

**Yara Örtüsü Uygulamaları İçin *Equisetum Arvense* Özütü  
Yüklü Biyomalzemelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

**Proje No: 111M408**

Doç.Dr. Oğuz BAYRAKTAR  
Mehmet Emin USLU  
İpek ERDOĞAN

AĞUSTOS 2012  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu projede, yara iyileşme sürecini hızlandırabilen; fonksiyon ve şekil bakımından doğal dokunun yerini alabilen; ve yara iyileşme sürecini takiben toksik madde bırakmadan bozunabilen bir yara örtüsü olma potansiyeline sahip gözenekli bir biyo malzeme elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sürecinde amaçlanan özellikler doğrultusunda oluşturulan biyomalzeme için biyoyumluluğu yüksek ipek fibroin ile ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olan hyaluronik asit karışımı kullanılmıştır. Yara bölgesinin sahip olduğu mikrobiyal floranın ve reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması yara iyileşme sürecini hızlandıracığından, biyomalzemedeki antioksidan ve antimikrobiyal madde salımının gerçekleşmesi de göz önünde bulundurulmuş bir kriterdir. Bu bağlamda yara örtüsüne antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri olduğu ortaya çıkarılan *Equisetum arvense* özütü eklenmiş ve salım sonrası özüt aktivitesi, antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite bakımından incelenmiştir. Proje, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

İçindekiler .....	iii
Tablo ve şekiller listeleri .....	v
Özet .....	vi
Abstract .....	vii
Bölüm 1. Giriş .....	1
Bölüm 2. Genel Bilgiler .....	3
2.1. Yara, türleri ve iyileşme aşamaları .....	3
2.2. Yara iyileştirme materyalleri ve yara örtüleri .....	4
2.3. Köpük form yara örtüleri .....	7
2.4. İpek fibroin: yapısal özellikleri .....	8
2.5. Hyaluronik asit .....	9
2.6. <i>Equisetum arvense</i> :Antioksidan etki ve antimikrobiyal aktivite .....	9
Bölüm 3. Gereç ve yöntemler .....	11
3.1. <i>Equisetum arvense</i> özütleme optimizasyonu ve özüt karakterizasyonu .....	11
3.1.1. Özütleme .....	11
3.1.2. Özüt karakterizasyonu .....	12
3.1.2.1. Toplam fenol miktarı.....	12
3.1.2.2. Antioksidan aktivite tayini .....	12
3.1.2.3. Antimikrobiyal aktivite tayini .....	12
3.1.2.3.1. Disk difüzyon yöntemi .....	12
3.1.2.3.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK).....	13
3.1.2.4. Hücre kültürü ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesi .....	13
3.2. Köpük malzemenin oluşturulması .....	15
3.2.1. Ham ipeğin serisinden uzaklaştırılması ve ipek çözeltisinin hazırlanması .....	15
3.2.2. Hyaluronik asit-ipek fibroin karışımı ile köpük formun oluşturulması .....	15
3.3. Biyomalzemenin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	16

3.4. Biyomalzemenin salım özellikleri ve salım sonrası aktivite belirlenmesi .....	16
3.5. Biyomalzemenin sitotoksik etkisinin araştırılması .....	16
3.6. Hücre-biyomateryal entegrasyonu .....	17
Bölüm 4. Bulgular .....	17
4.1. Özüt karakterizasyonu .....	17
4.1.1. Toplam fenol miktarı .....	17
4.1.2. Antioksidan aktivite tayini .....	18
4.1.3. Antimikrobiyal aktivite tayini .....	18
4.1.3.1. Disk difüzyon yöntemi .....	18
4.1.3.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) .....	20
4.1.4. Hücre kültürü ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesi .....	23
4.2. Biyomalzemenin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	26
4.3. Biyomalzemenin salım özellikleri ve salım sonrası aktivite belirlenmesi .....	27
4.3.1. Biyomalzemenin salım sonrası toplam fenol ve antioksidan miktarı .....	28
4.3.2. Biyomalzemenin antimikrobiyal etkisinin araştırılması ..	30
4.3.3. Biyomalzemenin sitotoksik etkisinin araştırılması .....	32
4.4. Hücre-biyomateryal entegrasyonu .....	32
Bölüm 4. Tartışma/Sonuç .....	33
Referanslar .....	38
Ekler .....	43

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 1. Yara iyileştirici materyaller .....	5
Tablo 2. Deney değişkenleri ve bağlı seviyeler.....	11
Tablo 3. Oluşturulan biyomalzemelerin içerik özellikleri ve örneklere verilen kodlar.....	16
Şekil 1. <i>C. Albicans</i> için disk difüzyon testinde oluşan alanlar.....	18
Şekil 2. <i>E.Coli</i> için disk difüzyon testinde oluşan alanlar .....	19
Şekil 3. <i>S.Epidermidis</i> için disk difüzyon testinde oluşan alanlar .....	19
Tablo 4. Tüm patojenler için etkili olan özüt örneklerinin ölçülen temiz alanların milimetre olarak değerleri .....	20
Şekil 4. <i>C. Albicans</i> için büyüme eğrisi .....	21
Şekil 5. <i>E. Coli</i> için büyüme eğrisi.....	21
Şekil 6. <i>S. Epidermidis</i> için büyüme eğrisi .....	22
Tablo 5. Patojenler büyümelerini engellemek için örneklerde gerekli olan minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	23
Şekil 7. <i>Equisetum arvense</i> özütünün NIH3T3 fibroblast hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki.....	24
Tablo 6. Sitotoksik aktivitenin canlılık yüzdesi üzerinden gösterimi.....	25
Şekil 8. Biyomalzemelerin SEM görüntüleri. ....	27
Tablo 7. Biyomalzemelerin Salım Sonrası Toplam Fenol Miktarları .....	29
Tablo 8. Biyomalzemelerin Salım Sonrası Antioksidan Aktiviteleri .....	29
Şekil 9. 96 saatlik salım ortamlarının <i>E. coli</i> üzerindeki etkisi.....	30
Şekil 10. 96 saatlik salım ortamlarının <i>S.epidermidis</i> üzerindeki etkisi .....	31
Şekil 11. 96 saatlik salım ortamlarının <i>C. albicans</i> üzerindeki etkisi .....	31
Şekil 12. Malzeme özütünün 24 ve 48 saatte hücre canlılığına etkisi.....	32
Şekil 13. Biyomalzemeler üzerine hücre tutunmasını gösteren SEM görüntüleri.....	33

## ÖZET

Yara, deride fiziksel, ısı kaynaklı veya fizyolojik bir etken nedeniyle oluşan tahribatı tanımlamak için kullanılmaktadır. Yara iyileşmesi farklı tip hücreler ve dokuyu oluşturan bileşenlerin, çevresel sinyallere verdikleri tepkiler ile ilerlemektedir. Yara iyileştirme terimi lokal farmasötik formülasyonlardan sentetik bandaj gibi geleneksel yara örtülerinden modern uygulamalar olan doku destek malzemelere kadar uzanan bir aralığı kapsamaktadır. Modern yara iyileştirici malzemeler olarak tanımlanan yara örtüleri sentetik veya biyolojik malzemelerden üretilebilmektedirler. Günümüzde modern yara örtülerine salım özellikleri de kazandırılarak fonksiyonellik kazandırılmaktadır. Bu sayede yara kapatıcı olmaktan bir adım ileri giden yara örtüleri, tedavi edici özelliğe sahip olmakta ve epitel dokunun yeniden oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler. Yüksek absorpsiyon kapasitesine ve mukavemete sahip, esnek özellik gösteren köpük malzemeler, ideal yara örtüsü özellikleri göstermektedirler. İpek fibroin sahip olduğu biyo-uyumluluk, biyobozunurluk ve düşük enflamasyon riski ile doğal polimerler içinde biyomalzeme olarak kullanıma aday bir polimerdir. Hyaluronan içeren matriks yapı doku hasarı meydana geldiğinde fibroblast ve endotelial hücrelerin yara bölgesine göçünü desteklemekte ve doku oluşum faaliyetini başlatmaktadır. Günümüzde bitki özütleri, sahip oldukları antimikrobiyal ve antioksidan özellikler nedeniyle salım yapan aktif madde olarak tercih edilmektedirler. Bu bağlamda antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri üzerinde çalışılan *Equisetum arvense*, ya da bilinen adıyla Atkuyruğu bitkisi, köpük malzemelere eklenerek salım yapabilmeye aday bir özüt olarak ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda ipek fibroin içerisine eklenen hyaluronan miktarı arttıkça yapının kuvvetlendiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında bitki özütü içeriğinde var olan fenolik bileşiklerin ipek proteinleriyle etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Artan özüt konsantrasyonuna ters orantılı olarak köpük malzemenin mekanik mukavemetinin azaldığı görülmüştür. Malzemenin gözenek yapısındaki artış ve pürüzlü yapıdaki azalma ise hücre tutunmasını arttıran etkenler olarak gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : *Equisetum arvense*, İpek fibroin, hyaluronan, antioksidan, fenolik bileşik, Köpük malzeme

## ABSTRACT

Wound is used to define the injury on skin as a result of heat, physical damage or physiological factors. Wound healing progressed as different type of cells and tissue component response to the environmental signals. Wound healing term includes the range from local pharmaceutical formulations to tissue support materials. Wound dressings, named as modern wound healing materials can be produced from synthetically or biological materials. Today modern wound dressings gain the release properties therefore they gain the functionality. By this, the wound dresses are one step ahead from wound closure material, they can gain the therapeutic property and contribute to the formation of new epithelial tissue. The sponge materials that have high absorption capacity and have elastic property with a high tensile strength, show ideal wound dressing features. Silk fibroin is one of the candidate polymer for biomaterial usage with its biodegradability, biocompatibility and low inflammation risk properties. Matrix structure which contains hyaluronan starts the tissue formation and supports migration of fibroblast and endothelial cells to the wound area when tissue damage occurs. Therefore today, by possessing antioxidant and antimicrobial properties, the plant extracts are used as active materials in release process. In this sense *Equisetum arvense* is one of the candidate extract for its studied antioxidant and antimicrobial properties, to add in the sponge materials for release. In this project it was found that as the hyaluronan concentration increases in the sponge material, the mechanical strength was also increased. Also it was reported that the phenolic contents of the extract was interacted with the proteins of silk and formed a precipitate. As the extract concentration increases the mechanical strength of the sponge material decreases. Finally it was seen that the pore formation and the roughness were the two important parameters for cell adhesion.

Key words: *Equisetum arvense*, Silk fibroin, hyaluronan, antioxidant, phenolics, sponge material

## 1. GİRİŞ

Yara, deride fiziksel, ısı kaynaklı veya temelde yer alan fizyolojik bir etken nedeniyle oluşan tahribatı tanımlamak için kullanılmaktadır. Enflamasyon, doku hasarından hemen sonra gerçekleşir, bağışıklık sistemi kan ve doku sıvısı kayıplarını engellemek, canlı olmayan dokuları bertaraf etmek ve enfeksiyonun önüne geçmek için alarm konumuna geçer. Trombositler ve fibrin matriks, birlikte destek yapı oluşturarak kanı durdurmaya çalışırlar. Kanamayı durdurma aşaması hemostaz olarak adlandırılmaktadır. Travma ile birlikte çeşitli faktörlerin kana salınması sonucunda aktif hale gelen trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtı oluşumunu sağlar, yaralı bölge kapanır, kanın sistem dışına akışını durdurulur ve bölgenin iyileşmesine imkân sağlanır. Yeni doku oluşumu, yara iyileşmesinde ikinci aşamayı oluşturur ve yaralanmadan yaklaşık 2 ile 10 gün sonra gözlenmeye başlar. Bu aşamada hücre çoğalması ve göçü ön plandadır. Yara oluşumundan yaklaşık 2 ile 3 hafta sonra başlayan yeniden biçimlenme, en son ve en uzun süren aşamadır. Bakterilerin varlığı yara bölgesine lökositlerin göç etmesine ve bu bölgenin yüksek miktarda proteaz ve oksitleyici madde içerir. Bakterilerin varlığı yara bölgesine lökositlerin göç etmesine ve bu bölgenin yüksek miktarda proteaz ve oksitleyici madde içermesine sebep olmaktadır. Oksidan üretici enzimler spesifik olarak bakteri ölümüne yol açarlar, ancak yara bölgesinde gözlenen bölgesel anemi ve buna bağlı olarak gelişen hipoksi nedeniyle sözü geçen enzimler verimli çalışamaz ve bakteri kolonileri canlılığını yitirmiş dokuyu besin kaynağı olarak kullanarak çoğalır. Yaranın doğal iyileşme sürecinde oluşan fibröz yara dokusu, elastik fiberlerden yoksun olup myoblast içeriklidir. Yara iyileştirilmesinde amaçlanan, iyileşme sürecini hızlandırmak, fibröz yara dokusu oluşumunu elimine ederek gerek fonksiyon gerek yapısal olarak orijinal doku benzeri yapılar oluşturulmasını sağlamaktır. Bu amaca yönelik olarak deriyi ikame edecek özellikte materyaller üretilerek çağdaş tedavi yolları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Modern yara iyileştirici materyaller olarak tanımlanan yara örtüleri sentetik veya biyolojik materyallerden üretilebilmektedirler. Doğal polimerlerden üretilen materyaller, beraberinde kontaminasyon riski ve doku reddini taşıyan allograft ve heterograftlara göre daha avantajlı kullanım sağladıklarından, yüksek oranda tercih edilir olmuşlardır. Günümüzde modern yara örtülerine salım özellikleri de kazandırılarak fonksiyonellik kazandırılmaktadır. Bu sayede yara kapatıcı olmaktan bir adım ileri giden yara örtüleri, tedavi edici özelliğe sahip olmakta

ve epitel dokunun yeniden oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler. Aktif madde salımı yaparak fonksiyonelleştirilen yara örtüleri, yara ortamının sahip olduğu mikrobiyal flora ve yüksek miktardaki reaktif oksijen türlerinin giderilmesinde de rol oynayabilmektedirler. Kullanılan materyalin orijinal doku yerini alabilmesi, dokulara destek görevinde bulunan ekstrasellüler matriks yapısını taklit edebilmesi, sahip olduğu morfolojiyle, ekstrasellüler matrikste yer alan hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını teşvik etmesi, sitotoksik özellik göstermemesi anlamına gelmektedir. Köpük yara örtüleri, sahip oldukları gözenekli ağ sistemi ile yüzey alanlarını genişleterek malzeme ile bulunduğu ortam arasında besin ve metabolik atık geçişini kolaylaştırdıklarından hücre tutunması ve doku oluşumu için uygun malzemeler olarak ön plana çıkmaktadırlar. İpek fibroin sahip olduğu biyo uyumluluk, biyobozunurluk ve düşük enflamasyon riski ile doğal polimerler içinde biyomalzeme olarak kullanıma aday bir polimerdir. İpek fibroinden oluşturulan matriksler fibroblast, osteoblast ve kök hücrelerin tutunması ve çoğalması için uygun ortam oluşturmaktadır. Doku ve matriks su dengesini sağlayan hyaluronan, sahip olduğu viskoelastik özelliklere bağlı olarak da boşluk doldurma ve yağlama görevlerini üstlenmektedir. Doku hasarı meydana geldiğinde, hyaluronan içeren matriks yapı fibroblast ve endotelial hücrelerin yara bölgesine göçünü desteklemekte ve doku oluşum faaliyetini başlatmaktadır. Ortamdaki serbest radikalleri süpürerek antioksidan rolü üstlenen hyaluronan, bu sayede yara örtüsü katkı malzemesi olarak da önem kazanmaktadır. Yara bölgesinde açığa çıkan yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri ve mikrobiyal flora nedeniyle iyileşme süreci olumsuz etkilendiğinden antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösteren maddelerin ortama kontrollü salınması da yara iyileşmesini hızlandıran bir faktördür. Bu bağlamda antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri üzerinde çalışılan *Equisetum arvense*, ya da bilinen adıyla Atkuyruğu bitkisi, köpük materyallere eklenerek salım yapabilmeye aday bir özüt olarak ön plana çıkmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yara, türleri ve iyileşme aşamaları

Yara, deride fiziksel, ısı kaynaklı veya temelde yer alan fizyolojik bir etken nedeniyle oluşan tahribatı tanımlamak için kullanılmaktadır. Wound Healing Society, yara tanımını normal anatomik yapı ve fonksiyonda oluşan tahribat olarak yapmaktadır (BOATENG ve ark., 2008). İyileşme süreçlerine göre yaralar, akut veya kronik olarak sınıflandırılabilirler. Akut yaralar sürtünme, kesik, yanık veya kimyasal kaynaklı kazalar gibi dış etkenlere bağlı olarak meydana gelirler. Bası yaraları, diyabetik ve venöz ülserler olarak üç gruba ayrılabilen kronik yaralarda ise, tekrarlanan doku hasarları, diyabet, kanser gibi hastalıklar ve kalıcı enfeksiyonlar nedeniyle iyileşme süreci sonuçsuz kalmaktadır (MUSTOE, 2004).

Yara iyileşmesi farklı tip hücreler ve dokuyu oluşturan bileşenlerin, çevresel sinyallere verdikleri tepkiler ile ilerler. Enflamasyon, yeni doku oluşumu ve yeniden biçimlenmeyi içeren 3 aşamadan oluşmaktadır (GURTNER ve ark., 2008). Enflamasyon, doku hasarından hemen sonra gerçekleşir, bağışıklık sistemi kan ve doku sıvısı kayıplarını engellemek, canlı olmayan dokuları bertaraf etmek ve enfeksiyonun önüne geçmek için alarm konumuna geçer. Trombositler ve fibrin matriks, birlikte destek yapı oluşturarak kanı durdurmaya çalışırlar. Kanamayı durdurma aşaması hemostaz olarak adlandırılmaktadır. Travma ile birlikte çeşitli faktörlerin kana salınması sonucunda aktif hale gelen trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtı oluşumunu sağlar, yaralı bölge kapanır, kanın sistem dışına akışını durdurulur ve bölgenin iyileşmesine imkân sağlanır.

Yeni doku oluşumu, yara iyileşmesinde ikinci aşamayı oluşturur ve yaralanmadan yaklaşık 2 ile 10 gün sonra gözlenmeye başlar. Bu aşamada hücre çoğalması ve göçü ön plandadır. Keratinositlerin yara bölgesine göçünü takip eden sürede yeni damar oluşumları gözlenir. Anjiyojenez adı verilen bu süreci düzenleyenler ise damar endotel büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü 2'dir (Werner ve Grose, 2003). İlk aşamada oluşturulan fibrin matriks yerini fibroblast ve makrofajlarla çevrili kılcal damarlara bırakır. Yeni oluşan bölgede biraraya gelen keratinositler, sonraki dönemlerde tekrar bariyer özelliğini kazanacak olan epitel tabakayı oluşturur. Yeni doku oluşumu son olarak fibroblastların, kasılabilen hücreler olan myoblastlara dönüşmesi ve ekstrasellüler matriks oluşumunda yer alması ile sonlanır, yara kapatılmış olur (OPALENIK, 2005, WERNER ve ark., 2007).

Yara oluşumundan yaklaşık 2 ile 3 hafta sonra başlayan yeniden biçimlenme, en son ve en uzun süren aşamadır. Bu aşamada endotelial hücreler, makrofajlar ve myofibroblastların çoğu apoptoza uğrar, geriye ise az miktarda hücre ve ekstrasellüler matriks proteinleri kalır. Bir yıl boyunca fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücreler matriks metalloproteinaz salgılayarak onarılan dokuyu güçlendirir ve tip 1 kollajenden oluşan hücresiz fibröz yapıyı oluşturur (LOVVORN ve ark., 1999). Bu yapıya yara dokusu adı verilir. Fibröz yara dokusu, sağlıklı doku özelliklerini geri kazanamaz.

Kronik yaraların iyileşmemesindeki etken epitel dokunun oluşmamasıdır (SCHNEIDER ve ark., 2009). Özellikle kronik ülserlerde görülen tablo, zengin bir bakteriyel ve fungal ortam oluşması yönündedir (FALANGA, 2004). Bakterilerin varlığı yara bölgesine lökositlerin göç etmesine ve bu bölgenin yüksek miktarda proteaz ve oksitleyici madde içermesine sebep olmaktadır (MUSTOE, 2004). Oksidan üretici enzimler spesifik olarak bakteri ölümüne yol açarlar, ancak yara bölgesinde gözlenen bölgesel anemi ve buna bağlı olarak gelişen hipoksi (oksijen yetmezliği) nedeniyle sözü geçen enzimler verimli çalışamaz ve bakteri kolonileri canlılığını yitirmiş dokuyu besin kaynağı olarak kullanarak çoğalır. Lökosit göçü sonrasında oluşan yüksek proteaz aktivitesi ve ekstrasellüler matriksin yıkılması da yaranın kapanması için gereken hücre göçünü engelleyerek iyileşme sürecini kesintiye uğratır. Kronik yara türlerinden olan bacak ülserlerinde en sık olarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* görülürken, bası ülserlerinde *Streptococcus* türleri, *Proteus* türleri, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Citrobacter* izolatlarına da rastlanmaktadır (O'MEARA ve ark., 2000).

## **2.2. Yara iyileştirme materyalleri ve yara örtüleri**

Yara iyileştirme terimi lokal farmasötik formülasyonlardan modern uygulamalar olan doku destek materyallerine kadar uzanan bir aralığı kapsamaktadır. Tablo 1'de yara iyileştirme sürecinde kullanılan materyallerden örnekler görülebilmektedir (BOATENG ve ark., 2007).

Tablo 1. Yara iyileştirici materyaller (BOATENG ve ark., 2007, PURSER., 2010)

Materyal	Kullanılan malzeme	Şekil özellikleri	Avantajları	Dezavantajları
Lokal formülasyonlar	Povidon-iyodin, gümüş, fizyolojik solüsyonlar	Merhem, yarı-katı solüsyonlar	Acil uygulamalar için uygun, kolay kullanım	Nemi absorblaması, çabuk emilmesi, geçici kullanıma uygun olması
Sargı bezi	Pamuk, polyester	Dokusuz fiber yapı	Yara bölgesinde gaz geçirgenliği sağlayarak iyileşmeyi hızlandırması	Yapışkan olmaması, geçici kullanıma uygun olması
Hidrokolloidler	Jelatin, pektin	Yapışkan, jel görünümü	Su geçirmezlik	Koku yayması, sızan yaralar için uygun olmaması
Hidrojel	İpek fibroin, kitosan	Amorf, su bazlı yapı	Kuru, nekrotik dokuyu nemlendirmesi	Kullanım için ikincil bir yara örtüsüne ihtiyaç duyulması
Aljinat	Aljinik asit	Yumuşak, esnek jel görünümü	Nemli bir iyileşme ortamı yaratması, kan durdurucu ajan olarak kullanılması	Diyabetik yaralarda her gün değiştirme gereksinimi, yapışkan özelliği nedeniyle kuru yaralarda kullanılamaması
Köpük	İpek fibroin, kollajen, poliüretan	Gözenekli yapı	Destek doku olarak kullanıldığında hücre çoğalmasına, besin maddeleri ve metabolik atıkların difüzyonuna olanak sağlaması	Kararlı bir yapı olabilmesi için organik çözügenlerle veya çapraz bağlayıcı ajanlara ihtiyaç duyulması, kuru yaralarda kullanılamaması

Yara iyileşme süreci yara tiplerine, yara boyutuna ve derinliğine, kişinin beslenme durumu, yaşı, taşıdığı sistemik hastalık veya kullandığı ilaçlara bağlı olarak değişir.

Yaranın doğal iyileşme sürecinde oluşan fibröz yara dokusu, elastik fiberlerden yoksun olup myoblast içeriklidir. Yara iyileştirilmesinde amaçlanan, iyileşme sürecini hızlandırmak, fibröz yara dokusu oluşumunu elimine ederek gerek fonksiyon gerek yapısal olarak orijinal doku benzeri yapılar oluşturulmasını sağlamaktır (BALASUBRAMANI ve ark., 2001). Bu amaca yönelik olarak deriyi ikame edecek özellikte materyaller üretilerek çağdaş tedavi yolları geliştirilmeye çalışılmaktadır (SIBBALD ve ark., 2005). Modern yara iyileştirici materyaller olarak tanımlanan yara örtüleri sentetik veya biyolojik materyallerden üretilmektedirler. Sentetik yara örtüleri sıklıkla yüzeysel ve küçük boyutlu yaralar için kullanılmaktadırlar. Alt grubu olan kompozit sentetik örtüler dayanıklılık için bir dış yüzeye, yüksek tutunma ve elastisite için de bir iç yüzeye sahiptirler. Biyolojik yara örtüleri ise kadavradan üretilen allograftlar, domuzlardan elde edilen heterograftlar, amniyotik membran ve filmler ile doğal polimerlerden üretilen köpükleri içermektedir. Doğal polimerlerden üretilen materyaller ise, beraberinde kontaminasyon riski ve doku reddini taşıyan allograft ve heterograftlara göre daha avantajlı kullanım sağladıklarından, yüksek oranda tercih edilir olmuşlardır.

İdeal yara örtüsü aşağıda yer alan özellikleri taşımalıdır (PURSER, 2010):

1. Yara iyileşmesi için nemli bir ortam sağlayarak fibröz doku oluşumunu engellemelidir.
2. Oksijen, karbondioksit ve su buharı geçişine izin vererek epitel hücre çoğalmasını desteklemelidir.
3. Isı izolasyonu sağlayarak, yara çevresini hücrelerin çoğalması için en uygun sıcaklık olan 37°C'de tutmalıdır.
4. Yara iyileşmesini yavaşlatan mikroorganizmaları ortamdaki uzak tutmalıdır.
5. Enfeksiyon riski oluşturabilecek kontaminantları içermemelidir.
6. Değiştirme sırasında yeni oluşan damar ve dokulara zarar vermemek için yapışkan özellikte olmamalıdır.
7. Kullanımı güvenli olmalı, zehirli ve allerjen madde içermemelidir.
8. Hasta için uygun olmalıdır.
9. Sızıntı yapan yaralar için yüksek absorblama kapasitesine sahip olmalıdır.

10. İyileşme süresi, kullanım süresi ve maddi değeri göz önünde bulundurulduğunda maliyet etkinliği yüksek olmalıdır.

11. Yaraya zarar vermeden dışardan gözlem imkanı vermelidir.

12. Travma, bakteriyel saldırılar ve UV radyasyona karşı karşı mekanik koruma sağlamalıdır.

13. Çapraz kontaminasyona karşı steril olmalıdır.

14. Uzun süre kullanılabilmelidir ve değiştirme aralıkları mümkün olduğunca seyrek olmalıdır. Bu sayede enfeksiyon riski azalır, yara çevresi sıcaklığı optimumda tutulur ve hasta daha az rahatsızlık duyar.

Günümüzde modern yara örtülerine salım özellikleri de kazandırılarak fonksiyonellik kazandırılmaktadır. Bu sayede yara kapatıcı olmaktan bir adım ileri giden yara örtüleri, tedavi edici özelliğe sahip olmakta ve epitel dokunun yeniden oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (SCHNEIDER ve ark., 2009). Aktif madde salımı yaparak fonksiyonelleştirilen yara örtüleri, yara ortamının sahip olduğu mikrobiyal flora ve yüksek miktardaki reaktif oksijen türlerinin giderilmesinde de rol oynayabilmektedirler.

### **2.3. Köpük form yara örtüleri**

Yara iyileştirmesinde kullanılacak yara örtüsünün iyileşme sürecini hızlandırması, fibröz doku oluşumunu engellemesi, orjinal dokunun yerini gerek fonksiyon gerekse şekil bakımından alabilmesi ve sürecin sonlanmasını takiben geride toksik madde bırakmaksızın degradasyonu esasına dayanması beklenmektedir. Kullanılan materyalin orijinal doku yerini alabilmesi, dokulara destek görevinde bulunan ekstrasellüler matriks yapısını taklit edebilmesi, sahip olduğu morfolojiyle, ekstrasellüler matrikste yer alan hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını teşvik etmesi, sitotoksik özellik göstermemesi anlamına gelmektedir. Köpük yara örtüleri, sahip oldukları gözenekli ağ sistemi ile yüzey alanlarını genişleterek malzeme ile bulunduğu ortam arasında besin ve metabolik atık geçişini kolaylaştırdıklarından hücre tutunması ve doku oluşumu için uygun malzemeler olarak ön plana çıkmaktadırlar (ZHANG ve ark., 2009). Yüksek absorpsiyon kapasitesine ve mukavemete sahip, esnek özellik gösteren köpük materyaller, ideal yara örtüsü özellikleri göstermektedirler (ALTAY VE BAŞAL, 2010). Yüksek absorpsiyon kapasitesi sayesinde yara salgılarını absorbe ettikleri ve sahip oldukları buhar geçirgenliği ile de gaz geçişine izin vererek yaraya yapışmadıkları gözlenen

köpük materyaller aynı zamanda sıvı geçirmeme özelliği ile de yara iyileşmesini hızlandırmaya yardımcı olurlar. Termal izolasyon özelliği ile yara çevresinde optimum sıcaklığın sabitlenmesini sağlayarak fibröz doku oluşumunu da engellediği ortaya çıkarılmıştır.

Gözenekli yapılar sulu ortam içinden inert gazların geçirilmesi ile elde edilebildiği gibi, dondurarak kurutma ve dondurma-çözdürme işlemlerinin ardarda tekrarlanması ile de gerçekleştirilebilir (HARDY ve ark., 2008, TAMADA, 2005). Polimerik malzemeye gözenekli yapı kazandırmanın bir yolu da polimer ve gözenek oluşturucu madde arasındaki çözünlülük farkına dayanan tuz özütleme yöntemidir. Gözenek oluşturucu madde olarak kullanılan tuz, organik çözgen içindeki polimer ile karıştırılır ve karışım katılaştırıldıktan sonra tuz tanecikleri suda çözünerek uzaklaştırılır (KI ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda elektrospin ile elde edilmiş nanofiberlerden dondurarak kurutma yöntemi ile köpük materyali oluşturulduğu da görülmüştür. Elektrospin yöntemi, elektrik alan içerisinde, çapları mikro ile nanometreler arasında değişebilen polimer fiberler oluşturulmasına dayanmaktadır (MATTHEWS ve ark., 2002). Sistem, şırınga pompası, yüksek voltaj kaynağı ve fiberlerin toplandığı levhadan oluşmaktadır. Voltaj kaynağı kullanılarak elektrik alan yaratılması sonucunda, pompa tarafından pistonu hareket ettirilen şırınga içerisinde bulunan polimer solüsyonu, yüzey gerilimini aşarak elektrik yüklü jet halinde toplama levhasına yönelir. Bu aşamada polimer çözgeni buharlaşır ve sürekli haldeki fiberler oluşturulur (PHAM ve ark., 2006, CHAKRABORTY ve ark., 2009). KI ve arkadaşlarının 2008 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada, metanol içinde toplanan ipek fibroin nanofiber dispersiyonu, dondurarak kurutma yöntemiyle katılaştırılmış ve üç boyutlu, nanogözenekli köpük yapı elde edilmiştir.

#### **2.4. İpek fibroin: Yapısal özellikleri**

İpek fibroin sahip olduğu biyo uyumluluk, biyobozunurluk ve düşük enflamasyon riski ile doğal polimerler içinde biyomalzeme olarak kullanıma aday bir polimerdir. İpek fibroinden oluşturulan matriksler fibroblast, osteoblast ve kök hücrelerin tutunması ve çoğalması için uygun ortam oluşturmaktadır. İpek böceğinin kozasını oluştururken salgıladığı ipek liflerinin bileşenleri, fibroin ve fibroini saran tutkal benzeri yapıdaki serisin proteinleridir. Aralarında disülfid bağı ile bağlanmış, sırasıyla ~390 kDa ve ~26 kDa boyutlarında ağır ve hafif polipeptid zincirlerinden

oluşan ipek fibroin, üç kristal forma sahiptir. İpek I ve ipek II yapılar belirli şartlar altında birbirlerine dönüşebilirler (MIN ve ark., 2004). İpek I formu, sarmal yapıdan oluşurken, ipek II daha stabil ve kristal  $\beta$ -tabaka konformasyonuna sahiptir.  $\beta$ -tabakaları arasında hidrojen bağları ve hidrofobik interaksyonlar bulunmaktadır, ipek fibroinin sahip olduğu mukavemetin nedeni bu etkileşimlerdir (ZHANG et al., 2009). Sarmal yapıdan  $\beta$ -tabaka yapısına dönüşüm, fiziksel ve mekanik yollarla olabileceği gibi, yaygın olduğu üzere kimyasal muamele ile de gerçekleştirilmektedir. Etanol ve metanol uygulaması,  $\alpha$ -sarmal yapısında dehidrasyona yol açarak  $\beta$ -tabakalı yapıya geçişi sağlar. Uygulamaya maruz kalan ipek fibroin matriksleri içerdikleri yüksek kristal yapı nedeniyle kırılma olurlar (YEO ve ark., 2008).

Yara örtülerinde kullanılan polimer çözeltisinin büyüme faktörü özelliği gösteren bir bileşen ile karıştırılması ve materyalin bu karışım ile hazırlanması beraberinde yara dokusu ile yüksek derecede uyumluluk, hücre tutunması ve çoğalmasında artış, sonuçta da doğal dokuya en yakın formun oluşturulması gibi bir çok avantajı da beraberinde getirmektedir. Taklit edilmek istenen ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olan hyaluronik asit, bu amaçla hazırlanan polimer karışımları için başarılı bir adaydır.

## **2.5. Hyaluronik asit**

Hyaluronan olarak da bilinen hyaluronik asit (HA), kıkırdak, göz sıvısı, göbek kordonu ve eklem sıvısında bulunan doğal bir glukozaminglukandır (MALAFAYA ve ark., 2007). Ekstrasellüler matriks komponenti olan hyaluronan, proteoglikanların omurga yapısını oluşturmaktadır. Doku ve matriks su dengesini sağlayan hyaluronan, sahip olduğu viskoelastik özelliklere bağlı olarak da boşluk doldurma ve yağlama görevlerini üstlenmektedir. Doku hasarı meydana geldiğinde, hyaluronan içeren matriks yapı fibroblast ve endotelial hücrelerin yara bölgesine göçünü desteklemekte ve doku oluşum faaliyetini başlatmaktadır (CHEN ve ark., 1999). Ortamdaki serbest radikalleri süpürerek antioksidan rolü üstlenen hyaluronan, bu sayede yara örtüsü katkı malzemesi olarak da önem kazanmaktadır.

## **2.6. *Equisetum arvense*: Antioksidan etki ve antimikrobiyal aktivite**

Yara bölgesinde açığa çıkan yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri ve mikrobiyal flora nedeniyle iyileşme süreci olumsuz etkilendiğinden antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösteren maddelerin ortama kontrollü salınması da yara iyileşmesini hızlandıran bir faktördür. Konvansiyonel metod ile enfeksiyon oluşumunu

önlemek için yara örtülerine gümüş (PARSONS ve ark., 2005) ve antibiyotik (Mi ve ark., 2002) entegre edilebilmekte, ortamda açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması için çinko katkılı malzemeler kullanılabilir (LANSDOWN ve ark., 2007). Antibiyotik kullanımının dezavantajı, uzun vadede mikrobiyal flora direnç kazandırmasıdır. Bu direnç mekanizması, yara oluşumunun tekrarlanması halinde iyileşme sürecini olumsuz etkileyecek bir faktör haline gelebilir. Yara örtüsüne antimikrobiyal ve antioksidan özellik kazandıracak maddelerin ayrı ayrı entegrasyonu ise prosese de kontrol basamağı ekleyerek üretim sürecini uzatabilecektir. Bu nedenle günümüzde doğal bitki özütleri, sahip oldukları antimikrobiyal ve antioksidan özellikler nedeniyle salım yapan aktif madde olarak tercih edilmektedirler. Bu bağlamda antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri üzerinde çalışılan *Equisetum arvense*, ya da bilinen adıyla Atkuyruğu bitkisi, köpük materyallere eklenerek salım yapabilmeye aday bir özüt olarak ön plana çıkmaktadır. 2005 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada (NAGAI ve ark., 2005) *Equisetum arvense*'nin tepe ve gövde kısmından elde edilen alkol ve su bazlı özütlerinde yüksek flavonoid ve vitamin değerleriyle karşılaşılmıştır. Daha detaylı araştırmalar sonucunda bitkinin bakır ve çinko içerdiği, bu maddelerin ise süperoksit anyon radikallerinin uzaklaştırılması için kullanılan mekanizmada önemli roller üstlendiği gösterilmiş ve bu sebeplerden dolayı doğal antioksidan görevi bulunduğu bildirilmiştir. *Equisetum* bitkisinin beş farklı alt türünde gerçekleştirilen bir çalışmada ise (MILOVANOVIC ve ark., 2007) bitkinin içeriğindeki fenol nedeniyle doğal antioksidan kaynağı olduğu ve alt türler içinde *Equisetum arvense*'nin en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Özütün antimikrobiyal etkisi ise 2006 ve 2007 yıllarında gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Disk difüzyon metodu uygulanan bu çalışmalarda özütün gram negatif, gram pozitif bakteriler ve mantarlar üzerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (RADULOVIC ve ark., 2006, MILOVANOVIC ve ark., 2007). Atkuyruğu bitkisinden elde edilen n-bütanol ve etil asetatın da antimikrobiyal etkiye sahip olduğu 2009 yılında yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (CANADANOVIĆ-BRUNET ve ark., 2009). Literatürde *Equisetum arvense*'nin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri belirtilmesine rağmen, bu özelliklerinin ekstraksiyon optimizasyonu yapılarak nasıl değiştiği ile ilgili bir çalışmaya bilginiz dahilinde rastlanmamaktadır. Ayrıca bu çalışma kapsamında optimum koşullarda

yapılacak ekstraksiyonla elde edilecek bitki özütünün biyomalzeme ile entegrasyonu sağlanacak ve yara örtüsü olarak kullanılma potansiyeli ortaya konulacaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 *Equisetum arvense* özütleme optimizasyonu ve özüt karakterizasyonu

##### 3.1.1 Özütleme

Özütün elde edilmesi için Tablo 2’de görüldüğü gibi 5 değişken 3 seviyede incelendi. Katı partikül boyutu ve seviyesi, elde edilen partiküllerin mikron seviyesinde olmasından ve kütle transferi bakımından farklı seviyelerde incelemenin bir farklılığa neden olmadığı ön denemelerde belirlendi ve bu nedenle incelemeden çıkartıldı. Ekstraksiyon zamanı ise, daha geniş bir spektrumu incelemek için 3, 6, 9 saat aralığından 2, 7, 12 saat aralığına çıkarıldı.

Tablo 2. Deney değişkenleri ve bağlı seviyeler

Değişken	(+)1	0	(-)1
X <sub>1</sub> = Sıcaklık (°C)	4	24	45
X <sub>2</sub> = Karıştırma hızı (rpm)	50	150	250
X <sub>3</sub> = Etanol oranı (%)	10	50	90
X <sub>4</sub> = Ekstraksiyon zamanı (saat)	2	7	12
X <sub>5</sub> = Katı-sıvı oranı	1:10	1:20	1:30

Özütler, Tablo 1’de olduğu gibi, istatistiksel analiz programı olan MINITAB’e yüklendi ve yüzey yanıt metodu için gerekli olan özüt hazırlama kriterleri oluşturuldu. MINITAB programı ile yapılan değişken ve seviyelerinin tamamı Ek-1’de verilmektedir. Bu çalışma için yarım yüz merkezli yüzey analizi yapıldı. Toplamda 32 adet örnek elde edildi ve bunların istatistiksel çalışmaları gerçekleştirildi. Seviyeler (+)1; 0 ve (-)1 olarak işaretlenerek özütler hazırlandı. Deneysel tabloda verilen değişkenlere bağlı olarak hazırlanan bitki-çözgen karışımları vakum filtrasyon ile süzme işlemine tabi tutuldu. Karışım içinde bulunan etanol, döner evaporatör aracılığıyla uzaklaştırıldı. Santrifüj işlemi ile safsızlık yaratan katı partiküller uzaklaştırıldıktan sonra özütün su fazı donduruldu. Donmuş özüt, liyofilizatör kullanılarak kurutuldu ve deneylerde kullanılan toz formdaki özüt elde edildi.

### **3.1.2 Özüt karakterizasyonu**

#### **3.1.2.1 Toplam Fenol Miktarı**

Toplam fenol miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemi ile 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak tayin edildi. Deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Standart çözelti olarak gallik asit kullanıldı ve özütlerdeki fenol miktarı gallik asit kalibrasyon eğrisi (Ek-2), aracılığıyla hesaplandı. Folin-ciocalteu ayracı 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek çalışma konsantrasyonuna getirildi. Sodyum karbonat çözeltisi ise distile su içinde %7,5'lük olarak hazırlandı. Deney için 20 µl örnek üzerine 100 µl folin çözeltisi eklenerek 2,5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 80 µl sodyum karbonat çözeltisi eklenen örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saatlik inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda örnekler 725 nm'de fotometrik okumaya alındı. Çıkan absorbans sonuçları, kalibrasyon eğrisi ile gallik asit eşdeğerine dönüştürüldü ve özüt içerisindeki toplam fenol miktarı hesaplandı.

#### **3.1.2.2 Antioksidan Aktivite Tayini**

Özütlerin sahip olduğu antioksidan aktivite değerleri, 96 kuyucuklu plakalarda ABTS yöntemi kullanılarak belirlendi. Deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Standart olarak troloks çözeltisi kullanıldı. Özütlerin sahip olduğu antioksidan aktivite, troloks kalibrasyon eğrisi (Ek-3) ile hesaplandı. ABTS çalışma solüsyonu, distile su kullanılarak çözülen 14 mM ABTS ve 4,9 mM potasyum persülfatın ( $K_2S_2O_8$ ) 1:1 oranında karıştırılıp 16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilerek hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalar içerisine eklenen 10 µl örnek üzerine, Varioskan spektrofotometre cihazında 200 µl ABTS solüsyonu eklenerek 734 nm'de 30 dk boyunca 60 okuma yapıldı ve kinetik analiz gerçekleştirildi. Çıkan absorbans sonuçları, kalibrasyon eğrisi ile troloks eşdeğerliğine dönüştürüldü ve özütün sahip olduğu antioksidan aktivite belirlendi.

#### **3.1.2.3 Antimikrobiyal Aktivite Tayini**

##### **3.1.2.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi**

Özütlerin bakteri ve mantar türleri üzerindeki antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemi ile incelendi. Deneyler için, yara bölgelerinde yoğun olarak gözlenen mikroorganizmalardan bakteri türü olarak *Escherichia coli* (gram -) ve *Staphylococcus epidermidis* (gram +), mantar türü olarak *Candida albicans* belirlendi. Pozitif kontrol olarak mantar türü için amfoterisin B, gram (+) bakteri için vankomisin ve gram (-) bakteri için streptomisin kullanıldı. Bakteriler besleyici katı besiyerinde,

mantar ise patates katı besiyerinde çoğaltıldı. Besi yerlerine ekim yapılacak mikroorganizmaların koloni yoğunlukları, 0,5 McFarland birimine göre ayarlandı. Ekim sonrası petrilere belirlenen kısımlara boş diskler yerleştirildi. Her disk üzerine, steril suda çözülerek 150 mg/ml konsantrasyona getirilen *Equisetum arvense* özütünden 20 µl eklendi. Patojenler 16 saat büyümeye bırakılarak disklerin etrafında oluşan mikroorganizmadan temiz alanlar ölçüldü.

### **3.1.2.3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)**

Minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemi ile farklı konsantrasyonlardaki örneklerin *E.coli*, *S.epidermidis* ve *C.albicans* büyümesi üzerindeki etkileri incelendi. Pozitif kontrol olarak streptomisin, vankomisin ve amfoterisin B kullanıldı. 96 kuyucuklu plakada gerçekleştirilen deneyde, her kuyucuğa 95 µl sıvı besiyeri, 100 µl örnek ve 5 µl 0,5 Mcfarland birimine göre ayarlanan koloni yoğunluğundaki mikroorganizmalar eklendi. Mikroorganizmalar 37° C sıcaklıkta 20 saat boyunca inkübe edildi. Örnek konsantrasyonları 75 mg/ml; 37,5 mg/ml; 18,75 mg/ml ve 9,375 mg/ml olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotikler ve antifungal madde 20 µg/ml; 10 µg/ml, 5 µg/ml ve 2,5 µg/ml olarak hazırlandı. Mikroorganizmaların kuyucuklara ekildiği an olan sıfır anında 600 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü ve 20 saat inkübasyona bırakıldı. 20 saat sonunda aynı dalgaboyunda absorbans ölçümü yapıldı ve fark ( $\Delta t$ ) hesaplandı. Ayrıca kullanılan üç patojen, gerek fenolik içeriğin gerek antioksidan aktivitenin en yüksek, en düşük ve orta seviyede olduğu örneklerle inkübasyona bırakıldı. 20 saatlik inkübasyon sırasında elde edilen büyüme eğrileri Varioskan spektrofometre cihazında analiz edildi. Bu büyüme eğrileri yardımıyla MİK değerlerini belirlemede kullanılan yöntemin doğruluğunu test etmek amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.2.4 Hücre kültürü ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesi**

NIH/3T3 fare fibroblast hücreleri 2 mM glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin bulunan ve %10 FBS ile desteklenmiş DMEM besiyeri içinde kültüre alındı. Hücreler, ikilenme süreleri olan 48 saatte bir tripsin-EDTA (% 0,25) ile flask yüzeyinden kaldırılarak 1000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Oluşan hücre pelleti süpernatant atıldıktan sonra 1 ml hücre ortamı ile süspanse edilerek 10 µl hücre süspansiyonu 90 µl tripan mavisini ile karıştırıldı. Hemasitometre kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirildi ve kalan hücre süspansiyonu uygun konsantrasyon

doğrultusunda besiyeri ile karıştırılarak 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Bu işlem, deneyler için gerekli hücre sayısını elde edene kadar devam ettirildi.

*Equisetum arvense* özütünün fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile belirlendi. İlk aşamada, standart özütlenme koşulları olan %70 etanol içinde, 180 rpm hızda, 2 saat boyunca ve oda sıcaklığı koşullarında özütlenen *Equisetum arvense* kullanılarak bitkinin sahip olduğu sitotoksik etki gözlemlendi. Yöntemin ilk aşamasında fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu plakalara, her kuyuda 95 µl hacim içinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Analiz sonuçlarını etkileme riskine karşın besiyeri içeriğinde antibiyotik kullanılmadı. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler 24 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi ve hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. İşlemin ikinci gününde liyofilize edilmiş *Equisetum arvense* özütü, otoklavlanmış distile su içinde ve vortekslenerek çözüldü, 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve su fazında çözünen kısmın bulunduğu süpernatant ayrılarak 0,22 µm por çapına sahip enjektör filtre ile sterilize edildi. Her kuyudaki 95 µl hücre süspansiyonu üzerine 5 µl özüt ekleneceğinden ve özüt konsantrasyonu 20 kat seyreleneceğinden, çalışma konsantrasyonları 20 kat fazla olarak hesaplandı. Özüt etkilerinin daha kapsamlı gözlemlenebilmesi için konsantrasyon aralığı 100-3000 µg/ml olarak seçildi. Plaka yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerine her kuyuya 5 µl olacak şekilde özüt eklendi. Özüt eklenmeyen fibroblast hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Her konsantrasyon ve kontrol seti 3 replika halinde hazırlandı. Hücreler 24, 48 ve 72 saat aralıklarında 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Sitotoksik aktivite ölçümü için toz halindeki MTT, 5 mg/ml stok konsantrasyonda 1XPBS tampon çözeltisi ile hazırlandı. Analiz edilecek deney seti inkübatörden çıkarılarak kuyucuklar içindeki hücre kültür ortamı ile karıştırılmış özüt çözeltisi, plaka ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Plaka yüzeyine yapışmış olan hücrelerin üzerine 100'er µl 1XPBS izotonik çözelti eklenerek kültür ortamı kalıntıları uzaklaştırıldı ve plaka tekrar ters çevrildi. Plaka, peçeteye emdirilerek kuyularda sıvı kalmamasına dikkat edildi. Her deney seti için kullanılacak miktarda MTT çözeltisi, çalışma konsantrasyonu olan 0,5 mg/ml'e seyreltildi ve hücre bulunan kuyulara ve spektrofotometrik analiz için ayrılan kör (blank) kuyularına 100'er µl hacminde eklendi. Hazırlanan plaka, alüminyum folyoya sarılarak 37°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda plaka 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enzimi ile MTT'nin

indirgenmesi sonucunda oluşan formazan kristalleri plaka dibinde pellet halini aldı. Plaka ters çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan formazan kristalleri DMSO ile çözüldü. Kuyulara 100'er µl saf DMSO eklendi ve plaka yaklaşık 400-500 rpm'de 5 dakika vortekslendi. 96 kuyucuklu plaka, Elisa Çoklu Plaka Okuyucu'da 545 nm dalgaboyunda okutuldu ve konsantrasyonlara denk gelen absorbans değerleri elde edildi. Replikalara ait absorbans değerlerinin ortalamaları alındı ve standart sapma değerleri hesaplandı. Canlılık yüzdeleri hesaplanırken ise aşağıdaki formül kullanıldı.

Canlılık:  $100\% \times (\text{Örnek absorbans değeri ortalaması} / \text{Kontrol absorbans değeri ortalaması})$

### **3.2 Köpük malzemenin oluşturulması**

#### **3.2.1 Ham ipeğin serisinden uzaklaştırılması ve ipek çözeltisinin hazırlanması**

Ham ipek lifinden serisinin uzaklaştırılması için, ipek liflerinin ağırlığının 50 katı (v/w) hacminde % 0,05'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlandı ve kaynamaya bırakıldı. Ham ipek lifleri bu çözeltide 30 dakika bekletildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra ipek lifleri distile su ile çalkalandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Serisinden uzaklaştırılan ipek lifleri, 1:2:8 mol oranına göre hazırlanan CaCl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH-H<sub>2</sub>O üçlü solvent sisteminde, 78°C'de 150 rpm'de 2 saat boyunca çalkalanarak sıvı forma dönüştürüldü. Elde edilen berrak ipek çözeltisi, sodyum sülfür ve sülfürik asit çözeltilerinde bekletilerek sülfür bileşenlerinden uzaklaştırılan diyaliz tüplerinde (MWCO 12000-14000) distile suya karşı, +4°C'de 3 gün diyaliz edildi. Diyaliz sonunda elde edilen ipek çözeltisinin konsantrasyonu 2,4 g/ml olarak hesaplandı.

#### **3.2.2 Hyaluronik asit-ipek fibroin karışımı ile köpük formun oluşturulması**

Toz halindeki hyaluronik asit (*Streptococcus equi*, Sigma), ipek fibroin çözeltisi ile ipek fibroin:hyaluronik asit oranları ağırlıkça (w/w) 97:3 ve 85:15 olacak şekilde karıştırıldı. Saf ipek çözeltileri 50-60°C'de karıştırıldıktan sonra, belirlenen miktarlardaki hyaluronik asit, ipek çözeltisine eklenerek karıştırılmaya devam edildi. Karıştırma sürecinde suda çözülmüş *Equisetum arvense* özütü karışımın içine eklendi. Kullanılan özüt konsantrasyonları 10, 50, 100 mg/ml olarak belirlendi. Karışım, 0,1 M HCl asit kullanılarak pH 4-4,5 değer aralığına getirildi. Karışım süresi

olan 2 saat sonunda özüt içeren ve içermeyen ipek-hyaluronik asit çözeltileri ve kontrol grubu olan saf ipek çözeltisi, 24 saat boyunca  $-80^{\circ}\text{C}$  ve  $-24^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi. Dondurma sürecinde, örneklerin gözenek yapısı kazanabilmesi için 2 defa oda sıcaklığında çözdürüldü ve tekrar donduruldu. Oluşturulan malzemelerin özellikleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Oluşturulan biyomalzemenin içerik özellikleri ve örneklere verilen kodlar.

Özüt konsantrasyonu (mg/ml)	% 3 Hyaluronik asit		% 15 Hyaluronik asit	
	$-24^{\circ}\text{C}$	$-80^{\circ}\text{C}$	$-24^{\circ}\text{C}$	$-80^{\circ}\text{C}$
0	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$
10	$B_1$	$B_2$	$B_3$	$B_4$
50	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$
100	$D_1$	$D_2$	$D_3$	$D_4$

### 3.3 Biyomalzemenin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Üzerlerine sıvı azot dökülerek dondurulan örneklerden kesitler alındı ve argon gazı atmosferinde altın ile kaplama yapıldıktan sonra taramalı elektron mikroskopunda görüntüler elde edildi.

### 3.4 Biyomalzemenin Salım Özellikleri ve Salım Sonrası Aktivite Belirlenmesi

Malzemenin salım özelliği ve biyobozunurluğunun belirlenmesi için kesikli salım yöntemi kullanıldı. Oluşturulan köpük örneklerinden 0,5 cm yüksekliğinde ve 1 cm çapında, ağırlıkları 0,018 ile 0,025 g arası değişen silindirler kesildi. Her bir parça 24 kuyucuklu plakaların içerisine yerleştirildi, üzerlerine 2,5 ml hacminde 1XPBS eklendi. Plakalar 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 170 rpm karıştırma hızında çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında bekletildi. Malzemelerden toplanan sıvı fazlar toplam fenol miktarı, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanıldı.

### 3.5 Biyomalzemenin Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

Biyomateryalin sitotoksik aktivitesinin incelenmesi için 3T3 fare fibroblast hücre hattı kullanıldı ve malzemelerin özütlenme basamağından geçirildiği indirekt sitotoksik aktivite tayin yöntemine başvuruldu. Disk halinde kesilen malzemeler, %70'lik etanol içinde, oda sıcaklığında bir gece bekletilerek steril edildi (LU ve ark., 2011). Ertesi gün 3 kez 1XPBS ile yıkanan malzemeler, PBS'in uzaklaştırılması için  $40^{\circ}\text{C}$ 'lik kurutma fırınında bir saat bekletildi. Özütlenme aşamasına gelindiğinde, malzemeler FBS içerikli DMEM besiyerinde 24 saat boyunca  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve %5

CO<sub>2</sub> koşulunda bekletildi. Daha önceden yüzeye tutunması için ekim yapılan hücrelerin üzerindeki kullanılmış besiyeri uzaklaştırıldı ve üzerlerine, ilgili malzeme özütünden 100 µl eklendi. 24 ve 48 saat zaman aralıkları için MTT gerçekleştirildi.

### **3.6 Hücre-Biyomateryal Entegrasyonu**

Oluşturulan biyomateryal üzerine hücre tutunumunu gözlemleyebilmek için, sitotoksitate tayininde özütleme işlemi uygulanan malzemelerin üzerlerine 10<sup>5</sup> hücre ekilerek 24 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> koşulunda inkübasyona bırakıldı. SEM görüntüsü alabilmek için malzemelere fiksasyon işlemi uygulandı. Malzemeler 1XPBS ile yıkandıktan sonra, PBS ile seyreltilmiş glutaraldehit solüsyonu (%2,5) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında örnekler sırasıyla %30-50-70-90 ve %100 etanol konsantrasyonlarında 5'er dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilerek dehidrasyon uygulandı (CHEN ve ark., 2004). İşlem sonrasında örnekler 37°C'de vakum etüvde 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Örnekler argon gazı atmosferinde altın kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda incelendi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Özüt karakterizasyonu**

#### **4.1.1 Toplam Fenol Miktarı**

Toplam fenol miktarları tayin edilen özütlerin gram kuru ağırlıkları (KA) içindeki miligram gallik asit eşdeğerlikleri (GAE) Ek-2'deki tabloda gösterilmiştir. Örnekler içerisindeki toplam fenol miktarları 20-180 mg GAE/g kuru özüt ağırlığı aralığında değişmektedir. 3 numaralı örnek en düşük, 14 numaralı örnek ise en yüksek toplam fenol miktarına sahiptir. En düşük fenol miktarına sahip örnek, 4°C'de, %10 alkol ile 2 saatlik ekstraksiyon süresinde, 1:10 katı sıvı oranında ve 250 rpm karıştırma hızında hazırlanmıştır. En yüksek fenol miktarına sahip örnek ise 45°C'de, %90 alkol ile 12 saatlik ekstraksiyon süresinde, 1:10 katı sıvı oranında ve 50 rpm karıştırma hızında hazırlanmıştır. İstatiksel analiz sonucu Ek-2'de verilmiştir. Yüzey yanıt regresyon analizi sonucunda fenol miktarını belirleyen faktörler sıcaklık, etil alkol miktarı ve ekstraksiyon süresi ile bunların kendileri ve birbirleriyle olan ilişkileri olarak bulunmuştur. Analizin regresyon katsayısı 0,95 olarak hesaplanmıştır. Anlamlı olan değerler  $p \leq 0,05$  aralığında bulunmuştur.

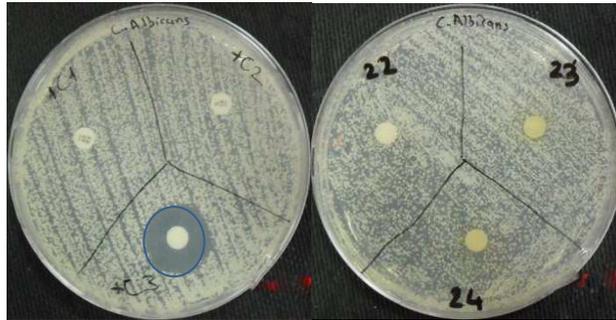
#### 4.1.2 Antioksidan Aktivite Tayini

Her örneğin miligram (mg) kuru ağırlıkları içerisindeki  $\mu\text{M}$  cinsinden trolox eşdeğerlikleri Ek-3'deki tabloda verilmiştir. Örneklerin antioksidan kapasiteleri 290  $\mu\text{M}$  trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAK) ile 1270  $\mu\text{M}$  TEAK arasında değişmektedir. En düşük antioksidan kapasitesi 3 numaralı örnekte, en yüksek antioksidan kapasitesi ise 14 numaralı örnekte gözlemlenmiştir. En düşük antioksidan kapasitesine sahip örnek 4°C'de, %10 alkol ile 2 saatlik ekstraksiyon süresinde, 1:10 katı sıvı oranında ve 250 rpm karıştırma hızında hazırlanmıştır. En yüksek antioksidan kapasitesine sahip örnekler ise sırasıyla 14 numara için 45°C, %90 alkol ile 12 saatlik ekstraksiyon süresinde, 1:10 katı sıvı oranında ve 50 rpm karıştırma hızında hazırlanmıştır. İstatiksel analiz sonucu Ek-3 de verilmiştir. Yüzey yanıt regresyon analizi sonucunda antioksidan kapasiteyi belirleyen faktörler sıcaklık, karıştırma hızı, etil alkol miktarı, ekstraksiyon süresi ve katı sıvı oranı ile bunların kendileri ve birbirleriyle olan ilişkileri olarak bulunmuştur. Analizin regresyon katsayısı 0,97 olarak hesaplanmıştır. Anlamlı olan değerler  $p \leq 0,05$  aralığında bulunmuştur.

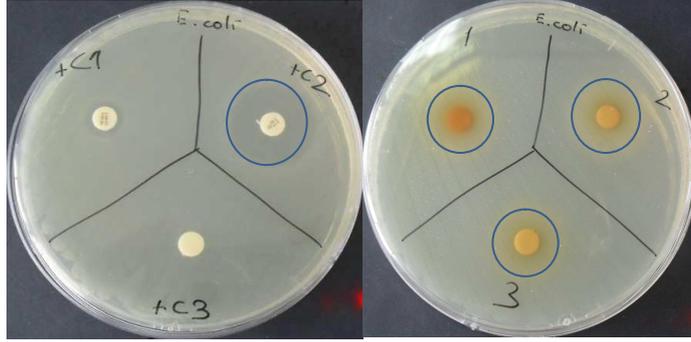
#### 4.1.3 Antimikrobiyal Aktivite Tayini

##### 4.1.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Kullanılan özüt konsantrasyonunun mantar üremesi üzerinde etkili olmadığı, *E.coli* ve *S.epidermidis* üzerinde ise antimikrobiyal ajan olarak etki gösterdiği görülmüştür. Ölçülen alanlar Tablo 4'de gösterilmiştir. Tüm disk difüzyon sonuçlarını gösteren fotoğraflar ve ölçülen temiz alanları gösteren tablolar Ek-4'de verilmiştir.



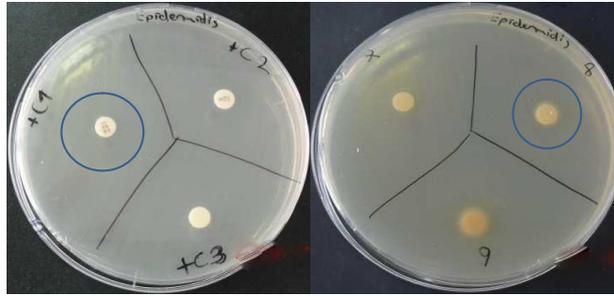
Şekil 1. *Candida Albicans* için disk difüzyon testinde oluşan alanlar



Pozitif kontrol

Örnek

Şekil 2. *E.Coli* için disk difüzyon testinde oluşan alanlar



Pozitif kontrol

Örnek

Şekil 3. *S.Epidermidis* için disk difüzyon testinde oluşan alanlar

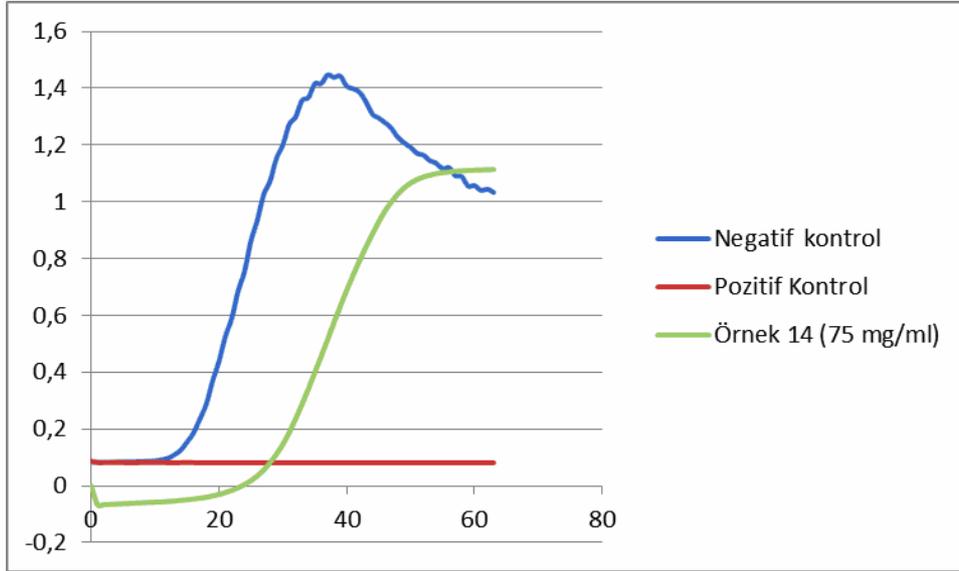
Tablo 4. Tüm patojenler için etkili olan özüt örneklerinin ölçülen temiz alanların (inhibisyon zone) milimetre (mm) olarak değerleri

<i>C. Albicans</i>		<i>S. Epidermidis</i>		<i>E. Coli</i>	
Örnek	Çap (mm)	Örnek	Çap (mm)	Örnek	Çap (mm)
Amfoterisin B	20	Vankomisin	24	Streptomisin	21
		Streptomisin	18	Vankomisin	9
		1	8	1	20
		6	8	2	21
		8	15	3	18
		13	9	4	19
		14	7	5	16
		15	8	7	8
		18	12	10	21
		24	9	11	20
		26	9	12	18
		27	9	13	8
		30	8	14	10
		32	8	15	17
				19	8
				20	8
				21	19
				25	8
				30	8
				31	8
				32	8

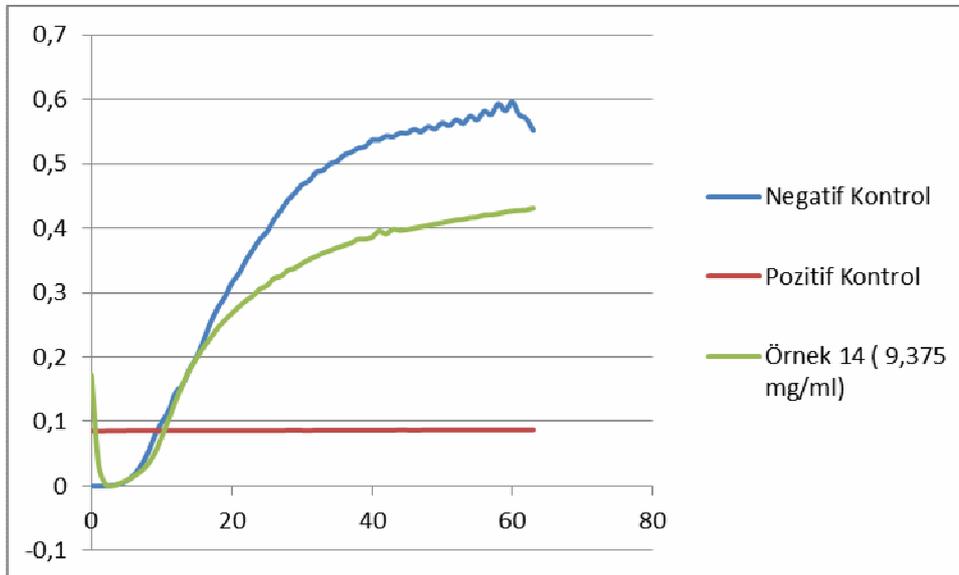
#### 4.1.3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Literatürde *Equisetum arvense* için bulunan inhibisyon konsantrasyonları 75 ve 50 mg/ml olarak belirtildiğinden özüt konsantrasyonları 75-9,375 mg/ml aralığında kullanılmıştır (Jasna, 2009). Büyüme eğrilerini gösteren grafikler Ek-5'te

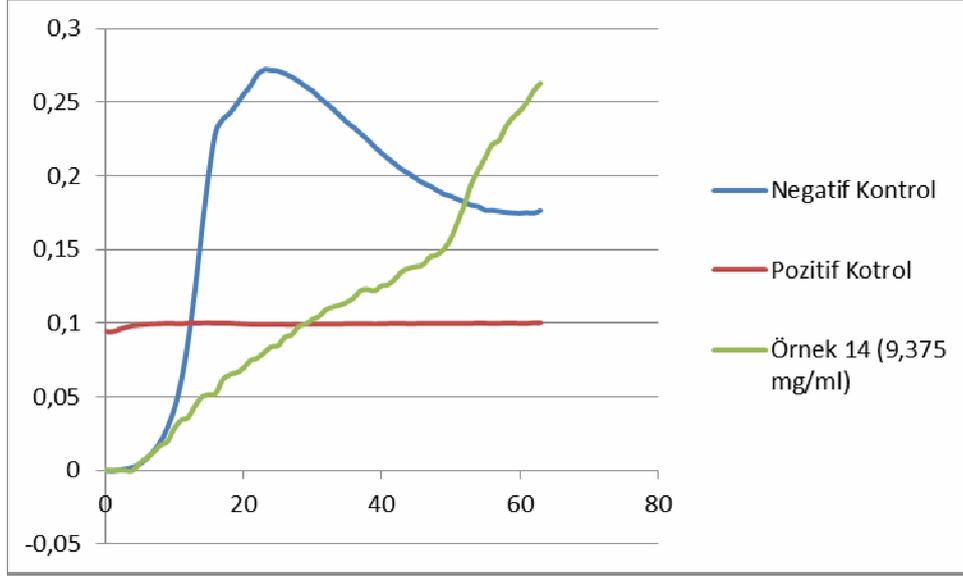
gösterilmiştir. Aşağıdaki grafiklerde pozitif negatif kontroller ile her bakteri için en etkili konsantrasyonlar gösterilmiştir. Büyüme eğrileri için kullanılan örnekler sırası ile 3, 14 ve 32 numaradır. Minimum inhibisyon konsantrasyonuna ait veriler Ek-5 de verilmiştir.



Şekil 4. *C. Albicans* için büyüme eğrisi. 14 numaralı örnek 75 mg/ml konsantrasyonda 20 saat boyunca incelenmiştir. Dikey eksen absorbanansı yatay eksen ise okuma sayısını göstermektedir. Okumalar her 20 dk da bir alınmıştır.



Şekil 5. *E. Coli* için büyüme eğrisi grafiği. 14 numaralı örnek 9,375 mg/ml konsantrasyonda 20 saat boyunca incelenmiştir. Dikey eksen absorbanansı yatay eksen ise okuma sayısını göstermektedir. Okumalar her 20 dk da bir alınmıştır.



Şekil 6. *S. Epidermidis* için büyüme eğrisi grafiği. 14 numaralı örnek 9,375 mg/ml konsantrasyonda 20 saat boyunca incelenmiştir. Dikey eksen absorbans yatay eksen ise okuma sayısını göstermektedir. Okumalar her 20 dk'da bir alınmıştır.

*C.albicans* sonucunu incelediğimizde (Şekil 4) negatif kontrolde büyüme oranı absorbans cinsinden 1,2 iken pozitif kontrolde bu oran 0,1 düzeyindedir. Kullanılan konsantrasyonlarda pozitif kontrole eşit absorbans farkı veren örnek gözlemlenmemiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olabilecekleri tahmin edililen örnekler gözlemlenmiştir. Örneklerin, *C.albicans* için bulunan minimum inhibisyon konsantrasyonları Tablo 5'te verilmiştir.

*E.coli* sonucu incelendiğinde (Şekil 5) pozitif kontrolde 0,642 absorbans farkı gözlemlenmiş, pozitif kontrolde ise bu oran 0,1 düzeyinde oluşmuştur. Örneklerin, *E.coli* için minimum inhibisyon konsantrasyonları Tablo 5'te verilmiştir.

*S.epidermidis* verileri analiz edildiğinde (Şekil 6) pozitif kontrol 0,18, negatif kontrol ise 0,5'lik bir absorbans farkı ortaya koymaktadır. Örneklerin absorbans farkları gözlemlendiğinde hem 75 mg/ml'lik konsantrasyonda hem de bu konsantrasyonun altında ki konsantrasyonlarda pozitif kontrole yakın sonuçlar görülmüştür. Bazı örnekler ise düşük absorbans farkları nedeniyle daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olabilecekleri yönünde intiba uyandırmıştır. Örneklerin, *S.epidermidis* için minimum inhibisyon konsantrasyonları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Patojenler büyümelerini engellemek için örneklerde gerekli olan minimum inhibisyon konsantrasyonlarını gösteren tablo. Konsantrasyonlar mg/ml cinsinden verilmiştir. İB: İnhibisyon Başlangıcı. İG: İnhibisyon Görülmemiştir.

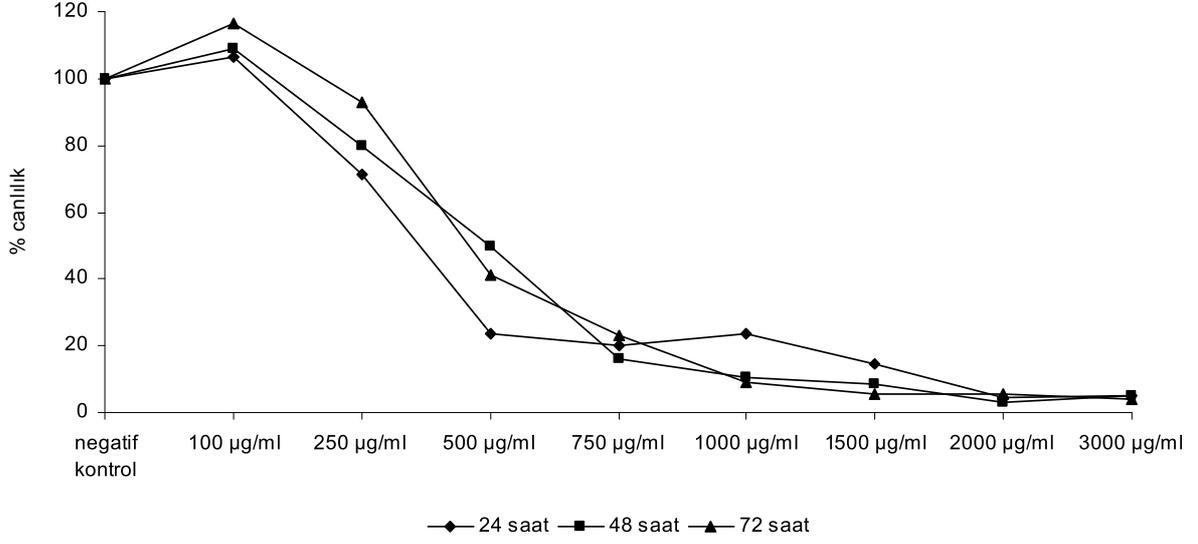
Örnek	S. Epidermidis	E. Coli	C. Albicans	Örnek	S. Epidermidis	E. Coli	C. Albicans
1	İG	İB	İB	17	İB	75	İG
2	75	İB	İG	18	İB	İB	İG
3	İG	İG	İG	19	İB	75	İB
4	İG	İG	İG	20	İB	75	İB
5	İG	İG	İG	21	75	İG	İG
6	İB	İG	İG	22	18,75	İG	İB
7	İB	İG	İB	23	İG	İG	İG
8	75	İG	İB	24	İG	75	İG
9	İB	İB	İB	25	İB	>75	İG
10	İB	75	İB	26	İB	75	İG
11	İG	İB	İG	27	İB	75	İB
12	75	İB	İG	28	75	75	İB
13	İB	18,75	>75	29	75	75	İB
14	İB	75	>75	30	75	İG	İG
15	İB	18,75	>75	31	75	75	İG
16	75	75	>75	32	İG	75	İG

#### 4.1.4 Hücre kültürü ve sitotoksik aktivitenin belirlenmesi

Standart koşullarda ekstraksiyonu gerçekleştirilen *Equisetum arvense* bitkisinin yaprakları, 500 µg/ml konsantrasyondan itibaren inhibitör etkisinin yarısını gösterdiği IC50 değerine ulaşmaktadır (Şekil 7). Canlılık değerleri bu konsantrasyonda 24 saat için %23,75; 48 saat için %49,61; 72 saat için ise %41,24 olarak gözlemlenmiştir. Bu konsantrasyon değeri, farklı koşullarda elde edilen özütlerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde bir sınır oluşturmaktadır.

Bu bağlamda farklı parametreler uygulanarak elde edilen özütlerin sitotoksik aktivitelerinin incelenmesinde kullanılacak konsantrasyon aralığı, standart özütün oluşturduğu sitotoksik aktivite göz önünde bulundurularak, 250 ile 750 µg/ml aralığına sınırlandırılmıştır.

*Equisetum arvense*-NIH 3T3 canlılık yüzdesi



Şekil 7. Standart koşullar olan %70 etanol %30 su içerisinde, 180 rpm devirde 2 saat boyunca oda sıcaklığında ekstrakte edilen *Equisetum arvense* bitkisinin NIH3T3 fibroblast hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki. IC50 değeri, maddenin inhibitör etkisini gösterdiği konsantrasyonun yarısıdır.

Farklı parametreler ile elde edilen özütlerin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesinde elde edilen sonuçlar özütlerin antioksidan kapasiteleri ve toplam fenol miktarları ile karşılaştırmalı olarak Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Farklı parametreler denenerek elde edilen özütlerin hücrelerde oluşturduğu sitotoksik aktivitenin canlılık yüzdesi üzerinden gösterimi ve özütlerin antioksidan aktivite ve toplam fenol miktarı ile karşılaştırılması

K.A.: Kuru ağırlık, TEAK: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite, GAE: Gallik Asit Eşdeğeri

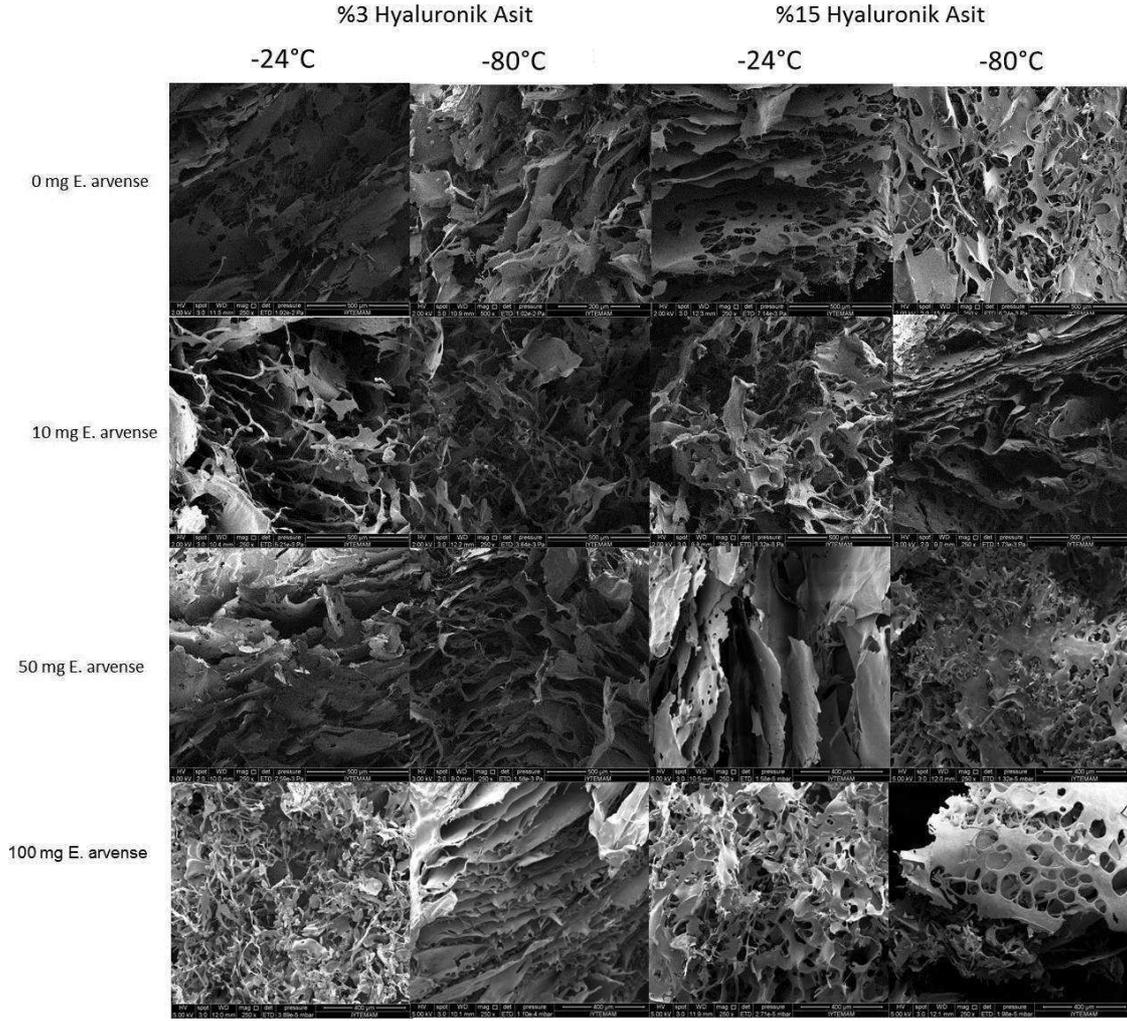
Özüt kodu	% Canlılık			Antioksidan kapasitesi (µM TEAK/mg özüt K.A.)	Toplam Fenol Miktarı (mg GAE/g özüt K.A.)
	24 saat	48 saat	72 saat		
1	117,9	85,27	77,95	830,89	82,94
2	142,65	104,57	104,11	395,4	35,32
3	152,04	86,29	98,75	292,75	20,47
4	119,23	86,49	102,03	338,8	35,41
5	119,34	80,67	99,68	412,14	25,39
6	117,24	93,25	114,98	550,2	41,9
7	121,55	89,97	105,46	585,21	34,5
8	126,63	101,13	109,94	820,69	41,57
9	132,38	82,53	81,88	939,18	59,25
10	83,65	67,21	60,38	725,69	106,46
11	155,36	108,27	88,72	424,02	53,56
12	125,52	68,58	77,35	412,35	57,13
13	<b>18,9</b>	<b>12,09</b>	<b>8,97</b>	<b>1214,94</b>	<b>150,04</b>
14	<b>41,99</b>	<b>6,56</b>	<b>-1,9</b>	<b>1246,82</b>	<b>182,8</b>
15	<b>34,36</b>	<b>23,69</b>	<b>28,99</b>	<b>1268,09</b>	<b>115,4</b>
16	<b>18,12</b>	<b>12,68</b>	<b>1,99</b>	<b>1270,79</b>	<b>149,14</b>
17	62,43	61,58	66,57	838,07	86,38
18	137,13	91,34	77,3	523,7	52,08
19	83,43	61,04	57,79	651,98	86,15
20	73,81	55,36	53,4	572,58	79,57
21	125,52	91,04	61,72	357,18	51,85
22	132,82	104,85	105,78	532,75	63,46
23	120,66	89,43	77,99	817,09	53,27
24	116,13	66,81	53,54	1116,61	80,58
25	61,22	74,3	64,59	885,2	93,25
26	108,07	67,55	53,35	1099,02	103,63
27	61,99	59,03	44,34	814,92	85,47
28	60,44	72,93	52,33	866,76	79,82
29	64,64	59,47	46,46	954,65	94,85
30	164,31	83,9	63,8	915,48	100,92
31	98,23	76,06	52,43	1203,4	75,77
32	74,81	57,66	35,78	1026,65	115,41

Tablo 6'da özüt eklenmemiş hücrelerden oluşan negatif kontrol grubu %100 canlı kabul edilerek 500 µg/ml özüt konsantrasyonunun hücreler üzerinde yarattığı sitotoksik aktivite antioksidan aktivite ve toplam fenol değerleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. 24 saatten itibaren en yüksek sitotoksik aktivite gösteren özütler kalın harflerle, 24-72 saat aralığında en düşük sitotoksik aktiviteye sahip

olduğu belirlenen özütler ise açık gri zemin ile işaretlenerek gösterilmiştir. Tüm konsantrasyon ve zamanlara ait sitotoksikite değerleri Ek 6'da sunulmuştur. Hücreler üzerinde sitotoksik aktivite gösteren 13, 14, 15 ve 16 numaralı özütlerin antioksidan aktivite ve fenol miktarları daha yüksektir. Antioksidan aktivite ve fenol miktarı, solvent sistemi, karıştırma hızı, karıştırma süresi, ortam sıcaklığı ve karışım içindeki katı-sıvı oranı gibi ekstraksiyon parametrelerine göre değişen değerlerdir. Hem sitotoksik aktivitesi ,yüksek olan özütlerin hem de tüm zaman dilimlerinde canlılık yüzdesinin negatif kontrol seviyesinde kalmasını sağlayan, düşük sitotoksik aktiviteye sahip 2, 6 ve 8 numaralı özütlerin solvent sistemi %90 etanol ve %10 su olmasına rağmen, aralarındaki fark ekstraksiyon zamanları olarak karşımıza çıkmaktadır. En uzun süre olan 12 saat boyunca ilgili solvent sisteminde ekstrakte edilen özütler yüksek sitotoksik aktiviteye sahipken, ekstraksiyon süresi 2 saat olan özütlerin sitotoksik aktivitesi anlamlı şekilde azalmaktadır.

#### **4.2 Biyomalzemenin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Örnekler elektron mikroskopu vasıtasıyla incelenmiştir. 250x büyütme oranında malzemelerin görüntüleri Şekil 8'de gösterilmiştir. Görüntülerde malzemenin katmanlı bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu yapı içerikteki bitki özütü miktarı arttıkça farklılık göstermiştir. Malzemenin gözenek yapısı içeriğe bağlı olarak değişiklik göstermektedir.



Şekil 8. Biyomalzemelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı 250X'dir.

Yapının plakalar şeklinde oluştuğu gözlemlenmektedir. Hyaluronik asit miktarı arttıkça köpük malzeme içerisindeki gözeneklerin arttığı görülmektedir. Artan bitki özütü miktarı ise plaka yapısını bozmaktadır. Yapıdaki düzensizlik malzemenin mekanik kuvvetini de etkilemektedir.

### 4.3 Biyomalzemenin Salım Özellikleri ve Salım Sonrası Aktivite Belirlenmesi

Malzemeler kesikli salım uygulanmak üzere plaka içerisine yerleştirilmeden önce yapılan incelemede bitki özütü konsantrasyonu arttıkça yapının kırılğan hale geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum özüt eklendikten sonra sıvı haldeki ipek fibroin-hyaluronik asit karışımında oluşan çökelti ile de açıklanabilir.

Oluşturulan diskler PBS içerisine yerleştirildikten sonra artan bitki özütü miktarına paralel olarak sıvı içerisinde çözünme hızlarının da arttığı gözlemlenmektedir. İlk iki

saat içerisinde yapısında 100 mg *equisetum arvense* bulunan köpük malzeme büyük oranda çözülmüştür. 96 saat sonucunda 100 mg *equisetum arvense* bulunan örnekler tamamen çözülmüştür, sadece ipek fibroin ve hyaluronik asit ile oluşturulmuş köpük malzeme kuru ağırlıkça %50 oranında bozunmuştur. Aynı şekilde 96 saat sonucunda içerisinde 10 mg ve 50 mg bitki özütü bulunduran köpük malzeme yapısal olarak bütünlüğünü korumuş ama 10 mg bitki özütü bulunduran malzeme kuru ağırlıkça %75, içerisinde 50 mg bitki özütü bulunduran örnek ise %80 oranında bozunmuştur. İçerikte bulunan hyaluronik asit miktarı da yapısal bütünlüğe etki eden bir parametre olarak gözlemlenmiştir. İçeriğinde hiç bitki özütü bulunmayan malzemeler mekanik mukavemet ve çözünürlük bakımından incelendiğinde, hyaluronik asit miktarı arttıkça mekanik özellik arttığı ve biyoçözünürlük miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. İçeriğinde bitki özütü bulunmayan köpük malzemeler incelendiğinde %3 hyaluronik asit içeren örneklerde 96 saat sonucunda bozunma miktarı %78 ve %70 iken %15 hyaluronik asit içeren malzemelerde bozunma miktarı %64 ve %56'tır. %3 ve % 15 hyaluronik asit içeren örnekler kendi içerisinde incelendiğinde ise dondurma sıcaklığının çözünme miktarı üzerinde etkili olduğu gözlemlenmektedir. Her iki grupta da -24°C'de dondurulmuş örneklerdeki bozunma miktarının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile paralel olarak literatürde, artan hyaluronik asit miktarının yapının mekanik özelliğini arttırdığı bulunmuştur (RENA ve ark., 2009).

Zamana bağlı olarak malzeme çözünürlüğü artmakta ve hyaluronik asit sıvı ortamda çözüldüğünden sıvı fazda jelleşme gözlemlenmektedir. Jelleşme miktarı artan özüt konsantrasyonu ve hyaluronik asit miktarına bağlı olarak hızlanmaktadır.

#### **4.3.1 Biyomalzemenin Salım Sonrası Toplam Fenol ve Antioksidan Miktarı**

Kesikli salım sonrasında toplanan sıvı fazlar üzerinden toplam fenol miktarı ve antioksidan aktivite belirlenmiştir. Analiz sonuçları Tablo 7 ve Tablo 8'de verilmiştir. A kodlu örneklerde özüt bulunmazken, B kodlu örnekler 10 mg, C kodlu örnekler 50 mg, D kodlu örnekler ise 100 mg özüt içermektedir. Malzeme kodlarındaki harflerin yanındaki rakamlar ise hyaluronik asit içeriğini temsil etmektedir. 1 ve 2 rakamlarının bulunduğu kodlar, %3 oranında hyaluronik asit içerikli malzemeleri, 3 ve 4 rakamlarının bulunduğu kodlar, %15 oranında hyaluronik asit içerikli malzemeleri göstermektedir.

Tablo 7. Biyomalzemelerin Salım Sonrası Toplam Fenol Miktarları (mg Gallik Asit Eşdeğeri/ml)

Özüt Kodu	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
<i>A</i> <sub>1</sub>	6,5	7,5	13,7	2,2
<i>A</i> <sub>2</sub>	6,9	12,3	7,2	1,2
<i>A</i> <sub>3</sub>	11,0	6,2	4,8	0,8
<i>A</i> <sub>4</sub>	11,2	0,2	10,0	1,6
<i>B</i> <sub>1</sub>	5,7	7,2	12,3	2,0
<i>B</i> <sub>2</sub>	5,0	4,9	11,7	1,9
<i>B</i> <sub>3</sub>	5,7	1,8	13,4	2,2
<i>B</i> <sub>4</sub>	4,0	16,0	38,6	6,3
<i>C</i> <sub>1</sub>	11,6	25,9	32,8	5,3
<i>C</i> <sub>2</sub>	13,9	17,1	23,9	3,9
<i>C</i> <sub>3</sub>	10,1	16,0	16,6	2,7
<i>C</i> <sub>4</sub>	14,7	39,1	41,5	6,8
<i>D</i> <sub>1</sub>	10,4	10,7	15,1	2,5
<i>D</i> <sub>2</sub>	5,9	14,8	17,9	2,9
<i>D</i> <sub>3</sub>	8,3	17,4	12,5	2,0
<i>D</i> <sub>4</sub>	13,4	25,3	31,2	5,1

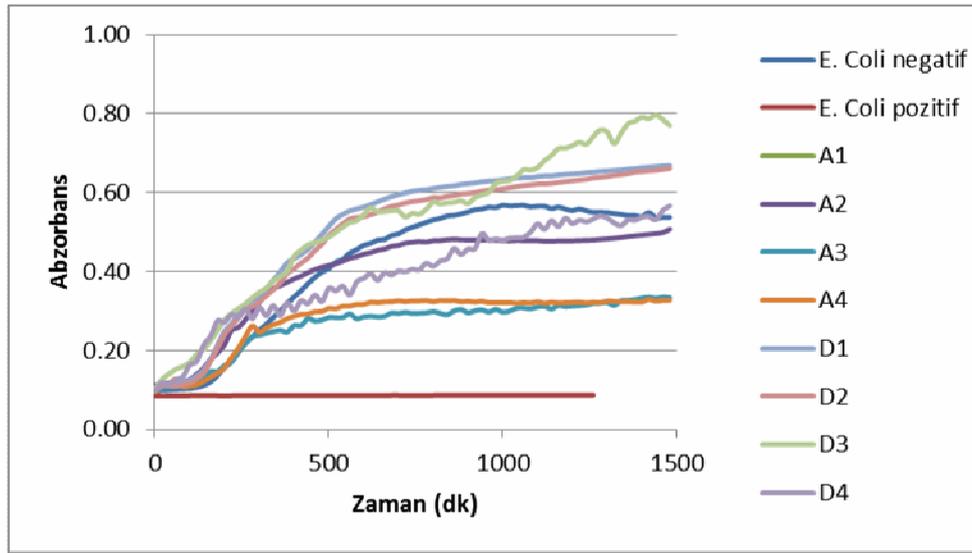
Tablo 8. Biyomalzemelerin Salım Sonrası Antioksidan Aktiviteleri ( $\mu\text{M TEAK} / \mu\text{l}$ )

Özüt Kodu	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
<i>A</i> <sub>1</sub>	103,08	70,53	79,55	-3,95
<i>A</i> <sub>2</sub>	133,32	39,29	76,15	-0,94
<i>A</i> <sub>3</sub>	78,89	64,73	81,85	-37,89
<i>A</i> <sub>4</sub>	134,47	-31,61	167,01	105,56
<i>B</i> <sub>1</sub>	145,81	70,10	142,13	111,40
<i>B</i> <sub>2</sub>	83,20	67,09	84,13	232,58
<i>B</i> <sub>3</sub>	175,87	27,49	101,91	167,37
<i>B</i> <sub>4</sub>	84,59	173,41	220,45	148,90
<i>C</i> <sub>1</sub>	125,30	252,02	229,01	215,34
<i>C</i> <sub>2</sub>	157,11	227,46	217,71	239,91
<i>C</i> <sub>3</sub>	87,53	198,78	201,55	236,86
<i>C</i> <sub>4</sub>	159,42	295,01	256,73	264,17
<i>D</i> <sub>1</sub>	126,85	113,87	187,99	127,77
<i>D</i> <sub>2</sub>	85,88	150,91	188,03	125,00
<i>D</i> <sub>3</sub>	151,08	238,18	206,35	140,93
<i>D</i> <sub>4</sub>	145,82	255,85	249,74	291,57

Malzemelerin zamana bağılı olarak sıvıyı jelleştirme miktarları farklılık göstermektedir. Sıvıdaki jelleşme toplam fenol ve antioksidan analiz sonuçlarında sapmalara neden olmuştur. Bu sapmalara rağmen malzemenin içeriğindeki bitki özütünün salımı büyük oranda ilk 24 saat sonunda gözlemlenmiştir.

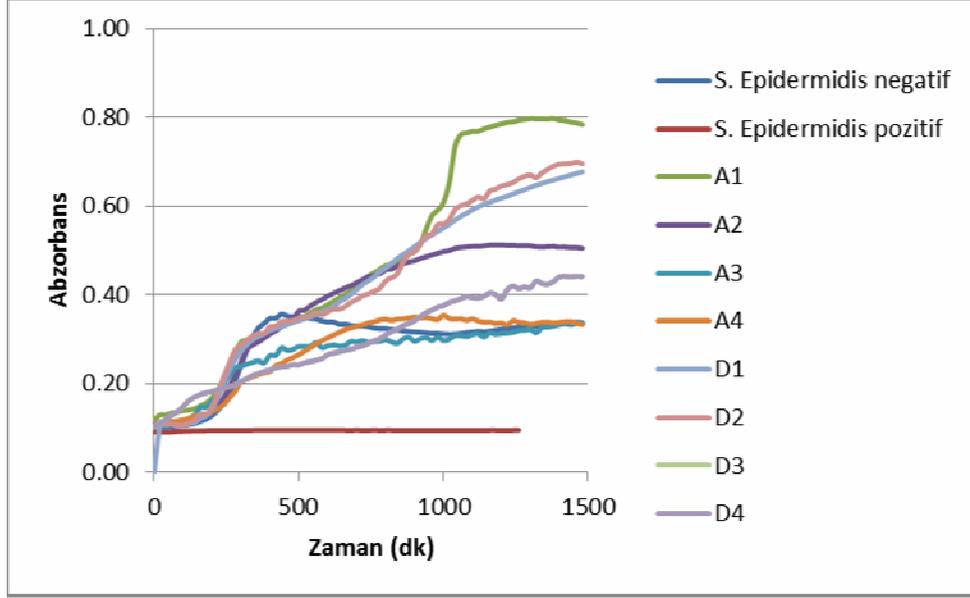
#### 4.3.2 Biyomalzemenin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

72 saatlik salım sonrası oluşan sıvı fazların üç farklı patojen üzerindeki inhibisyonları araştırılmıştır. 24 saatlik büyüme eğrileri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, bitki özütünün bulunmadığı ve en yüksek miktarda bulunduğu malzemeler kullanılmıştır. İlgili büyüme eğrileri aşağıda yer alan Şekil 9, 10 ve 11'de gösterilmiştir.



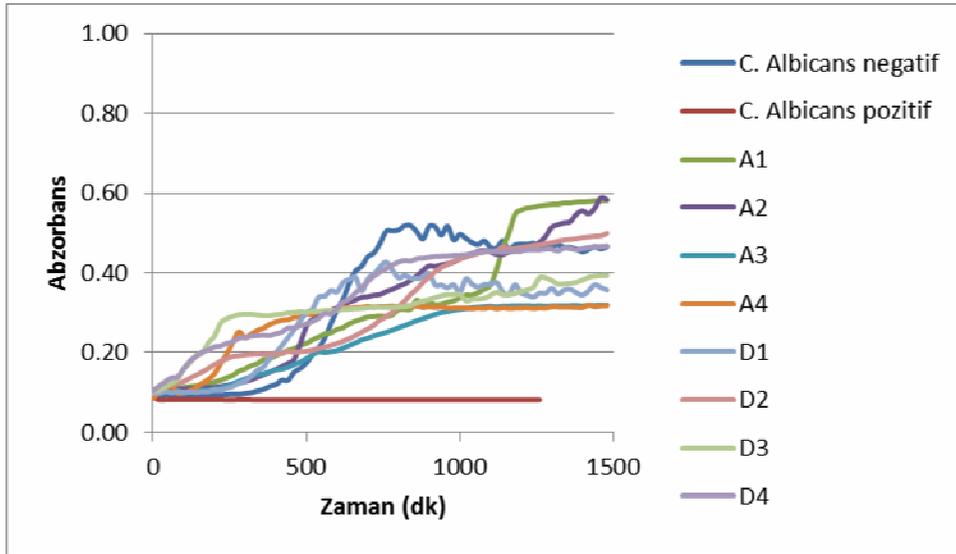
Şekil 9. İçeriğinde bitki özütü bulunmayan A1, A2, A3 ve A4 kodlu malzemeler ile içeriğinde 100 mg özüt bulunan D1, D2, D3 ve D4 kodlu malzemelere ait 96 saatlik salım ortamlarının *E. Coli* üzerindeki etkisi.

Şekil 9'de görüldüğü gibi içeriğinde bitki özütü bulunmayan A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> kodlu malzemeler bakteri büyümesini yavaşlatmıştır. Bunun yanında içeriğinde bitki özütü bulunan D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> köpük malzemelerin salım sonrası sıvı fazları bakterinin büyümesinde herhangi bir etkiye neden olmamıştır.



Şekil 10. İçeriğinde bitki özütü bulunmayan A1, A2, A3 ve A4 kodlu malzemeler ile ve içeriğinde 100 mg özüt bulunan D1, D2, D3 ve D4 kodlu malzemelere ait 96 saatlik salım ortamlarının *S.epidermidis* üzerindeki etkisi.

Şekil 10'da görüldüğü üzere örneklerde bakteri büyümesini yavaşlatıcı bir özellik görülmemiştir. Aksine örnekler bakteri büyümesini tetikleyici bir rol üstlenmişlerdir.

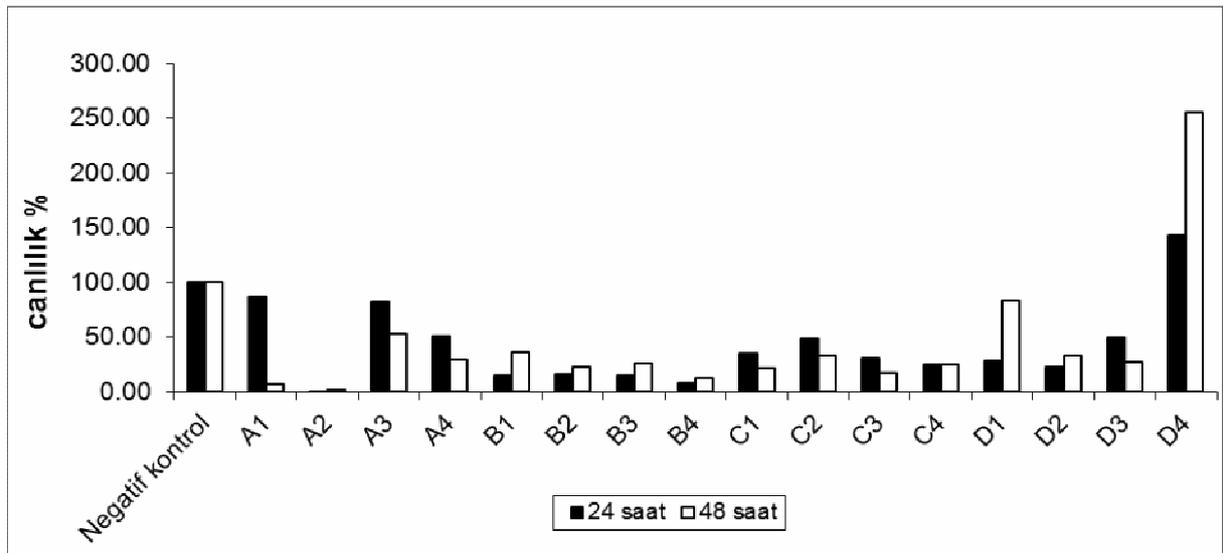


Şekil 11. İçeriğinde bitki özütü bulunmayan A1, A2, A3 ve A4 kodlu malzemeler ile ve içeriğinde 100 mg özüt bulunan D1, D2, D3 ve D4 kodlu malzemelere ait 96 saatlik salım ortamlarının *C. albicans* üzerindeki etkisi.

Şekil 11'de görüldüğü üzere örneklerde mantar büyümesini yavaşlatıcı bir özellik görülmemiştir.

### 4.3.3 Biyomalzemenin Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

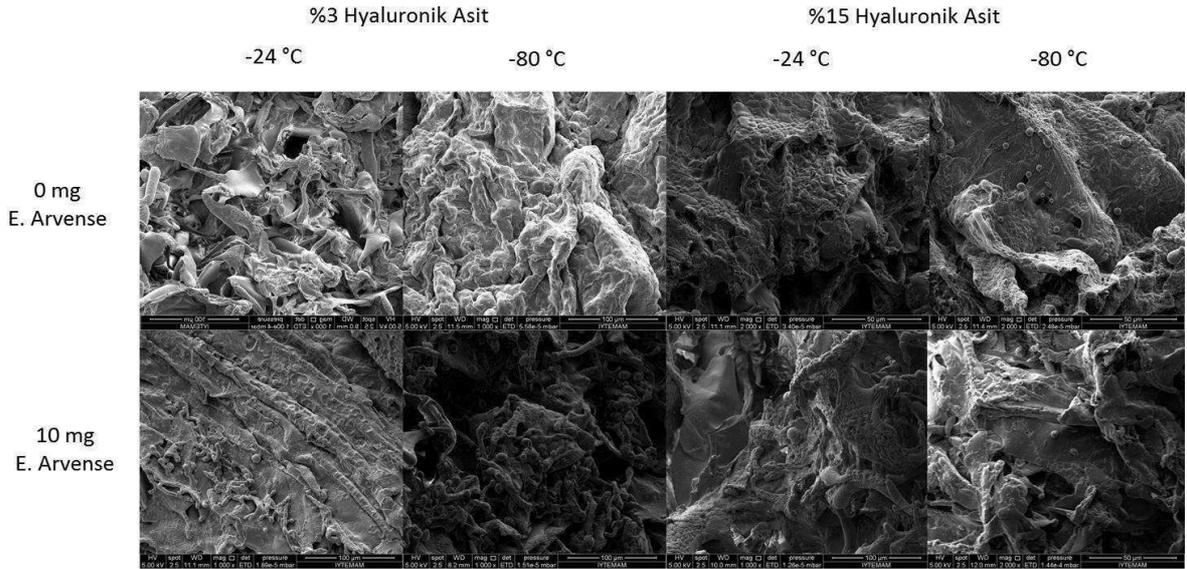
Negatif kontrol %100 canlı olarak kabul edilerek oranlama yapıldığında, biyomalzemeler için kabul edilebilir canlılık yüzdesi olan %70 sadece ilk 24 saat içerisinde içeriğinde bitki özütü bulunmayan köpük malzemelerde görülmektedir (Şekil-12). *Equisetum arvense* bitki özütünün sitotoksik etkisi daha önceki deneylerde ortaya konulmuştur. Köpük malzemeden salınan özüt için de paralel sonuçlar gözlemlenmiştir. D4 örneğinde yüksek absorban, malzemenin besiyeri ile girişim yapması ve absorban değerlerinde sapma oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Dipte oluşan çökelti, fotometrik okumalarda hataya neden olmuş, aynı hata bir kaç denemede de gözlemlenmiştir. Ayrıca PBS ile inkübe edilen biyomalzemenin gözenek yapısı değiştiğinden, malzemenin salım özellikleri değişikliğe uğramış ve salım ortamı içerik bakımından optimize edilememiştir.



Şekil 12. Malzeme özütünün 24 ve 48 saatte hücre canlılığına etkisi.

### 4.4 Hücre-Biyomateryal Entegrasyonu

Hücre tutunumunu gözlemlmek için içerisinde bitki özütü bulunmayan ve 10 mg bitki özütü bulunan malzemeler, en iyi mekanik mukavemete sahip oldukları için bu işlemden kullanılmak üzere seçilmiştir. Elde edilen elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Biyomalzemeler üzerine hücre tutunmasını gösteren SEM görüntüleri. Büyütme oranı 1000X'dir.

Gözenekli malzemeler yara iyileştirme çalışmalarında, yüzey alanında artış sağladığı ve hücre tutunumunu teşvik etmesi bakımından ön plana çıkmaktadır. Malzemenin gözenekleri arası geçişler olması ve gözenek boyutlarının 100 µm'den fazla olması hücre tutunumunu sağlayan faktörler arasında yer almaktadır (LU ve ark., 2011). Hücrelerin tutunması için ideal bir yüzeye sahip malzemeler, içerikleri ile de ekstrasellüler matriksi taklit edebildikleri oranda yara iyileştirme çalışmaları için daha yüksek potansiyele sahip olmaktadır. Elde edilen görüntüler Şekil 13'de incelendiğinde sadece %15 hyaluronik asit ile -24 °C'de oluşturulmuş malzeme dışındaki örneklere hücrelerin tutundukları gözlemlenmiştir. Hücre tutunması için en önemli etken olan yüzey gözenekliliği ve pürüzlülüğü bu örneklerde hücrelerin tutunmasına olanak verecek düzeydedir.

## 5. TARTIŞMA/SONUÇ

Projenin özüt karakterizasyonu aşamasında elde edilen toplam fenol sonuçları göz önüne alındığında, özütleme sırasında kullanılan etanol-su karışımının oranı değiştiğinde karışımın polaritesi değişecek ve farklı polariteye sahip fenolik bileşiklerin karışım içinde bulunma oranları da farklılık gösterecektir. Ayrıca sıcaklık kütle transferini hızlandırıcı bir etmendir ve ekstraksiyon süresinde bu transferin etkisini artırır. Bu bağlamda örneklerimizin fenolik içeriklerinde ki değişiklik de anlam kazanmaktadır. İstatistiksel analiz sonucunda fenolik bileşiklerin elde edilmesinde kullanılacak parametrelerin hesaplamasındaki formül aşağıdaki gibidir.

$$A = 59,0996 + 1,304 * x1 + 1,1801 * (x3) - 3,3278 * (x4) - 0,0150 * (x3)^2 + 0,0771(x1 * x4) + 0,1099 * (x3 * x4)$$

Etanol miktarının artması ile birlikte toplam fenol miktarında da artış gözlenmesi beraberinde antioksidan aktivite artışını da getirmiştir. Sıcaklık ve diğer parametreler ise kütle transferinin etkili ve yüksek miktarda gerçekleşmesini sağlamıştır. Özüt içerisindeki fenolik bileşiklerin oranı arttıkça özütün antioksidan kapasitesi de buna paralel olarak artmaktadır. 2007 yılında Milovanovic V. ve 2005 yılında da Nagai bitkinin antioksidan aktivitesini farklı maddelerle eşdeğer olarak göstermişlerdir. Bizim bulgularımız da bu yayınlar ile birlikte değerlendirildiğinde, özütleme işlemi için karakterizasyonun ne derece önemli olduğu bir kere daha ortaya çıkmaktadır. İstatiksel analiz sonucunda antioksidan kapasitesini belirleye maddelerin elde edilmesinde kullanılacak parametrelerin hesaplamasındaki formül aşağıdaki gibidir.

$$A = 885,780 - 13,866 * (x1) + 3,998 * (x2) + 16,729 * (x3) - 58,573 * (x4) - 62,701 * (x5) - 0,018(x1)^2 - 0,219 * (x3)^2 + 6,890 * (x4)^2 + 1,975 * (x5)^2 + 0,078 * (x1 * x3) + 0,030 * (x2 * x3) + 0,622 * (x3 * x4)$$

*E. Arvense*'nin antimikrobiyal etkisi üzerine, Radulovic N. 2006 yılında bitkiye ait uçucu yağlar ile yaptıkları denemelerde *E. Coli* ve *C. Albicans* için antimikrobiyal etki gözlemlenmişlerdir. *E. Coli* için 25 mm, *C. Albicans* içinse 23 mm temiz alan rapor etmişlerdir. Jasna M. 2009 yılında bitkinin etil asetat ve n-butanol ile hazırlanan özütleri üzerinde yaptığı denemelerde *E. Coli* büyümesi üzerinde herhangi etki gözlemlenmediğini raporlamıştır. 2008 yılında Lotfipour ve arkadaşları etil asetat ve diklorometan ile yaptıkları özütlerin *S. Epidermidis* büyümesi üzerinde inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada *E. Coli* üzerinde bir etki gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla bazı açılardan tutarlıdır. Ne varki özütleme yönteminde ki farklılıklardan dolayı elde edilen fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve farklılığı, özütlerin daha etkili olmasında rol oynamıştır. Aynı zamanda bitkinin yetiştiği coğrafya, hasat zamanı ve iklim içeriğindeki etken maddelerin miktarları üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında özütleme karakterizasyonunun önemi bir kere daha ortaya çıkmıştır.

Antioksidan aktivite ve toplam fenol miktarının yüksek olması, ilgili maddenin vücut içinde oluşan serbest radikalleri etkin biçimde süpürme özelliğini ortaya

koymaktadır. Hücre içinde enerji üretimi ve metabolizma hareketlerinde önemli görevleri bulunan serbest radikaller, en dış elektron yörüngesindeki elektron açığına kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmaya çalışırlar. Elektron açığını kapatamadığı takdirde sahip oldukları yüksek enerji nedeniyle vücut içinde hücre membranı lipidlerini, hücresel proteinleri, DNA ve enzimleri oksitler ve oluşan oksidatif stres nedeniyle hücresel solunum olumsuz etkilenir ve hücre yıkımı hatta ölümü meydana gelir (Antolovich ve ark., 2002). Vücutta yara oluşuktan sonra ise yara bölgesi bakteri kolonilerince zengin hale gelir ve bu bakteriyel yükün bölgeden uzaklaştırılması için bağışıklık sistemi uyarılarak lökosit göçü aktiflenir (MUSTOE, 2004). Görevi mikrobiyal yükü ortadan kaldırmak olan oksidan enzimler ise, yara bölgesindeki anemiye bağlı olarak oksijen yetersizliği nedeniyle etkin olarak çalışamazlar, mikroorganizmalar varlığını sürdürmeye devam eder ve yara iyileşme süreci aksar (O'MEARA ve ark., 2000). Süreci aksatan bir diğer unsur da yara bölgesindeki ani kanlanma sonucu oksijen miktarının aşırı artışı ve beraberinde serbest radikallerin yara bölgesine salınmasıdır. Sonuç olarak ortamda oksidatif stres artar ve iyileşmede rol oynayacak hücrelerin yıkımına yol açarak, yara iyileşmesini kesintiye uğratır.

Antioksidan aktiviteye sahip maddeler, oksidatif stres yaratan serbest radikalleri, serbest radikal ara ürünlerini veya oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederek ortadan kaldırma özelliğine sahiptirler. Antioksidan maddeler, sahip oldukları aktivite değerleri ve kullanım miktarlarına bağlı olarak yarar sağladıkları gibi zarar da verebilmektedirler. Yeterli oksijen varlığında mikrobiyal aktiviteyi durdurma yönünde etki gösteren oksidan enzimlerin miktarını azaltmaları nedeniyle, fazla miktarda antioksidan madde varlığı yara iyileşme sürecini de olumsuz etkileyebilir. Bu bağlamda elde edilen veriler doğrultusunda düşük sitotoksik aktivite ve yüksek antioksidan kapasite ile fenol miktarı değerleri örtüşen parametreler seçilerek optimizasyon sağlanabilecektir.

Biyomalzeme oluşturulduktan sonra kesikli salım yöntemi ile salım sonrası aktivite ve malzemenin dayanımı üzerine yapılan incelemelerde, malzemeye bitki özütü eklenmesinin, eklenen konsantrasyondaki artışla paralel olarak kırılabilirliği arttırdığı ve ipek fibroin-hyaluronik asit karışımında çökelti oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan bilimsel çalışmalarda fenolik bileşiklerin proteinler ile etkileşime girip sıvı faz içinde çökelti oluşturdukları gösterilmiştir. Kullandığımız at kuyruğu bitkisinin fenolik

içeriği daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek olarak bulunmuştur (RAWEL ve ark., 2002, ZHANG ve ark., 2008, OU ve ark., 2005, ARTS ve ark., 2001, ZHANG ve ark., 2001, TIANA ve ark., 2004). Bu nedenle oluşan çökeltinin fenolik bileşik-protein etkileşiminden dolayı oluştuğunu söyleyebilmekteyiz. Yapı iskeletinin temel taşı olan ipek fibroinler sıvı içerisinden çöktükçe iskelet yapıda bozulma meydana gelmektedir bu da yapının mekanik kuvvetini olumsuz yönde etkilemektedir. İçeriğinde hiç bitki özütü bulunmayan malzemeler mekanik mukavemet ve çözünürlük bakımından incelendiğinde, hyaluronik asit miktarı arttıkça mekanik özellik arttığı ve biyoçözünürlük miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile paralel olarak literatürde, artan hyaluronik asit miktarının yapının mekanik özelliğini arttırdığı bulunmuştur (Rena ve ark., 2009). Örnekler taramalı elektron mikroskopunda incelendiğinde ise, katmanlı bir yapı elde edildiği gözlenmiş, hyaluronik asit miktarı arttıkça gözenek oluşumunda bir artış olduğu saptanmıştır. Bitki özütü eklenmesi ise, miktarın artmasına bağlı olarak plaka oluşumunu bozmakta ve malzemenin mekanik dayanımı da daha önce belirtildiği gibi, bu durumdan olumsuz etkilenmektedir.

Malzemedan yapılan salım sonucunda ki toplam fenol ve antioksidan sonuçları incelendiğinde bunların özütün toplam antioksidan ve fenol kapasitesiyle uygunluk gösterdiği ve ilk 24 saatte büyük oranda aktif bileşikleri ortama saldığı gözlemlenmiştir.

Özüt eklenmiş ve eklenmemiş malzemelerin fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde, ilk 24 saat içinde malzemenin hücreler üzerinde, ISO standartlarına göre biyomalzeme sitotoksikite sınırı olarak %30 oranını aşmadığı, hücrelerin %70 oranında canlılık gösterdiği görülmektedir. Bununla beraber bazı örneklerin kontrol grubundan da yüksek absorbanza sahip olma nedeni, malzeme ile besiyerindeki bileşenlerin girişim yapması ve çökelti oluşturması olarak açıklanabilir. Bu nedenle projede önerilen indirekt sitotoksikite ölçüm yöntemi yerine direkt ölçüm yapılması ve hücrelerin biyomalzeme üzerine ekim yapıldıktan sonra MTT testinin uygulanması daha sağlıklı sonuçlar verebilecektir. Biyomalzeme-hücre entegrasyonunda ise deneme için en dayanıklı olduğu gözlenen, bitki özütü bulundurmeyen ve içeriğinde 10 mg bitki özütü bulduran malzemeler seçilmiştir. Fibroblast hücrelerinin, %15 hyaluronik asit içerikli ve -24°C'de dondurulan malzeme dışında diğer malzemelere tutunduğu, en yüksek tutunma oranının %15 hyaluronik

asit içerikli -80°C'de dondurulan malzemede olduğu gözlenmiştir. Hyaluronik asidin yapıya eklenmesinin, malzemenin ekstrasellüler matriksi taklit etme derecesini, daha düşük sıcaklıklarda dondurma işleminin gerçekleştirilmesinin de gözenek oluşumunu arttırmayı hücrelerin bu özelliklere sahip malzemeye tutunumunu açıklamaktadır.

## REFERANSLAR

- ALTAY P., Başal G., Yara Örtüleri, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 1, 109-121, (2010).
- ANTOLOVICH M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mcdonald S., Robards K., Methods for Testing Antioxidant Activity, *The Analyst*,. 127, 183-198, (2002).
- ARTS M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A., Masking Of Antioxidant Capacity By The Interaction Of Flavonoids With Protein. *Food Chem.Toxicol.*, 39,787–791, (2001).
- BALASUBRAMANI M., Kumar T.R., Babu M., Skin substitutes: a review, *Burns*, 27, 534–544, (2001).
- BOATENG J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M., Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 8, 2892–2923, (2008).
- CANADANOVIĆ-BRUNET J.M., Cetković G.S., Djilas S.M., Tumbas V.T., Savatović S.S., Mandić A., Markov L.S., Cvetković D.B., Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts., *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 269–278, (2009).
- CHAKRABORTY S., Liao I., Adler A., Leong K.W., Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 12, 1043–1054, (2009).
- CHEN G., Zhou P., Mei N., Chen X., Shao Z., Silk Fibroin Modified Porous Poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold for Human Fibroblast Culture In Vitro, *Journal of Materials Science*, 15, 671-674, (2004).
- CHEN W.Y.J., Abatangelo G., Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep Reg.*, 7, 79–89, (1999).
- FALANGA V., The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32, 1, 88–94, (2004).
- FUENTES M.G., Meinel A.J., Hilbe M., Meinel L., Merkle H.P., Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 5068-76, (2009).
- GURTNER G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker T.M., Wound repair and regeneration, *Nature*, 453, 314-321, (2008).

- HARDY J.G., Römer L.M., Scheibel T.R., Polymeric materials based on silk proteins, *Polymer*, 49, 20, 4309–4327, (2008).
- JASNA M.C., Anadanovic B., Cetkovic G.S., Sonja M., Tumbas V.T., Savatovic S.S., Mandic A.I., Markov S.L., Cvetkovic D.D., Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of Horsetail (*equisetum arvense* L.) Extracts, *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 269–278, (2009).
- KI C.S., Park S.Y., Kim H.J., Jung H., Woo K.M., Lee J.W., Park Y.H., Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration, *Biotechnol Lett*, 30, 3, 405–410, (2008).
- LANSDOWN A.B.G., Mirastschijski U., Stubbs N., Scanlon E., Agren M.S., Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects, *Wound Rep Reg*, 15, 2–16, (2007).
- LOTFIPOUR F., Nazemiyeh H., Azad F., Garaei N., Arami S., Talat S., Sadegpour F., Hasanpour R., Evaluation of Antibacterial Activities of Some Medicinal Plants form North-West Iran, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(2), 80-85, (2008).
- LU Q., Wang X., Lu S., Li M., Kaplan D.L., Zhu H., Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process, *Biomaterials*, 32(4): 1059–1067, (2011).
- LOVVORN H.N., Cheung D.T., Nimni M.E., Perelman N., James M. Estes N. Adzick S., Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair, *Journal of Pediatric Surgery*, 34, 1, 218-223, (1999).
- MALAFAYA P.B., Silva G.A., Reis R.L., Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 207–233, (2007).
- MANTLE D., Eddeb F., Pickering A.T., Comparison of Relative Antioxidant Activities of British Medicinal Plant Species in Vitro, *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 47–51, (2000).
- MATTHEWS J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., Electrospinning of Collagen Nanofibers, *Biomacromolecules*, 3, 2, 232-238, (2002).
- MI F., Wu Y., Shyu S., Schoung J., Huang Y., Tsai Y., Hao J., Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery, *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 3, 438–449, (2002).

- MILOVANOVIĆ V., Radulović N., Todorović Z., Stanković M., Stojanović G., Antioxidant, Antimicrobial and Genotoxicity Screening of Hydro-alcoholic Extracts of Five Serbian Equisetum Species, *Plant Foods Hum Nutr.*, 62,113–119, (2007).
- MIN B., Jeong L., Nam Y.S., Kim J., Kim J.Y., Park W.H., Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 5, 223–230, (2004).
- MUSTOE T., Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy, *The American Journal of Surgery*, 187, 65–70, (2004).
- NAGAI T., Myoda T., Nagashima T., Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense L.*, *Food Chemistry*, 91, 389–394, (2005).
- O'MEARA S., Cullum N., Majid M., Sheldon T., Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration, *Health Technology Assessment*, 4, 21, (2000).
- OPALENIK S.R., Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair, *The FASEB Journal*, 19, 1561-1563, (2005).
- OU S., Wang Y., Tang S., Huang C., Jackson M.G., Role Of Ferulic Acid In Preparing Edible Films From Soy Protein Isolate, *J. Food Eng.*, 70, 205 – 210, (2005).
- PARSONS D., Bowler P.G., Myles V., Jones S., Silver Antimicrobial Dressings in Wound Management: A Comparison of Antibacterial, Physical, and Chemical Characteristics, *Wounds*, 17, 8, 222-232, (2005).
- PHAM Q.P., Sharma U., Mikos A.G., Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Engineering*, 12, 5, 1197-1211, (2006).
- PURSER K., Wound Dressing Guidelines, *Royal United Hospital Bath NHS Trust*, (2010).
- RADULOVIĆ N., Stojanović G., Palić R., Composition and Antimicrobial Activity of *Equisetum arvense L.* Essential Oil., *Phytother. Res.*, 20, 85–88, (2006).
- RAWEL H.M., Czajka D., Rohn S., Kroll J., Interactions of Different Phenolic Acid and Flavonoids with Soy Proteins, *Int. J. Biol. Macromol.*, 30, 137-150, (2002).

- REN Y.Z., Zhou Z.Y., Liu B.F., Xu Q.Y., Cui F.Z., Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold, *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 372–378, (2009).
- REN Y.J., Zhou Z.Y., Liu B.F., Xu Q.Y., Cui F.Z., Preparation and Characterization of Fibroin/Hyaluronic Acid Composite Scaffold. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44,372–378, (2009).
- SCHNEIDER A., Wang X.Y., Kaplan D.L., Garlick J.A., Egles C., Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing, *Acta Biomaterialia*, 5, 7, 2570-2578, (2009).
- SIBBALD R.G., Zuker R., Coutts P., Coelho S., Williamson D., Queen D., Using a Dermal Skin Substitute in the Treatment of Chronic Wounds Secondary to Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Case Series, *Ostomy Wound Management*, 51, 11, 22-46, (2005).
- TIANA J., Liua J., Tiana X., Hu Z., Chen X., Study Of The Interaction Of Kaempferol With Bovine Serum Albumin. *J. Mol. Struct.*, 691, 197–202, (2004).
- TAMADA Y., New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure, *Biomacromolecules*, 6, 6, 3100-3106, (2005).
- WERNER S., Grose R., Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines, *Physiol Rev*, 83, 835–870, (2003).
- WERNER S., Krieg T., Smola H., Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing, *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 998-1008, (2007).
- YEO I., Oh J., Jeong L., Lee T.S., Lee S.J., Park W.H., Min B., Collagen-Based Biomimetic Nanofibrous Scaffolds: Preparation and Characterization of Collagen/Silk Fibroin Bicomponent Nanofibrous Structures, *Biomacromolecules*, 9, 4, 1106–1116, (2008).
- ZHANG H.M., Zhou Q.H., Yang Y.Q., Wan Y.Q., Investigation of the Interaction Between Rutin and Trypsin in Solution by Multi-Spectroscopic Method, *Spectrosc. Lett.*, 43, 183–191, (2010).
- ZHANG Y., Yue Y., Li J., Chen X., Studies On The Interaction Of Caffeic Acid With Human Serum Albumin In Membrane Mimetic Environments, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 90, 141–151, (2008).
- ZHANG Q., Yan S., Li M., Silk Fibroin Based Porous Materials, *Materials*, 2, 4, 2276-2295, (2009).

- ZHANG X., Reagan M.R., Kaplan D.L., Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 12, 988–1006, (2009).

## EKLER

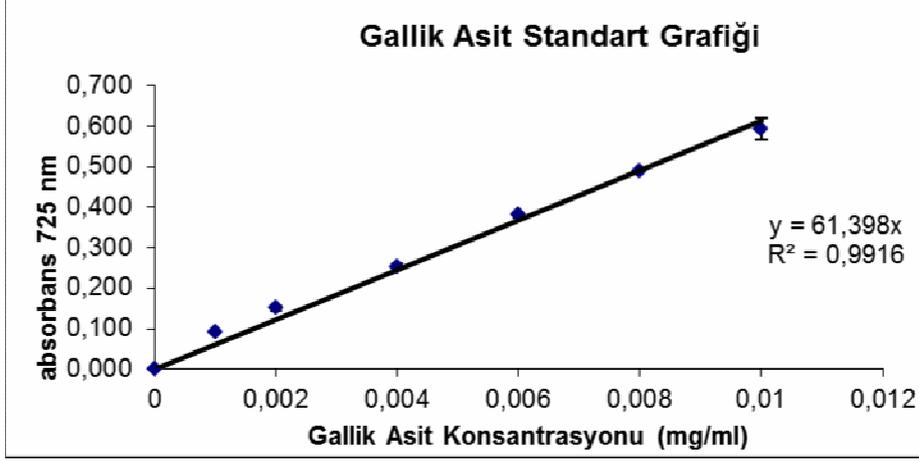
### EK-1

*Equisetum arvense* özüt karakterizasyonu için 5 faktörlü yarım yüz merkezli yüzey yanıt analiz tablosu.

Örnek Numarası	RunOrder	PtType	Blocks	Sıcaklık	Karıştırma	EtOH	Katı sıvı bekletme zamanı	Katı sıvı oranı
5	1	1	1	4	50	90	2	10
16	2	1	1	45	250	90	12	30
6	3	1	1	45	50	90	2	30
31	4	0	1	24,5	150	50	7	20
23	5	-1	1	24,5	150	50	2	20
3	6	1	1	4	250	10	2	10
1	7	1	1	4	50	10	2	30
4	8	1	1	45	250	10	2	30
8	9	1	1	45	250	90	2	10
20	10	-1	1	24,5	250	50	7	20
17	11	-1	1	4	150	50	7	20
28	12	0	1	24,5	150	50	7	20
13	13	1	1	4	50	90	12	30
19	14	-1	1	24,5	50	50	7	20
21	15	-1	1	24,5	150	10	7	20
10	16	1	1	45	50	10	12	30
30	17	0	1	24,5	150	50	7	20
25	18	-1	1	24,5	150	50	7	10
2	19	1	1	45	50	10	2	10
24	20	-1	1	24,5	150	50	12	20
26	21	-1	1	24,5	150	50	7	30
14	22	1	1	45	50	90	12	10
9	23	1	1	4	50	10	12	10
11	24	1	1	4	250	10	12	30
12	25	1	1	45	250	10	12	10
18	26	-1	1	45	150	50	7	20
22	27	-1	1	24,5	150	90	7	20
29	28	0	1	24,5	150	50	7	20
27	29	0	1	24,5	150	50	7	20
15	30	1	1	4	250	90	12	10
32	31	0	1	24,5	150	50	7	20
7	32	1	1	4	250	90	2	30

## EK-2

Gallik Asit standart grafiği



Örneklerin gram kuru ağırlıklarındaki miligram gallik asit eşdeğerliklerini gösteren tablo

Örnek	Absorbans	mg GAED/ gr KA
Kör	0,0	0,0
1	0,5	82,9
2	0,2	35,3
3	0,1	20,5
4	0,2	35,4
5	0,2	25,4
6	0,3	41,9
7	0,2	34,5
8	0,3	41,6
9	0,4	59,3
10	0,7	106,5
11	0,3	53,6
12	0,4	57,1
13	0,9	150,0
14	1,1	182,8
15	0,7	115,4

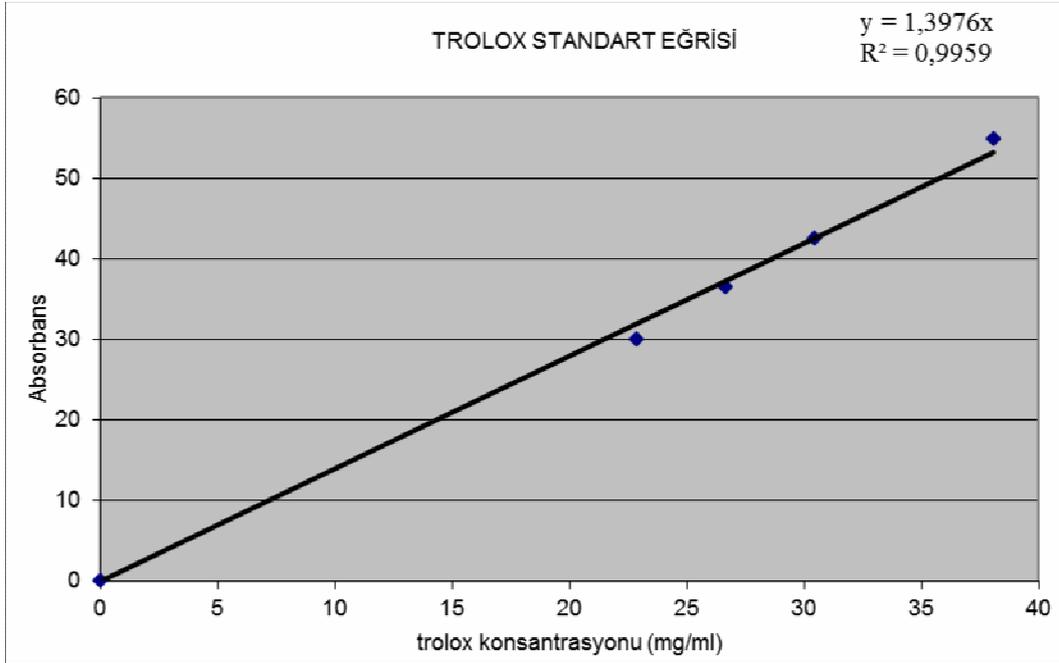
Örnek	Absorbans	mg GAED/ gr KA
16	0,9	149,1
17	0,5	86,4
18	0,3	52,1
19	0,5	86,2
20	0,5	79,6
21	0,3	51,9
22	0,4	63,5
23	0,3	53,3
24	0,5	80,6
25	0,6	93,3
26	0,6	103,6
27	0,5	85,5
28	0,5	79,8
29	0,6	94,8
30	0,6	100,9
31	0,5	75,8
32	0,7	115,4

Gallik asit eşdeğerliği için örneklerin yüzey analiz regresyonu

Yüzey analiz dağılımı GALLİK ASİT						
The analysis was done using uncoded units.						
Estimated Regression Coefficients for Gallic Acid equilevent (gr/ml)						
Term	Coef	SE Coef	T	P		
Constant	59,0996	37,4292	1,579	0,149		
temperature	1,3042	1,2746	1,023	0,333		
stirring	-0,0789	0,3132	-0,252	0,807		
EtOH	1,1801	0,6761	1,745	0,115		
Incubation time	-3,3278	7,2193	-0,461	0,656		
solid liquid ratio	-4,0024	4,0201	-0,996	0,345		
temperature*temperature	-0,0296	0,0231	-1,282	0,232		
stirring*stirring	0,0001	0,0010	0,122	0,905		
EtOH*EtOH	-0,0150	0,0061	-2,476	0,035		
Incubation time*Incubation time	0,3531	0,4985	0,708	0,497		
solid liquid ratio*	0,1677	0,0970	1,728	0,118		
solid liquid ratio						
temperature*stirring	0,0003	0,0018	0,177	0,863		
temperature*EtOH	0,0055	0,0045	1,220	0,253		
temperature*Incubation time	0,0771	0,0360	2,142	0,061		
temperature*solid liquid ratio	-0,0257	0,0180	-1,431	0,186		
stirring*EtOH	0,0009	0,0009	0,981	0,352		
stirring*Incubation time	-0,0087	0,0074	-1,182	0,268		
stirring*solid liquid ratio	-0,0025	0,0037	-0,687	0,509		
EtOH*Incubation time	0,1099	0,0184	5,963	0,000		
EtOH*solid liquid ratio	-0,0150	0,0092	-1,624	0,139		
Incubation time*solid liquid ratio	-0,0342	0,0737	-0,464	0,653		
S = 14,7477	PRESS = 195506					
R-Sq = 95,46%	R-Sq(pred) = 0,00%	R-Sq(adj) = 85,37%				
Analysis of Variance for Gallic Acid equilevent (gr/ml)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	20	41147,8	41147,8	2057,4	9,46	0,001
Linear	5	27928,6	1078,1	215,6	0,99	0,474
Square	5	2475,5	2475,5	495,1	2,28	0,134
Interaction	10	10743,7	10743,7	1074,4	4,94	0,012
Residual Error	9	1957,5	1957,5	217,5		
Lack-of-Fit	5	1522,9	1522,9	304,6	2,80	0,170
Pure Error	4	434,6	434,6	108,6		
Total	29	43105,2				
Unusual Observations for Gallic Acid equilevent (gr/ml)						
Gallic Acid						
equilevent						
Obs	StdOrder	(gr/ml)	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
3	6	41,901	36,231	14,523	5,670	2,21 R
25	18	52,082	75,523	10,594	-23,441	-2,28 R
R denotes an observation with a large standardized residual.						

### EK-3

Trolox standart grafiği



Elde edilen özütlerin miligram kuru ağırlık içerisindeki ntioksidan kapasitelerinin mikromolar troloks eşdeğerlikleri

Örnek	mikro molar TEAK / mg KA
Kör	0
1	830,89
2	395,40
3	292,75
4	338,80
5	412,14
6	550,20
7	585,21
8	820,69
9	939,18
10	725,69
11	424,02
12	412,35
13	1214,94
14	1246,82
15	1268,09

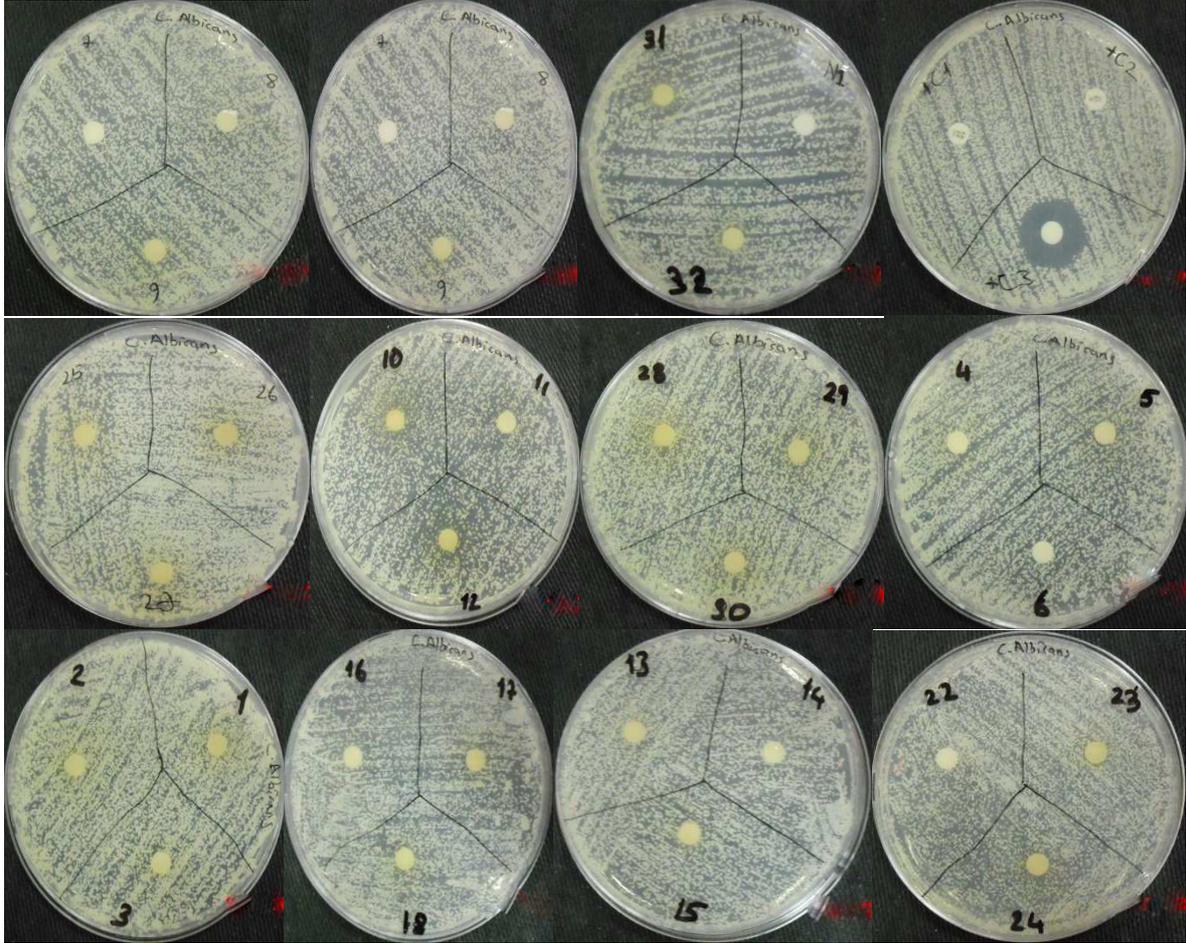
Örnek	mikro molar TEAK / mg KA
16	1270,79
17	838,07
18	523,70
19	651,98
20	572,58
21	357,18
22	532,75
23	817,09
24	1116,61
25	885,20
26	1099,02
27	814,92
28	866,76
29	954,65
30	915,48
31	1203,40
32	1026,65

Trolox eşdeğerliği için örneklerin yüzey analiz regresyonu

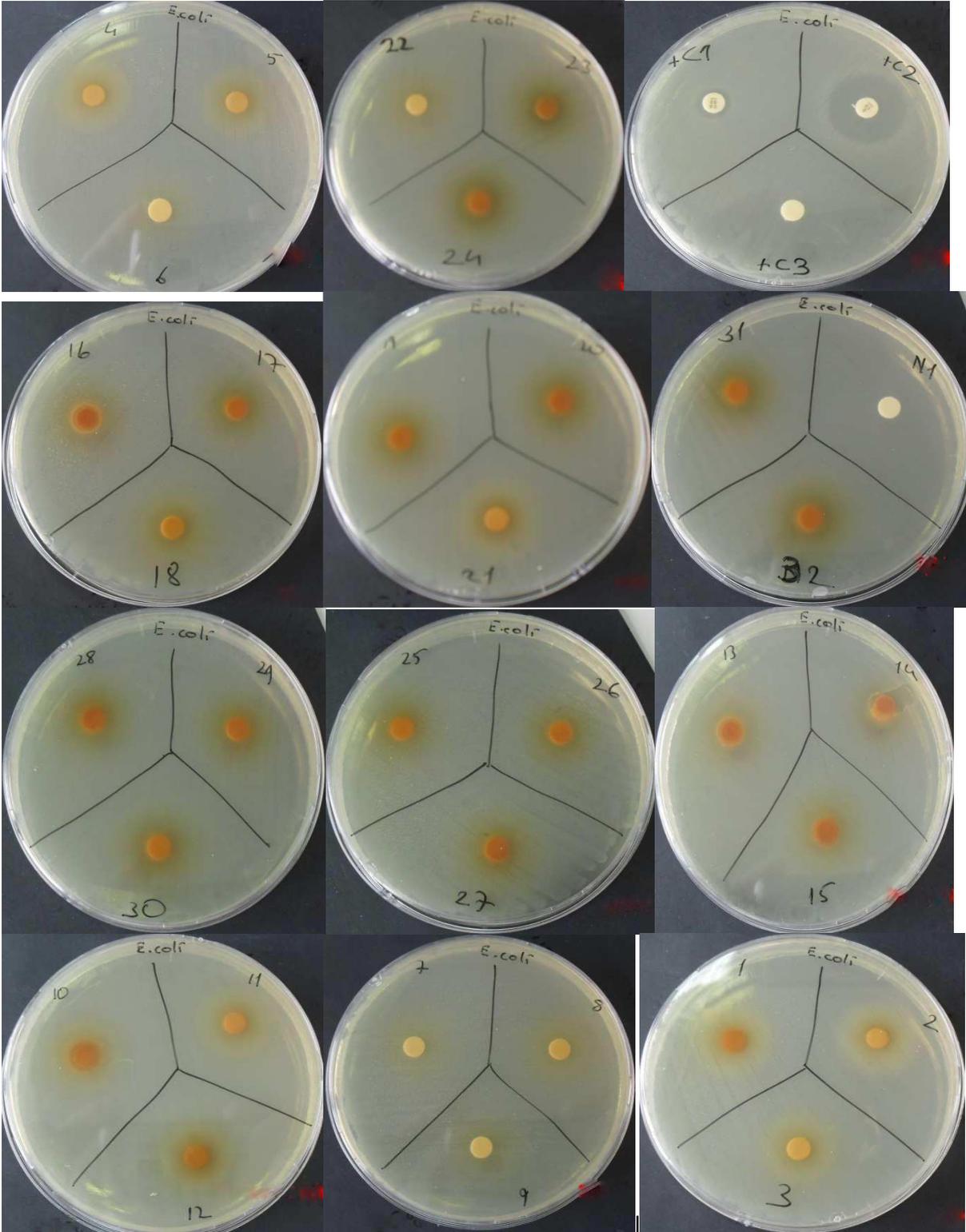
YÜZEY ANALİZ DAĞILIMI TROLOKS						
The analysis was done using uncoded units.						
Estimated Regression Coefficients for trolox eq. İn 1 gr (milimolar)						
Term	Coef	SE Coef	T	P		
Constant	885,780	261,846	3,383	0,010		
temperature	-13,866	10,350	-1,340	0,217		
stirring	3,998	2,116	1,890	0,095		
EtOH	16,729	4,567	3,663	0,006		
Incubation time	-58,573	39,983	-1,465	0,181		
solid liquid ratio	-62,701	27,162	-2,308	0,050		
temperature*temperature	0,156	0,200	0,779	0,458		
stirring*stirring	-0,018	0,007	-2,781	0,024		
EtOH*EtOH	-0,219	0,041	-5,333	0,001		
Incubation time*Incubation time	6,890	2,622	2,627	0,030		
solid liquid ratio*	1,975	0,656	3,013	0,017		
solid liquid ratio						
temperature*stirring	0,023	0,012	1,889	0,096		
temperature*EtOH	0,078	0,030	2,570	0,033		
temperature*Incubation time	-0,107	0,243	-0,439	0,672		
temperature*solid liquid ratio	-0,040	0,121	-0,333	0,747		
stirring*EtOH	0,030	0,006	4,884	0,001		
stirring*Incubation time	-0,075	0,050	-1,508	0,170		
stirring*solid liquid ratio	-0,031	0,025	-1,264	0,242		
EtOH*Incubation time	0,622	0,124	4,998	0,001		
EtOH*solid liquid ratio	-0,063	0,062	-1,021	0,337		
Incubation time*solid liquid ratio	-0,769	0,497	-1,546	0,161		
S = 99,4945 PRESS = 6395012						
R-Sq = 96,91% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 89,20%						
Analysis of Variance for trolox eq. İn 1 gr (milimolar)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	20	2487695	2487695	124385	12,57	0,001
Linear	5	1339559	232814	46563	4,70	0,027
Square	5	488711	488711	97742	9,87	0,003
Interaction	10	659426	659426	65943	6,66	0,006
Residual Error	8	79193	79193	9899		
Lack-of-Fit	5	68205	68205	13641	3,72	0,154
Pure Error	3	10988	10988	3663		
Total	28	2566889				

**EK-4**

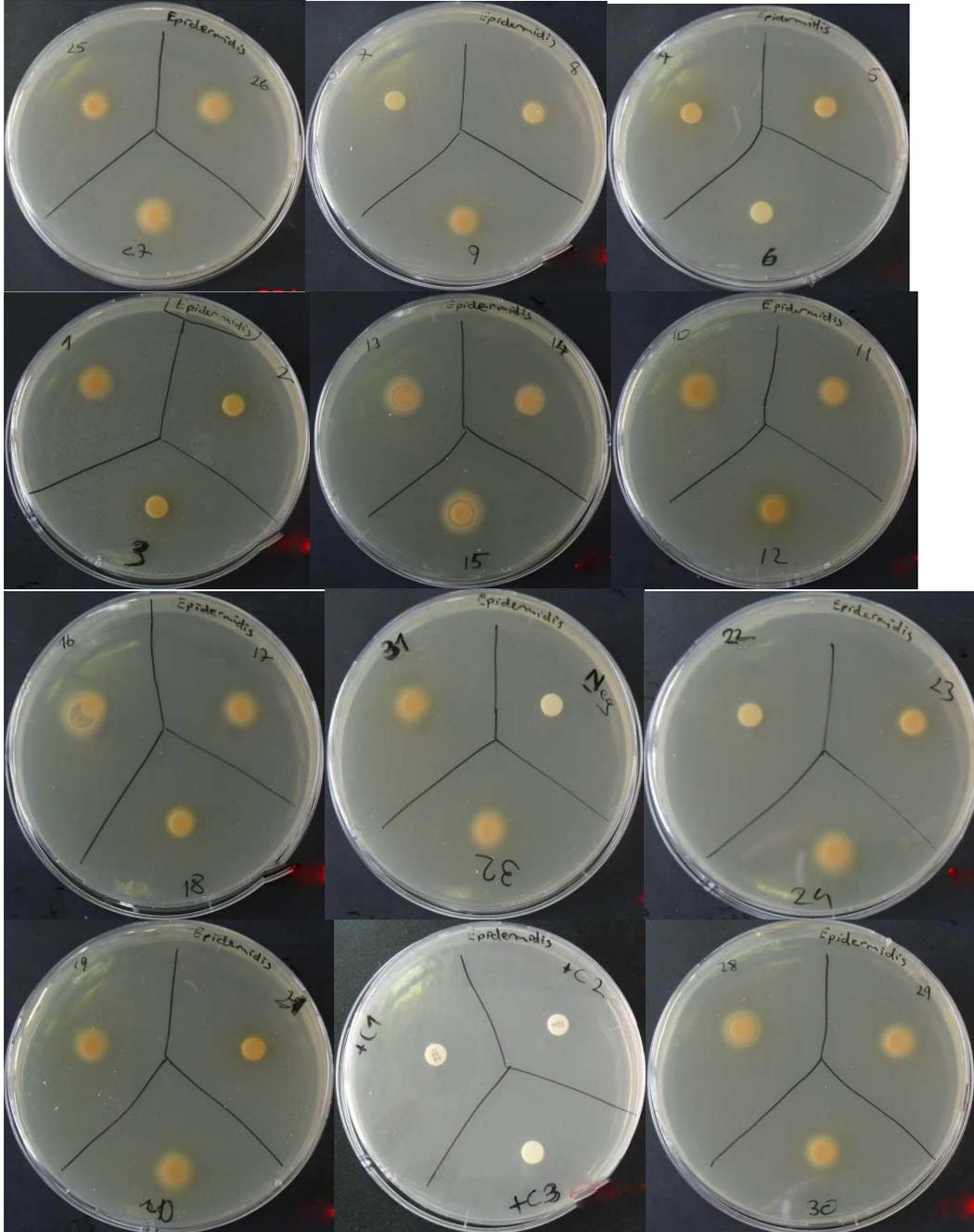
**C. Albicans** disk difüzyon fotoğrafları



E. Coli disk difüzyon fotoğrafları



S. Epidermidis disk difüzyon fotoğrafları



Disk difüzyon sonucu ölçülen alanlar

*C. Albicans*

Örnek	Çap (mm)
Amfoterisin B	20

*S. Epidermidis*

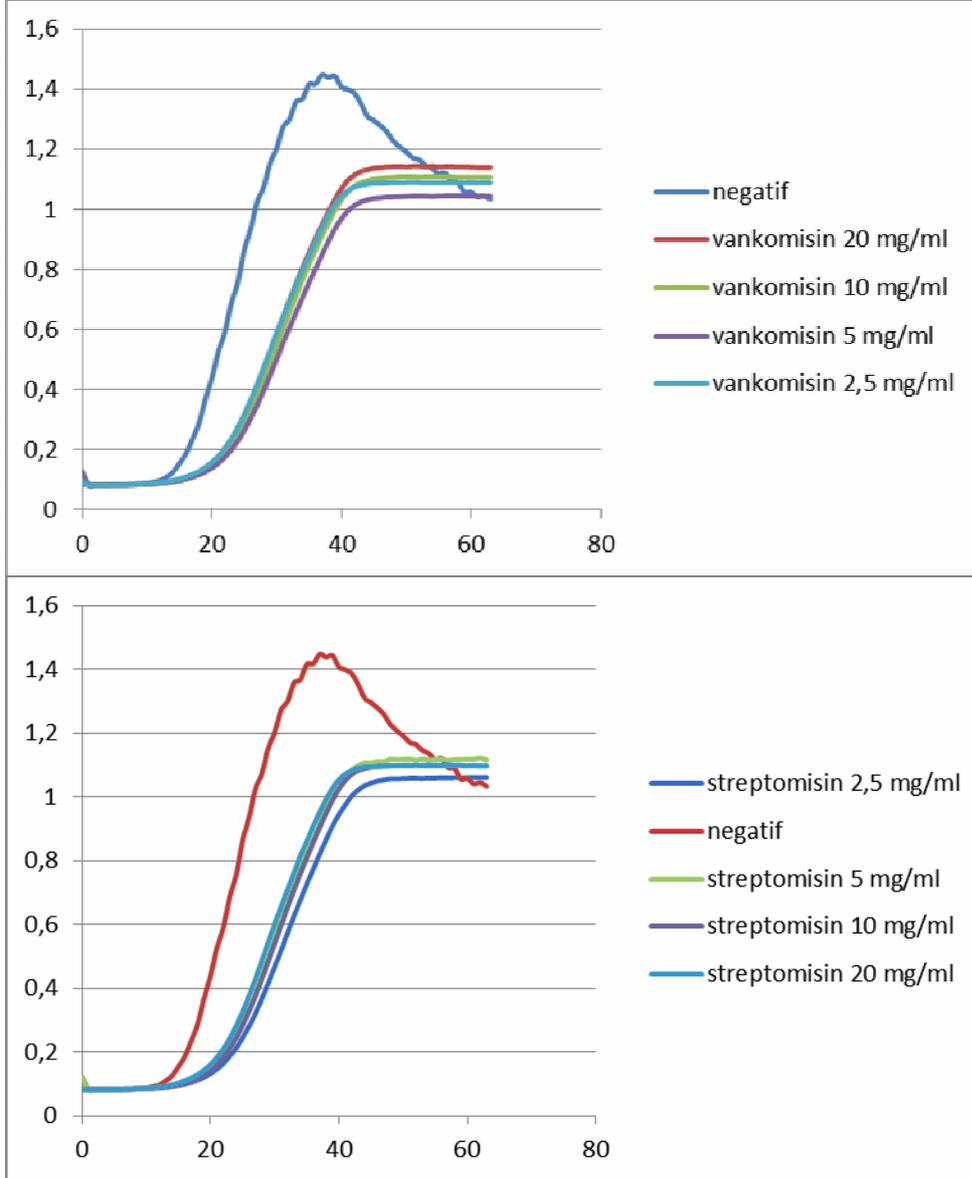
Örnek	Çap (mm)
Vankomisin	24
Streptomisin	18
1	8
6	8
8	15
13	9
14	7
15	8
18	12
24	9
26	9
27	9
30	8
32	8

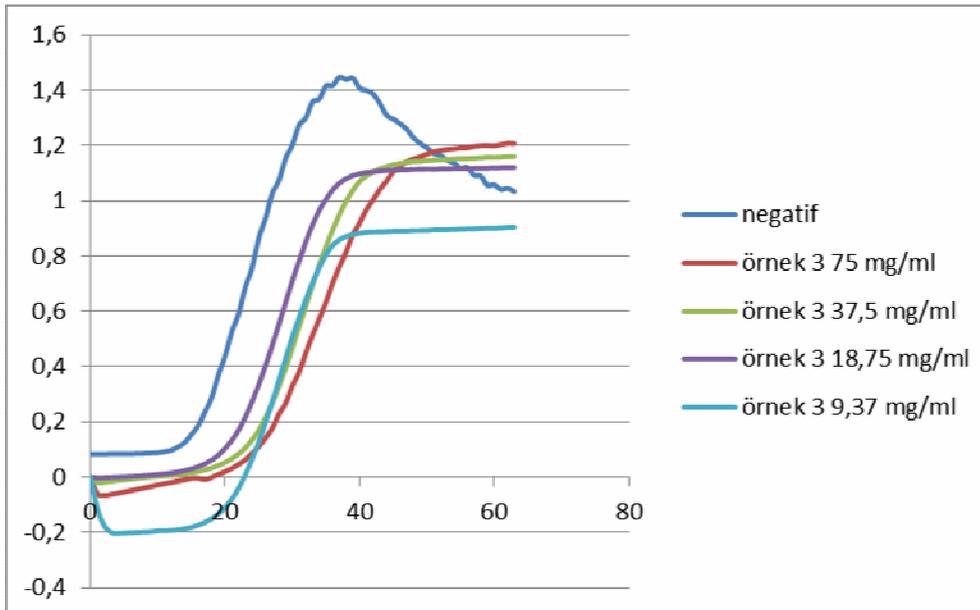
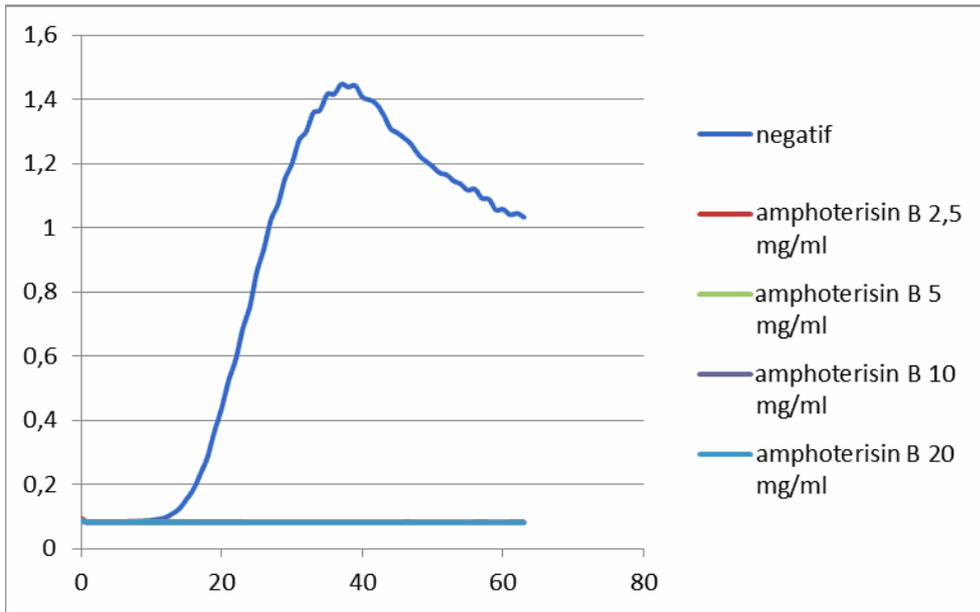
*E. Coli*

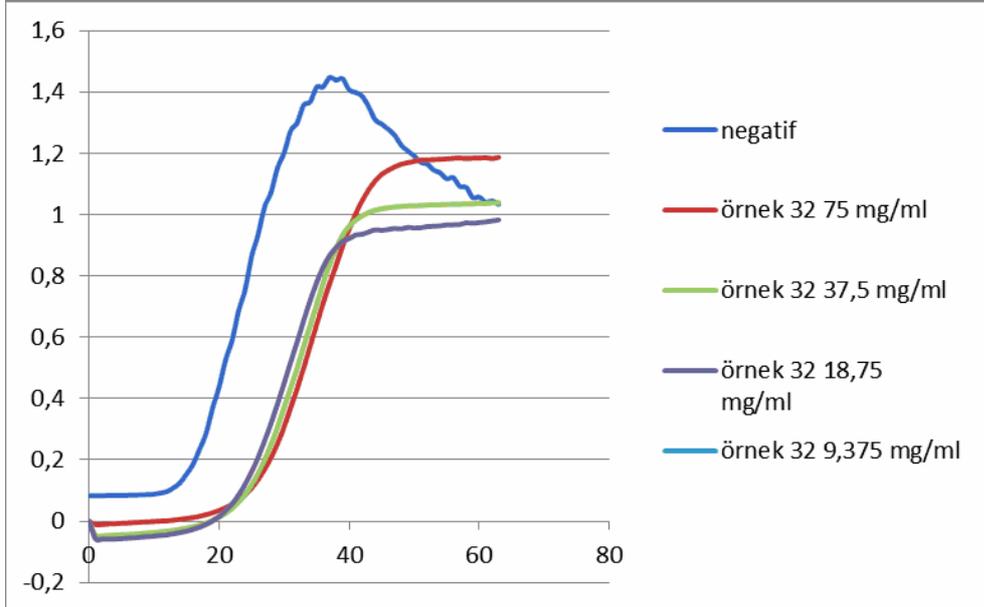
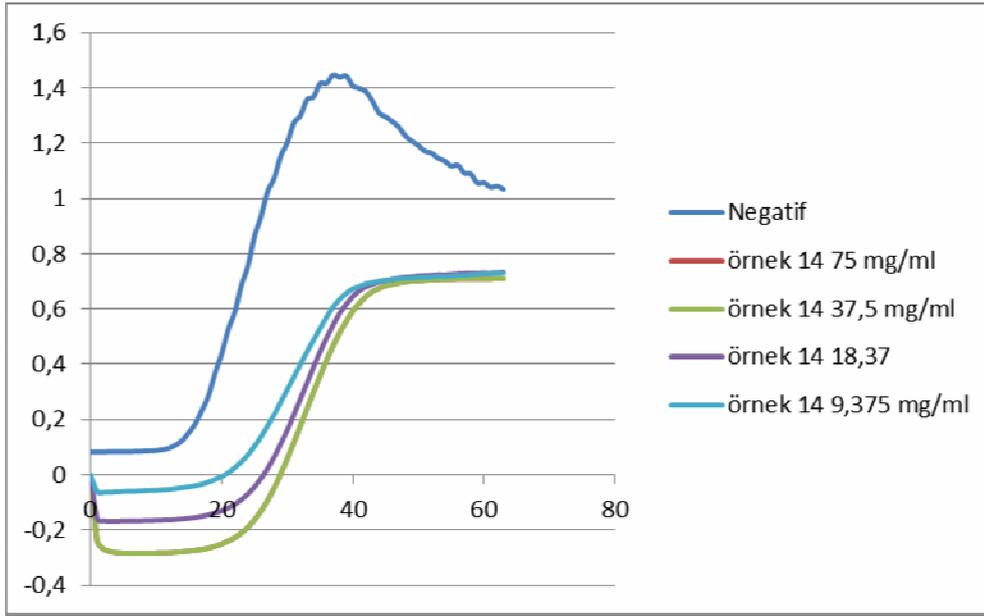
Örnek	Çap (mm)
Streptomisin	21
Vankomisin	9
1	20
2	21
3	18
4	19
5	16
7	08
10	21
11	20
12	18
13	08
14	10
15	17
19	8
20	8
21	19
25	8
30	8
31	8
32	8

## EK-5

*C. Albicans* için 20 saatlik büyüme eğrisi







C. *Albicans* MİK değerleri için kullanılan abzorbans farkları

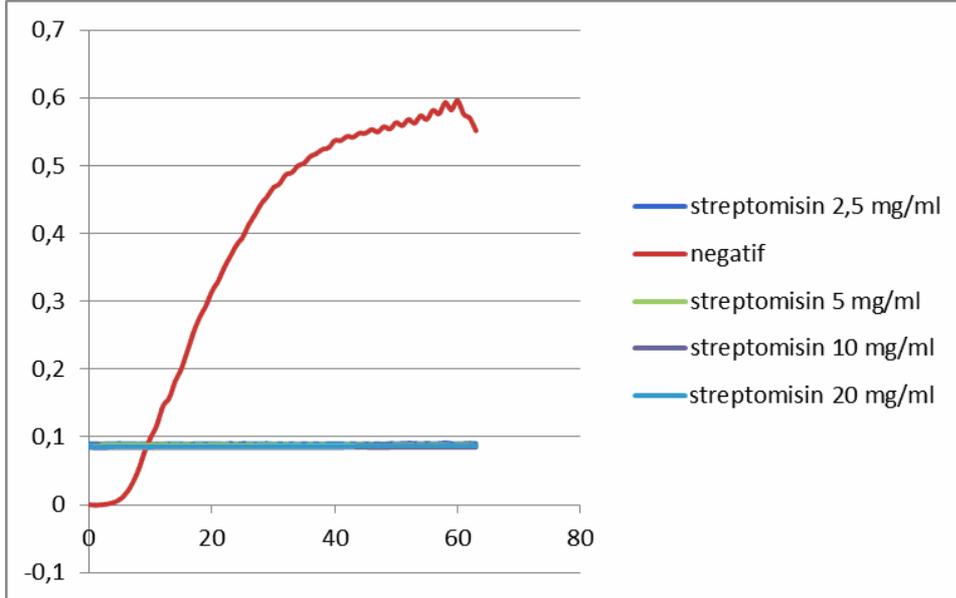
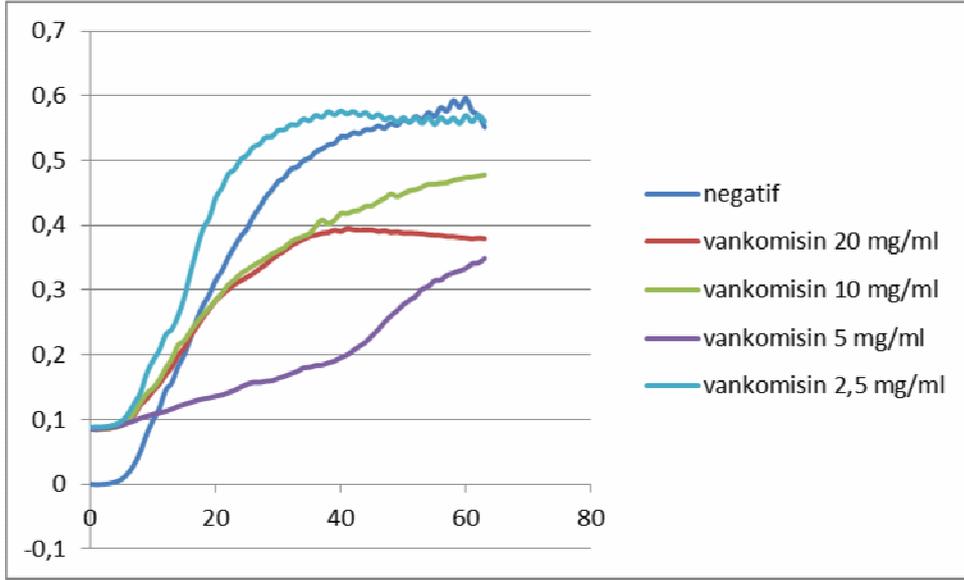
	Konsantrasyon (mg/ml)	Zaman 0	Zaman 20 saat	Fark
Negatif		0,082	1,380	<b>1,298</b>
		0,081	0,935	<b>0,853</b>
		0,084	1,374	<b>1,289</b>
		0,080	1,461	<b>1,381</b>
Vankomisin	20	0,080	1,150	1,070
	10	0,080	1,173	1,093
	5	0,081	0,809	0,728
	2,5	0,081	1,054	0,973
Streptomisin	20	0,080	1,108	1,028
	10	0,080	1,118	1,038
	5	0,080	1,087	1,007
	2,5	0,080	1,191	1,111
Amfoterisin B	20	0,105	0,257	<b>0,152</b>
	10	0,093	0,222	<b>0,129</b>
	5	0,088	0,233	<b>0,145</b>
	2,5	0,083	0,212	<b>0,130</b>
1	75	0,847	1,310	0,462
	37,5	0,330	0,776	0,445
	18,75	0,198	0,589	0,391
	9,375	0,144	0,756	0,612
2	75	1,066	1,855	0,789
	37,5	0,391	1,459	1,068
	18,75	0,203	1,036	0,833
	9,375	0,136	1,055	0,918
3	75	0,601	1,742	1,141
	37,5	0,271	1,417	1,147
	18,75	0,172	1,296	1,124
	9,375	0,122	1,363	1,241
4	75	0,789	1,704	0,915
	37,5	0,254	1,239	0,985
	18,75	0,159	1,112	0,952
	9,375	0,118	1,130	1,012
5	75	0,530	1,579	1,049
	37,5	0,252	1,375	1,123
	18,75	0,160	1,204	1,044
	9,375	0,122	1,196	1,074
6	75	0,240	1,051	0,811
	37,5	0,122	0,747	0,625
	18,75	0,101	0,189	0,088
	9,375	0,092	0,659	0,567

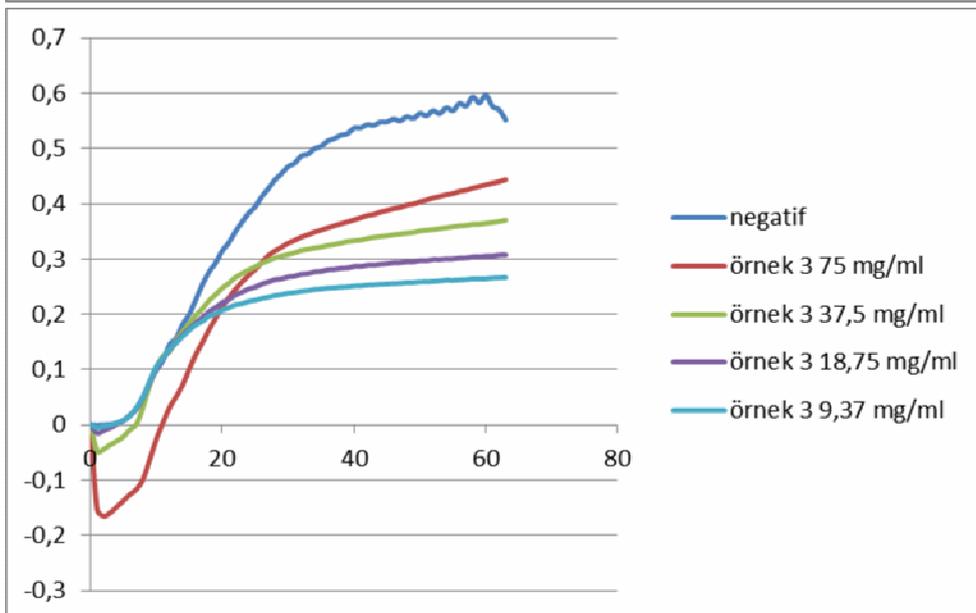
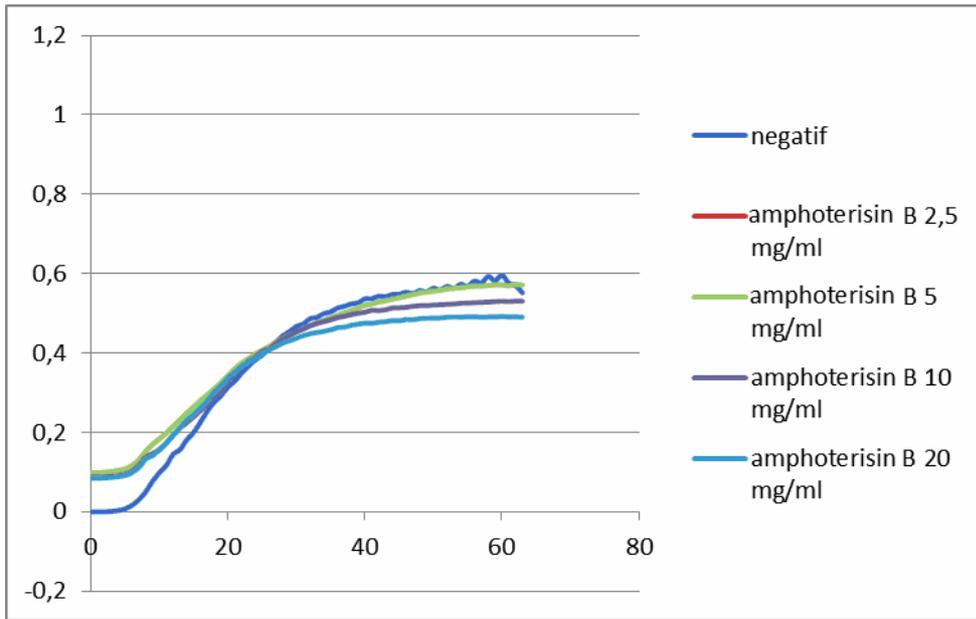
7	75	0,382	0,860	0,478
	37,5	0,131	1,000	0,870
	18,75	0,106	1,149	1,043
	9,375	0,106	1,073	0,966
8	75	0,676	1,612	0,936
	37,5	0,214	1,477	1,263
	18,75	0,133	1,280	1,147
	9,375	0,107	1,199	1,093
9	75	0,657	1,347	0,690
	37,5	0,336	0,879	0,542
	18,75	0,211	0,944	0,733
	9,375	0,147	1,043	0,896
10	75	1,486	1,857	0,370
	37,5	0,418	1,076	0,659
	18,75	0,236	0,911	0,675
	9,375	0,162	0,885	0,723
11	75	0,529	1,417	0,889
	37,5	0,280	1,117	0,837
	18,75	0,180	0,993	0,813
	9,375	0,141	1,113	0,972
12	75	1,705	2,267	0,563
	37,5	0,662	1,607	0,945
	18,75	0,358	1,359	1,001
	9,375	0,203	1,146	0,943
13	75	0,756	1,017	0,261
	37,5	0,426	0,889	0,463
	18,75	0,228	0,681	0,452
	9,375	0,172	0,742	0,569
14	75	0,737	0,989	0,252
	37,5	0,324	0,594	0,270
	18,75	0,197	0,675	0,478
	9,375	0,148	0,570	0,422
15	75	0,747	1,013	0,266
	37,5	0,350	0,703	0,352
	18,75	0,207	0,619	0,412
	9,375	0,163	0,742	0,579
16	75	0,648	0,962	0,313
	37,5	0,502	1,015	0,513
	18,75	0,295	0,802	0,507
	9,375	0,201	0,685	0,484
17	75	0,720	1,564	0,844
	37,5	0,284	0,839	0,555
	18,75	0,183	0,904	0,720
	9,375	0,131	0,860	0,729

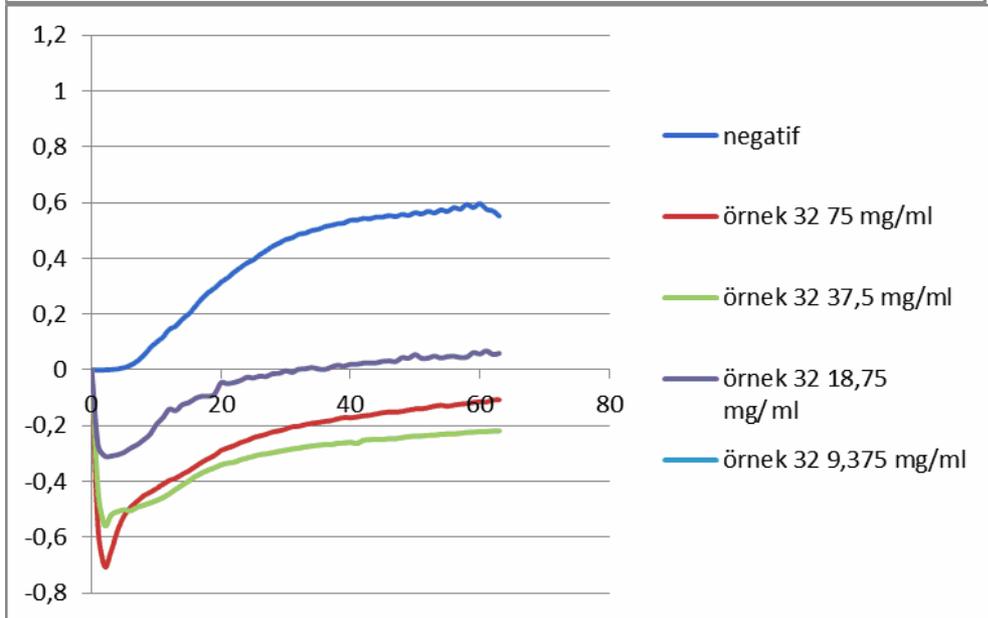
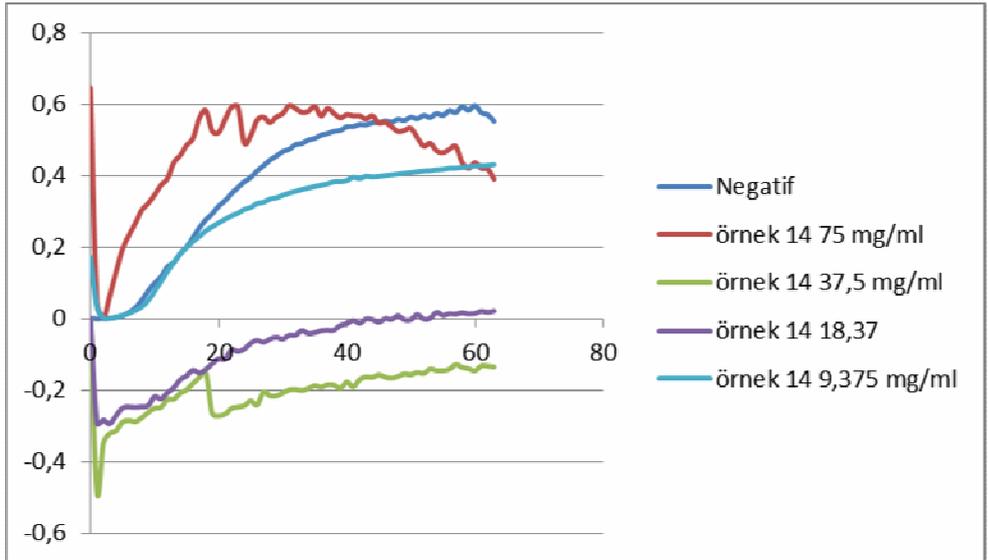
18	75	1,340	2,069	0,729
	75	0,497	1,480	0,983
	37,5	0,268	1,175	0,907
	18,75	0,175	1,103	0,928
19	9,375	1,254	1,753	0,498
	75	0,309	1,051	0,742
	37,5	0,195	0,929	0,734
	18,75	0,137	0,705	0,567
20	9,375	1,458	1,934	0,477
	75	0,390	1,107	0,717
	37,5	0,218	0,913	0,695
	18,75	0,155	0,881	0,727
21	9,375	0,585	1,544	0,960
	75	0,279	1,299	1,020
	37,5	0,178	1,315	1,137
	18,75	0,132	1,084	0,952
22	9,375	0,240	0,711	0,471
	75	0,130	1,351	1,221
	37,5	0,106	1,223	1,117
	18,75	0,095	1,242	1,147
23	9,375	1,351	2,122	0,771
	75	0,488	1,578	1,090
	37,5	0,250	1,381	1,131
	18,75	0,161	1,118	0,957
24	9,375	1,069	1,578	0,509
	75	0,303	1,179	0,875
	37,5	0,191	0,986	0,795
	18,75	0,140	0,840	0,700
25	9,375	0,783	1,715	0,932
	75	0,262	0,923	0,661
	37,5	0,172	0,846	0,674
	18,75	0,139	0,832	0,693
26	9,375	0,835	1,654	0,819
	75	0,317	0,924	0,607
	37,5	0,198	0,883	0,685
	18,75	0,147	0,867	0,720
27	9,375	1,399	1,616	0,217
	75	0,332	0,998	0,665
	37,5	0,193	0,629	0,436
	18,75	0,144	0,524	0,381
28	9,375	1,452	1,779	0,327
	75	0,373	0,786	0,413
	37,5	0,216	0,930	0,714
	18,75	0,150	0,709	0,559

29	9,375	1,244	1,611	0,367
	75	0,308	0,975	0,667
	75	0,185	0,834	0,650
	37,5	0,133	0,482	0,349
30	18,75	0,626	1,314	0,688
	9,375	0,276	0,917	0,641
	75	0,177	0,902	0,726
	37,5	0,132	0,594	0,461
31	18,75	1,359	1,879	0,520
	9,375	0,355	0,801	0,447
	75	0,202	0,878	0,676
	37,5	0,139	0,151	0,012
32	18,75	0,694	1,488	0,795
	9,375	0,339	0,973	0,634
	75	0,198	0,757	0,560
	37,5	0,146	0,600	0,454

*E. Coli* için 20 saatlik büyüme eğrileri







E. Coli MİK değerleri için kullanılan abzorbanans farkları

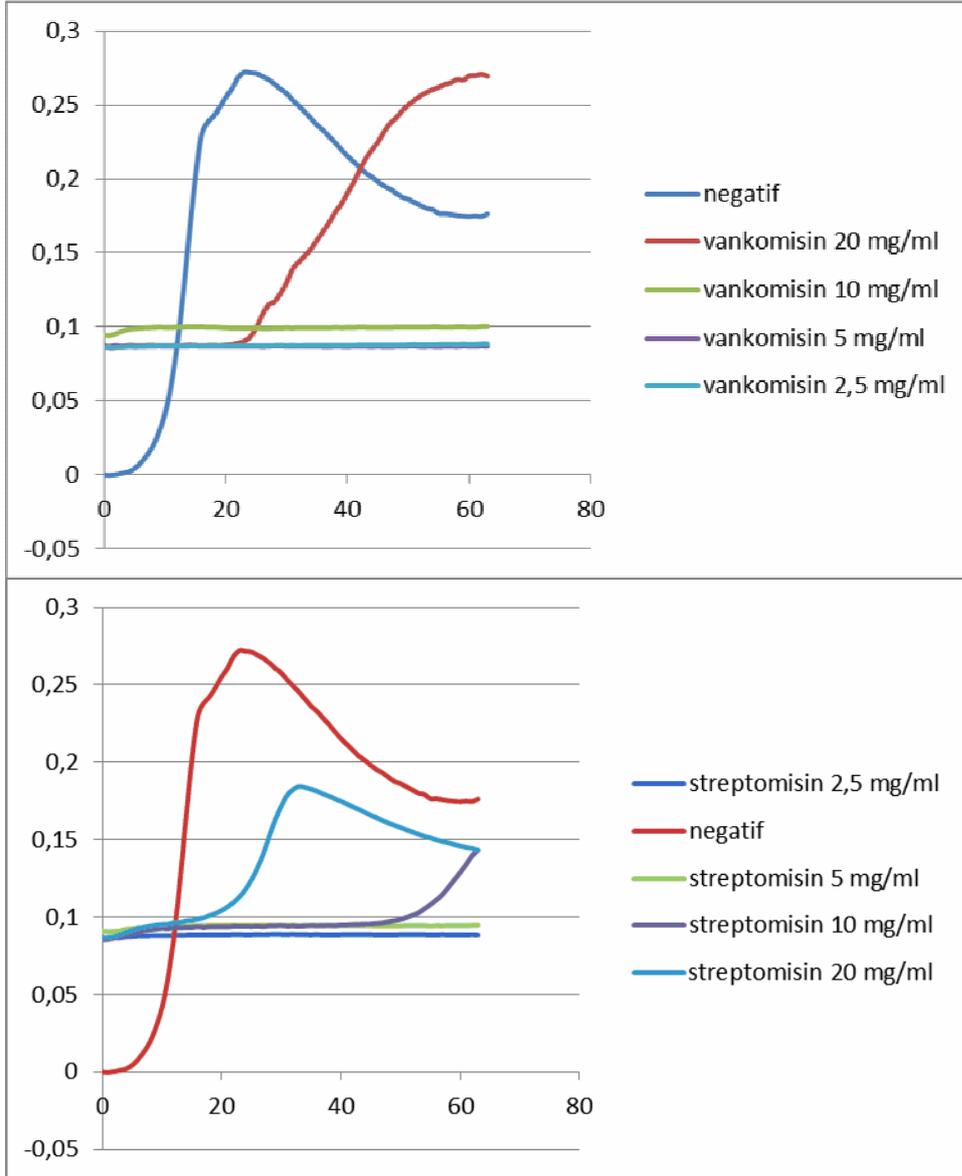
	Konsantrasyon (mg/ml)	Zaman 0	Zaman 20 saat	Fark
Negatif		0,090	0,730	<b>0,640</b>
		0,089	0,686	<b>0,597</b>
		0,089	0,758	<b>0,669</b>
		0,088	0,670	<b>0,582</b>
Vankomisin	20	0,084	0,257	0,173
	10	0,085	0,376	0,292
	5	0,088	0,500	0,412
	2,5	0,084	0,597	0,512
Streptomisin	20	0,084	0,291	0,207
	10	0,085	0,255	0,170
	5	0,085	0,113	0,028
	2,5	0,086	0,227	0,141
Amfoterisin B	20	0,106	0,726	<b>0,620</b>
	10	0,096	0,674	<b>0,578</b>
	5	0,089	0,666	<b>0,577</b>
	2,5	0,087	0,645	<b>0,558</b>
1	75	1,835	2,096	0,261
	37,5	1,168	1,594	0,426
	18,75	0,556	0,866	0,310
	9,375	0,309	1,324	1,015
2	75	1,304	1,532	0,227
	37,5	0,511	1,083	0,573
	18,75	0,268	1,023	0,755
	9,375	0,171	1,027	0,856
3	75	0,660	1,112	0,452
	37,5	0,307	0,827	0,520
	18,75	0,734	0,540	-0,194
	9,375	0,146	0,641	0,495
4	75	0,916	1,257	0,340
	37,5	0,354	0,941	0,586
	18,75	0,213	0,854	0,640
	9,375	0,155	1,020	0,866
5	75	0,821	1,347	0,526
	37,5	0,537	1,140	0,603
	18,75	0,584	0,576	-0,008
	9,375	0,162	0,981	0,820
6	75	0,405	0,921	0,515
	37,5	0,217	0,782	0,565
	18,75	0,224	0,633	0,409
	9,375	0,185	0,635	0,449

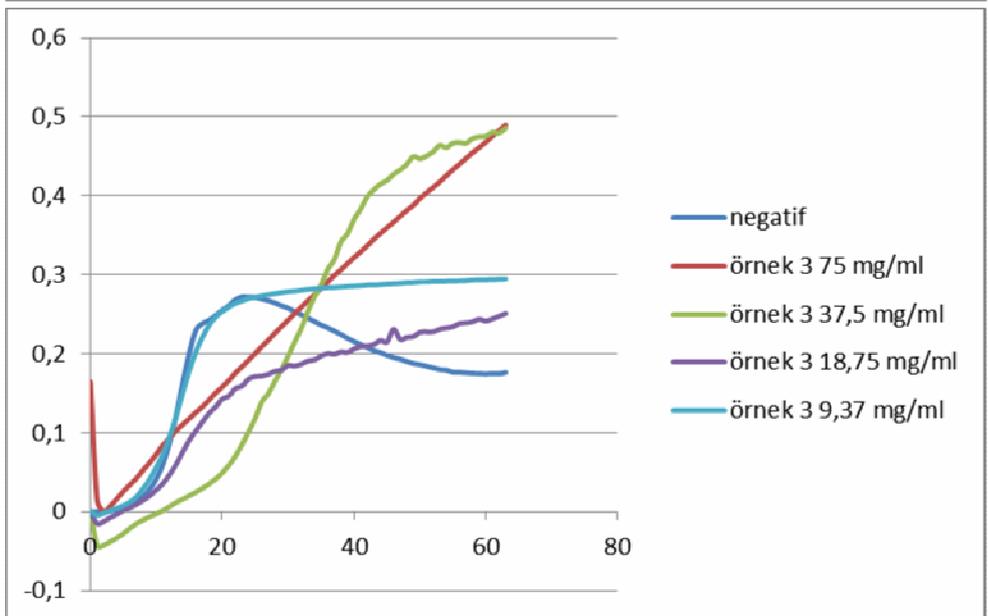
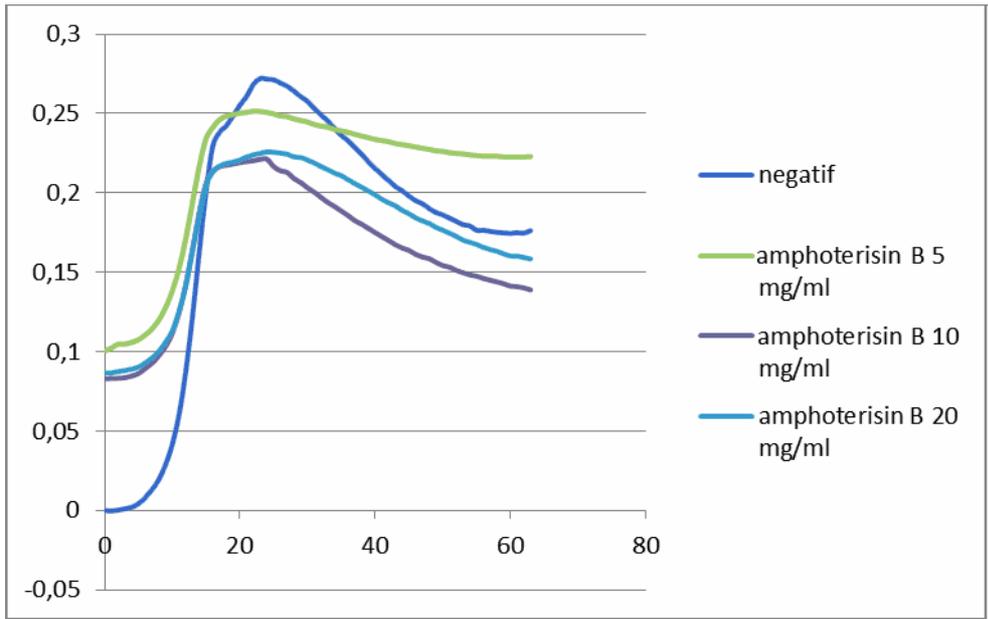
7	75	0,436	1,021	0,585
	37,5	0,208	0,644	0,436
	18,75	0,151	0,538	0,387
	9,375	0,119	0,554	0,436
8	75	1,077	1,516	0,439
	37,5	0,400	0,956	0,555
	18,75	0,218	0,780	0,562
	9,375	0,145	0,651	0,507
9	75	1,927	2,138	0,211
	37,5	0,936	1,487	0,552
	18,75	0,549	1,160	0,611
	9,375	0,294	1,089	0,795
10	75	2,292	2,148	-0,145
	37,5	1,266	1,539	0,273
	18,75	0,787	1,444	0,658
	9,375	0,429	1,349	0,920
11	75	1,221	1,508	0,287
	37,5	0,644	1,011	0,367
	18,75	0,338	0,799	0,461
	9,375	0,225	0,911	0,686
12	75	2,276	2,219	-0,057
	37,5	1,081	1,552	0,471
	18,75	0,595	1,642	1,047
	9,375	0,335	0,927	0,592
13	75	2,537	2,201	-0,336
	37,5	2,053	1,959	-0,094
	18,75	1,198	1,351	0,154
	9,375	0,679	0,853	0,174
14	75	2,363	2,487	0,123
	37,5	1,536	1,749	0,213
	18,75	0,854	1,097	0,243
	9,375	0,523	0,836	0,313
15	75	2,264	2,094	-0,171
	37,5	1,376	1,437	0,061
	18,75	0,818	0,994	0,176
	9,375	0,395	0,680	0,285
16	75	2,475	2,370	-0,105
	37,5	1,746	2,080	0,334
	18,75	1,074	1,358	0,284
	9,375	0,568	1,024	0,455
17	75	2,054	2,160	0,106
	37,5	1,037	1,371	0,334
	18,75	0,619	1,093	0,474
	9,375	0,319	1,319	1,000

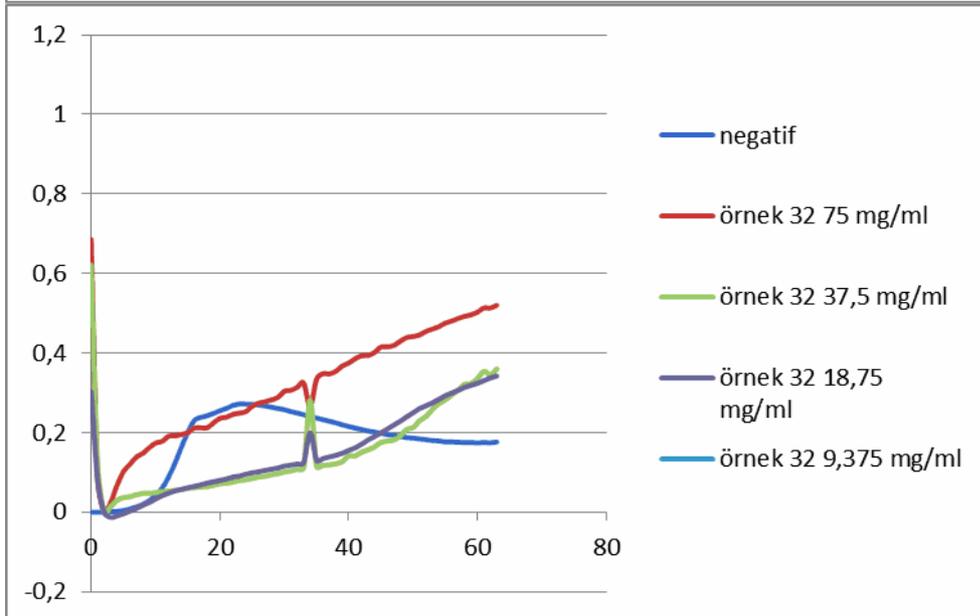
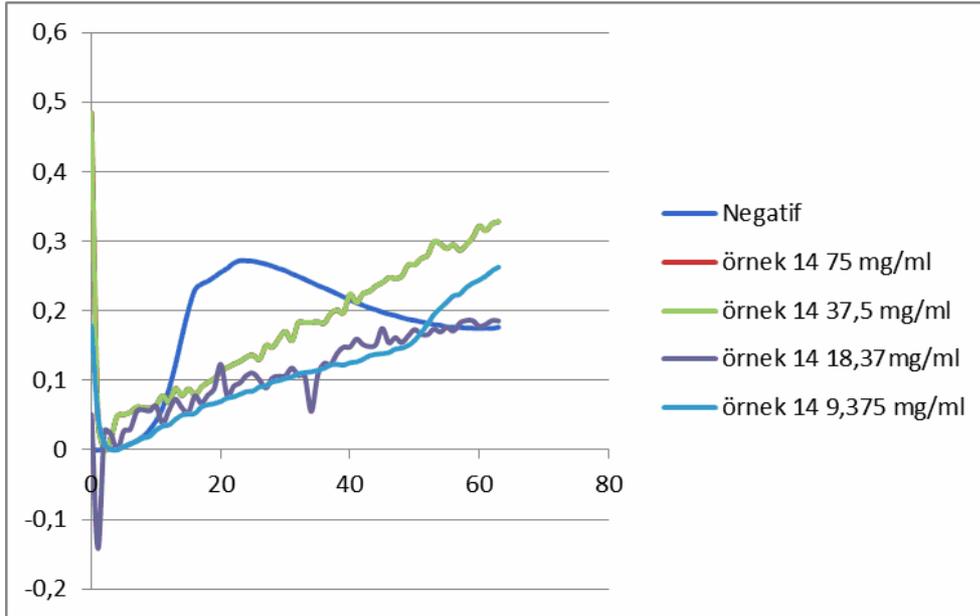
18	75	1,799	2,103	0,304
	37,5	0,776	1,262	0,486
18	18,75	0,425	0,976	0,552
	9,375	0,248	0,796	0,548
19	75	2,178	2,173	-0,005
	37,5	0,956	1,530	0,574
	18,75	0,589	1,175	0,586
	9,375	0,324	1,373	1,049
20	75	2,325	2,306	-0,019
	37,5	1,084	1,667	0,583
	18,75	0,588	1,240	0,652
	9,375	0,344	1,272	0,928
21	75	1,186	1,609	0,423
	37,5	0,577	1,184	0,606
	18,75	0,337	1,201	0,863
	9,375	0,209	1,010	0,801
22	75	0,442	0,816	0,374
	37,5	0,242	0,671	0,429
	18,75	0,156	0,473	0,317
	9,375	0,121	0,425	0,304
23	75	1,726	2,046	0,319
	37,5	0,854	1,271	0,416
	18,75	0,789	0,687	-0,102
	9,375	0,246	0,498	0,252
24	75	2,078	2,106	0,029
	37,5	1,093	1,546	0,453
	18,75	0,668	1,277	0,609
	9,375	0,385	1,276	0,890
25	75	1,626	2,013	0,387
	37,5	0,758	1,606	0,848
	18,75	0,429	1,272	0,842
	9,375	0,249	1,179	0,930
26	75	2,014	1,970	-0,044
	37,5	0,999	1,626	0,626
	18,75	0,598	1,319	0,721
	9,375	0,347	1,413	1,066
27	75	2,217	2,220	0,003
	37,5	0,996	1,662	0,666
	18,75	0,593	1,307	0,714
	9,375	0,289	1,127	0,838
28	75	2,224	2,148	-0,075
	37,5	0,922	1,488	0,566
	18,75	0,507	1,274	0,767
	9,375	0,325	1,424	1,099

29	75	2,109	2,261	0,152
	37,5	0,967	1,595	0,629
	18,75	0,534	1,308	0,774
	9,375	0,271	1,201	0,930
30	75	1,485	1,908	0,423
	37,5	0,783	1,384	0,601
	18,75	0,406	1,127	0,721
	9,375	0,260	1,276	1,016
31	75	2,154	2,204	0,051
	37,5	0,983	1,579	0,597
	18,75	0,505	1,235	0,730
	9,375	0,356	0,931	0,575
32	75	1,983	2,100	0,117
	37,5	1,180	1,796	0,616
	18,75	0,591	1,355	0,764
	9,375	0,406	1,004	0,598

S. Epidermidis için 20 saatlik büyüme eğrileri







S. Epidermidis MİK değerleri için kullanılan abzorbans farkları

	Konsantrasyon (mg/ml)	Zaman 0	Zaman 20 saat	Fark
Negatif		0,096	0,534	<b>0,438</b>
		0,092	0,546	<b>0,454</b>
		0,093	0,633	<b>0,540</b>
		0,088	0,742	<b>0,654</b>
Vancomisin	20	0,084	0,288	0,204
	10	0,095	0,331	0,236
	5	0,089	0,330	0,241
	2,5	0,085	0,624	0,539
Streptomycin	20	0,089	0,274	0,186
	10	0,089	0,270	0,181
	5	0,085	0,218	0,133
	2,5	0,085	0,418	0,333
Amfoterisin B	20	0,101	0,572	0,471
	10	0,097	0,604	0,507
	5	0,096	0,547	0,451
	2,5	0,087	0,600	0,513
1	75	1,463	1,984	0,521
	37,5	0,788	1,168	0,380
	18,75	0,448	0,869	0,421
	9,375	0,283	0,560	0,277
2	75	1,279	1,398	0,120
	37,5	0,540	0,817	0,277
	18,75	0,283	0,806	0,524
	9,375	0,176	0,678	0,502
3	75	0,716	1,263	0,546
	37,5	0,329	1,137	0,808
	18,75	0,210	0,582	0,372
	9,375	0,150	0,577	0,426
4	75	0,949	1,439	0,490
	37,5	0,354	0,893	0,539
	18,75	0,213	0,851	0,638
	9,375	0,154	0,789	0,635
5	75	0,735	1,193	0,457
	37,5	0,362	0,666	0,304
	18,75	0,229	0,571	0,342
	9,375	0,159	0,733	0,574
6	75	0,367	0,642	0,274
	37,5	0,208	0,576	0,369
	18,75	0,144	0,457	0,313
	9,375	0,122	0,594	0,472

7	75	0,519	0,793	0,273
	37,5	0,195	0,763	0,569
	18,75	0,143	0,382	0,239
	9,375	0,117	0,438	0,321
8	75	0,968	1,028	0,059
	37,5	0,394	0,776	0,381
	18,75	0,176	0,531	0,355
	9,375	0,141	0,437	0,296
9	75	1,485	1,881	0,396
	37,5	1,016	1,307	0,291
	18,75	0,434	0,720	0,285
	9,375	0,245	0,494	0,248
10	75	2,229	2,435	0,206
	37,5	1,133	1,767	0,634
	18,75	0,560	0,900	0,340
	9,375	0,379	1,019	0,640
11	75	1,082	1,495	0,413
	37,5	0,540	0,901	0,361
	18,75	0,495	0,626	0,132
	9,375	0,224	0,582	0,358
12	75	2,244	2,275	0,031
	37,5	1,021	1,514	0,493
	18,75	0,525	1,086	0,561
	9,375	0,312	0,750	0,438
13	75	2,328	2,563	0,235
	37,5	1,440	2,050	0,610
	18,75	0,949	1,483	0,534
	9,375	0,513	0,768	0,255
14	75	2,215	2,539	0,324
	37,5	1,299	1,691	0,392
	18,75	0,768	1,055	0,288
	9,375	0,473	0,767	0,294
15	75	2,074	2,357	0,283
	37,5	1,222	1,751	0,529
	18,75	0,760	1,143	0,383
	9,375	0,381	0,679	0,298
16	75	2,199	2,267	0,068
	37,5	1,296	1,833	0,537
	18,75	0,768	0,984	0,216
	9,375	0,452	0,816	0,364
17	75	1,597	1,857	0,260
	37,5	0,771	1,161	0,391
	18,75	0,438	0,865	0,427
	9,375	0,274	0,748	0,475

18	75	1,732	2,085	0,353
	37,5	0,770	1,274	0,504
	18,75	0,414	1,115	0,701
	9,375	0,251	0,710	0,459
19	75	1,906	2,233	0,327
	37,5	0,778	1,131	0,353
	18,75	0,439	0,715	0,276
	9,375	0,258	0,918	0,660
20	75	2,188	2,401	0,213
	37,5	0,921	1,606	0,685
	18,75	0,492	0,916	0,424
	9,375	0,297	0,680	0,383
21	75	1,190	1,380	0,189
	37,5	0,602	1,176	0,574
	18,75	0,305	0,591	0,285
	9,375	0,197	0,374	0,178
22	75	0,714	0,509	-0,205
	37,5	0,700	0,536	-0,164
	18,75	0,421	0,495	0,074
	9,375	0,118	0,328	0,210
23	75	1,698	2,263	0,565
	37,5	0,735	1,436	0,701
	18,75	0,403	0,864	0,461
	9,375	0,233	0,412	0,179
24	75	1,806	2,107	0,302
	37,5	0,831	1,289	0,458
	18,75	0,517	0,990	0,473
	9,375	0,282	0,550	0,268
25	75	1,332	1,589	0,258
	37,5	0,601	1,257	0,656
	18,75	0,366	0,983	0,616
	9,375	0,226	0,650	0,423
26	75	1,649	1,864	0,214
	37,5	1,028	1,401	0,373
	18,75	0,550	0,882	0,331
	9,375	0,302	0,657	0,355
27	75	2,114	2,329	0,214
	37,5	0,946	1,604	0,658
	18,75	0,472	1,046	0,573
	9,375	0,290	0,508	0,218
28	75	2,059	2,228	0,169
	37,5	0,847	1,136	0,289
	18,75	0,474	0,890	0,415
	9,375	0,303	0,591	0,289

29	75	1,936	2,134	0,198
	37,5	0,735	1,245	0,509
	18,75	0,425	0,917	0,492
	9,375	0,195	0,499	0,303
30	75	1,215	1,450	0,235
	37,5	0,751	1,029	0,279
	18,75	0,403	0,847	0,444
	9,375	0,265	0,741	0,477
31	75 mg/ml	2,062	2,311	0,248
	37,5 mg/ml	0,881	1,563	0,682
	18,75 mg/ml	0,500	1,250	0,750
	9,375 mg/ml	0,322	0,734	0,412
32	75 mg/ml	1,590	2,219	0,629
	37,5 mg/ml	0,932	1,642	0,710
	18,75 mg/ml	0,508	1,163	0,654
	9,375 mg/ml	0,365	0,696	0,331

**EK-6**

Özütlerin sahip olduğu sitotoksik aktivite değerlerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak canlılık yüzdesi üzerinden gösterimi

Sitotoksik aktivite değerleri. Özüt eklenmemiş hücrelerden oluşan negatif kontrol grubu %100 canlı kabul edilerek oranlamalar yapılmıştır.

Özüt kodu	Canlılık %si								
	250 µg/ml			500 µg/ml			750 µg/ml		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
1	130,50	82,48	104,44	117,90	85,27	77,95	74,14	69,26	63,38
2	143,76	94,03	111,47	142,65	104,57	104,11	123,65	104,71	99,26
3	112,04	79,39	96,86	152,04	86,29	98,75	148,18	79,00	90,06
4	112,93	82,62	109,94	119,23	86,49	102,03	137,57	87,27	96,95
5	128,84	78,17	107,72	119,34	80,67	99,68	112,93	83,55	92,97
6	119,45	105,97	110,17	117,24	93,25	114,98	135,80	93,69	113,92
7	126,19	95,30	108,37	121,55	89,97	105,46	128,73	92,51	105,41
8	109,39	97,06	104,81	126,63	101,13	109,94	140,66	99,17	100,46
9	153,15	94,62	116,37	132,38	82,53	81,88	126,63	79,39	71,98
10	116,13	75,58	70,83	83,65	67,21	60,38	71,82	44,74	39,39
11	140,44	91,63	93,34	155,36	108,27	88,72	122,10	80,42	82,76
12	121,22	65,79	97,50	125,52	68,58	77,35	120,66	70,34	58,76
13	41,55	35,24	53,81	18,90	12,09	8,97	23,54	7,44	2,73
14	19,78	10,08	12,07	41,99	6,56	-1,90	23,54	9,06	-2,27
15	78,90	68,62	71,15	34,36	23,69	28,99	31,71	12,48	7,67
16	25,19	18,75	21,59	18,12	12,68	1,99	18,45	6,46	1,94
17	115,69	83,55	99,31	62,43	61,58	66,57	52,15	27,36	38,28
18	124,42	90,99	90,57	137,13	91,34	77,30	130,17	78,46	60,93
19	135,91	101,47	83,31	83,43	61,04	57,79	44,42	29,56	42,63
20	145,86	99,76	91,54	73,81	55,36	53,40	42,98	21,78	22,19
21	134,59	88,25	78,09	125,52	91,04	61,72	136,35	96,52	62,55
22	154,81	115,03	111,93	132,82	104,85	105,78	119,56	93,15	96,95
23	111,93	97,90	95,05	120,66	89,43	77,99	127,18	70,29	70,37
24	118,34	87,08	93,80	116,13	66,81	53,54	143,43	30,54	28,76
25	130,83	91,48	93,67	61,22	74,30	64,59	44,86	67,74	48,45
26	112,27	91,83	77,85	108,07	67,55	53,35	57,13	30,25	24,87
27	110,06	81,01	78,13	61,99	59,03	44,34	57,79	22,61	18,45
28	85,64	85,51	83,17	60,44	72,93	52,33	55,69	32,21	28,66
29	126,63	88,15	85,67	64,64	59,47	46,46	44,20	25,35	17,85
30	120,33	98,43	89,18	164,31	83,90	63,80	98,90	64,71	44,38
31	165,30	94,32	88,67	98,23	76,06	52,43	53,70	30,79	20,62
32	154,70	94,62	69,67	74,81	57,66	35,78	47,85	31,28	14,93

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. OĞUZ BAYRAKTAR
Proje No:	111M408
Proje Başlığı:	Yara Örtüsü Uygulamaları İçin Equisetum Arvense Özütü Yüklü Biyomalzemelerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2011 - 01/08/2012
Onaylanan Bütçe:	25000.0
Harcanan Bütçe:	25000.0
Öz:	Equisetum arvense bitkisi içeriğindeki fenolik bileşikler ve antioksidan etkileri sayesinde yara iyileştirme ve kanama durdurma konularında potansiyel bir terapötik ajandır. Bitkinin aktif maddelerinin etkin şekilde elde edilmesi için özütleme işleminin karakterizasyonu ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda elde edilen özüt aktif maddelerinin stabilizasyonu ve kullanım alanına kontrollü salımı için bir biyomalzeme içine enkapsüle edilmelidir. En etkili malzeme türü köpük malzemedir. İpek fibroin ve hyaluronik asit yardımıyla köpük malzeme oluşturulması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
Anahtar Kelimeler:	ipek fibroin, hiyaluronik asit, Equisetum arvense, antioksidan, antimikrobiyal, yara örtüsü
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır