ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YARA İYİLEŞMESİNDE KİTOSAN/ZNO/AG NANOKOMPOZİTİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI tarafından hazırlanan **Yara İyileşmesinde Kitosan/ Zno/Ag Nanokompozitinin Antimikrobiyal Etkisi** adlı tez çalışması 27/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR

Eş Danışman : Prof. Dr. Sabah M. THAHAB

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Müslüm KUZU
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Karabük Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **Yara İyileşmesinde Kitosan/ Zno/Ag Nanokompozitinin Antimikrobiyal Etkisi** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, intihal içermediğini beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (27/01/2023).

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YARA İYİLEŞMESİNDE KİTOSAN/ZNO/AG NANOKOMPOZİTİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Eş Danışman: Prof. Dr. Sabah M. THAHAB

Bu çalışmada, Kitosan (CS)/Çinko Oksit (ZnO)/Gümüş (Ag) hidrojel nanokompozitinin Ag ve ZnO nanoparçacıklarının (NP'ler) yeşil sentez yöntemi kullanılarak hazırlanması incelenmekte ve araştırılmaktadır. Ag ve ZnO NP'ler Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Ultraviolet-Visible spektroskopisi (UV-Vis) kullanılarak karakterize edilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü çapı (18-20)nm olan Ag NP'ler elde edmiştir. Ag ve ZnO NP'lerin farklı ağırlık yüzdeleri (wt%) kullanılarak CS/ZnO/Ag nanokompozitlerinin antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Bir yara örtüsü olarak CS/ZnO/Ag hidrojel nanokompozitleri, ZnO ve Ag nanoparçacıklarının varlığı ile antibakteriyel, antimikrobiyal ve anti-enflamatuar ajanlar olarak kullanılmak üzere yapılabilir. Cs/ZnO/Ag nanokompozitleri, *K. pneumoniae, S. aureus* ve *E. coli* bakterileri gibi gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiyi yükseltmek için hazırlanmıştır. Sırasıyla (1:1, 2:1 ve 3:1) karıştırma oranı içinde daha yüksek ZnO NP konsantrasyonlarında farklı (ZnO/Ag) NP oranlarına sahip CS/ZnO/Ag nanokompozitler kullanılarak daha yüksek antibakteriyel aktiviteler gözlemlenir. *Staphylococcus aureus*, ZnO NP oranı arttıkça sırasıyla (9, 9 ve 10) inhibisyon zonu büyümesi gösterir. Aynı şekilde, *Klebsiella pneumoniae* sırasıyla (9, 10 ve 11) inhibisyon zonu büyümesi gösterirken, *E. coli* için de sırasıyla (8,10 ve 10) inhibisyon zonu büyümesi elde edilir. Geleneksel pamuklu gazlı bez, erkek Wistar sıçanlarının yaralı dokusunu onarma sürecinde modern yara pansuman özelliklerini elde etmek için CS/ZnO/Ag nanokompozit ile işleme tabi tutuldu. Pamuklu gazlı bez örnekleri daldırma, kurutma ve kürleme yöntemi ile CS/ ZnO/ Ag nanokompozit ile emprenye edildi. CS/ZnO/Ag nanokompozit ile tedavi edilen yaralarda, diğer gruplara kıyasla, yaralamadan sonraki 18. günde daha iyi bir yara iyileşme paterni gözlemlenmiştir. Bulgularımız, CS/ZnO/Ag nanokompozitinin yara iyileşmesini hızlandırdığını ve yara kapama oranını yükselttiğini gösterdi.

2023, 63 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Kitosan, Silver, Nanoparticles, Antimikrobiyal, *S. aureus*

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ANTIMICROBIAI EFFECT OF CHITOSAN/ZNO/AG NANOCOMPOSITE FOR WOUND HEAIING

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Co-Advisor: Prof. Dr. Sabah M. THAHAB

In this study, the preparation of chitosan (CS)/ Zinc Oxide (ZnO)/ Silver (Ag) Hydrogel nanocomposite using green method synthesis of Ag and ZnO nanoparticles(NPs) are studied and investigated. Ag and ZnO NPs are characterized using Transmission Electron Microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Ultra violet -Visible spectroscopy (UV-Vis). Ag NPs with an average particles size diameter (18-20)nm is obtained. The antibacterial activity of the CS/ZnO/Ag nanocomposites using different weight percentage (wt%) of Ag and ZnO NPs are examined. Hydrogel CS/ ZnO/ Ag nanocomposites as a wound dressing could be made to act as antibacterial antimicrobial and anti-inflammatory agents in the presence of ZnO and Ag Nanoparticles. Cs/ZnO/Ag nanocomposites are prepared to elavate the antimicrobial effect against gram-positive and gram-negative microorganisms such as *K. pneumoniae, S. aureus* and *E. coli* bacteria receptively. Higher antibacterial activities are observed using CS/ZnO/Ag nanocomposite with different (ZnO/Ag) NPs ratios at higher concentrations of ZnO NPs within a mixing ratio of (1:1, 2:1 and 3: 1) respectively. *Staphylococcus aureus* shows an inhibition zone growth of (9,9 and 10) respectively as ZnO NPs ratio increases. As well as, the inhibition zone growth of (8, 10 and 10) for *E. coli* are obtained respectively, while *Klebsiella pneumoniae* shows an inhibition zone growth of (9, 10 and 11) respectively. Conventional cotton gauze was treated with CS/ZnO/Ag nanocomposite for achieving modern wound dressing properties in a process of repairing injured tissue of male Wistar rats. Cotton gauze samples were impregnated with CS/ZnO/Ag nanocomposite by the dip, dry, and cure method. A better healing pattern of wound closure is observed in CS/ ZnO/ Ag nanocomposite treated wounds at day 18th after wounding in comparison to the other groups. Our findings specified that CS/ ZnO/ Ag nanocomposite hasten wound healing and upsurges wound closure ratio.

2023, 63 pages

Keywords: Chitosan, Silver, Nanoparticles, Antimicrobial, *S. aureus*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR'a ve eş danışmanım Prof. Dr. Sabah M. THAHAB'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

Çankırı, Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **6**
2.1 Yara Patofizyolojisi ve Yara İyileşme Süreci **6**
2.2 Antimikrobiyal Aktivite Gösteren Yara Adreslemesi **7**
2.3 Patojenik Bakteri ile Enfekte Olmuş Yara **9**
2.3.1 *Staphylococcus aureus* **11**
2.3.2 *Klebsiella pneumoniae* **12**
2.3.3 *Escherichia coli* **12**
2.4 Yara İyileşmesi İçin Nanopartiküller **13**
2.4.1 Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) **14**
2.4.2 Çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler) **15**
2.4.3 Kitosan nanopartikülleri (CS NP'ler) **18**
2.5 Nanopartikül Üretiminde Yeşil Bir Yöntem Olarak Okaliptüs camaldulensis **19**
2.5.1 Metalik nanopartiküller ile okaliptüs **20**
3. MATERYAL VE METOT **21**
3.1 Materyaller **21**
3.1.1 Kullanılan ekipman ve malzemeler **21**
3.1.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler **21**
3.1.3 Sentetik kültür ortamı **22**
3.2 Yöntemler **22**
3.2.1 Çalışma tasarımı **22**
3.2.2 Örneklerin toplanması **23**

3.2.3 Kültür medyasının hazırlanması 23
3.2.4 Örnek kültür 24
3.2.5 Bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi 24
3.2.6 Nanopartikül sentezi 26
3.2.7 CS/ZnO, CS/Ag, CS/ZnO/Ag ve CS/extract'in antibakteriyel etkisi 29
3.2.8 Sol-jel yöntemiyle nanokompozit yara örtüsü 29
3.2.9 Sol-jel işlemi adımları 30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 34
4.1 Bakteri İzolasyonu 34
4.2 NP'lerin Fiziksel Karakterizasyonu 35
4.2.1 Cs NP'ler için UV-Vis spektroskopisi 35
4.2.2 pH'ın etkileri 36
4.2.3 Yaprak ekstraktının FTIR spektroskopisi analizi 37
4.2.4 Sentezlenen AgNP'lerin elektron mikroskobu 37
4.2.5 Cs/Ag NP'ler için UV-vis spektroskopi 38
4.2.6 Sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis spektroskopisi 39
4.2.7 Bakterilerin ZnO/Ag/CS kompozit kaplamalarla işlemden önceki ve sonraki mikro morfolojileri 39
4.3 NP'lerin Biyolojik Aktivitesi 41
4.3.1 NP'lerin antimikrobiyal olarak aktivitesi 41
4.4 Histopatolojik Çalışmalar ve Fotoğraflar 47
4.4.1 Yara kapanma hızı 48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 50
KAYNAKLAR 51
EKLER 61
ÖZGEÇMİŞ 63

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
g/mL	Mililitre başına gram
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Ag	Gümüş nanopartikül
CS	Kitosan
DMF	N-dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
FTIR	Fourier iletim kızılötesi testi
MDR	Çoklu ilaç direnci
Nps	Nanopartikül
OMPs	Dış zar proteinleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Raman saçılması
Zn	Çinko nanopartikül

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Açık (a) ve antimikrobiyal yara örtüsü kaplı (b) yaradaki iyileşme sürecinin temsili (Simões *et al.* 2018) 9
Şekil 2.2 Sentez, uygulamalar ve toksisite ile ilgili çinko metal ve çinko NP'lerin genel açıklaması (Ali *et al.* 2018) 17
Şekil 2.3 Kitosanın antibakteriyel aktivitesini açıklamak için önerilen mekanizma (Simões *et al.* 2018) 19
Şekil 3.1 Okaliptüs camaldulensis yaprağı ekstraktının hazırlanmasını gösteren resim (Md Ishak *et al.* 2019) 27
Şekil 3.2 Ag Nanopartiküllerinin yeşil sentezi. (a) yaprak yıkama ve temizleme (b) yaprak ağırlıklandırma, (c) Kaynatma (d) Ekstrakt ağırlıklandırma 28
Şekil 3.3 Bu çalışmada üretilen nanoparçacıkların üzerindeki etkinliğini test etmek amacıyla sıçanlarda yapay yara yapma yöntemi. (a) yapay yara. (b) pamuklu gazlı bez etrafında bükülmüş yara 31
Şekil 4.1 Enfekte yaraları olan hastalardan toplanan 150 sürüntü örneğinden izole edilen mikroorganizmaların yüzdesi 34
Şekil 4.2 Kitosan NP'lerinin UV-vis spektroskopi analizi 36
Şekil 4.3 Okaliptüs corymbia yaprağı ekstraktından Ag NP'lerin oluşumunda AgNO3/DW'nin PH'ının etkisi 37
Şekil 4.4 Okaliptüs corymbia yaprağı ekstresinin FTIR'ı 38
Şekil 4.5 AgNP'lerin TEM görüntüleri (a) (40 nm) büyütme (b) (20) nm büyütme 38
Şekil 4.6 Cs/Ag NP'lerin UV-vis spektroskopi analizi 39
Şekil 4.7 Okaliptüs corymbia yaprağı ekstraktından ZnO NP oluşumunda pH'ın etkisi 40
Şekil 4.8 Müdahale edilmemiş bakterilerin SEM'i Ölçek çubuğu, (a): 1 µm, (b): 3 µm ve (c): 5 µm 41
Şekil 4.9 Bakteri hücre duvarlarının deformasyonunu, büzülmesini ve hasarını gösteren ZnO/Ag/CS kompoziti ile muamele edilmiş bakterilerin SEM'i. Ölçek çubuğu, 3 µm, (b): 5 µm ve (c):10 µm 42
Şekil 4.10 a) E.coli'nin Büyümesi b) Klebsiella pneumoniae'nin büyümesi, c) Farklı konsantrasyonlarda CS NP'leri ile tedavi edilen Staphylococcus aureus'un büyümesi 43
Şekil 4.11 Ağırlıkça % 01.5 konsantrasyonlarla mudahale edilmiş Ag NP'ler ile A : Staphylococcus Büyümesi , B : Klebsiella pneumoniae Büyümesi , C : E.coli'nin büyümesi 45
Şekil 4.12 ZnO NP'ler ile müdahale edilen (% 0.15 ağırlık) a: E.coli'nin Büyümesi, b: Staphylococcus aureus'un Büyümesi c: Klebsiella pneumoniae'nin büyümesi 47
Şekil 4.13 (3:1) ZnO/Ag NP'lerle karıştırılmış CS NP'leri ile müdahale edilen a : E.coli'nin Büyümesi, b: Staphylococcus aureus'un Büyümesi c : Klebsiella pneumoniae'nin büyümesi 48

Şekil 4.14 Farklı günlerde tedavi edilen grupların yara kapanma oranı 50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Ekipman ve cihazlar 21
Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler 22
Çizelge 3.3 Sentetik ortamlar ve üretici firmaları 22
Çizelge 4.1 Erkeklerde ve kadınlarda diyabetik ayak enfeksiyonu prevalansı 35
Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda (0.25 g. 0.5g, 1.0 g) CS'nin antibakteriyel aktiviteleri ve Staphylococcus aureus , E. coli ve Klebsiella pneumoniae bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi 43
Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda Ag NP'ler (ağırlıkça %0,05, ağırlıkça %0,1 ve ağırlıkça %0,15) ile Cs(1g) /Ag NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve Staphylococcus aureus, E. coli ve Klebsiella pneumoniae bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi 44
Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda (ağırlıkça %0,05, ağırlıkça %0,1 ve ağırlıkça %0,15) Cs/ZnO NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve Staphylococcus aureus , E. coli ve Klebsiella pneumoniae bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi 46
Çizelge 4.5 Farklı oranlarda ve daha yüksek ZnO ve Ag NP konsantrasyonlarında (1:1, 2:1 ve 3:1) CS/Ag/Zn NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve Staphylococcus aureus bakterisinin inhibisyon zonu büyümesi , E. coli ve Klebsiella pneumoniae 48

1. GİRİŞ

Tüm vücudu kaplayan en büyük ve en görünür organ deridir., derinin temel görevi alttaki kasları, kemikleri, dokuları ve iç organları biyolojik, kimyasal, mekanik ve fiziksel kirleticilerden korumaktır (Chua *et al.* 2016). Ek olarak, cilt duyu, sıcaklık kontrolü, immünolojik izleme, su kaybı önleme dehidrasyon ve D3 vitamini üretiminde önemlidir (Simões *et al.* 2018). Bedensel homeostazı korumak için, cilt yapısı ve işlevleri mümkün olduğunca çabuk onarılmalıdır. Cilt hasarı meydana geldikten sonra bakteriyel enfeksiyon potansiyelini azaltmak için yara iyileşme süreci yeniden başlar (Siedenbiedel and Tiller 2012).

Staphylococcus aureus gibi gram-pozitif organizmalar, enfeksiyon sürecinin ilk aşamalarında rol oynayan baskın organizmalardır, oysa *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi gram-negatif organizmalar, yalnızca sonraki aşamalarda bulunur. (Cardona and Wilson 2015). Enfeksiyon, bağışıklık sistemi patojeni ortadan kaldıramadığında, granülasyon dokusunun, büyüme faktörlerinin ve hücre dışı matris bileşenlerinin (kollajen, elastin ve fibrin) bozulmasına neden olup normal yara iyileşme sürecini tehlikeye atarak ortaya çıkar (Han and Ceilley 2017). Sonuç olarak, mikropların yaraya nüfuz etmesini veya mikroorganizmaların büyümesini önleyebilecek yara pansumanlarının geliştirilmesi kritik öneme sahiptir, bunu başarmak için bakterisidal aktiviteye sahip yara pansumanları, doğal bakterisidal aktiviteye sahip malzemeler, değişen yüzeyler ve antimikrobiyal bileşikler dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılır (Vig *et al.* 2017).

Koruma, yeniden düzenleme ve duyusal algı cildin üç ana işlevidir: Vücut ile dış dünya arasında bir bariyer görevi görür, vücudun organlarını ve dokularını toksinlerden, mekanik hasarlardan ve mikrobiyal enfeksiyonlardan korur. Bu bariyerin, fiziksel travma, kimyasal penetrasyon veya radyasyonun bir sonucu olarak hasar görmesi ile bu koruyucu rolün kaybolması mikropların ve patojenlerin altta yatan dokulara yayılmasına, yara enfeksiyonlarına ve diğer dermatolojik bozukluklara neden olur. Enfeksiyonların çoğunluğunu *E. coli, S. aureus* ve *K. pneumoniae* gibi patojenik

bakteriler oluşturur. Cilt yaralandığında, yara iyileşmesi olarak bilinen bir dizi karmaşık fizyolojik mekanizma hasarı onarmaya ve yarayı kapatmaya başlar. Canlılarda, doku hasarına karşı iyi kontrol edilen immün tepkiler, hasarlı dokuları ve hücreleri yeniden inşa etmek ve onarmak amacıyla birkaç örtüşen aşamada meydana gelir (Patil *et al.* 2016).

Enfeksiyonlar eksüda gelişimine, düzensiz kollajen birikimine ve yara iyileşmesinde gecikmelere neden olabilir, bu nedenle yara bakım yönetimi üzerinde durulması gereken kritik bir alandır. Aşırı dehidrasyon, yara yüzeyinin nemli ortamını da değiştirerek yara iyileşmesini geciktirebilir. Sonuç olarak, çeşitli kutanöz formlara yanıt olarak yara iyileşme aktivitesinin temel mekanizmasını bilmek, yara iyileşmesini destekleyen etkili tedavi teknikleri tasarlamak için kritik öneme sahiptir (Fan and Zheng 2020).

Nanoteknoloji, çeşitli alanlarda öne çıkan çok disiplinli yeni bir teknolojidir. Hacimsel yapılı bir malzeme, bir veya daha fazla boyutta (uzunluk, genişlik veya kalınlık) nanometre aralığında küçük parçacıklara ayrıldığında, tek tek parçacıklar, bütünden farklı olan şaşırtıcı özellikler gösterir. Atomların ve moleküllerin hacimsel yapılı malzemelerden oldukça farklı davrandıkları iyi bilinmektedir. İlaç salım sistemleri, ilaçların veya başka herhangi bir terapötik bileşenin salınmasını veya dağıtımını hedeflemek için tasarlanmış bu özel teknolojilerden yararlanır.

Antineoplastik ilaçlara dayanan kontrollü ilaç salım sistemleri, iyi karakterize edilmiş polimerler, lipitler, peptitler ve proteinler, karbonhidratlar ve yüzey aktif maddeler benzersiz nano formülasyon platformlarına tasarlanabildiğinden, nanomalzeme çeşitliliği geniştir. Lipozomlar, dendrimerler ve nanojeller, kontrollü ilaç dağıtımı ve hücre büyüme yapı iskeleleri için birçok nano ilaçta kullanılmıştır ve gelecekte de nano ilaçlarda bir dereceye kadar kullanılmaya devam edecektir (Kavaz *et al.* 2017).

Nanoteknoloji, Nanopartiküller olarak adlandırılan 1-100 nanometre boyut aralığındaki kaynakları yönetmek ve kullanmak için kullanılan bir kavramdır. Bilim adamları, son yıllarda, boyut ve şekil dağılımlarından etkilenen benzersiz manyetik, optoelektronik ve

fizikokimyasal yetenekleri nedeniyle dikkatlerini nanopartiküllere odakladılar (Shah *et al.* 2015).

Çinko oksit NP'lerin (ZnO NP'ler), uyarıcı büyüme faktörü aracılı bir yolla biyolojik sistemlerde önemli bir rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS'lar) yaratma yetenekleri nedeniyle son zamanlarda ilgi çekici seçenekler olduğu gösterilmiştir, ROS'lar bakteri üremesini önleyebilir ve hücre adezyonunu ve göçünü iyileştirerek yara iyileşmesini destekleyebilir (Bayrami *et al.* 2019).

Gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) gram pozitif ve gram negatif bakterilere (*K. pneumoniae* ve *E. coli*) karşı bakterisidal aktivitesi çok sayıda bilim adamı tarafından kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir ve çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı başka bir uygulanabilir tedavi gibi görünmektedir (Lu *et al.* 2017).

AgNP'ler, enfekte olmuş yaralarda yeterli nem dengesinin korunmasında önemli olabilecek antibakteriyel etkiye ek olarak anti-enflamatuar özellikler sergilerler. Buna ek olarak bakterisidal özellikleri vardır ve insan hücrelerine diğer toksik kimyasal antibakteriyel ajanlardan daha az zarar verirler, ayrıca yara iyileştirici özelliklere de sahiptirler. AgNP'ler, *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere karşı üstün antibakteriyel etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek içerikli Ag nanopartikülleri, insan normal hücrelerinde sitotoksisiteye ve genotoksisiteye neden olurken düşük içerikli Ag nanopartikülleri zayıf antibakteriyel etkiye sahiptir (Xu *et al.* 2017).

Yayınlanan araştırmaya göre, nanopartiküller (NP'ler), çok çeşitli bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahip oldukları, ilaç yan etkilerini azaltabilecekleri ve mikrobiyal dirence neden olmadıkları için geleneksel antibiyotiklere potansiyel alternatiflerdir (Said *et al.* 2021).

NP'lerin kendine özgü özellikleri nedeniyle, antibiyotik direnci kazanan mikroorganizmalarla ilişkili zorluklardan kaçınmayı amaçlayan çeşitli tedavi yöntemlerinde kullanılmıştır (Pati *et al.* 2014).

NP'lerin bakterisidal etkisi, bakteri hücre duvarı ile doğrudan temas, toksik metal iyonlarının salınması veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla elde edilebilir. Pozitif yüklü NP'ler bakteri hücre duvarlarıyla temas ettiğinde, bakteri yüzeylerinde bulunan negatif yüklü gruplar (gram-negatif bakterilerde lipopolisakkaritler ve gram-pozitif bakterilerde teikoik asit/peptidoglikan) negatif yüklü NP'leri çeker (Simões *et al.* 2018).

Bu çalışmada, hazırlanan nanokompozitlerin özelliklerini araştırmak için kitosan/Ag/ZnO (CS/Ag/ZnO) kompozitinin hazırlanması, mükemmel özelliklere sahip bir biyouyumlu polimer olan kitosan'ın lineer biyobozunur doğal bir polimer olarak etkilerinin incelenmesi, hidrojelin antibakteriyel olarak işlev görmesi için bir yara örtüsü olarak değerlendirilmesi, *K. pneumoniae, S.aureus* ve *E.coli* bakterileri gibi gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiyi değerlendirmek için saf kitosan (Cs) ve Cs/ZnO/Ag nanokompozitlerinin hazırlanması, modern yara örtüsü özelliklerini elde etmek için kitosan/Ag/ZnO nanokompozit ile işlenmiş pamuklu gazlı bezin etkilerinin araştırılması, hazırlanan numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve UV-Vis yansıtıcı spektroskopisi (UV-Vıs) gibi yüksek sonuç veren ekipmanlar kullanılarak test edilip numunelerin su emme kabiliyeti, fitilleme etkisi ve antibakteriyel aktivitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, Ag, ZnO ve kitosan nanoparçacıklarının üstün özelliklerinden faydalanmak için (CS/ZnO/Ag) nanokompozitinin nanoparçacıkları ile sol-jel yöntemiyle yara pansuman örtüsü üretilmiştir. Bu örtünün çeşitli özellikleri, farklı yapısal analiz testleri, antibakteriyel aktivite ve in vitro ve in vivo yara iyileştirme testleri ile belirlenmiştir. Bir antibakteriyel yara örtüsü üretmenin basit bir yöntemi, kitosan'a ZnO/Ag nanokompozitini yüklemektir (Kumar *et al.* 2013).

Antibakteriyel aktivite, gram-pozitif (*S. aureus* ve *K. pneumoniae*) ve gram-negatif (*E. coli*) olmak üzere üç tür mikroorganizmaya karşı araştırılacaktır. Ayrıca, yara iyileşme sürecinin geliştirilmesinde birtakım unsurlar karmaşık olabilir.

Antioksidan, antienflamatuar ve antimikrobiyal özelliklerin bileşimi, muhtemelen (CS/ZnO/Ag) nanokompozitinin potansiyel yara iyileştirici etkisine katkıda bulunan faktörler arasındadır. CS /ZnO/Ag nanokompozitinin üretimi ve uygulanması için yara iyileşme performansından ve optimum koşullardan sorumlu ana biyoaktif ve inorganik bileşiğin oluşturulması için ek revizyonlar şarttır (Li *et al.* 2011).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Yara Patofizyolojisi ve Yara İyileşme Süreci

Yaralar, mekanik, fiziksel veya metabolizma ile ilgili sorunlar nedeniyle bir doku bozulduğunda veya hücresel bütünlük bozulduğunda ortaya çıkar (Chaudhari *et al.* 2016). İyileşme sürecinin süresine ve niteliğine göre, cilt yaraları akut veya kronik olarak sınıflandırılabilir. Akut bir yara, sıyrıklar, kasılmalar, yanıklar, kesikler, yırtılmalar ve delinmelerin bir sonucu olarak aniden ortaya çıkar ve etkilenen cilt katmanlarının büyüklüğüne ve sayısına bağlı iyileşme süresine sahiptir (Selvaraj *et al.* 2015, Vıg *et al.* 2017).

Normal fizyolojik koşullar altında, epidermal yapının restorasyonu oldukça etkilidir, ancak kronik bir yara, cildin düzenli ve zamanında onarılmasına izin vermeyen kusurlu bir iyileşme süreci göstermesi ile karakterize edilir (Järbrink *et al.* 2016).

Etiyolojiye dayanarak, Yara İyileştirme Derneği (Wound Healing Society) kronik yaraları dört kategoriye ayırır: basınç, diyabetik, venöz ve arteriyel yetmezlik ülserleri (Eming *et al.* 2014). Bakteriyel kolonizasyon genellikle kronik yaralarda görülür ve kronik inflamasyonun birincil nedeni olarak kabul edilir (Bowler 2002).

İyileşme süreci, hem yerleşik hem de göç eden hücre popülasyonlarının, hücre dışı matris bileşenlerinin ve çözünür aracıların dahil olduğu tam olarak senkronize edilmiş olaylardan oluşur (Velnar *et al.* 2009). Bu süreç beş ayrı aşamadan oluşur: hemostaz, inflamasyon, göç, proliferasyon ve yeniden şekillenme (Morgado *et al.* 2015).

İlk aşamada, hemostaz, vazokonstriksiyon yoluyla kan kaybını önlemek ve mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için bir fibrin pıhtısı oluşur (Thiruvoth *et al.* 2015).

Enflamatuar faz hemostaz ile hemen hemen aynı anda başlar ve nötrofillerin (bakterileri içine çeken ve yarayı proteazlar ve antimikrobiyal peptit sekresyonu yoluyla ve reaktif

oksijen ara ürünleri üreterek dekontamine eden hücreler), monositlerin/makrofajların (monositler, apoptotik nötrofillerle diğer hücreleri uzaklaştırmak, sitokinleri ve çoklu büyüme faktörlerini salgılamak için makrofajlara farklılaşır) ve mikroplara karşı spesifik bir tepki gösteren lenfositlerin (B-lenfositleri antikor üretirken, T-lenfositleri sitolitik aktivitede yer alan sitokinleri salgılar) toplanmasını içerir. Migrasyon ve proliferatif fazlar, fibroblastların yara bölgesine göçüne ve miyofibroblastlara farklılaşarak, hücre dışı matriks (ECM), yeni kan damarları ve yeniden epitelizasyon üretiminde rol oynayan fibronektin, hyaluronik asit, kollajen ve proteoglikan gibi hücre dışı matris bileşenleri üretmeye başlar (Moura *et al.* 2013).

2.2 Antimikrobiyal Aktivite Gösteren Yara Adreslemesi

Bakteriler, doğal olarak hem biyolojik hem de biyolojik olmayan yüzeyleri kolonize etme yetenekleri olması nedeniyle tercih edilir (Shah *et al.* 2013). Açık bir yara, mikrobiyal kolonizasyon için uygun bir niştir (Sarheed *et al.* 2016).

Genel olarak, mevcut enfekte olmuş yaraların çoğunluğu polimikrobiyaldir ve genellikle çevrede bulunan patojenler, yani mukoza zarlarında yaşayan endojen mikroplar ve bitişik ciltte bulunan mikroflora tarafından kontamine olurlar. Kronik yara oluşumunun ilk aşamalarında gram-pozitif organizmalar, özellikle *S. aureus* baskındır. Daha sonraki aşamalarda, gram-negatif *E. coli* ve *Pseudomonas* türleri gözlenir ve derinin daha derin katmanlarını istila etme ve önemli doku hasarına neden olma eğilimi gösterirler (Savitskaya *et al.* 2019).

Kronik yaraların %50'sinde stafilokok ve streptokok türleri de bulunur (Cardona and Wilson 2015). Cilt yaralarının bakteriyel kontaminasyonu yüksek morbidite ve mortalite oranlarından sorumludur (Woodford and Livermore 2009). Bu sağlık sorununu çözmek için, dünyanın dört bir yanındaki farklı laboratuvarlar, yara kontaminasyonunu önleme amacıyla antimikrobiyal yara örtüleri geliştirmeye başladı. Bugüne kadar geliştirilen yara örtüleri farklı malzemelerle (sentetik veya doğal) ve çeşitli fiziksel formlarda (süngerler, hidrojeller, hidrokolloidler, filmler, membranlar) üretilmiştir.

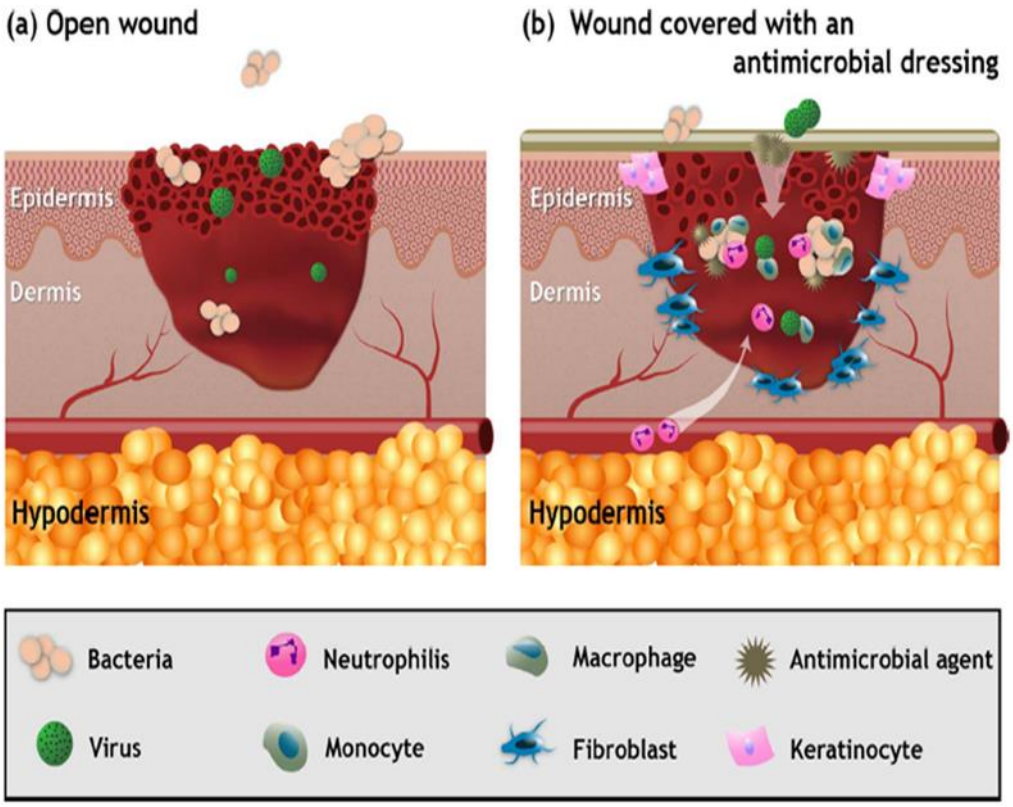
Bu farklı formülasyonlar, onları belirli bir yara tipinin tedavisi için uygun kılan farklı özelliklere sahiptirler. Örneğin, süngerler büyük gözeneklere sahiptirler, ısı yalıtımı sağlar ve yara bölgesinde nemli bir ortam yaratırlar. Öte yandan, süngerler mekanik olarak zayıftır, cilt maserasyonuna neden olabilir ve üçüncü derece yanıkların veya yaraların kuru eskar ile tedavisi için uygun değildir (Han and Ceilley 2017).

Hidrojeller, yarayı nemli tutmalarını sağlayan, yüksek miktarda su depolayabilme kapasiteleri olan 3 boyutlu polimerik ağlar içerir. Diğer taraftan, hidrojeller zayıf mekanik özellikler gösterir, bu nedenle ikincil bir pansuman gerektirir (Caló and Khutoryanskiy 2015).

Ayrıca hidrokolloidler tuzlu su veya sterilize su ile kolayca uzaklaştırılır, yapışmaz, yüksek yoğunlukludur ve ağrısız pansumanlardır. Öte yandan, hidrokolloidler kullanımlarını sınırlayabilecek bazı dezavantajlar sergilerler, yani sitotoksik olabilirler, hoş olmayan bir koku sergileyebilirler, düşük mekanik stabilite sunarlar ve yara bölgesinde asit pH'ını korurlar (Kamoun *et al.* 2017). Yara örtüsü olarak kullanılan filmler bakteri geçirmezdir, iyileşme evrelerini gözlemlemeye izin verir ve ağrısızdır. Bununla birlikte, bu tip pansumanın kullanımı zordur, yara yatağına yapışır ve eksüda birikimine neden olur (Kamoun *et al.* 2017).

Buna karşılık, membranların (özellikle elektrospun membranlar) fiziksel bariyerler olarak hareket ettiği bilinmektedir. Şimdiye kadar, pansumanın antimikrobiyal özelliklerini geliştirmek için yapılarına farklı ajanlar dahil edilmiştir. Bu antimikrobiyal ajanlar esas olarak antibiyotikleri (örneğin tetrasiklin, siprofloksasin, gentamisin ve sülfadiazin), nanoparçacıkları (örneğin gümüş nanoparçacıkları) ve doğal ürünleri (örneğin bal, uçucu yağlar ve kitosan) içerir (Sarheed *et al.* 2016).

Yarayı mikrobiyal istiladan koruyan ve fibroblastların göçünü ve farklılaşmasını destekleyen fiziksel bir bariyer görevi görmek üzere tasarlanmış polimerik bir antimikrobiyal yara örtüsünün şematik bir temsili (Şekil 2.1)'de sunulmuştur.



Şekil 2.1 Açık (a) ve antimikrobiyal yara örtüsü kaplı (b) yaradaki iyileşme sürecinin temsili (Simões *et al.* 2018)

2.3 Patojenik Bakteri ile Enfekte Olmuş Yara

Patojenik organizmalar tüm vücuda sızabilir, hücrelere yapışabilir ve konakta çoğalabilir ve bazı durumlarda bağışıklık sistemi bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları önleyemeyebilir. Bakteriler cilt yüzeyinde yaşar, enfeksiyonlar travma, akut veya kronik ülserler veya cerrahi işlemler sonucu ortaya çıkabilir. Gastrointestinal cerrahi ile ilişkili yara enfeksiyonlarında dışkı ve bakteriyel cilt kommensalleri en yaygın bakteri kaynaklarıdır. Bağırsak duvarının deriden ayrılmasıyla ortaya çıkan peristomal enfeksiyon, bağırsak stomasında kesi yarası enfeksiyonu ve perianal apse bu hastalıklara örnektir. Ayrıca, kalçaların ve kuyruk kemiklerinin kemik kısımlarını kaplayan deride gelişen yatak yaraları (dekübit/basınç ülserleri), özellikle fekal bakteriyel enfeksiyona karşı savunmasızdır (Vestby *et al.* 2020).

Yukarıda belirtilen yara enfeksiyonlarına, düzenli olarak zorunlu dışkı atılımında bulunan milyarlarca dışkı bakterisi neden olur. Çok sayıda mikroba tekrar tekrar maruz kalma ve ardından enfeksiyon, yara iyileşmesinde gecikmeler ve iyileşmede başarısızlık, septik komplikasyonlar ve ölümle sonuçlanır (Hirashima *et al.* 2019).

Sonuç olarak, bakteri yükünü ve yarada bakteri üremesini azaltmak, fekal bakteriyel hastalıkların lokal yönetimi için bir araştırma önceliğidir. Kronik yaralar dünya çapında salgın boyutlarına ulaşmıştır. Bu duruma sebebiyet veren önemli bir bileşen, periferik arter tıkayıcı hastalıkta olduğu gibi makroanjiyopatinin, diyabetes mellitusun veya belirli otoimmün hastalıklarda olduğu gibi mikroanjiyopatinin neden olduğu dolaşım bozukluğudur. Çok sistemik bir inflamatuar bağ dokusu hastalığı olan sistemik sklerozlu (SSc) bireylerin üçte ikisine kadarında, sıklıkla nekroz, yumuşak doku enfeksiyonu ve osteomiyelitin eşlik ettiği kronik dijital ülserler (DU) vardır (Allanore *et al.* 2016).

Cilt, enfeksiyonlara, zehirlere ve deri yaralarına karşı temel koruma hattıdır. Cilt hasarı ciddi morbidite ve hatta ölüme neden olabilir. Bir cilt enfeksiyonu için yara iyileşme süreci, doku hasarına yanıt olarak kolajen birikimini ve sonunda skar oluşumunu içeren karmaşık bir süreçtir. Enflamasyon, fibroplazi ve skar olgunlaşması bu tür süreçlerin örnekleridir (Gosain and DiPietro 2004).

Bakteriler cilt enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Hemolitik Streptococcus ve Staphylococcus aureus, cilt enfeksiyonlarına en sık neden olan Gram pozitif bakterilerdir. *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterobacter sp., Klebsiella sp*. ve *Proteus sp.* cilt enfeksiyonlarına neden olabilen Gram negatif çubuk bakterilerdir (Ekawati *et al.* 2020).

Deri yüzeyindeki yara enfeksiyonu, çok çeşitli organizmaların hızla kolonize olmasına izin verir. Çeşitli araştırmalara göre, değişik coğrafi yerlerde ikamet eden hastalardan birkaç farklı bakteri türü tanımlanmıştır. Piyojenik bakteriler, iltihaplanmaya neden olan bir mikroorganizma türüdür. Pyoderma orta ila şiddetli nekrotizan enfeksiyonlar cilt

enfeksiyonlarına örnektir. Bakteriler, mantarlar ve parazitler gibi çeşitli mikroorganizmalar cildi enfekte edebilir (Bowler *et al.* 2001).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus, halk arasında ve hastaneler arasında yayılan dünya çapında bir sorundur, bazı suşlarının nadir durumlarda antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, normalde *S.aureus* enfeksiyonunu tedavi etmek için antibiyotikler kullanılır. Deri enfeksiyonları, gıda zehirlenmesi ve sistemik enfeksiyon *S.aureus*'un neden olduğu olası hastalıklar arasındadır. İmpetigo, selülit, folikülit ve apseler, bunların neden olduğu cilt hastalıklarıdır. Bu bakterideki -laktamaz enzimi, -laktam antibiyotiklerin halkasını kırarak onları etkisiz hale getirebilir.

Deri enfeksiyonları, gıda zehirlenmesi ve sistemik enfeksiyon *S. aureus*'un neden olduğu olası hastalıklar arasındadır. İmpetigo, selülit, folikülit ve apseler bunun neden olduğu cilt hastalıklarıdır. Bu bakterideki laktamaz enzimi, laktam antibiyotiklerin halkasını kırabilir ve bu da onları etkisiz hale getirebilir (Ekawati *et al.* 2020).

Kronik iyileşmeyen yaralar, uzun süreli inflamasyon, yetersiz yeniden epitelizasyon ve matriks yeniden şekillenme eksikliği ile kendini gösterir. Bakteriler sürekli olarak kronik yaralarda bulunur. Bazal membran dermal ülserlerinin yırtılması, dermal doku ve hücreleri cilt bakterilerini başlatmak için açığa çıkarır ve istilayı kolaylaştırır. Staphylococcus aureus, kronik yaralarda en yaygın olarak görülen fırsatçı patojenlerden biri olan ve önemli lokal ve sistemik enfeksiyonların kaynağı olan yaygın bir deri kolonizatörüdür. *S. aureus*, hücre zarı hasarına ve ölümüne neden olan toksin, enterotoksinler ve koagülaz gibi patojenik ajanlar üretir. Ayrıca, lipopeptitler, peptidoglikan ve lipoprotein gibi hücre yüzeyi kimyasalları, patern (patojen tanıma reseptörleri) (PRR'ler) yoluyla bağışıklık hücrelerini aktive edebilir, bu da artan bir proinflamatuar yanıta neden olur ve yara iyileşmesini geciktirir (Li and Wu 2021).

Öte yandan, kronik ve/veya tekrarlayan yara enfeksiyonlarında *S. aureus* patojenitesinin benzersiz yollarını önerir. Eskiden harici bir patojen olduğu düşünülürken, yeni araştırmalar bunun makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositozdan kurtulabileceğini ve epitelyal ve endotelyal hücreler, osteoblastlar ve murin fibroblastları gibi profesyonel olmayan fagositlerde hücre içi absorpsiyona neden olabileceğini göstermiştir. Hücre içi *S. aureus* sitotoksisite üretir, ancak aynı zamanda enfeksiyon tekrarına veya kronikliğe ve bakteriyel dağılıma yol açan bir bağışıklık kaçırma mekanizması olarak da devam edebilir ve çalışabilir (Yokota *et al.* 2021).

2.3.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, Gram negatif bakteridir ve en sık görülen hastane patojenlerinden biridir, giderek çoklu ilaca dirençli hale gelmekte, hastanede yatan hastalarda önemli akciğer ve idrar yolu enfeksiyonlarına, ayrıca diyabet, alkolizm ve kronik akciğer hastalığına neden olmaktadır. Deri yaraları mikroorganizmaların deriyi geçerek dolaşım sistemine girmesine izin veren çok dikkat edilmesi gereken nedenlerdir (Paczosa and Mecsas 2016). *K. pneumoniae*, kalıcı ülserleri olan klinik hastaların büyük bir yüzdesinde bulunmuştur. Nokta mutasyonları ve yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin kazanılması, birlikte çalışan karmaşık bir dizi değişkenin neden olduğu çoklu ilaç direncinin iki önemli kaynağıdır (Biasini *et al.* 2014).

2.3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli gram negatif bir bakteridir. Birkaç *E. coli* suşu, böbrek sistemi, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere çeşitli yerlerde çeşitli hastalıklara neden olabilen fırsatçı ve kommensal hastalıklara dönüşmüştür. Ne yazık ki, son birkaç on yılda, bazı bakteri türleri antimikrobiyal tedavilere karşı giderek daha dirençli hale gelmiştir (Sora *et al.* 2021).

Dünya Sağlık Örgütü ve ABD Tıp Enstitüsü de dahil olmak üzere birçok uluslararası sağlık kuruluşu, antibiyotiğe dirençli bakterilerin insan sağlığı ve ekonomi için

oluşturduğu çevre ve sağlık endişeleri konusunda resmi kaygılarını dile getirdi. Diğer mikrobiyal hastalıklar arasında, her yaştan hastanın derisindeki ve yumuşak dokularındaki enfeksiyonlar en yaygın olanlarıdır. Birçok klinik yara enfeksiyonu vakasında antibiyotikler veya parenteral tedavi gerekebilir (Alharbi *et al.* 2019).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (SSTI'ler), her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde 14 milyondan fazla kişiyi etkileyen en sık görülen hastalıklardır. Sadece *E. coli, Pseudomonas aeruginosa* ve Gram pozitif organizmaların bulunduğu SSTI'ler, mikrobiyal istilanın nedenine ve yoğunluğuna bağlı olarak basit yüzeysel enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar değişebilir (Burnham *et al.* 2016) içinde bulunur. *E. coli* gibi enterobakteriler, antibiyotik direnci geliştirme kapasiteleri nedeniyle çok dikkat çekmiştir (Delgado-Valverde *et al.* 2013).

2.4 Yara İyileşmesi İçin Nanopartiküller

Nanoteknoloji, çeşitli alanlarda öne çıkan yeni bir multidisipliner teknolojidir. Hacimsel yapılı malzeme, nanometre aralığında veya daha da küçük bir veya daha fazla boyuta (uzunluk, genişlik veya kalınlık) sahip küçük parçacıklara bölündüğünde, tek tek parçacıklar hacimsel yapılı malzemeden farklı şaşırtıcı özellikler gösterir. Atomların ve moleküllerin dökme malzemelerden oldukça farklı davrandığı iyi bilinmektedir (Giannousi *et al.* 2015).

Nanokompozitler (NC'ler), çeşitli amaçlar için hetero- veya homo-nanoparçacık yapılarının birleştirilmesine atıfta bulunan ikinci nesil nanoteknolojidir, bu kombinasyon, karışımdaki tek tek NP'lerin niteliklerini geliştirmekle kalmaz, aynı zamanda yeni işlevleri de ortaya çıkarır. Ayrıca antibakteriyel etkinliği artırmak için metal veya metal oksidi doğal polimerlerle birleştirme eğilimi de artmaktadır (Giannousi *et al.* 2015).

Yara iyileşmesi, doku mühendisliği, ısıl işlem ve ilaç dağıtımı, nanokompozit için seçeneklerden sadece birkaçıdır. Nanokompozit, mekanik ve termal yetenekler,

antibakteriyel özellikler, denge ve absorpsiyonu sağlamak için gözenekli yapı ve yara örtüsünde ideal nemi koruma kapasitesi dahil olmak üzere yara örtülerini yara iyileşmesi için uygun hale getiren çeşitli özellikler sunar (Shabunin *et al.* 2019).

Nanopartiküller doğada bulunabilir veya laboratuvarda üretilebilir, mühendislik ürünü nanopartiküller ise laboratuvar ortamında oluşturulanlardır. Kimyasal, fiziksel ve biyolojik yaklaşımların tümü, mühendislik ürünü nanopartiküller yapmak için kullanılır. Metalik nanoparçacıklar ideal tekrarlanabilir bir yöntem kullanılarak hazırlanır, tane şekli kontrolü sağlar, monodisperse nanopartiküller, ucuz ve basit, daha az çözücü ile daha az toksik öncüleri kullanarak (one-pot reaksiyon) sentetik birkaç adım sonucunda, daha az toksik atık ürünler çıkararak ve oda sıcaklığına yakın bir sıcaklık reaksiyonunda üretilir. Önemli yüzey enerjileri nedeniyle, nanopartiküller, aralarında bir karşı itici kuvvetin yokluğunda termodinamik olarak uygun toplu partiküller oluşturmak üzere topaklanır (Razzaque *et al.* 2016).

Biyolojik teknik, zararlı, indirgeyici, sınırlayıcı ve stabilize edici kimyasallar içermeyen daha verimli bir sentez işlemi sağlar. Bitki özleri ve mikroorganizmalar, metal öncüllerini nanopartiküllere dönüştürmek ve belirli durumlarda, üretilen nanopartiküllerin stabilitesine veya kapatılmasına yardımcı olmak için biyo-ilham yaklaşımlarında kullanılır. Bitki ekstraktlarında bulunan biyomoleküllerin (örneğin enzimler/proteinler, amino asitler, polisakkaritler ve vitaminler) kombinasyonları metal iyonlarını çevre dostu bir şekilde biyolojik olarak azaltır (Arabacı *et al.* 2020).

2.4.1 Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler)

Boyutu 1 ile 100 nanometre aralığındaki gümüş nanoparçacıklar, yüzeyin hacimsel yapılı gümüş atomlarına olan muazzam oranı nedeniyle "gümüş" olarak sınıflandırılır, bazılarında yüksek miktarda gümüş oksit bulunur. Nanopartiküller, amaca bağlı olarak çeşitli şekillerde yapılabilir. Küresel gümüş nanoparçacıklar en yaygın olanlarıdır, ancak elmas, sekizgen ve ince tabakalar da popülerdir. Olağanüstü geniş yüzey alanları nedeniyle çok sayıda ligandın koordinasyonu mümkündür. Laboratuvar ve hayvan

araştırmalarında, olası etkinliği belirlemek amacıyla gümüş nanoparçacıkların insan terapötiklerine ilişkin özellikleri araştırılmaktadır (Cassano *et al.* 2019).

Gümüş nanoparçacıkların (Cs/Ag NP'ler) gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler (*Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*) üzerindeki bakterisidal etkisi, çok sayıda bilim adamı tarafından kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir ve çoklu ilaca dirençli patojenlere, başka bir uygulanabilir tedavi gibi görünmektedir. Gümüş bazlı NP'ler, enfekte yaralarda yeterli nem dengesinin korunmasında önemli olabilecek antibakteriyel etkiye ek olarak anti-inflamatuar özellikler de sergiler (Lu *et al.* 2017).

Nano Ag, *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel yetenekleri ile tanınır. Bununla birlikte, Ag nanoparçacıklarını güvenle kullanmak için içerikleri iyi ayarlanmalıdır. Yüksek içerikli Ag nanopartikülleri, insan normal hücrelerinde sitotoksisite ve genotoksisiteye neden olur. Düşük içerikli Ag nanoparçacıkları ise zayıf antibakteriyel etkiye sahiptir (Razzaghi *et al.* 2019).

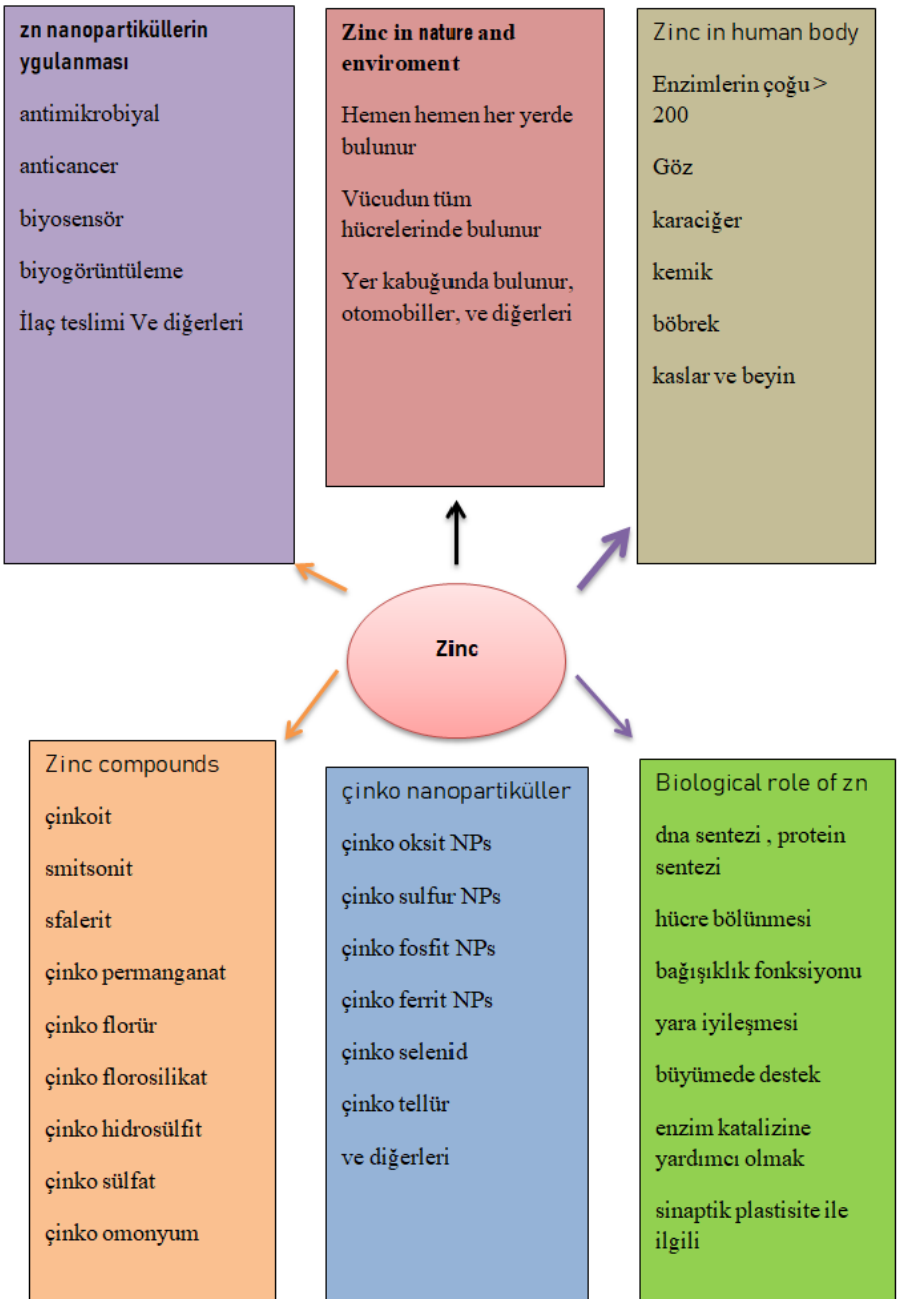
Ayrıca, Ag+ iyonları ve Ag bazlı bileşikler, çeşitli bakteriler için oldukça zehirlidir ve bu da onları çeşitli tıbbi uygulamalar için umut verici adaylar haline getirir. Ag yaygın olarak bir nitrat tuzu olarak kullanılır, ancak Ag nanoparçacık (Ag-NP) formunda yüzey alanı artar, bu da antibakteriyel aktivitede önemli bir artışa neden olur (Al-Abboodi *et al.* 2020).

2.4.2 Çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler)

Çapları 100 nanometreden küçük olan çinko oksit (ZnO) nanopartiküller, boyutlarına göre çok fazla yüzey alanına ve çok fazla katalitik aktiviteye sahiptirler. Çinko oksit nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri, nasıl yapıldıklarına bağlı olarak değişir. Lazer ablasyonu, hidrotermal yöntemler, elektrokimyasal biriktirme, sol-jel yöntemi, kimyasal buhar biriktirme, termal ayrıştırma, yanma yöntemleri, ultrason, mikrodalga destekli yanma yöntemi, iki aşamalı mekanokimyasal-termal sentez, anotlama, birlikte çöktürme, elektroforetik biriktirme ve çözelti konsantrasyonu, pH ve

yıkama ortamı kullanan çökeltme işlemleri, ZnO nanoparçacıkları üretmenin olası yollarından bazılarıdır. Ortam sıcaklığında ZnO, 3.37 eV enerji aralığına sahip geniş bant aralıklı bir yarı iletkendir (Kumar *et al.* 2013).

Büyük indirgeme potansiyeli, hafif reaktivitesi ve beş kararlı izotopu nedeniyle çinko, metaller arasında en fazla ilgiyi toplar. ZnO, geniş uygulama alanı, çevre dostu olması ve çeşitli fizyokimyasal özellikleri nedeniyle sülfür, ferrit, fosfit, selenit ve tellür gibi çinko bazlı nanoyapıların en çekicisidir. (Şekil 2.2) çinkonun geniş bir özetini ve alaka düzeyini göstermektedir (Abd-Elsalam 2021).



Şekil 2.2 Sentez, uygulamalar ve toksisite ile ilgili çinko metal ve çinko NP'lerin genel açıklaması (Ali *et al.* 2018)

Nano ZnO'nun toksik olmaması, yenilebilir olması, biyouyumlu olması ve yüksek termal stabilite ve dayanıklılığa sahip olması gibi birçok faydası vardır. Öte yandan, Ag ve ZnO nanoparçacıklarını birleştirmek antibakteriyel etkinliği artırabilir. Kitosan-Ag/ZnO karışım filmleri şimdi, murin makrofajlarında ve Gram pozitif bakterilerde yara pansuman ve antibakteriyel çalışmalar için geliştirilmektedir. Bununla birlikte, su

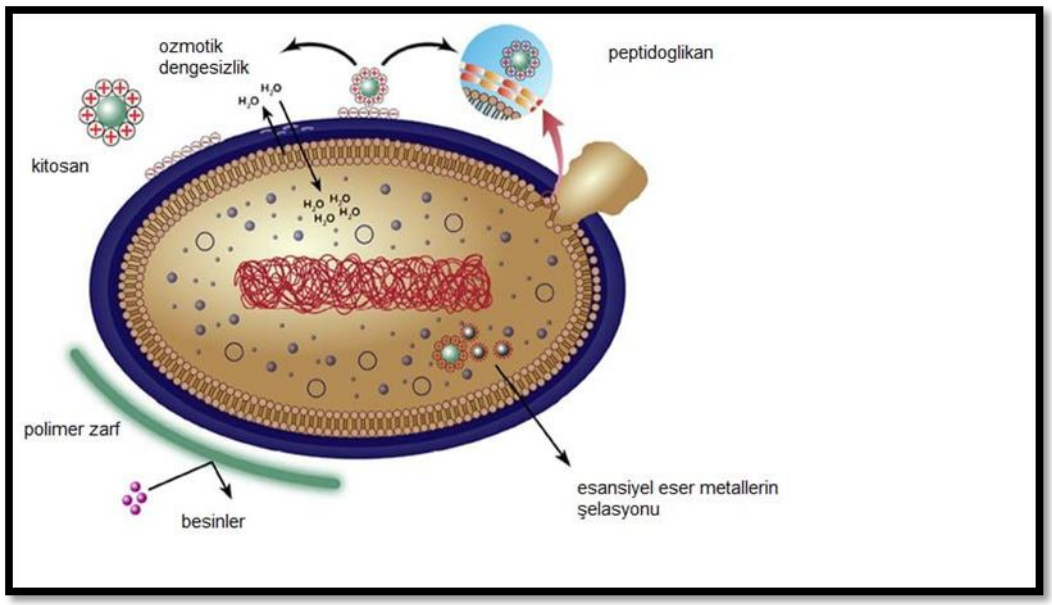
ürünlerine zarar veren Gram-negatif bakterilere karşı Ag/ZnO nanokompozitlerini Kitosana dahil etmek için antibakteriyel mekanizma üzerine herhangi bir araştırma yapılmamıştır (Bakhsheshi-Rad *et al.* 2019).

2.4.3 Kitosan nanopartikülleri (CS NP'ler)

Doğal bolluğu sayesinde her yıl 1000 tondan fazla elde edilir, bunun yaklaşık %70'i deniz türlerinden gelir. Lineer bir aminopolisakkarittir, doğal olarak kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında bulunan bir biyopolimerdir ve selülozdan sonra gezegendeki en yaygın ikinci biyopolimerdir. Kitosan (CS), bir D glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminin kopolimeridir, oysa kitin bir N-asetil-D-glukozamin polimeridir. Kitosan, deasetillenmiş kitindir. Amino (-NH 2) asetilamino (-NH-CO-CH 3) gruplarının kitin üzerine gruplara aktarılması işlemi deasetilasyon olarak bilinir. Doğada, yumuşakçaların ve kabukluların dış iskeletinde, ayrıca mantarlarda ve böcek kütiküllerinde sıralı makrofibriller olarak görünür (Islam *et al.* 2017).

Kanama bölgesine CS uygulandığında, elektrostatik etkileşimler eritrosit hücrelerini yaraya doğru yönlendirerek pıhtılaşmaya neden olur. Sonuç olarak, operasyonlarda ve askeri yaralanmalarda yaygın olarak kan pıhtısı olarak kullanılır, film oluşturma potansiyeline sahip toksik olmayan bir polisakkarittir ve biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir, son yıllarda olası bir gıda koruma kaplama malzemesi olarak meyve, sebze ve su ürünlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılır. Sınırlı nem tutma, zayıf mekanik mukavemet, tek antibakteriyel ve zayıf anti-oksidan yetenekleri nedeniyle saf CS kaplama, koruma standartlarını karşılayamamıştır (Periayah *et al.* 2016). CS ve türevleri mantarlara, bakterilere, alglere ve virüslere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterir (Shannon and Abu-Ghannam 2016). Literatürde, (Şekil 2.3)'te gösterildiği gibi CS'nin antibakteriyel aktivitesini açıklamak için önerilen en az üç mekanizma vardır (Goy *et al.* 2009). En çok kabul edilen mekanizma, CS antimikrobiyal aktivitesinin, pozitif yüklü kitosan grupları (glukozaminlerin amin grupları) ile bakteri hücre duvarında bulunan negatif yüklü gruplar (peptidoglikanlar gibi yüzey bileşenleri) arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığını öne sürmektedir (Arkoun *et al.* 2017). Son mekanizma, bakteriyel

büyüme için gerekli olan eser metallerin ve oligo elementlerin şelasyonunu içerir, yani CS'nin amino grupları temel eser metallerle etkileşime girebilir ve böylece toksinlerin üretimini ve mikrobiyal büyümeyi inhibe edebilir. Polimer CS, kaplamaların geçirgenliğini ve antibakteriyel özelliklerini ve ayrıca koruma niteliklerini artırabilir (Goy *et al.* 2009).



Şekil 2.3 Kitosanın antibakteriyel aktivitesini açıklamak için önerilen mekanizma (Simões *et al.* 2018)

2.5 Nanopartikül Üretiminde Yeşil Bir Yöntem Olarak Okaliptüs camaldulensis

Eucalyptus camaldulensis şu anda Akdeniz çevresinde, Güney Afrika, Güney Amerika ve Asya'da ticari selüloz elyafının en önemli kaynaklarından biri olarak ekilmektedir. O. Camaldulensis (The river red gum) dünyanın en çok ekilen plantasyon türü haline gelmiştir. Çünkü bitkinin geleneksel tıbbi kullanımı, güçlü antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Paine *et al.* 2011).

Bitki dünyasından çeşitli ilaçlar elde edilir. Gerçekten de şifalı bitkiler, antik çağlardan beri insanların sağlık hizmetlerinde önemli bir rol oynamıştır ve bunlar, pan ve çoklu ilaca dirençli patojenlerle savaşmak için yeni antimikrobiyal ilaçların önemli bir

kaynağı olabilirler. Bu yeni antibakteriyel maddeler, bitki özlerinde ve uçucu yağlarda bulunabilir (Aleksic Sabo and Knezevic 2019).

Ağacın yaprakları 5–11% oranında tanen içerir. Kino (bir odun eksüda sınıfı) %45 kinotannik asitin yanı sıra aglukozit, katekol ve pirokatekol içerir ayrıca yapraklara flavonoidler ve steroller için uygulanan test pozitiftir. Kabuk %2,5-16 tanen, odun %2-14 ve kino % 46,2-76.7 içerir. Ağacın bildirilen fitokonstitüentlerinden bazıları uçucu yağlar, steroller, alkaloidler, glikozitler, flavonoidler, tanenler ve fenollerdir (Aleksic Sabo and Knezevic 2019).

2.5.1 Metalik nanopartiküller ile okaliptüs

Doğal ve ekili Okaliptüs ormanları, peyzaj güzelleştirme ve orman ürünü olarak kullanılan odunsu bitkiler arasındadır. Okaliptüs yaprağı ekstresinden gümüş nanoparçacıkların verimli üretimi de yapılır. Okaliptüs'te bulunan birçok kimyasal maddenin bitkide pek çok rolü vardır. Bunlar, böcek ve omurgalı otçullara karşı korumanın yanı sıra UV ve soğuk stresine karşı dayanıklılığı da içerir. Okaliptüs yaprağına kendine özgü aromasını veren uçucu yağın çoğunluğunu oluşturdukları için terpenoidler en iyi bilinen kimyasallardır. Okaliptüsler, terpenoidler ve fenoller gibi biyoaktif moleküllerin iyi kaynağıdır ve organları yeşil teknoloji üretiminde mükemmel bir şekilde kullanılmaktadır (Saleem *et al.* 2017).

Metalik nanopartiküllerin temel özellikleri, büyüklüklerinden ve şekillerinden oldukça etkilenir. Nanopartiküller, büyüklüklerini, şekillerini, kararlılıklarını ve biyosentez hızlarını düzenlemek için ideal koşullar altında oluşturulur. Okaliptüs türleri mükemmel biyoaktif terpenoidler, tanenler, flavonoidler ve floroglusinol türevleri kaynaklarıdır (Sawalha *et al.* 2021).

Bu olağanüstü başarılar, mükemmel yapısal özelliklere sahip metal nanoparçacıkların üretimi için "daha yeşil" teknolojilerin geliştirilmesinin yolunu açmıştır (Boulekbache-Makhlouf *et al.* 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan ekipman ve malzemeler

Kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Ekipman ve cihazlar

Cihazlar ve ekipman	Üretim Şirketi (menşeli)
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	Model AA300 Angstrom advanced (Inc.USA)
Otoklav	Gallenkhamp (İngiltere)
Santrifüj	Beckman (ABD)
FT IR	SHIMADZU (FT IR) 8400S (Japonya)
Mikropipet	Belçika
Hücre kültürü plakası	Amerika Birleşik Devletleri
Buzdolabı	Concord (Kore)
Fırın	Memmert (Almanya)
Öze	Hi media (Hindistan)
Işık mikroskobu	Novex (Hollanda)
Çalkalayıcı İnkübatör	Jissy (Kore)
Vortex karıştırıcı	Rota mixer (İngiltere)
Hassas Terazi	Sartorius (Almanya)
Kuluçka makinesi	Nef (Türkiye)
UV-vis spektroskopisi	Amerika Birleşik Devletleri
PH ölçer	Amerika Birleşik Devletleri
X-ışını kırınım ölçümleri	Amerika Birleşik Devletleri
Taramalı elektron mikroskobu	Amerika Birleşik Devletleri
TGA	Amerika Birleşik Devletleri
Transmisyon Elektron Mikroskobu	Amerika Birleşik Devletleri

3.1.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler

Kimyasal ve biyolojik bileşenler Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler

Kimyasallar	Üretici FIRMA (menşei)
Kitosan tozu	BDH (İngiltere)
AgNO3	MRECK (Almanya)
Zn(NO3)	(Sigma-Aldrich) ABD
Asetik asid	(Sigma-Aldrich) ABD
NaOH	(Sigma-Aldrich) ABD
HCl	(Sigma-Aldrich) ABD

3.1.3 Sentetik kültür ortamı

Kullanılan tüm sentetik ortam ve üretici firmaları Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Sentetik ortamlar ve üretici firmaları

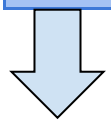
Kültür Medyası	Şirket (Menşei)
Kanlı agar Baz	Oxoid
Mueller Hinton Agarı	Oxoid
Muller hinton suyu	Hi media
Beyin kalp suyu	Hi media
Beyin kalp agarı	Hi media

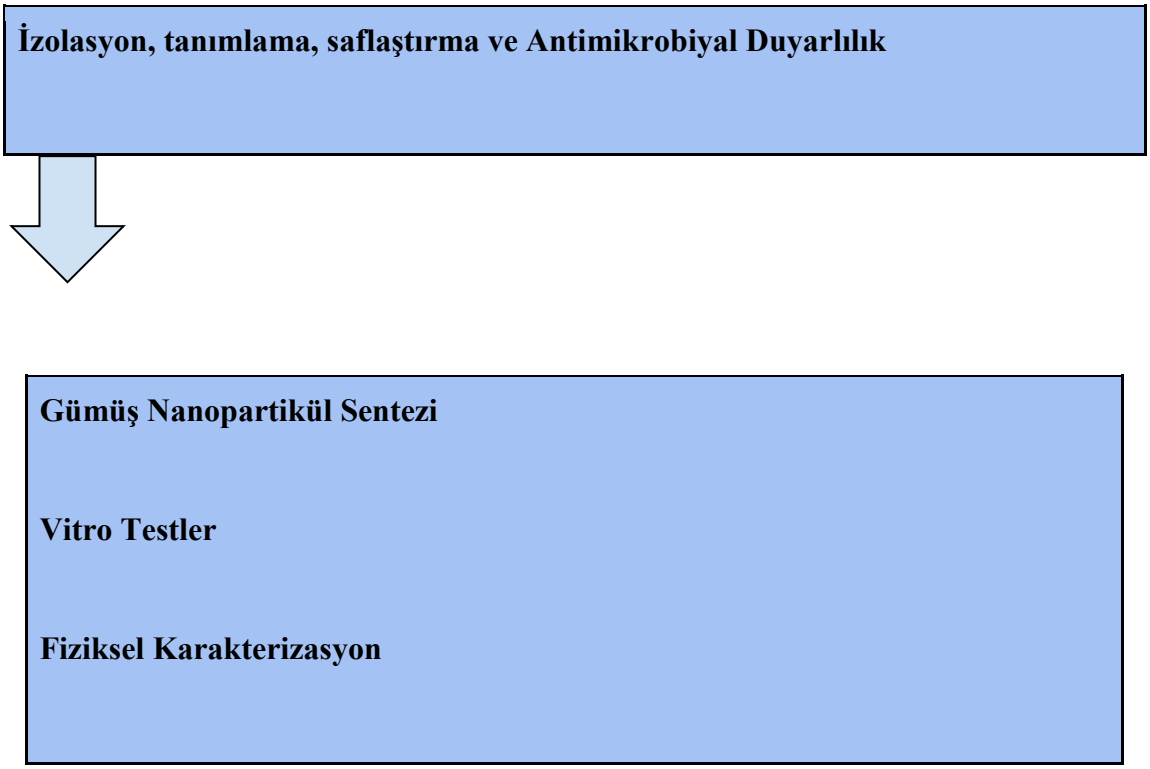
3.2 Yöntemler

3.2.1 Çalışma tasarımı

Örneklerin toplanması

(150 Yaradan 150 sürüntü toplanır)





3.2.2 Örneklerin toplanması

Al-Najif Al-Ashraf şehrinde farklı hastanelere (Al-Hakeem General Hospital ve Al-Zahraa Teaching Hospital) başvuran hastaların yara enfeksiyonlarından toplam 150 örnek alındı. Çalışma Al-Hakem hastanesinde (01.10.2021 ile 01.06.2022 tarihleri arasında) gerçekleştirildi. Sürüntüler transmisyon ortamı kullanılarak toplandı. Bu çalışma Kufa Üniversitesi'ndeki biyoetik merkez komitesi tarafından onaylandı.

3.2.3 Kültür medyasının hazırlanması

3.2.3.1 Kan agarı (BA)

Bazı Hemolitik bakteri türleri arasında ayırt edici bir ortam olarak kabul edilir ve üretici firmaya göre kullanıldı (Elbing and Brent 2002).

3.2.3.2 Nutrient agar

Bakterilerin üremesi ve aktivasyonu için uygun bir besiyeridir ve üretici firmaya göre hazırlandı (Elbing and Brent 2002).

3.2.3.3 Besin agarı

Bakterilerin büyümesi ve korunması için uygun bir ortamdır ve üreticiye göre hazırlandı (Xie *et al.* 2002)

3.2.4 Örnek kültür

Tüm numuneler steril sürüntülerle toplandı. Kültür ortamı, üreticinin talimatlarına göre hazırlandı, burada Macunkey, Kan Agarı ve Sabouraud dekstroz agar olmak üzere üç tip kültür ortamı hazırlandı.

Besiyerleri hazırlandıktan sonra petri kaplarına yerleştirildi ve aynı örnek numaraları ile numaralandırıldı, ardından kültürleme işlemi için örneklerle birlikte kapağa aktarıldı.

Daha sonra numune karıştırıldı ve steril öze numuneye daldırıldı ardından kültür ortamının kapağı da açıldı ve öze ile besiyeri üzerine zikzaklar şeklinde yayma yapıldı, daha sonra kap kapatılarak 24 saat 37^{o}C'de inkübatöre baş aşağı yerleştirildi.

Örnekler belirtilen üç kültür ortamında kültürlendi. 24 saat inkübasyondan sonra tüm numuneler Vitec 2'de kontrol edildi.

3.2.5 Bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi

Bu adım, mikrobiyal tanımlama, antibiyotik duyarlılık testi (AST) ve direnç mekanizması tespiti için VITEK 2 cihazı kullanılarak (Tıbben İlgili Gram-Pozitif Kokların Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testi için VITEK 2 Sisteminin

Değerlendirilmesi) bölümünde tarif edildiği gibi tamamlanmıştır. Bakteri izolatlarının yüzde 0.45'lik salin içinde 0.5 McFarland bulanıklık standardına eşdeğer emülsifiye edilmesi ile süspansiyonlar oluşturuldu. VİTEK 2 sistemi, tanımlama ve AST için aynı süspansiyonları kullandı. Süspansiyonlar, karşılaştırmalı tanımlama prosedürü olarak üreticinin özelliklerini kullanmıştır.

Gentamisin, tobramisin, amikasin, imipenem, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, ampisilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, seftriakson, sefepim, trimetoprim/sülfametoksazol ve piperasilin dahil 14 ilaca yönelik minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC'ler), (bioM'erieux, Marcy l'Etoile, Fransa) üreticinin talimatlarına göre, yazılım sürümü 5.04 ve AST-GN09 test kartı kullanılarak değerlendirildi. Duyarlılık, orta duyarlılık ve dirençlilik için sınır değerler, Klinik ve laboratuvar Standartları Enstitüsü kılavuzlarıyla tutarlıydı (ClSI 2015). Polimiksin B, doksisiklin ve minosiklin dahil üç ilaca yönelik MIC'ler, broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve sefotaksim, tetrasiklin, mezlosilin ve tikarsilin/klavulanik asit dahil dört ilaca direnç, standart disk difüzyon yöntemi (Oxoid, Hampshire, UK) kullanılarak değerlendirildi.

Bu sonuçlar ClSI (2015)'e göre yorumlanmıştır. Üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana duyarlı olmayan suşlar(Çoklu ilaca dayanıklı) (Multidrug-resistant) (MDR) olarak tanımlanırken, iki veya daha az antimikrobiyal kategoride en az bir ajana duyarlı olmayan suşlar (Extensively drug resistant) (Büyük ölçüde ilaca dirençli) (XDR) olarak kabul edildi (Magiorakos *et al.* 2012). Buna karşılık, antibiyotik direnci ile biyofilm oluşumu arasındaki korelasyon analizleri için 0-2 antimikrobiyal kategorilere dirençli olanlar ayrı ayrı tanımlandı ve non-MDR olarak adlandırıldı. Üreticinin protokolüne göre, test panelleri (iCubate-Gel Permeation Chromatography) (iCubate-Gel Geçirgenlik Kromatografisi) (ID-GPC), asitleştirme, alkalizasyon, enzim hidrolizi ve inhibe edici bileşiklerin varlığında büyüme gibi çeşitli metabolik süreçleri tespit etmek için pH değişim testleri ve türevleri dahil 46 florimetrik test içeriyordu.

Kart otomatik olarak bir vakum cihazı ile dolduruldu, kapatıldı ve VITEK 2 okuyucu-inkübatör modülüne (inkübasyon sıcaklığı, 35.5 °C) yerleştirildi. Ardından her 15

dakikada bir kinetik floresan ölçümüne tabi tutuldu. Sonuçlar ID-GPC veri tabanı tarafından yorumlandı ve nihai sonuçlar otomatik olarak elde edildi. Kullanılan tüm kartlar otomatik olarak çöp kutusuna atıldı. AST, VITEK 2 kullanılarak yapıldı. 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu, %0.45 salin içinde 1.5 x 107 CFU/ml'ye seyreltildi. Kartlar otomatik olarak doldurulduktan, kapatıldı ve ardından inkübasyon ve okuma için VITEK 2 cihazına yüklendi.

AST-GN75 kartı, Ampisilin, Pipracillin/Tazobaktam, Sefazolin, Sefoksitin, Seftazidim, Ceftriakson, Sefepim, İmipenem, Amikasin, Gentamisin, Siprofloksasin, levofloksin, Tigesiklin, Nitrofurantoksantoin ve Sfametointoin için kullanıldı. Duyarlılık testinin analizi, mikrobiyal duyarlılık kategorisini (ClSI) yorumlama kriterlerine göre duyarlı, orta veya dirençli olarak tanımlayan her iki yöntemle belirlenen MIC'ler tarafından yapıldı (Clinical and laboratory Standards Institute 2022).

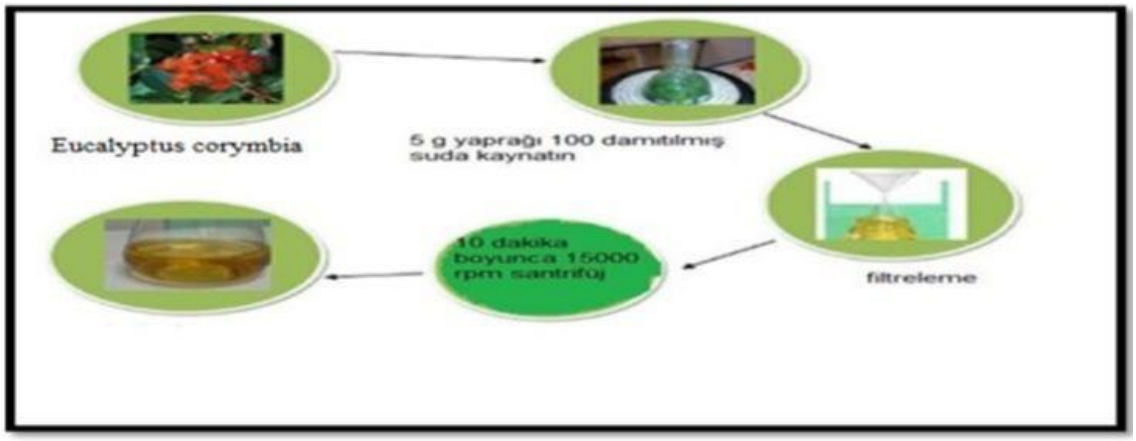
3.2.6 Nanopartikül sentezi

3.2.6.1 Kitosan NP'ler / asetik asit çözeltisinin hazırlanması

CS/asetik asit çözeltileri hazırlamak için toz halindeki CS hassas bir elektronik terazi cihazı kullanılarak tartıldı ve (100 ml) (1:10 DW) asetik asit ilave edilerek üç farklı viskoz polimerik çözelti (0.25, 5 ve 1.0) g/mL oluşturuldu.

3.2.6.2 Sulu okaliptüs corymbia yaprağı ekstrelerinin hazırlanması

(*Eucalyptus corymbia)* taze ve sağlıklı yaprakları önce çeşme suyu, sonra deiyonize su ile iyice yıkandı. Yapraklar havada kurutuldu ve küçük parçalar halinde kesildi. Doğranmış yapraklar (20g), bir beher içindeki 100 ml deiyonize otoklavlanmış suya ilave edildi ve sıcaklık kontrollü bir su banyosunda 90°C'de 10 dakika ısıtıldı. Ekstrakt soğutuldu ve Whatman kâğıdı No.1 filtre kağıdından süzüldü ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı Şekil 3.1 (Sila *et al.* 2014).



Şekil 3.1 *Eucalyptus corymbia* yaprağı ekstraktının hazırlanmasını gösteren resim (Md Ishak *et al.* 2019)

3.2.6.3 Farklı pH parametrelerin optimizasyonu

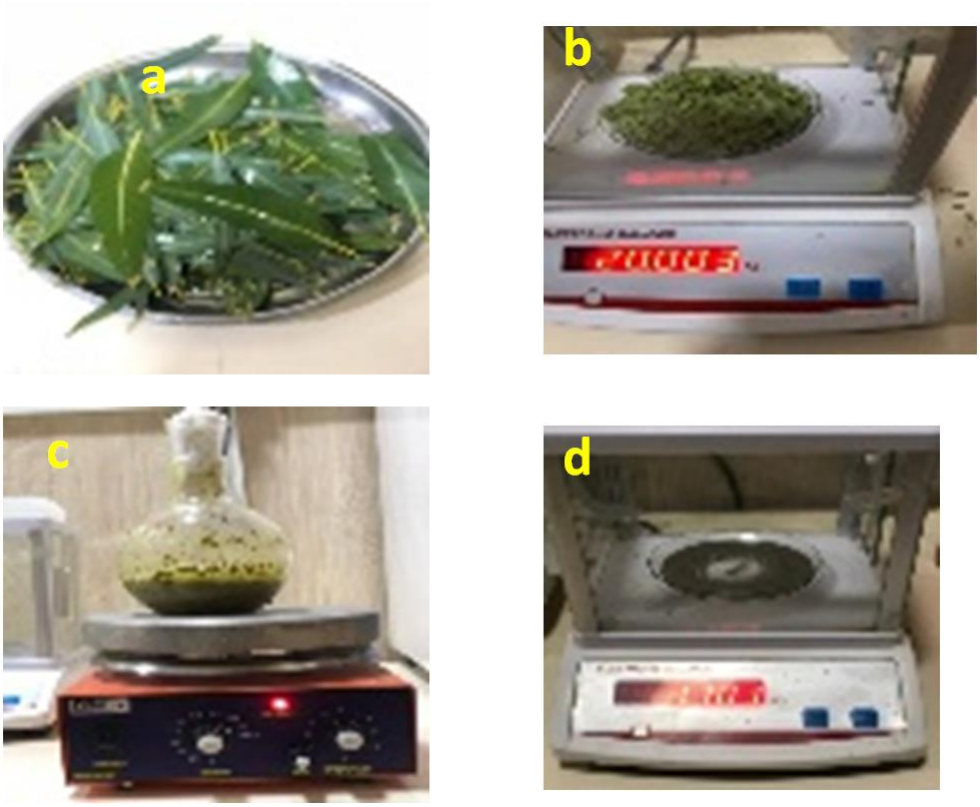
Bitki ekstraktının (5.7) pH'ı, 1M HC1 ve 1M NaOH kullanılarak, tam olarak 20 ml hacimde sırasıyla (3.7, 7.7 ve 8.7) nihai pH'a ayarlandı (Sila *et al.* 2019).

3.2.6.4 ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentezi

Bir mM Çinko nitrat heksahidrat [$Zn(NO3)_2$. 6H2O] %10 bitki özü solüsyonunda 1:2 oranında sürekli karıştırılarak süspanse edildi. Karışım tamamen çözüldükten sonra 150^{o}C'de (2–3) saat karıştırılmaya devam edildi ve elde edilen karışım oda sıcaklığında soğutulduktan sonra süpernatant atıldı. Elde edilen katı ürün (soluk beyaz renkli) 10 dakika boyunca 6000 rpm'de iki kez santrifüjlendi, yıkandı ve 80^{o}C'de (5-6) saat kurutuldu. Kurutulan toz, rengi değişene kadar oda sıcaklığında tutuldu ve daha sonraki çalışmalarda kullanıldı (Ahmad *et al.* 2020).

3.2.6.5 Ag nanopartiküllerin yeşil sentezi

Okaliptüs corymbia'nın sulu yaprak özütü kullanılarak gümüş nanoparçacıkların (Ag NP'ler) basit bir yeşil sentezi yöntemi geliştirildi ve bunların antibakteriyel ve antibiyofilm potansiyelleri araştırıldı. Bu amaçla, Okaliptüs özütünün sulu çözeltileri ve Ag NO3(1 mM) (1:4 v/v) oranında (Ali *et al.* 2015)'e göre ve Şekil 3.2'de gösterildiği gibi karıştırıldı (Salgado *et al.* 2019).



Şekil 3.2 Ag Nanopartiküllerinin yeşil sentezi. (a) yaprak yıkama ve temizleme (b) yaprak ağırlıklandırma, (c) Kaynatma (d) Ekstrakt ağırlıklandırma

3.2.6.6 Cs/ZnO ve Cs/Ag nanokompozitlerinin hazırlanması

Nanokompozitleri hazırlamak için CS, ZnO NP'ler ve Ag nanoparçacıkları iki farklı ağırlık yüzdesi (%0.05 ağırlık, %0.10 ağırlık ve %0.15 ağırlık) ile dahil edildi ve sonikatör ile 10 dakika karıştırıldı (Al-Abboodi *et al.* 2020).

3.2.7 CS/ZnO, CS/Ag, CS/ZnO/Ag ve CS/extract'in antibakteriyel etkisi

Bu tahlil (Govindasamy *et al.* 2021)'e göre yapıldı. Hazırlanan nanokompozit çözeltilerin antibakteriyel aktiviteleri, sırasıyla *S. aureus* ve *E. coli* ve *K.pneumoniae* ile Gram pozitif ve Gram negatif mikroplara karşı test edildi. Hazırlanan nanokompozitlerin ve nanoliflerin kültüre alınması prosedürü şu şekilde açıklanabilir:

Deneysel çalışma öncesinde kullanılan tüm petri kapları otoklavda steril edildi. Bakteri kültürünün besiyerini hazırlamak için petri kaplarına beş ila altı farklı koloni ayrıldı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Hazırlanan besiyerine üç farklı bakteri türü püskürtüldü. Nanokompozitlerin kültürlenmesi için ortamda (6mm) çapında birçok delik oluşturulduktan sonra nanokompozitler mikropipet (10µL) kullanılarak deliklere eklendi.

3.2.8 Sol-jel yöntemiyle nanokompozit yara örtüsü

Yara pansuman pedi, dokunmamış kumaştan ve pamuklu gazlı bezden üretildi. Yara pansumanı, eczane satın alınan ve yara pansumanı için nanokompozit materyali sarmak için kullanılan % 100 pamuk ve pamuklu gazlı bez kullanılarak yapıldı. Burada iki kat kumaş, nanoparçacık çözeltisi uygulanarak sandviç şeklinde yapıldı ve pamuklu gazlı bezin etrafına sarıldı.

3.2.8.1 Gazlı bez kaplama nanomalzemelerinin hazırlanması

Steril gazlı bezler 2.5 x 2.5 cm boyutlarında kesildi ve nanomalzemeler (20 g/100 ml) ve su:etanol (10:1) karışımı içeren bir çözeltiye daldırıldı. Daha sonra 30°C'de 40 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Reaksiyon sonunda gazlı bezlerin rengi değişti ve hemen yaranın üzerine yerleştirildi.

3.2.9 Sol-jel işlemi adımları

Sol-jel işlemi, entegre bir ağ (jel) üretmek için kimyasal çözeltilerin kullanıldığı bir ıslak kimyasal tekniktir.

Adım 1: Nanoparçacıklar, gerekli çözücü içinde dağıtılarak kolloidal çözeltiye dönüştürüldü.

Adım 2: Sol, daha sonra, bir sıvı faz (jel) içeren inorganik sürekli bir ağ oluşumuna doğru gelişti.

Adım 3: Daha sonra polimer çözeltiler halinde metal oksit oluşumu başladı.

Adım 4: Bir kurutma işleminden sonra sıvı faz jelden çıkarıldı.

Adım 5: Ardından, daha fazla polikondenzasyonu desteklemek ve mekanik özellikleri geliştirmek için bir ısıl işlem gerçekleştirildi.

Adım 6: Hazırlanan solüsyon ince yüzeye yani dokumasız kumaşa uygulandı.

Adım 7: Çözelti, her biri 3 cm olan iki katmanlı kumaşın yüzeyi arasına uygulandı.

Adım 8: Ardından, iki katmanlı işlem görmüş sandviç, pamuklu gazlı bezin etrafına sarıldı.

(İn vivo çalışma)

Genel olarak, 8 haftalık ve (170–190) g ağırlığında 42 erkek Wistar sıçanı, Irak'taki Deney Hayvanları Merkezi'nden alındı. Sıçanlar standart koşullara göre barındırıldı ve beslendi. Hayvanlarla ilgili tüm deneyler, deney hayvanlarının kullanımı ve bakımı için

Ulusal Sağlık Enstitüleri yönergelerine (NIH Publications No. 8023, revize 1978) uygun olarak gerçekleştirildi.

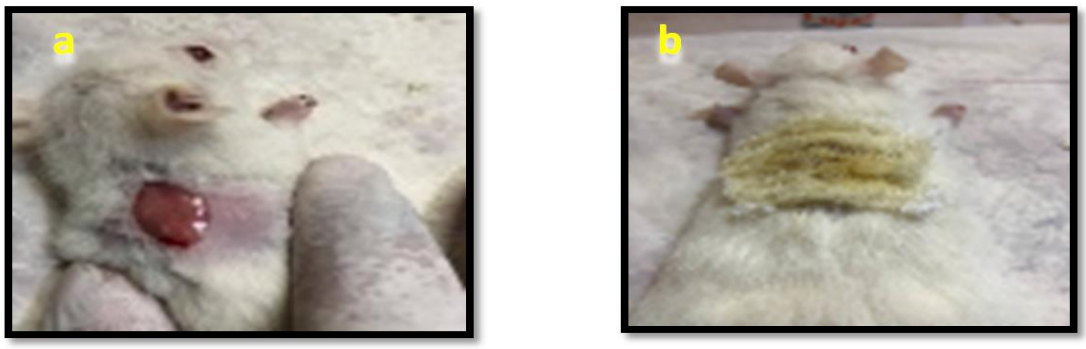
Sıçanlar uygulanan örneklere ve tedavi yaklaşımlarına göre altı gruba ayrıldı. Deney gününde, sıçanlara intraperitoneal ketamin-ksilazin (3:1, 2 ml/1 kg) ile anestezi uygulandı ve sırt tüyleri alındı ve alttaki deri %70 etanol ile silindi, tam kalınlıkta deri yaraları (2 cm x 2 cm) her sıçanın sırtında cerrahi bir bistüri ile oluşturulmuştur.

3.2.9.1 Yara kapanma oranı

Yara iyileşmesi, bütünlüğün restorasyonunu sağlamak için yaralanan dokunun onarılması işlemi olarak tanımlanırken, yara kasılması yaranın daralmasını veya kapanmasını içermektedir. Buna göre, kapanma oranını tahmin etmek için, yara alanı farklı zaman aralıklarında ölçülmüştür Şekil 3.3'te.

- 6. günde CS/ZnO, CS/Ag ve CS/ZnO/Ag ile tedavi edilen sıçanlarda yara boyutunun incelenmiş,

- Sonraki günlerde 12. ve 18. günlerde yara boyutunun incelenmesi ve kontrol sıçanları ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.3 Bu çalışmada üretilen nanoparçacıkların üzerindeki etkinliğini test etmek amacıyla sıçanlarda yapay yara yapma yöntemi. (a) yapay yara. (b) pamuklu gazlı bez etrafında bükülmüş yara

3.2.9.2 Fiziksel karakterizasyon

UV-Vis spektrum analizi:

UV/vis spektrofotometresi (200-800 nm), bir nm çözünürlüğe sahip absorbans rölesinin partikül konsantrasyonunu, boyutunu (çapını) ve partikül şekil kaymasını belirlemek için basit bir yöntem olarak kullanıldı (Haiss *et al.* 2007).

FT-IR analizi:

FTIR (Shimadzu), Ag NP'lerin ve aloe vera özütünün yüzeyindeki fonksiyonel grupların tanımını inceledi ve spektrumlar (4000-400) cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte tarandı. Ag nanoparçacıklarının bir KBr matrisi içinde dağıtılmasıyla, kuru numuneler hazırlandı, numunelerin değerlendirilmesi için standart olarak KBr neredeyse şeffaf bir disk oluşturacak şekilde sıkıştırıldı.

3.2.9.3 Biyolojik karakterizasyon

Mueller-hinton plaka hazırlama:

Bu ortam, üretim talimatlarına göre hazırlandı. Ortam, otoklavlandıktan sonra soğutuldu (45-50 $^{\circ}$C) ve daha sonra plakalara yaklaşık 4 mm derinlikte döküldü. Kullanıma kadar plakalar, agar katılaştıktan sonra 4°C'ye yerleştirildi.

İnokulum hazırlama:

İnokulumu hazırlamak için, izolatların genç kültür kolonileri (18-24 saat), 600 nm'de No. 0.5 McFarland standart çözeltisine eşit 1.5 * 10 ^ 8 hücre / ml kültür yoğunluğuna sahip bir inokulum sağlamak üzere 5 ml'lik bir normal salin tüpüne aktarıldı.

Test plakaları inokülasyonu:

Plakaların aşılanması, steril bir swab ıslatılarak gerçekleştirildi. Swabı birkaç kez döndürerek, fazla inokulum sıvı noktasının üzerinde tüpün iç duvarına sıkıca ovalandı. Ardından, swab steril agar yüzeyi boyunca (60° döndürülmüş) çalıştırılarak Muller Hinton agar plakaları aşılandı. Bu yöntem tekrarlandı. Son olarak, eküvyonun eşit dağılımını sağlamak için sürüntü agar yüzeyinin kenarı etrafında hareket ettirildi.

Oda sıcaklığında, plakalar kapalı kapak ile oda sıcaklığında birkaç dakika kurumaya bırakıldı. Plakalar, 37 $^{\circ}$C'de 30 dakika (18-24) saat süreyle inkübe edildi.

Kültür:

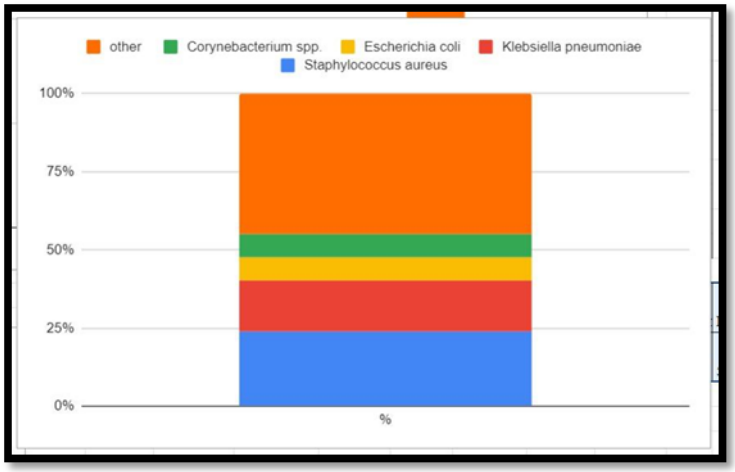
Sentezlenen gümüş NP'lerin klinik bölgelerden izole edilen çoklu ilaca dirençli bakterilerin farklı izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesi, plaka sayma yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Magana *et al.* 2008). Bakteriler *Escherichia coli , Staphylococcus aureus ve K. pneumonia'yı içeriyordu* (çünkü mevcut çalışmada en sık görülen bakteri türleri bunlardı). MIC tayini, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (ClSI) referans protokolü M26-A (CISI 1999)'a göre modifiye edilerek bir mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı.

Hücrelerin nihai konsantrasyonu, (5 x 10^5) CFU/ml'lik bir konsantrasyon elde etmek için (0.08-0.1) optik yoğunluğa sahip 625 nm'de bir spektrofotometrede Mueller-Hinton suyu ile ayarlandı. Deney, sırasıyla 150 µL inokulum ve 150 µL numunenin 16m'lik (100 ug / ml, 50 ug / ml ve 25 ug / ml) nihai konsantrasyonlarına eklenmesiyle 3 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. Plakalar 36 °C'de 24 saat inkübe edildi ve daha sonra 50 µL CTT (sulu solüsyonda %0.5) ilave edildi. 6 saatlik inkübasyondan sonra, minimum inhibitör konsantrasyonun (MIC), CTT tarafından verilen hücrelerin görünür büyümesini inhibe edebilen en düşük konsantrasyon olduğu belirlendi (ölü hücreler boyanmadı). İnkübasyon periyodundan sonra, genel inhibisyon alanının çapları milimetre olarak test edildi ve sonuçlar standart inhibisyon bölgesi kılavuzuna (ClSI) göre yorumlandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakteri İzolasyonu

Genel olarak, Al-Najif Al-Eshraf şehrinde farklı hastanelere (Al-Hakeem General Hospital ve Al-Zahraa Eğitim Hastanesi) başvuran 60 (%53)'ı kadın ve yaşları (20 ila 100) arasında değişen 112 hastadan 150 yara örneği toplandı. (%44.2)'si Gram pozitif ve (%55.8)'si Gram negatif olmak üzere toplam 28 farklı mikrobiyal tür izole edildi. Tespit edilen en yaygın bakteri türü Staphylococcus aureus (%16) olmakla beraber, bunu Şekil 4.1'de ve Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere Klebsiella pneumoniae (%11) ve Escherichia coli (%5) izledi.



Şekil 4.1 Enfekte yaraları olan hastalardan toplanan 150 sürüntü örneğinden izole edilen mikroorganizmaların yüzdesi

Tek bir bakteri türü, yaraların çoğunu enfekte etti. En sık görülen izolat, diğer birçok araştırmada çeşitli yara türlerinden izole edilen en yaygın mikrop (toplam mikropların % 40-60'ı) olduğu gösterilen *S. aureus*'tur (Bowler and Davies 1999, Brook and Frazier 1998, Davies *et al.* 2004, Körber *et al.* 2010).

Gram-negatif bakteriler içinde *P. aeruginosa*, diğer raporlarla da uyumlu olarak daha fazla tespit edildi (Burmølle *et al.* 2010, Halbert *et al.* 1992). *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler, kronik yaralarda enfeksiyonun sürmesine ve

yara iyileşmesinin gecikmesine neden olan virülans faktörlerini üretirler. *S. aureus*, koagülaz, katalaz, kümelenme faktörü A ve lökositinler gibi virülans faktörlerinin bir sonucu olarak önemli enfeksiyonlara neden olur (Dissemond 2009). Benzer şekilde, *P. aeruginosa* tarafından üretilen bir elastaz, yara ortamının patojenitesi ile ilişkilendirilmiştir (Schmidtchen *et al.* 2003).

Çizelge 4.1 Erkeklerde ve kadınlarda diyabetik ayak enfeksiyonu prevalansı

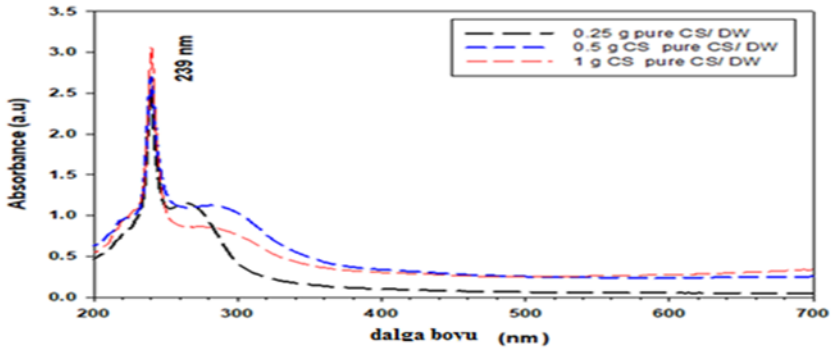
Cinsiyet	N(%)
Erkek	62 (% 47)
Kadın	60 (% 53)

4.2 NP'lerin Fiziksel Karakterizasyonu

4.2.1 Cs NP'ler için UV-Vis spektroskopisi

Reaksiyon karışımında üretilen CS nanoparçacıklarının absorpsiyon spektrumu 239 nm'de bir tepe noktasına sahip olduğu gözlemlendi Şekil 4.2.

Kitosanın 200-300 nm aralığında zirve absorbans gösterdiği bilinmektedir. Şekil 4.10, farklı kitosan konsantrasyonları için UV-vis spektrumunu göstermektedir, kitosan konsantrasyonu arttıkça tepe noktalarının yoğunluğu artmıştır. Maksimum tepe absorbansı, parçacıkların daha yüksek bir dağılımını temsil eden 1g konsantrasyon için 239nm olarak gerçekleşti.

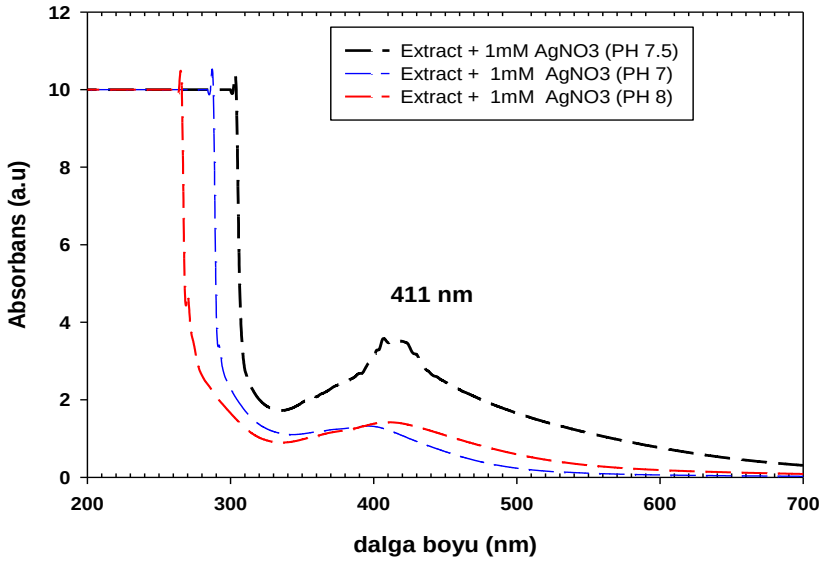


Şekil 4.2 Kitosan NP'lerinin UV-vis spektroskopi analizi

Nanopartiküllerin üretimi, reaksiyon çözeltisinde kitosan NP'lerinin varlığını düşündüren, 280 nm'de tek bir tepe noktası gösteren UV-vis spektrofotometre kullanılarak araştırıldı.

4.2.2 pH'ın etkileri

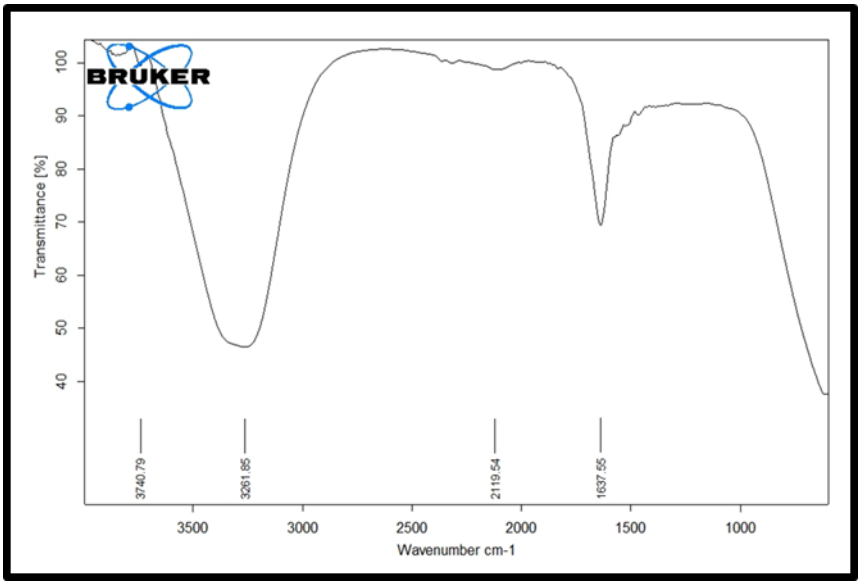
Ag nanoparçacığının sentezi, sentez sırasında çok önemli bir rol oynayan reaksiyon ortamının pH'ına bağlıdır (Singh *et al.* 2009). Ag nanoparçacığının sentezi, bazik ila nötr pH aralığı arasında hemen gerçekleşir. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, Ag nanoparçacıklarının oluşumu asidik koşullar veya asidik pH ortamında yavaşdı, bazik koşullar veya bazik pH ortamında hızlandı. Daha düşük pH veya asidik pH, daha büyük nanoparçacık ile sonuçlanırken, temel pH'da küçük şekilli küresel nanoparçacık oluştu. TEM görüntülerinde gösterildiği gibi, pH 7.5 ile özün daha yüksek konsantrasyonu daha yüksek miktarda küresel şekilli ve boyut aralığı (18-20) nm olan nanoparçacık oluşturdu.



Şekil 4.3 *Eucalyptus corymbia* yaprağı ekstraktından Ag NP'lerin oluşumunda AgNO3/DW'nin PH'ının etkisi

4.2.3 Yaprak ekstraktının FTIR spektroskopisi analizi

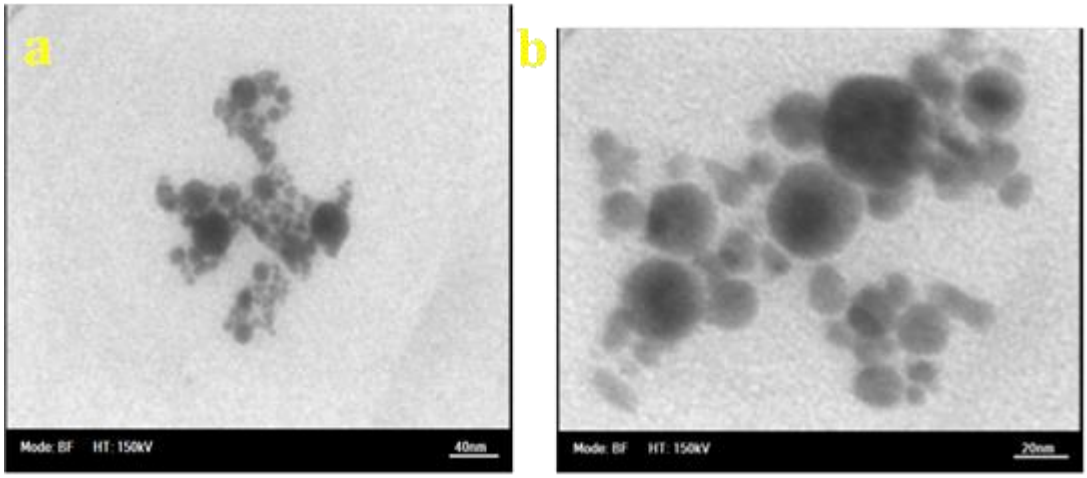
Okaliptüs corymbia yaprak özütünün ve sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR spektrumları, Ag+ iyonlarının azaltılmasından ve biyolojik olarak indirgenmiş Ag-NP'lerin kapatılmasından sorumlu olası biyomolekülleri belirlemek için yapıldı. FT-IR sonuçları, Okaliptüs corymbia yaprak özütlerinde (–C=C) ve hidroksil (–OH) gruplarının varlığını gösterdi Şekil 4.4'te.



Şekil 4.4 Okaliptüs corymbia yaprağı ekstresinin FTIR'ı

4.2.4 Sentezlenen AgNP'lerin elektron mikroskobu

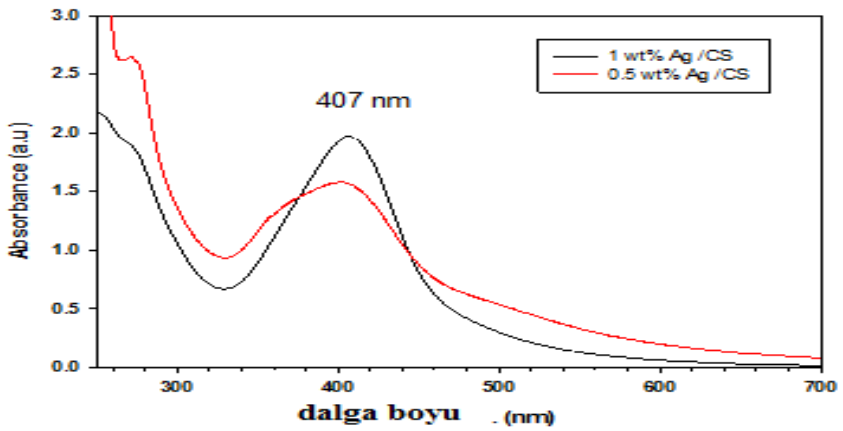
Biyolojik olarak sentezlenmiş Ag NP'ler için geçirmeli elektron mikroskobu sonuçları, Şekil 4.5, ortalama Ag NPs çapının (18-20) nm olduğunu ve monodispersiteye işaret ettiğini ortaya koydu. Parçacıklar küre şeklindeydi ve *Eucalyptus corymbia* özlerinin indirgeme/dengeleme rolleri için çok uygun olduğuna işaret eden minimal topaklanma sergiledi.



Şekil 4.5 AgNP'lerin TEM görüntüleri (a) (40 nm) büyütme (b) (20) nm büyütme

4.2.5 Cs/Ag NP'ler için UV-vis spektroskopi

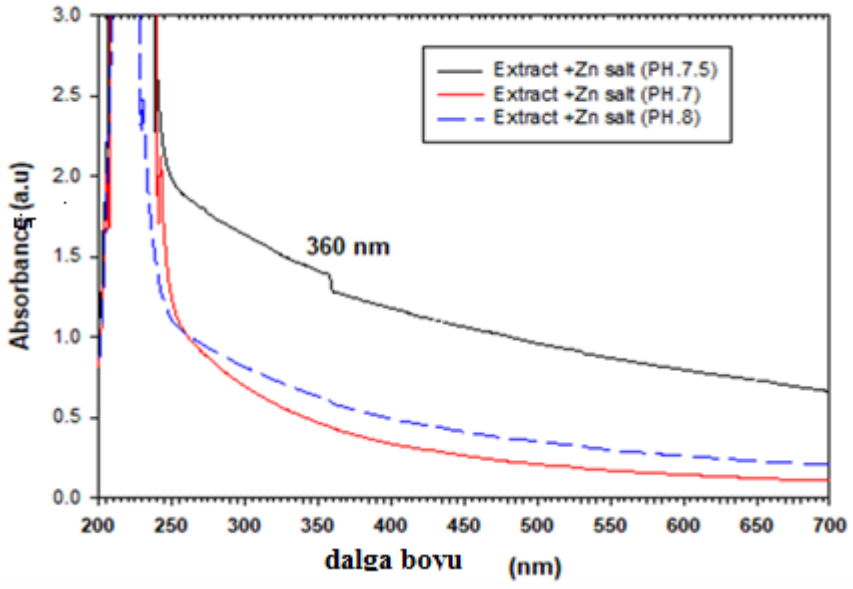
DW'de (ağırlıkça %0.05, ağırlıkça %0.1) Ag NPs konsantrasyonlarında CS ile kapatılan Ag nanoparçacıklarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Ag'nin karakteristik absorpsiyon zirveleri 407 nm'de gözlemlendi. Metal nanoparçacıkların sentezi sırasında bir kapaklama molekülünün ana işlevi, nanoparçacıkları etkili bir şekilde stabilize etmek için gerekli miktar uygulandığında çekirdeklenme sürecini ve agregasyonu kontrol etmektir. UV-Vis spektroskopisinden elde edilen bulgular, sentezlenen tüm Ag nanoparçacıklarının hacimli gümüşe kıyasla maviye kaymış absorpsiyona (1000 nm civarında plazma rezonansı) sahip olduğunu doğruladı. Maviye kaymış absorpsiyon zirvesi, kuantum hapsetme etkisine atfedilir.



Şekil 4.6 Cs/Ag NP'lerin UV-vis spektroskopi analizi

4.2.6 Sentezlenen ZnO NP'lerin UV-Vis spektroskopisi

Reaksiyon karışımında üretilen ZnO nanoparçacıklarının absorpsiyon spektrumu, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi ZnO Np'ler için 360 nm'de bir tepe noktasına sahipti. Çinko Oksit nanoparçacığının yeşil sentezini etkileyen faktörlerden pH'ın etkisi ZnO nanoparçacığının birleşmesinde de önemli bir rol oynar, reaksiyon karışımının pH'ı ZnO nanoparçacığının boyutunu kontrol eder. Ekstraktlardan sentezlenen ZnO nanoparçacığı, reaksiyon karışımının pH'ı (pH 8'den) daha yüksek olduğunda ZnO nanoparçacık birikimi daha büyük parçacıklar oluşturdu, en yüksek pH'ın (pH 7) olduğu durumda ise bu birikim gerçekleşmedi ve Şekil 4.7'de gösterildiği gibi reaksiyon, ortamda Çinko Nitrat'ın Çinko Oksite tamamen indirgenmesiyle sonuçlandı.



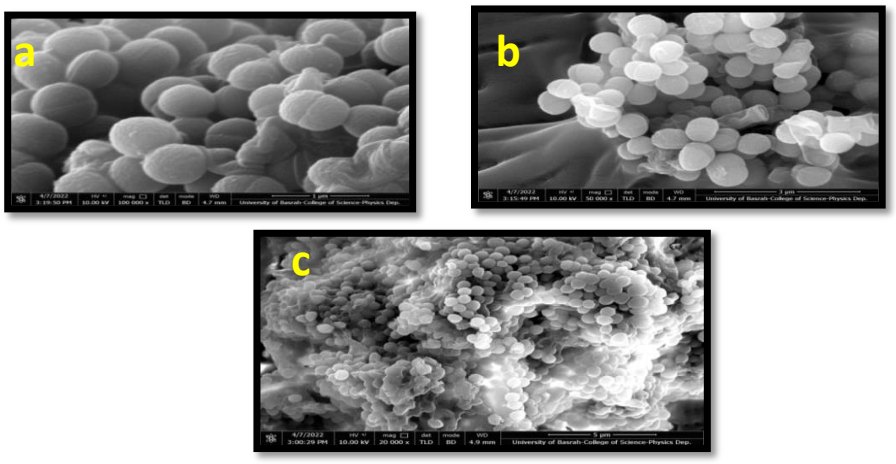
Şekil 4.7 *Eucalyptus corymbia* yaprağı ekstraktından ZnO NP oluşumunda pH'ın etkisi

4.2.7 Bakterilerin ZnO/Ag/CS kompozit kaplamalarla işlemden önceki ve sonraki mikro morfolojileri

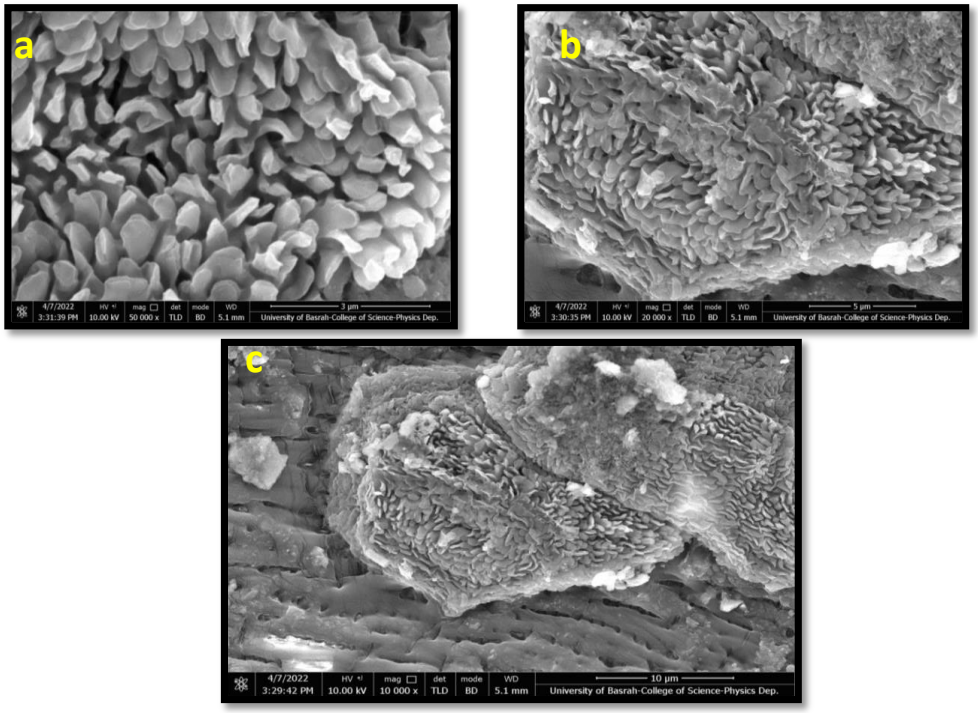
ZnO/Ag/CS kompozitlerinin biyofilmdeki *E.coli* mimarisi üzerindeki biyofilm üretimi yeteneğinin inhibisyonundaki etkisini görselleştirmek için bir çalışma yapıldı. Bu amaçla Fe-SEM (Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu) kullanılarak işlem görmüş ve işlem görmemiş hücrelerin hücre yapısı araştırıldı ve bulunan sonuçlar Şekil 4-6'da verildi.

ZnO/Ag/CS kompozit kaplamaların antibakteriyel mekanizmasını ortaya çıkarmak için CS kompozit kaplamalarla işlemden önce ve sonra bakteri hücre yapıları SEM ile karakterize edildi. Şekil 4.8 (a,b ve c)'de gösterildiği gibi, işlem görmemiş bakteri hücreleri pürüzsüz yüzeylere sahipti. *S. mutans*'ın işlenmemiş bakteri hücreleri, hücre dışı polimerik madde ye gömülü büyük kümelere sahip hücreleri gösterdi.

İşlenmiş ZnO/Ag/CS kompozit kaplamadan sonra, bakteri hücrelerinin yüzeyleri önemli ölçüde bastırıldı ve membranlar ciddi şekilde bozuldu Şekil 4.9 (a, b ve c). ZnO/Ag/CS kompozit kaplamalar ile müdahale edilen bakteri hücreleri açıkça zarar gördü. Bu arada, bakteri hücre yüzeyine daha fazla nanoparçacık yapıştı. Biyofilm ZnO/Ag/CS kompozit ile müdahale edildiğinde hücrelerin sayısında ve tekil hücre sayısında ve kısa zincir sayısında önemli bir azalma gözlendi.



Şekil 4.8 Müdahale edilmemiş bakterilerin SEM'i Ölçek çubuğu, (a): 1 µm, (b): 3 µm ve (c): 5 µm



Şekil 4.9 Bakteri hücre duvarlarının deformasyonunu, büzülmesini ve hasarını gösteren ZnO/Ag/CS kompoziti ile muamele edilmiş bakterilerin SEM'i. Ölçek çubuğu, 3 µm, (b): 5 µm ve (c):10 µm

Sonuçlar, ZnO-NP'lerin bakterisidal mekanizmasının kısmen bakteriyel hücre duvarı bütünlüğünün bozulmasından ve bunun sonucunda ZnO'nun reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik edebileceği ve hücre zarlarının yapısını ve AgNP'lerin yapısını yok edebileceği bakteri hücrelerinin parçalanmasından kaynaklandığını gösterdi. AgNP'ler bakteri hücre duvarlarını yok etmek için gümüş iyonları salarak bakterileri öldürebildi.

4.3 NP'lerin Biyolojik Aktivitesi

4.3.1 NP'lerin antimikrobiyal olarak aktivitesi

4.3.1.1 Cs NP'leri

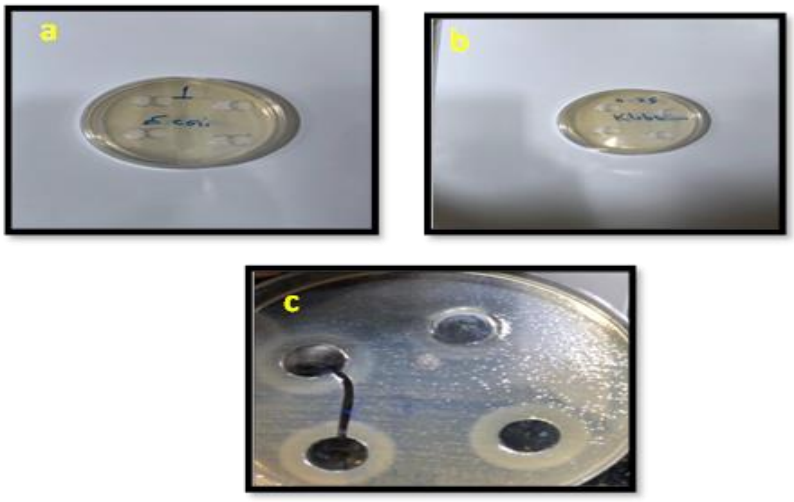
Hazırlanan nanokompozit çözeltilerin antibakteriyel aktiviteleri, sırasıyla *S. aureus ve E. coli ve K.pneumoniae* ile Gram pozitif ve Gram negatif mikroplara karşı test edildi.

Hazırlanan besiyerine üç farklı bakteri türü püskürtülmüştür. Nanokompozitlerin kültürlenmesi için ortamda (6mm) çapında birçok delik oluşturuldu, bundan sonra nanokompozitler bir mikropipet (10µL) kullanılarak deliklere eklendi.

Büyümeye farklı konsantrasyonlarda (0.25g 0.5g, 1.0g) CS NP'ler ile müdahale ettikten sonra, *Staphylococcus aureus* bakterisinin inhibisyon zonu büyümesinin sonucu Şekil 4.10 ve Çizelge 4.2 'de gösterildiği gibi İnhibisyon Zonu (IZ) sırasıyla (5, 8 ve 10) ml oldu. *E. coli ise* sırasıyla (5, 7 ve 10) değerlerini gösterdi. *Klebsiella pneumoniae* ise (5, 8 ve 10) İnhibisyon Zonu (İZ) gösterdi.

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda (0.25 g. 0.5g, 1.0 g) CS'nin antibakteriyel aktiviteleri ve *Staphylococcus aureus* , *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi

Bakteri türü CS Konsantrasyonu	***S. aureus***	***E. coli***	***Klebsiella pneumoniae***
	İnhibisyon Zonu (IZ)		
0.25 g	**5**	**5**	**5**
0.5g	**8**	**7**	**8**
1.0 g	**10**	**10**	**10**



Şekil 4.10 a) *E.coli'nin Büyümesi* b) *Klebsiella pneumoniae'nin büyümesi*, c) Farklı konsantrasyonlarda CS NP'leri ile tedavi edilen *Staphylococcus aureus'un büyümesi*

Yüksek konsantrasyondaki Kitosan NP'lerinin bakterilerin büyümesini engelleyebildiği sonucu diğer raporlarla paralellik gösterdi (Liu *et al.* 2006). Sonuçlar, nanoparçacıkların hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteri üremesini engelleme yeteneğine sahip olduğunu gösterdi. Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilerden biyojenik kitosan NP'lerine karşı daha yüksek duyarlılığa sahipti. Bu durum, Gram pozitif bakterilerin, kitosan'ın antibakteriyel etkisine Gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu sonucu (Alishahi 2012) ile uyumlu olduğunu gösterdi. Kitosan'a bakteriyel maruziyeti yorumlamak zor olduğu sonucuna varıldı.

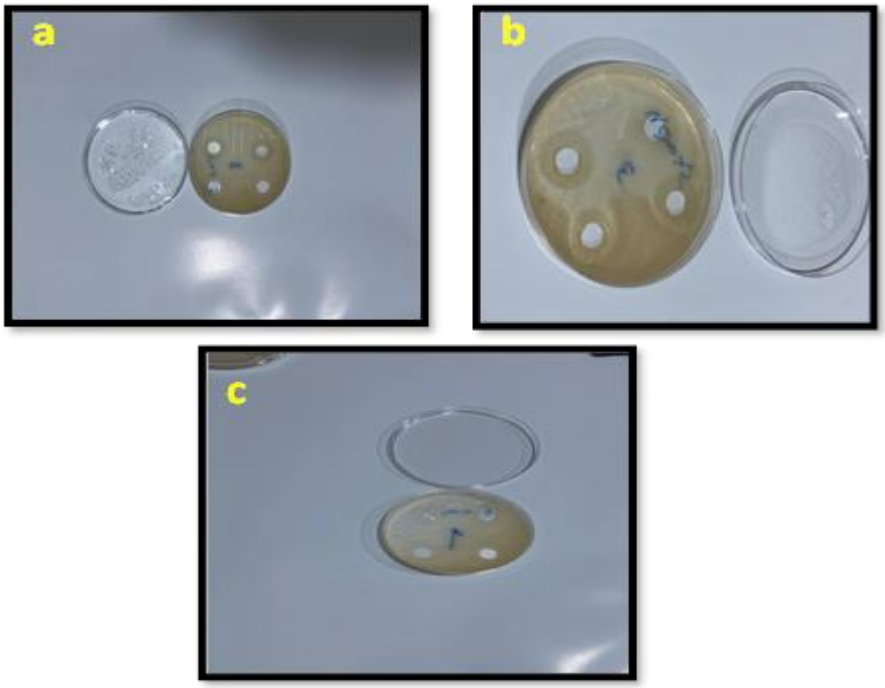
Artan çoklu ilaç direnci (MDR) tehdidi nedeniyle, bilim insanları, dirençli alanlar haline gelen mevcut antibiyotiklerin yerini almak için antibiyotiklere etkili bir alternatif, yeni giriş-ilaç takviyesi bulma görevini üstlenmiştir. Nanopartiküller artık antibiyotiklere umut verici bir çözüm olarak görülüyor ve bakteriyel MDR sorununun üstesinden gelmek için yüksek bir potansiyele sahip görünüyorlar (Franci *et al.* 2015).

4.3.1.2 Cs/Ag NP'leri

Büyümeye, farklı Ag NP konsantrasyonlarına sahip Cs (1g) /Ag NP'ler ile müdahale ettikten sonra (ağırlıkça %0.05, ağırlıkça %0.1 ve ağırlıkça %0.15), *Staphylococcus aureus* bakterisinin inhibisyon zonu büyümesi sırasıyla (8, 9 ve 9) olarak gerçekleşti. Bunun yanı sıra, *E. coli* bakterilerinin inhibisyon zonu büyümesi sırasıyla (8, 10 ve 8) olurken, *Klebsiella pneumoniae* bakterisi Çizelge 4.3 ve Şekil 4.11'de görülebileceği gibi (12, 14 ve 16) inhibisyon zonu büyümesi gösterdi.

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda Ag NP'ler (ağırlıkça %0,05, ağırlıkça %0,1 ve ağırlıkça %0,15) ile Cs(1g) /Ag NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve *Staphylococcus aureus, E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi

Bakteri Ag NP Konsantrasyonları	***Staphylococcus aureus***	***E. coli***	***Klebsiella pneumoniae***
	İnhibisyon Bölgesi (IZ)		
Ağırlıkça %0.05	8	8	12
Ağırlıkça %0.1	9	10	14
Ağırlıkça %0.15	9	8	16



Şekil 4.11 Ağırlıkça % 01.5 konsantrasyonlarla mudahale edilmiş Ag NP'ler ile A : *Staphylococcus Büyümesi* , B : *Klebsiella pneumoniae* Büyümesi , C : *E.coli'nin büyümesi*

4.3.1.3 Cs/ZnO NP'ler

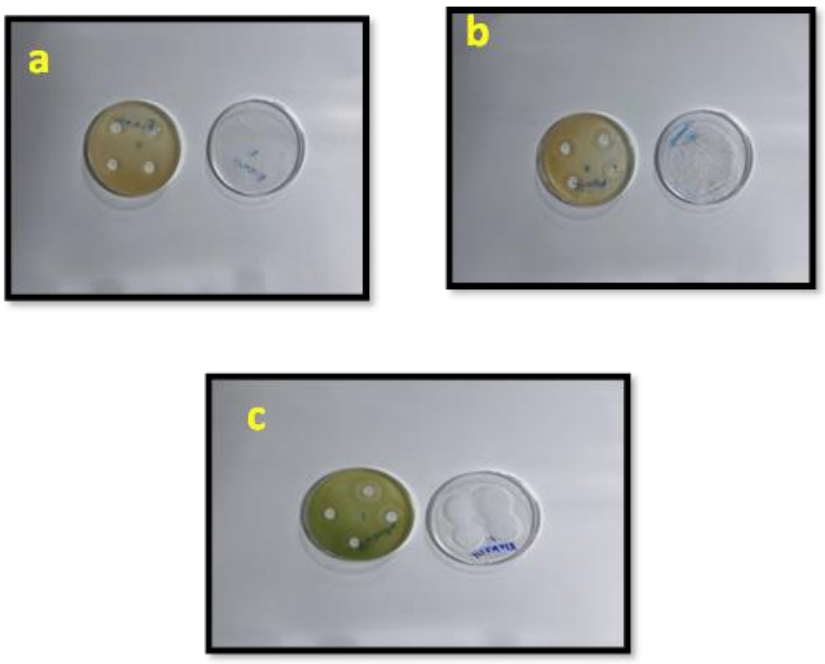
Büyümeye ağırlıkça %0,05, ağırlıkça %0,1 ve ağırlıkça %0,15 Cs(1g)/ZnO NP'ler ile müdahale ettikten sonra , *Staphylococcus aureus* bakterisinin inhibisyon bölgesi büyümesinin sonucu sırasıyla (8, 8 ve 8) olarak gerçekleşti. Bunun yanı sıra, *E. coli* sırasıyla (8, 10 ve 8) inhibisyon bölgesi büyümesi gösterirken *Klebsiella pneumoniae,* Çizelge 4.4 ve Şekil 4.12'de görülebileceği gibi (9, 9 ve 11) inhibisyon zonu büyümesi gösterdi.

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda (ağırlıkça %0,05, ağırlıkça %0,1 ve ağırlıkça %0,15) Cs/ZnO NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve *Staphylococcus aureus , E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae bakterilerinin inhibisyon bölgesi büyümesi*

Bakteri ZnONP'ler Konsantrasyonlar	***Staphyloccocus aureus***	***E. coli***	***Klebsiella pneumoniae***
	İnhibisyon bölgesi (IZ)		
Ağırlık %0.05	8	8	9
Ağırlık%0.10	8	10	9
Ağırlık%0.15	8	8	11

Nano boyutlu ZnO sentezi, yeni antibakteriyel ajan olarak kullanımının araştırılmasının önünü açmıştır. Benzersiz antibakteriyel ve antifungal özelliklerine ek olarak, ZnO-NP'ler yüksek katalitik ve yüksek fotokimyasal aktivitelere sahiptir. ZnO, UVA (315–400 nm) ve UVB (*280–315* nm) bölgelerinde antibakteriyel yanıtta faydalı olan ve kozmetikte UV koruyucusu olarak kullanılan yüksek optik absorpsiyona sahiptir (Sirelkhatim *et al.* 2015).

Literatürde öne sürülen ayırt edici mekanizmalar şu şekilde sıralanmıştır: ZnO-NP'lerin hücre duvarları ile doğrudan teması ve bunun sonucunda bakteriyel hücre bütünlüğünü bozması (Adams *et al.* 2006, Brayner *et al.* 2006, Sirelkhatim *et al.* 2015), antimikrobiyal iyonların çoğunluk Zn2+ iyonlarının serbest bırakılması (Kasemets *et al.* 2009, Li *et al.* 2011) ve ROS oluşumu (Sirelkhatim *et al.* 2015). Bununla birlikte, çözünmüş Zn türleri, ZnO-NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra ortam bileşenlerine göre değişebileceğinden, toksisite mekanizması çeşitli ortamlarda farklılık gösterir (Li *et al.* 2011).



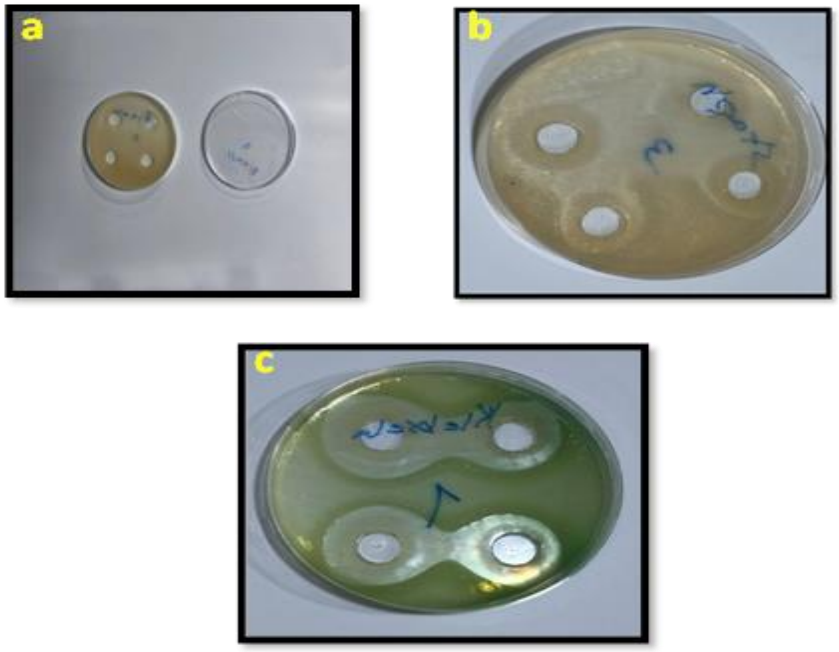
Şekil 4.12 ZnO NP'ler ile müdahale edilen (% 0.15 ağırlık) **a**: *E.coli'nin Büyümesi,* **b**: *Staphylococcus aureus'un Büyümesi* **c**: *Klebsiella pneumoniae'nin büyümesi*

4.3.1.4 CS/ ZnO /Ag NP'ler

Büyümeye, her biri farklı oranlarda ve daha yüksek ZnO ve Ag NP (% 0.15 ağırlık) konsantrasyonlarında (1:1, 2:1 ve 3: 1) CS/ZnO/Ag NP'ler ile müdahale ettikten sonra *Staphylococcus aureus* bakterisinin inhibisyon zonu büyümesinin sonucu sırasıyla (9, 9 ve 10) oldu. Bunun yanı sıra, *E. coli* sırasıyla (8, 10 ve 10) inhibisyon bölgesi büyümesi gösterirken *Klebsiella pneumoniae* Çizelge 4.5 ve Şekil 4.13'te görüldüğü gibi sırasıyla (9, 10 ve 11) inhibisyon zonu büyümesi gösterdi.

Çizelge 4.5 Farklı oranlarda ve daha yüksek ZnO ve Ag NP konsantrasyonlarında (1:1, 2:1 ve 3:1) CS/Ag/Zn NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri ve *Staphylococcus aureus* bakterisinin inhibisyon zonu büyümesi , *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae*

bakteri ZnO/Ag Oran	***Staphylococcus aureus***	***E. coli***	***Klebsiella pneumoniae***
	İnhibisyon Bölgesi (IZ)		
1:1	9	8	9
2:1	9	10	10
3:1	10	10	11



Şekil 4.13 (3:1) ZnO/Ag NP'lerle karıştırılmış CS NP'leri ile müdahale edilen **a :** *E.coli'nin* Büyümesi, **b**: *Staphylococcus aureus'*un Büyümesi **c** : *Klebsiella pneumoniae'*nin büyümesi

4.4 Histopatolojik Çalışmalar ve Fotoğraflar

Tedavi prosedürü sırasında tüm değişiklikleri izlemek, yara iyileşme sürecinin etkinliğini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir. Yaralanmayı takip eden 6, 12 ve 18. günlerde yara alanı izlendi ve yara kapanma yüzdesini değerlendirmek için ölçüldü. Histopatolojik araştırmaya göre, Keratinositler yara bölgesini kaplamak ve cilt yaralarının iyileşme mekanizmasında epidermal bütünlüğü yeniden sağlamak için

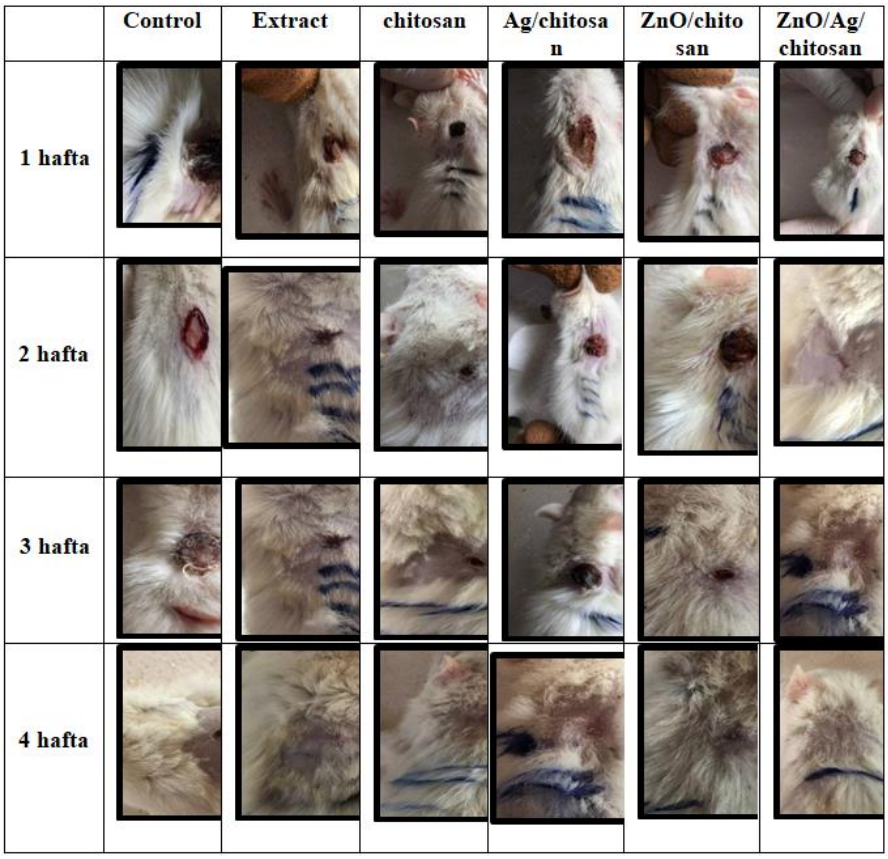
çoğalır ve göç eder. Deri örneklerinin histolojik incelemeleri sonucunda doku yeniden epitelizasyonu ve hücre çoğalmasının olduğu görüldü. Histolojik incelemeye dayanarak, dermal tabaka oluşumu ve epidermis rejenerasyonunun tedavinin 12. gününde başladığı söylenebilir.

4.4.1 Yara kapanma hızı

Yara iyileşmesi, bütünlüğün yeniden sağlanması için yaralı dokuyu onarma süreci olarak tanımlanır, yaranın kasılmasını, yaranın daralmasını veya kapanmasını içerir. Kapanma oranını tahmin etmek için yara alanı farklı zaman aralıklarında ölçüldü. ZnO/Ag/CS ile tedavi edilen yaralarda, yaralanmadan sonraki 18. günde diğer gruplara kıyasla daha iyi bir yara kapanma paterni görüldü ($p < 0.05$). Tedavi edilen grupların farklı günlerdeki yara kapanma oranları Şekil 4.14'te göstermektedir.

Bir yaranın iyileşmesi, sınırları belirsiz çok aşamalı bir süreçtir. Çalışılan örneklerdeki her bir öğe/ bileşenin iyileşme evreleri ve elde edilen sonuç üzerinde etkisi oldu. Sonuçlarda belirtildiği gibi, tüm numuneler, tedaviden sonraki 6 gün içinde yapılan kontrollerde karşılaştırıldığında önemli iyileşme etkileri gösterirken, verimliliklerdeki farklılıklar önemsizdi. İyileşmenin 12. gününde numunelerden benzer sonuçlar elde edildi. Ayrıca, tedavinin 18. gününde, yara iyileşmesine dayalı olarak tedavi edilen örnekler arasındaki farkların, kontrol örneklerine kıyasla önemli ölçüde iyileştiği gözlemlenmiştir.

Bulgularımız, CS/ ZnO/Ag NP'lerin yaranın iyileşmesini hızlandırdığını ve yaranın kaynama oranını artırdığını göstermiştir. Yara iyileşme sürecinin iyileştirilmesinde bir dizi unsur karmaşık olabilir. Antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobials özellikleri gibi tıbbi tedavi ürünleri, muhtemelen (CS/ ZnO/Ag) NPlerin potensyal yara iyileştirici etkisine katkıda bulunan faktörler arasındadır. Bu nedenle, yara iyileştirme performansı için kullanılan inorganik bileşiklerin biyoaktif özelliklerini ve (CS/ ZnO/Ag) NP'lerin optimum hazırlık ve uygulama koşullarını geliştirmek için daha fazla araştırma çalışmasına ihtiyaç vardır.



Şekil 4.14 Farklı günlerde tedavi edilen grupların yara kapanma oranı

Biyoaktif ve inorganik bileşiği oluşturmak için ek revizyonlar zorunludur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ag NP'lerin ve ZnO NP'lerin yeşil ve çevre dostu sentezinde indirgeyici madde olarak Okaliptüs Globulus yaprağı ekstresi kullanılması denenmiş ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır. AgNP'lerin ve ZnO NP'lerin UV-vis spektrumları, Ag NP'lerin ve ZnO NP'lerin oluşumunun birincil göstergesi olarak kabul edilen rezonans Plazmon absorpsiyon geçişleri olgusu nedeniyle tepe dalga boylarında değişiklik göstermiştir. TEM karakterizasyon işlemi, AgNP'lerin küresel bir şekle sahip olduğunu göstermiştir. Farklı ağırlık yüzdelerinde AGNP'ler ve ZnO NP'ler yüklü kitosanın CS / ZnO / Ag nanokompozitlerinin üretilmesinin hem gram pozitif hem de gram negatif patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliği artırabileceği gözlenmiştir. Hazırlanan tüm bileşimler bir dizi bakterisidal davranış sergilemiş ve bimetalik formülasyonlar, CS / ZnO / Ag nanokompozitlerinin antibakteriyel aktivitesini geliştiren ZnO ve Ag nanoparçacıklarının yüksek antibakteriyel aktivitesinden dolayı sinerjik bir antibakteriyel etki göstermiştir. CS / ZnO / Ag nanokompozit ile işlem görmüş geleneksel pamuklu gazlı bez ile tedavi, modern yara pansumanlarına göre yara bakımında daha iyi sonuç vermiştir. Bu tür CS / ZnO / Ag nanokompozitinin emülsiyonu, daldırma-kuru kürleme işlemi gibi basit bir yöntem kullanılarak tekstil kumaşlarına kolaylıkla uygulanabilir. Kitosan / Ag / ZnO ile işlem görmüş pamuklu gazlı bezin antibakteriyel etkinlik değerleri, nanoparçacıkların her biri ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, CS / ZnO / Ag nanokompoziti için bir tür sinerjik etki göstererek artmıştır. Pamuklu gazlı bezin CS / ZnO/ Ag nano kompozit ile işleme tabi tutulmasının, kuruma süresini, fitilleme kabiliyetini ve su emiciliğini yani modern bir yara örtüsünün ana özelliklerini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Yara iyileşmesi için Ag NP'li CS / PVP polimerlerinin hazırlanması, kolajen / CS / Ag nano kompozitinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi, farklı boyut ve şekle sahip hibritin (Ag / ZnO) yara bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi ve optimize edilmesi konularının çalışılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abd-Elsalam, K. A. 2021. Zinc-Based Nanostructures for Environmental and Agricultural Applications, Elsevier Science, 2: 12-15.

Adams, l. K., lyon, D. Y. and Alvarez, P. J. J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions, Water Research, l40(19): 3527–3532.

Ahmad, H., Venugopal, K., Rajagopal, K., De Britto, S., Nandini, B., Pushpalatha, H. G. and Jogaiah, S. 2020. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using Eucalyptus globules and their fungicidal ability against pathogenic fungi of apple orchards. Biomolecules, 10(3): 425.

Al-Abboodi, S. M. T., Thahab Al-Abboodi, S. M., Yahya, A. N. and Almussawy, T. A. 2020. Preparation and Characterization of Chitosan/ZnO/Ag Nanocomposites as Antibacterial Hydrogel for Wound Dressing, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 4: 34-36.

Al-Abboodi, S. M. T., Yahya, A. N. and Almussawy, T. A. 2020. Preparation and Characterization of Chitosan/ZnO/Ag Nanocomposites as Antibacterial Hydrogel for Wound Dressing. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 978(1): 012040.

Aleksic Sabo, V. and Knezevic, P. 2019. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. plant extracts and essential oils: A review, Industrial Crops and Products, 132: 413–429.

Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Kadaikunnan, S., Alobaidi, A. S., Sharafaddin, A. H., Alyahya, S. A. and Almanaa, T. N. 2019. Prevalence of Escherichia coli strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk, Saudi Journal of Biological Sciences, 26(7): 1557–1562.

Ali, A., Phull, A. R. and Zia, M. 2018. Elemental zinc to zinc nanoparticles: is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns, Nanotechnology Reviews, De Gruyter, 7(5): 413–441.

Ali, K., Ahmed, B., Dwivedi, S., Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A. and Musarrat, J. 2015. Microwave Accelerated Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles with

Eucalyptus globulus leaf Extract and Their Antibacterial and Antibiofilm Activity on Clinical Isolates, PloS One, 10 (7): e0131178.

Allanore, Y., Denton, C.P., Krieg, T., Cornelisse, P., Rosenberg, D., Schwierin, B. and Matucci-Cerinic, M. 2016. Clinical characteristics and predictors of gangrene in patients with systemic sclerosis and digital ulcers in the Digital Ulcer Outcome Registry: a prospective, observational cohort, Annals of the Rheumatic Diseases, 75 (9): 1736–1740.

Arabacı, N., Karaytuğ, T., Demirbas, A., Ocsoy, I. and Katı, A. 2020. Nanomaterials for Enzyme Immobilization, Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications, Wiley, 1: 7.

Arkoun, M., Daigle, F., Heuzey, M. C. and Ajji, A. 2017. Mechanism of Action of Electrospun Chitosan-Based Nanofibers against Meat Spoilage and Pathogenic Bacteria, Molecules, 2: 24.

Bakhsheshi-Rad, H.R., Dayaghi, E., Ismail, A.F., Aziz, M., Akhavan-Farid, A. and Chen, X. 2019. Synthesis and in-vitro characterization of biodegradable porous magnesium-based scaffolds containing silver for bone tissue engineering, Transactions of the Nonferrous Metals Society of China, 29 (5): 984–996.

Bayrami, A., Alioghli, S., Rahim Pouran, S., Habibi-Yangjeh, A., Khataee, A. and Ramesh, S. 2019. A facile ultrasonic-aided biosynthesis of ZnO nanoparticles using Vaccinium arctostaphylos l. leaf extract and its antidiabetic, antibacterial, and oxidative activity evaluation, Ultrasonics Sonochemistry, 55: 57–66.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T. and Kiefer, F. 2014. SWISS-MODEl: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, Nucleic Acids Research, 42(1): 252–258.

Boulekbache-Makhlouf, l., Meudec, E., Mazauric, J.-P., Madani, K. and Cheynier, V. 2013. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolics in Eucalyptus globulus leaves by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry, Phytochemical Analysis: PCA, 24(2): 162–170.

Bowler, P. G. and Davies, B. J. 1999. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers, International Journal of Dermatology, 38(8): 573–578.

Bowler, P. G., Duerden, B. I. and Armstrong, D. G. 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management, Clinical Microbiology Reviews, 14(2): 244–269.

Bowler, P.G. 2002. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options, Annals of Medicine, 34(6): 419–427.

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M.F. and Fiévet, F. 2006. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium, Nano letters, 6(4): 866–870.

Brook, I. and Frazier, E.H. (1998). Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers, International Journal of Dermatology, 37(6): 426–428.

Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, l., Homøe, P. and Tvede, M. 2010. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 59(3): 324–336.

Burnham, J. P., Kirby, J. P. and Kollef, M. H. 2016. Diagnosis and management of skin and soft tissue infections in the intensive care unit: a review, Intensive Care Medicine, 42(12): 1899–1911.

Caló, E. and Khutoryanskiy, V. V. 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, European Polymer Journal, 65: 252–267.

Cardona, A. F. and Wilson, S. E. 2015. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment, Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 61(2): S69–S78.

Cassano, D., Mapanao, A.-K., Summa, M., Vlamidis, Y., Giannone, G., Santi, M. and Guzzolino, E. 2019. Biosafety and Biokinetics of Noble Metals: The Impact of Their Chemical Nature, ACS Applied Bio Materials, 2(10): 4464–4470.

Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V. and Singh, S. R. 2016. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review, International Journal of Molecular Sciences, 1: 7-12.

Chua, A. W. C., Khoo, Y. C., Tan, B. K., Tan, K. C., Foo, C. l. and Chong, S. J. 2016. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications, Burns & Trauma, 4: 3.

Clinical and laboratory Standards Institute, 2022. Web site. https://clsi.org. Date of access: 03.03.2022.

Davies, C.E., Hill, K.E., Wilson, M.J., Stephens, P., Hill, C.M., Harding, K.G. and Thomas, D.W. 2004. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers, Journal of Clinical Microbiology, 42 (8): 3549–3557.

Delgado-Valverde, M., Sojo-Dorado, J., Pascual, A. and Rodríguez-Baño, J. 2013. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae, Therapeutic Advances in Infectious Disease, 1(2): 49–69.

Dissemond, J. 2009. Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Diagnostic, clinical relevance and therapy, Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG, 7(6): 544–551.

Ekawati, E. R., Darmanto, W. and Wahyuningsih, S. P. A. 2020. Detection of Staphylococcus aureus in wound infection on the skin surface, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 3: 13-15.

Elbing, K. and Brent, R. 2002. Media preparation and bacteriological tools, Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel, 1: 1.

Eming, S.A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation, Science Translational Medicine, 6(25): 265sr6.

Fan, X. and Zheng, Y. 2020. Biosynthesis of eco-friendly and recyclable Pd/lDHs catalyst using the withered leaves extract for Suzuki coupling reaction, IET Nanobiotechnology / IET, 14(1): 59–65.

Giannousi, K., Menelaou, M., Arvanitidis, J., Angelakeris, M., Pantazaki, A. and Dendrinou-Samara, C. 2015. Hetero-nanocomposites of magnetic and antifungal nanoparticles as a platform for magnetomechanical stress induction in Saccharomyces cerevisiae, Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine, 3(26): 5341–5351.

Gosain, A. and DiPietro, l. A. 2004. Aging and wound healing, World Journal of Surgery, 28(3): 321–326.

Govindasamy, G. A., Mydin, R. B. S. M. N., Sreekantan, S. and Harun, N. H. 2021. Compositions and antimicrobial properties of binary ZnO-CuO nanocomposites encapsulated calcium and carbon from Calotropis gigantea targeted for skin pathogens, Scientific Reports, 11(1): 99.

Goy, R. C., Britto, D. and Assis, O. B. G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan, Polímeros, SciElO Brasil. Sciences, 2: 16-17.

Halbert, A. R., Stacey, M. C., Rohr, J. B. and Jopp-McKay, A. 1992. The effect of bacterial colonization on venous ulcer healing, The Australasian Journal of Dermatology, 33(2): 75–80.

Han, G. and Ceilley, R. 2017. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments, Advances in Therapy, 34(3): 599–610.

Hirashima, H., Komori, Y., Kohinata, Y., Komai, M. and Fukushima, K. 2019. In vitro investigation of antibacterial activity against fecal bacteria infecting wounds. Wound Medicine, 3: 25-27.

Islam, S., Bhuiyan, M. A. R. and Islam, M. N. 2017. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering, Journal of Polymers and the Environment, 25(3): 854–866.

Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R. and Car, J. 2016. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review, Systematic Reviews, 5(1): 152.

Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S. and Chen, X. 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, Journal of Advertising Research, 8(3): 217–233.

Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H. C. and Kahru, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO2 to yeast Saccharomyces cerevisiae, Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA, 23(6): 1116–1122.

Kavaz, D., Kirac, F., Kirac, M. and Vaseashta, A. 2017. low releasing mitomycin c molecule encapsulated with chitosan nanoparticles for intravesical installation,

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, Scientific Research Publishing, 8(4): 203–219.

Körber, A., Schmid, E. N., Buer, J., Klode, J., Schadendorf, D. and Dissemond, J. 2010. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV, 24(9): 1017–1025.

Kumar, S. S., Venkateswarlu, P., Rao, V. R. and Rao, G. N. 2013. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. International Nano Letters, 3(1): 1-6.

Li, D. and Wu, M. 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases, Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1): 291.

Li, M., Zhu, l. and lin, D. 2011. Toxicity of ZnO nanoparticles to Escherichia coli: mechanism and the influence of medium components, Environmental Science & Technology, 45(5): 1977–1983.

Lu, Z., Gao, J., He, Q., Wu, J., liang, D., Yang, H. and Chen, R. 2017. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing, Carbohydrate Polymers, 15(6): 460–469.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. and Harbarth, S. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18(3): 268–281.

Md Ishak, N. A. I., Kamarudin, S. K. and Timmiati, S. N. 2019. Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via plant extracts: an overview, Materials Research Express, IOP Publishing, 6(11): 112004.

Morgado, P. I., Aguiar-Ricardo, A. and Correia, I. J. 2015. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship, Journal of Membrane Science, 4(90): 139–151.

Moura, I. I. F., Dias, A. M. A., Carvalho, E. and de Sousa, H. C. 2013. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review, Acta Biomaterialia, 9(7): 7093–7114.

Paczosa, M. K. and Mecsas, J. 2016. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense, Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 80(3): 629–661.

Paine, T. D., Steinbauer, M. J. and lawson, S. A. 2011. Native and exotic pests of eucalyptus: a worldwide perspective, Annual Review of Entomology, 5(6): 181–201.

Pati, R., Mehta, R. K., Mohanty, S., Padhi, A., Sengupta, M., Vaseeharan, B. and Goswami, C. 2014. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 10(6): 1195–1208.

Patil, P. S., Fountas-Davis, N., Huang, H., Michelle Evancho-Chapman, M., Fulton, J. A., Shriver, L. P. and leipzig, N. D. 2016. Fluorinated methacrylamide chitosan hydrogels enhance collagen synthesis in wound healing through increased oxygen availability, Acta Biomaterialia, 36: 164–174.

Periayah, M. H., Halim, A. S. and Saad, A. Z. M. 2016. Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research, Pharmacognosy Reviews, 10(19): 39–42.

Razzaghi, M., Kasiri-Asgarani, M., Bakhsheshi-Rad, H. R. and Ghayour, H. 2019. In Vitro Degradation, Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Mg-3Zn-xAg Nanocomposites Synthesized by Mechanical Alloying for Implant Applications, Journal of Materials Engineering and Performance, 28(3): 1441–1455.

Razzaque, S., Hussain, S. Z., Hussain, I. and Tan, B. 2016. Design and Utility of Metal/Metal Oxide Nanoparticles Mediated by Thioether End-Functionalized Polymeric ligands, Polymers, 8: 4.

Said, M. M., Rehan, M., El-Sheikh, S. M., Zahran, M. K., Abdel-Aziz, M. S., Bechelany, M. and Barhoum, A. 2021. Multifunctional Hydroxyapatite/Silver Nanoparticles/Cotton Gauze for Antimicrobial and Biomedical Applications, Nanomaterials (Basel, Switzerland), 1: 12.

Saleem, S., Ahmed, B., Khan, M. S., Al-Shaeri, M. and Musarrat, J. 2017. Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO nanoparticles

synthesized from Eucalyptus globulus plants, Microbial Pathogenesis, 11(1): 375–387.

Salgado, P., Mártire, D. O. and Vidal, G. 2019. Eucalyptus extracts-mediated synthesis of metallic and metal oxide nanoparticles: current status and perspectives. Materials Research Express, 6(8): 082006.

Sarheed, O., Ahmed, A., Shouqair, D. and Boateng, J. 2016. Antimicrobial dressings for improving wound healing. Wound Healing-New Insights into Ancient Challenges. InTech, 4(12): 373-398.

Savitskaya, I. S., Shokatayeva, D. H., Kistaubayeva, A. S., Ignatova, l. V. and Digel, I. E. 2019. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing B. subtilis cells, Heliyon, 5(10): e02592.

Sawalha, H., Abiri, R., Sanusi, R., Shaharuddin, N.A., Noor, A.A.M., Ab Shukor, N.A., Abdul-Hamid, H., *et al.* 2021. Toward a Better Understanding of Metal Nanoparticles, a Novel Strategy from Eucalyptus Plants, Plants, 1: 5.

Schmidtchen, A., Holst, E., Tapper, H. and Björck, l. 2003. Elastase-producing Pseudomonas aeruginosa degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth, Microbial Pathogenesis, 34(1): 47–55.

Selvaraj, D., Viswanadha, V. P. and Elango, S. 2015. Wound dressings-a review. BioMedicine, 5: 22.

Shabunin, A. S., Yudin, V. E., Dobrovolskaya, I. P., Zinovyev, E. V., Zubov, V., Ivan'kova, E. M. and Morganti, P. 2019. Composite wound dressing based on chitin/chitosan nanofibers: processing and biomedical applications. Cosmetics, 6(1): 16.

Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S.K. and Poinern, G. E. J. 2015. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities, Materials, 8 (11): 7278–7308.

Shah, S. R., Kasper, F. K. and Mikos, A. G. 2013. Perspectives on the prevention and treatment of infection for orthopedic tissue engineering applications, Chinese Science Bulletin = Kexue Tongbao, 58(35): 4342–4348.

Shannon, E. and Abu-Ghannam, N. 2016. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications, Marine Drugs, 1: 4.

Siedenbiedel, F. and Tiller, J. C. 2012. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles, Polymers, Molecular Diversity Preservation International, 4(1): 46–71.

Sila, J. M., Michira, I. N., Abongo, D., Kamau, G. N., Mwaura, F. B., Kiio, I. K. and Iwouha, E. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus corymbia leaf extract and its antimicrobial application. Journal Biochemiphysics, 21: 30.

Sila, M. J., Nyambura, M. I., Abong'o, D. A., Mwaura, F. B. and Iwuoha, E. 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles from Eucalyptus corymbia leaf extract at optimized conditions. In Nano Hybrids and Composites, 25: 32-45.

Simões, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonça, A. G. and Correia, I. J. 2018. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik, 12(7): 130–141.

Singh, M., Sinha, I., & Mandal, R. K. 2009. Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. Materials Letters, 63(3-4): 425-427.

Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, l.C., Bakhori, S.K.M., Hasan, H., *et al.* 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism, Nano-Micro letters, 7(3): 219–242.

Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L. and Zecconi, A. 2021. Extraintestinal pathogenic escherichia coli: virulence factors and antibiotic resistance. Pathogens, 10(11): 1355.

Thiruvoth, F.M., Mohapatra, D.P., Kumar, D., Chittoria, S.R.K. and Nandhagopal, V. 2015. Current concepts in the physiology of adult wound healing, Plastic and Aesthetic Research, OAE Publishing Inc, 2: 250–256.

Velnar, T., Bailey, T. and Smrkolj, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms, The Journal of International Medical Research, 37(5): 1528–1542.

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R. and Nesse, L. L. 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease, Antibiotics (Basel, Switzerland), 9: 2.

Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S. and Dennis, V. A. 2017. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering, International Journal of Molecular Sciences, 1: 4-8.

Woodford, N. and livermore, D. M. 2009. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge, The Journal of Infection, 59(1): S4–S16.

Xie, W., Xu, P., Wang, W. and liu, Q. 2002. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative, Carbohydrate Polymers, 50(1): 35–40.

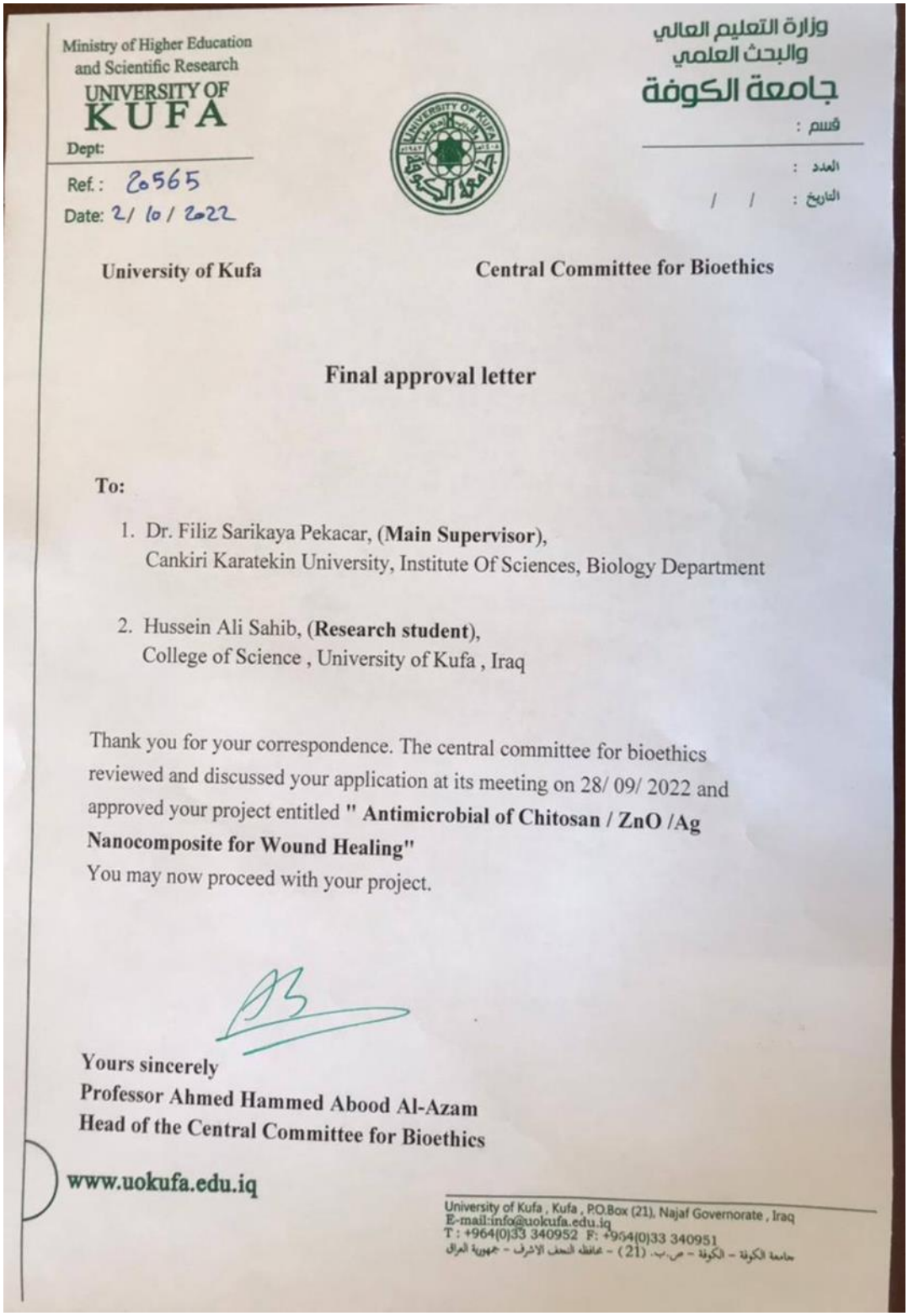
Xu, Q., Xie, l., Diao, H., li, F., Zhang, Y., Fu, F. and liu, X. 2017. Antibacterial cotton fabric with enhanced durability prepared using silver nanoparticles and carboxymethyl chitosan, Carbohydrate Polymers, 17(7): 187–193.

Yokota, M., Häffner, N., Kassier, M., Brunner, M., Shambat, S.M., Brennecke, F. and Schniering, J. 2021. Staphylococcus aureus impairs dermal fibroblast functions with deleterious effects on wound healing, FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 35(7): e21695.

EKLER

EK 1. Final approval letter

EK 1. Final approval letter



Ministry of Higher Education and Scientific Research
UNIVERSITY OF KUFA
Dept:
Ref.: 20565
Date: 2/ 10 / 2022

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الكوفة
قسم :
العدد :
التاريخ : / /

University of Kufa — Central Committee for Bioethics

Final approval letter

To:

1. Dr. Filiz Sarikaya Pekacar, (**Main Supervisor**),
   Cankiri Karatekin University, Institute Of Sciences, Biology Department

2. Hussein Ali Sahib, (**Research student**),
   College of Science , University of Kufa , Iraq

Thank you for your correspondence. The central committee for bioethics reviewed and discussed your application at its meeting on 28/ 09/ 2022 and approved your project entitled **" Antimicrobial of Chitosan / ZnO /Ag Nanocomposite for Wound Healing"**
You may now proceed with your project.

Yours sincerely
Professor Ahmed Hammed Abood Al-Azam
Head of the Central Committee for Bioethics

www.uokufa.edu.iq

University of Kufa , Kufa , P.O.Box (21), Najaf Governorate , Iraq
E-mail:info@uokufa.edu.iq
T : +964(0)33 340952 F: +964(0)33 340951
جامعة الكوفة - الكوفة - ص.ب. (21) - محافظة النجف الاشرف - جمهورية العراق

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hussein Ali Sahib AL-MUSAWI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Kufa Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012-2016