles", *Pharmaceutical Research*, 22(11), 1821-1828, (2005).
- [32] Kenawy, E.-R., Worley, S.D., and Broughton, R., "The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review", *Biomacromolecules*, 8(5), 1359-1384 (2007).
- [33] Schlichting, K., Dahne, M., and Weiler, A., "Biodegradable Composite Implants", *Sports medicine and arthroscopy review*, 14(3), 169-176 (2006).
- [34] Punke, C., Zehlicke, T., Boltze, C., and Pau, H.W., "Experimental Studies on a New Highly Porous Hydroxyapatite Matrix for Obliterating Open Mastoid Cavities", *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 29(6), 807-811, (2008).

- [35] Mishra, R. and Militky, J., 6 - *Nanocomposites*, in *Nanotechnology in Textiles*, R. Mishra and J. Militky, Editors. 2019, Woodhead Publishing. p. 263-310, (2018).
- [36] Jong, S. and Birmingham, J., *Medicinal Benefits of the Mushroom Ganoderma*, in *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier. p. 101-134, (1992).
- [37] Serinçay, H., Özkan, S., Yılmaz, N., Koçyiğit, S., Uslu, İ., Gürcan, S., and Arısoy, M., "Pva/Paa-Based Antibacterial Wound Dressing Material with *Aloe vera*", *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 52(13), 1308-1315, (2013).
- [38] Puspawati, N.M. and Simpen, I.N., "Optimasi Deasetilasi Khitin Dari Kulit Udang Dan Cangkang Kepiting Limbah Restoran Seafood Menjadi Khitosan Melalui Variasi Konsentrasi Naoh", *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 4(1), 79-90, (2010).
- [39] Motlagh, D., Allen, J., Hoshi, R., Yang, J., Lui, K., and Ameer, G., "Hemocompatibility Evaluation of Poly(Diol Citrate) in Vitro for Vascular Tissue Engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A(4), 907-916, (2007).
- [40] Ururahy, M.S., Curylofo-Zotti, F.A., Galo, R., Nogueira, L.F., Ramos, A.P., and Corona, S.A., "Wettability and Surface Morphology of Eroded Dentin Treated with Chitosan", *Arch Oral Biol*, 75, 68-73 (2017).
- [41] Fan, L., Yang, J., Wu, H., Hu, Z., Yi, J., Tong, J., and Zhu, X., "Preparation and Characterization of Quaternary Ammonium Chitosan Hydrogel with Significant Antibacterial Activity", *Int J Biol Macromol*, 79, 830-6 (2015).
- [42] Khoo, C.G., Frantzich, S., Rosinski, A., Sjostrom, M., and Hoogstraate, J., "Oral Gingival Delivery Systems from Chitosan Blends with Hydrophilic Polymers", *Eur J Pharm Biopharm*, 55(1), 47-56, (2003).
- [43] Shanthini, G.M., Martin, C.A., Sakthivel, N., Veerla, S.C., Elayaraja, K., Lakshmi, B.S., Asokan, K., Kanjilal, D., and Kalkura, S.N., "Physical and Biological Properties of the Ion Beam Irradiated Pmma-Based Composite Films", *Applied Surface Science*, 329, 116-126, (2015).

- [44] Wei, Z., Tian, P., Liu, X., and Zhou, B., "Hemocompatibility and Selective Cell Fate of Polydopamine-Assisted Heparinized Peo/Plla Composite Coating on Biodegradable Az31 Alloy", *Colloids Surf B Biointerfaces*, 121, 451-60 (2014).
- [45] Li, L., Cheng, C., Xiang, T., Tang, M., Zhao, W., Sun, S., and Zhao, C., "Modification of Polyethersulfone Hemodialysis Membrane by Blending Citric Acid Grafted Polyurethane and Its Anticoagulant Activity", *Journal of Membrane Science*, 405-406, 261-274, (2012).
- [46] Wang, L.R., Qin, H., Nie, S.Q., Sun, S.D., Ran, F., and Zhao, C.S., "Direct Synthesis of Heparin-Like Poly(Ether Sulfone) Polymer and Its Blood Compatibility", *Acta Biomaterialia*, 9(11): 8851-8863 (2013).
- [47] Lin, W.-C., Liu, T.-Y., and Yang, M.-C., "Hemocompatibility of Polyacrylonitrile Dialysis Membrane Immobilized with Chitosan and Heparin Conjugate", *Biomaterials*, 25(10), 1947-1957 (2004).
- [48] Gutha, Y., Pathak, J. L., Zhang, W., Zhang, Y., & Jiao, X. Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO). *International journal of biological macromolecules*, 103, 234-241, (2017).