



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENEL AMAÇLI DOKU YAPIŞTIRICISI HAZIRLANMASI VE
UYGULANMASI**

CANAN ÇAKIR ÇOBAN
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KIRIKKALE-2023



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENEL AMAÇLI DOKU YAPIŞTIRICISI HAZIRLANMASI VE
UYGULANMASI**

CANAN ÇAKIR ÇOBAN
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KIRIKKALE-2023

KABUL VE ONAY

Canan ÇAKIR ÇOBAN tarafından hazırlanan “GENEL AMAÇLI DOKU YAPIŞTIRICISI HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kırıkkale Üniversitesi Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi İmza.....
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi İmza.....
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Prof. Dr. Siyami KARAHAN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi İmza.....
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Doç. Dr. Uğur TİFTİKÇİ
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmza.....
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Doç. Dr. Veyis KARAKOÇ Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO,
Çankırı Karatekin Üniversitesi İmza.....
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 22/02/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....Unvanı Adı SOYADI
..... Enstitüsü Müdürü



Derin & Doruk' a...

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Canan ÇAKIR ÇOBAN

22/02/2023

ÖZET

GENEL AMAÇLI DOKU YAPIŞTIRICININ HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

ÇAKIR ÇOBAN, Canan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Şubat 2023, 104 sayfa

Günümüzde, sentetik ve biyolojik yollarla hazırlanan doku yapıştırıcıları iyileşmeyi hızlandırmak, sızıntıları önlemek, kanamayı durdurmak ve yaraları kapatmak için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yara kapatma, cerrahi operasyonun son adımudur ve cerrahlar, doku yapıştırıcılarının hızlı uygulanması, kolay şekil alması, daha az ağrı, daha az travmatik kapatma ve kozmetik sonuç vermesi nedeniyle tercih ederler.

Bu doktora tezinin amacı; cerrahide oldukça yaygın kullanılan kimyasal temelli doku yapıştırıcı sistemlerine yeni bir alternatif oluşturmak olup, polietilen glikol, polivinilalkol ve biyoyumlu çapraz bağlayıcılar ile oluşturulan doku yapıştırıcısının biyoyumluluğunu araştırmaktır. Tez çalışması kapsamında ilk olarak, hazırlanan doku yapıştırıcısı yapısal olarak FT-IR tekniği kullanılarak tanımlanmıştır. İkinci olarak çalışmada doku yapıştırıcısı kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* biyoyumluluk testleri yapılmış ve detaylı olarak incelenmiştir. *In vitro* biyoyumluluk testlerinden MTT sitotoksosite testi ile doku yapıştırıcısının L929 fibroblast hücreleri üzerine direkt etkisi incelenmiştir, hücre canlılığının in-direkt yöntemlede belirlenmesi için agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi xcelligence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı kullanılarak L929 fibroblast hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Hücre ölüm yolları, apoptoz nekroz ikili boyama yöntemi kullanılarak nitel yolla belirlenmiştir. Gen düzeyinde toksisite çalışmaları, genotoksosite mikronükleus testi ile gerçekleştirilmiştir. Doku yapıştırıcısının hemolitik özelliği hemoliz testi yapılarak değerlendirilmiştir. İn vitro yara iyileşmesi hücre göçü açısından 24., 48., 72. saatlerde yine L929 fibroblast hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Doku yapıştırıcısının antimikrobiyal etkinliği *E. coli* ve *S. aureus* suşları üzerinde araştırılmıştır. Tez çalışmasında üçüncü ve son olarak *in vivo* biyoyumluluk testlerinden, sensitizasyon testi, dermal irritasyon testi, subkronik sistemik toksisite çalışmaları yapılmıştır. Sensitizasyon testi için sağlıklı kobaylar (Guinea pig), deri irritasyonu için sağlıklı albino tavşanlar (New Zealand), subkronik

sistemik toksisite testi için Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Ayrıca, sistemik toksisite testi sonrası sıçanlardan doku örnekleri alınarak histolojik değerlendirmeler yapılmış, kan örneklerinden hematoloji ölçümlerine dayalı değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. İn vivo testlerden son olarak etkinlik testi gerçekleştirilmiştir. Bu test ile Sprague-Dawley cinsi sıçanlara adezyon ve iyileşme testleri uygulanmıştır ve test sonunda yara bölgelerinden alınan dokular histopatolojik olarak ve çekme-kopma mukavemet testi yapılarak değerlendirilmiştir.

İn vitro deneyler sonucunda doku yapıştırıcısının jel özelliğine bağlı olarak in-direkt uygulandığında sitotoksik etki göstermediği, CHO hücreleri üzerinde mikronükleus oluşumunu indüklemediği, hemolitik etki göstermediği *in vitro* yara iyileşmesinde hücre proliferasyonunu olumlu etkilediği değerlendirilmiştir. *In vivo* deneylerde sensitizan ve iritan özellik göstermediği, sistemik toksisite testinde kontrol grubuna kıyasla olumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Etkinlik testinde yara iyileşmesi ve iyileşme sonrası deri mukavemet testinde kontrol grubuna ve ticari ürüne kıyasla etkili sonuçlar verdiği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polivinilalkol, doku yapıştırıcı, tannik asit, biyouyumluluk.

ABSTRACT

PREPARATION AND APPLICATION OF GENERAL PURPOSE TEXTURE ADHESIVE

ÇAKIR ÇOBAN, Canan

KırıkkaleUniversity

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, PhD Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

February 2023, 104 pages

Today, tissue adhesives prepared by synthetic and biological means are widely used to accelerate healing, prevent leaks, stop bleeding and close wounds. Wound closure is the last step of the surgical operation and surgeons prefer it because of the rapid application of tissue adhesives, easy shaping, less pain, less traumatic closure and cosmetic results.

The aim of this doctoral thesis; To create a new alternative to chemical-based tissue adhesive systems, which are widely used in surgery, and to investigate the biocompatibility of tissue adhesive formed with polyethylene glycol, polyvinylalcohol and biocompatible crosslinkers. Within the scope of the thesis, first, the prepared tissue adhesive was structurally defined using the FT-IR technique. Secondly, *in vitro* and *in vivo* biocompatibility tests were carried out using tissue adhesive and examined in detail. The direct effect of tissue adhesive on L929 fibroblast cells was investigated by the MTT cytotoxicity test, one of the *in vitro* biocompatibility tests, and the agar diffusion method was used to determine the cell viability by the indirect method. The effect on cell proliferation was determined using the xcelligence real-time cell analyzer using L929 fibroblast cells. Cell death pathways were determined qualitatively using the apoptosis necrosis dual staining method. Gene-level toxicity studies were performed with the genotoxicity micronucleus test. The hemolytic property of the tissue adhesive was evaluated by performing the hemolysis test. *In vitro* wound healing was evaluated in terms of cell migration at 24, 48, and 72 hours, again using L929 fibroblast cells. The antimicrobial activity of tissue adhesive was investigated on *E. coli* and *S. aureus* strains. In the thesis study, the third and last *in vivo* biocompatibility tests, sensitization test, dermal irritation test, subchronic systemic toxicity studies were performed. Healthy guinea pigs (Guinea pigs) were used for the sensitization test, healthy albino rabbits (New Zealand) were used for skin irritation, and Sprague-Dawley rats were used for the subchronic systemic toxicity test. In addition, after the systemic toxicity test, tissue samples were taken from rats and histological evaluations were made, and evaluations based on hematology measurements were made from blood samples. The efficacy test was carried out as the last of the *in vivo* tests. With

this test, adhesion and healing tests were applied to Sprague-Dawley rats and at the end of the test, the tissues taken from the wound areas were evaluated histopathologically and by tensile-rupture strength test.

As a result of *in vitro* experiments, it was evaluated that due to the gel property of the tissue adhesive, when applied in-directly, it did not show cytotoxic effects, did not induce micronucleus formation on CHO cells, did not show hemolytic effects, and positively affected cell proliferation in *in vitro* wound healing. It was observed that it did not show sensitizing and irritant properties in *in vivo* experiments, and gave positive results in the systemic toxicity test compared to the control group. In the efficacy test, it was evaluated that it gave effective results in wound healing and post-healing skin strength test compared to the control group and the commercial product.

KeyWords: Polyvinylalcohol, tissue adhesive, tannic acid, biocompatibility.



TEŞEKKÜR

Doktoraya başladığım ilk günden itibaren bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, yol gösteren ve çözüm önerileri sunan, akademik bakış açısını örnek aldığım, hiçbir zaman merhametini ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimlerinden yararlandığım tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. İlhami TÜZÜN ve Doç. Dr. Uğur TİFTİKÇİ'ye; teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilimsel araştırmalarımız için huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan başta KÜBTUAM müdürü Prof. Dr. Siyami KARAHAN olmak üzere değerli KÜBTUAM ekibine teşekkür ederim.

Histopatolojik çalışmalarımın bir kısmının gerçekleştirilmesinde tüm laboratuvar imkanlarıyla destek olan başta Kobay DHL A.Ş. Genel Müdürü Sayın A. Begüm BUĞDAYCI 'ya ve in vivo deneylerimde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Kobay DHL A.Ş.'de çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Kobay DHL A.Ş. ailemden kıymetlim Veteriner Hekim Neşe AYDEMİR'e ayrıca çok teşekkür ederim.

Bu uzun akademik serüvene beraber başladığım, her türlü zorluğu birbirimize olan desteğimizle göğüslediğimiz, varlığı sebebiyle her zaman kendimi şanslı hissettiğim yol arkadaşım canım Öğr. Gör. Dr. Büşra MORAN BOZER'e teşekkürü borç bilirim.

Bugünlere ulaşabilmemin en büyük mimarları olan, beni sonsuz sevgileriyle büyüten, hayata hazırlayan ve evlatları olmaktan her zaman gurur duyduğum canım ÇAKIR aileme, çok teşekkür ederim.

Akademik hayatımın zorlu sürecinde yoluma katılarak bu yolu güzelleştiren, başarmaya çalıştıklarımı, sabrımı, mücadelemi görerek beraber büyüdüğüm canım kızım Derin ve canım oğlum Doruk Kemal, sizlere anlayışınız için sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 2020-010 numaralı projeye destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | vi |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Yara | 4 |
| 2.1.1. Yara İyileşmesi | 4 |
| 2.1.1.1. Hemostaz/İnflamasyon Faz | 4 |
| 2.1.1.2. Proliferasyon/ Granülasyon Faz | 5 |
| 2.1.1.3. Yeniden Şekillenme Fazı | 5 |
| 2.1.2. Yara Çeşitleri | 6 |
| 2.1.2.1. Akut Yara | 6 |
| 2.1.2.2. Kronik Yara..... | 6 |
| 2.2. Doku Yapıştırıcısı..... | 7 |
| 2.2.1. Doku Yapıştırıcısı Yapışma Mekanizmaları | 8 |
| 2.2.2. Doku Yapıştırıcı Çeşitleri | 8 |
| 2.2.2.1. Doğal veya Biyolojik Yapıştırıcılar | 8 |
| 2.2.2.2. Biyomimetik Doku Yapıştırıcıları..... | 10 |
| 2.2.2.3. Sentetik ve Yarı-sentetik Doku Yapıştırıcıları..... | 11 |
| 2.3. Polivinil Alkol | 14 |
| 2.4. Tannik Asit | 15 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 17 |
| 3.1. Materyal..... | 17 |
| 3.1.1. Kullanılan cihazlar | 17 |
| 3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarflar | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3. Kullanılan hücre hatları | 18 |
| 3.1.4. Besiyeri ve çözeltiler | 18 |
| 3.1.4.1. Besiyerleri | 18 |
| 3.1.4.2. Çözeltiler | 19 |
| 3.1.5. Deney Hayvanları | 19 |
| 3.2. Deneysel Yöntemler | 19 |
| 3.2.1. Doku Yapıştırıcısının Hazırlanması | 19 |
| 3.2.1.1. PEG Zincirlerinin Uç Gruplarının Karboksilik Asite Dönüştürülmesi..... | 20 |
| 3.2.1.2. TA-PEG/PVA Bazlı Doku Yapıştırıcısının Hazırlanması | 20 |
| 3.2.2. Doku Yapıştırıcısının Yapısal Özelliklerinin Karakterizasyonu | 21 |
| 3.2.3. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Sisteminde Doku Yapıştırıcısının Biyoyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi Testleri..... | 21 |
| 3.2.3.1. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Testi (MTT) | 21 |
| 3.2.3.2. Agar Difüzyon Testi..... | 23 |
| 3.2.3.3. Apoptoz-Nekroz Testi..... | 24 |
| 3.2.3.4. <i>In vitro</i> Genotoksosite Testi (Mikronükleus Testi)..... | 25 |
| 3.2.3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi | 26 |
| 3.2.3.6. <i>In vitro</i> Yara İyileşmesi..... | 26 |
| 3.2.3.7. Hemolitik Etki Testi..... | 27 |
| 3.2.4. Antimikrobiyel Etkinlik Testi..... | 28 |
| 3.2.5. <i>In Vivo</i> Hayvan Deneplerinde Biyoyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi Testleri..... | 28 |
| 3.2.5.1. Deri Sensitizasyon testi (TS 10993-10) | 28 |
| 3.2.5.2. Dermal İritasyon testi (TS 10993-23)..... | 31 |
| 3.2.5.3. Subkronik Sistemik Toksikite Testi (TS EN ISO 10993-11)..... | 34 |
| 3.2.5.4. Etkinlik Testi..... | 36 |
| 4. BULGULAR | 39 |
| 4.1. Doku yapıştırıcısı hazırlanması ve karakterizasyonu | 39 |
| 4.1.1. FT-IR karakterizasyonu | 39 |
| 4.1.1.1. PEG-COOH FT-IR Sonuçları | 39 |
| 4.1.1.2. TA-EDC/NHS FT-IR Sonuçları..... | 40 |
| 4.2. Doku Yapıştırıcısının <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Sisteminde Biyoyumluluk Özellikleri Sonuçlar..... | 41 |
| 4.2.1. L929 Fibroblast Hücrelerinde MTT Testi | 41 |
| 4.2.2. L929 Fibroblast Hücrelerinde Agar Difüzyon Testi..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.3. Apoptoz Nekroz Testi Sonuçları..... | 43 |
| 4.2.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemine Ait Proliferasyon Sonuçları | 45 |
| 4.2.5. Genotoksisite Mikronükleus Testi Sonuçları..... | 46 |
| 4.2.6. <i>In Vitro</i> Yara İyileştirme Deneyine (Scratch Deneyi) Ait Bulgular | 49 |
| 4.2.7. Hemolitik Etki Testi Bulgular | 50 |
| 4.3. Antimikrobiyel Etkinlik Testi Bulgular..... | 52 |
| 4.4. Doku Yapıştırıcısının <i>in vivo</i> Biyouyumluluk Özellikleri Testleri Sonuçlar .. | 53 |
| 4.4.1. Doku Yapıştırıcısının Deri Sensitizasyon Deneyi | 53 |
| 4.4.2. Doku Yapıştırıcısının Dermal İrritasyon Deneyi..... | 55 |
| 4.4.3. Subkronik Sistemik Toksisite Deneyi (TS EN ISO 10993-11) | 57 |
| 4.4.3.1. Subkronik Sistemik Toksisite Deneyi Ağırlık Sonuçları..... | 57 |
| 4.4.3.2. Subkronik Sistemik Toksisite Deneyi Hemogram Sonuçları..... | 58 |
| 4.4.3.3. Subkronik Sistemik Toksisite Testi İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları | 60 |
| 4.4.3.4. Yara İyileşmesi Bulgular | 61 |
| 4.4.3.5. Histopatolojik Bulgular | 62 |
| 4.4.3.6. Yara iyileşmesi sonrası biyomekaniksel değerlendirme bulgular..... | 65 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 68 |
| KAYNAKLAR | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 83 |
| EKLER..... | 84 |
| EK-1. Etik Kurul Onayı..... | 84 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>ÇİZELGE</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.1. Dekolarizasyon İndeksi | 24 |
| 3.2. Lizis İndeksi | 24 |
| 3.3. Hücre cevabı (dekolarizasyon indeksi ve lizis indeksi için ayrı ayrı derecelendirilmiş) ve sitotoksisitenin yorumlanması | 24 |
| 3.4. Magnusson ve Kligman derecelendirme ölçeği..... | 31 |
| 3.5. Deri reaksiyonu için skorlandırma sistemi (TS EN ISO 10993-23)..... | 33 |
| 3.6. Birincil veya kümülatif tahriş indeks kategorileri | 33 |
| 4.1. TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı Sonuçları | 43 |
| 4.2. Doku yapıştırıcısı uygulanmış L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik- nekrotik indeks sonuçları..... | 44 |
| 4.3. Kısa süreli, 3 saat'lik uygulamadaki sonuçlar | 47 |
| 4.4. 24 saat'lik uygulamadaki sonuçlar | 47 |
| 4.5. Okunan absorban değerleri ve nicel değerlendirme..... | 51 |
| 4.6. 24 saat bakteri suşlarına maruz bırakılan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının inkübasyon sonrası cfu/mL değerleri ve etkinlik sonuçları..... | 52 |
| 4.7. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının Magnusson ve Kligman ölçeğine göre sensitizasyon değerlendirmesi | 54 |
| 4.8. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısına ait gözlem sonuçları | 56 |
| 4.9. Birincil tahriş skoru ve birincil (kümülatif) tahriş indeksi (PII)..... | 57 |
| 4.10. Deney hayvanlarına ait Ağırlık/Karaciğer indeksi | 58 |
| 4.11. Hematoloji ölçümü sonucunda alınan değerler | 59 |
| 4.12. Doku yapıştırıcısı uygulanan deney gruplarında subkronik sistemik toksisitenin patolojik olarak değerlendirilmesi..... | 60 |
| 4.13. Deney hayvanlarına ait deri örneklerine uygulanan germe işlemi sonrası ölçülen maksimum kuvvet..... | 67 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>ŞEKİL</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1. Yara iyileşmesinin ardışık dört aşaması | 4 |
| 3.1. TA-PEG/PVA bazlı doku yapıştırıcısının hazırlanması | 21 |
| 3.2. Deri içi enjeksiyon bölgeleri..... | 29 |
| 3.3. Deri sensitizasyon testi | 30 |
| 3.4. Deri uygulama bölgeleri. | 32 |
| 3.5. Dermal irritasyon testi uygulama aşaması..... | 32 |
| 3.6. İntraperitonealenjeksiyon yapılırken. | 34 |
| 3.7. Dinamik Yorulma Test Cihazı Utest | 38 |
| 4.1. Orijinal PEG (kırmızı) ve PEG-COOH (mavi) FT-IR spektrumları | 39 |
| 4.2. TA-EDC /NHS (mavi) ve TA (kırmızı) FT-IR spektrumları | 40 |
| 4.3. TA-EDC/NH (mavi), NHS (siyah)ve EDC (yeşil) FT-IR spektrumları..... | 41 |
| 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı ekstrelerinin uygulandığı L929 fibroblast hücrelerine ait % canlılık grafiği ... | 42 |
| 4.5. L929 Fibroblast Hücrelerinde Agar Difüzyon Testi Sonuçları | 43 |
| 4.6. L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik hücrelerin fotoğrafları | 44 |
| 4.7. L929 Fibroblast hücrelerine ait nekrotik hücrelerin fotoğrafları..... | 45 |
| 4.8. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerinin proliferasyon grafiği | 46 |
| 4.9. CHO hücrelerine 24 saat uygulanan doku yapıştırıcısı boyanmasının genotoksisite fotoğrafları | 48 |
| 4.10. İn vitro yara modeli ile elde edilen L929 Fibroblast hücre göçünün günlere göre temsili fotoğrafları. | 50 |
| 4.11. Hemogloblin konsantrasyonu eğim grafiği..... | 51 |
| 4.12. Antimikrobiyal etkinlik testinde gözlemlenen koloni oluşumu | 52 |
| 4.13. Deri sensitizasyon testi uygulamadan 24 saat ve 48 saat sonra görüntüsü..... | 53 |
| 4.14. Dermal sensitizasyon testi uyarım fazı sonrası bulgular | 55 |
| 4.15. Dermal irritasyon testi sonuçlar..... | 56 |
| 4.16. Test grubu dışı hayvanların dokularına ait mikroskop görüntüleri | 61 |
| 4.17. Yara modeli oluşturulduktan sonra farklı dönemlerde yara kapanma oranları. 62 | |

| | |
|--|----|
| 4.18. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı kullanılan gruptan alınan doku örneğinin hematoxilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüsü..... | 63 |
| 4.19. Surgiseal stylus doku yapıştırıcısı uygulanan gruptan yara bölgelerinden alınan doku örneğinin hematoxilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri | 64 |
| 4.20. Kontrol grubunda yara bölgelerinden alınan doku örneğinin hematoxilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri | 65 |
| 4.21. Deri örneğine yapılan mukavemet testi | 66 |



KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------|---|
| CHO | Çin Hamster Ovaryum |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| EDC | 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hidroklorür |
| EDTA | Etilendiamin Duman Asetikasit |
| EMH | Ekstramedullar Hematopoezis |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FDA | Food and Drug Administration, (Gıda ve ilaç dairesi) |
| FT-IR | Fouirer Transform-Kızılötesi Spektrofotometre |
| L929 | Fibroblast Mouse C3 / An connective tissue |
| L-Dopa | 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine |
| MTT | Metiltiazol Difenil Tetrazolyum |
| NHS | N-Hidroksisüksinimid |
| OD | Optik Yoğunluk |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEG | Poly(ethylene) glikol |
| PI | Propidyum İyodür |
| PVA | Poly(vinil) alkol |
| SLS | Sodium Lauril Sülfat |
| TA | Tannik asit |

1. GİRİŞ

Yara doku bütünlüğünün fiziksel, kimyasal, ısı ve cerrahi nedenlerden oluşabileceği gibi arteriyel ve venöz yetmezliklerde olduğu gibi spontan nedenlerden de bozulmasıdır. Doku kaybının olmadığı ve yara dudaklarının bir araya getirilerek yapılan kapatma işlemi yara tedavisinde primer kapatma olarak yer alır.

Sütür tekniği, yüksek gerilme mukavemeti ve düşük ayrılma özelliği nedeniyle uzun yıllardır yara kapatmada ve kanama kontrolünde tercih edilen uygulama olmuştur. Bununla birlikte sütür tekniğinde görülen dezavantajlardan, yüksek enfeksiyon oranı, kullanımdaki zorluk, kan yoluyla bulaşan hastalıkların iğne kullanımı yoluyla bulaşması endişesi bazılarını oluşturur. Bu nedenle, çeşitli hemostaz ajanları, klipsler, zımbalar, bantlar ve doku yapıştırıcılarının kullanılması dahil olmak üzere, daha hızlı ve daha etkili kanama kontrolüne ve yara kapanmasına yardımcı olacak başka teknikler geliştirilmiştir (Mehdizadeh ve Yang, 2013; Bal-Ozturk vd., 2021). Biyoyapışkan, dokuların yüzeylerine uygulandığında birbirine bağlayabilen, uygulanan yükleri bir dokudan diğerine aktararak ayrılmayı önleyen bir malzemedir. Son on yılda, üç kategoriye ayrılabilen çeşitli tıbbi biyo-yapışkanlar geliştirilmiştir:

- i) Farklı mekanizmalar yoluyla kan pıhtıları oluşturan hemostatlar;
- ii) Yırtılmış ve travmatize olmuş dokuları yeniden birleştiren yapıştırıcılar;
- iii) Gazların veya sıvıların sızmasını önlemek için bir bariyer oluşturan sızdırmazlık malzemeleri.

Mevcut yapıştırıcıları iyileştirmek için yeni nesil doku yapıştırıcılarının geliştirilmesine büyük miktarda çaba harcanmaktadır (Bao, Gao, Sun, Nian ve Xian, 2020).

Doku yapıştırıcıları, yara kapatma ve iyileştirme, ilaç verme, tıbbi cihazların implantasyonu, doku mühendisliği ve diş ve kemik uygulamaları dahil olmak üzere klinik uygulamaların çeşitli alanlarında giderek daha fazla popülerlik kazanmaktadır (Mehdizadeh ve Yang, 2013; Bao vd., 2020).

Günümüzde doku yapıştırıcı türleri; fibrin temelli, albümin temelli, kolajen temelli, siyanoakrilat temelli, hidrojel, nano etkin malzeme temelli olacak şekilde kategorize edilmiştir. Hidrojeller, çeşitli biyomedikal uygulamalar için de çekici olmalarının yanı

sıra üç boyutlu yapıları ve çok miktarda su tutma kapasiteleri ile birçok avantaja sahiptir. Genel de, hidrojenler sulu bir ortamda hidrofilik polimer zincirlerinden fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanma yoluyla üretilebilirler. Hidrojenler biyouyumlu olmaları, özelliklerinin ayarlanabilir olması, hücre ilaç biyoaktif bileşik kapsülleme kabiliyetleri yüksek ve porlu yapıya sahiptirler. Hidrojenlerin yara nemli tutması, hızlı yara iyileşme sürecinde avantaj sağlar. Hidrojenleri oluşturmak için; malzemeler seçilirken, birbirine uyumlu veya iyileşme sürecini olumlu etki gösteren doğal bileşimlerden tercih edilir. Sonuç olarak, yapışkan hidrojenler yaraların doğasına, uygulama yerlerine ve bunların komşu doku ve sıvılarına uygun olmalıdır (Mehdizadeh, Weng, Gyawali, Tang ve Yang, 2012; Mehdizadeh ve Yang, 2013; Petra vd., 2014).

PEG bazlı yapıştırıcıların sıklıkla kullanılanlarından, ana bileşenleri dört kollu PEG süksinimit glutarik asit ve dört kollu PEG eter merkaptan olan Coseal™ cerrahi dolgu macunu, kanama yerlerini mekanik olarak kapatarak vasküler rekonstrüksiyonlar için iyi doku yapışmasına (25 kPa) ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe (30 gün) sahiptir (Assmann vd., 2017; Murdock vd., 2019). Bununla birlikte, PEG bazlı yapıştırıcıların bazı sınırlamaları vardır, yara bölgesi enfeksiyonlara karşı savunmasızdır ve bu yapıştırıcılar enfeksiyonu etkili bir şekilde ortadan kaldıramaz, hasarlı doku rejenerasyonu sürecini geciktirir, bu durum riskleri artırır ve hastalar üzerinde iyileşme için büyük zorluklar yaratabilir (Lu vd., 2020; Huang vd., 2021).

Tannik asit (TA) bazlı malzemeler, geniş kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle önemli ilgi görmüştür. Tez çalışmasında, yapıştırıcı hazırlanırken çapraz bağlayıcı olarak kullanılan tannik asit, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan polifenollerden biridir. Son zamanlarda, tannik asidin proteinler ve DNA gibi hemen hemen tüm biyopolimerlere bağlandığı ve moleküler bir yapıştırıcı olarak büyük ilgi gördüğü ortaya çıkmıştır (Shin, Park ve Lee, 2019).

Bu tez çalışmasında, TA ve polimerler kullanılarak yeni bir doku yapıştırıcısı hazırlanmıştır. TA-PEG/PVA basitçe PEG1000 (molekül ağırlığı 1000 olan polietilen glikol) ile L-Dopa proteini içeren ve ortak çapraz bağlama maddesi olarak tannik asit kullanılan bir biyoyapışkan hazırlandı. Doku yapıştırıcısı formülasyonu tamamlandıktan sonra karakterizasyon değerlendirmesi için Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR), biyouyumluluğunun değerlendirilmesi açısından sitotoksikite, apoptoz nekroz ikili boyama testi, xcelligence ile hücre proliferasyon yöntemleri, L929 Fibroblast hücre hattına uygulanmıştır. Gerçekleştirilen bu testlerin ardından *in vitro* yara iyileşme

çalışmasında doku yapıştırıcısının etkinliği araştırılmıştır. Genotoksisite testi Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücre hattı kullanılarak mikronükleus metoduna uygun olarak yapılmıştır. *In-vivo* sensitizasyon, iritasyon, sistemik toksisite ve etkinlik testi yapılmıştır. *In vivo* çalışmalarda, Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda oluşturulan yaraları TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı ile kapatılmış ve belirlenen günlerde yara küçülmeleri makroskobik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelere göre, kontrol grupları ile karşılaştırıldığı zaman, TA-PEG/PVA ile yapıştırılan hayvanlarda yaraların daha hızlı kapandığı görülmüştür. Ayrıca, iyileşen yara bölgesinden alınan doku örneklerine ait kesitler, histolojik olarak değerlendirmiştir.

Yapılan çalışmanın verileri doğrultusunda hedeflenen yapıştırma gücü yüksek, biyobozunur, biyoyumlu, maliyeti düşük, kolay uygulanabilir doku yapıştırıcıları geliştirmek; halen piyasada kullanılan pek çok doku yapıştırıcısının bulunan yan etkilerine karşılık iyileştirilmiş sonuçların elde edilmesi ve sonunda bir yerli ürüne dönüşmesi neticesinde ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

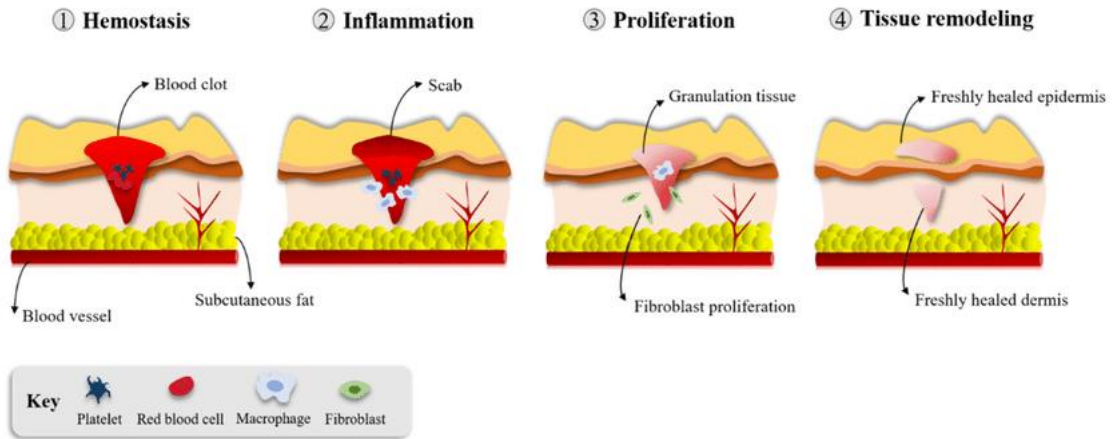
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara

Deri insan vücudunda en büyük organ olarak görev yapar, uyarınları algılar, bizi dış etkilerden (mekanik, ısı, nem ve UV radyasyonu) korur, atıkları dışarı atar (Xi vd., 2020). Bununla birlikte, hem travma hem de fizyolojik ortam cilt dokusuna zarar vererek cilt yaralarını yaygın bir sağlık sorunu haline getirebilir (Liang, He, ve Guo, 2021).

2.1.1. Yara İyileşmesi

Deri genellikle mükemmel rejeneratif özellikler sergiler ve normal yara iyileşmesi, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve hücre dışı matris (ECM) yeniden modellenmesi dahil olmak üzere bir dizi oldukça düzenli süreci içerir.



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin ardışık dört aşaması (Pinto, Cerqueira, Lópes, Pastrana ve Sillankorva, 2020).

2.1.1.1. Hemostaz/İnflamasyon Faz

Enflamatuar faz sırasında, plazma trombositleri kanamayı durdurmak için yaranın yüzeyinde bir pıhtı oluşturmak üzere bir araya geldiğinde hemostaz başlatılır (Vowden, 2005). Bu pıhtı, lökositlerin ve lenfositlerin inflamasyonun başlamasını desteklemek için yara bölgesine göç etmesine izin verir. Yaralanma bölgesinde kan kaybını en aza indirmek için vazokonstriksiyon (damarların kısılması) indüklenir (Hunt, Hopf ve Hussain, 2000; Vowden, 2005). Yabancı partiküller ve hücre kalıntıları nötrofiller, monositler ve lenfositler tarafından uzaklaştırılır. Bu enflamatuar hücreler, enflamatuar fazın başlangıcında üretilen sitokinler tarafından toplanır ve kemotaksis yoluyla yaraya

girer. Ayrıca monositler, sırasıyla sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakarak vazodilatasyonu (damarların genişlemesi) ve diğer fagositlerin ve fibroblastların toplanmasını teşvik etme işlevi görür. Bu faz, pH'ta değişikliklerle sonuçlanır ve bu da yaralarla ilişkili gözlenen şişlik ve ağrıya yol açar. Sonuç olarak, granülasyon, epitelizasyon, anjiyogenez ve kasılmanın meydana geldiği proliferasyon fazı başlatılır (Martin, 1997; Vowden, 2005).

2.1.1.2. Proliferasyon/ Granülasyon Faz

Proliferasyon fazı, inflamasyon fazı tamamlandıktan sonra başlar. Proliferatif faz sırasında damar sistemi yeniden kurulur (anjiyogenez), fibronektin gibi doku matris bileşenlerinden oluşan granülasyon dokusu üretilir (fibroplazi) ve yara yüzeyleri yeniden epitelize olmaya başlar (Li, Chen ve Kirsner, 2007). Çeşitli faktörler (vasküler endotelial büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü- β dahil) anjiyogenezi indükler. Anjiyojenik kılcak filizler, fibrin/fibronektin açısından zengin yara pıhtısını istila eder ve birkaç gün içinde granülasyon dokusu boyunca bir mikrovasküler ağ halinde organize olur (Enoch ve Leaper., 2008).

Bu granülasyon dokusu, epitelizasyon sırasında çevreden bir epitel bariyeri oluşturmak için epitel hücrelerinin göçüne izin verir (Tonnesen, Feng ve Clark, 2000). Granülasyon dokusunun görünümü yara durumunu aşağıda anlatıldığı gibi gösterebilir:

- İyileşmekte olan yaralar nemli ve parlak, hiperemik ve kırmızımsı bir görünüme sahiptir.
- Etili kırmızı renge sahip aşırı, yumuşak, hassas yaralar zayıf iyileşmeyi gösterir.

Granülasyon fazının sonunda miyofibroblastlar yaranın kapanmasına yol açar (Darby, Laverdet, Bonte' ve Desmouliere, 2014). Son olarak, yara iyileşmesi, granülasyon dokusunun bir skar ile yer değiştirdiği ve epidermin ya apoptoz ile ölen ya da dermise yeniden yerleşen immün hücrelerden kurtulduğu yeniden şekillenme fazı ile sona erer (Tottoli vd., 2020).

2.1.1.3. Yeniden Şekillenme Fazı

Yeniden şekillenme, iyileşme sürecinin son aşamasıdır ve yaralanmadan birkaç hafta sonra başlar bir yıla kadar sürebilir. Granülasyon dokusu, tip III kolajen'in yerini tip I kolajen ile değiştirerek yeniden şekillenir ve fibronektin ve hyaluronik asitte bir yıkım

meydana gelir ve kolajen lifleri açısından zengin bir skar dokusu oluşur ve gerilme maksimum gerilme mukavemetini elde edilir (Welshans ve Hom, 2017; Ellis, Lin, Tartar, 2018; Roşca ve Țuțuianu, 2018).

Gecikmiş yara iyileşmesi ve olası kronik ülser oluşumu, aşırı skarlaşma veya her ikisi, sunulan bu olaylardan birinin düzensizliğinden gelişebilir (Ellis vd., 2018; Aljghami, Saboor, Amini-Nik, 2019). Sağlıklı bireylerde, bu yara iyileşme süreci oldukça verimlidir ve epidermal bariyer fonksiyonlarını hızla eski haline getirir (Roşca, Țuțuianu ve Domnica Titorencu, 2018).

2.1.2. Yara Çeşitleri

Yara, iyileşme sürecinin süresine ve doğasına göre akut ve kronik olarak sınıflandırılır. Deri yaralarının dünya çapında sağlık sistemleri ve ekonomi üzerinde muazzam bir olumsuz etkisi vardır. Son zamanlarda, dünya çapında yaklaşık bir milyar insanın akut ve kronik yaralardan muzdarip olduğu bildirildi. Bu muazzam sayı, büyük mali harcamalara dönüşmektedir (Raziyeva vd., 2021). Durumun düşük iyileşme oranları nedeniyle daha da kötüleşmesi muhtemeldir. Bilhassa, randomize kontrollü çalışmalardan elde edilen veriler, ortalama %40'luk bir iyileşme oranı sağlarken, bildirilen oran genellikle %90'dan fazladır (Fife, Eckert ve Carter, 2018).

2.1.2.1. Akut Yara

Akut yara, kaza veya cerrahi yaralanma nedeniyle aniden meydana gelen deri yaralanmasıdır. Derinin epidermis ve dermis tabakasındaki hasarın boyutuna, derinliğine ve derecesine bağlı olarak genellikle 8-12 hafta içinde öngörülebilir ve beklenen bir zaman diliminde iyileşir (Dhivya, Padma ve Santhini, 2015).

Bağışıklık hücreleri ve faktörleri, akut yara iyileşmesinde kilit düzenleyiciler ve oyunculardır (Su, Zheng, Wang, Zhang ve Hu, 2019). Nötrofiller ve bazofiller, yaralanmaya ilk yanıt verenlerdir. Ek olarak, makrofajlar, mast hücreleri, Langerhans hücreleri (LC'ler), T hücreleri ve B hücreleri gibi diğer doğal ve adaptif immün hücrelerin de sürece dahil olduğu gösterilmiştir (Cañedo-Dorantes ve Cañedo-Ayala, 2019).

2.1.2.2. Kronik Yara

Yara iyileşmesi sırasında immün yanıtın düzensizliği kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olur (Azevedo, Lisboa, Cobrado, Pina-Vaz, ve Rodrigues, 2020). Kronik yaralarda,

inflamatuvar faz çözülmez, bu da zayıf ve gecikmiş iyileşmeye yol açar (Wu, Cheng ve Cheng, 2019; Tottoli vd., 2020). Bu tür yaralarda kalıcı iltihaplanma, çeşitli özelliklerle karakterize edilir. Spesifik olarak, aşırı miktarda proinflamatuvar makrofaj bulunurken, antiinflamatuvar fenotiplere sahip makrofajların miktarı düşüktür (Saleh vd., 2019; Krzyszczyk, Schloss, Palmer ve Berthiaume, 2018).

Kronik yaraların yaygınlığı, insanlarda artan obezite oranları ve buna bağlı olarak artan diyabet gelişme riski ile birlikte yaşanan popülasyon nedeniyle artmıştır. Bu yaralar, hastaların ve ailelerinin yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkilere neden olur örneğin; fonksiyon ve hareket kaybına yol açan artan ağrı; sıkıntı, kaygı, depresyon ve sosyal izolasyon ve hatta ölüme neden olur (Pinto vd., 2020).

2.2. Doku Yapıştırıcısı

Ameliyatlarda kullanılmak üzere özel olarak geliştirilen sıvı yapışkan malzemeler, alternatif olarak veya diğer dikişler, zımbalar, klipsler, ligatürler, teller veya yapışkan şeritler gibi yara kapamada kullanılan materyallere yardımcı olarak kullanılan yapıştırıcılar veya dolgu macunları olarak ifade edilir (Jarrett ve Coury, 2013).

Bir cerrahi dolgu macunu, canlı dokulardaki (kesikler, kesikler, çatlaklar, yarıklar veya delikler) dar alanlara nüfuz edebilen ve daha sonra bu boşlukları kapatabilen yarı sert ve tercihen esnek bir katı malzemeye yerleşen sıvı bir malzemedir. Bir örtücü çevre dokuya yapışmak zorunda değildir, ancak dokuyu itmemelidir. Gerçekte, ticari olarak temin edilebilen çoğu malzeme, çok az gerçek yapışkanlık özelliği sergileyen veya hiç göstermeyen, sızdırmazlık maddesi görevi görecektir şekilde geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bir cerrahi adeziv, sızdırmazlık kapasitesine sahip olmasının yanı sıra, bilinen bir veya daha fazla adezyon mekanizması yoluyla dokuya yapışabilmelidir (Traian, 2022).

Doku yapıştırıcılarında, yapışma mukavemetinin yüksek olmasının yanında aranan en önemli özelliklerinden biri de biyouyumlu olmasıdır. Biyolojik uyumluluğun tanımı şu şekilde olmalıdır:

- 1) Hem bileşenler hem de bozunma ürünleri toksisiteye neden olmamalıdır;
- 2) Ürün inflamatuvar veya kanserojen olmamalıdır;
- 3) Yapıştırma prosedürü tahriş edici olmamalı veya normal yara iyileşme sürecine engel olmamalıdır;

4) Yara üzerinde jelleşmiş ürün, hidroliz veya enzimatik bozunma ile parçalanabilir olmalıdır;

5) Bozunma ürünü tamamen metabolize edilmeli veya vücuttan atılmalıdır (Petra vd., 2014).

2.2.1. Doku Yapıştırıcısı Yapışma Mekanizmaları

Doku yapıştırıcılarında ana adezyon mekanizmaları arasında; moleküler bağlanma, mekanik bağlanma ve termodinamik yer alır. Bu adezyon mekanizmaları arasında moleküler bağ en popüler olandır. Kısaca, doku yüzeyinde bulunan moleküller ile adeziv moleküller arasında hidrojen bağı, kapiler kuvvetler, Van der Waals kuvvetleri, statik elektrik kuvveti ve kovalent bağlar gibi atomlar arası ve/veya moleküller arası kuvvetler kurulur (Ge ve Chen, 2020).

Doku yapıştırıcıları, son 30 yılda hızlı bir gelişme ile modern tıpta giderek daha önemli unsurlar haline gelmektedir (Ge ve Chen, 2020). Onlarca yıllık yoğun araştırma faaliyetlerinden sonra, doku yapıştırıcılarının farklı klinik gereksinimleri karşılama yeteneğini artırmak için çok çeşitli doku yapıştırıcıları geliştirilmiştir. Mevcut klinikte kullanılan doku yapıştırıcıları üç gruba ayrılabilir:

(1) doğal doku yapıştırıcıları,

(2) biyomimetik doku yapıştırıcıları,

(3) sentetik ve yarı sentetik doku yapıştırıcıları (Duarte, Coelho, Bordado, Cidade ve Gil, 2012).

2.2.2. Doku Yapıştırıcı Çeşitleri

2.2.2.1. Doğal veya Biyolojik Yapıştırıcılar

Biyokimyasal reaksiyonlarla çapraz bağlanan doğal polimerlerden türetilen doku yapıştırıcıları, sentetik yapıştırıcılara göre daha biyouyumlu bir alternatif sunar (Ronit vd., 2009). Literatürde, protein bazlı yapıştırıcılar; fibrin, kolajen, jelatin ve polisakkarit bazlı yapıştırıcılar; kitosan, aljinat ve kondroitin olarak yer alır.

Fibrin Bazlı Yapıştırıcılar: Fibrin yapıştırıcılar, genellikle trombin ve fibrinojen kombinasyonlarından oluşur (Reece, Maxey ve Kron, 2001). Kardiyovasküler cerrahi, beyin cerrahisi, plastik cerrahi ve dalak ve karaciğer laserasyonları dahil olmak üzere geniş uygulama alanına sahiptir.

Geniş kullanım alanı, hızlı etki göstermesi ile bilinen fibrin doku yapıştırıcının bilinen yan etkileri vardır. Viral kontaminasyon riskini azaltmak için ısı inaktivasyonu ve çözücü/deterjan ekstraksiyon yöntemleri kullanılsa bile insan veya hayvan plazmasından türetildiği için fibrin bazlı yapıştırıcılarda hastalık bulaşma riski büyük bir sorundur (Horowitz ve Busch, 2008). Olası kontaminasyon probleminden kaçınmak için virüsle inaktive edilmiş fibrin yapıştırıcılar geliştirilmiştir. Bu yapıştırıcılar, mükemmel biyoyumluluk ve düşük toksisite sunarken, karmaşık bir hazırlama prosedürüne, yavaş sertleşmeye ve oldukça zayıf bağlanma gücüne sahiptir (Ronit vd., 2009).

Kolajen Bazlı Yapıştırıcılar: Kolajen bazlı yapıştırıcılar, lifleri üzerinde kan ve pıhtılaşma ürünlerini adsorbe ederek boşluklarda hapseder ve etkili bir şekilde yaraya yapıştırır. Ayrıca, trombosit adezyonunu ve agregasyonunu indüklerler ve pıhtılaşma faktörlerini aktive ederler (Bochicchio, Dunne, Bochicchio ve Scalea, 2004)

Hastalık bulaşma riski düşük olan kolajen bazlı yapıştırıcılar, cerrahi dikiş malzemeleri, hemostatik yapıştırıcı ve yara pansumanları gibi farklı tıbbi uygulamalarda çok iyi biyoyumluluk göstermektedir (Fleck ve Simman, 2010). Bununla birlikte, kolajen bazlı hemostatlar doku kompresyonu ile şişebilir. Sonuç olarak, oftalmolojik veya ürolojik ameliyatlarda için kullanılamaz (William, Spotnitz ve Burks, 2008).

Jelatin Bazlı Yapıştırıcılar: Jelatin geri dönüşümsüz olarak elde edilen denatüre kolajendir (Ge ve Chen, 2020). Yerinde yapışma özelliği ile dokuları bir araya getirir ve/veya sızıntıları önler, ayrıca çeşitli yumuşak dokuların rejenerasyonunu sağlaması özellikleri ile büyük ilgi çekmiştir (Liu vd., 2009).

Jelatin bazlı yapıştırıcıların jelleşme özelliği, çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak sağlanır. Bu çapraz bağlayıcılar genellikle formaldehit ve glutaradehit gibi toksisitesi yüksek kimyasallar olabilmektedir (Suzuki ve Ikada, 2010). Ayrıca jelatin bazlı doku yapıştırıcılarının uygulama öncesi ısıya gerek duyulması ve bilinen biyobozunma sürelerinin uzunluğu gibi bazı dezavantajları mevcuttur (Petra vd., 2014).

Polisakkarit Bazlı Yapıştırıcılar:

➤ **Kitosan**, kabuklular, mantarlar ve diğer bitkisel olmayan organizmalardan kitinin kısmi deasetilasyonu ile üretilen b-(1,4)-bağlı 2-asetamido-2-deoksi-D glukopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranozun bir polisakaritidir. Kitosan bazlı yapıştırıcıların avantajları, biyobozunur ve biyoyumlu olmalarıdır. Ayrıca ameliyatlarda kullanımından sonra iyi antimikrobiyal özellik de göstermiştir (Mati-Baouche vd., 2014).

➤ **Aljinat**, aljin veya alginik asit olarak da adlandırılan aljinat, kahverengi alglerin hücre duvarlarında geniş çapta dağılmış bir anyonik polisakarittir ve burada bağlayıcı su yoluyla viskoz bir zank oluşturur. Ekstrakte edilmiş formda suyu hızla emer; kendi ağırlığının 200-300 katı kadar su emebilir (Duarte vd., 2012).

➤ **Kondroitin**, değişen N asetil-galaktozamin ve glukuronik asit zincirinden oluşan bir polisakkarittir. Özellikle eklem bölgelerinde bulunurken, farklı pozisyonlarda sülfatlanma özelliğine sahiptir. Kondroitin sülfat bazlı adezivlerin bazı avantajları, bu polisakkaritler insan dokularında bulunduğu için, biyouyumluluk ve toksisite göstermezler. Bununla birlikte, polimer ve doku arasındaki bağlanmayı arttırmak için daha iyi yapışkan özellikler elde etmek amacıyla daha fonksiyonel gruplar önerilmektedir (Wang vd., 2007).

2.2.2.2. Biyomimetik Doku Yapıştırıcıları

Doğa, en değişken amaçlar için milyonlarca yıldır yapıştırıcılar geliştirmektedir. Hayvanlarda avcılardan korunma, bitkilerde kendi kendini iyileştirme ve mikroorganizmalarda yüzeylere tutunma bazı örneklerdir. Doğadan ilham alan araştırmacılar, doğal süreçlere dayalı yapıştırıcılar geliştirmekte ve iyileştirmektedir. Son on yılda, biyomimetik mekanizmalara ilişkin artan bilgi ve anlayış, sentez ve polimer tasarımındaki ilerlemelerle birleştiğinde, çeşitli gruplarda yapılan araştırmalarda umut verici sonuçların ihtiyaçları karşıladığı görülmektedir (Bré, Zheng, Pêgo ve Wang, 2013).

Midye-mimetik Yapıştırıcılar: Deniz midyeleri, kayalar, keresteler, cam ve metal gibi her türlü yüzeye sıkıca tutunma konusundaki üstün yetenekleriyle tanınırlar (Ai, Wei, Nie ve Yang, 2013; Hiraishi vd., 2015). Son zamanlarda midye yapışkan proteinlerinin başta domuz derisi olmak üzere canlı vücut maddelerine ve çeşitli memeli hücrelerine bağlanması üzerine çalışmalar da yapılmaktadır (Cha, Hwang ve Lim, 2008).

Deniz midyeleri tarafından salgılanan midye adheziv proteinleri (MAP'ler), midye ile buldukları yüzey arasında sağlam bir bağ oluşturmak için gerekli bileşenlerdir. Yapılan çalışmalar MAP'lerin yüksek miktarda katekolik amino asit içeren bir protein yani 3,4-Dihidroksifenil-L-alanin'in (DOPA) içerdiğini, bu amino asitin moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda sıkı yapışkan plak oluşumuyla sonuçlanan olağandışı özellik gösterdiğini buldu. DOPA'nın, MAP'lerin istisnai yapışkan özelliklerinden birincil olarak sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Ai vd., 2013). MAP'lerin, araştırmacılar tarafından doku yapıştırıcı tasarımı için ideal bir şablon olarak kabul edilir. Katekol grubu

olduğu kanıtlanmış olan DOPA'nın fonksiyonel grubunu taklit ederek, dopamin ve hidrokafeik asit gibi ticari olarak temin edilebilen diğer birçok ajan kullanılarak, uygun yapıştırma yeteneklerine sahip çeşitli midyeden ilham alan doku yapıştırıcıları geliştirilmiştir (Zhu, Peck, Iqbal ve Wang, 2017).

Güçlü ve suda çözünmeyen midye yapıştırıcıları, hücre ve doku yapıştırıcıları olarak kullanılabilmesi ve biyolojik olarak parçalanabildikleri için çevre dostu olma avantajına sahip olmaları nedeniyle çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel kullanımlar için ilgi çekmiştir (Waite, 2002). Midye yapışkan proteinleri, insan vücuduna zararsız oldukları ve immünojenisite sağlamadıkları için tıbbi yapıştırıcılar olarak da kullanılabilir. Bu nedenle, pratik midye biyoyapışkanlarının potansiyelini gerçekleştirmeye çalışmak için çok çaba sarf edilmektedir. Midye yapışkan proteinlerinin üretimine ve özelliklerine vurgu yaparak, çeşitli gelişimsel yaklaşımlardaki ilerlemeler devam etmektedir (Cha vd., 2008).

2.2.2.3. Sentetik ve Yarı-sentetik Doku Yapıştırıcıları

Sentetik ve yarı sentetik yapıştırıcı sınıfı, doğal yapıştırıcıdan daha iyi yapışma özelliğine sahiptir. Bununla birlikte, düşük biyobozunma ve buna bağlı bazı bozunma ürünlerinin kronik enflamasyonu artırması, ıslak yüzeylerde düşük mukavemet göstermesi ve yüksek sitotoksisite gibi çeşitli dezavantajları vardır (Ge ve Chen, 2020). Siyanoakrilatlar, poliüretanlar, poli (etilen glikol), polyesterler ve dendrimer polimerlerdahi olmak üzere bazı sentetik ve yarı sentetik yapıştırıcılar hali hazırda kullanılmaktadır.

Siyanoakrilat Bazlı Yapıştırıcılar: Siyanoakrilatlar yüksek reaktiviteli sıvı monomerlerdir. Dokuya uygulandığında, monomerler doku yüzeyindeki çatlaklara ve kanallara akar ve siyanoakrilat ile lizinin yan zincirleri arasında doku proteinlerindeki fonksiyonel gruplar arasındaki kovalent bağlar yoluyla doku ile yapıştırıcı arasında güçlü bir bağ oluşturur. Bu durum, canlı dokular üzerindeki uygulamalar için yeterli yapışma gücü sağlar. Ayrıca kozmetik olarak uygulanması ve kullanımının kolay olması onu harici uygulamalar için uygun hale getirir (Leggat, Smith ve Kedjarune, 2007).

Siyanoakrilatlar, dokulara uygulanmak için yeterli bir yapışma gücüne ve mekanik bir dayanıklılığa sahiptir. Küçük yırtıkları veya benzeri yara tiplerini daha iyi kapatırlar ayrıca en çok plastik cerrahide kullanılırlar. Bunun yanında, yapısında bulunan siyanoasetat ve formaldehitin toksisitesi yara iyileşme sürecinde inflamatuvar yanıt oluştur, bunlarda iyi yapışma gücü beraberinde bazı problemleri getirir (Chow, Marshall,

Zacharakis, Paraskeva ve Purkayastha, 2010; Bhatia, 2010). Siyanoakrilat yapıştırıcıların yara iyileşmesini engelleyen enflamatuar tepkilere neden olduğu ve hatta pankreas tümörü gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Bhatia, 2010).

Poliüretan Bazlı Doku Yapıştırıcılar: Poliüretan bazlı doku yapıştırıcıları, hemolitik etki göstermeden vücut sıcaklığında mükemmel termostabilite özelliği, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve biyouyumlu olması nedeniyle sentetik malzemeler arasında dikkat çekmektedir (Ferreira, Pereira, Coelho, Silva ve Gil, 2008). Bununla birlikte bazı poliüretan bazlı yapıştırıcıların iyi adezyon sonuçlarına sahip olmasına rağmen dezavantajı, sertleşme süresinin ameliyatların gereksinimlerini karşılamak adına çok uzun olmasıdır (Ge ve Chen, 2020).

Dendrimer Bazlı Yapıştırıcılar: Dendrimerler, biyomedikal uygulamalar için çeşitli olasılıklar sağlayabilen, iyi tanımlanmış yapılara ve çok sayıda fonksiyonel son gruba sahip, düşük polidispersiviteye sahip yüksek oranda dallanmış makromoleküllerden oluşur (Duncan ve Izzo, 2005). Korneal yara onarımı ve korneal katarakt insizyonları için sütür kullanımı yerine dendrimer bazlı adezivlerin kullanılabilmesi gösterilmiştir (Grinstaff, 2007; Johnson, Wathier, Grinstaff ve Kim, 2009).

Poly(ethylene glycol) Bazlı Yapıştırıcılar: Başka bir doku yapıştırıcısı grubu, bu tez çalışmasında da kullanılan polimerlerden olan, poli(etilen glikol) (PEG) bazlıdır.

PEG, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kozmetik, gıda ve ilaçlarda kullanım için onaylanmış, yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak parçalanabilir bir polimerdir (Kreppel ve Kochan, 2008). PEG'nin temel formu, tekrarlayan ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) alt birimlerden oluşan doğrusal bir sentetik polimerdir. Farklı uzunluklarda sentezlenebilir, 200 ile 40.000 dalton arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip moleküllerle sonuçlanır. İmmünojenik olmayan ve düşük derecede toksisiteye sahip, yüksüz ve hidrofilik bir moleküldür. Ek olarak, "çok kollu PEG'ler" olarak adlandırılan dallanmış formları sentezlenebilir (Kumar, Soppimath ve Nachaegari, 2006; Haag ve Kratz, 2006).

PEG, tıp bilimlerinde kullanım için elverişli özelliklere sahiptir: polimer suda çözünür, biyolojik olarak uyumludur ve *in vivo* olarak kullanıldığında, gizlilik benzeri bir davranış gösterir, yani bağışıklık sistemi tarafından kolayca tanınmaz (Knop, Hoogenboom, Fischer ve Schubert, 2010). Şişme oranını kontrol etmenin yolları olmasına ve piyasada çok sayıda PEG bazlı doku yapıştırıcı bulunmasına rağmen, uyumluluklarına ilişkin

endişeleri tamamen ortadan kaldırmak için daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (Zhu vd., 2017).

Çoğunlukla eksternal kullanılan doku yapıştırıcılarından farklı olarak, PEG doku yapıştırıcıları, daha çok cerrahi işlemler sırasında hemostaz, çeşitli deri altı dokuların ve/veya zarların yakınlaşması veya yapıştırılması gibi vücut içi durumlarda kullanılmaktadır (Spotnitz, 2012).

PEG bazlı doku yapıştırıcıları üç ana sınıfa ayrılabilir: fotopolimerize olabilen yapıştırıcılar, PEG–trilizin yapıştırıcılar ve iki farklı şekilde işlevselleştirilmiş PEG polimerine dayalı yapıştırıcılar (Spotnitz ve Burks, 2008; Bhatia, 2010).

PEG bazlı geliştirilen doku yapıştırıcılarından en iyi bilinen, FocalSeal-L (Genzyme Biosurgery, Inc., Cambridge, MA; FDA onaylı) ve CoSeal (Cohesion Technologies) ticari adlarıyla piyasaya sunulmuştur. FocalSeal-L, foto-uyarım yoluyla etkinleştirilir ve birkaç dakika sonra hidrojeller oluşturur. Yavaş jelleşme süresi nedeniyle hemostaz uygulaması için önerilmez. FocalSeal-L esas olarak ameliyat sonrası hava/sıvı kaçaklarını azaltmak için uygulanır (Ryou ve Thompson, 2010). Coseal, sıvı sızıntısını önlemede sütür rollerine yardımcı olmak için ince bir tabaka ile vasküler rekonstrüksiyonlarda kullanım için endikedir. Ana matris olarak hidrofilik PEG nedeniyle, bu yapıştırıcılar yüksek bir şişme oranına sahiptir (24 saat sonra orijinal boyutundan yaklaşık 4 kat daha fazla). PEG bazlı yapıştırıcıların başka bir örneği, iki reaktif PEG çözeltisinden oluşan SprayGel yapışma bariyer sistemidir. Bir solüsyon NHS ile işlevselleştirilmiş starPEG ve diğer solüsyon aminle işlevselleştirilmiş starPEG ve metilen mavisi içerir (Johns, Ferland ve Dunn, 2003).

Hidrojeller, doğal hücre dışı matrisin (ECM) lifsiz kısmına benzeyen yüksek su içeriğine sahip, çeşitli çözünen maddelerin, besinlerin ve kapsülleyici hücrelerin difüzyonuna izin veren üç boyutlu (3D) polimer ağlardır (Li vd., 2018). Hidrojeller, kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanma yoluyla oluşturulur ve fizyolojik ortamlarda parçalanmadan büyük miktarda su veya biyolojik sıvı tutabilir. Yüksek su içerikleri, mükemmel biyouyumlulukları ve yumuşak madde yapıları nedeniyle hidrojeller, *in vivo* dokulara benzer biyomimetik bir mikro ortam sağlar ve bu da onları ilaç verme, yara onarımı, doku mühendisliği gibi biyomedikal alanda ve 3D hücre kültüründe çeşitli kullanımlar için uygun hale getirir (Shi, Yu ve Ding, 2021).

Hidrojellerin uygulamadan hemen önce hazırlanması hastalar için invaziv, elverişsiz ve

ağrılı olmaktadır. Cerrahi implantasyondan farklı olarak, geleneksel bir şırınga kullanılarak uygulanabilen enjekte edilebilir hidrojeller, hasta uyumunu ve konforunu önemli ölçüde artırır ve enfeksiyon riskini en aza indirir. Genel olarak yerinde jelleşme sistemlerinde, enjeksiyondan hemen önce hidrojeller, sulu polimer çözelti formunu sergiler ve sıcaklık ve pH gibi çevresel uyarılara maruz kaldıktan sonra veya yerinde kimyasal çapraz bağlama yoluyla akmayan hidrojellere dönüşür (Dumortier, Grossiord, Agnely ve Chaumeil., 2006; Nguyen, vd., 2016; Thambi, Li ve Lee, 2017; Cui, Yu ve Ding., 2019).

Hidrojellerin yapısını oluşturan terapötik ajanlar, biyoaktif moleküller veya hücreler, düşük sıcaklıklarda veya oda sıcaklığında sulu polimer solüsyonları ile basitçe karıştırılarak hazırlanabilmelidir. Vücuda enjekte edildikten sonra, karışık solüsyonlar kendiliğinden sürekli ilaç verme cihazlarına veya 3D hücre büyüme iskelelerine dönüşür. Çeşitli biyomedikal uygulamalar için ısıya duyarlı hidrojellerin tasarımının genellikle bazı önemli gereksinimleri karşılaması gerekir: (a) sulu polimer çözeltilerinin viskozitesi, ilaçlar/hücreler ve müteakip enjeksiyon ile homojen bir dağılımı kolaylaştırmak için yeterince düşük olmalıdır; (b) yüklü ilaçların ilk patlama etkisini ve kapsüllenmiş hücrelerin sızıntısını en aza indirmek için vücut sıcaklığına maruz kaldıktan sonra hızlı jelleşme gereklidir; (c) biyoyumlu olmalı ve amaçlarına ulaştıktan sonra bozunabilmeli ve bozunma ürünleri sitotoksik olmamalıdır; ve (d) farklı biyomedikal uygulamaları eşleştirmek için kontrollü ilaç salım profilleri sağlamalıdır (Shi vs., 2021).

Geçtiğimiz yıllarda, birçok türde sentetik ve doğal ısıya duyarlı polimer tasarlanmış ve rapor edilmiştir. Özellikle hidrofilik poli(etilen glikol) (PEG), mükemmel biyoyumluluğu nedeniyle sentetik kaynaklı ısıya duyarlı hidrojellerin tasarımında ve üretiminde ana bileşendir. PEG tabanlı sistemlere polyesterler ve polipeptitler gibi hidrofobik segmentler eklenerek, *in vivo* olarak uygulanabilir biyolojik olarak parçalanabilen ve ısıya duyarlı hidrojeller son zamanlarda popüler bir konu haline geldi.

2.3. Polivinil Alkol

Biyoyumlu bir hidrojel hazırlanmasında polivinil alkol (PVA), düşük maliyet, düşük toksisite, biyoyumluluk ve mükemmel kimyasal kararlılık gibi vazgeçilmez avantajlara sahiptir. Bu nedenle PVA, birçok biyomedikal malzemede anahtar bileşen olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kumar ve Han, 2017). PVA moleküler zincirindeki büyük

miktarda hidroksil grubu nedeniyle, suda iyi çözünebilirliğe sahiptir ve diğer polar molekül gruplarıyla kolayca hidrojen bağları oluşturur. Döngüsel dondurma-çözülme yönteminin, çapraz bağlayıcılar olarak hidrojen bağları olan bir polimerik ağ oluşturmak için etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Huang vd., 2016; Bijpai, Saini, 2006). Daha düşük bir donma sıcaklığı, üretilen hidrojelin daha yüksek mukavemeti için daha fazla ve daha yoğun hidrojen bağına yol açacaktır.

Deneyel olarak, saf PVA hidrojelinin, PVA makromolekül zincirleri tarafından oluşturulan polimerik ağın oluşturulmasında sınırlı sayıda çapraz bağlayıcıya atfedilebilecek döngüsel donma çözme işleminden sonra nispeten zayıf mekanik performansa sahip olduğu bulunmuştur (Juan, Suo ve Deng, 2010). Bu durum, PVA jelinin kısıtlı uygulanmasına yol açar. Bu nedenle PVA, daha iyi mekanik performans formüle etmek için genellikle başka bir makromolekül polimer ile birleştirmeyi gerektirir (Holloway, Lowman, VanLandingham ve Giuseppe, 2013). Örneğin, kimyasal formülü $HO-(CH_2-CH_2-O)_n-H$ olan polietilen glikol (PEG) ile birleştirilmiş PVA hibriti, çapraz bağlanan hidrojen bağlarının oluşumu sırasında kutup gruplarının varlığını açıkça gösterir.

PEG, toksik olmaması, tahriş edici olmaması ve immünojenik olması, iyi biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu olması ve suda ve birçok organik çözücüde (etanol, aseton vb.) çözünmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir (Calles, Tartara, Lopez-Garcia, Diebold ve Palma, 2013; Ye, vd., 2016). Ek olarak, işleme açısından PEG, mükemmel yağlama, nemlendirme, dispersiyon, bağlama ve antistatik elektrik özelliklerine sahiptir. Bu durum böyle bir polimerin farmasötik ve biyomühendislik alanlarında kullanım için iyi bir aday malzeme olduğunu gösterir (Mero ve Campisi, 2012). PVA'ya benzer şekilde, saf PEG jeli, su emerek şişmesi durumunda nispeten zayıf mekanik mukavemet gösterir. Biyoyumlu materyaller geliştirmek için PEG molekülleri ile aşılınmış PVA'nın oluşan zengin hidroksil grubu içeriği kullanılarak jel formatında bir polimerik ağ oluşturmak arzu edilir (Yin vd., 2016).

2.4. Tannik Asit

Tannik asit (TA), bitkilerden elde edilen, uygun maliyetli, doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Beş pirogallol grubu ve beş katekol grubundan oluşur ve diğer malzemelerle hidrojen bağı, iyonik bağı, koordinasyon ve hidrofobik etkileşimler gibi çok yönlü

etkileşimler yapabilir. Sonuç olarak, çeşitli yüzeylere güçlü bir şekilde yapışır. Son zamanlarda TA, mükemmel antioksidan, antibakteriyel ve antijen aktiviteleri gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları nedeniyle çeşitli alanlarda uygulama için aktif olarak incelenmiştir (Gwak, Hong, Seok ve Su, 2021). Bununla birlikte, son zamanlarda, tannik asidin proteinler ve DNA gibi hemen hemen tüm biyopolimerlere bağlandığı ve moleküler bir yapıştırıcı olarak büyük ilgi gördüğü ortaya çıktı (Lee, Cho, Kim ve Kim, 2022).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

| | |
|---|-------------------------|
| Dinamik yorulma test cihazı | Utest UTM 9000(USA) |
| Doku takip cihazı | Leica(Germany) |
| Elisa mikropılaka okuyucu | Allshange(USA) |
| Etüv | ElektroMag(Turkey) |
| Floresan ataçmanlı araştırma mikroskopu | Leica(Germany) |
| Hassas terazi | Mettler toledo(USA) |
| Hücre sayım cihazı | Invitrogen(USA) |
| Isıtıcılı manyetik karıştırıcı | Heidolph-MRHei(Germany) |
| Işık mikroskopu | Olympus(Japanese) |
| Karbondioksitli inkübatör | Binder(Germany) |
| Laminar flow kabin | ESCO(USA) |
| Mikrotom | ThermoScientific(USA) |
| Otoklav | Hirayama(Japanese) |
| Parafin dispenser | Leica(Germany) |
| Parafin su banyosu | APEX |
| pH-metre | Mettler toledo(USA) |
| Rotary Evaporatör | Heidolph 4000(Germany) |
| Sogutmalı santrifüj | Nüve, SF-400(Turkey) |
| Xcelligence-RTCA | Roche(Germany) |

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarflar

PVA (Sigma, Germany), PEG (Sigma, Germany), EDC (Sigma aldrich, Germany), NHS (Sigma aldrich, Germany), TA (Sigma aldrich, Germany), L-Dopa (Sigma aldrich, Germany), ZnCl₂ (Merck, Germany), sodyum karbonat (Merck, Germany), PBS (Biological industries, USA), SF (Polifarma, Turkey), MTT (Serva, Israel), ribonükleaz A (Serva, Israil), propidium iodid (Serva, Israel), hoechst 33342 (Serva, Israel), mitomisin C (Serva, Israel), sitokalazin B (Serva, Israel), KCl (75 mM; Biological industries, USA), methanol (Sigma, Germany), glasiyal asetik asit (Kimetsan, Turkey), giemsa (Merk, Germany), S9 enzimi (Corning, USA), ksilazinhidroklorür (Bayer AG, Leverkusen, Germany), ketamin (Ketalar Parke Davis, Eczacıbaşı), formaldehit (Birpa, Turkey), hematoksilen (Bio optica, Italy), eozin (Beslab, Turkey), serolojik steril pipet (Corning, USA), steril santrifüj tüpü (Corning, USA), 6-48-96 kuyucuklu hücre kültürü plate (Corning, USA), lam (microcult, Turkey), lamel (Laborant, Turkey).

3.1.3. Kullanılan hücre hatları

İn vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılan: L929 fibroblast hücresi (Mus musculus, fibroblast) ve CHO (Çin Hemstir Ovaryum) epitel hücresi; antimikrobiyal çalışmalarında kullanılan: *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922 mikroorganizmaları ATCC firmasından temin edilmiştir.

3.1.4. Besiyeri ve çözeltiler

DMEM (Biological industries, USA), MEM (Biological industries, USA), fetal bovine serum (Biological industries, USA), penicillin streptomisin (Biological industries, USA), tripsin EDTA solution C (Biological industries, USA). Tez kapsamında kullanılan besiyeri ve çözeltilerin, hazırlanması aşağıda anlatıldığı gibidir.

3.1.4.1. Besiyerleri

DMEM besiyerine, %1 penisilin streptomisin, %10 fetal bovine serum eklenerek besiyeri hazırlandı ve L929 fibroblast hücre hattı için *in vitro* çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı.

MEM besiyerine, %1 penisilin-streptomisin, %10 fetal bovine serum eklenerek besiyeri hazırlandı ve CHO epitel hücre hattı için çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı.

3.1.4.2. Çözeltiler

- MTT, Serva marka kit 1 mg/mL olacak şekilde fenol kırmızısı içermeyen DMEM içerisinde çözünerek uygulama günü taze olarak hazırlanmıştır.
- İkili boyama solüsyonu, 10 mL PBS içerisinde, Ribonükleaz A'dan (Serva, İsrail) 100 µL, propodium iodide (Life technologies, USA) 100 µL, Hoechst 33342 (Santa cruz) 500 µL olacak şekilde hazırlandı.
- 0,075 M KCL hipotonik solüsyonu hazırlamak için 1,397 g toz KCL tartularak 250 mL steril distile su içinde çözülerek hazırlandı.
- Metanol:glasial asetik asit, 3:1 oranında metanol ve glasial asetik asitin karıştırılması ile hazırlanmıştır.
- Mitomisin C solüsyonu, 10 ml PBS içerisinde 0,1 mg Mit-C çözülerek hazırlandı.
- Sitokalazin B solüsyonu, 1 mg üzerine 1 mL PBS ile karıştırılarak hazırlandı.

3.1.5. Deney Hayvanları

İn vivo çalışmalarda kullanılan deney hayvanları, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 24/11/2021 toplantı tarihli, 45 nolu karar ile etik onay alındıktan sonra, Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.2. Deneysel Yöntemler

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca üç aşamadan oluşmaktadır. (1) doku yapıştırıcısının hazırlanarak, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmiştir, (2) hazırlanan doku yapıştırıcısının *in vitro* testleri yapılmıştır, (3) hazırlanan doku yapıştırıcısının *in vivo* hayvan deneyleri yapılmıştır.

3.2.1. Doku Yapıştırıcısının Hazırlanması

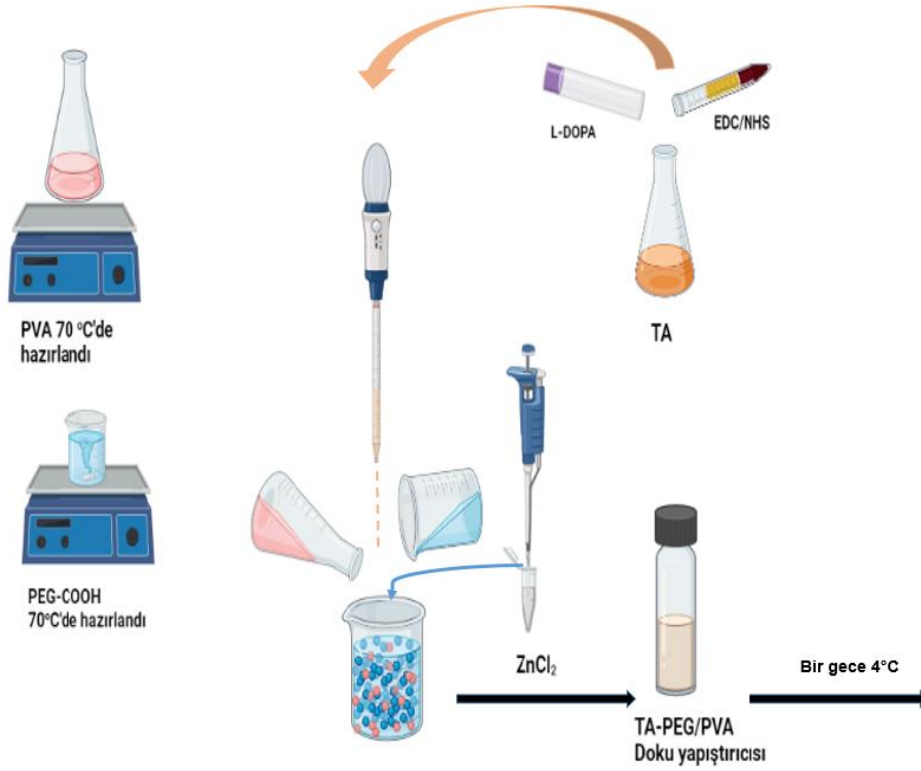
TA/PEG-PVA bazlı doku yapıştırıcısı hazırlamak için öncelikle PEG polimeri zincirlerinin OH gruplarına karboksilik (COOH) grupları eklenmiştir. Çünkü bir moleküle PEG'nin bağlanabilmesi için bir veya iki terminalinde de fonksiyonel grup içermesi gerekmektedir. Fonksiyonel grup, molekülde bulunan ve PEG ile birleşecek uygun reaktif grubun tipine göre seçilmiştir.

3.2.1.1. PEG Zincirlerinin Uç Gruplarının Karboksilik Asite Dönüştürülmesi

PEG (Polietilen glikol), öncelikle Na₂CO₃ (Sodyum karbonat) (0,3 g; 5 mL saf su) ile birlikte saf suda çözüldü. KMnO₄ (Potasyumpermanganat) 90 mL saf suda 4,2 gram tartılıp 10 dk karıştırılarak çözüldü. PEG karışımına eklendi, 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. 1000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek çöktürme işlemi yapıldı. Süspanse sıvı alınarak evaporatörde 60 °C de suyu uçuruldu. 4,5 mL eter ile 0,5 mL H₂SO₄ karıştırılarak PEG’li karışıma eklendi.

3.2.1.2. TA-PEG/PVA Bazlı Doku Yapıştırıcısının Hazırlanması

Polimerleşmenin sağlanması için önce hazırlanan PEG ve PVP karışımlarının karışması sağlandı. PEG-COOH, 5 mL’de % 5 oranında olacak şekilde saf su içerisinde hazırlandı. Ardından PVA tartılarak, 5 mL’de % 5 oranında olacak şekilde saf su içerisinde 70 °C’ de yaklaşık 30 dk karıştırılarak hazırlandı. Doku yapıştırıcısının ana bileşenleri olana PEG ve PVA birleşerek matris ağı benzeri özellik sağlarken, TA’in yapısında bulunması ise matris-doku bağlanması için çapraz bağlama maddesi işlevi görür. Bu nedenle çapraz bağlayıcı olarak kullanılması planlanan TA; OH zincir uç gruplarına amin grupları eklemek amacıyla EDC/NHS çözültisi ile muamele edilmiştir. Bu işlem için 0,1 M EDC ile 0,1 M hazırlanan NHS, 1:1 oranında karıştırıldı. 0,02M Tannik asit(TA) saf suda çözdürüldü. TA ile EDC/NHS karışımları etkileşime alınarak karışması sağlandı. 0,02 M olarak hazırlanan L-dopa doku yapıştırıcısında jelleşmeyi ve yapışma mukavemetini artırmak için önce TA-EDC/NHS ile 9:1 oranlarında karıştırıldı. 5 mL PEG-PVA karışımına, TA-EDC/NHS-L-Dopa, 2 mL olarak aynı anda eklendi. Karışıma 0,2 M ZnCl₂ (Çinko klorür) eklendi. pH ayarı için 0,5 M sodyum bikarbonat eklendi. Hazırlanan jel 10 dk oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra +4 °C bir gece bekletildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. TA-PEG/PVA bazlı doku yapıştırıcısının hazırlanması

3.2.2. Doku Yapıştırıcısının Yapısal Özelliklerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen TA-PEG/PVA bazlı doku yapıştırıcısının yapısal karakterizasyonu FT-IR Spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrumlar, FT-IR spektrometre cihazı ile 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedildi.

3.2.3. İn Vitro Hücre Kültür Sisteminde Doku Yapıştırıcısının Biyouyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi Testleri

3.2.3.1. İn vitro Sitotoksisite Testi (MTT)

Hücre Kültürünün Hazırlığı

- Kriyotüplerde dondurma çözeltisi (%20 Fetal Sığır Serum, MEM (Sodyum bikarbonatla tamponlanmış), %7-10 DMSO) içerisinde bulunan memeli fibroblast L929 hücre hattı 37 °C sıcaklıkta hızlıca çözdürüldü.
- Kriyotüpte süspansiyon halinde bulunan hücreler mikropipet kullanılarak santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Santrifüj tüpündeki miktarın 3-4 katı kadar DMEM besiyeri ilave edildi.

- 200g, 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantı aspire edildi.
- Pelleti santrifüj tüpünün dip kısmına parmakla vurarak dağıtıldı.
- Tüpün dip kısmında dağılan pelletin üzerine 5-10 mL L-glutaminli DMEM besiyeri ilave edildi. Hücreler 75 cm²'lik flasklara yayıldı.

Hücrelerin 1x10⁴ hücre/mL Konsantrasyonda Hazırlanması ve MTT Yöntemi

- Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında, hücre sayım işlemi ve konsantrasyon ayarlaması yapıldı.
- Monolayer tabakanın üzerindeki besiyerini aspire edildi. 2-4 mL 1X PBS (Fosfat tamponu) ile dikkatlice yıkandı.
- Hücreleri petri yüzeyinden ve birbirlerinden ayırmak için petri kabına 2-3 mL Trypsin/EDTA eklendi.
- Hücreleri 6 dakika nemli atmosferde 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.
- Hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop altında kontrol edildi.
- İnkübasyon sonunda santrifüj tüpüne hücre süspansiyonu aktarıldı.
- Üzerine Tripsin/EDTA'yı aktive etmek için süspansiyon haldeki hücrelerin 2-3 katı L-glutaminli DMEM besiyeri ilave edildi.
- Santrifüj edildi (200g, 3 dakika).
- Süpernatant aspire edildi.
- Pellet santrifüj tüpünün dip kısmına parmakla vurarak dağıtıldı.
- Tüpün dip kısmında dağılan pelletin üzerine 1 mL L-glutaminli DMEM besiyeri ilave edildi.
- Pelleti 1 mL besiyeri içinde homojen olarak dağıtıldı.
- Çözülmüş haldeki hücreden 10 µL alınıp, 10 µL tripan mavisi ile epondorf tüpünde karıştırıldı.

- Karışımdan 10 µL alınarak hemosistometre lamına konuldu. Hücre sayım cihazında (Invitrogen (USA)) sayıldı.
- 96 kuyulu hücre kültür kabının her kuyusuna 100µL (1×10^4 cell/well) hücre süspansiyonu konuldu. 24 saat boyunca 37 °C de %5 CO₂ de inkübe edildi.

24 saat inkübasyonun ardından hücelere uygulama yapmak için; 1:1 olacak şekilde 2X DMEM ile hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı en yüksek dozdan başlanarak seri dilüsyon yapılarak hücelere eklendi. 24 saat inkübatörde inkübe edildi. 24 saat inkübasyonun ardından sıvı kısım çekip atıldı. 50 µL MTT solüsyonu (1mg/mL) her bir kuyuya eklendi. 2 saat inkübasyonun ardından 100 µL izopropil alkol eklendi. 570 nm de mikropilaka okuyucu da (Allshange) okutuldu.

MTT sonucu elde edilen absorbanans verileri kullanılarak istatistiksel değerlendirme F testi kullanılarak yapıldı.

3.2.3.2. Agar Difüzyon Testi

Test, “TS EN ISO 7405/6.2-Agar Difüzyon Testi ” standardına göre uygulandı.6 kuyulu plakalara 20×10^4 kuyu/hücre olacak şekilde L929 fibroblast hücreleri ekildi. 24 saat inkübe edilerek % 80 konfluensi sağlandı. 24 saat sonunda hücreler üzerindeki vasat atıldı, hücrelerin üzerine taze besiyeri ile birebir karıştırılmış % 3'lük Noble-Agar besiyerinden ilave edildi. Daha sonra hücreler, % 1 olarak hazırlanan neutral red boyası ile 20 dk oda sıcaklığında hücrelerin boyanması için bekletildi. Ardından TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı tam konsantrasyonu, negatif kontrol olarak DMEM ve pozitif kontrol olarak lateks ekstraktları 1 mm disk üzerine emdirilerek kuyular üzerinde tam ortaya gelecek şekilde hücreler üzerine bırakıldı. 6 kuyulu plaka hiç ışık görmeyecek şekilde kapatıldı. 24 saat süresince inkübe edildi. Süreç sonunda kuyular üzerinden diskler pens yardımı ile dikkatli şekilde alındı. 1X PBS ile yıkandı ve zon çapları ölçüldü, renk açılmaları ve hücre morfolojileri inverted mikroskop kullanılarak değerlendirmesi yapıldı (Çizelge 3.1).

Nitel değerlendirme, TS EN ISO 7405 standardında bulunan Çizelge 3.1. ve 3.2.'ye göre yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinin ardından elde edilen puan Çizelge 3.3'de verilen şekilde yorumlandı.

Çizelge 3.1. Dekolarizasyon İndeksi

| Dekolarizasyon indeksi | Açıklama |
|------------------------|---|
| 0 | Numune etrafında veya altında saptanabilir renksiz zon yok |
| 1 | Renksiz zon numunenin altındaki alanla sınırlıdır |
| 2 | Renksiz zon numunenin 0,5 cm ilerisine kadar uzanır |
| 3 | Renksiz zon numunenin 0,5 cm ila 1,0 cm ilerisine kadar uzanır |
| 4 | Renksiz zon numunenin 1,0 cm'den daha ilerisine kadar uzanır,ancak petrinin tamamını kaplamaz |
| 5 | Renksiz zon petrinin tamamını kapsar |

Çizelge 3.2. Lizis İndeksi

| Lizis indeksi | Açıklama |
|---------------|---|
| 0 | Gözlenebilir sitotoksisite yok |
| 1 | Renksiz zonun <%20'si etkilenmiştir |
| 2 | Renksiz zonun <%20 ila <%40'ı etkilenmiştir |
| 3 | Renksiz zonun <%40 ila <%60'ı etkilenmiştir |
| 4 | Renksiz zonun <%60 ila <%80'ı etkilenmiştir |
| 5 | Renksiz zonun >%80'i etkilenmiştir. |

Çizelge 3.3. Hücre cevabı (dekolarizasyon indeksi ve lizis indeksi için ayrı ayrı derecelendirilmiş) ve sitotoksisitenin yorumlanması

| Ölçek | Hücre cevabı | Açıklama |
|-------|--------------|------------------------|
| 0 | 0 | Sitotoksik değil |
| 1 | 1 | Hafif sitotoksik |
| 2 | 2-3 | Orta derece sitotoksik |
| 3 | 4-5 | Aşırı sitotoksik |

3.2.3.3. Apoptoz-Nekroz Testi

İkili boyama (double staining) uygulaması için 48 well plate kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan L929 fibroblast hücrelerini (An2 Mouse C3/ An connective tissue) flasktan kaldırmak için vasat atıldı ve flask PBS (1X) ile yıkandı. Ardından hücreler üzerine kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskopta gözlendi ve taze besiyeri eklenip karıştırıldıktan sonra hücreler falkon tüpe aktarıldı. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 200g'de, 3 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant atıldı falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1 mL taze besiyeri ile homojen şekilde dağıtıldı.

Süspanse edilen karışımdan 10 µL alınıp, üzerine 10 µL tripan mavisini eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µL alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. Tripanblue (tripan mavisini) ile sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 kuyulu plakaya ekildi. Hücreler 37°C

sıcaklıkta hacimsel olarak da %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 1:1 olacak şekilde 2x DMEM ile karıştırılan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı belirli dozlarla hazırlanarak hücrelere eklendi. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks eldiven ekstresi, negatif kontrol için sadece DMEM konuldu. 37°C sıcaklıkta hacimsel olarak %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Her kuyuya taze hazırlanmış olan ikili boyama solüsyonundan 70µL eklendi. Işık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılan plaka 20 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi kullanılarak (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

3.2.3.4. İn vitro Genotoksisite Testi (Mikronükleus Testi)

Genotoksisite Mikronükleus (MN) Testi OECD 487 kılavuzuna uygun olarak yapıldı. Hücre kültüründe çoğaltılan CHO hücreleri her bir kuyuda 20x10³ olacak şekilde 48 kuyulu plakalara ekilip 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyonun ardından kuyulardaki vasatlar atılarak taze besiyeri ilave edildi, besi ortamına 1:1 olacak şekilde 2X DMEM ile karıştırılarak hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı 1:16 seyreltilmiş dozda eklendi. Kuyuların bir kısmına pozitif kontrol için mitomicin-C, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. İnkübasyon metabolik aktivasyon varlığında (S9 karaciğer enzimi) 3 saat ve uzun süreli 24 saat uygulandı.

Mikronükleus testi için hazırlanan kültür ortamlarına inkübasyonun 44. saatinde binükleuslu hücreler elde etmek amacıyla 3µg/mL Sitokalazin-B ilave edildi. 72. saatte kuyulardaki vasatlar atıldı hücrelerin şişerek parçalanmalarını ve kromozomların birbirlerinden ayrılmalarını sağlamak amacıyla iki farklı fiksasyon yapıldı. Birinci fiksasyonda, 15 dk süresince inkübatörde 0,075 M KCl hipotonik solüsyonu ile inkübe edildi. İkinci fiksasyon da ise; inkübasyon sonunda hipotonik solüsyon ile açılmış olan metafaz plakalarının belirlenmesi amacıyla, taze hazırlanan metanol:glasiyelasetik asit ile fikse edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada binükleuslu hücrelerin görüntülenmesi için 70 µL giemsa boyası damlatılarak 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1X PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. İverted mikroskopta mikronükleuslu, binükleuslu ve çok nükleuslu hücrelerin değerlendirilmesi ve sayımı yapıldı. Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak analiz edilmesi için SPSS:16.0 paket programı

kullanıldı, kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde bağımsız örneklem T testi uygulandı.

3.2.3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Xcelligence RTCA) hücrelerin fizyolojik durumuna bağlı olarak hücre çoğalmasının, canlılığının ve sitotoksitenin değerlendirilmesini sağlar. L929 fibroblast hücreleri, altın kaplı e-plakaya ekim işleminden önce RTCA-SP analiz sistemi, 37 °C sıcaklıkta hacimsel olarak % 5 CO₂ içeren ve % 95 nem içeren inkübatöre yerleştirildi. 96 kuyucuklu altın kaplı e-plate üzerindeki her bir kuyuya 5x10³kuyu/hücre olacak şekilde L929 fibroblast hücreleri ekildi. 24 saat süre ile L929 fibroblast hücreleri 37 °C'de inkübe edilirken RTCA-SP sistemine bağlı olarak proliferasyonu takip edildi. İnkübasyonun 24. saatinde cihaz durduruldu, e-plate üzerinden vasat atıldı, kuyulara 100 µL besiyeri, ilave edildi. Uygulama öncesinde 1:1 olacak şekilde 2X DMEM ile karıştırılan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısından tek konsantrasyonda 20 µL olarak 3 tekrarlı hücelere uygulandı. Negatif kontrol olarak hücre+besiyeri, pozitif kontrol olarak % 20 DMSO eklendi. 96 saat süre ile kültürü yapılıp ve 10 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alındı. Süre sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edildi.

3.2.3.6. İn vitro Yara İyileşmesi

L929 hücreleri rutin hücre açma ve çoğaltma prosedürleri uygulandıktan sonra hücre sayımı gerçekleştirildi ve kuyu başına 5x10⁵ kuyu/hücre olacak şekilde 6 well-plate üzerine ekildi. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaşana kadar inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyonun ardından kuyuların ortasına 1000 µL'lik pipet ucuyla düz bir çizik çekildi ve böylece standart yara modeli oluşturulmuş oldu. Yara yüzeyinin oluşturulmasıyla oluşan yüzeyden kalkan hücreleri uzaklaştırmak için her kuyucuk iki kez 500 µL PBS ile yıkandı. 1:1 olacak şekilde 2X DMEM ile karıştırılarak hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcı özütlerinden tekkonsantrasyondan 3 tekrarlı olarak uygulama yapıldı. İşlem sonrası yara modelindeki kapanma miktarı 0, 24, 48 ve 72. saatlerde inverted mikroskopta ile 10x büyütmede gözlemlendi ve fotoğraflandı.

3.2.3.7. Hemolitik Etki Testi

Hemoglobin tayini

Hemoglobin tayini için Drabkins yöntemini kullanarak bir hemoglobin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu amaçla hazır olarak alınan hemoglobin kalibratörü ile standarda uygun 0,02-0,8 mg/mL arasında dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlar 540 nm de okutuldu. Y ekseninde hemoglobin konsantrasyonu (mg/mL) ve x ekseninde A540 nm de okutulan absorbans değerlerinden bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon katsayısı (F), bu grafiğin eğimidir. Y-kesme noktası yaklaşık olarak sıfır olmalıdır.

Kan örneklerinin toplanması ve hazırlanması

En az üç donörden alınan tavşan kanı EDTA'lı pıhtılaşma önleyici tüplere eşit hacimde en az 3 mL olacak şekilde alındı.

TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısından özütünün hazırlanması

TS EN ISO 10993-12 standardına uygun olacak şekilde kalsiyum/magnezyum içermeyen PBS kullanılarak kimyasal olarak tepkimesiz kapalı kaplarda özütleme işlemi yapıldı. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısından elde edilen özütü 3 tekrarlı, 7'şer mL olacak şekilde kan ile etkileşimi öncesi oda sıcaklığında hazır hale getirildi. Negatif kontrol maddesi olarak PBS, pozitif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

Plazma Serbest Hemoglobin(PSH) Tayini

Üç donörden alınan kan eşit hacimde karıştırıldı ve kanın 3 mL'lik bir miktarı 700-800 G'de 15 dakika santrifüjlenir. Drabkins solüsyonu ile santrifüj sonrası plazma 1:1 seyreltilir. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 540 nm'de elde edilen çözeltinin absorbansı okutuldu. Standart eğriden elde edilen F değeri ile plazma hemoglobin oranı hesaplandı. Plazma serbest hemoglobin (mg/mL) şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Plazma Serbest Hemoglobin(PSH)} = A^{\text{PSH}} \times F \times 2$$

Toplam Kan Hemoglobin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

5 mL Drabkin's solüsyonuna 20 µL iyi karıştırılmış tam kan örneği eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi ardından solüsyonun absorbansı 540 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu. Elde edilen absorbans değerleri ile hemoglobin konsantrasyonundan elde edilen F değeri ve kanın dilüsyon faktörü ile toplam kan hemoglobin konsantrasyonu hesaplanır:

Toplam Kan Hemoglobin Konsantrasyonu (C)= $A^C \times F \times 251$

Elde edilen sonuç 10 ± 1 olarak bulunmalıdır. Bu değer bulunana kadar tam kanın 1X PBS ile seyreltme işlemi yapıldı.

Doku yapıştırıcısı özütünü içeren her tüpe, negatif ve pozitif kontrollerin özütünü içeren her tüpe tam kan hemoglobin konsantrasyonu 10 ± 1 olarak dilue edilmiş kandan 1 mL eklendi. Tüm tüplerin kapakları kapatıldı. Tüpler etüvde $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 3 saat uygun bir test tüpü rafında tutuldu. Kan ve materyalin temasını sürdürmek için her tüp her 30 dakikada bir kez yavaşça ters çevirildi. İnkübasyon süresinin sonunda, tüpler santrifüjde 800 G'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice alındı ve ikinci bir tüpe aktarıldı. Süpernatanda herhangi bir rengin varlığı, berraklığı, bulanıklığı kaydedildi. Aşağıdaki hesaplama yöntemi kullanılarak %hemoliz değeri hesaplandı:

$$\% \text{ Hemoliz} = \frac{\text{Supernatant hemoglobin konsantrasyonu} \times 100 \%}{\text{Total hemoglobin konsantrasyonu}}$$

3.2.4. Antimikrobiyel Etkinlik Testi

Test yöntemi ASTM E 2149-13a ya göre planlandı ve revize edilerek uygulandı. Test için E. coli ATCC 25922 gram negatif suşu, S. aureus ATCC 25923 gram pozitif suşlarının 24 saatlik taze kültüründen Tryptic Soy Broth besiyerine ekim yapıldı. 18-24 saatlik taze suşlarından üreme sonucunda 10^8 mikroorganizma elde edildi (475 nm 0,28).

Hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısından 1 mL alınıp 50 mL 10^8 bakteri suşu içeren petri ortamına aktarıldı. Hazırlanan tüm malzemeler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm hızda 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda önceden hazırlanmış olan plate count agar besiyerine ekimi gerçekleştirildi. Ekimi yapılmış olan tüm petriler 37°C de 1 gece inkübasyona bırakıldı. 24 sonunda yapılan ekimlerin koloni sayımları yapıldı cfu/mL oranları tespit edildi. Pozitif kontrol için: doku yapıştırıcısı olmayan E. coli, S. aureus kültürleri plakaya uygulandı.

3.2.5. İn Vivo Hayvan Deneylerinde Biyouyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi Testleri

3.2.5.1. Deri Sensitizasyon testi (TS 10993-10)

Deri sensitizasyon testi TS EN ISO 10993-10:2014, TS EN ISO 10993-2:2006 ve TS EN ISO 10993-12 standartlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Deri sensitizasyon testi

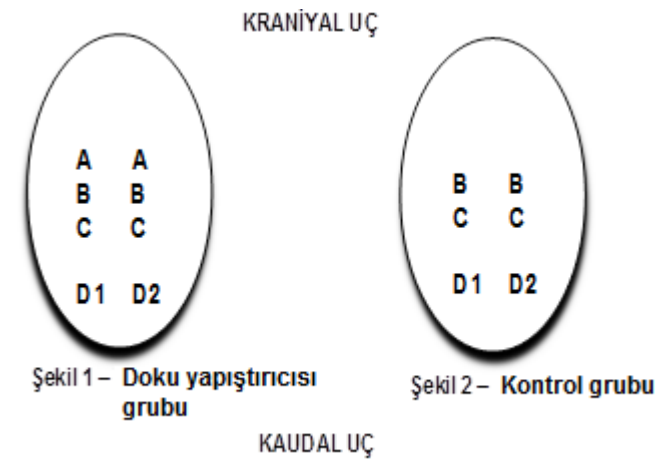
(Guinea pig maksimizasyon deneyi), tıbbi cihazlardan salınan cilt ve mukoza tahrişi veya cilt duyarlılığı oluşturabilen kimyasal maddelerin temas yoluyla oluşturdukları muhtemel tehlikeleri değerlendirir.

Çalışmada, konvansiyonel yöntemlerle yetiştirilen yaklaşık 300-500 g ağırlığında, 10-12 haftalık, 12 adet erkek Kobay kullanıldı. Tüm kobaylar, oda sıcaklığında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), % 30-70 nemli ortamda ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde deney hayvanları kafes sistemlerinde muhafaza edilerek, *ad libitum* beslendi.

Çalışma 2 ayrı grup şeklinde planlandı. Gruplar; test grubu ve kontrol grubu şeklinde adlandırıldı. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütleri verilen test grubunda 6 adet, kontrol grubunda 6 adet olmak üzere toplam 12 adet erkek kobay kullanıldı. Deneyden yaklaşık 24 saat öncesinde, omurganın her iki tarafında özütlerin enjeksiyonu için yeterince mesafe bırakacak şekilde hayvanların sırt tüyleri dibinden traşlandı. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı jel formunda olduğu için direkt yöntem kullanılarak hayvanlara uygulanamamıştır. TS EN ISO 10993-12 standardına göre 1:1 olacak şekilde serum fizyolojik ile karıştırılarak özütü hazırlandı. Deney 3 aşamada gerçekleştirildi ve bu aşamalar aşağıda anlatıldı.

Deri İçi İndükleme Fazı

Doku yapıştırıcısı özütleri 0,1 mL olarak, her bir hayvana Şekil 3.2. de gösterildiği gibi intraskapuler bölgede enjeksiyon yerlerinden (Şekil 3.2. A, B ve C bölgeleri) deri içi olarak enjekte edildi.



Şekil 3.2. Deri içi enjeksiyon bölgeleri

0,1 mL deri içi uygulamalar aşağıdaki içeriklerle yapılmıştır:

TA-PEG/PVA Doku yapıştırıcısı grubu (Test grubu):

Bölge A: 50:50 hacim oranında FCA (Freund's Complete Adjuvant) ve Serum fizyolojik.

Bölge B: TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütü (Seyreltilmemiş özüt).

Bölge C: 50:50 hacim oranında A ve B bölgelerinde uygulanan materyallerin karışımları.

Bölge D1 ve D2: Topikal uygulama alanları.

Kontrol grubu:

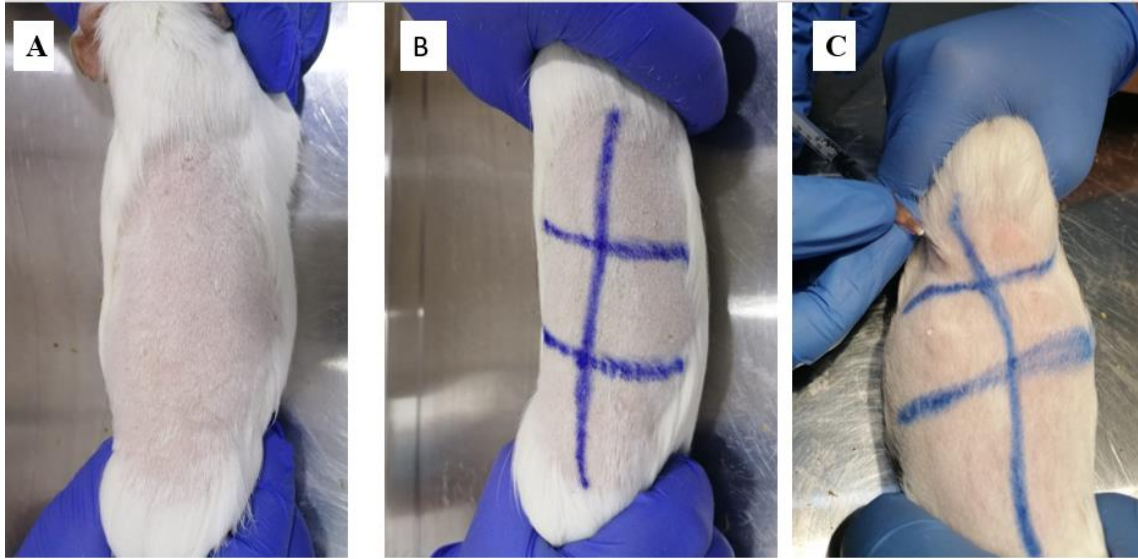
Bölge A: Uygulama yapılmaz.

Bölge B: Serum fizyolojik.

Bölge C: 50:50 hacim oranında FCA (Freund's Complete Adjuvant) ve Serum fizyolojik.

Bölge D1 ve D2: Topikal uygulama alanları.

Intradermal indüksiyon fazı test grubu uygulama aşamaları Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Deri sensitizasyon testi A) Test grubu uygulama öncesi traşlanmış hali B) Test grubu enjeksiyon bölgelerinin işaretlenerek ayrılmış hali C) Test grubu ilk enjeksiyon.

Yüzeysel İndükleme Fazı

Deri içi indükleme fazının tamamlanmasından 7 gün sonra TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı, deri içi enjeksiyon yerlerini kapatacak şekilde 8 cm²'lik bir yama alanı (filtre kağıdı veya emici gazlı bez) kullanılarak her bir hayvanın intraskapuler bölgesine yüzeysel olarak uygulandı. Şekil 3.2.'de gösterilen Bölge B yeri için uygulanan özüt

uygulandı. Deri içi indüklenme fazında, ilgili bölge, yama uygulanmadan 24 saat önce deriye ovuşturularak yedirilen %10'luk sodyum dodesil sülfat ile ön muameleye tabi tutuldu. Yamalar kapatıcı sargı bezi ile tutturuldu. Sargı ve yamalar 48 saat sonra çıkarıldı. Benzer şekilde kontrol hayvanlarına sadece kör sıvı (%0,9 NaCl) uygulandı.

Uyarım Fazı

Topikal indüklenme fazının tamamlanmasından 14 gün sonra, bütün test gruplarındaki hayvanlara Şekil 3.2.'deki Bölge C yeri için uygulanan özütler bir yamaya emdirilerek hazırlandı. Her bir hayvanın yan üst kısmı gibi muamele edilmeyen yerlerine topikal olarak bu yamalar uygulandı. Yamalar kapatıcı sargı ile tutturuldu. Sargı ve yamalar 24 saat sonra çıkartıldı.

Enjeksiyondan (24±2) saat ve (48±2) saat sonunda eritem ve ödem için cilt reaksiyonları, her bir uyarım yeri için Çizelge3.4.'de belirtilen Magnusson ve Kligman derecelendirilmesine göre derecelendirildi.

Çizelge 3.4. Magnusson ve Kligman derecelendirme ölçeği

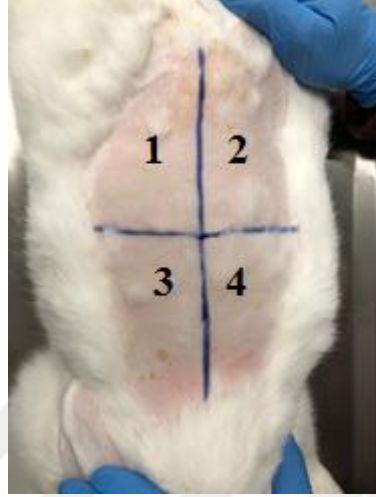
| Yama Deneyi Reaksiyonu | Derecelendirme Ölçeği |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Görülür bir değişim yok | 0 |
| Ayrık veya yamalı eritem | 1 |
| Orta derecede veya bitişik eritem | 2 |
| Belirgin | 3 |
| Ciddi eritem veya şişme | 4 |

3.2.5.2. Dermal İrritasyon testi (TS 10993-23)

Çalışmada, konvansiyonel yöntemlerle yetiştirilen yaklaşık 2000-2500 g ağırlığında, genç erişkin, erkek Yeni Zellenda tavşanı kullanıldı. Tüm tavşanlar, oda sıcaklığında (18±3°C), % 30-70 nemli ortamda ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde deney hayvanları kafes sistemlerinde muhafaza edilerek, *ad libitum* beslendi.

Çalışma da 3 adet erkek tavşan kullanıldı. Deneyden yaklaşık 24 saat önce, omurganın her iki tarafında özütlerin uygulanması için yeterince mesafe bırakacak şekilde hayvanların sırt tüyleri dibinden kırıldı. Herbir tavşanın sırtı 4 bölgeye ayrıldı. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütleri 1:1 oranında serum fizyolojik ile karıştırılarak

hazırlandı. Deney protokolünü takiben Şekil 3.4.'de gösterilen bölgelere 2,5 cm x 2,5 cm kesilerek hazırlanmış steril gazlı bezlere TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütleri, negatif kontrol amaçlı serum fizyolojik ve pozitif kontrol olarak SLS emdirildikten sonra her bir bölge ayrı ayrı üzerleri kapatıldıktan sonra tüm uygulama alanı bandaj ile sarıldı (Şekil 3.5). 4 saat sonra bandajlar çıkarıldı.



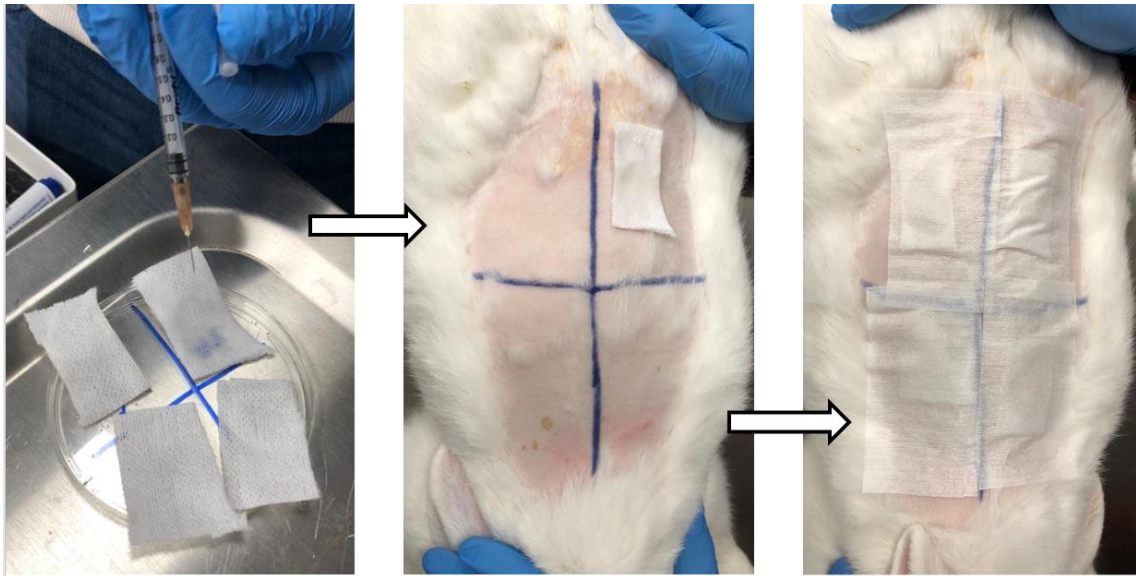
Şekil 3.4. Deri uygulama bölgeleri.

Bölge 1: Doku yapıştırıcısı özütü.

Bölge 2: Pozitif kontrol SLS

Bölge 3: Negatif kontrol olarak serum fizyolojik.

Bölge 4: Doku yapıştırıcısı özütü.



Şekil 3.5. Dermal irritasyon testi uygulama aşaması

İşlemin ardından 1. saat, 24. saat, 48. saat ve 72'nci saatlerde deney bölgeleri gözlemlendi ve Çizelge 3.5.'de belirtilen kriterler göz önüne alınarak örnekler değerlendirildi.

Çizelge 3.5. Deri reaksiyonu için skorlandırma sistemi (TS EN ISO 10993-23)

| Reaksiyon | Birincil tahriş skorlandırması |
|---|---------------------------------------|
| Eritem ve eskar oluşumu | |
| Eritem yok | 0 |
| Çok hafif eritem (zar zor görülebilir) | 1 |
| Belirgin eritem | 2 |
| Orta derecede eritem | 3 |
| Ciddi eritem (pancar gibi kırmızı) ile eritemin derecelendirmesini önleyen eskar oluşumu arasında | 4 |
| Ödem oluşumu | |
| Ödem yok | 0 |
| Çok hafif ödem | 1 |
| Belirgin ödem (belirgin ödem alanine kenarları) | 2 |
| Orta derece ödem (yaklaşık 1 mm kabarmış) | 3 |
| Ciddi ödem (1 mm'den daha fazla kabarmış ve maruz bırakılan alanine dışına yayılmış) | 4 |
| Tahriş için toplam muhtemel skor | 8 |
| Deri yerlerindeki diğer ters değişiklikler kaydedilmeli ve rapor edilmelidir. | |

Birincil tahriş skoru Çizelge 3.5.'de belirtildiği gibi hesaplanarak Çizelge 3.6. 'da belirtilen tahriş cevabı kategorileri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.6. Birincil veya kümülatif tahriş indeks kategorileri

| Ortalama skor | Cevap Kategorisi |
|----------------------|-------------------------|
| 0 - 0,4 | İhmal edilebilir |
| 0,5 - 1,9 | Hafif |
| 2 - 4,9 | Orta |
| 5 – 8 | Ciddi |

3.2.5.3. Subkronik Sistemik Toksikite Testi (TS EN ISO 10993-11)

Çalışmada, konvansiyonel yöntemlerle yetiştirilen 10-12 haftalık, yaklaşık 250-300 g ağırlığında Wistar Albino Rat kullanıldı. Tüm ratlar, oda sıcaklığında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), % 30-70 nemli ortamda ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde deney hayvanları kafes sistemlerinde muhafaza edilerek ve *ad libitum* beslendi.

Çalışma 2 ayrı grup şeklinde planlandı. Gruplar; TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı grubu ve kontrol grubu şeklinde adlandırıldı, her grupta her iki cinsiyetten eşit sayıda (5 adet dişi – 5 adet erkek) Wistar Albino Rat kullanıldı. Enjeksiyonlar 0. günde kas içi olarak 1 mL/kg intraperitoneal olarak uygulama yapıldı (Şekil 3.6). Hayvan refahı göz önünde bulundurularak enjeksiyon sonrası 3 günlük dinlenme şeklinde toplam 14 gün devam edildi. İlk enjeksiyon gününden itibaren sakrifikasyon gününe kadar yapılacak gözlem süresince hayvanlarda ölüm ve toksikasyon belirtileri kontrol edildi.



Şekil 3.6. İntraperitonealenjeksiyon yapılırken.

14 günlük çalışma da gözlem süresince günde bir kez olmak üzere her gün aşağıdaki parametreler takip edildi;

- Ölüm olup olmadığı kontrol edildi.
- Deri ve tüy yapısı kontrolü yapıldı.

- Genel göz muayenesi yapıldı.
- Salivasyon olup olmadığı (varsa kıvam ve şekli), genel durum ve çevre ilgisi kontrol edildi.

İlk enjeksiyon sonrası 14. gün kalp kanı alındıktan sonra hayvanlar sakrifiye edilerek grospatoloji yapıldı. Grospatoloji sırasında karaciğer ağırlığı ölçülerek Ağırlık/ Karaciğer indeksi hesaplandı.

Sakrifikasyon öncesi alınan kalp kanından hemogram ve serum biyokimyası analizleri yapıldı. Hemogram analizinde WBC-RBC-HGB-HCT-PLT-MCHC değerleri incelendi.

Grospatoloji sonrası %10'luk formaldehit içine alınan organlara (Beyin, Kalp, Akciğer, Karaciğer, Dalak, Mide, Over/Testis, Timus, Pankreas, Deri, Kas, Böbrek) hematoksilin eozin boyanarak histopatolojik inceleme yapıldı.

Nekropsi Ve Makroskopik Değerlendirme Aşamasi

Doku örnekleri 5 gün %10'luk formalin içerisinde bekletildi.

Doku Takibi İşlemi: Bekletme işlemini takiben doku örneği çeker ocak içerisinde uygun büyüklükte kesilerek ve üzerinde ismi yazılan doku takip kasetlerine koyularak su içerisine bırakıldı. Daha sonra doku örnekleri cam beher içine konularak minimum 2 saat akan su altında bekletildi.

Akan sudan alınan doku örnekleri doku takip cihazıyla aşağıdaki aşamalardan geçirildi:

- 5 dakika distile su (dH₂O),
- 5 dakika distile su (dH₂O),
- 5 dakika distile su (dH₂O),
- 30 dakika %70'lik etil alkol,
- 30 dakika %80'lik etil alkol,
- 30 dakika %96'lık etil alkol
- 30 dakika %100'lük etil alkol
- 30 dakika %100'lük etil alkol
- 30 dakika ksilol 1
- 30 dakika ksilol 2

- 65 °C parafin istasyonda 1 saat parafin içerisinde bekletilecektir.

Takibi tamamlanan dokular 60 °C etüve alındı. Doku örnekleri tek tek uygun kasetlerle birlikte parafin dispenser içerisinde erimiş olan parafin ile uygun gömme kaplarına gömüldü.

Kesit İşlemi: Gömülen dokuların parafini kurduktan sonra mikrotomla kesit alma işlemi yapıldı. Kesiti alınan doku örneği gerekli sayıda ve 5 µm olacak şekilde parafin su banyosuna alınarak ve parafin kırışıklığı/doku katlantıları giderilerek lam üzerine alındı.

Boyama İşlemi (Hematoksilen – Eozin): Lam üzerine alınan kesitler kurduktan sonra 2 saat olmak üzere 60-65 °C etüv içerisinde bekletildi. Daha sonra deparafinizasyon işlemi için 15'er dakikalık periyotlarla 3 kez ksilol içerisinde bekletildi. Bekletme işlemi takiben doku örnekleri azalan alkol serilerinde (%100-%96-%80-%70) çalkalanarak distile suya alınıp 2 dakika bekletildi. Distile sudan alınan doku örneklerinin suyu süzülerek 8 dakika hematoksilen içerisine bırakılarak bekletildi. Hematoksilenden alınan doku örnekleri 10 dakika boyunca akan suda bekletildi. Akan suda hematoksilenden arınan doku örnekleri 30 saniye boyunca Eozinde bekletildi. Eozin ile boyama işlemi tamamlandıktan sonra artan alkol serilerinde (%70-%80-%96-%100) çalkalanarak doku örnekleri fazla eozinden arındırılarak, 15'er dakikalık periyotlarla 3 kez ksilol içerisinde bekletildi. Ksilolden alınan doku örnekleri entellan ile kapatılarak mikroskopta incelendi.

3.2.5.4. Etkinlik Testi

Çalışmada konvansiyonel yöntemlerle yetiştirilen 10-12 haftalık, yaklaşık 250-300 g ağırlığında Wistar Albino Rat kullanıldı. Tüm ratlar, oda sıcaklığında (22±2°C), % 30-70 nemli ortamda ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde deney hayvanları kafes sistemlerinde muhafaza edilerek *ad libitum* beslendi.

Çalışma 3 ayrı grup şeklinde planlandı. Gruplar; TA-PEG/PVAdoku yapıştırıcısı grubu, Surgiseal stylus ticari doku yapıştırıcısı grubu ve kontrol grubu şeklinde adlandırıldı.

Etkinlik testi için; 21 adet erkek rat kullanıldı. Cerrahi prosedürler için anestezi intraperitoneal ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kullanıldı. Enfeksiyonu önlemek için amoksisilin (50 mg/kg intraperitoneal olarak) cerrahi işlemlerden 1 saat önce verildi. Hayvanların genel anesteziye alınmalarını takiben aseptik şartlarda, sırt bölgeleri tıraş edildi. Sırt-bel omurları çizgisinin her iki yanında ve bu çizgiye paralel

olacak şekilde yönlü, yaklaşık 2 cm uzunluğunda tüm deri katmanlarını içeren ensizyon yaraları oluşturuldu. Öncelikle yara kenarında oluşan ıslaklık sargı bezi kullanılarak giderildikten sonra yara dudakları elle karşı karşıya getirilme ve tek kat film tabakası halinde hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı uygulanarak, 15-20 sn süreyle polimerizasyonu beklendi. Deney hayvanları, deney boyunca tekli kafeslerde tutuldu. 14 gün boyunca her gün genel durumları gözlemlendi. 14 günün sonunda hayvanlar sakrifikasyon işlemi yapıldı. Hayvanlardan yara bölgelerinde kranial ve kaudalinden 4x2 ebatlı alanlardan mesafe bırakılarak deri dokusu alındı. Alınan deri parçalarından bir tanesi biyomekaniksel incelemeler için ayrılırken, bir tanesi hızlıca %10 luk formalin kaplarına alınarak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Histopatolojik inceleme süreçleri subkronik toksisite testinde anlatıldığı şekilde yapıldı. Boyama sonrası lamplar mikroskop altında incelendi.

Yara iyileşmesi sonrası biyomekaniksel değerlendirme

Biyomekaniksel incelemeler, Kırıkkale Üniversitesi Makine ve Malzeme Laboratuvarı'nda, yaraların kapanmasını takiben uygulanan ötenazi işleminin hemen sonrasında bekletilmeden yapıldı. İyileşme gözlenen yara bölgesinin kranial ve kaudalinden 4x2 ebatlı alanlar ölçülerek, hayvanlardan deri örneği alındı. Rezeksiyonu yapılan deri örnekleri steril fizyolojik tuzlu su içerisine konularak bekletilmeden laboratuvara götürüldü. Biyomekaniksel değerlendirme için Dinamik Yorulma Test Cihazı Utest (UTM 9000; USA) cihazından (Şekil 3.7) yararlanılmıştır. Cihazın üzerinde bulunan alt ve üst klempler, zıt yönde çalışarak aralarına yerleştirilen ürüne germe işlemi yapmaktadır. Cihaz, analiz sırasında elde edilen verileri dijital olarak bilgisayar sistemine aktarmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen deri dokusuna ait biyomekaniksel ölçümlerin tamamı aynı cihaz ve sistem üzerinden, yapılmıştır.



Şekil 3.7. Dinamik Yorulma Test Cihazı Utest (UTM 9000; USA)

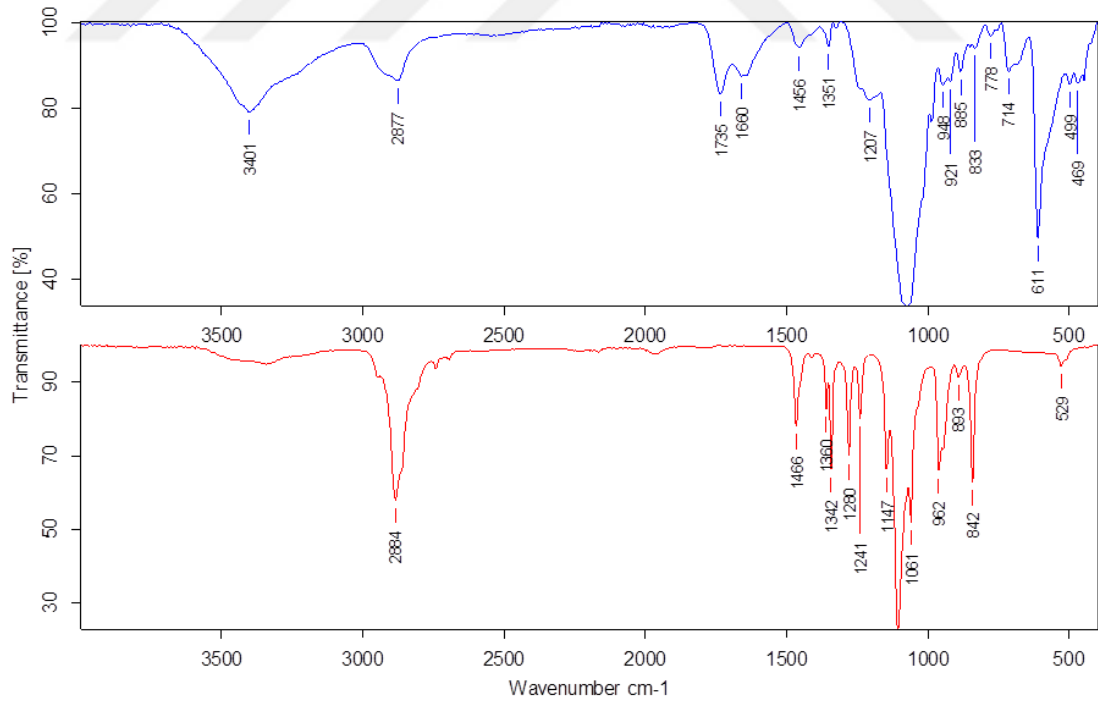
4. BULGULAR

4.1. Doku yapıştırıcısı hazırlanması ve karakterizasyonu

4.1.1. FT-IR karakterizasyonu

4.1.1.1. PEG-COOH FT-IR Sonuçları

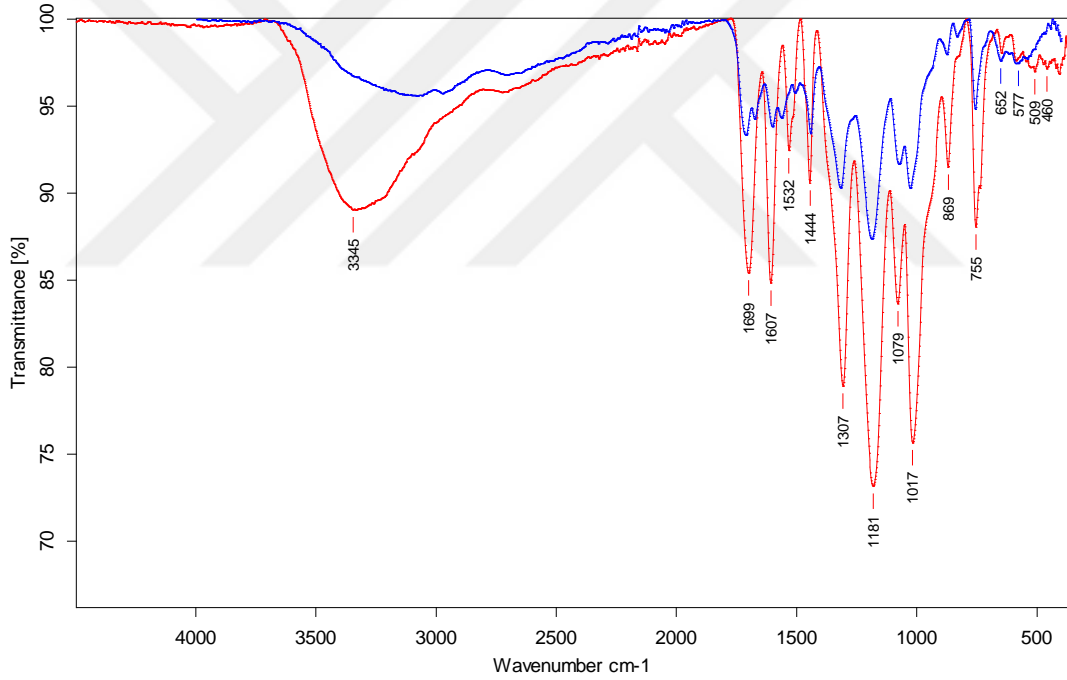
Orijinal PEG ve PEG-COOH yapısına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Orijinal PEG-COOH polimerinin FT-IR spektrumu 1750 cm⁻¹, C=O karboksilik gerilimlerinin absorpsiyonlarını göstermektedir. Bu pik PEG zincirlerinin uç gruplarının karboksilik asite dönüştürülme işleminden önce; PEG FT-IR spektrumların 1500-2000 cm⁻¹'deki bant aralığında gerilim bandı görülmemiştir. FT-IR spektrumunda gözlemlenen bu değişim karboksil grupların PEG polimeri uçları üzerine eklendiğini kanıtlamaktadır.



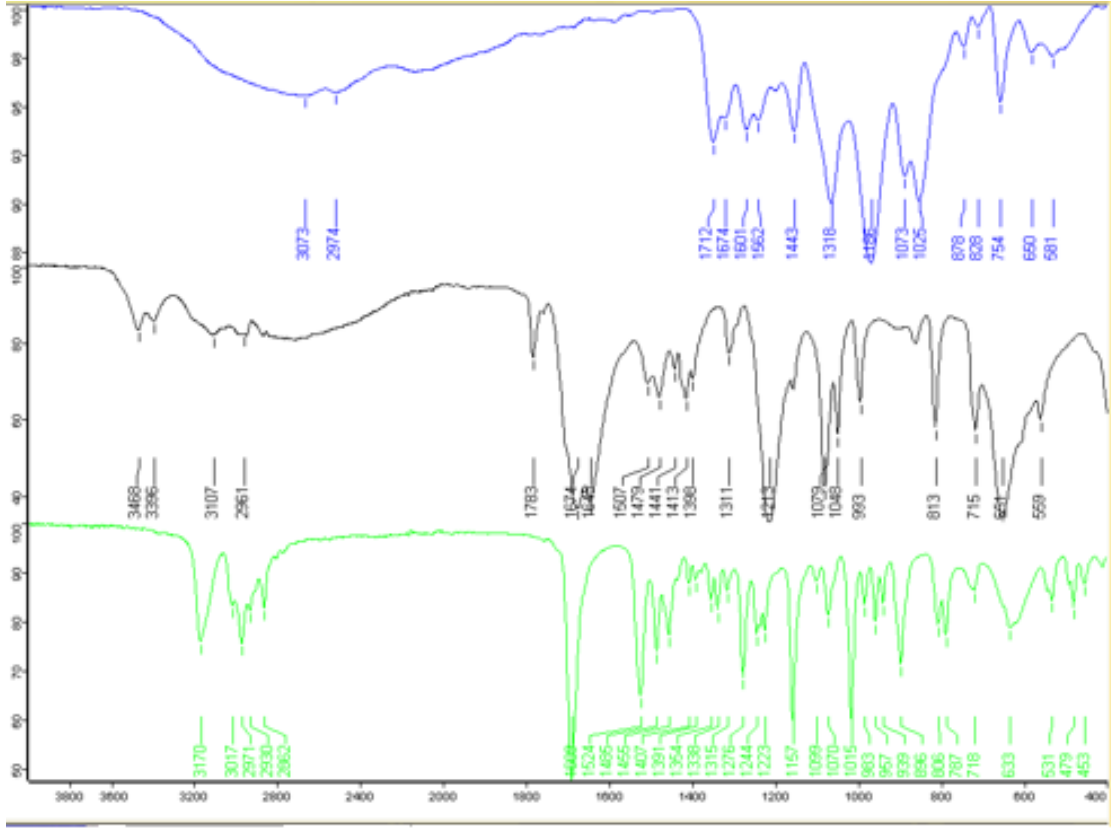
Şekil 4.1. Orijinal PEG (kırmızı) ve PEG-COOH (mavi) FT-IR spektrumları

4.1.1.2. TA-EDC/NHS FT-IR Sonuçları

Şekil 4.2.'de, 3345 cm⁻¹ merkezli geniş ve güçlü bir bant ile 3700 ve 3000 cm⁻¹ civarında güçlü absorpsiyon bulanması tannik asit spektrumunu göstermektedir. Bu bantlar, hidroksil grupları (OH) germe titreşimlerine ve OH arasındaki çok çeşitli hidrojen bağlarını yansıtır (Mayra A. Pantoja-Castroa, Horacio González-Rodríguez., 2011). Bu spektrumda, TA-EDC/NHS yapısında orijinal TA yapısına kıyasla; sırasıyla CH₂ ve CH₃ gruplarının simetrik ve antisimetrik -C-H- gerilme titreşimleriyle ilişkili olarak 2974 cm⁻¹'de hafif bir bant fark edebilir. Orijinal TA-EDC/NHS yapısına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.3.'de verilmiştir. 3073-2974 cm⁻¹'deki belirgin pik, fenolik grupların varlığını gösterir. EDC/NHS varlığında matrisin TA ile çapraz bağlanması, diğer matrislere kıyasla 1186 ve 1073 cm⁻¹'de artan bir absorpsiyon ile sonuçlanır.



Şekil 4.2. TA-EDC /NHS (mavi) ve TA (kırmızı) FT-IR spektrumları

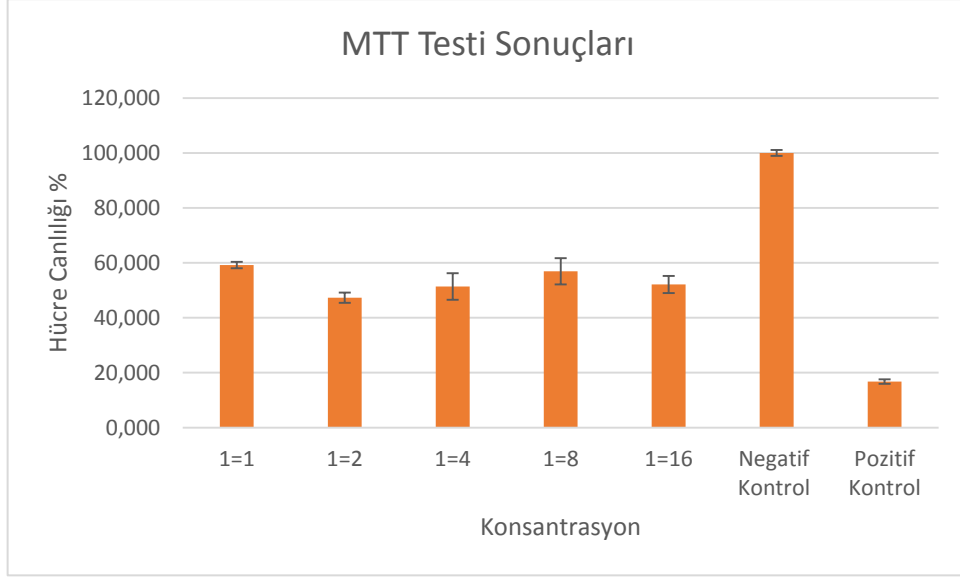


Şekil 4.3. TA-EDC/NH (mavi), NHS (siyah)ve EDC (yeşil) FT-IR spektrumları

4.2. Doku Yapıştırıcısının *In Vitro* Hücre Kültür Sisteminde Biyouyumluluk Özellikleri Sonuçlar

4.2.1. L929 Fibroblast Hücrelerinde MTT Testi

Nicel Değerlendirme: (TS EN ISO 10993-5/EK-C-MTT Sitotoksisite Deneyi) uygun olarak yapılmıştır. Doku yapıştırıcılarının L-929 fibroblast hücre hattı üzerindeki indirekt sitotoksisite sonuçları 24 saat olarak Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı ekstrlerinin uygulandığı L929 fibroblast hücrelerine ait % canlılık grafiği

L-929 hücreleri üzerindeki test sonuçlarına göre, TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı kontrol grubuna (24 saat için $100 \pm 1,08$) kıyasla sırasıyla en yüksek konsantrasyondan başlayarak $56,219 \pm 1,17$, $47,303 \pm 1,86$, $51,369 \pm 4,84$, $56,924 \pm 4,76$, $52,120 \pm 3,12$ olmak üzere yüzde hücre canlılığı değerlerine sahiptir. Yapılan nitel ve nicel değerlendirme de, doku yapıştırıcısının en yüksek konsantrasyonda (1:1) toksik etkisi olduğu bulunmuştur. İstatiksel olarak karşılaştırıldığında ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0,05$) olarak kabul edildiğinden en yüksek konsantrasyon ile negatif kontrol absorbans verileri karşılaştırıldığında $F > F_{ölçüt}$ olduğundan gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur.

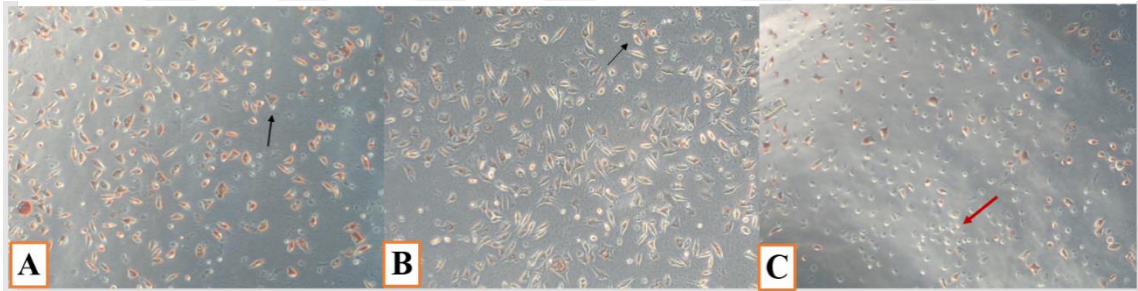
4.2.2. L929 Fibroblast Hücrelerinde Agar Difüzyon Testi

Nitel değerlendirme için özütlere, hücreler üzerinde yarattığı etki mikroskopik olarak incelenmiştir. Standard da verilen çizelgeler referans alınarak doku yapıştırıcısı özütlere, sitotoksitesinin nitel morfolojik derecelendirilmesi yapılmıştır. Buna göre negatif kontrol numuneleri hücreler üzerinde toksik etki göstermezken (0), pozitif kontrol olarak kullanılan kauçuk madde özütlere beklediği gibi yüksek derecede (4) toksisite ortaya çıkarmıştır. Kullanılan TS EN ISO 7405 standardına göre, Çizelge 3.3.'de gösterildiği gibi (1)'den daha büyük derecelendirme değerinin bulunması, sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütlere için hücre cevabı her bir konsantrasyonda 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ayrı ayrı hesaplandığında; Çizelge 4.1.'de verilen sonuçlar elde edilmiştir. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütlere, tüm konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur.

Çizelge 4.1. TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı Sonuçları

| Konsantrasyon | Dekolarizasyon İndeksi | Lizis İndeksi | Sonuç |
|-----------------|------------------------|---------------|------------------|
| 1:1 | 1 | 1 | Hafif Sitotoksik |
| 1:2 | 1 | 1 | Hafif Sitotoksik |
| 1:4 | 1 | 0 | Sitotoksik değil |
| 1:8 | 1 | 0 | Sitotoksik değil |
| 1:16 | 1 | 0 | Sitotoksik değil |
| Negatif Kontrol | 0 | 0 | Sitotoksik değil |
| Pozitif Kontrol | 3 | 4 | Aşırı Sitotoksik |

Deney plakaları inkübasyon süresi sonlandırıldıktan sonra Olympus marka inverted mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Görüntüler aynı mikroskoba ait kamera ile çekilmiştir. Hücre morfolojileri incelendiğinde Şekil 4.5.'de da görüldüğü gibi TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı özütleri ile negatif kontrol numuneleri benzer özellikler göstermiştir. Negatif kontrol numunesine bakıldığında mekik şeklinde olması beklenen fibroblast hücrelerinin oval yapılar gösterdiği ve az sayıda hücrenin neutral kırmızısı ile boyandığı gösterilmiştir. Doku yapıştırıcısının direkt yöntemle yapılan sitotoksisite testine göre in-direkt yöntem olan agar difüzyon testiyle yapıldığında canlılık oranı artmış görülmektedir.



Şekil 4.5. L929 Fibroblast Hücrelerinde Agar Difüzyon Testi Sonuçları. A) TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı 1:1 konsantrasyona ait görüntü; B) Negatif Kontrol numunesine ait görüntü; C) Pozitif Kontrol numunesine ait görüntü. (Görüntüler 10x büyütmeden çekilmiştir. Siyah oklar, hücre içine boyayı almış canlı hücreleri göstermektedir, kırmızı ok ise hücre morfolojisi bozulmuş boyanmamış hücreleri göstermektedir.

4.2.3. Apoptoz Nekroz Testi Sonuçları

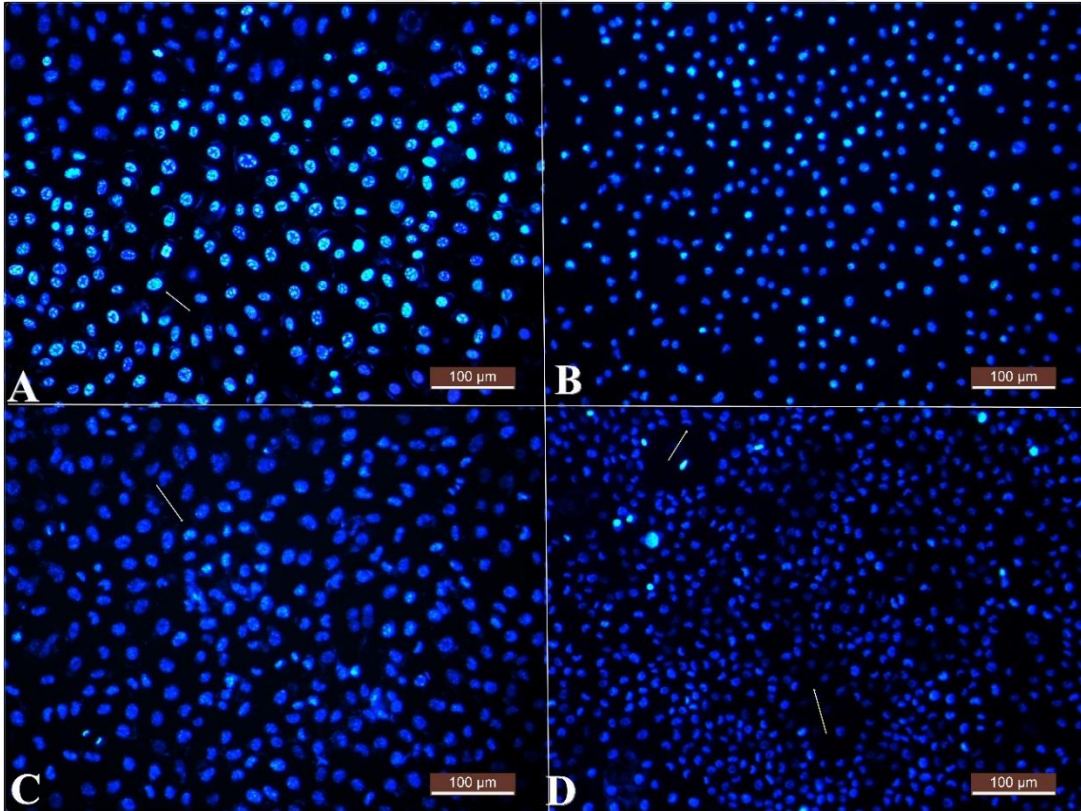
L929 fibroblast hücrelerinde apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için ikili boyama (double staining) metodu kullanılmıştır.

Hazırlanan ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) flouresan boyası DNA'ya bağlanarak mavi flouresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renge boyanmasını sağlar, böylece apoptotik parçacıklar ve DNA fragmentasyonları ışığa ile

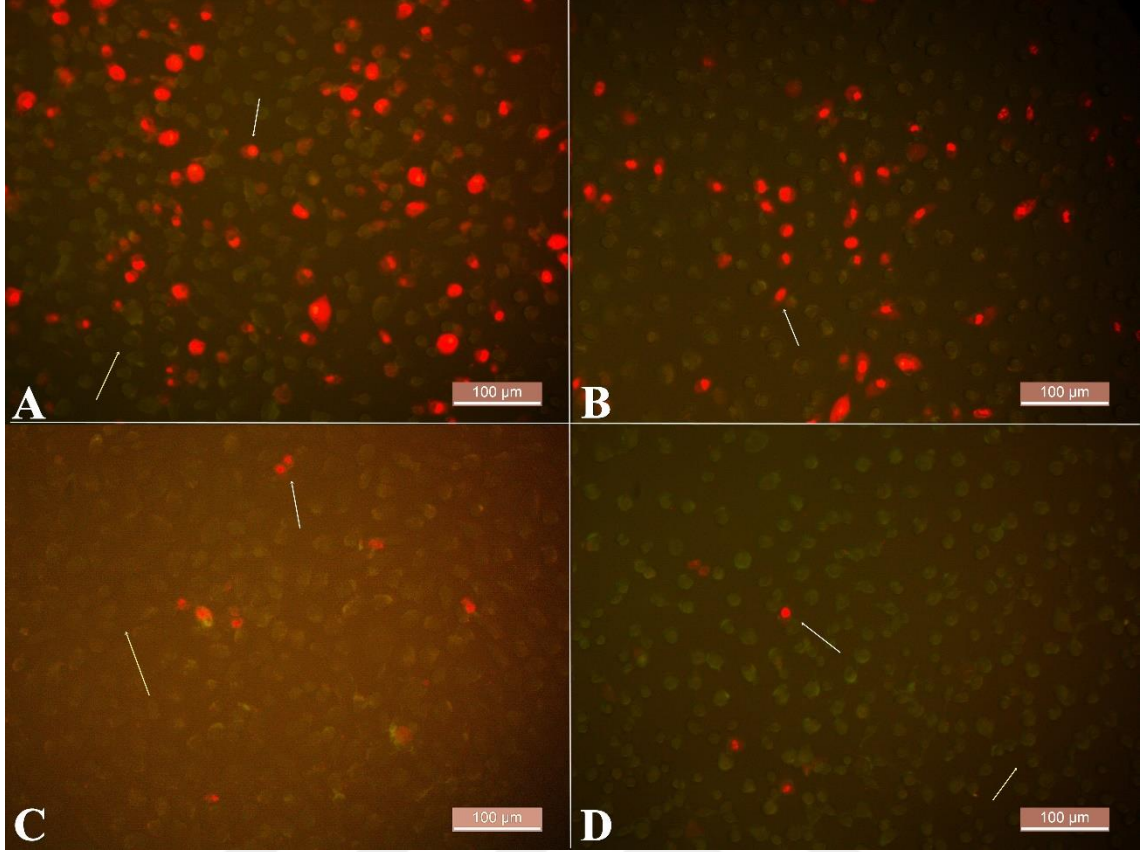
gözlemlenebilir. Genel prensipte apoptotik hücre çekirdekleri, düzgün parçalanmış, diğerlerine göre daha parlak ve çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilirler. Hazırlanan ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid flouresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı floresan ve yeşil floresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup hücrelerin nekroza uğradığına işaret etmektedir. Çizelge 4.2 de apoptotik nekrotik ölüm yüzdeleri detaylı olarak verilirken, Şekil 4.6 ve 4.7’de DAPI ve FITC filtrelerinde hücrelerin görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Doku yapıştırıcısı uygulanmış L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik- nekrotik indeks sonuçları

| Konsantrasyon | % Apoptoz | % Nekroz |
|------------------------|-----------|-----------|
| 1:1 | 22,1±3,4 | 26,6±5,8 |
| 1:8 | 19,7±4,1 | 21,5±4,5 |
| 1:16 | 16,1±0,4 | 18,6±1,1 |
| Negatif Kontrol | 2,5±0,4 | 2,1±0,6 |
| Pozitif Kontrol | 21,2±2,8 | 76,33±6,4 |



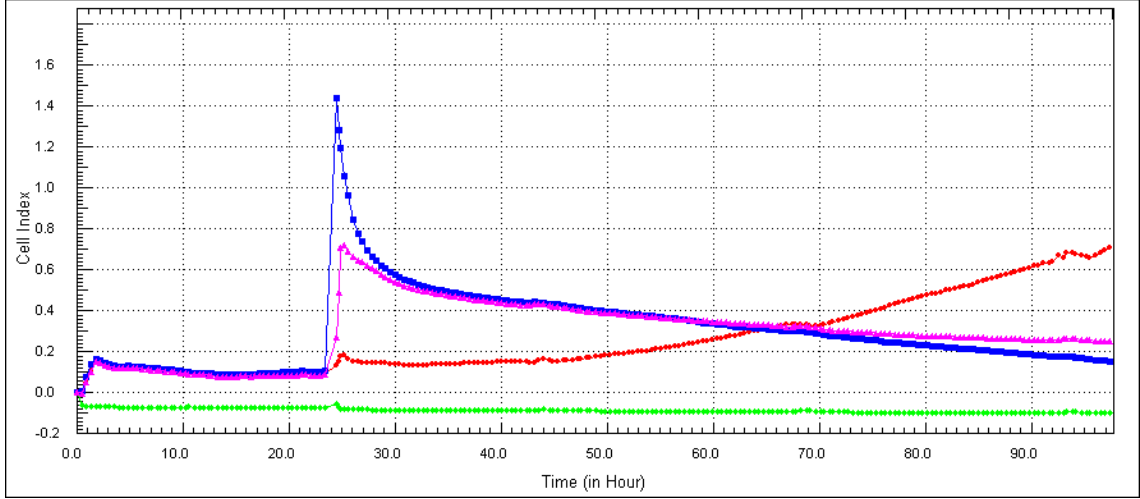
Şekil 4.6. A) 1:1 konsantrasyon; B) 1:8 konsantrasyon; C) 1:16 konsantrasyon; D) Negatif kontrol grubu. L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik hücrelerin fotoğrafları. (Fotoğraflar LEICA, DMI 6000B model mikroskopta; DAPI filtresinde 200X büyütmede görüntülenmiştir; beyaz oklar; apoptotik hücreleri, Sarı oklar; canlı hücreleri göstermektedir.



Şekil 4.7. A) 1:1 konsantrasyon; B) 1:8 konsantrasyon; C) 1:16 konsantrasyon; D) Negatif kontrol grubu. L929 Fibroblast hücrelerine ait nekrotik hücrelerin fotoğrafları. (Fotoğraflar LEICA, DMI 6000B model mikroskopta; FITC filtresinde 200X büyütmede görüntülenmiştir; beyaz oklar; nekrotik hücreleri, Sarı oklar; canlı hücreleri göstermektedir.

4.2.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemine Ait Proliferasyon Sonuçları

Doku yapıştırıcısının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerine ait proliferasyon grafiklerine ait bulgular Şekil 4.8.'de verilmiştir. L929 fibroblast hücrelerinde TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve 90 saat süre hücre proliferasyonları incelenmiştir. Hücrelerin üzerine TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının uygulanmasının ardından ilk 24 saatte hücrelerin proliferasyonu incelendiğinde 1:8 ve 1:16 konsantrasyonlarda her ikisinde de artış gözlenmiştir. Yaklaşık olarak 36 saat geçmesinin ardından her iki konsantrasyondada proliferasyon azalmıştır. Negatif kontrol grubunda hücrelerin ekilmesinden deneyin sonlandırılmasına kadar hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Hücre uygulanmayan sadece DMEM konulan kuyularda sabit empedans ölçümü gözlenmiştir.



Şekil 4.8. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerinin proliferasyon grafiği (Kırmızı: NK (Huc+DMEM) Yeşil: DMEM (sadece), Lacivert: TA-PEG/PVA (1:8), Pembe: TA-PEG/PVA (1:16)

4.2.5. Genotoksisite Mikronükleus Testi Sonuçları

Deney prosedürü 72 saatte gerçekleşmektedir, hazırlanan doku yapıştırıcısı özütü genotoksik bir etkisinin olup olmadığı incelenmek için CHO hücrelerine uygulandı. 3 saatlik S9 karaciğer enzimi varlığında ve S9 karaciğer enzimi yokluğunda 24 saatlik uygulamaların ardından sayımı yapılan hücreler de *in vitro* genotoksisite değerlendirme sonucunda elde edilen veriler SPSS 16 ile Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan istatistik testleri uygulanarak belirlendi. *In vitro* mikronükleus testinde kontrol ve deney grupları için 1000 adet binükleus hücre olacak şekilde toplamda sayılmıştır. Standardda belirtilen CBPI ve RI değerleri hesaplanmıştır. Replikasyon Endeksi (RI) kontrol kültürlerine kıyasla tedavi edilen kültürlerde Cyt-B'ye maruz kalma süresi boyunca hücre başına göreceli hücre döngüsü sayısını gösterir ve sitostaz yüzdesini hesaplamak için kullanılabilir. CBPI indeksi ise, hücre başına ortalama çekirdek sayısını gösterir ve hücre proliferasyonunu hesaplamak için kullanılabilir.

Hücre sayısına bağlı olarak standardda belirtildiği şekilde (CBPI) ve Replikasyon İndeksi (RI) önerilen formüle göre hesaplanmıştır: (OECD 487). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

$$CBPI = [MI + 2MII + 3 (MIII)] / N$$

$$RI = [(MII + (2x MIII) / N_T)] / [(MII + (2x MIII) / N_C)] \times 100$$

(MI: Bir nükleuslu hücreler, MII: İki nükleuslu hücreler, MIII: Multi nükleuslu hücreler, N: Toplam hücre sayısı, N_T: Test maddesi toplam hücre sayısı, N_c: Kontrol grubu toplam hücre sayısı)

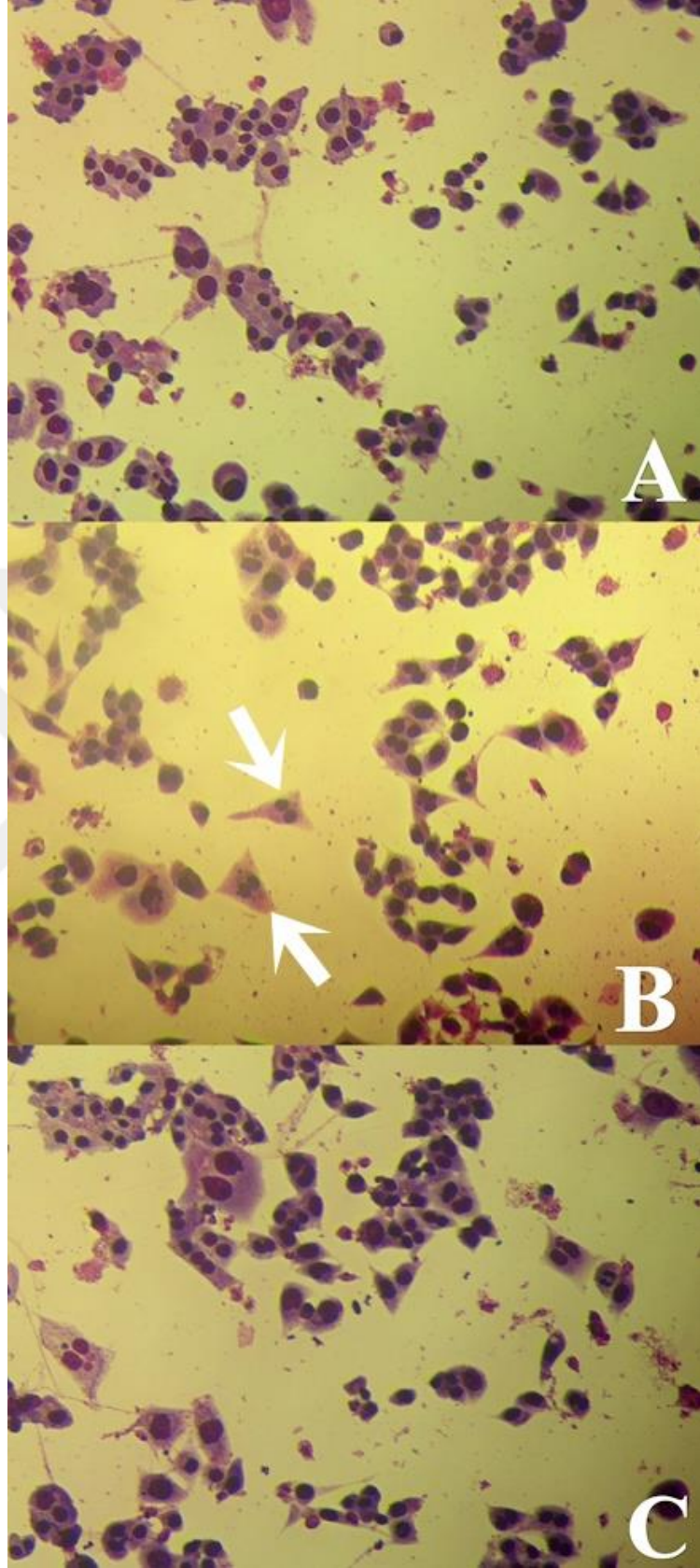
Çizelge 4.3. Kısa süreli, 3 saat'lik uygulamadaki sonuçlar

| Sıra No | Test Materyali | % Mikronükleus Oranları | CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) | Replikasyon İndeksi (RI) |
|---------|---------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
| 1 | Negatif Kontrol | 1,36 | 1,86 | - |
| 2 | Pozitif Kontrol | 8,55 | 1,38 | 57,73 |
| 3 | Doku Yapıştırıcısı (1:16) | 2,92 | 1,52 | 59,36 |

Çizelge 4.4. 24 saat'lik uygulamadaki sonuçlar

| Sıra No | Test Materyali | % Mikronükleus Oranları | CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) | Replikasyon İndeksi (RI) |
|---------|---------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
| 1 | Negatif Kontrol | 1,42 | 1,94 | - |
| 2 | Pozitif Kontrol | 7,04 | 1,49 | 66,82 |
| 3 | Doku Yapıştırıcısı (1:16) | 2,18 | 1,60 | 55,44 |

LEICA, DMI 6000B model mikroskopta 200X büyütmede çekilen fotoğraflar, Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. CHO hücrelerine 24 saat uygulanan doku yapıştırıcısı boyanmasının genotoksisite fotoğrafları

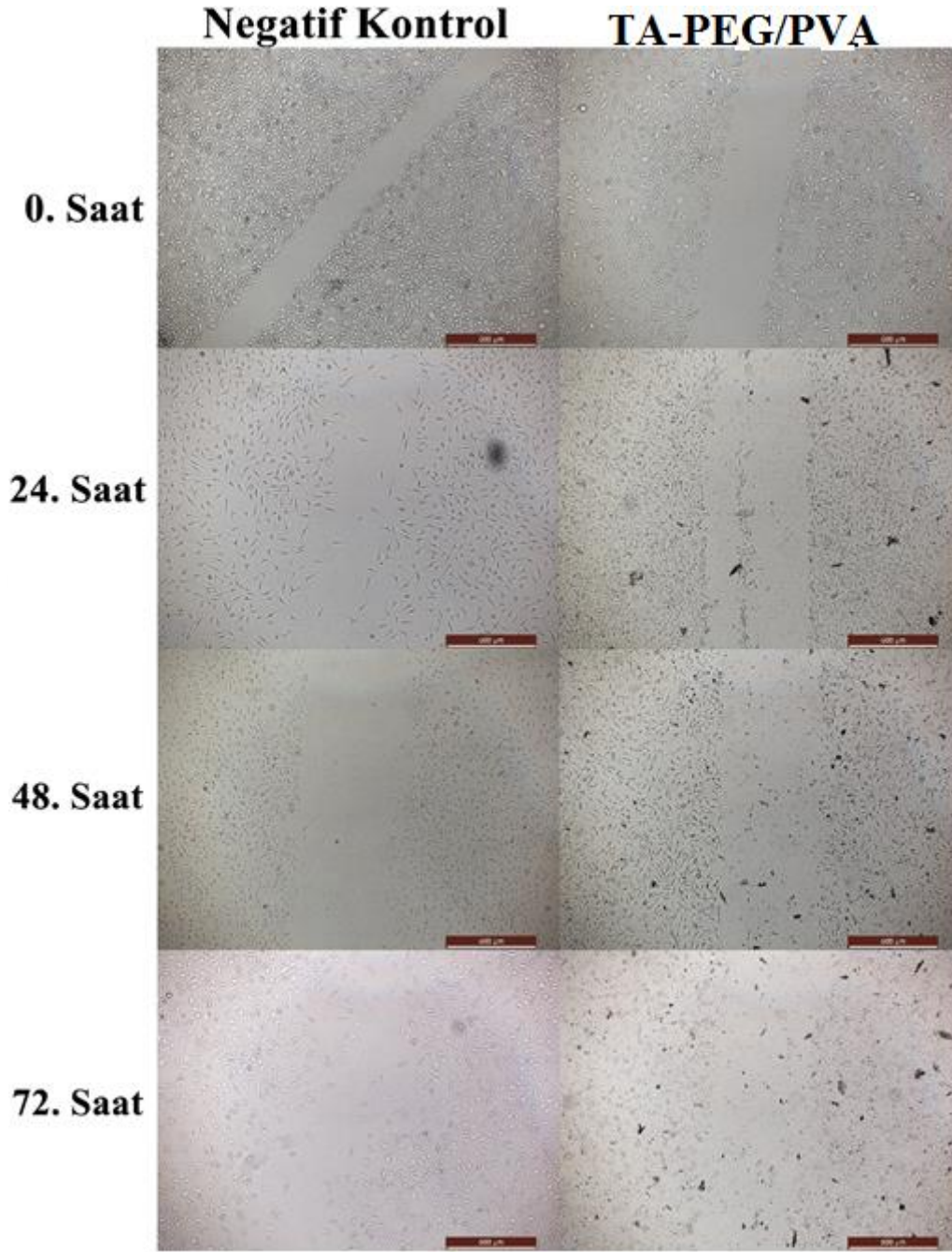
A) Sadece besiyeri uygulanmış negatif kontrol CHO hücreleri, B) Mit-c uygulanmış pozitif kontrol CHO hücreleri, C) 1:16 konsantrasyonda TA-PEG/PVA doku yapıştırıcı uygulanmış CHO hücreleri.(Beyaz oklar: mikronükleuslu hücreleri göstermektedir. 200X büyütmede çekilmiştir.)

İstatistiksel olarak 24 saat uygulanmış negatif kontrol CHO hücreleri grubu ile doku yapıştırıcısının uygulandığı CHO hücreleri grubu mikronükleus değerleri karşılaştırıldığında $P=0,737>0,05$ olarak bulunduğundan gruplar arasında anlamlı fark yoktur. 3 saat uygulanmış negatif kontrol CHO hücreleri grubu ile doku yapıştırıcısının uygulandığı CHO hücreleri grubu mikronükleus değerleri karşılaştırıldığında $P=0,615>0,05$ olarak bulunduğundan gruplar arasında anlamlı fark yoktur.

4.2.6. *In Vitro* Yara İyileştirme Deneyine (Scratch Deneyi) Ait Bulgular

TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının fibroblast göçü üzerindeki etkisi, hücresiz alanlardaki azalmanın incelenmesi yani yara iyileşme sürecinin taklit edilmesi yoluyla nicel olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* olarak gerçekleştirilen yaraların görüntüleri sıfırıncı saatte ve 37 °C'de %5 CO₂ 'de 24, 48 ve 72 saatlik bir onarım süresinden sonra kuyuların resimleri çekilmiştir.

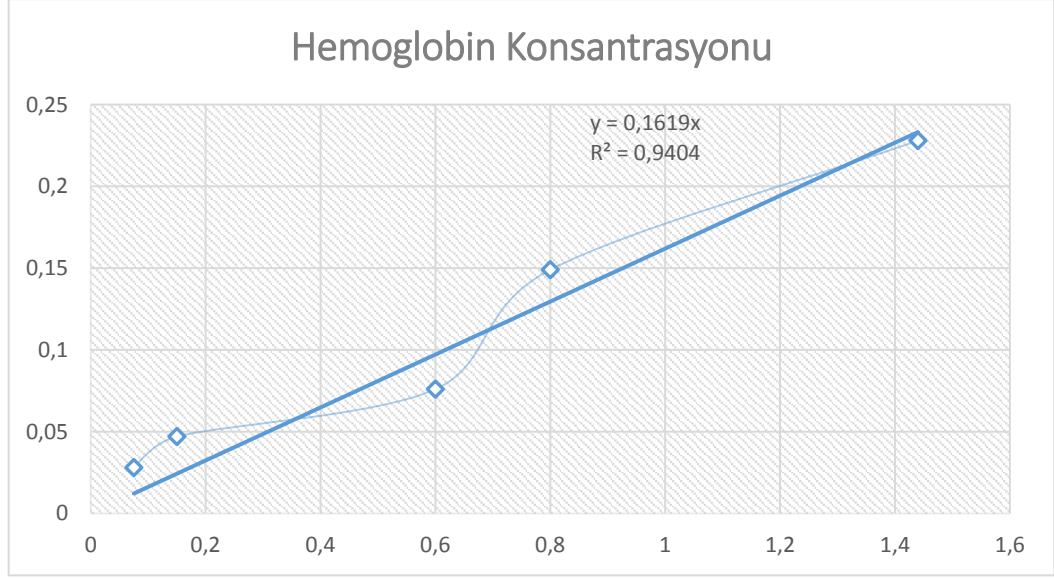
TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının negatif kontrole kıyasla hücre migrasyonu temel alınarak incelenmiştir. *In vitro* olarak L929 fibroblast hücrelerinde yapay olarak hasar almış bir yaranın kapanmasını hızlandırma yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.10.'de verilmiştir.



Şekil 4.10. İn vitro yara modeli ile elde edilen L929 Fibroblast hücre göçünün günlere göre temsili fotoğrafları.

4.2.7. Hemolitik Etki Testi Bulgular

Bu yöntem, bir malzemenin hemolize neden olma eğilimini belirlemek için kullanılır. Test için gereken hemoglobin konsantrasyonu standartta 10 ± 1 olarak belirtilmiştir, bu deneyde hemoglobin konsantrasyonu 9,18 olarak hesaplandı.



Şekil 4.11. Hemoglobin konsantrasyonu eğim grafiği

Deney sonuçları, kör numuneden elde edilen değer ile hesaplandı. Referans alınan TS EN ISO 10993-4 standardına göre hemolitik indeks değeri %5' den daha büyük bulunması numunenin hemolitik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5. Okunan absorbans değerleri ve nicel değerlendirme

| | Ekstrakt Durum | | Absorbans Değeri (540 nm) | % Hemoliz |
|--------------------------------------|----------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | Renk | Berraklık | | |
| TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı | Renksiz | Berrak | 0,048 | 0,126 |
| Negatif Kontrol | Renksiz | Berrak | 0,046 | 0,124 |
| Pozitif Kontrol | Kırmızı | Berrak | 1,988 | 5,325 |
| Blank Kontrol | Renksiz | Berrak | 0,047 | - |

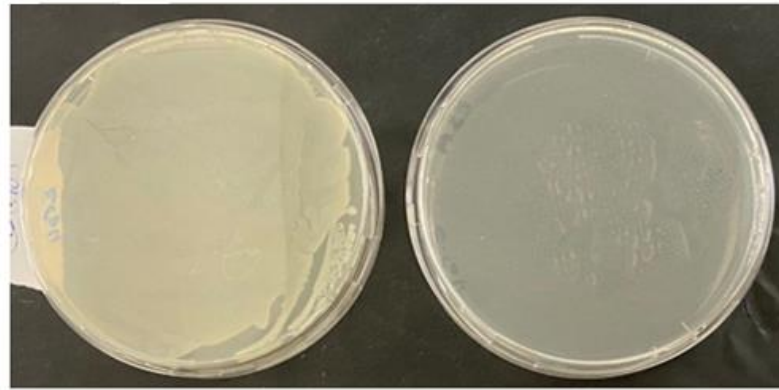
Çizelge 4.5'da 540 nm'de okunan absorbans değerlerini göstermektedir. Bu değerler kalibrasyon kat sayısı ve süpernatant hemoglobin konsantrasyonu ile %hemoliz indeksini belirlemede kullanıldı. Blank olarak PBS kullanıldı. Deney Sonuçları, hemolitik indeks düzeylerinde %5'den daha küçük değer bulunması nedeniyle hazırlanan doku yapıştırıcısının hemolitik etkisinin olmadığını göstermiştir.

4.3. Antimikrobiyel Etkinlik Testi Bulgular

Gerçekleştirilen deneyler ile; TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının *Escherichia coli*, suşları üzerinde antimikrobiyal etkisinin koloni oluşumunun negatif kontrol grubuna kıyasla %30 azalttığı belirlenmiştir. Aynı şekilde *S. Aureus* suşlarında doku yapıştırıcısının uygulandığı petrilerde %100 etkili olduğu koloni oluşumunu tamamen engellediği bulunmuştur (Çizelge 4.6).

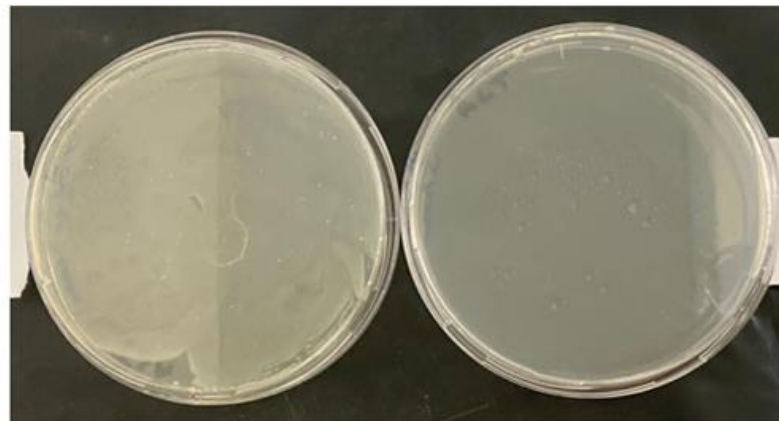
Çizelge 4.6. 24 saat bakteri suşlarına maruz bırakılan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının inkübasyon sonrası cfu/mL değerleri ve etkinlik sonuçları

| | TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcı | Kontrol | % Azalma |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------|----------|
| <i>E. coli</i> (25922) | 1×10^5 cfu/mL | 1×10^8 cfu/mL | %30 |
| <i>S. aureus</i> (25923) | 0 cfu/mL | 1×10^8 cfu/mL | %100 |



E. coli
(Kontrol Grubu)

E. coli
(TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı)



S. aureus
(Kontrol Grubu)

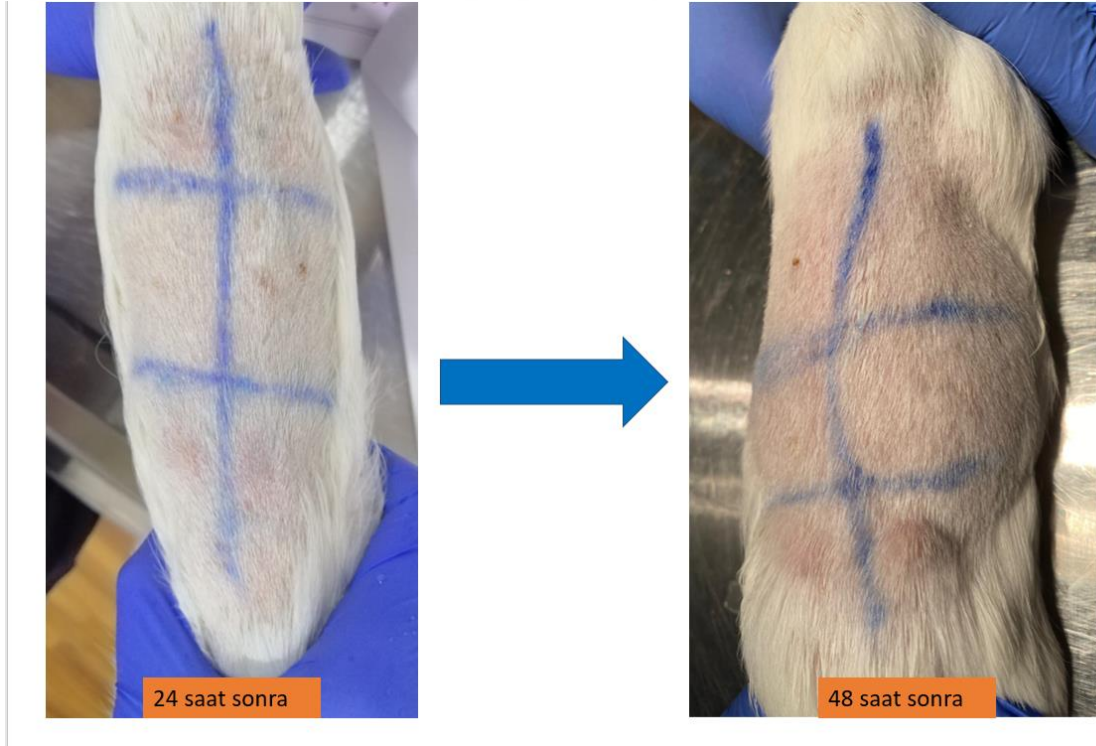
S. aureus
(TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı)

Şekil 4.12. Antimikrobiyel etkinlik testinde gözlemlenen koloni oluşumu

4.4. Doku Yapıştırıcısının *in vivo* Biyouyumluluk Özellikleri Testleri Sonuçlar

4.4.1. Doku Yapıştırıcısının Deri Sensitizasyon Deneyi

TS EN ISO 10993-10 Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi – Bölüm 10: Tahriş ve cilt duyarlılığı için deneyler standardına göre TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısına ait özütler sensitizasyon reaksiyonunu değerlendirmek için en yüksek doz yöntemi kullanılarak yapıldı. Kobaylarda cilt üzerine uygulanan numunenin duyarlılığa neden olma potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

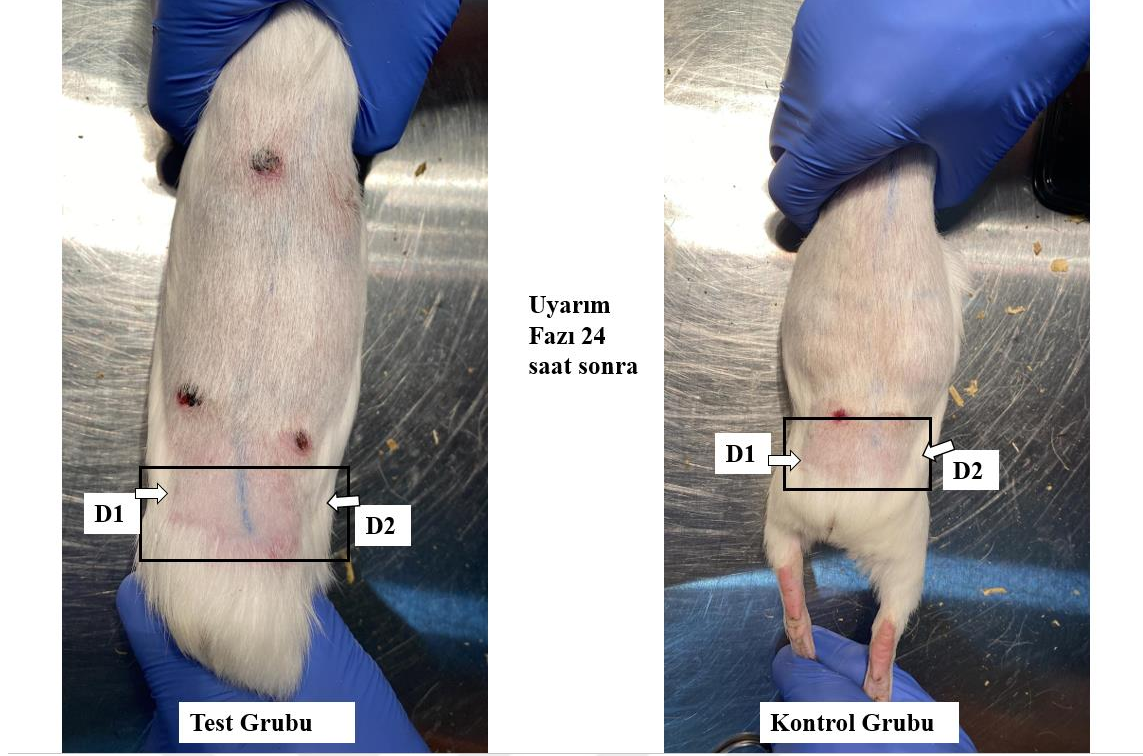


Şekil 4.13. Deri sensitizasyon testi uygulamadan 24 saat ve 48 saat sonra görüntüsü.

Çizelge 4.7. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının Magnusson ve Kligman ölçeğine göre sensitizasyon değerlendirilmesi

| | Deney Hayvanları (Kobay) | 24. saat | 48.saat | Bireysel Ortalama | Grup Ortalaması | Sonuç |
|----------------------|---------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Test Grubu | 1 | 1 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,3 |
| | 2 | 1 | 0 | 0,5 | | |
| | 3 | 1 | 1 | 1 | | |
| | 4 | 1 | 0 | 0,5 | | |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 6 | 1 | 0 | 0,5 | | |
| Kontrol Grubu | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 3 | 1 | 0 | 0,5 | | |
| | 4 | 1 | 0 | 0,5 | | |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 6 | 0 | 0 | 0 | | |

Topikal indüklemeye fazının tamamlanmasının ardından 14 ± 1 gün sonra bütün deney ve kontrol hayvanları deney numunesi ile uyarıldı. Deney numunesi ve bir adjuvan ve serum fizyolojik indüklemeye süresince, Şekil 1'deki C yeri için seçilen derişimdeki numuneyle ıslatılmış uygun yamalar veya kap kullanılarak her bir hayvanın yan üst kısmı gibi muamele edilmeyen D1 ve D2 bölgelerine topikal olarak uygulanmıştır. Yamalar kapatıcı örtü ile tutturulmuştur. Sargı ve yamalar (24 ± 2) saat sonra çıkartılmıştır. Şekil 4.14.'de test grubu hayvanlarına ve kontrol grubu hayvanlarına ait sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Dermal sensitizasyon testi uyarım fazı sonrası bulgular

Değerlendirme kriterlerine göre TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının sensitizasyon testinde değerlendirme skoru 0,3 olarak hesaplanmış (görünür bir değişim yok) ve doku yapıştırıcısının herhangi bir sensitizasyon reaksiyonu göstermediği bulunmuştur.

4.4.2. Doku Yapıştırıcısının Dermal İritasyon Deneyi

İşlemin ardından 1. saat, 24. saat, 48. saat ve 72'nci saatlerde deney bölgeleri gözlenmiş ve Çizelge 4.18.'de belirtilen kriterler göz önüne alınarak örnekler değerlendirilmiştir. 72. Saatte yapılan skorlamadan sonra her bir hayvanda 24, 48 ve 72'nci saatteki bütün eritem/eskar skorları ve ödem skorları; TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı, pozitif kontrol ve negatif kontrol için ayrı ayrı toplanmıştır. Değerlendirmelere ait sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Ayrıca tavşanlar da yapılan dermal iritasyon sonuçlarından 1. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saate ait bulgulara ait görüntüler Şekil 4.15.'de verilmiştir.

Dermal İrritasyon testi (TS 10993-10)



Şekil 4.15. Dermal irritasyon testi sonuçlar

Çizelge 4.8. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısına ait gözlem sonuçları.

| | | Eritem ve eskar oluşumu | | | Ödem oluşumu | | | Toplam |
|----------|---------|-------------------------|----------|----------|--------------|----------|----------|--------|
| | | 24. saat | 48. saat | 72. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat | |
| 1.Hayvan | 1.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2.Bölge | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 24 |
| | 3.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2.Hayvan | 1.Bölge | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 5 |
| | 2.Bölge | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 24 |
| | 3.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4.Bölge | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 4 |
| 3.Hayvan | 1.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2.Bölge | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 24 |
| | 3.Bölge | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4.Bölge | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |

Tavşanlarda uygulanan dermal irritasyon testi sonuçlarına göre Çizelge 4.19’da verilen skorların toplam verilerine göre Birincil ve İkincil(Kümülatif) Tahriş Endeksi(PII) Çizelge 4.9’de verilmiştir. Hesaplamalarda gözlemlerin sadece 24, 48 ve 72’nci saatleri

dahil edilmiştir. Herbir hayvan için birincil tahriş skorları hesaplanmış, TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı, negatif kontrol ve pozitif kontrolün PII skorları sırasıyla 0,3, 0,0 ve 8,0 olarak bulunmuştur. Klinik gözlem incelemelerini içeren değerlendirme ve analiz sonuçlarına TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı iritasyon özelliği hafif ihmal edilebilir (0,3) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Birincil tahriş skoru ve birincil (kümülatif) tahriş indeksi (PII)

| Uygulanan Madde | Birincil Tahriş Skoru | | | Birincil(Kümülatif) Tahriş İndeksi (PII) |
|--|-----------------------|-----------|-----------|--|
| | 1. Hayvan | 2. Hayvan | 3. Hayvan | |
| TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısına | 0 | 0,75 | 0,16 | 0,3 |
| Negatif Kontrol | 0 | 0 | 0 | 0,0 |
| Pozitif Kontrol | 8 | 8 | 8 | 8,0 |

4.4.3. Subkronik Sistemik Toksikite Deneyi (TS EN ISO 10993-11)

4.4.3.1. Subkronik Sistemik Toksikite Deneyi Ağırlık Sonuçları

Subkronik sistemik toksisite deneyinde hayvanlar test grubu ve kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Her grupta her iki cinsiyetten eşit sayıda (5 adet dişi – 5 adet erkek) Wistar Albino Rat kullanılmıştır. İlk enjeksiyon sonrası 14. gün kalp kanı alındıktan sonra hayvanlar sakrifiye edilerek grosspatoloji yapılmıştır. Her gruptaki hayvanlardan nekropsi sonucu; Beyin, Kalp, Akciğer, Karaciğer, Dalak, Lenf Nodulları, Mide, Over/Testis, Timus, Pankreas, Deri, Kas, Böbrek alınan doku örnekleri dejeneratif ve toksikopatolojik yönden incelenmiştir. Grosspatoloji sırasında karaciğer ağırlığı ölçülerek Ağırlık/Karaciğer indeksi hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.10.'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Deney hayvanlarına ait Ağırlık/Karaciğer indeksi

| | | AĞIRLIK ÖLÇÜMÜ | | | | |
|----------------------------|----|-------------------|---------------|--------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Cinsiyet | No | Başlangıç Ağırlık | Bitiş Ağırlık | Karaciğer Ağırlığı | Ağırlık Değişim Oranı (%) | Karaciğer Ağırlık İndeksi (%) |
| Test Grubu Erkek | 1 | 256 | 375 | 11,32 | 46,48 | 3,02 |
| | 2 | 257 | 328 | 11,75 | 27,63 | 3,58 |
| | 3 | 265 | 365 | 12,45 | 37,74 | 3,41 |
| | 4 | 260 | 381 | 13,30 | 46,54 | 3,49 |
| | 5 | 252 | 307 | 11,20 | 21,83 | 3,65 |
| Test Grubu Dişi | 1 | 253 | 277 | 11,90 | 9,49 | 4,30 |
| | 2 | 251 | 281 | 11,36 | 11,95 | 4,04 |
| | 3 | 258 | 286 | 11,29 | 10,85 | 3,95 |
| | 4 | 257 | 285 | 11,86 | 10,89 | 4,16 |
| | 5 | 256 | 281 | 10,52 | 9,77 | 3,74 |
| Kontrol Grubu Erkek | 1 | 252 | 365 | 13,48 | 44,84 | 3,69 |
| | 2 | 261 | 348 | 12,10 | 33,33 | 3,48 |
| | 3 | 258 | 348 | 12,67 | 34,88 | 3,64 |
| | 4 | 251 | 342 | 12,45 | 36,25 | 3,64 |
| | 5 | 260 | 382 | 13,96 | 46,92 | 3,65 |
| Kontrol Grubu Dişi | 1 | 270 | 291 | 9,20 | 7,78 | 3,16 |
| | 2 | 268 | 295 | 11,1 | 10,07 | 3,76 |
| | 3 | 262 | 288 | 10,35 | 9,92 | 3,59 |
| | 4 | 267 | 292 | 10,63 | 9,36 | 3,64 |
| | 5 | 263 | 290 | 11,39 | 10,27 | 3,93 |

Test grubu hayvanlar ile kontrol grubu hayvanların Ağırlık Değişim Oranları (%) kıyaslandığında gruplar arasında fark görülmemiştir. Karaciğer Ağırlık İndeksleri (%) hesaplandığında genel olarak birbirine yakın değerler elde edilmiştir.

4.4.3.2. Subkronik Sistemik Toksikite Deneyi Hemogram Sonuçları

Sakrifikasyon sırasında alınan kan örneklerinden Hemogram analizinde WBC-RBC-HGB-HCT-PLT-MCHC değerleri Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Hematoloji ölçümü sonucunda alınan değerler

| Kan sayımı | Birimi | Referans aralığı | Kontrol Grubu (Dişi) Ortalama | Kontrol Grubu (Erkek) Ortalama | Test Grubu (Dişi) Ortalama | Test Grubu (Erkek) Ortalama |
|-------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| WBC | 10 ⁹ /L | 1.9-13.80 | 6,74 | 10,47 | 6,21 | 8,57 |
| LYM | 10 ⁹ /L | 0.39-4.60 | 1,76 | 2,09 | 1,17 | 1,09 |
| MON | 10 ⁹ /L | 1.31-7.20 | 4,47 | 7,67 | 4,51 | 6,76 |
| NEU | 10 ⁹ /L | 0.0-0.92 | 0,51 | 0,72 | 0,49 | 0,72 |
| EOS | 10 ⁹ /L | 12.0-46.0 | 24,60 | 19,90 | 14,12 | 13,49 |
| BAS | 10 ⁹ /L | 50.0-85.9 | 68,00 | 73,35 | 78,06 | 77,80 |
| LY% | % | 0.0-10.3 | 7,40 | 6,75 | 7,82 | 8,58 |
| MO% | % | 4.82-9.80 | 6,74 | 6,27 | 5,55 | 6,82 |
| NE% | % | 11.0-17.0 | 13,50 | 12,90 | 10,58 | 14,16 |
| EO% | % | 27.0-46.0 | 39,95 | 36,80 | 29,80 | 38,82 |
| BA% | % | 50.0-67.0 | 59,40 | 58,60 | 54,00 | 56,84 |
| RBC | 10 ¹² /L | 16.0-25.0 | 20,10 | 20,60 | 19,78 | 20,76 |
| HGB | g/dL | 31.0-39.0 | 33,80 | 35,25 | 36,60 | 36,50 |
| HCT | % | 11.0-15.0 | 12,25 | 13,90 | 12,16 | 14,16 |
| MCV | fl | 25.0-40.0 | 27,90 | 31,25 | 25,10 | 30,82 |
| MCH | pg | 250-1400 | 120,00 | 132,50 | 120,40 | 921,00 |
| MCHC | g/dL | 5.1-8.2 | 6,10 | 7,15 | 6,30 | 6,48 |
| RDWc | % | 1.9-13.80 | 6,74 | 10,47 | 6,21 | 8,57 |
| PLT | 10 ⁹ /L | 0.39-4.60 | 1,76 | 2,09 | 1,17 | 1,09 |
| PCT | % | 1.31-7.20 | 4,47 | 7,67 | 4,51 | 6,76 |
| MPW | fl | 0.0-0.92 | 0,51 | 0,72 | 0,49 | 0,72 |
| PDWc | % | 12.0-46.0 | 24,60 | 19,90 | 14,12 | 13,49 |

Hemogram cihazı sonuçlarına bakıldığında grup ortalamaları verilen referans aralığı içerisinde bulunmuştur. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı uygulanan ratlarda dişi ve erkek hayvanlarda serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu dişi ve erkek hayvanlara kıyasla benzer veriler elde edilmiştir.

4.4.3.3. Subkronik Sistemik Toksikite Testi İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları

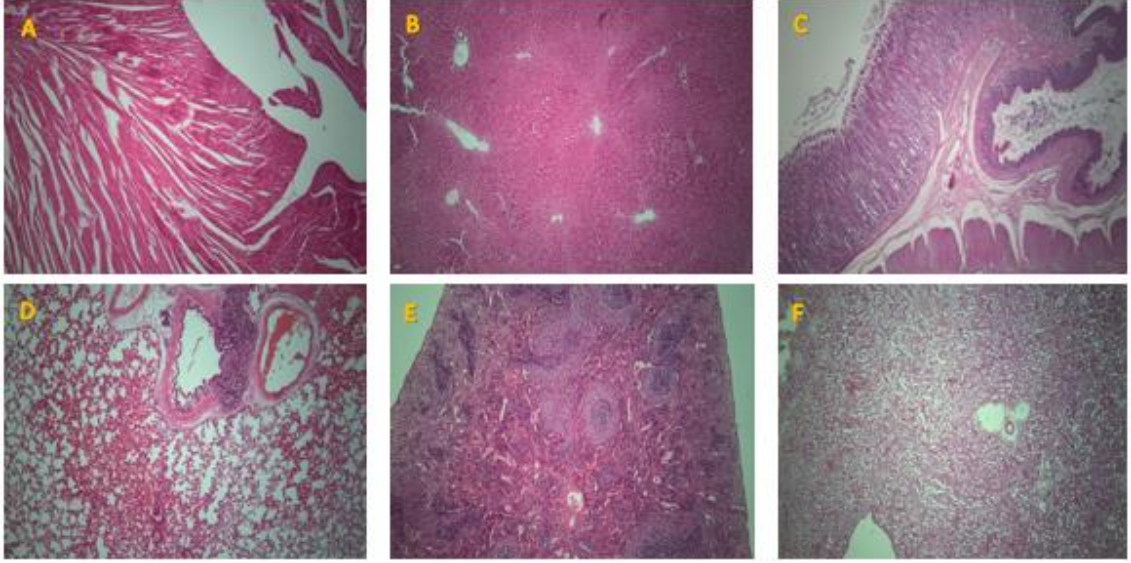
Deney hayvanlarından nekropsi sonucu; Beyin, Kalp, Akciğer, Karaciğer, Dalak, Lenf Nodulları, Mide, Over/Testis, Timus, Pankreas, Deri, Kas, Böbrek doku örnekleri toksikopatolojik olarak değerlendirilmiştir. İncelenen dokulardan böbrek, beyin, kalp, over/testis, timus ve pankreas örneklerinde sistemik toksisite etkisiyle oluşmuş herhangi bir lezyon izlenmemiştir. Bununla birlikte ratlarda doku yapıştırıcısı uygulanan grupta ve kontrol grubu hayvanlardada dalakta hafif şiddette EMH, lenfoid hiperplazi ve hiperemi gözlemlenirken, karaciğerde hafif şiddette EMH, akciğer epitel hücrelerinde hafif şiddette dejenerasyon izlenmiştir. İç organlarda gözlenen bulgular kontrol grubuyla karşılaştırıldığında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır. Histopatoloji bulgularına ait sonuçlar Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Doku yapıştırıcısı uygulanan deney gruplarında subkronik sistemik toksisitenin patolojik olarak değerlendirilmesi

| | Dalak | Karaciğer | Akciğer | Böbrek | Kalp | Beyin |
|---------------------------------------|--------------|------------------|----------------|---------------|-------------|--------------|
| Kontrol Grubu (Dişi) Ortalama | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 1) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) |
| Test Grubu (Dişi) Ortalama | 0 (0; 1) | 0 (0; 1) | 0 (0; 1) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) |
| Kontrol Grubu (Erkek) Ortalama | 0 (0; 1) | 0 (0; 1) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) |
| Test Grubu (Erkek) Ortalama | 0 (0; 1) | 0 (0; 2) | 0 (0; 1) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) |

*0: yok, 1:hafif, 2:orta, 3:yoğun: Sonuçlar medyan (en düşük ve en yüksek değer olarak verilmiştir).

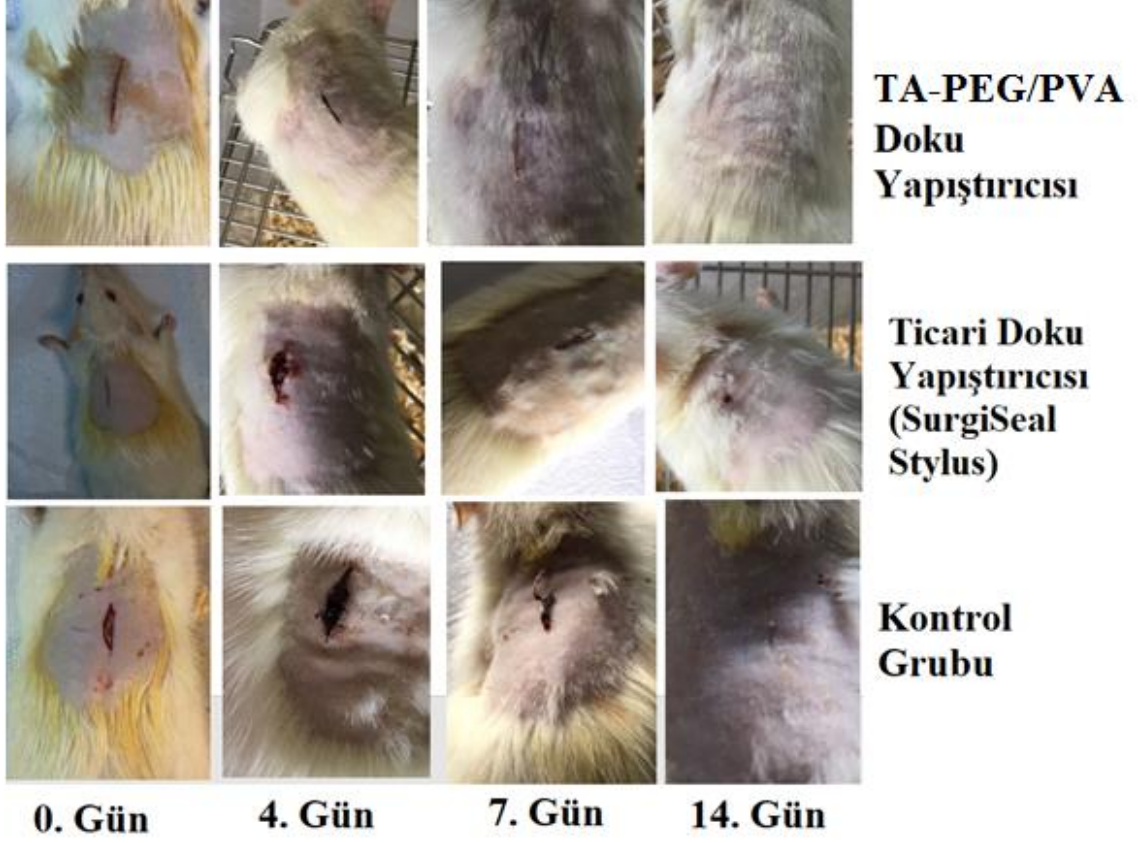
H&E boyama sonrası dokuların bazılarında mikroskop görüntüleri Şekil 4.16'de verilmiştir. Örnekler dişi test grubu hayvanlara aittir.



Şekil 4.16. Test grubu dişi hayvanların dokularına ait mikroskop görüntüleri A) Kalp, B) Karaciğer, C) Mide, D) Akciğer, E) Dalak, F) Böbrek

4.4.3.4. Yara İyileşmesi Bulgular

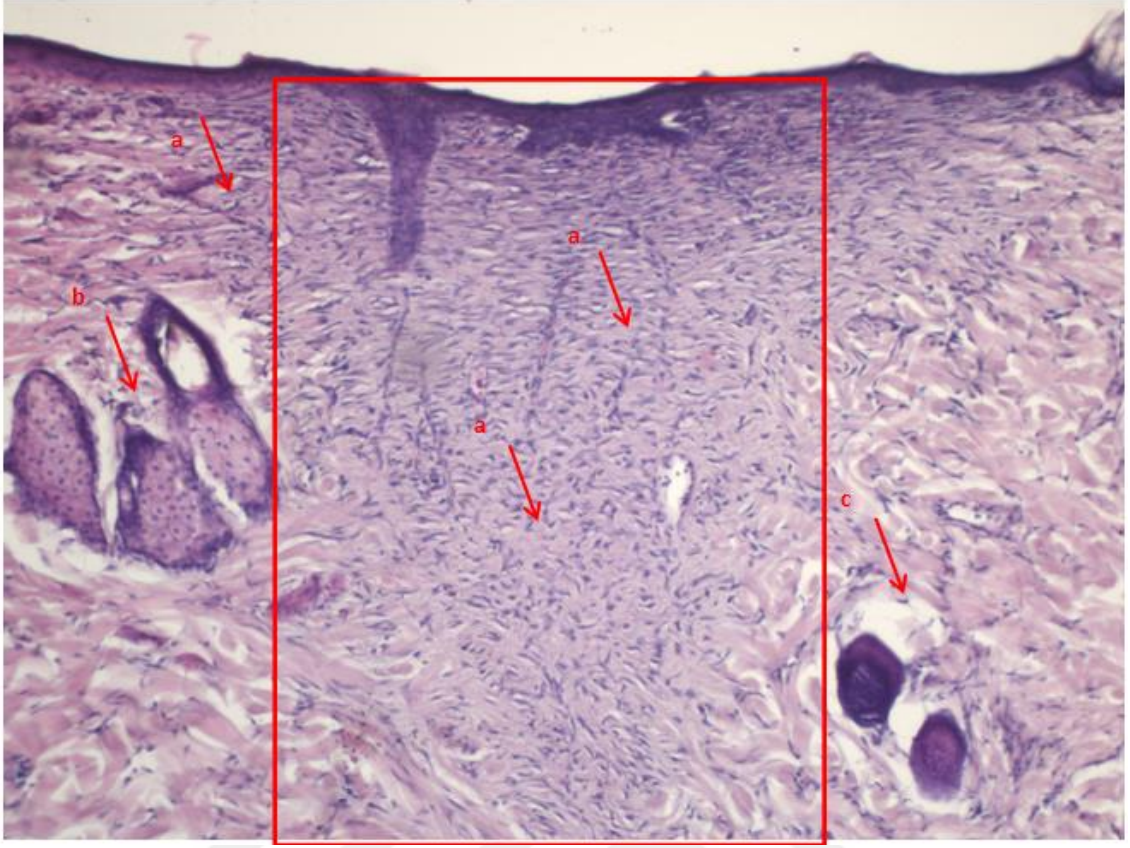
TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı, 5 mL enjeksiyon iğnesi kullanılarak uygulama bölgesine tıkanmadan kolaylıkla doğrudan uygulanmıştır. Bu özelliği yara bölgesine hızlı şekilde uygulama avantajı sağlamıştır. Enjekte edilebilirlik, yapıştırıcıya minimal invaziv implant özelliği katarak, yüksek esneklik ve kullanım kolaylığı sağlarken aynı zamanda hücre kapsüllemesi için 3 boyutlu bir ortam sağlar. Aynı zamanda tam kalınlıktaki deriye enjekte edildi ratlara ait sonuçlar Şekil 4.17.'de onarım etkisini değerlendirmek için sonuçlar ayrı ayrı verilmiştir. 0. gün, 7. gün ve 14. günlerde her grubun ayrı ayrı yara yatağı kapanmasının sıralı fotoğraflarını göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, test grubu hayvanlar, iyileşme sırasında önemli ölçüde daha hızlı yara kapanması ile sonuçlanmıştır. İyileşme süresi 14 gün boyunca TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı implantasyonundan sonra, yaralar küçülmüş ve defekt alanları megaskopik kalıntı olmadan tüm test gruplarda neredeyse kapandı.



Şekil 4.17. Yara modeli oluşturulduktan sonra farklı dönemlerde yara kapanma oranları.

4.4.3.5. Histopatolojik Bulgular

Sakrifiye edilen deneklerden alınan üretra epitel dokuları doku fiksasyonu ve takibinin ardından örnekler H&E ile boyanmıştır. Mikroskopik değerlendirme amacı ile yapılan inceleme sonrasında alınan 14. gün deri örneklerinde yapılan H&E boyamaları reepitelizasyon, kapiller sayısı, enflamatuvar hücre, fibroblast sayısı, kolajen fibriller ve yağ bezleri açısından incelendi. Ticari olarak satın alınan Surgiseal stylus doku yapıştırıcısı, TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı ve kontrol grubu verileri kıyaslanarak incelendi. Sonuçlar Şekil 4.18, 4.19, 4.20’de verilmiştir.



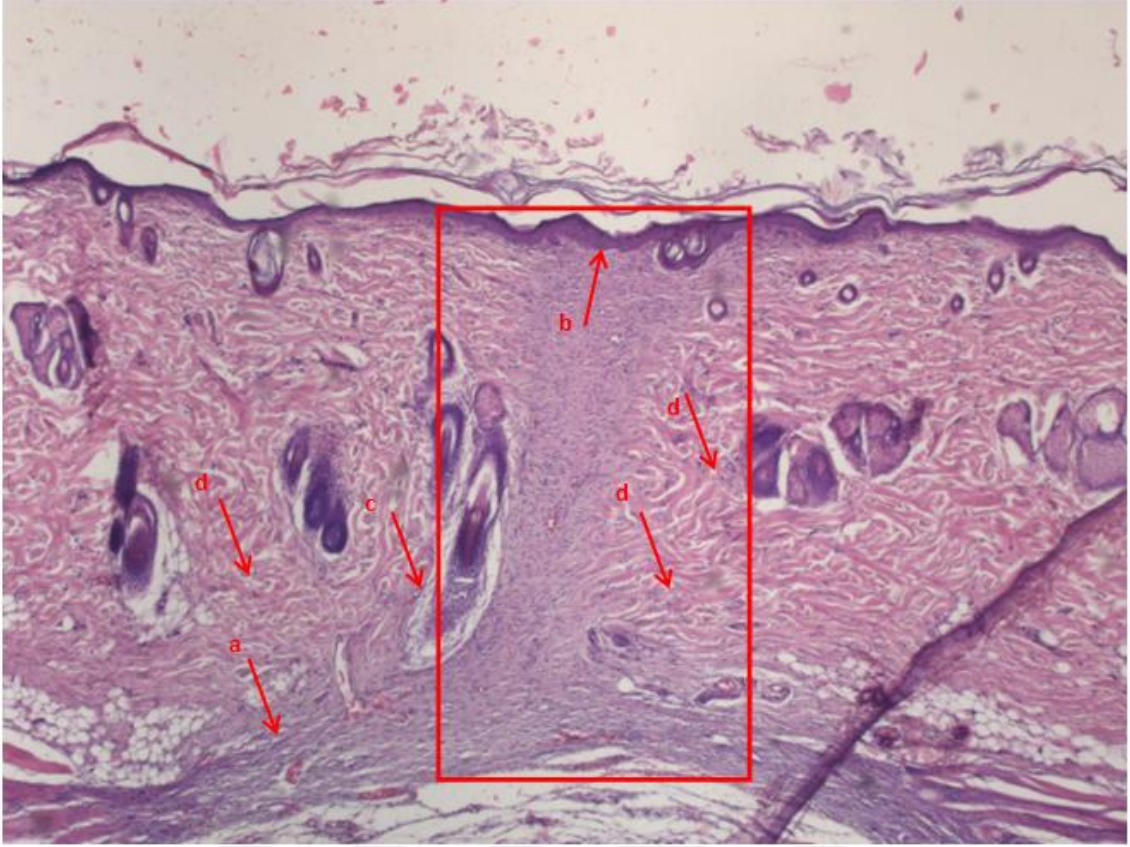
Şekil 4.18. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı kullanılan gruptan alınan doku örneğinin hematoxilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüsü

Çerçeve içindeki alan yara oluşturulan bölgeyi göstermektedir. Bazal membran düzgün şekilde ilerlemektedir. Yara bölgesinde bazal membran yapısı düzgündür. Yara bölgesi ve yakın çevresinde inflamasyon söz konusudur, iyileşme devam etmektedir. Yara bölgesi dermis sınırlarında kalmış ve hipodermiste iyileşme tamamlanmıştır.

A: Yara bölgesi ve etrafında yaygın inflamasyon söz konusudur.

B: Yara çevresinde bulunan ter bezleri normal histolojik yapısına dönmüştür.

C: Kıl folükülleri etrafı normal deri morfolojisindedir.



Şekil 4.19. Surgiseal stylus doku yapıştırıcısı uygulanan gruptan yara bölgelerinden alınan doku örneğinin hematoxilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri

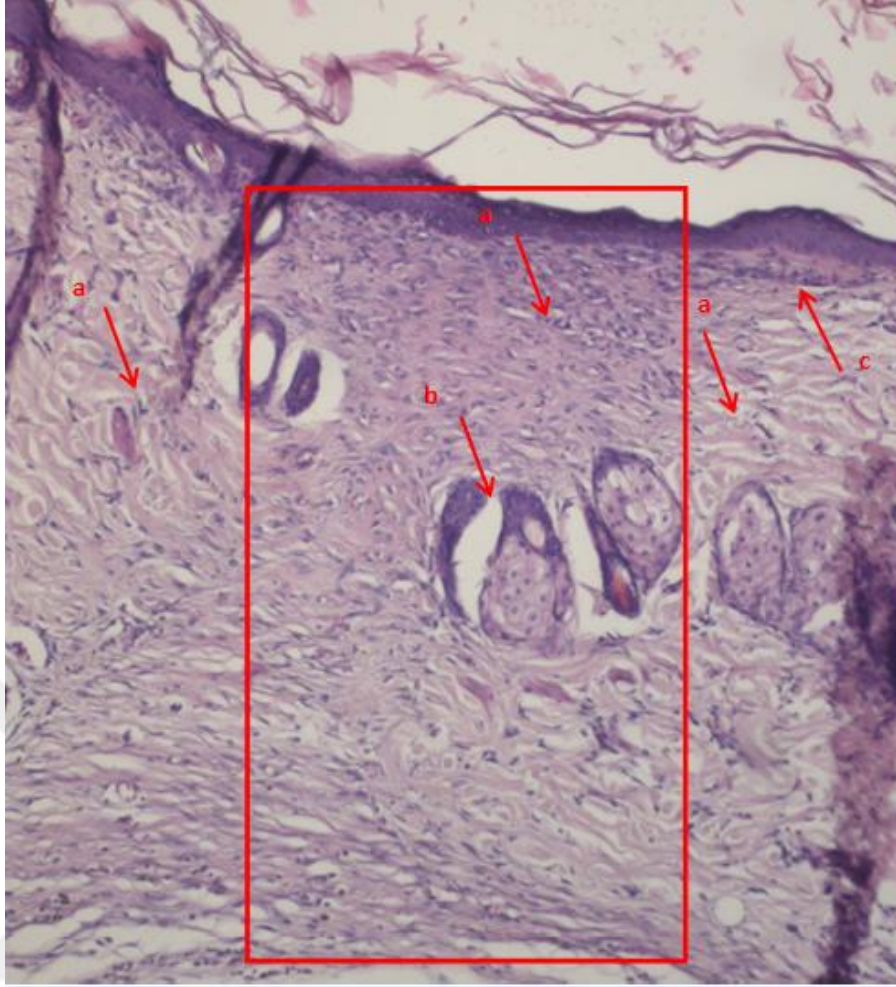
Çerçeve içindeki alan yara oluşturulan bölgeyi göstermektedir.

A: Yara bölgesinde oluşan skar tabaka dermis tabakası boyunca ve hipodermise kadar uzanmaktadır.

B: Stratum granulosum tabakası yaranın olduğu bölgede diğer bölgelere göre kalınlık göstermektedir. Bu kısım korneumun alt kısmında dış yüzeyden görünebilir alandır. Skar oluşumu dışarıdan gözle görülebilir boyuttadır.

C: Yara bölgesi yakınlarında bulunan bezler ve kıl kökleri etrafında inflamasyon ve morfolojik yapıların bozunmaya uğradığı ve henüz tamamlanmadığı gözükmektedir.

D: Yara bölgesi ve çevresinde inflamasyonun devam ettiği gözükmektedir.



Şekil 4.20. Kontrol grubunda yara bölgelerinden alınan doku örneğinin hematoksilen eozin boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri

Çerçeve içindeki alan yara oluşturulan bölgeyi göstermektedir.

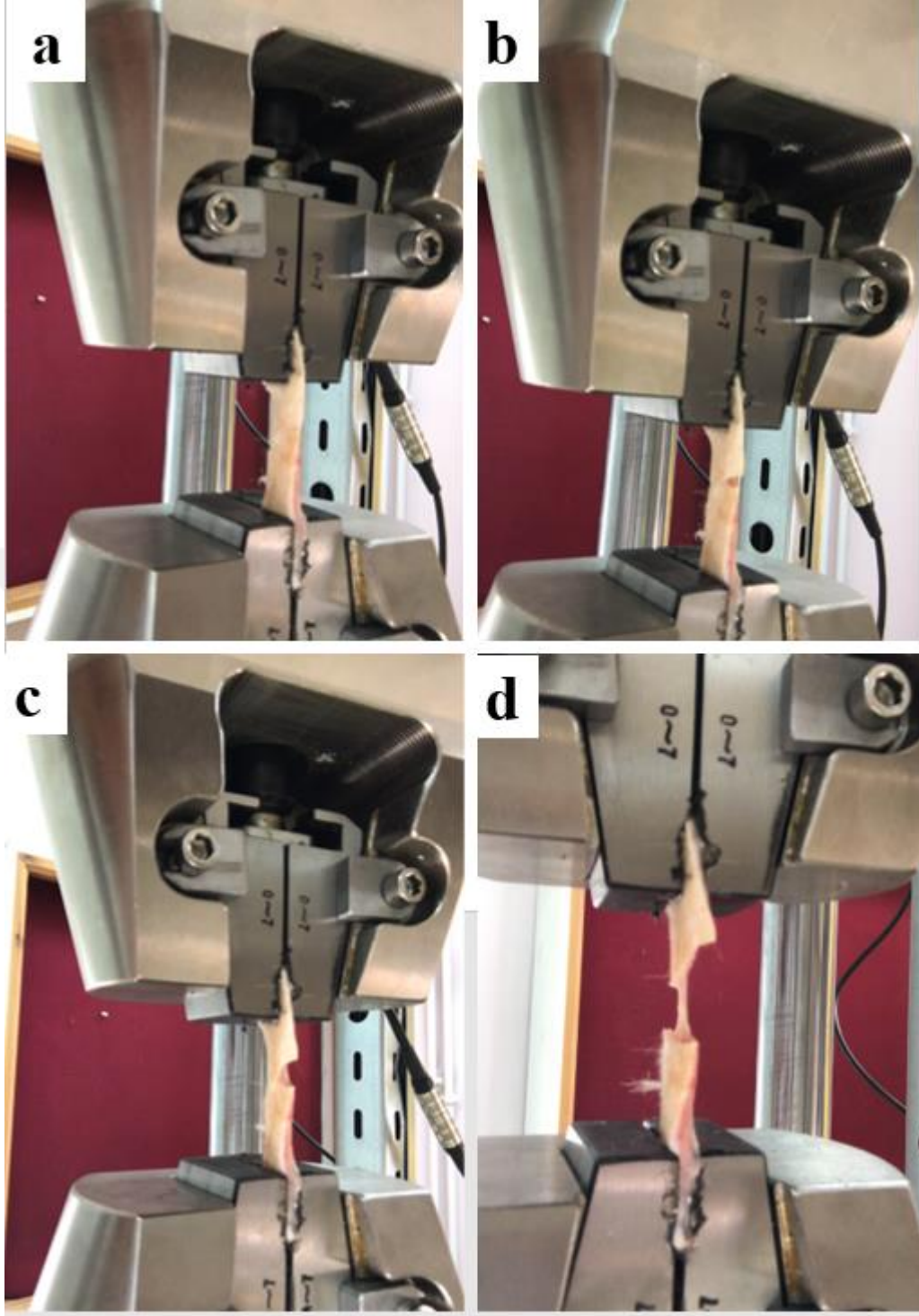
A: Yara bölgesi ve etrafında yaygın inflamasyon söz konusudur.

B: Yara bölgesindeki ter bezleri normal histolojik yapısına kısmen dönmüştür.

C: Bazal membran da kalınlaşma ve düzensiz yapı mevcuttur.

4.4.3.6. Yara iyileşmesi sonrası biyomekaniksel değerlendirme bulgular

Alınan 4x2 cm' lik deri örneklerinin kraniyal ve kaudal uçları Dinamik Yorulma Test Cihazının klemplerine skar dokusu hattı tam ortada kalacak şekilde yerleştirildi. Klemplerin birbirinden uzaklaşarak yaratacağı gerilme hızı 10 mm/dk sabit hıza ayarlandı. Deri örneklerinin gösterdiği maksimum mukavemet kuvveti Newton (N) cinsinden ölçüldü, uzama oranları da yüzdelik değer olarak kaydedildi. Deri örneklerine yapılan test işlemi Şekil 4.21' de verilmiştir.



Şekil 4.21. Deri örneğine yapılan mukavemet testi. a) Örneğin cihaz klemplerine yerleştirilmesi, b) Örneğin ilk yırtılma anı, c) Örneğin yırtılmaya devam eden görüntüsü, d) Örneğin tam kopma öncesi gösterdiği maksimum direnç.

Yapılan biyomekaniksel değerlendirmeler sonucunda, çalışmada yer alan tüm grupların iyileşmiş yara alanlarından alınan deri örneklerinin mukavemet kuvvetleri Newton (N) cinsinden belirlenerek kaydedilmiştir. Tüm gruplara ait dokuların mukavemet testi

sonucu ölçülen maksimum kuvvet değerleri Newton (N) cinsinden Çizelge 4.13' de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Deney hayvanlarına ait deri örneklerine uygulanan germe işlemi sonrası ölçülen maksimum kuvvet

| Deney Hayvanı Sayısı | Maksimum kuvvet (N) | | |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | TA-PEG/PVA Doku Yapıştırıcısı | Ticari Doku Yapıştırıcısı Grubu | Kontrol Grubu |
| 1 | 5,6 | 5,1 | 5,4 |
| 2 | 9 | 8,3 | 8,8 |
| 3 | 14,4 | 3,8 | 4,5 |
| 4 | 5,3 | 6,5 | 5,2 |
| 5 | 8,2 | 4,9 | 6,7 |
| 6 | 7,2 | 5,4 | 4,3 |
| 7 | 9,6 | 5,7 | 7,6 |
| Ortalama ±SD | 8,47 ±3,07 | 5,67 ±1,42 | 6,07 ±1,68 |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıbbi uygulamalar için çeşitli doku yapıştırıcıları geliştirilmiş olmasına rağmen, biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyouyumlu, sürdürülebilir hemostaz yeteneği, ıslak dokulara kuvvetli yapışması, yara iyileşmesine katkı sağlaması, kullanım kolaylığı, istenen kozmetik sonuçlar vermesi, maliyetin uygun olması ve farklı insan dokuları için uygun olması dahil olmak üzere tüm tıbbi ve cerrahi gerekliliklere uyan özel bir doku yapıştırıcısı geliştirmek zordur.

Yapıştırıcının biyouyumluluğu, yapışma dayanıklılığı, bağlanma etkinliği, bağ kuvveti ve raf ömrü açısından her bileşenin oynayacağı özel bir rol vardır ve iyi düşünülmüş bir formülasyon, performans geliştirmede önemli bir rol oynayacaktır. Bu nedenle, özel bir kimyasal grup içererek biyokimyasal reaksiyonlarla çapraz bağlanan doğal polimerlere dayalı doku yapıştırıcılarının ve doku yapıştırıcılarını taklit eden biyomimetik polimerlerin, gelecek nesil cerrahi yapıştırıcılar için büyük potansiyel göstermesi beklenmektedir.

Bu tez kapsamında sentetik özellikte ancak biyouyumlu olduğu FDA tarafından onaylanmış PEG ve PVA polimerleri ve bu polimerleri antimikrobiyal özelliği, adezyon özellik sağladığı bilinen tannik asit çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak çok amaçlı kullanıma uygun olması tercihiyle bir doku yapıştırıcısı hazırlanmıştır. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı hazırlandıktan sonra *in vitro* sitotoksosite testi, agar difüzyon testi, ikili boyama yöntemi, genotoksosite ve hücre proliferasyonu testleri ile toksisite testleri gerçekleştirilmiştir. *In vitro* yara modeli çalışması yapılarak hücreler üzerinde proliferatif etkisi araştırılmıştır. Kan ile etkileşim testlerinden hemoliz testi ile hemolitik etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinliği gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde gösterilmiştir. Ayrıca doku yapıştırıcısının *in vivo* biyouyum etkinliği dermal sensitizasyon, deri irritasyon ve subkronik sistemik toksisite testleri ile araştırılmıştır. Son olarak doku yapıştırıcısının amacına uygunluğu etkinlik testi yapılarak gösterilmiştir.

PEG ve PVA gibi malzemelerin tümü biyolojik olarak uyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve iyi hidrofiliğe sahiptir, bu da onları biyomalzeme tasarımında kullanmak için iyi adaylar yapar (Xiao, Wu, Zhou, Qian ve Hu, 2017)

FocalSeal®, DuraSeal™ ve CoSeal® gibi PEG bazlı birçok doku yapıştırıcısı biyomedikal malzeme FDA tarafından onaylanmıştır. FocalSeal®, toksik olmaması,

immünojenik olmaması ve biyo-emilebilir olması avantajlar sunar. FocalSeal® esas olarak astarlar ve sızdırmazlık maddelerinden oluşur. FocalSeal® kullanılırken, astar önce yara yüzeyine fırçalanır, ardından PEG bazlı yapışkan malzeme uygulanır ve fotoçapraz bağlanma elde etmek için en sonunda görünür ışık uygulaması gerçekleştirilir (Yang, Yu, Wang, Liu ve Liu, 2022).

Günümüzde, yapışkan hidrojeller olarak yaygın şekilde kullanılabilen başlıca dört tür malzeme vardır: birincisi, kitosan, hyaluronik asit, kondroitin sülfat, aljinat, dekstran, vb. ile temsil edilen doğal polisakkaritler; ikincisi, poli(y-glutamik asit)(y-PGA), e-polilisin (e-PL), tioktik asit, vs. ile temsil edilen poliamino asitler ve bunların analog polimerleridir; üçüncüsü, jelatin, ipek fibroin vb. ile temsil edilen yapışkan proteinlerdir; dördüncüsü, PEG, polivinilpirolidon (PVP), polivinil alkol (PVA) vb. tarafından temsil edilen sentetik polimerlerdir. Bu arada, araştırmacılar, doku yapışması gibi hidrojel özelliklerini geliştirmek için polifenollerini kullanmaya da heveslidirler (Yang vd., 2022).

Çalışmalar, hidrojellerin hemostatik performansının yalnızca fiziksel sızdırmazlığa değil, aynı zamanda yara özlerini emerek pıhtılaşma faktörlerinin birikmesine de bağlı olduğunu göstermiştir. Örneğin, bir biyo-yapışkan hidrojelin yapışkanlığı ile birleştiğinde, hemostaz sağlamak için yarayı mühürlemekle kalmaz, aynı zamanda yara ile yara arasındaki temastan kaynaklanan potansiyel enfeksiyon risklerini önlemek için yara bölgesine uzun süre sorunsuz bir şekilde yapışır. dış ortam. Üç boyutlu ağ yapısına ve yüksek mekanik güce sahip bir hidrojel, yara salgılarını emebilir, yara iyileşmesi için nemli bir ortam sağlayabilir, iç ve dış hemostaz sağlayabilir, doku rejenerasyonunu uyarabilir ve hemostazdan sonra yara iyileşmesini destekleyebilir (He vd., 2022).

Tannik asit, prosiyanidinler ve dopamin gibi doğal olarak türetilmiş polifenollerin hemostatik, antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Tannik asidin (TA) fenolik hidroksil grubunun kanla etkileşerek kanın hızla pıhtılaşmasını sağlayabileceği ve TA'nın hemostatik bir yapıştırıcı olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir. TA aynı zamanda polivinilpirolidon, PEG ve jelatin dahil olmak üzere sentetik polimerler ve biyomakromoleküllerle etkileşime geçmek için moleküler bir çapraz bağlayıcı olarak da kullanılabilir. Tanik asit, özellikle, biyoyapışkan sentezinde temel bir bileşen olarak aşağıdaki kriterleri karşılar: (i) hidrojen ve iyonik bağ veya hidrofobik etkileşimler yoluyla yoğun polimerik çapraz bağlar sağlayan beş kollu polifenol yapısına bağlı çeşitli bağlanma işlevleri, (ii) peptitlerin amino gruplarıyla kovalent etkileşimler, jelatin bazlı yapıştırıcılarda geliştirilmiş mekanik özelliklere yol

açar, (iii) oksitlendiğinde, güçlü doku yapışması sağlamak için doku ile kimyasal olarak bağlanabilen pirogallol parçaları ve (iv) oksitlenmiş tanenlerin burukluğuna ve zar etkisine bağlı doğuştan gelen antimikrobiyal yetenekler (Guo vd., 2022). Bu avantajlara rağmen, çoklu kovalent olmayan etkileşimleri hidrojenleri ağ oluşumundan ziyade koaservasyona yönlendirme eğiliminde olduğundan, tannik asit nadiren biyoadeziv formülasyonlara dahil edilir.

Deniz midyelerinin nemli bir ortamda süper yapışmasından ilham alan, dopamin bazlı su altı ıslak bağlanma teorisi yaygın olarak bilinmektedir ve çok sayıda dopamin bazlı biyolojik doku yapışkan hidrojel geliştirilmiştir (He vd., 2022). Örneğin, Guo ve arkadaşları, sadece iyi yapışma özelliğine sahip olmakla kalmayıp aynı zamanda enjekte edilebilir, antibakteriyel, iletken, hemostatik ve antioksidan fonksiyonlar gibi çoklu fonksiyonlara sahip olan jelatin aşılı dopamin bazlı karbon nanotüp yüklü bir hidrojel sentezlediler (Liang, Zhao, Hu, Han ve Guo, 2019).

Zhang et al., hızlı hemostatik performansa sahip bir SA-DA (sodyum aljinat-dopamin) kompozit hidrojel hazırladı. Bu çalışmada, enfekte yaraları tedavi etmek için BTTP+ biyosidinin çift fiziksel olarak çapraz bağlanmış bir PVA/SA DA çift ağ (DN) hidrojeline elektrostatik olarak dahil edilmesi ile dopamin aşılı sodyum aljinat (SA-DA) zincirleri, PVA ağında kovalent olmayan bağlarla (π - π istifleme ve hidrojen bağları) iç içe geçer ve dağılır ve bu arada hidrojen bağlarıyla PVA ağına bağlanır (Lei, Zhang ve Zhang, 2021).

Y. Yang et al., polietilen glikol monometil eter modifiye glisidil metakrilat işlevselleştirilmiş kitosan (CSG-PEG), metakrilamid dopamin (DMA) ve çinko iyonu bazlı foto çapraz bağlı çok işlevli antibakteriyel yapıştırıcı antioksidan ve yara iyileşmesini teşvik eden hemostatik hidrojel yara örtüleri geliştirdiler (Yang ve Liang, 2022).

TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının L929 fibroblast hücreleri üzerinde MTT testi ve agar difüzyon testi ile sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda MTT testi nicel verilerine göre 24 saat inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyonda %56,219 \pm 1,17 canlılık elde edilmiştir. MTT yöntemi hücreler üzerinde doku yapıştırıcısının direkt etkisini göstermek için uygulanmıştır. Ancak doku yapıştırıcısının fiziki yapısı düşünüldüğünde daha uygun yöntemin in-direkt yöntem olarak agar difüzyon yöntemi olduğu düşünülerek L929 fibroblast hücreleri üzerinde agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Bunun sonucunda 24 saat inkübasyonda L929 fibroblast hücreleri

üzerinde hafif sitotoksik etki gösterdiği dekolarizasyon ve lizis indeksi hesabında bulunmuştur.

M.A. Gwak et al., çeşitli substratlara yapışmasını iyileştirmek için Hiyaluronik asit(HA) polimerinin dopamin ile reaksiyona sokulmasıyla bir HA-katekol konjugatı (HA-Cat) sentezlediler. Ayrıca, tannik asidin (TA) HA-Cat/TA hidrojellerinin yapışma mukavemeti ve basınç mukavemeti üzerindeki etkisi, çapraz bağlama için kullanılan NaIO₄ miktarına ve TA içeriklerine göre incelenmiştir. HA-Cat/TA hidrojelleri üzerinde tohumlanan fibroblastın sitotoksitesisi, Live/Dead metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. TA içeren veya içermeyen HA-Cat/TA hidrojellerinin hücre canlılığı, 72 saat sonra floresan görüntülerle analiz edilmiştir. Buna göre TA içeren HA-Cat hidrojelinin hücreler için sitotoksik olmadığını göstermişlerdir (Gwak vd., 2021).

Wang et al., yaptıkları bu çalışmada hemostatik malzemeler olarak biyouyumlu yeni in situ hidrojeller tasarlandı ve enzimatik çapraz bağlama yoluyla "-polilisin-aşılı poli(etilen glikol) ve tiramin bazlı doku yapıştırıcıları hazırlanmıştır. Hidrojellerin sitotoksitesisi, hidrojellerin ekstraktlarının L929 fare fibroblast hücrelerinin tek tabakaları ile temas ettirilmesiyle ISO standartları (TS EN ISO 10993) test yönteminden uyarlanan bir prosedüre dayalı olarak değerlendirildi. MTT yöntemi uygulanan bu çalışmada, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyondan sonra %100, % 50, % 25 ekstrakt ile L929 fibroblast hücre aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın gözlenmediği bulunmuştur (Wang, Zhou, Liu ve Feng, 2015).

Burada, tannik asit (TA), polietilen glikol (PEG) ve jelatinden (TPG) oluşan üçlü kompleks bir koaservat, basit fiziksel harmanlama yöntemiyle üretilen yeni bir biyoyapışkan olarak önerilmiştir. Yapıştırıcıların sitotoksitesisi L929 fibroblast hücrelerinde 24, 48, 72 saat süreli inkübasyonlarla in-direkt yöntem kullanılarak CCK-8 sitotoksitesite test kiti ile değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre yapışkanların %90 üzerinde canlılık gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada hemolitik etki testine tabi tutulan biyoyapışkanların non-hemolitik reaksiyon gösterdiği bulunmuştur (Li vd., 2022).

Doku yapıştırıcısının L929 fibroblast hücrelerinde apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için ikili boyama yöntemi uygulanmıştır. MTT yönteminde alınan konsantrasyon verilerine göre üç ayrı konsantrasyonda 24 saat süre ile L929 fibroblast hücreleri ait apoptotik ve nekrotik indeks hesaplanmıştır. En yüksek konsantrasyonda % 22,1 ±3,4 oranında

apoptoz,% 26,6 ±5,8 oranında nekroz olduğu bulunmuştur. Konsantrasyon azaldıkça apoptotik ve nekrotik etkinin azaldığı bulunmuştur.

L929 fibroblast hücrelerinde TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve 90 saat süre ile hücre proliferasyonları incelenmiştir. Hücrelerin üzerine doku yapıştırıcısının uygulanmasının ardından ilk 24 saatte hücrelerin proliferasyonu incelendiğinde 1:8 ve 1:16 konsantrasyonlarda her ikisinde artış gözlenmiştir. 36 saat geçmesinin ardından her iki konsantrasyondada proliferasyon azalmıştır.

CHO hücreleri üzerinde doku yapıştırıcısının genotoksik özelliği mikronükleus yöntemi ile araştırılmıştır. Uzun süreli 24 saat S9 enzimi yokluğunda ve 3 saat süreli S9 enzimi varlığında ayrı ayrı tek konsantrasyonda çalışılmıştır. 24 saat süreli ve 3 saat süreli inkübasyonlarda hücreler üzerinde negatif kontrole benzer mikronükleus oluşumu gözlenmiştir.

TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının fibroblast göçü üzerindeki etkisi, hücre alanlardaki azalmanın incelenmesi yara iyileşme sürecinin taklit edilmesi yoluyla nicel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre 24. ve 48. saatlerde negatif kontrole kıyasla hücre göçünü olumlu etkilediği, ancak negatif kontrole göre daha hızlı kapanma göstermediği gözlenmiştir.

Kan ile etkileşim testlerinden hemolitik etki çalışması yapılmıştır. Doku yapıştırıcısı PBS içerisinde özütlenerek hazırlanmıştır. Hemogloblin konsantrasyonu bilinen seyreltilmiş kan ile 3 saat inkübasyonun ardından hemolitik özellik göstermediği bulunmuştur.

Y. Yang et al. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada polietilen glikol monometil eter modifiye glisidil metakrilat işlevselleştirilmiş kitosan (CSG-PEG), metakrilamid dopamin (DMA) ve çinko iyonu bazlı foto çapraz bağlı çok işlevli antibakteriyel yapıştırıcı antioksidan hemostatik hidrojel yara örtüleri geliştirdiklerini bildirdiler. Bu çalışmada CSG-PEG/DMA/Zn hidrojellerinin kan uyumluluğu *in vitro* hemoliz testi ile değerlendirilmiştir. Tüm hidrojel grupları hafif açık sarı ve PBS rengiyle tutarlı, pozitif kontrol grubu ise parlak kırmızı bulunmuştur. Kantitatif sonuçlarda, sentezledikleri tüm hidrojellerin hemoliz oranının %5'ten az olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada hazırladıkları hidrojellerinin *Staphylococcus aureus* (S. aureus, Gram-pozitif bakteriler) ve *Escherichia coli*'ye (E. coli, Gram-negatif bakteriler) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterileri üzerinde yapılan MIC deneyi sonucunda mükemmel antibakteriyel özelliklere sahip olduklarını gösterdiler. (Yang vd., 2022).

TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının antimikrobiyal etkinliği iki farklı suş üzerinde gösterilmiştir. Yapılan deney sonucunda *S. aureus* suşunda doku yapıştırıcısının uygulandığı petrilere 24 saat inkübasyonun ardından %100 etkili olduğu bakteri kolonilerinden çoğalma olmadığı bulunmuştur. *E. coli* suşu ekimi yapılan petrilere doku yapıştırıcısı uygulandığında 24 saatlik inkübasyonun ardından %30 oranında bakteri kolonilerini azalttığı bulunmuştur.

Doku yapıştırıcısının *in vivo* biyoyumluluk testlerinden deri sensitizasyon testi, kobay deney hayvanları üzerinde yapılmıştır. TS EN ISO 10993-10: 2010 standardına göre, doku yapıştırıcısının serum fizyolojik ile hazırlanmış özütleri potansiyel sensitizasyon reaksiyonunu değerlendirmek için maksimum doz yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sensitizasyon testi üç aşamada gerçekleştirilmiştir; intradermal indüksiyon, local indüksiyon ve yarışma fazı. Üç fazın tamamlanmasının ardından sargı bezleri çıkarılarak 24 ve 48'inci saatlerde uygulama bölgesinde gözlemlenen değişiklikler Magnusson ve Kligman ölçeğine göre skorlanmıştır. Buna göre doku yapıştırıcısı grup ortalaması 0,5, kontrol grubu ortalaması 0,2 olarak hesaplanmıştır. Sonuç hesaplaması yapıldığında 0,3 değeri bulunmuştur, tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde doku yapıştırıcısının kobaylar üzerinde sensitizasyon etkisi göstermediği bulunmuştur.

Doku yapıştırıcısının deri irritasyon etkisinin araştırılması için TS EN ISO 10993-10 standardına göre TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının serum fizyolojik kullanılarak özütleri hazırlanmıştır. Bu özütler kullanılarak pozitif ve negatif kontrol maddeleride eş zamanlı tez doz uygulama yapılmıştır. Yamalar 4'üncü satin sonunda çıkarılmış uygulama bölgeleri serum fizyolojik ile yıkanmış ve incelenmiştir. Daha sonar hayvanların 4, 24, 48 ve 72'inci saatte gözlemler yapılmış ve 72 saat sonunda test sonlandırılmıştır. Her bir uygulama bölgesi için, standardın uygun gördüğü değerlendirme sistemine göre eritem, eskar ve ödem için deri reaksiyonları değerlendirilmiştir. Herbir hayvan için birincil tahriş skorları hesaplanmış, ve bu sonuçlardan ikincil (kümülatif) tahriş indeksi bulunmuştur. TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının, negatif kontrol ve pozitif kontrolün PII skorları sırasıyla 0,30, 0,00 ve 8 olarak bulunmuştur. Klinik gözlem incelemelerini içeren değerlendirme ve analiz sonuçlarına göre TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının irritasyon özelliği hafif ihmal edilebilir (0,30) düzeyde bulunmuştur.

Sistemik toksisitede ana unsur toksik etkinin maddenin uygulandığı yerden daha uzakta görülmesidir. Bu da maddeden salınan bileşiklerin, yan ürünlerin sistemik dolaşım

taşınması ve farklı bölgelere dağılmasıdır. Sistemik toksisitenin belirlenmesi için genellikle kemirgen hayvanlar kullanılır, bu nedenle çalışmamızda ratlar kullanılmıştır. Her iki cinsiyetten de eşit sayıda hayvan kullanılmıştır. Subkronik sistemik toksisite yöntemi bizim çalışmamızda 14 gün süre ile revize edilerek yapılmıştır. Hayvanlara 3 günlük periyotlarda periton içi enjekte edilmiş ve 14 gün sonunda nekropsi işlemi uygulanmıştır. Nekropsi öncesi kanları alınarak hemogram testi yapılmıştır. Hemogram verileri grup ortalamaları alındığında test ve kontrol gruplarında ratlara ait referans değerleri içerisinde bulunmuştur. Nekropside alınan dokulardan karaciğer dokusu ağırlığı tartılmış ve Karaciğer İndeksleri hesaplanmıştır. Sonuçlar kontrol gruplarında ve test gruplarında benzer bulunmuştur. Beyin, kalp, akciğer, karaciğer, dalak, lenf nodulları, mide, over/testis, timus, pankreas, deri, kas, böbrek dokularıfiksasyon işlemi ve takibi sonrasında preparatlar H&E boyası ile boyanmıştır. Görüntüler patolojik açıdan mikroskopta incelenmiş kontrol grubu ve test grupları arasında önemli fark görülmemiştir. Tüm bu sonuçlar toplandığında doku yapıştırıcısı sistemik subkronik toksik etki göstermemiştir.

Sıçanlar üzerinde hazırlanan TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısının etkinliğini değerlendirebilmek için, sıçanların sırt bölgesinde 2 cm uzunluğunda tüm deri katmanlarını içeren ensizyon yaraları oluşturulmuştur. Üç grup halinde planlanan deneyde Surgiseal stylus doku yapıştırıcısı uygulanmış, TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı uygulanmış ve bir gruba hiçbir şey uygulanmadan kendi halinde iyileşmeye bırakılmıştır(negatif kontrol). *In vivo* yara oluşturulan sıçanlar 14 gün boyunca takip edilmiştir. Belirli günlerde (0, 4, 7, 14'üncü gün) yara alanları fotoğraflanmıştır. 14. gün nekropsi sonrası yara bölgesinden alınan deri örnekleri biyomekaniksel değerlendirme için Kırıkkale Üniversitesi Makine ve Malzeme Laboratuvarı'na götürülmüştür. Diğer yara örnekleri formol kaplarına alınarak fiksasyon ve takibin ardından hazırlanan preparatlar H&E boyaması ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Yapılan biyomekaniksel değerlendirmeler sonucunda, çalışmada yer alan tüm grupların iyileşmiş yara alanlarından alınan deri örneklerinin mukavemet kuvvetleri Newton (N) cinsinden belirlenerek kaydedilmiştir. Maksimum germe kuvvetleri ortalama olarak bakıldığında Surgiseal stylus doku yapıştırıcısı, TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısı, negatif kontrol grubu sırasıyla; 5,67 N, 8,47 N, 6,07 N olarak hesaplanmıştır. Yaranın iyileştikten sonraki mukavemeti en iyi oranda TA-PEG/PVA doku yapıştırıcısına ait olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda temel olarak genel amaçlı kullanılması hedeflenen yapıştırma gücü yüksek biyouyumlu ve biyobozunur özellik gösteren uygulaması kolay doku yapıştırıcısı hazırlamak hedefimizdir. Bu bağlamda hali hazırda ticari olarak satılan doku yapıştırıcılarının yapıştırma güçlerinin ön plana çıkarıldığı ancak *in vitro* ve *in vivo* biyouyumluluk çalışmalarının sonuçlarının yer almadığı literatüre bu anlamda katkı sağladığı düşünülmektedir. PEG temelli doku yapıştırıcıları bulunmasına rağmen farklı kimyasal formülle yeni bir doku yapıştırıcısı geliştirilmiş olması ülkemiz ve dünyada sıklıkla kullanılan doku yapıştırıcıları iyi bir alternatif olacaktır. Özellikle etkinlik testi sonuçları bize hazırladığımız doku yapıştırıcının yara dudaklarını iyi yapıştırması, yarada enfeksiyon geliştirmemesi, yara iyileşmesini hızlandırması açısından ticari olarak denediğimiz doku yapıştırıcısına kıyasla umut vaat sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak, elde edilen kapsamlı deneysel çalışma sonuçları, günümüzde yaygın kullanıma sahip doku yapıştırıcılarına iyi bir alternatif oluşturması açısından oldukça önemlidir.

İleride hazırladığımız doku yapıştırıcısı kullanılarak farklı dokularda örneğin; beyinde dura tamirinde sütür desteği, akciğerlerde hava kaçaklarını önlemede, tendon ligament gibi diz eklem kopmalarında, vasküler kapatmada hemostatik ajan olarak kullanılması için hayvan deneylerinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Assmann, A. Vegh, M. Ghasemi-Rad, S. Bagherifard, G. Cheng, E.S. Sani, G.U. Ruiz-Esparza, I. Noshadi, A.D. Lassaletta, S. Gangadharan, A. Tamayol, A. Khademhosseini, N. Annabi. (2017). A highly adhesive and naturally derived sealant. *Biomaterials*, 140, 115–127.
2. Chow, H. Marshall, E. Zacharakis, P. Paraskeva, S. Purkayastha (2010). Use of tissue glue for surgical incision closure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Surg*, 211, pp. 114-125.
3. A.P. Duarte, J.F. Coelho, J.C. Bordado, M.T. Cidade, M.H. Gil. (2012). Surgical adhesives: Systematic review of the main types and development forecast. *Progress in Polymer Science*, 37, 1031–1050.
4. Aljghami, M.E.; Saboor, S.; Amini Nik, S. (2019). Emerging innovative wound dressings. *Ann. Biomed. Eng.*, 47, 659–675.
5. Ana M. Pinto, Miguel A. Cerqueira, Manuel Bañobre-López, Lorenzo M. Pastrana, and Sanna Sillankorva. (2020). Review Bacteriophages for Chronic Wound Treatment: From Traditional to Novel Delivery Systems. *Viruses*, 12, 235.
6. Anuj Kumara and Sung Soo Han. (2017). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 66, 159–182.
7. Ayça Bal-Ozturk, Berivan Cecen, Meltem Avci-Adali, Seda Nur Topkaya, Emine Alarcin, Gokcen Yasayan, Yi-Chen Ethan Li, Bunyamin Bulkurcuoglu, Ali Akpek, Huseyin Avci, Kun Shi, Su Ryon Shin, Shabir Hassanc. (2021). Review article, Tissue adhesives: From research to clinical translation. *Nano Today* 36, 101049.
8. Azevedo, M.M.; Lisboa, C.; Cobrado, L.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. (2020). Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: An intricate interrelationship. *Br. J. Nurs*, 29, S6–S13.
9. Bernard Horowitz and Michael Busch. (2008). Estimating the pathogen safety of manufactured human plasma products: application to fibrin sealants and to thrombin. *TRANSFUSION*;48:1739-1753.
10. Bijpai, A.K.; Saini, R. (2006). Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly (vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 17, 49–61.
11. Calles, J.A.; Tartara, L.I.; Lopez-Garcia, A.; Diebold, Y.; Palma, S.D.; Valles, E.M. (2013). Novel bioadhesive hyaluronan-itaconic acid crosslinked films for ocular therapy. *Int. J. Pharm.*, 455, 48–56.
12. Cañedo-Dorantes, L.; Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: A comprehensive review. *Int. J. Inflamm.* Volume, Article ID 3706315, 15 pages.
13. Caroline E. Fife, Kristen A. Eckert and Marissa J. Carter. (2018). Publicly Reported Wound Healing Rates: The Fantasy and the Reality. *Advances In Wound Care.*; Volume 7, Number 3.
14. Darby, I. A., B. Laverdet, F. Bonte', and A. Desmouliere. (2014). Fibroblasts

- and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*;7:301.
15. Dr. D.A. Johns M.D., Dr.R.FerlandM.D., Dr.R.DunnM.D. (2003). Initial Feasibility Study of a Sprayable Hydrogel Adhesion Barrier System in Patients Undergoing Laparoscopic Ovarian Surgery. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*. Volume 10, Issue 3, Pages 334-338.
 16. Ellis, S.; Lin, E.J.; Tartar, D. (2018). Immunology of wound healing. *Curr. Dermatol. Rep.*, 7, 350–358.
 17. Ferreira P., Pereira R., Coelho J.F., Silva A.F., Gil M.H. (2008). Modification of the biopolymer castor oil with free isocyanate groups to be applied as bioadhesive. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40, 144–152.
 18. Fleck, C.A.; Simman, R. (2010). Modern collagen wound dressings: Function and purpose. *J. Am. Col. Certif Wound Spec.*, 2, 50–54.
 19. Florian Kreppel, Stefan Kochan. (2008). Modification of Adenovirus Gene Transfer Vectors With Synthetic Polymers: A Scientific Review and Technical Guide. *Mol Ther.*;16:16-29.
 20. G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728.
 21. Grant Bochicchio, MD, MPH, James Dunne, MD, Kelly Bochicchio, RN, and Thomas Scalea, MD. (2004). The Combination of Platelet-Enriched Autologous Plasma with Bovine Collagen and Thrombin Decreases the Need for Multiple Blood Transfusions in Trauma Patients with Retroperitoneal Bleeding. *The Journal of Trauma.*;56:76–79.
 22. Grinstaff MW. (2007). Designing hydrogel adhesives for corneal wound repair. *Biomaterials*; 28:5205–14.
 23. H. Murdock, J.T. Chang, S.K. Luketich, D. Pedersen, G.S. Hussey, A. D'Amore, S.F. Badylak. (2019). Cytocompatibility and mechanical properties of surgical sealants for cardiovascular applications. *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.*, 157, 176–183.
 24. Haag, R and Kratz, F. (2006). Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* ;45: 1198–1215.
 25. Hu Li, Yan Shi, Wenxue Zhang, Miao Yu, Xiguang Chen, and Ming Kong. (2022). Ternary Complex Coacervate of PEG/TA/Gelatin as Reinforced Bioadhesive for Skin Wound Repair. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 14, 18097–18109.
 26. Huang, H.B.; Yao, J.L.; Li, L.; Zhu, F.; Liu, Z.T.; Zeng, X.P.; Yu, X.H.; Huang, Z.L. (2016). Reinforced polyaniline/polyvinyl alcohol conducting hydrogel from a freezing-thawing method as self-supported electrode for supercapacitors. *J. Mater. Sci.*, 51, 8728–8736.
 27. Hunt, T. K., H. Hopf, and Z. Hussain. (2000). Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* ;13:6.
 28. Hyung Joon Cha, Dong Soo Hwang and Seonghye Lim. (2008). Development of bioadhesives from marine mussels. *Biotechnol. J.*, 3, 631–638.
 29. J. Herbert Waite. (2002). Adhesion a` la Moule. *Integr. Comp. Biol.*, 42:1172–1180.

30. Jian Yang, Haojie Yu, Li Wang, Jian Liu, Xiaowei Liu, Yichuan Hong, Yudi Huang, Shuning Ren. (2022). Advances in adhesive hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 172, 111241.
31. Jiayue Shi, Lin Yua, Jiandong Ding. (2021). Review article, PEG-based thermosensitive and biodegradable hydrogels. *Acta Biomaterialia* 128, 42–59.
32. Jie Li, PhD, Juan Chen, MD, Robert Kirsner, PhD. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25, 9 – 18.
33. Jinshan Guo, Wei Sun, Jimin Peter Kim, Xili Lu, Qiyao Li, Min Lin, Oliver Mrowczynski, Elias B. Rizk, Juange Cheng, Guoying Qian, Jian Yang. (2018). Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. J. Guo et al. / *Acta Biomaterialia*, 72, 35–44.
34. Johnson CS, Wathier M, Grinstaff M, Kim T. (2009). In vitro sealing of clearcorneal cataractincisions withanovel biodendrimer adhesive. *ArchOphthalmol*; 127:430–4.
35. Juan Li, Jinping Suo And Runzhi Deng. (2010). Structure, Mechanical, And Swelling Behaviors Of Poly(Vinyl Alcohol)/Sio2 Hybrid Membranes. *Journal of Reinforced Plastics And Composites.*, Vol. 29, No. 4.
36. Julianne L. Holloway, Anthony M. Lowman, Mark R. VanLandingham, Giuseppe R. Palmese. (2013). Chemical grafting for improved interfacial shear strength in UHMWPE/ PVA-hydrogel fiber-based composites used as soft fibrous tissue replacements. *Composites Science and Technology.*, 85, 118–125.
37. Kamila Raziyeva, Yevgeniy Kim, Zharylkasyn Zharkinbekov, Kuat Kassymbek, Shiro Jimi and Arman Saparov. (2021). Review Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11, 700.
38. Katrin Knop, Richard Hoogenboom, Dagmar Fischer, and Ulrich S. Schubert. (2010). Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons asWell as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 6288 – 6308.
39. Krzyszczyk, P.; Schloss, R.; Palmer, A.; Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front. Physiol.*, 9, 419.
40. Kumar, TR, Soppimath, K and Nachaegari, SK. (2006). Novel delivery technologies forprotein and peptide therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol.*; 7:261–276.
41. Liangpeng Ge and Shixuan Chen. (2020). Review, Recent Advances in Tissue Adhesives for Clinical Medicine. *Polymers*, 12, 939.
42. Lígia Pereira Bré, Yu Zheng, Ana Paula Pêgo and Wenxin Wang. (2013). Taking tissue adhesives to the future: from traditionalsynthetic to new biomimetic approaches. Review Article) *Biomater. Sci.*, 1, 239-253.
43. Liu, Y.; Kopelman, D.; Wu, L.Q.; Hijji, K.; Attar, I.; Preiss-Bloom, O.; Payne, G.F. (2009). Biomimetic sealant based on gelatin and microbial transglutaminase: An initial in vivo investigation. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 91, 5–16.
44. Lu, S. Shi, H. Li, E. Gerhard, Z. Lu, X. Tan, W. Li, K.M. Rahn, D. Xie, G. Xu, F. Zou, X. Bai, J. Guo, J. Yang. (2020). Magnesium oxide-crosslinked low-

- swelling citrate-based mussel-inspired tissue adhesives. *Biomaterials*, 232.
45. Marcia G. Tonnesen, Xiaodong Feng, and Richard A. F. Clark. (2000). Angiogenesis in Wound Healing. *J. Investig. Dermatol. Symposium Proceedings*, 1:40–46.
 46. Martin, P. (1997). Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75–81.
 47. Marvin Ryou, MD, and Christopher C. Thompson, MD. (2006). Tissue Adhesives: A Review. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, Volume 8, Issue 1, Pages 33-37.
 48. Mayra A. Pantoja-Castroa, Horacio González-Rodríguez. (2011). Study By Infrared Spectroscopy And Thermogravimetric Analysis Of Tannins And Tannic Acid. *Rev. Latinoamer. Quím.* 39/3.
 49. Mero, A.; Campisi, M. (2014). Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers*, 6, 346–369.
 50. Min A. Gwak, Bo Min Hong, Ji Min Seok, Su A. Park, Won Ho Park. (2021). Effect of tannic acid on the mechanical and adhesive properties of catechol-modified hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 699–705.
 51. Mohammadreza Mehdizadeh, Hong Weng, Dipendra Gyawali, Liping Tang, Jian Yang. (2012). Injectable citrate-based mussel-inspired tissue bioadhesives with high wetstrength for sutureless wound closure. M. Mehdizadeh et al. / *Biomaterials*, 33, 7972e7983.
 52. Mohammadreza Mehdizadeh, Jian Yang. (2013). Design Strategies and Applications of Tissue Bioadhesives, Review. *Macromol. Biosci.*,13,271–288.
 53. Mati-Baouche, Pierre-Henri Elchinger, Hélène de Baynast, Guillaume Pierre, Cédric Delattre, Philippe Michaud. (2014). Review article, Chitosan as an adhesive. *European Polymer Journal*, 60, 198–212.
 54. Noriko Hiraishi, Daisaku Kaneko, Shu Taira, Siqian Wang, Masayuki Otsuki & Junji Tagami. (2015). Mussel-mimetic, bioadhesive polymers from plant-derived materials. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6, 59–62.
 55. P.Jarrett, A.Coury. (2013). 16 - Tissue adhesives and sealants for surgical applications. *Joining and Assembly of Medical Materials and Devices. Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, Pages 449-490.
 56. Peter A. Leggat, Derek R. Smith, Ureporn Kedjarune. (2007). Surgical Applications Of Cyanoacrylate Adhesives:A Review Of Toxicity.*ANZ J. Surg.*; 77: 209–213.
 57. Petra J.M. Bouten, Marleen Zonjee, Johan Bender, Simon T.K. Yauw, Harry van Goor, Jan C.M. van Hest, Richard Hoogenboom. (2014). The chemistry of tissue adhesive materials. *Progress in Polymer Science*, 39, 1375–1405.
 58. Q.V. Nguyen, M.S. Lee, J.S. Lym, Y.I. Kim, H.J. Jae, D.S. Lee. (2016). pH-Sensitive sulfamethazine-based hydrogels as potential embolic agents for transcatheter vascular embolization. *J. Mater. Chem. B*, 4, 6524–6533.
 59. Qiqi Lei, Yuwei Zhang, Wenning Zhang, Riwang Li, Ningjian Ao, Hong Zhang. (2021). A synergy between dopamine and electrostatically bound bactericide in

- a poly (vinyl alcohol) hybrid hydrogel for treating infected wounds. *Carbohydrate Polymers*, 272, 118513.
60. Ronit Bitton, Elinor Josef, Irena Shimshelashvili, Keren Shapira, Dror Seliktar, Havazelet Bianco-Peled. (2009). Phloroglucinol-based biomimetic adhesives for medical applications. *Acta Biomaterialia*, 5, 1582–1587.
 61. Roşca, A.-M.; Țuțuianu, R.; Domnica Titorencu, I. (2018). Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 59, 655–662.
 62. Rui Wang, Bo Zhou, Wei Liu, Xiao-hai Feng, Sha Li, Dong-feng Yu, Jia-cong Chang, Bo Chi and Hong Xu. (2015). Fast in situ generated e-polylysine-poly (ethylene glycol) hydrogels as tissue adhesives and hemostatic materials using an enzyme-catalyzed method. *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 29(8) 1167–1179.
 63. Ruth Duncan, Lorella Izzo. (2005). Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 57, Issue 15, 14, Pages 2215-2237.
 64. S. Enoch, D.J. Leaper. (2008). Basic science of wound healing, *Surg.*, 26, 31–37.
 65. S.Q. Cui, L. Yu, J.D. Ding. (2019). Thermogelling of amphiphilic block copolymers in water: ABA type versus AB or BAB type. *Macromolecules*, 52, 3697–3715.
 66. Saleh, B.; Dhaliwal, H.K.; Portillo-Lara, R.; Shirzaei Sani, E.; Abdi, R.; Amiji, M.M.; Annabi, N. (2019). Local Immunomodulation using an adhesive hydrogel loaded with miRNA-laden nanoparticles promotes wound healing. *Small*, 15, e1902232.
 67. Selvaraj Dhivya, Viswanadha Vijaya Padma & Elango Santhini. (2015). Wound dressings- a review. *BioMedicine*; volume 5, Article number: 22.
 68. Shin, M.; Park, E.; Lee, H. (2019). Plant-Inspired Pyrogallol-Containing Functional Materials. *Adv. Funct. Mater.*, 29, 1903022.
 69. Shuko Suzuki, Yoshito Ikada. (2010). Adhesion of Cells and Tissues to Bioabsorbable Polymeric Materials: Scaffolds, Surgical Tissue Adhesives and Anti-adhesive Materials. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24, 2059–2077.
 70. Su, L.; Zheng, J.; Wang, Y.; Zhang, W.; Hu, D. (2019). Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair. *Biomed. Pharmacother.*, 117.
 71. Sujata K. Bhatia. *Traumatic Injuries*. (2010). *Biomaterials for Clinical Applications* Springer, New York, pp. 213-258.
 72. T. Brett Reece, M.D., Thomas S. Maxey, M.D., Irving L. Kron, M.D. (2001). A prospectus on tissue adhesives. *The American Journal of Surgery*, 182, 40S–44S.
 73. T. Thambi, Y. Li, D.S. Lee. (2017). Injectable hydrogels for sustained release of therapeutic agents. *J. Control. Release*, 267, 57–66.
 74. Tottoli, E.M.; Dorati, R.; Genta, I.; Chiesa, E.; Pisani, S.; Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 12, 735.

75. Traian V. Chirila. (2022). Surgical adhesives based on silk fibroin: A critical account of past and current research. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, s 114, 103109.
76. Vowden, K. (2005). Complex wound or complex patient? Strategies for treatment. *Br. J. Commun. Nurs. Suppl.*; S6, S8, S10 passim.
77. Wang, D.A.; Varghese, S.; Sharma, B.; Strehin, I.; Fermanian, S.; Gorham, J.; Fairbrother, D.H.; Cascio, B.; Elisseff, J.H. (2007). Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue–biomaterial integration. *Nat. Mater.*, 6, 385–392.
78. Welshhans, J. L., and D. B. Hom. (2017). Soft tissue principles to minimize scarring: an overview. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.*; 25:1–13.
79. Wenzhen Zhu, Yvonne Peck, Javed Iqbal, Dong-An Wang. (2017). A novel DOPA-albumin based tissue adhesive for internal medical applications. *Biomaterials*, 147, 99e115.
80. William D. Spotnitz, M.D., M.B.A. (2012). Hemostats, Sealants, and Adhesives: A Practical Guide for the Surgeon. *The American Surgeon* December, Vol. 78(12):1305-1321.
81. William D. Spotnitz and Sandra Burks. (2008). Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox. *TRANSFUSION*; 48:1502-1516.
82. Woong-Jin Lee, Kyoungjoo Cho, Aaron-Youngjae Kim and Gyung-Whan Kim. (2022). Injectable Click Fibroin Bioadhesive Derived from Spider Silk for Accelerating Wound Closure and Healing Bone Fracture. *Materials*, 15, 5269.
83. Wu, Y.K.; Cheng, N.C.; Cheng, C.M. (2019). Biofilms in chronic wounds: Pathogenesis and diagnosis. *Trends Biotechnol.*, 37, 505–517.
84. Xueliang Xiao, Guanzheng Wu, Hongtao Zhou, Kun Qian, Jinlian Hu. (2017). Preparation and Property Evaluation of Conductive Hydrogel Using Poly (Vinyl Alcohol)/Polyethylene Glycol/Graphene Oxide for Human Electrocardiogram Acquisition. *Polymers*, 9(7), 259.
85. Y. Huang, Z. Du, T. Zheng, W. Jing, H. Liu, X. Liu, J. Mao, X. Zhang, Q. Cai, D. Chen, X. Yang. (2021). Antibacterial, conductive, and osteocompatible polyorganophosphazene microscaffolds for the repair of infectious calvarial defect. *J. Biomed. Mater. Res., A* 109, 2580–2596.
86. Ye, H.Y.; Owh, C.; Jiang, S.; Ng, C.Z.Q.; Wirawan, D.; Loh, X.J. (2016). A Thixotropic Polyglycerol Sebacate-Based Supramolecular Hydrogel as an Injectable Drug Delivery Matrix. *Polymers*, 8, 130.
87. Yin, H.M.; Qian, J.; Zhang, J.; Lin, Z.F.; Li, J.S.; Xu, J.Z.; Li, Z.M. (2016). Engineering Porous Poly(lactic acid) Scaffolds with High Mechanical Performance via a Solid State Extrusion/Porogen Leaching Approach. *Polymers*, 8, 125.
88. Yitong Li, Jie Cao, Shangcong Han, Yan Liang, Tingting Zhang, Han Zhao, Libin Wang and Yong Sun. (2018). ECM based injectable thermo-sensitive hydrogel on the recovery of injured cartilage induced by osteoarthritis. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, Vol. 46, No. S2, S152–S160.
89. Yongping Liang, Jiahui He, and Baolin Guo. (2021). Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano*, 15, 8, 12687–12722.

90. Yongping Liang, Xin Zhao, Tianli Hu, Yong Han, Baolin Guo. (2019). Mussel-inspired, antibacterial, conductive, antioxidant, injectable composite hydrogel wound dressing to promote the regeneration of infected skin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 556, 514–528.
91. Yuanmeng He, Kaiyue Liu, Chen Zhang, Shen Guo, Rong Chang, Fangxia Guan and Minghao Yao. (2022). Facile preparation of PVA hydrogels with adhesive, self-healing, antimicrobial, and on-demand removable capabilities for rapid hemostasis. *Biomater. Sci.*, 10, 5620–5633.
92. Yuewei Xi, Juan Ge, Min Wang, Mi Chen, Wen Niu, Wei Cheng, Yumeng Xue, Cai Lin, and Bo Lei. (2020). Bioactive Anti-inflammatory, Antibacterial, Antioxidative Silicon-Based Nanofibrous Dressing Enables Cutaneous Tumor Photothermo-Chemo Therapy and Infection-Induced Wound Healing. *ACS Nano*, 14, 3, 2904–2916.
93. Yufei Ai, Yaohua Wei, Jun Nie, Dongzhi Yang. (2013). Study on the synthesis and properties of mussel mimetic poly(ethylene glycol)bioadhesive. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120, 183–190.
94. Yutong Yang, Yongping Liang, Jueying Chen, Xianglong Duan, Baolin Guo. (2022). Mussel-inspired adhesive antioxidant antibacterial hemostatic composite hydrogel wound dressing via photo-polymerization for infected skin wound healing. *Bioactive Materials*, 8, 341–354.
95. Zixian Bao, Minghong Gao, Yue Sun, Rui Nian, Mo Xian. (2020). Review, The recent progress of tissue adhesives in design strategies, adhesive mechanism and applications. *Materials Science & Engineering, C* 111, 110796.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :

Doğum Tarihi :

Yabancı Dil :

Eğitim Durumu :

Lisans :

Yüksek Lisans

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar
(2012)

Yayımları (SCI) :

Mehmet Can, Sahin Demirci, Yildiz Yildirim, **Canan Çakır Çoban**, Mustafa Turk, Nurettin Sahiner. Modification of halloysite clay nanotubes with various alkyl halides, and their characterization, blood compatibility, biocompatibility, and genotoxicity. Materials Chemistry and Physics, 259 (2021) 124013.

Yayımları (Diğer) :


Gürer G. Budak, Seçil Özkan, Mehmet Budak, Tamay Şeker, Bahar Meryemoglu, Şükran Selin Miran, **Canan Çakır Çoban**, Orkun Tarkun. Preclinical toxicity test results of a new antiviral-immune-modulator compound consisting of flavonoid molecules (COVID-19 clinical trial preliminary data). Exploration of Medicine, 2022;3:1–21.

Araştırma Alanları :

Biyoloji, hücre kültürü, antikanser aktivite, in vitro in vivo biyouyumluluk, biyomühendislik, biyomalzeme,

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

| | |
|---|------------------------------|
|  | Toplantı Tarihi : 24.11.2021 |
| | Toplantı Sayısı : 2021 / 11 |
| | Karar No : 45 |

Haybis No: 14155

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

1) Projenin Başlığı:
Genel amaçlı doku yapıştırıcısı hazırlanması ve uygulanması.

Proje Yöneticisi:
Unvan, Adı, Soyadı : Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Anabilim Dalı : Biyomühendislik Bölümü
Fakülte/Enstitü : Mühendislik Fakültesi
Üniversite/Kurum : Kırıkkale Üniversitesi
Cep Telefonu : 05353977172
İş Telefonu : 03183572461/107
E-Mail Adresi : mtrk.35@gmail.com
Yazışma Adresi : Kırıkkale üniversitesi mühendislik fakültesi, biyomühendislik bölümü
Deneysel Hayvan Kullanım Sertifikası var/ yok
Deneysel Hayvan Kullanım Sertifikası yıl/sayı 2009/

3) Yardımcı Araştırmacılar:

| Sayı | Araştırmacının |
|------|---|
| 1) | Unvanı, Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Siyami KARAHAN Projedeki görevi: Yardımcı Araştırmacı Görev yeri: Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Adres: Kırıkkale Üniversitesi, Yahşihan/ Kırıkkale E-Mail Adresi: siyamikarahan@yahoo.com Telefon numarası: 05372072558 |
| 2) | Unvanı, Adı ve Soyadı: Doç Dr. Hüsamettin Ekici Projedeki görevi: Yardımcı Araştırmacı Görev yeri: Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Adres: Kırıkkale Üniversitesi, Yahşihan/ Kırıkkale E-Mail Adresi: husamettinekici@gmail.com Telefon numarası: 05054754956 |
| 3) | Unvanı, Adı ve Soyadı: Dr. Öğ. Üyesi Ali Kumandaş Projedeki görevi: Yardımcı Araştırmacı Görev yeri: Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Adres: Kırıkkale Üniversitesi, Yahşihan/ Kırıkkale E-Mail Adresi: alikumandas@kku.edu.tr Telefon numarası: 03183574242 / 6083 |
| 4) | Unvanı, Adı ve Soyadı: Uzm. Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN Projedeki görevi: Yardımcı Araştırmacı Görev yeri: KÜBTUAM Adres: Ankara- Kırıkkale yolu 7. Km Yenışehir/ Kırıkkale |

| | |
|----|---|
| | E-Mail Adresi: canancakir06@gmail.com Telefon numarası: 05438185731 |
| 5) | Unvanı, Adı ve Soyadı: Doç Dr. Mustafa ÖĞDEN Projedeki görevi: Yardımcı Araştırmacı Görev yeri: Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi A.B.D. Adres: Ankara- Kırıkkale yolu 7. Km Yenişehir/Kırıkkale E-Mail Adresi: mustafaogden@kku.edu.tr Telefon numarası: 05058540296 |

4) Proje Tarihleri:
Proje Başlangıç Tarihi : 01.12.2021
Proje Bitiş Tarihi : 01.12.2022
Proje Süresi : 1 yıl

5) Hayvan Türü, Irkı, Sayısı, Cinsiyeti, Yaşı, Ağırlığı:

| Tür | İrk | Sayı | Cinsiyet | Yaş | Ağırlığı |
|---|---------------|------|---|-----|-----------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Sıçan | albino wistar | 88 | <input checked="" type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> D | | 250-300 g |
| <input type="checkbox"/> Kobay | | 12 | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> D | | |
| <input type="checkbox"/> Tavşan | albino | 5 | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> D | | |

6) Projenin Özeti

Yapılması planlanan bu tez çalışmasında planlanan; genel amaçlı kullanılmak üzere biyoyumlu doku yapıştırıcıları hazırlamaktır. Hazırlanan doku yapıştırıcıları in-vitro ve in-vivo ortamda karakterize edilecektir.

Farklı formülasyonlarda hazırlanması planlanan doku yapıştırıcısı, içeriğindeki bileşenleri, fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla FT-IR, doku yapıştırıcısının kimyasal yapı karakterizasyonunu analiz etmek için, manyetik alana maruz kalan atom çekirdeklerinin elektromanyetik ışınları absorblama ilkesine dayanan ¹H-NMR tekniği kullanılacaktır. NMR ile karakterizasyonu yapılacaktır. Ve doku yapıştırıcısının yüzey morfolojileri SEM analiz teknikleri ile belirlenecektir.

Hazırlanan doku yapıştırıcısının çekme ve yapışma kuvvetini belirlemek için uygun çekme ve yapışma testleri yapılacaktır. Polimerlerin biyobozunluluk özellikleri değerlendirmek için biyobozunluluk testleri yapılacaktır.

İn vitro hücre kültür sisteminde doku yapıştırıcısının biyoyumluluk özelliklerinin değerlendirilmesi için; sitotoksisite (MTT), apoptoz-nekroz testi, genotoksisite (Mikronükleus), RTCA Xcelligance (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi) ile proliferasyonun takip edilmesi, in vitro yara iyileşmesi ve kan uyumu hemoliz testleri yapılacaktır.

İn vivo biyoyumluluk testleri için, Histopatolojik/İmmunohistokimyasal Analizler, Etkinlik Testi, sensitizasyon testi, İritasyon, Subkronik Sistemik Toksikite Testi, Deri Altı Lokal İmplantasyon Testi yapılacaktır.

KARAR: Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Anabilim Dalı Öğr. Üyesi, Prof. Dr. Mustafa TÜRK'ün " Genel amaçlı doku yapıştırıcısı hazırlanması ve uygulanması " isimli projesi, Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Hayvanları Araştırma Ünitesinde yapılması şartı ile, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik İlkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Başkan

Prof. Dr. Murat YILMAZ

Başkan Vekili

Prof. Dr. Umur TEKİN

Üye

Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Üye

Prof. Dr. Serkan ERAT

Üye

Doç. Dr. Baruk PEHLİVANLI

Üye

Doç. Dr. Gülçin AYDIN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nahit PAMUKOĞLU

Üye

Yusuf BOŞTANCI

Üye

Mustafa AKIN

Üye

Dr. Yaşar ŞAHİN

Üye

Tarım ve Orman Bakanlığının 15.02.2014 tarihli Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren Hayvan Deneysel Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik hükümlerince karar alınmış olup ilgili yönetmelik hükümlerine uymayanlara ve yetkisi olmadığı halde hayvan deneyi yapanlara 5199 Hayvanları Koruma Kanununun 28 inci maddesinin birinci fıkrasının (f) bendi gereğince işlem uygulanır.

3