

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FOTODİNAMİK TEDAVİ İMKÂNI SUNAN
AKTİF YARA ÖRTÜLERİ**

Gül Merve GENÇER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FOTODİNAMİK TEDAVİ İMKÂNI SUNAN
AKTİF YARA ÖRTÜLERİ**

Gül Merve GENÇER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FOTODİNAMİK TEDAVİ İMKÂNI SUNAN
AKTİF YARA ÖRTÜLERİ

Gül Merve GENÇER

KİMYA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 4087 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FOTODİNAMİK TEDAVİ İMKÂNI SUNAN
AKTİF YARA ÖRTÜLERİ

Gül Merve GENÇER

KİMYA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 17/06/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat AKARSU (Danışman)

Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ

Prof. Dr. Erdem ÇAMURLU

Dr. Öğr. Üyesi Seda DEMİREL TOPEL

Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU

ÖZET

FOTODİNAMİK TEDAVİ İMKÂNI SUNAN AKTİF YARA ÖRTÜLERİ

Gül Merve GENÇER

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat AKARSU

Haziran 2020; 106 sayfa

Tez çalışması ile fotosensitizör madde (FS) barındıran hidrojel yapıdaki aktif yara örtüsü elde edilmiştir. Işıkla aktive olan fotodinamik tedavi (FDT), uzun zamandan beri dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji vb. Çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir tedavi türüdür. FDT'de kullanılan FS, uygun dalga boyunda ışığı absorblayarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilen bir maddedir. ROS, hedef hücrelerde mutajenik veya genotoksik etki olmadan sitotoksik etkiler üreterek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ek olarak, bu süreçte mikroorganizmalar da direnç geliştiremezler. Fotosensitizör maddede bulunan kromofor gruplar spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kalmasıyla hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot (RNS) gibi zararlı radikallerin üretimi; ışığın dalga boyuna, şiddetine, kullanılan PS'ün miktarına ve çeşidine bağlıdır. Tez çalışmasında oluşan bu reaktif türlerin konsantrasyonu çeşitli faktörler ile ayarlanarak vücut dokularına zarar vermeden hasarlı dokuda enfeksiyona neden olabilecek iç ve dış kaynaklı mikroorganizmalardan arındırması öngörülmektedir. Ayrıca fotosensitizör boyar maddenin içerisine sabitlendiği hidrojel yara örtüsünün; yaranın nem dengesini koruması, doku oluşumunu artırıcı etki göstermesi, yarayı soğutarak acıyı azaltması, gaz geçişini optimum düzeyde tutarak ortam kaynaklı kontaminasyonu engellemesi, matriks sisteminin emici özelliği sayesinde hasarlı doku üzerindeki fazla sıvıyı emerek yaranın daha çabuk iyileşmesine katkı sağlaması gibi fiziksel özelliklere sahip olması hedeflenmiştir.

Tez çalışmasında; doğal, hibrit ve sentetik polimerlerden elde edilen tüm sistemler için çekme-kopma testleri, jelleşme, çözünme yüzdeleri ve farklı pH değerlerinde, sıcaklıklarda şişme davranışları gibi birçok parametre incelenmiştir. Seriler arasında farklı PS ajanları yüklenmiş sistemlere modifiye edilmiş JIS Z 2801 standardı kullanılarak *E. coli* (ATCC 11775) ve *S. aureus*'a (ATCC 25923) karşı antibakteriyel analiz testleri yapılmıştır. Hücre migrasyon ve MTT testleri ise L929 fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen çoğunlukla sentetik polimerlerden oluşan hidrojel yara örtüsünün log2 - log3 değerleri arasında antibakteriyel etki gösterdiği, kullanılan fotosensitizör maddenin toksik etki göstermeden hücre migrasyonunu desteklediği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Antimikrobiyal, Fotodinamik Terapi, Fotodinamik Tedavi, Fotosensitizör, Hidrojel, Yara örtüsü, Yara tedavisi

JÜRİ: Doç. Dr. Murat AKARSU

Prof. Dr. Ertuğrul ERPAÇ

Prof. Dr. Erdem ÇAMURLU

Dr. Öğr. Üyesi Seda DEMİREL TOPEL

Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU



ABSTRACT

ACTIVE WOUND DRESSINGS PROVIDING PHOTODYNAMIC TREATMENT

Gül Merve GENÇER

PhD Thesis Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat AKARSU

June 2020; 106 pages

Active hydrogel dressing containing photosensitizing agent (PS) was obtained with this thesis study. Light-activated photodynamic therapy (PDT) has long been used in dermatology, carcinology, otolaryngology, gynecology, gastroenterology, urology, etc. and it's a type of treatment that approved for various diseases. PS used in PDT is a substance that can absorb light with the suitable wavelength and form reactive oxygen species (ROS). ROS shows antimicrobial activity by producing cytotoxic effects in target cells without mutagenic or genotoxic effects. In addition, microorganisms cannot develop resistance in this process. The light-induced formation of the harmful radicals such as reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen (RNS) species that are capable of killing cells depends on the intensity and the wavelength of the light and the type and amount of the PS used. It is envisaged that the concentration of these reactive species studied in the thesis study will be adjusted by various factors so as to eliminate the internal and external microorganisms that can cause infection in the damaged tissue without causing harm to healthy tissues. Furthermore, the hydrogel dressings containing a fixed photosensitizer dye in the matrix are synthesized so as to protect the moisture balance on the wound area, to promote tissue formation, to reduce pain by cooling the wound area, to prevent the contamination of the wound while being permeable to gases and to contribute to the healing of the wound by absorbing excess liquid formed by the damaged tissue.

In the thesis study, many parameters such as tensile-rupture, gelling, dissolution percentage and swelling behavior at different pH and temperature were examined for all systems obtained from natural, hybrid and synthetic polymers. Antibacterial analysis of the systems loaded with different PS agents was conducted against *E. coli* (ATCC 11775) and *S. aureus* (ATCC 25923) by using a modified version of JIS Z 2801 standard. Cell migration and MTT tests were performed using L929 fibroblast cells. As a result of the studies, it was determined that the hydrogel dressing that consists of synthetic polymers shows an antibacterial effect between the values of log2 - log3 and the photosensitizer substance used supports cell migration without toxic effects.

KEYWORDS: Antimicrobial, Hydrogel, Photodynamic Therapy, Photodynamic Therapy, Photosensitizer, Wound dressing, Wound treatment

COMMITTEE: Assoc. Prof. Murat AKARSU

Prof. Dr. Ertuğrul ERPAÇ

Prof. Dr. Erdem ÇAMURLU

Asts. Prof. Dr. Seda DEMİREL TOPEL

Asts. Prof. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU



ÖNSÖZ

Bilim bilgi kütlesinden daha fazlası; bir düşünme tarzıdır. Evrenin kuşkuyla sorgulanma tarzıdır. Eğer şüpheli yaklaşmamak için otoriteye kuşkucu sorular soramıyorsak o zaman tam bir kaos içindeyiz.

Carl Sagan

Doktora eğitimime başlamam için bir fırsat veren, teorik ve deneysel konularda engin bilgisi ve tecrübesiyle destegini esirgemeyen değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ'a,

Doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım sırasında her zaman bana karşı gösterdiği güven, destek ve yol göstericilik için danışman hocam Doç. Dr. Murat AKARSU'ya,

Tez çalışmamın fikir açısından çıkış noktası; TÜBİTAK 1512 Teknogirişim Sermaye Destek Programına başvurduğum ve desteklenmeye hak kazanan “Yanık yaralarında kullanılmak üzere antimikrobiyal fotodinamik tedavi sunan hidrojel yara örtüleri ve kremlerin üretilmesi” başlıklı projedir. Bu sebeple tez çalışmamın öncül adımlarını oluşturan ilgili projede bana destek verdiği için TÜBİTAK kurumuna,

Tez çalışmamı destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine,

Doktora öğrenimim süresince her türlü sorumuza cevap veren, yoğunluk sebebiyle kaçırdığımız noktaları hatırlatarak desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Akdeniz Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan Erdem ÇAMURLU'ya, Antalya Bilim Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Seda DEMİREL TOPEL'e, Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU'na, Akdeniz Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Bugünlere gelebilmemde sarf ettikleri destek ve duydukları güven için; halam Gülhan KURTBELN ve aynı ekipte doktora eğitimimizi sürdürdüğümüz yol arkadaşım Ahmet GENÇER başta olmak üzere sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Derinin Yapısı ve Yaralı Dokunun Morfolojisi	4
2.1.1. Yara çeşitleri	4
2.1.1.1. Yara etiyolojisi	7
2.1.1.2. Yaranın süresi.....	7
2.1.1.3. Yaranın derinliği	8
2.1.2. Yara dokusunun iyileşme evreleri.....	9
2.1.3. Yara iyileşmesinde önemli faktörler	13
2.1.4. Yara Tedavisinde Kullanılan Malzemeler	17
2.2. Hidrojeller	21
2.2.1. Hidrojellerin sınıflandırılması.....	21
2.3. Fotodinamik Tedavi	27
2.3.1. Fotosensitizör maddeler	29
2.3.1.1. Birinci nesil fotosensitizörler	29
2.3.1.2. İkinci nesil fotosensitizörler	30
2.3.1.3. Üçüncü nesil fotosensitizörler	37
3. MATERYAL VE METOD	38
3.1. Materyal	38
3.2. Metod	41
3.2.1. Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdelerinin incelenmesi	45
3.2.2. Hidrojellerin su tutma kapasitelerinin incelenmesi	45
3.2.3. Hidrojellerinin şişme davranışlarının incelenmesi.....	46
3.2.3.1. Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi	46
3.2.3.2. Hidrojellerin farklı sıcaklıktaki şişme değerlerinin incelenmesi	46
3.2.3.3. Farklı pH değerlerinde hidrojellerin şişme değerlerinin incelenmesi	46
3.2.3.4. Hibrit sistem denemeleri	47
3.2.3.5. Çekme-kopma testleri	49
3.2.4. Fotosensitizör Ajanların Matriks Sisteme Yüklenmesi.....	49
3.2.5. Antibakteriyel aktivite testleri.....	50
3.2.5.1. Fotosensitizör yüklenmiş hidrojellerin antimikrobiyal analizleri.....	52
3.2.6. Hücre kültürü testleri.....	53
3.2.7. Ortam Kaynaklı Mikrobiyal Gelişim	57
3.2.8. Hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki salınım miktarlarının tespiti.....	57
3.2.9. FTIR spektroskopisi ile yapı analizleri	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. Sentetik Hidrojellerin Hazırlamasında Farklı Oranlarda ve Molekül Ağırlıklarına Sahip PEG-PVA Yapılarının İncelenmesi	59

4.2. Sentetik Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdelerinin incelenmesi.....	60
4.3. Sentetik hidrojellerin su tutma kapasitelerinin incelenmesi.....	60
4.4. Sentetik hidrojellerinin Şişme Davranışlarının İncelenmesi.....	61
4.4.1. Sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi	61
4.4.2. Sentetik hidrojellerin farklı sıcaklıktaki şişme değerlerinin incelenmesi	62
4.4.3. Farklı pH değerlerinde sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin incelenmesi.....	64
4.5. Hibrit Sistem Denemeleri.....	66
4.5.1. Hibrit hidrojellerin su tutma kapasiteleri	67
4.6. Çekme-Kopma Testleri	68
4.7. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları	69
4.8. Hücre Kültürü Testleri	70
4.8.1. Endotel hücre kültürü testleri	70
4.8.2. Fibroblast hücre kültürü testleri	72
4.9. Ortam Kaynaklı Mikrobiyal Gelişim	79
4.10. Hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki salınım miktarları	80
4.11. FTIR spektroskopisi ile yapı analizleri	84
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇLAR	95
7. KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Fotodinamik Terapi İmkânı Sunan Aktif Yara Örtüleri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17 / 06 / 2020

Gül Merve GENÇER



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

M	: Molar
nm	: Nanometre
γ	: Gama
ϵ_{maks}	: maksimum molar absorptivite
λ_{maks}	: Maksimum dalga boyu
$\Phi\Delta$	: Kuantum verimi

Kısaltmalar

ALA	: 5-aminolevulinik asit
AlPcS ₄	: alüminyum ftalosiyanın tetrasülfonat
APS	: Amonyum Persülfat
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BPD-MA	: Benzoporfirin türevi monoasit halka A
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CFU	: Koloni oluşturan birimi
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
DMEM	: Dulbecco Modified Eagle's Medium
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: Epitelial Mezenkimal Transition
FA	: Formaldehit
FBS	: fetal sıgır serumu
FDT	: Fotodinamik Tedavi

FS	: Fotosensetizör
GA	: Gluteraltehit
GAG	: Glikozaminoglikan
HCl	: Hidroklorik Asit
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
Hp	: Hemaporfirin
HpD	: Hemoporfirin Türevi
HPPH	: 2-(1-heksiloksietil)-2-devinil pirofeoforbit
HUVEC	: İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri
IPN	: İç içe geçen Polimer Ağı
KCl	: Potasyum klorür
KPS	: Potasyum Persülfat
LB	: Laktoz Broth
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LED	: Işık yayan diyot
MB	: Metilen Mavisi
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MMP	: Matris Metaloproteinaz
<i>m</i> -THPC	: 5,10,15,20-Tetrakis(<i>m</i> -hidroksifenil)klorin
<i>m</i> -THPP	: meta-tetra (hidroksifenil) porfirin
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid
NaAlg	: Sodyum Aljinat
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
NPe6	: N-aspartil klorin e6
PBS	: Fosfat tamponlu tuzlu su

Pc4	: ftalosiyanin 4
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEG	: Polietilen Glikol
PEGMA	: Polietilen Glikol Metakrilat
PLA	: Polilaktik Asit
PPIX	: Protoporfirin IX
PVA	: Polivinil Alkol
PVP	: Polivinil prolidon
RB	: Rose Bengal
RNS	: Reaktif Azot Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SBF	: Simüle vücut sıvısı
SnET ₂	: kalay etil etiopurpurin
TBO	: Toluidin Mavisi
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
TPPS ₄	: 5,10,15,20-tetrakis(4-sülfanatofenil'in meta izomeri)-21H,23H-porfirin
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Derideki farklı katmanların gösterimi	4
Şekil 2.2. Saç folikülü içeren ve içermeyen deri katmanlarının ayrıntılı gösterimi	5
Şekil 2.3. Yaranın sınıflandırılması	6
Şekil 2.4. Akut (A) ve kronik yaralar (B) arasındaki fark	8
Şekil 2.5. Yara derinliğinin sınıflandırılması.....	9
Şekil 2.6. Yara dokusunun iyileşme evreleri	9
Şekil 2.7. Yara iyileşme evrelerinde görev alan faktörler ve ECM ve dokunun yapısı .	11
Şekil 2.8. Yara örtüsünün materyaline göre sınıflandırılması a) Gazlı bezler; b) Filmler; c) Köpükler; d) Hidrokolloidler; e) Aljinatlar ve Hidrofiberler; f) Biyolojik yara örtüleri; g) Hidrojel yapılar; h) Kompozit Yara Örtüleri ve Yardımcı Maddeler	18
Şekil 2.9. Su moleküllerinin hidrojel yapı içerisinde hapsedilmesi	21
Şekil 2.10. Hidrojellerin genel sınıflandırılması.....	22
Şekil 2.11. a) amorf hidrojel; b) yarı-kristal hidrojel	26
Şekil 2.12. Fotosensitizör boyar maddenin (FS) ışık ile uyarılması (FS* = uyarılmış hal)	27
Şekil 2.13. Belirli dalga boyunda ışık ile uyarılan FS'nin mekanizması (Maisch 2007)	27
Şekil 2.14. Temel haldeki oksijenin uyarılması sonucu oluşan yapılar	28
Şekil 2.15. 1. ve 2. nesil fotosensitizörler yapılarına örnekler.....	30
Şekil 2.16. Porfin türevi olan ikinci nesil <i>m</i> -THPP ve TPPS ₄ yapısı	31
Şekil 2.17. a) Benzoporfirin türevi monoasit halka A (BPD-MA, Verteporfin, Visudyne®); b) 5,10,15,20-Tetrakis(<i>m</i> -hidroksifenil)klorin (<i>m</i> -THPC, Temoporfin); c) kalay etil etiopurpurin (SnET ₂ , Rostaporfin, Purlytin™); d) N-aspartil klorin e6 (NPe6, Talaporfin, Ls11); e) klorofil a	32
Şekil 2.18. 2-(1-heksiloksietil)-2-devinil pirofeoforbit (HPPH) yapısı	32
Şekil 2.19. Bakteriyofeoforbit grubuna ait fotosensetizörlerden bazıları	33
Şekil 2.20. Ftalosiyanın grubundaki fotosensetizörlere örnek	34

Şekil 2.21. Antrakinon ve bir antrakinon türevi olan hiperisin yapısı	35
Şekil 2.22. Fenotiyazin grubunda yer alan metilen mavisinin (MB) ve toluidin mavisinin (TBO) yapısı	35
Şekil 2.23. Siyanin grubunda yer alan merosiyanin yapısı	36
Şekil 2.24. Kurkumin yapısı	36
Şekil 2.25. Rose bengal ve dibromo metil ester (TH9402) yapısı	37
Şekil 3.1. PVA ile GA arasındaki tepkime mekanizması, a) optimum oranda aldehit kullanımı sonucu oluşan yapı; b) aldehitin fazla miktarda kullanılması sonucu oluşan dallanma	41
Şekil 3.2. PVA ile FA arasındaki tepkime	42
Şekil 3.3. PVA-NaAlg yapısı	43
Şekil 3.4. PEG-PVA Yapısı	43
Şekil 3.5. Farklı PVA:B:PEG oranlarına sahip hidrojel sistemlerin görünümü	44
Şekil 3.6. Hidrojellerin etüvde kurutulması	45
Şekil 3.7. Bakteriyel kültür ortamının hazırlanışı	51
Şekil 3.8. <i>E. Coli</i> bakteriyel popülasyon artışı eğrisi	51
Şekil 3.9. <i>S. aureus</i> bakteriyel popülasyon artışı eğrisi	52
Şekil 3.10. Bakteri analizinde kullanılan LED cihazı	53
Şekil 3.11. MTT Protokolü	54
Şekil 3.12. Jellerin Hücrelere uygulanması	55
Şekil 3.13. Örneklerin bulunduğu ve hücre ekimi yapılan 6 kuyucuklu plakaların 24 saat sonraki görünümü	55
Şekil 3.14. Örneklere fotodinamik terapi uygulanması	56
Şekil 4.1. HUVEC hücrelerinin kontrol grubunun sadece jel olan ve fotosensitif madde içeren jeller ile inkübasyon sonucundaki morfolojisi	71
Şekil 4.2. MB ve HUVEC ile MTT sonuçları	72
Şekil 4.3. TB ve HUVEC ile MTT sonuçları	72
Şekil 4.4. RB ve HUVEC ile MTT sonuçları	72

Şekil 4.5. RB içeren örneğin için MTT test sonucu	73
Şekil 4.6. MB içeren örneğin için MTT test sonucu	74
Şekil 4.7. TBO içeren örneğin için MTT test sonucu	75
Şekil 4.8. Hücre migrasyon deney sonucu	79
Şekil 4.9. İçerisinde TBO fotosensetizörü bulunan hidrojin salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri	80
Şekil 4.10. İçerisinde MB fotosensetizörü bulunan hidrojin salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri	81
Şekil 4.11. İçerisinde RB fotosensetizörü bulunan salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri	81
Şekil 4.12. TBO içeren hidrojin SBF içerisindeki salınım grafiği	82
Şekil 4.13. MB içeren hidrojin SBF içerisindeki salınım grafiği	83
Şekil 4.14. RB içeren hidrojin SBF içerisindeki salınım grafiği	83
Şekil 4.15. S-5 sisteminin FTIR spektrumu.....	84
Şekil 4.16. S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....	86
Şekil 5.1. PEG miktarının jelleşme yüzdesine etkisi	87
Şekil 5.2. Sentetik hidrojellerin su tutma kapasiteleri (PVA:B:PEG = 10:05:X).....	87
Şekil 5.3. Sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi.....	88
Şekil 5.4. Sentetik hidrojellerin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları	87
Şekil 5.5. Sentetik hidrojellerin çekme-kopma test sonuçları (PVA:B:PEG = 10:05:X).....	90
Şekil 5.6. S-5 sisteminin FTIR ile yapı karakterizasyonu	92
Şekil 5.7. S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FTIR sonuçlarının karşılaştırılması	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli kimyasal ve fiziksel çapraz bağlı yapıda olan hidrojellere ve uygulandığı yerlere örnekler	23
Çizelge 3.1. SBF (simüle vücut sıvısı) içeriği	47
Çizelge 3.2. Hibrit sistemlerde kullanılan maddelerin oranları ve örneklerin görünümleri.....	48
Çizelge 3.3. Bakteri testi için hazırlanan sentetik sistemlerin formülasyonlar.....	49
Çizelge 3.4. Bakteri testi için hazırlanan hibrit sistemlerin formülasyonları	50
Çizelge 4.1. Farklı Molekül Ağırlıklarına sahip PVA-PEG kombinasyonlarının görsel yorumlanması.....	59
Çizelge 4.2. Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri.....	60
Çizelge 4.3. Sentetik hidrojellerin su tutma kapasiteleri	61
Çizelge 4.4. Sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi.....	62
Çizelge 4.5. Sentetik hidrojellerin 4°C sıcaklıktaki şişme değerleri	63
Çizelge 4.6. Sentetik hidrojellerin 25°C sıcaklıktaki şişme değerleri	63
Çizelge 4.7. Sentetik hidrojellerin 37°C sıcaklıktaki şişme değerleri	64
Çizelge 4.8. Sentetik hidrojellerin pH=1 olan simüle gastrik sıvısı içindeki şişme değerleri.....	65
Çizelge 4.9. Sentetik hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değerleri.....	65
Çizelge 4.10. Sentetik hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değerleri.....	66
Çizelge 4.11. Hibrit sistemlerde kullanılan maddelerin oranları ve örneklerin görünümleri	67
Çizelge 4.12. Hibrit hidrojellerin su tutma kapasiteleri	67
Çizelge 4.13. Hibrit hidrojellerin pH=1 olan simüle gastrik sıvısı içindeki şişme değerleri	68
Çizelge 4.14. Hibrit hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değeri. 68	
Çizelge 4.15. Hibrit hidrojellerin pH=7.4 olan simüle vücut sıvısı içindeki şişme değerleri	68

Çizelge 4.16. Hidrojellerin çekme-kopma test sonuçları.....	69
Çizelge 4.17. Antimikrobiyal analiz sonuçları	70
Çizelge 4.18. HUVEC ile MTT denemelerinin standart sapmaları	72
Çizelge 4.19. RB içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları	76
Çizelge 4.20. MB içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları	77
Çizelge 4.21. TBO içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları ..	78
Çizelge 4.22. Ortam analizi	79
Çizelge 4.23. Fotosensetizör içeren hidrojellerin SBF çözeltisi içerisindeki salınım miktarı	82

1. GİRİŞ

Deri patojenlere karşı ilk savunma hattıdır ve mikrobiyal istilaya karşı fiziksel bir engel görevi görür. Yara iyileşmesinin çeşitli aşamaları yıllar içinde geniş çapta çalışılmış ve normal iyileşmeyle ilişkili meydana gelen olaylar sınıflandırılmıştır (Braiman 2007; Shaw 2002). Yara iyileşmesinin ilk aşamaları, bir koagülasyon oluşumunu ve iltihabını içermektedir. Bu aşamada inflamatuvar cevabı, dermal ve epidermal hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve ardından yara boşluğunu doldurmak ve cilt bariyerini yeniden kurmak için matris sentezi ile devam etmektedir (Hackam 2002, Harding 2005). Son olarak, doku onarımı ve farklılaşma süreci ile cilt dokusunun tam olarak iyileşmesi ve cilt estetiğinin restorasyonu sağlanır (Hackam 2002, Diegelmann 2004). Literatürdeki fikir birliği, yara iyileşme sürecinde aşamalı olarak, önce boşluğun derhal doldurulmasına, ardından epitelizasyon ve cilt bariyeri fonksiyonunun yeniden kurulmasına yöneliktir (Yamaguchi 2001). Bu nedenle yaranın iyileşmesi için meydana gelen aşamalar, cilt fonksiyonunun restorasyonuna yol açan doku dengesinin oluşması adına önemli bir fizyolojik süreçtir. Yaranın yeri, etiyolojisi, büyüklüğü ve eşlik eden hastalıkların varlığı gibi birçok faktör iyileşme aşamasında önemlidir. Örneğin yara bölgesinde bakterilerin varlığı, çeşidi ve yoğunluğu hasta için oldukça hayati önem taşımaktadır. Yaralanmamış bir ciltte, patojenik organizmaların kolonizasyonu ve büyümesi, düşük yüzey pH, sebum ve yağ asitleri tarafından inhibe edilmektedir (Landis 2008). Fakat bakteriler hayatta kalmak için kendilerini açık yaralar gibi ekolojik olarak uygun oyuklara (nişlere) sabitlemeye çalışırlar. Bu nedenle enfeksiyon kutanöz yaralarda sık görülen bir problemdir ve yara iyileşmesinin durmasına bile neden olur. Bu durum hastada morbidite ve hatta mortalite riskinin artmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin keşfi, enfeksiyonların tedavisinde devrim yaratmaktadır. Fakat patojenik bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği dirençteki artış, lokalize enfeksiyonlar için alternatif tedavilerin araştırılmasına olan ilginin artmasına neden olmuştur (Vecchio 2013). Yara iyileşme sürecinin hızını ve kalitesini yönetmede tüm bu faktörler göz önüne alınarak tedavi yöntemleri önerilmekte ve çeşitli malzemeler üretilmektedir. Bu amaçla yara tedavisinde yaygın olarak yara sargı malzemeleri kullanılmaktadır.

Yara sargısı malzemeleri, nem ve oksijeni geçiren, mikroorganizmaların geçişini engelleyerek onlara karşı koruyucu bariyer oluşturan materyallerdir (Adamian 2004). Pasif sargılar olarak bilinen türleri; gazlı bezler, hidrojeller, köpükler, hidrokolloidler (karboksimetil-selüloz), alginat, kollajen, selüloz, pamuk / rayon, şeffaf filmler (poliüretan), sargılar vb. yaralarda lokal hücresel yanıt üzerinde etkileri nedeniyle pasif olarak sınıflandırılmıştır (Livshits 1988; Cornelius 2006). Bu yara örtüleri; yaralı cildi korumak, yara yüzeyinde uygun nemi sağlamak, mikrobiyal biyofilmleri önlemek veya kontrol altına almak, yaralanmış dokuları temizlemek, ağrıyı ortadan kaldırmak veya en aza indirmek, ölü alanları ve yaşayamayan dokuları kaldırmak, yara kaynaklı kokuları kontrol etmek gibi amaçlar için kullanılır. Aktif sargılar ise, yara örtülerine antimikrobiyaller (topikal antibiyotik ve antifungal ürünler), kollajen veya enzimatik debridman ajanları emdirilerek elde edilir. Özellikle kronik yaralarda lokal enfeksiyonun önlenmesi için gümüş sülfadiazin, metilen mavisi, kristal viyole, bal, polihegzametilen biguanid (PHMB) ve kadeksomer iyodin antimikrobiyaller olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Sawant 2012; Zilberman 2008; Moura 2013). Bu ürünler yara örtüleri dışında, macun, krem, toz formülasyonda da hazırlanmaktadır. Aktif sargılar sınıfında moleküler emici filtreler veya tuzaklar gibi davranan koku kontrollü pansumanlar da

mevcuttur. Koku kontrollü pansumanlar yapılarında aktif kömür vb. malzemeleri barındırırlar ve yaraların ve yanık kokularının tedavisinde önerilmektedir. Aktif yara örtülerinin nem ve kollajen ağın tutunmasını arttırması, mikrobiyal biyofilm tabakasının oluşumunu önlemesi, eksüdatları (atıkları) azaltması ve epitelizasyon süresinin (hücre oluşum süresi) kısılmasını sağlaması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Singh 2013). Bu örtülerinin üretilmesinde doğal, sentetik veya hibrit polimer yapıları tercih edilebilir. Sentetik polimerler kullanılarak yara üzerine suni dermal bir tabaka örtüsü elde etmeyi amaçlayan sistemler olduğu gibi, doğal-biyouyumlu polimer yapıları ağırlıklı olarak kollajen ve tohumlanmış hücrelerden veya kollajen ve kondroitin sülfattan yapılan sistemler de mevcuttur (Bala 2005). Ek olarak, dokuların tamamen yenilenebilmesi için seçilen doğal veya sentetik polimerik malzemelerin, biyouyumlu bir ekstrasellüler matriks (ECM) yapısı sağlaması gerekmektedir. Doğal polimerik malzemelere kolajen, fibrinojen, elastin, sentetik polimerik malzemelere ise poliglikatik asit, polilaktik asit, polidioksanon, poli-ε-kaprolakton, polivinilpirolidon, polivinil alkol, polietilen glikol örnek olarak verilebilir. Doğal makromoleküller sentetik polimerlere kıyasla nispeten düşük bir mekanik mukavemet göstermektedir (Zahedi 2010). Bu sebeplerden dolayı tez çalışmasında, fiziksel dayanımı yüksek, şişme davranışları iyi olan en uygun matriks sisteminin eldesi için çeşitli sentetik ve doğal polimer kombinasyonları çalışılmıştır.

Yara tedavisi amacıyla üretilmiş olan ve yaranın evresi, derinliği, salgı miktarı, bakteriyel kontaminasyonu gibi yaranın bazı fizyolojik özelliklerine bağlı olarak kullanılabilecek yara örtüleri piyasada uzun zamandır satılmaktadır. Bu ürünlerin amacı var olan enfeksiyonu gidermekten çok enfeksiyon oluşum riskini azaltmak ve yaranın iyileşme sürecini nispeten hızlandırmaktır. Bu yara örtülerine enfeksiyonu gidermek için yukarıda bahsedildiği gibi çeşitli antibiyotiklerin veya gümüş gibi inorganik yapıların emdirildiği sistemler yaygındır. Fakat tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerinde selektif toksisite göstermesi ve mikroorganizmalarda bulunan hedef spontan kolaylıkla mutasyonlar ile değişerek dirençli hale gelebilmesi, bu yara örtülerinin etkinliklerini sınırlamaktadır. Farklı bir şekilde içerisinde gümüş gibi inorganik maddeleri barındıran sistemler ise yüksek antimikrobiyal aktivite göstermelerine ve mikroorganizmaların mutasyon geçirerek dirençli hale gelmelerine fırsat vermeden etki edebilmelerine karşın yara dokusunun kendisine de tahribat verebilmektedir. Bu gibi sorunlardan dolayı hasarlı dokunun tedavisi için ekstrasellüler matriksi destekleyebilecek ve lokalize enfeksiyonlar için kullanılabilecek alternatif tedavilerin bulunması amacıyla literatür taramaları yapılmış, yapılan araştırmalar sonucunda fotodinamik terapinin yara tedavisinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Işıkla aktive olarak etki gösteren fotodinamik terapi (PDT), uzun zamandan beri dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji vb. Çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir tedavi türüdür (Dai 2009; Baumgartner 2006). PDT'de kullanılan fotosensitizör (PS), uygun dalga boyunda ışığı absorblayarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilen bir maddedir (Ackroyd 2001; Wainwright 2004). ROS, hedef hücrelerde mutajenik veya genotoksik etki olmadan sitotoksik etkiler üreterek antimikrobiyal aktivite gösterir (Gursoy 2012, Konapka 2007). Ek olarak, bu süreçte mikroorganizmalar da direnç geliştiremezler. Fotosensitizör boyar maddede bulunan kromofor gruplar spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kalmasıyla hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot (RNS) gibi zararlı radikallerin üretimi; ışığın dalga boyuna, şiddetine, kullanılan PS'ün miktarına ve

çeşidine bağlıdır (Baltazar 2015). Tez çalışmasında oluşan bu reaktif türlerin vücut dokularına zarar vermeden hasarlı dokuda enfeksiyona neden olabilecek iç ve dış kaynaklı mikroorganizmalardan arındırması hedeflenmiştir (Onat 2014). Yapılan araştırmalarda hasarlı dokuda mikroorganizma kaynaklı biyofilm oluşsa dahi reaktif oksijen türlerinin yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Kutlubay 2011). Ayrıca literatür taramalarında fotosensitizör ajanları aktive etmek için kullanılacak ışınların aynı zamanda doku oluşumunu uyarıcı role sahip olduğu ile ilgili bazı çalışmalara rastlanılmıştır (Türsen 2015).



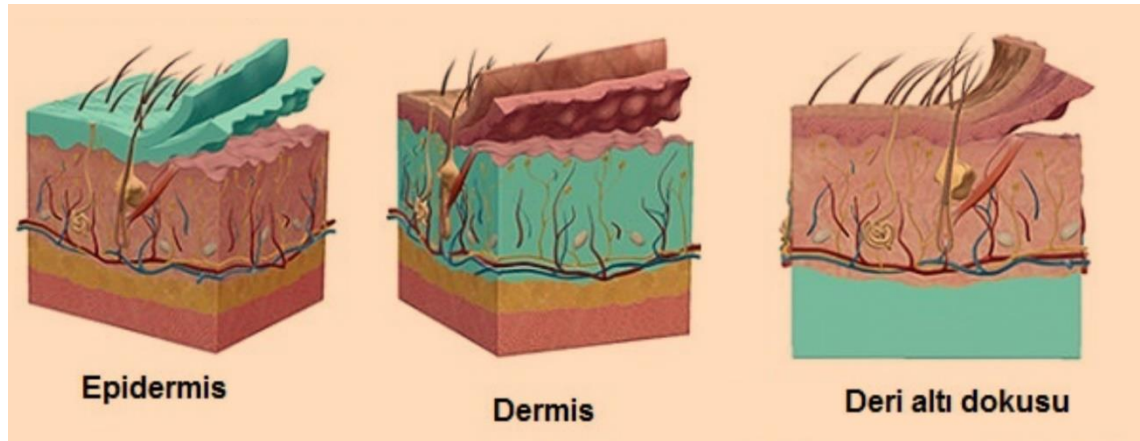
2. KAYNAK TARAMASI

Hasarlı dokunun onarımında; vücudu destekleyebilecek ve iyileşmeyi hızlandırabilecek tedavi yöntemi ve/veya materyali geliştirebilmek için vücudun yara onarım mekanizmasını anlamamız gereklidir. Bu süreç sırasında bütünleşik olay sırasını kavramamız, vücut içindeki ve dışındaki etmenlerin iyileşme sürecine etkisini öngörerek gidişatı kontrol edebilmemiz son derece önemlidir.

2.1. Derinin Yapısı ve Yaralı Dokunun Morfolojisi

Deri; koruma, düzenleme ve duyum olmak üzere üç ana işleve sahip olan bir dokudur. Vücudun en büyük ve en görünür organıdır ve çevre arasındaki anatomik ve fizyolojik bir engeldir. Fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik yaralanmalardan korunma sağlar hem de sıcaklık, soğuk algısı, ağrı, kaşıntı, dokunma ve basınç gibi duysal bileşenleri algılar. Vücuttaki farklı bölgelere göre deri kalınlığı ve hassasiyeti değişmektedir. Literatürde belirtilen ortalama cilt kalınlığı 1,7-7,7mm arasında değişmektedir ve genellikle 3,8 mm civarında bir kalınlığa sahiptir. Epidermis, dermis ve deri altı dokusu (hipodermis) olmak üzere 3 ana katmandan (şekil 2.1.) oluşmaktadır (Scott 2011).

- Epidermis; Cildin en dış tabakasıdır. Su geçirmez bir yapıdadır ve cilt tonunu yaratır.
- Dermis; epidermin altındaki katmandır. Sert bağ dokusu, saç kökleri ve ter bezleri içerir.
- Derin deri altı dokusu (hipodermis); En altta bulunan katmandır. Yağ ve bağ dokusundan oluşmuştur.



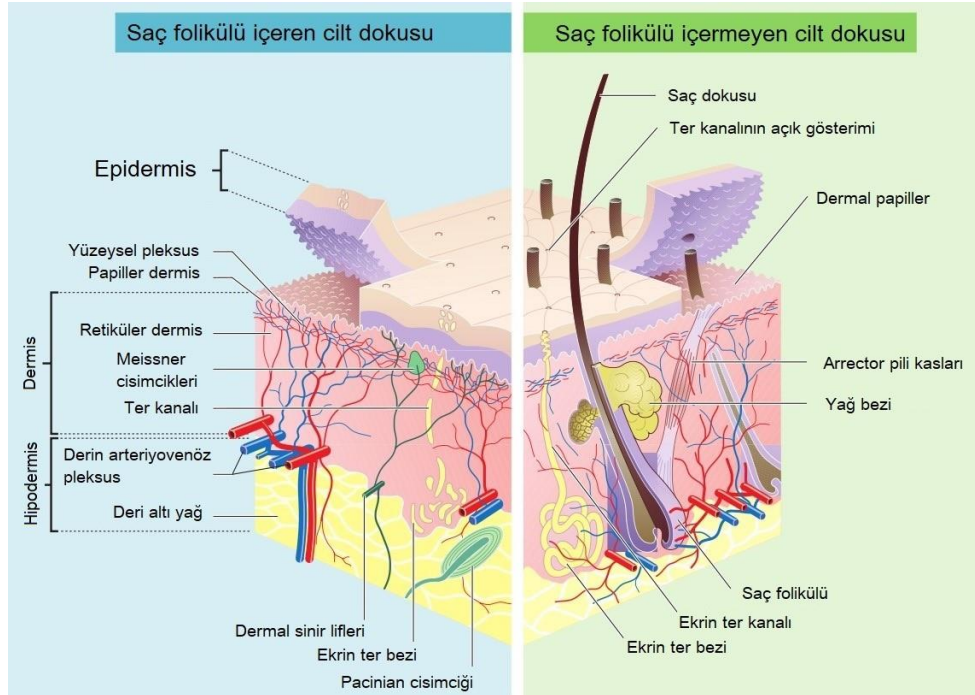
Şekil 2.1. Derideki farklı katmanların gösterimi

Derinin en dış katmanı olan epidermis, pozisyonu, şekli, polaritesi, morfolojisi ve keratinositlerin farklılaşma durumuyla tanımlanan çoklu hücre katmanlarından oluşmuş bir yapıdır, damarsal yapı bulundurmaz. Keratinositler (epidermal hücrelerin yaklaşık % 85'i), melanositler (yaklaşık % 5), langerhans hücreleri (% 3-8) ve merkel hücreleri (yaklaşık % 2) olmak üzere dört farklı tipte hücre içermektedir. Keratinositler çok katlı yassı hücreli epitel içeren koloniler halinde bulunur. En dış tabakayı oluşturan keratinositler sürekli dökülmekte ve yeni hücreler ile değiştirilmektedir. Keratinositler,

patojenik bakteriler, mantarlar, parazitler, virüsler, ısı, UV radyasyonu ve su kaybı nedeniyle oluşabilecek çevresel hasara karşı bir engel oluşturmakla görevlidir (McGrath 2004). Ayrıca keratinositler deride oluşan yaralanmalarda kısmen yaranın yarattığı boşluğu yuvarlanma hareketi ile göç ederek doldurur (Myers 2007; Anderson 1996).

Dermis tabakası; bağ dokusundan oluşan ve vücudu stres ve zorlanmadan koruyan epidermin altındaki cilt tabakasıdır. Cilde gerilme direncini ve elastikiyeti; suda çözülebilir hyalüronan ve proteoglikanlar tarafından desteklenmiş suda çözülmez kollajen fibrilleri ile mikrofibriller ve elastik lifler bulunduran ekstrasellüler matriks (ECM) sağlar (Breitkreutz 2009). ECM yara iyileşmesinin her aşamasına oldukça önemlidir. ECM yapısı ve bileşenleri, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmada, hücrelerin birbirleriyle iletişim halinde olmasını sağlamada, hücre göçünü yönlendirmede ve hücre tepkileri modüle etmede kilit rol oynar. Kronik yaralarda olduğu gibi ECM'nin işlevsiz olduğu durumlarda yara iyileşmesi yavaşlar veya durur (Midwood 2004).

Derin deri altı dokusu (hipodermis) cildin en derin ve genellikle en kalın tabakasıdır. Fonksiyonel nedenlerden dolayı dudak, yanak, göz kapağı, dış kulak gibi bazı bölgelerde bulunmaz. Bu bölgelerde, dermis kas ve bağ doku ile doğrudan temas halindedir. Hipodermisin yüzeysel kısmı, saç köklerini, ter bezlerini ve damar sistemini, basınç ve çekme kuvvetlerinden korunmasına yardımcı olmak için çevreler. Yapısı ağırlıkça yaklaşık % 90 trigliseritten oluşmuştur. Enerji rezervi olarak, koruyucu dolgu ve destek malzemesi olarak, termojenezi ve izolasyonu sağlamak için, yüzey hatlarının korunmasında görev alır. Hipodermis ayrıca steroid metabolizmasında ve östrojen üretiminde rol almaktadır (Breidenbach 1988). Östrojen, derideki yara iyileşmesinin hızı ve kalitesi desteklediği için önemlidir (Ashcroft 1999). Saç folikülü içeren ve içermeyen derideki farklı katmanların ayrıntılı gösterimi şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Saç folikülü içeren ve içermeyen deri katmanlarının ayrıntılı gösterimi

Yaralanma, cildin, mukozal yüzeylerin veya organın bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Bir tahribatin sonucu olarak ortaya çıkan ve kendiliğinden iyileşemeyen doku kaybı ya da defekti, toplumda insanın yaşam kalitesini ve uzunluğunu doğrudan etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Kesici, delici aletlerden, ezik, yanık, elektrik çarpması, yanma gibi etkilere silah ve patlayıcı madde kaynaklı unsurlardan, kimyasal maddelerden, trafik kazaları, düşme, darp, iş kazaları gibi olgulardan kaynaklanan çok çeşitli yaralanmalar görülmektedir. Yaralı dokunun iyileşmesi yaranın çeşidine, derinliğine, hastanın yaşına ve genetik yapısına, beslenme şekline, kullanılan tedavinin türüne vb. birçok hususa göre değişiklik göstermektedir (Young 2011). Yaralar, kısaca açık ve kapalı olmak üzere iki sınıfta incelenebilirler. Açık yaralar; yanık, kesik, ısırık vb. kaynaklı yaralardır. Kapalı yaralar ise; ezilme, sıyrık, hematoma (deri altında kan toplanması), burkulma vb. kaynaklı olabilir. Açık yaralarda doku kaybı sonucunda derinin üst katmanlarını oluşturan epidermis ve dermis hasar görür. Kapalı yaralarda ise deri bütünlüğü bozulmamakla birlikte, derinin alt katmanlarındaki yapılar darbe nedeniyle zarar görmekte, kanama meydana gelmektedir (Yalçın 2005). Derinin morfolojisini vücut içerisinden ve vücut dışarısından kaynaklı olgular bozabilir. Vücut dışındaki olgularla oluşan yaralara kapalı yaralar sınıfında olan; kontüzyonlar, hematomlar, ezilme yaralanmaları, açık yaralar sınıfında olan; aşınma, düzensiz yırtıklar, insizyonlar, delinmeler, yanıklar, ateşli silah yaraları örnek olarak verilebilir. Vücudun içerisinden kaynaklı yaralar ise bozulmuş dolaşım, nöropati, kronik tıbbi hastalık vb. kaynaklı olabilir (Guo 2010).

2.1.1. Yara çeşitleri

Yaralar için evrensel bir sınıflandırma olmamasına rağmen yaraları sınıflandırmak için çeşitli sınıflandırma yöntemleri bulunmaktadır. En pratik sınıflandırma Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Yara sınıflaması için en çok yaranın yapısı, süresi (akut veya kronik) ve cilt ve altta yatan dokulara verilen hasarın derinliği dikkate alınır (Percival 2012).



Şekil 2.3. Yaranın sınıflandırılması

2.1.1.1.Yara etiyolojisi

Yara etiyolojisi yaraya neden olan faktörleri sınıflandır. Farklı sınıflandırmalar olmakla birlikte genel olarak; cerrahi insizyon, travmatik yara, yanık, radyasyon yarası, basınç ülseri, diyabetik ayak yarası, vasküler ülser, atipik yara olmak üzere 8 farklı başlık altında özetlenebilir. İnsizyon tıp dilinde, cildin, dokunun ya da organın kesilmesiyle ilgili bir kavramdır. Cerrahi insizyon, ucu sivri, delici, kesici bir materyal ile oluşturulan yara türüdür. Travmatik yaralar dıştan mekanik bir etki sonucu olur ve bir organın, dokunun yapısını ya da biçimini bozan yaralardır. Yanık yaraları, sıcak bir cisimle karşılaşma, sürtünme, elektrik çarpması, bazı kimyasallar ile temas vb. nedenlerle oluşabilir. Radyasyon yaraları, radyasyonun türüne göre değişir. Alfa parçacıkları ve nötronlar, x-ışınları ve gama ışınlarına göre dokuda daha fazla biyolojik hasara sebep olmaktadır. Basınç ülseri; Bası yarası, dekübit ülser ya da halk arasında yatak yarası olarak bilinmektedir. Uzun süre veya şiddetli bir şekilde dokuya basıncın uygulanması ile kan dolaşımının azalmasıyla oluşur. Diyabetik ayak yarası, diyabet hastalarında sinirsel mekanizmada ve/veya damarsal mekanizmada oluşan dolaşımsal bozukluklar ile cildin nem miktarının azalması buna bağlı olarak kuru ve çatlak cilt yüzeyine mikroorganizmaların yerleşmesi sonucu oluşur. Vasküler ülser, damar sistemi ile ilgili bozukluklardan dolayı gelişen yaralardır. Atipik yaralar normalin dışından davranışsal özellikler gösteren yara çeşididir (Broughton 2006).

2.1.1.2.Yaranın süresi

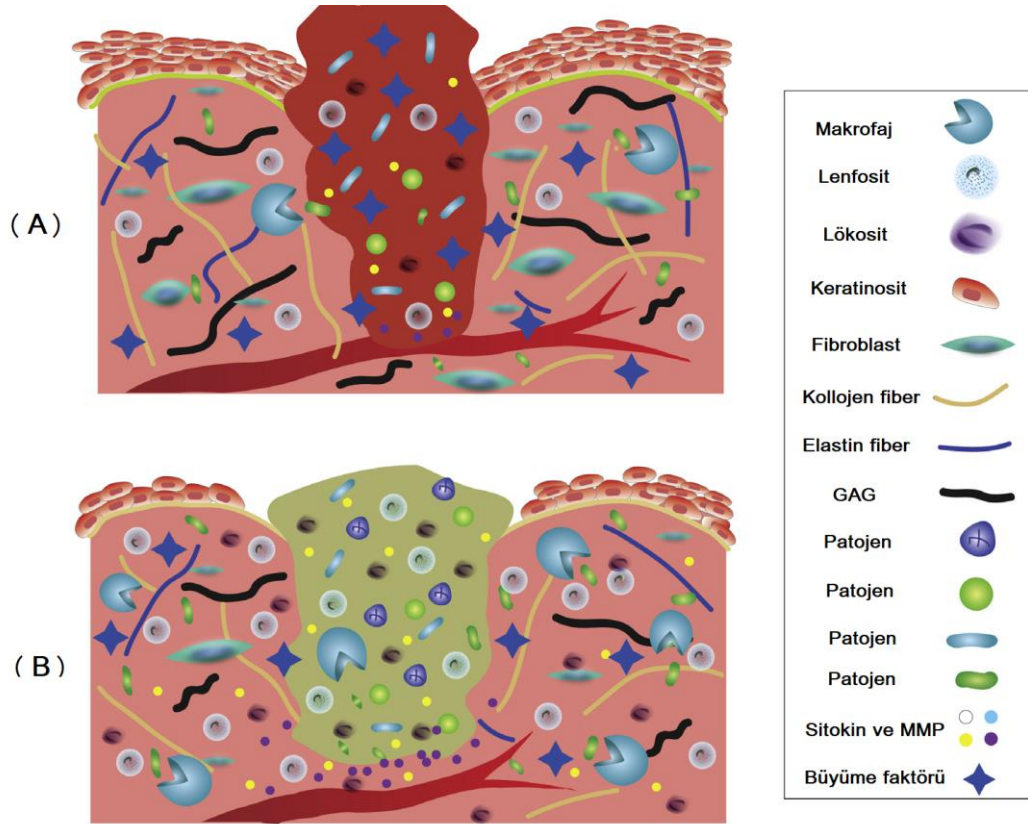
✓ Akut Yaralar

Akut yaralar, yumuşak dokunun bütünlüğünün bozulmasından dolayı aniden ortaya çıkan ve tahmin edilebilir bir süre sonunda iyileşen yaralardır. Akut yara yeri, büyüklüğüne, ilgili anatomik yapılara ve biyolojik yüke bağlı olarak basit veya karmaşık olabilir. Travmatik yaralar ve cerrahi yaralar akut yaralara örnek olarak verilebilir (Lee 2009).

✓ Kronik Yaralar

Yara iyileşmesi karmaşık bir süreçtir ve birçok farklı biyolojik yolu içerir. Doku rejenerasyonu; enfeksiyon, eşzamanlı hastalık (Diyabet, vasküler hastalık, kanser vb.), yetersiz beslenme gibi birçok faktörden olumsuz etkilenebilir. Yaranın iyileşmesinin başarısız olduğu durumlarda kronik ülser ortaya çıkabilmektedir. Akut yaraların tahmin edilebilir bir zamanda (4-6 hafta) iyileşmemesi halinde, iyileşme sürecinin gecikmesiyle veya durmasıyla zamanla kötüleşebilen kronik bir yara şekillenir. Kronik yaralarda iyileşme sürecini etkinleştirmek veya hızlandırmak için dışarıdan bir etki gerektirir. Basınç ülserleri, diyabetik ayak ülserleri ve venöz ülserler başlıca kronik yara tipleridir. Kronik zayıflama, yetersiz beslenme, diyabet ve sepsis gibi sistemik nedenler kronik yaralara neden olabilir. Kronik yaralar, granülasyon dokusu oluşumunu ve epitelizeasyonunu engelleyen yüksek seviyelerde proteolitik enzimler ve sitokinlerle karakterize edilmektedir. Bu evrede kalan bakteriyel kolonizasyon için ideal bir ortam sağlar ve iyileşme süreci enfeksiyon durumuyla ilişkili olarak değerlendirilir (Lee 2009; Weinzweig 2010). Şekil 2.4'te akut ve kronik yaralar arasındaki farklar şematize edilmiştir. Şekilde de gösterildiği gibi kronik yaralarda keratinosit, makrofaj, lenfosit ve

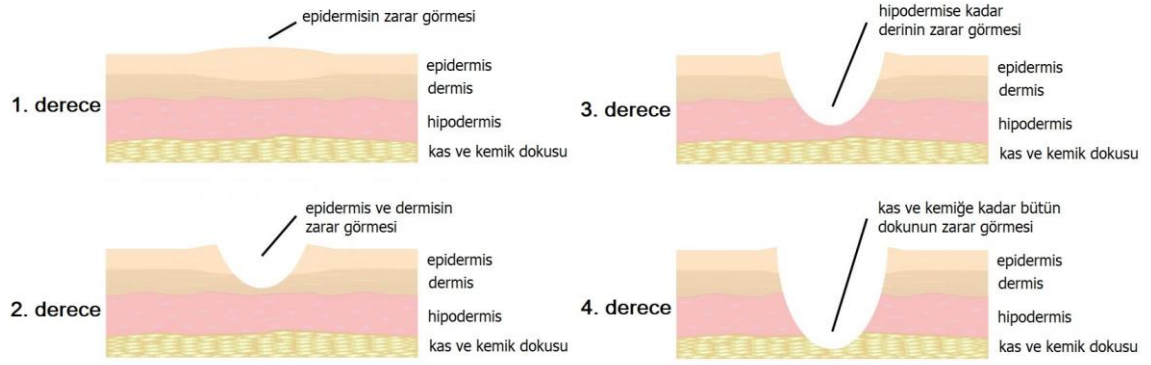
fibroblast popülasyonundaki önemli artış görülmektedir. Ayrıca akut yaralar (A) kronik yaralara (B) kıyasla daha fazla büyüme faktörü ve daha az patojen içermektedir.



Şekil 2.4. Akut (A) ve kronik yaralar (B) arasındaki fark (Kordestani 2019)

2.1.1.3. Yaranın derinliği

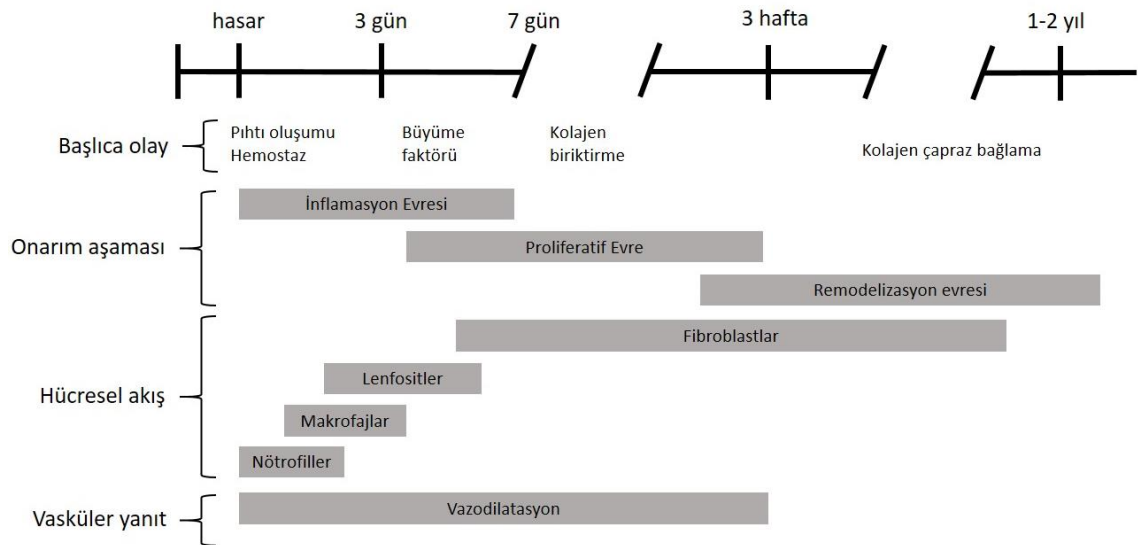
Birinci derece bir yara sadece epidermin zarar görmesi sonucu oluşur. Birinci derece yanıklara klasik örnek güneş yanıklarıdır. İkinci derece bir yara epidermis ve dermin zarar görmesi ile şekillenir, fakat dermis boyunca uzanmaz. İkinci derece yaralar ayrıca yaranın derinliğine bağlı olarak yüzeysel kısmi veya yüzeysel dermal ve derin kısmi veya derin dermal olarak sınıflandırılır. Yüzeysel kısmi yaralar pembe ve nemli görünür ve genellikle 3 hafta içinde kendiliğinden iyileşir. Derin kısmi yaralar ise bazen benekli bir görünüme sahip, kuru ve solgun görünür. Bu yaraların kendiliğinden kapanması genellikle 3 haftadan daha uzun sürer. Üçüncü derece yanık veya derin bir kesik tüm epidermisi ve dermisi içeren tam kalınlıkta bir yaralanmadır. Fizik muayenede gözlenen bulgu kan pıhtılarıyla dolu (trombozlu) damarlardır. Dördüncü derece yaralar yaranın kas ve kemiğe doğru derinlemesine uzanmasıyla oluşurmaktadır (Weinzweig 2010). Şekil 2.5'te yaranın derinliğine bağlı olarak zarar gören yapılar gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Yara derinliğinin sınıflandırılması

2.1.2. Yara dokusunun iyileşme evreleri

Yara iyileşmesi, ölü hücrelerin, hasarlı ekstrasellüler matriksin (ECM), eksik yapıların ve cansızlaştırılmış dokuların, yeni hücreler ve dokular ile değiştirildiği, karmaşık ve dinamik bir işlemdir. Doku hasarı oluşur oluşmaz, yara iyileşmesi çok sayıda biyokimyasal ve hücrel süreci başlatmaktadır. Doku bütünlüğünü eski haline getirmek amacıyla, çok sayıda hücrel ve hücre dışı yollar sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve koordine edilmiş bir şekilde birbirleriyle etkinleştirilir. Yara iyileşme süreci; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelizasyon olmak üzere dört ayrı evreye ayrılır (Velnar 2009). İnflamasyon faz sırasında hemostaz meydana gelir ve akut bir iltihap sızıntısı oluşur. Proliferatif faz, fibroplazi, granülasyon, kasılma ve epitelizeasyon ile karakterizedir. Son aşama, genellikle skar olgunlaşması olarak tanımlanan yeniden biçimlenmedir. Vücut içinden veya dışından kaynaklanabilecek pek çok faktör bu sürece müdahale ederek yara iyileşmesini geciktirebilir, yaranın ileride iz bırakmasına sebep olabilir ve hatta ölüme neden olabilir (Ueno 2006). Şekil 2.6’da yara dokusunun iyileşme evreleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Yara dokusunun iyileşme evreleri

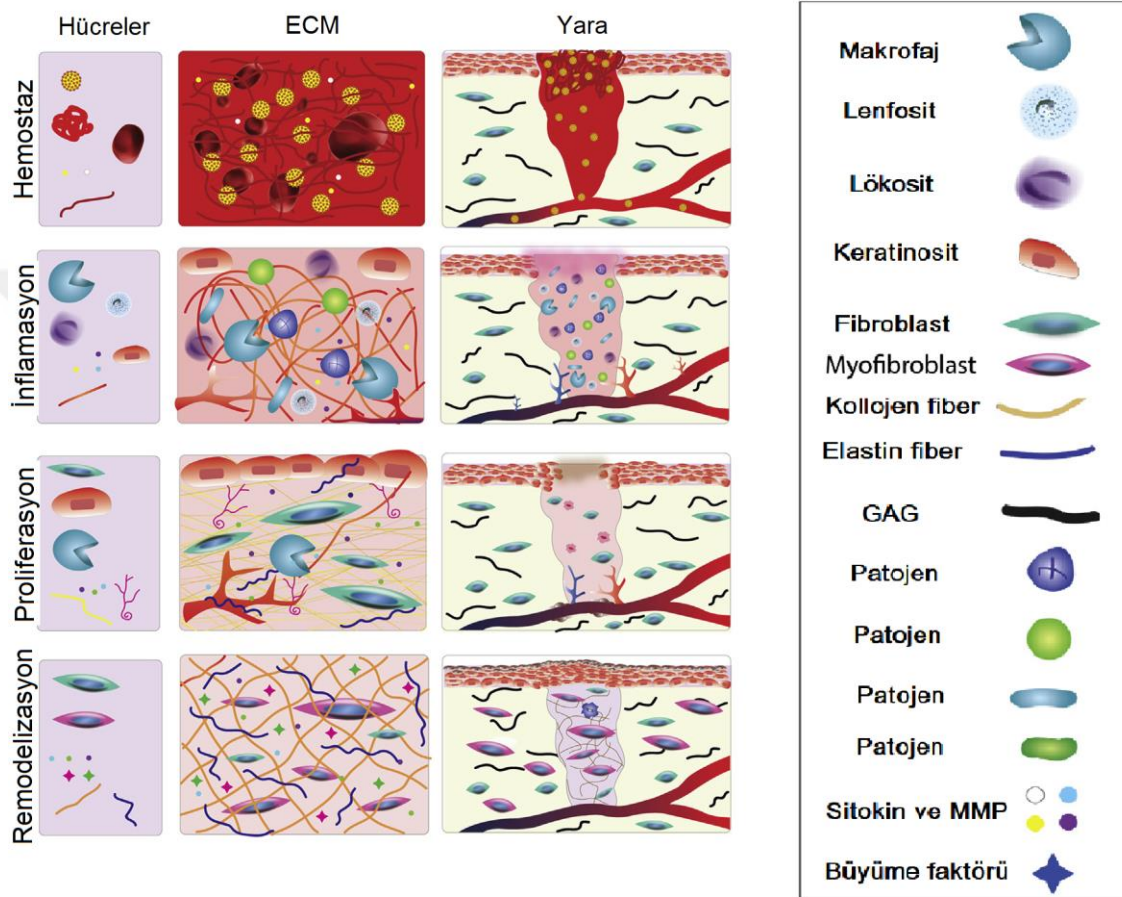
I. Hemostaz

Yaralanmadan sonra doku bütünlüğünde bir parçalanma oluşur, oyuğu veya kesiği kan doldurarak ECM'nin çeşitli bileşenleri ile temas haline geçer. Hasarlı kılcal damarlar sitoplazmik kalsiyum seviyelerinin artmasıyla damar duvarının dairesel katmanındaki düz kas kasılır ve damar hızla daralır. Yaralanmanın enine düzlemde olduğu ve çapı 4-5mm'ye kadar olan damarlar kasılma ile tamamen kapatılabilir. Birkaç dakika içinde, arteriyol (kılcal damar) daralmasının aracılık ettiği kan akışındaki azalma doku hipoksisine (oksijen azlığı) ve asidoza (hidrojen iyonu konsantrasyonundaki artış) yol açmaktadır. Bu durum bir refleks olarak vazodilatasyonuna (damar duvarındaki çizgisiz kasın gevşemesi) neden olmak için nitrik oksit, adenosin ve diğer vazoaktif metabolitlerin üretimini tetiklemektedir. Eşzamanlı olarak, mast hücrelerinden histamin salınımı ile damar kası gevşemesi ve buna bağlı olarak damarın geçirgenliği artar, iltihap hücrelerinin yaranın etrafındaki hücre dışı alana girmesi sağlanır. Bu durum, erken aşamadaki yaraların karakteristik sıcak, kırmızı, şişmiş görünümünü oluşturmaktadır. Bu aşamada görülen fazla miktardaki kan kaybı, birçok mekanizma ile elde edilen bir pıhtı oluşumu ile önlenmektedir. Kan kaybını önlemek adına oluşturulan mekanizmaları özetlemek gerekirse; trombositlerin yara alanında toplanmasından sonra, faktör XII aktive edilir, böylece hemostaz'a yol açan fibrin pıhtısı oluşturulur. Faktör XII'nin aktivasyonu (Hageman faktörü), protrombini trombine dönüştüren faktör X aktivasyonu ile sonuçlanan ve fibrinojenin fibrine dönüşmesi ve bir fibrin tıkaçı veya pıhtısı oluşumu ile sonuçlanan bir mekanizmadır (hemostatik tıkaç). Fibrin pıhtısı, hücrelerin içine girebileceği yara alanı içindeki bir ön matriks görevi görür. Fibrin pıhtısı oluşuktan sonra, pıhtı uzantısını önleyen ve daha fazla hücre göçü için alan sağlamak üzere fibrin pıhtısını ortamdan kaldıran fibrinoliz aktive edilir. Fibrinoliz aktivitesi ile bir sonraki iyileşme aşamasına geçilmektedir (Young 2015)

II. İnflamasyon

Yara iyileşmesinin bu aşamasının asıl amacı enfeksiyonu önlemektir. İnflamatuar evresi doku hasarından hemen sonra başlamaktadır. Bu evrede, fibrin pıhtısı bozulmakta, ardından kılcal damarların genişleyerek geçirgen hale gelmesi ile plazma ve ana enflamatuar hücreleri (nötrofiller ve makrofajlar) yaralanma bölgesine bırakılmaktadır. Fibrin bozuldukça bozunma ürünleri fibroblastları ve epitel hücrelerini çeker (Şekil 2.7) Nötrofiller yaralanmadan hemen sonra yaraya girer ve 24-48 saat içinde maksimum sayılarına ulaşır. Aslında, bu durum enfeksiyona karşı vücudun gösterdiği ilk savunma hattıdır, asıl işlevi hücre artıklarını ve patojenleri fagosit etmektir. Doku artıklarını ve bakterileri yok etmek için savunma sistemi üç ana mekanizmaya sahiptir. Öncelikle, fagositoz adı verilen bir işlemi doğrudan yabancı maddeleri yutabilir ve yok edebilirler. İkincisi, nötrofiller bakterileri ve ölü konak dokuları yok edecek çeşitli toksik maddeleri (laktoferrin, proteazlar, nötrofil elastaz ve katepsin) bozabilir ve serbest bırakabilir. Son kanıtlar, nötrofillerin, kromatin üretebildiğini ve hücre dışı alanda bakterileri öldüren "tuzakları" koruduğunu göstermiştir. Oksijensiz radikaller, bakteriyosidal özelliklere sahip olduğu bilinen fakat aynı zamanda yarayı sterilize etmek için klor ile birleştirebilen nötrofil aktivitesinin bir yan ürünü olarak üretilir. Nötrofiller görevlerini tamamladıklarında ya ya apoptozise girerler, ya da yara yüzeylerinden katlanırlar ya da makrofajlar tarafından fagositozlanırlar. Makrofajlar, yaradan 48-72 saat sonra bir yarada tepe konsantrasyona ulaşan çok daha büyük fagositik hücrelerdir. Trombositlerden ve hasar görmüş hücrelerden salınan kimyasal haberciler tarafından yaraya çekilir ve bu

aşamada mevcut olan asidik yara ortamı içinde hayatta kalabilirler. Makrofajlar, enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde, anjiyogenezin uyarılmasında ve granülasyon dokusu oluşumunun arttırılmasında önemli olan TGF- β ve epidermal büyüme faktörü (EGF), gibi geniş bir büyüme faktörü rezervini barındırır. Lenfositler 72 saat sonra yarada görülmeye başlar ve kollajen üretilmesi yoluyla ECM yapı iskelesinin ve yara iyileşmesinin düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir Şekil 2.7’de inflamasyon evresinde görev alan hücreler görülmektedir.



Şekil 2.7. Yara iyileşme evrelerinde görev alan faktörler ve ECM ve dokunun yapısı

III. Proliferasyon

Bu faz, yara boşluğunda granülasyon dokusu oluşumu ile karakterize edilir. Bu aşamada keratinositler, epitel dokusunu yeniden oluşturmak ve epidermis tabakasının sürekliliğini sağlamak için göç eder. Oluşan bu yeni doku elastin, glikozaminoglikanlar (GAG'ler), fibrin ve fibronektin gibi lifli proteinleri içeren bir yapıdır. Proliferasyon; eş zamanlı meydana gelen, anjiyogeneze, granülasyon dokusu oluşumu, kollajen birikmesi, epitelizasyon ve yara retraksiyonunu içeren karmaşık bir süreçtir.

Anjiyogenez

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) salınımı esnasında hemostatik tıkaçın oluşması ile antiyogenez tetiklenir. Oluşan oksijen azlığına (hipoksi) cevap olarak vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) serbest bırakılır. Başlangıçta, yaranın merkezi nispeten avaskülerdir, çünkü sadece yara kenarındaki hasar görmemiş kılcal damarlardan oksijenin difüzyonu gerçekleşebilir. Anjiyogenez süreci ilerledikçe, yara boyunca sağlıklı damarlar ile bağ oluşturan kılcal bir damar ağı oluşur.

Fibroblast göçü

Yaranın iyileşme sürecini takiben, fibroblastlar, hemostatik pıhtıdan salınan büyüme faktörleri (ağırlıklı olarak TGF- β ve PDGF tarafından) ile uyarılır ve çoğalarak yara bölgesine göç eder. Yara oluşumundan sonraki üçüncü gün yara, ECM proteinlerini (hyalüronan, fibronektinler ve proteoglikanlar) salan, ve sonuç olarak kollajen üretebilecek fibroblastlar bakımından zenginleşir (Young 2011). İnsan vücudundaki kollajenin % 90'ından fazlası tip I'dir. Bununla birlikte, 2011 itibarıyla, oluşturdukları yapıya göre 28 tip kollajen tanımlanmış ve çeşitli gruplara ayrılmıştır. Kollajen bağ dokusundaki ana bileşendir. Fibroblastlar, kollajen sentezini yapan en önemli yapılardır (Ricard-Blum 2011). Yara bölgesi hasar almamış dokulara kıyasla farklı kollajen aralığından (daha yüksek oranda tip 3 kollajen) oluşmaktadır. Yeterli matriks yerleştirildikten sonra, fibroblastlar bir myofibroblast fenotipine dönüşerek psödopodlar (yalancı ayaklar) geliştirir. Bu yapı, çevreleyen proteinlere fibronektin ve kollajene bağlanmalarını ve yara büzülmesine yardımcı olmalarını sağlar. Fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajenler, dokulara güç sağlamada önemli rol oynarlar. Öncelikli amaç olan yaranın kapatılması için kollajen birikimi 5. günde maksimuma çıkmaktadır. Fakat kollajenin aşırı üretimi hipertrofik skar oluşumuna neden olabilir. Hipertrofik yara türü için olası risk aşırı gerginlikten kaynaklanan acı ve yara enfeksiyonlarının oluşmasıdır.

Epitelizasyon

Epitelizasyon aşamasında epitel hücreleri, ilk olarak bir hücre tabakası ile yarayı kaplamaya ve aşağıdaki matrikse yapışana kadar yaranın kenarlarından göç etmeye devam etmektedir. Epitel hücrelerinin hareket alanı kazanmasına ve yara yüzeyinde hareket etmesine izin veren Epitelial Mezenkimal Transition (geçiş) (EMT) işlemi, yara oluşumu gibi farklı uyarılar sonucunda hücrelerin epitelial özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları ile şekillenir (Yang 2008). Bu aşama kapalı olan yaralarda 24 saat içinde tamamlanabilir. Sitokin konsantrasyonundaki değişiklikler, epitel hücrelerinde hücre sayılarını çoğaltmak ve yara onarımını tamamlamak için önemlidir. İkincil olarak epitel hücrelerinin büyük bir alanda bulunamaması ile gelişen zor iyileşme gösteren yaralarda, epitelizasyon tamamlanmadan önce yaranın belirgin bir şekilde büzülmesi gerekir. Fakat bazı yaralar büzülmenin gözlenemeyeceği kadar büyük bir alana sahip olabilir. Bu durumda defekti kapatmak için cilt grefti kullanılmaktadır (De Donatis 2010).

Yara çekilmesi

Yara oluşumundan yaklaşık 7 gün sonra yara büzülmeye başlamaktadır. Bu aşamada esas olarak myofibroblastlar rol oynamaktadır. Aktin ve miyosin arasındaki etkileşimler ile hasarlı doku alanını azaltarak hücre gövdeleri birbirine yaklaşır. Yara büyüklüğüne bağlı olarak ortalama 0.75mm/gün kısalma gözlenebilir. Kısalma, büzülme veya çekilme hızı, yara şekli de dahil olmak üzere sayısız faktörden etkilenmektedir. Doğrusal yaralar en hızlı ve dairesel yaralar ise en yavaş büzülen yara türleridir. Bu iyileşme aşamasında görülen bozukluklar, şekil ve bozukluğuna yol açabilir (Hinz 2006)

IV. Remodelizasyon

Remodelizasyon (yeniden şekillenme), 21 günden 2 yıla kadar zaman alabilen yara iyileşmesinin en uzun tadilat aşamasıdır. Bu evrede doku tadilatı, kollajen yapının yeniden düzenlenmesi ve yara dokusunun kasılması ile gerçekleştirilmektedir. Belirli bir düzen ile yönetilen kollajen sentezi ve yıkımı eşitlendiğinde, doku iyileşmesinin yeniden şekillenme aşaması başlamaktadır. Bu aşamada, kollajen tip I, kollajen tip III'e değiştirilir ve yeni sentezlenen kollajen lifleri yeniden düzenlenir, çapraz bağlanır ve mekanik gerilme hatları boyunca hizalanır. Bu evrenin süresi yaranın büyüklüğüne, ciddiyetine ve kapama tipine bağlı olarak 3 ila 21 gün arasında değişmektedir. Üçüncü haftaya kadar, kollajen yapı sahip olması gereken gerilme kuvvetinin yaklaşık % 20'sini kazanır ve 12 hafta sonra bu değer % 80'e ulaşmaktadır. Yaralı doku iyileşse dahi maksimum gerilme dayanımı normal sağlıklı cilde kıyasla azdır. Yara iyileşme aşamalarında zaman ilerledikçe, vaskülerite düzeyi azalır ve rengi kırmızıdan pembeye döner (Baranoski 2015).

Akut ve kronik yaralarda iyileşme şekilleri benzer olmasına rağmen bazı farklılıklar mevcuttur. Cerrahi insizyonlar dahil olmak üzere akut yaralar genellikle iyileşme aşamalarını nispeten hızlı bir şekilde geçer. Bu tür yaralar genellikle temizdir ve minimum doku kaybına ve bozulmasına neden olur. Dikişlerle hemen kapatılabilir ve hızla iyileşme eğilimindedir. Kronik yaralar ise yara oluşumundan 12 hafta sonra iyileşmeyi geciktiren durumların görüldüğü, sıklıkla uzun süreli patolojik inflamasyonun bir sonucu olarak şekillenen yaralardır. Genellikle doku kaybının geniş olduğu, doku kenarlarının birbirine yaklaşmadığı durumunda veya sepsis nedeniyle yaranın açık bırakılması gerektiği durumlarda oluşur. Bu tür yaralarda doku kusurunun kapsamlı granülasyon dokusu ile doldurması gerektiği için onarım süreci uzamaktadır. Büyük doku hasarları iyileşebilir fakat yara izi kalma olasılığı yüksektir (Broughton 2006).

2.1.3. Yara iyileşmesinde önemli faktörler

ECM proteinleri

ECM'nin yapısında proteoglikanlar, glikoproteinler ve GAG adı verilen proteinler ve polisakkaritler vardır. ECM'yi oluşturan proteinlerin iki ana sınıfını kollajen, elastin ve fibronektin adı verilen lifli proteinler oluşturmaktadır. Çoğunlukla fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajen, memelilerde en bol bulunan proteindir ve dermisin kuru ağırlığının %70 - %80'ini kolojendir. Elastin, doku elastikiyetinden ve esnekliğinden sorumludur. Esneyen ve orijinal formuna geri dönen ve doku şeklini korumaya yardımcı olan lifli bobinlerden oluşmaktadır. Elastin, insan derisinin kuru ağırlığının sadece %2 -

% 4'ünde bulunmaktadır. Fibronektin ise hücre yapışması için ankraj sağlayan ve hücrenin hücreyle veya hücrenin ECM ile etkileşimlerinden sorumlu olan lifli bir bileşiktir. Yeniden modelleme aşamasında, ön matriks sağlayan hücreler ve birikmiş kollajen lifleri arasındaki fiziksel etkileşimler için bir aracı görevi gören anahtar bir role sahiptir. Proteoglikanlar, çeşitli tiplerde bir dizi polisakarit yan zinciri ile dallanmış bir protein omurgasından oluşurken, gliko proteinleri, amino asit yan zincirleri olan bir polisakarit omurgasından oluşur. GAG zincirleri, disakkaritleri tekrarlayan amino şekerler içeren uzun dallanmamış polisakkaritlerdir. Proteoglikanlar, dokudaki çeşitli yapısal ve organizasyonel işlevleri ve % 95'e kadar (ağırlık / ağırlık) karbondhidratlarla yüksek oranda hidratlanmış jel benzeri öğütülmüş bir madde ile karakterize edilmektedir (Frantz 2010).

Anjiyogenez süreci

Yara iyileşmesinin kilit parçalarından biri olarak, anjiyogenez, besin maddeleri ve oksijen iletimi için kan taşımak üzere yeni damarların oluşturulduğu dinamik bir süreçtir. Vasküler endotel hücreleri, yara kenarlarında bulunan hasarlı damarların ve kılcal damarların son kısmından ortaya çıkarak yeni kılcal damarlar oluşturmaktadır. Bu kılcal damarlar, diğer kılcal damarları karşılamak ve kılcal bir ağ oluşturmak ve kan dolaşımına izin vermek için birbirleriyle bağlantı kurmak için büyümeye devam etmektedir.

Epitelizasyon süreci

Yaralanmadan birkaç saat sonra başlayan epitel iyileşmesi veya epitelizasyon, iyileşmenin bir diğer önemli özelliğidir. Normalde altta yatan dermise sıkıca bağlı olan bazal hücreler, hücre yapışma davranışlarını değiştirir ve ayrılmaya başlar ve geçici matriks boyunca sıralı bir şekilde göç eder. Bu yatay hareket hücreler buluştuğunda durdurulur. Epitelyal dokuda, keratinositler yaranın kenarlarından seyahat eder ve sonunda açık mor renge dönüşen koyu pembe renkte granülasyon dokusu üzerinde yavaşça büyür. Büyük miktarda epitelize edici doku genellikle başarılı yara iyileşmesinin bir göstergesidir (Pastar 2014).

Yara kasılması

Çoğalma evresinin son işareti, normalde yaralanmadan 5 gün sonra başlayan yara kasılmasıdır. Yara kasılması, bağ dokusu matriksinin yeni taşınmış fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajen lifleri tarafından oluşturulduğu dinamik bir işlemdir. Daha sonra, fibroblastlar, yara kenarlarını yara merkezine doğru çekmek için çekme kuvvetinden sorumlu olan miyofibroblastlardan farklılaşmakta ve bu da yara alanını kademeli olarak azaltmaktadır. Yara kasılması ECM proteinlerinin aşırı sentezini inhibe ederek iyileşme süresini kısaltmaktadır. Fibroblastların ve miyofibroblastların kasılma aktivitesi kasılma gücünü sağlamaktadır (Swaim 2001).

Matriks metaloproteinazları

Proteazlar, özellikle matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), normal yara iyileşmesinin tüm aşamalarında anahtar rol oynamaktadır (Şekil 2.7). Enflamatuvar faz sırasında, hasar görmüş hücre dışı matriks proteinleri, özellikle kollajen lifleri, yeni

sentezlenen kollajen liflerini, fibroblastların yer değiştirmesini doğru şekilde hizalamak için MMP'ler tarafından bozunmaktadır. Hasar görmüş kollajenleri ayrıştırmak için kollajenaz, kollajen liflerini iki parçaya bölmekte ve daha sonra jelatinaz, nötrofiller ve makrofajlar tarafından daha fazla fagositoz için daha küçük parçalara ayırmaktadır. MMP'ler, yeni kılcal ağ oluşumunu mümkün kılan endotelial bazal membranın çıkarılmasıyla endotelial hücre ayrılması ile anjiyogeneze önemli bir role sahiptir. Ayrıca, MMP'ler, yara kontraksiyonunun, çevreleyen bağ dokusu kalıbına dayanarak yeni oluşturulmuş ECM'yi doğru bir şekilde şekillendirmesi için gereklidir (Han 2015). MMP'ler, inhibitörleri ile birlikte, ECM bozunmasını ve birikmesini düzenleyerek reepitelyalizasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Bakhshayesh 2018).

Beslenme

Beslenme durumunun yara iyileşmesini etkileyebileceği uzun zamandır bilinmektedir. 15. yüzyılda, Portekizli kaşif Vasco da Gama, İskorpitçili denizcilerin çok sayıda iyileşmeyen cilt lezyonuna sahip olduğunu belirtmiştir. İskoç cerrah olan James Lind'in 1747 yılında saptadığı turuncgillerin İskorpitleri başarılı bir şekilde tedavi edebileceği ve yara onarımını artırabileceği ile ilgili çalışmasına kadar çok yönlü beslenmenin yaranın iyileşmesi üzerindeki önemi bilinmemekteydi. Kötü beslenme, inflamasyonu uzatarak, fibroblast fonksiyonunu inhibe ederek ve anjiyogeneze ve kollajen birikimini azaltarak iyileşmeyi olumsuz yönde etkilemektedir. A vitamini (epidermal büyümeye dahil), karbonhidratlar (kollajen sentezi için) ve omega-3 yağ asitleri (arakidonik asit yolunu modüle etmek) dahil olmak üzere yara iyileşmesi için önemli olan birçok temel besin maddesi bulunmaktadır. Son yıllarda, klinik beslenme alanındaki kapsamlı araştırmalar, yara iyileşmesini arttırmak için beslenme destek tekniklerinin kullanılmasında açık bir fayda olduğunu göstermektedir (Campos 2008).

Hipoksi (Oksijen Yetmezliği)

Tüm yaralar lokal vasküler teması kesildiği için bir dereceye kadar hipoksiktir. Yeniden epitelizeasyonu kolaylaştırmak için bir miktar hipoksi gerekli olmakla birlikte, yaraların iyileşmesi için yeterli miktarda oksijen temel bir gerekliliktir. Cerrahi uygulamada yaşlı hastaların ve periferik vasküler hastalığı olanların iyileşmesinin zayıf olduğu bilinmektedir. Hiperbarik (saf oksijen verilmesi ile şekillenen tedavi) oksijenin yarayı hızlı iyileştirdiği görülmektedir. Oksijenin azlığı nötrofiller ve makrofajlar için olumlu etki göstermesine rağmen, fagositoz ve diğer bazı işlevler için oksijen oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda, perioperatif dönemde verilen tamamlayıcı oksijenin yara enfeksiyonu riskini azalttığını göstermektedir. Oksijen, pralin ve lizin tortularının hidroksillenmesinde bir substrat görevi gördüğü için kollajen birikimi için de gereklidir. Sigara içmek oksijen kısmi basınçlarını etkiler ve daha fazla yara komplikasyonuna neden olur, ayrıca sigara içmenin bağışıklık fonksiyonunu ve kollajen birikimini de etkilediği bilinmektedir (Kurz 1996).

Enfeksiyonun Etkisi

Enfeksiyon daha önceden de belirtildiği gibi yaranın iyileşmesini son derece geciktiren ve kronik yaralara neden olabilen bir faktördür. Hatta cerrahi kesi yapılmadan önce bile antibiyotik tedavisi ilk olarak 1958'de kobaylarda ve daha sonra 1960'ta

insanlarda denenmiş, antibiyotik kullanımının yara enfeksiyonu riskini azalttığı kanıtlanmıştır.

İmmünsüpresyon (bağışıklık sisteminin baskılama)

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), kanser ve yetersiz beslenme olan hastaların tümü, yara iyileşmesinin gecikmesine yol açabilen bir derece immünosupresyona sahiptir. Ek olarak, enflamatuvar yanıtı bozan herhangi bir ilaç, iyileşme sürecini engelleyebilir. Prednizolon gibi oral steroidlerin, yara onarımı sırasında sitokin konsantrasyonlarını azalttığı ve kollajen birikiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.

Kronik hastalık

Kardiyovasküler sistemi etkileyen herhangi bir kronik hastalık, yara iyileşmesi için gerekli oksijen ve diğer besin maddelerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Diyabetik hastalarda, bağışıklık sistemlerinin zayıflamasından ve yüksek kan şekeri seviyesi nedeniyle lökosit işlevinin etkilenmesinden dolayı yara iyileşmesi önemli ölçüde gecikmektedir. Ek olarak diyabet, hem doku oksijen seviyelerini hem de besin tedarikini etkileyen uzun süreli mikrovasküler hasara neden olur.

Yaş

Yaşlı hastalar daha ince bir epidermal tabakaya sahiptir ve inflamasyon, migrasyon ve proliferasyon süreçleri daha yavaş gerçekleşmektedir. Ayrıca, bu hastaların daha yavaş yara iyileşmesine sahip olmaları dolayısıyla yüksek risk altında olmalarına neden olan kronik bir hastalığa sahip olma olasılıkları daha yüksektir.

Genetik Faktör

Genetik faktörler de yaranın iyileşme sürecinde oldukça etkilidir. Genellikle Asya ırkı hastalarında önemli ölçüde daha yaygın görülen ve yaranın iyileşme sürecinde oluşabilen bir bozukluk nedeniyle aşırı hücre üretimi neticesi ile anormal doku oluşumuna sebep olan keloid, genetik faktörün etkilediği durumlardan biridir. Keloid kollajen birikimindeki kusurlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Osteogenezis İmperfekta, Ehler Danlos Sendromu, Marfan Sendromu, Epidermolizis Büllosa konnektif doku metabolizma bozukluğu yapan genetik hastalıklar arasında sıralanabilir (Henriksen 2011).

Sıcaklık Etkisi

Vücuttaki hücresel yanıtların, enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı yaklaşık 37°C'dir. Yara sıcaklığı 2°C kadar düştüğünde iyileşme süreci yavaşlayabilmekte veya durabilmektedir. Ayrıca, soğutulmuş dokular vazokonstriksiyona neden olur ve bu durum hemoglobinin oksijen ihtiyacını artırmaktadır. Herhangi bir potansiyel enfeksiyonla savaşmak için nötrofil adı verilen beyaz kan hücrelerinin türü için daha az oksijen bulunur. Ayrıca yara doku sıcaklığı 33 derecenin altına düştüğünde fibroblast ve epitel hücre aktivitesi azalmaktadır (Mcguiness 2004).

Nemin Etkisi

1960'lı yıllında nemli tutulan yaraların kuru kalan yaralara kıyasla daha iyi iyileştiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda yara bölgesinden nemin Emilimi veya uzaklaştırılması cilt hücrelerin ölümüne neden olduğu, bu süreç sonucunda kurumuş kan ve diğer sıvılardan oluşan bir kabuğun nem kaybına karşı verimsiz bir engel teşkil ettiği, oluşan kabukların yeni hücrelerin yaranın kolonileşmesini engellediği saptanmıştır. Nemli bir bandajın belki de en önemli yararı, hücrelerin canlı kalması ve çoğaltılması için optimum bir ortam sağlamasıdır. Bu gibi nedenlerden dolayı günümüzde, gazlı bezli bandajlar yerine, yara bölgesini nem dengesini etkili bir şekilde koruyan, ancak oksijen, azot ve su buharı iletimi sağlayan bandajlar tercih edilmektedir. Ayrıca nemli yara örtüleri sinir uçlarını koruyarak yaranın daha az zarar görmesini ve daha az acı oluşmasını sağlamaktadır (Güneş 2006).

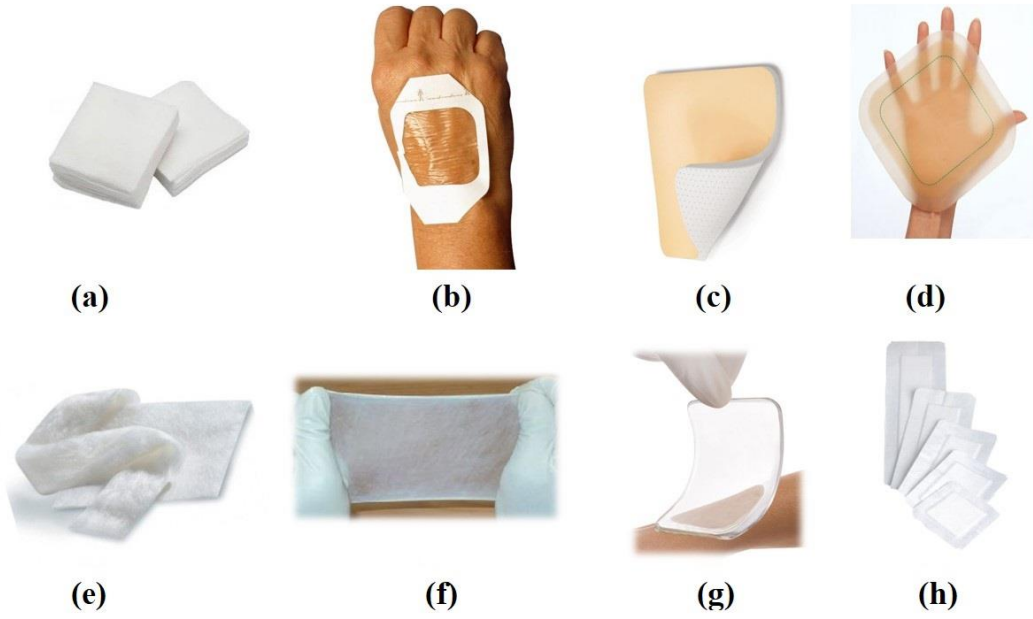
2.1.4. Yara Tedavisinde Kullanılan Malzemeler

Yara tedavisi için kullanılacak ürünler uygun doku mühendisliği iskeleleri, hücrelerin büyümesine rehberlik etmeli, yeterli yapısal destek sağlamalı, gerekli besinlerin ve atık ürünlerin taşınmasına yardımcı olmalı ve fonksiyonel doku ve organların oluşumunu kolaylaştırabilmelidir. İdeal pansuman materyali, yaraya bakteri istilasından korurken nemli bir ortam sağlamalıdır. Geleneksel gazlı bez, fazla eksüdayı uzaklaştırmakta, bakteri istilasını etkili bir şekilde engellemekte ve ortamda nem dengesini sağlamada yetersizdir. Son zamanlarda, hücre aktivitesini arttırmak veya skar oluşumunu en aza indirmek için çeşitli yara tedavisi materyalleri geliştirilmiştir. Yaranın durumuna ve kişinin ihtiyaçlarına uygun olarak film, hidrokolloid, hidrojel, köpük, hidrofiber, biyolojik ve kompozit sargılar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bugün piyasada 3.000'den fazla yara örtüsü ürünü bulunmaktadır. Örtünün materyaline göre 8 ana kategoride sınıflandırılabilirler. Şekil 2.8'de bu yara örtüleri ile ilgili görseller verilmiştir.

I- Gazlı Bezler

Geleneksel olarak, yara örtüleri dokuma (pamuklu) veya dokuma olmayan gazlı bezden (sentetik, daha emici) yapılmıştır. Düz örgü ve daha küçük gözenekli gazlı bez, yara yatağında travma riskini en aza indirmektedir. Gazlı bez örtüleri oldukça geçirgendir, ucuzdur ve kısa süreli veya kısa süreli kullanım olarak kullanılır. Gazlı bezlere, vazelin, bizmut veya çinko emdirilebilir. Gazlı bezler genellikle her türlü şekil, boyut, derinlik veya etiyolojiye sahip enfekte ve enfekte olmamış yaralar için kullanılabilir. Çok sık pansuman yapılması gereken yaralarda tercih edilebilir. İlaç veya tedavi edici kimyasallarının yüklenebildiği yapılardır. Birçok olumlu özelliğinin olmasına rağmen gözenek boyutlarının büyük olması, hasarlı dokuya yapışabilmesi, nem dengesini koruyamayıp, yarayı susuz bırakması olumsuz özellikleridir. Ayrıca kendiliğinden yapışkan olmayan gazlı bezler genellikle sargılarının tutunmasını arttıran ikincil sargılar olarak işlev gören farklı katmanlar kullanılmaktadır.



Şekil 2.8. Yara örtüsünün materyaline göre sınıflandırılması **a)** Gazlı bezler; **b)** Filmler; **c)** Köpükler; **d)** Hidrokolloidler; **e)** Aljinatlar ve Hidrofiberler; **f)** Biyolojik yara örtüleri; **g)** Hidrojel yapılar; **h)** Kompozit Yara Örtüleri ve Yardımcı Maddeler

II- Filmler

Yarı geçirgen film sargılar; yapışkan sırtlı ince, esnek şeffaf poliüretan bir tabakadan oluşmaktadır. Su buharı ve gazı geçirirken, bakteri ve suyu geçirmezler. Absorpsiyon kapasiteleri düşüktür. Kesiklerde, sıyrıklarda, kısmi kalınlıktaki yaralarda, dikişli yaralarda ve minimal drenajlı greft donör sahaları gibi yüzeysel yaralarda yaygın olarak kullanılabilir. Maserasyonu (suya maruz kalma nedeniyle yumuşama) önlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat film yara örtüleri enfekte yaralarda, orta ila ağır drenajlı yaralarda veya döküntülü cilde sahip hastalarda kullanılmamalıdır (Han 2016).

III- Köpükler

Köpük yara örtüleri veya pansumanların çoğu 3 katmanlı poliüretan köpüklerden yapılmaktadır. En dış koruma katmanı; oksijen gibi gazların düzenli olarak değiştirilmesine izin veren, bakterilerin giremeyeceği boyutta gözenek boyutuna sahip, hidrofobik özellikte ve eksüdaların (yara yatağında üretilen sıvı) uzaklaştırılmasını sağlayan bir yapıya sahiptir. Aşırı yara eksüdası sadece iyileşme sürecini engellemekle kalmaz, aynı zamanda yara kenarlarının maserasyonuna da yol açar. Orta tabaka bu yara eksüdalarını absorbe etmektedir. Yara ile tems eden iç tabaka ise hidrofildir ve eksüdaların orta tabakaya geçişine izin veren bir yapıya sahiptir. Bahsedilen 3 katmanda işlevsel olarak nemli bir ortam sağlar ve yarayı yapışmadan yarayı bakteriyel istiladan korumakta, daha az ağrılı pansuman değişikliklerine izin vermektedir. Köpük yara örtüleri yaranın ısı ve nem dengesini koruyabilir yapıdadır. Köpük yara örtüleri veya pansumanları bu gibi özelliklerinden dolayı eksüdalı yaralarda evrensel olarak kullanılabilir.

IV- Hidrokolloidler

Hidrokolloidler, yüksek miktarda sıvı tutabilen yapıdaki yara örtüleridir. Yapısında güçlü bir film veya köpük yapışkanlı bir destek tabakası ile jelatin, pektin ve selüloz gibi hidrofilik koloidal parçacıklar bulunmaktadır. Nihai ürün su, gaz ve bakterilere karşı bir bariyer görevi görmektedir. Ayrıca, ısı yalıtımı sağlamaktadır. Hem granüler hem de nekrotik yaralarda güvenle kullanılabilir. Fakat hidrokolloidler genellikle çıkarıldıktan sonra yara yüzeyinde kalıntı bırakmaktadır ve kanamalı yaralarda kullanımı uygun değildir. Bununla birlikte enfekte yaralar için ve bağışıklık yetersizliği olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Bu örtüler sadece cilt bütünlüğü iyi olan hastalarda sızdırmazlık maddeleri ile birlikte kullanılmalıdır.

V- Aljinatlar ve Hidrofiberler

Aljinatlar, kahverengi deniz yosundan ekstrakte edilen ve kalsiyum / sodyum tuzlarına dönüştürülen aljinik asit tuzlarından yapılır. Nemli bir yara ortamı sağlamak için hidrofilik bir jel oluşturmak üzere serum ve yara eksüdatları ile reaksiyona girerler. Oldukça geçirgendir ve bu sebeple ikincil bir pansuman gerektirir. Hidrofiber yara örtüleri aljinatlarla dönüşümlü olarak kullanılır. Aljinatlar ve hidrofiber yara örtüleri ağırlığının 20 katına kadar eksüda emebilir, bu da onları orta ila yüksek drenajlı yaralar için ideal yara örtüleri haline getirmektedir. İleri düzeyde olmamakla birlikte drenaj yaralarında ve enfekte yaralarda kullanılabilirler.

VI- Biyolojik Yara Örtüleri

Biyolojik veya biyosentetik sargılar, cilt veya amniyon gibi doğal dokulardan türetilmektedir. Sentetik malzeme, ksenograft veya allograft içerebilir. Biyolojik sargılar performanslarına göre ve uygulandıkları yere göre farklılık göstermektedir. Genel olarak biyolojik sargılar, fibroblastların ve epitel hücrelerinin yenilenmesine ve yer değiştirmesine elverişli olan ve yarayı enfeksiyon ve sıvı kaybından korumak için bir bariyer görevi gören nemli bir yara ortamı sağlama amacı taşır. Biyolojik yara örtüleri ayrıca iyileşme üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu bildirilen hafif bir inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Ek olarak, biyolojik sargıların doğası gereği tıkaçıcı ve yapışkan özellik göstermesi nedeniyle açık yaralarla ağrıyı önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir. Bazı biyolojik yara örtüleri yaraya vasküler bağlantılarla sıkıca yapışabilirken, biyolojik olmayan yara örtüleri yaraya sadece yapısındaki kıvrımlar dolayısı ile bağlanabilmektedir. Geçen yüzyılın ortalarından bu yana, allograftlar insanlar üzerinde geçici olarak büyük yaraları örtmek için biyolojik pansumanlar olarak kullanılmaktadır. Birçok olumlu özelliğine rağmen biyolojik yara örtülerinin az miktarda ve zor elde edilmesi nedeniyle diğer sargı malzemeleri daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genellikle deriden, ince bağırsak submukozundan, amniyondan, plasentadan veya birden fazla türün fasyasından ekstrakte edilen işlenmiş kollajen veya hyaluronik asit, yara sargısı için temsili ksenojenik biyolojik pansumanlar olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kollajen, hyaluronik asit veya bunların kombinasyonlarının yara yüzeyinde kullanıldığı zaman fibroblast ve keratinositlerin yapışmasını ve migrasyonunu teşvik ederek bir yara iyileşmesini kısalttığı saptanmıştır. Hyaluronik asit, bağ, epitel ve

nöral dokular boyunca insan vücudunda doğal olarak oluşan bir polisakkarittir (Han 2016).

VII- Hidrojel yapılar

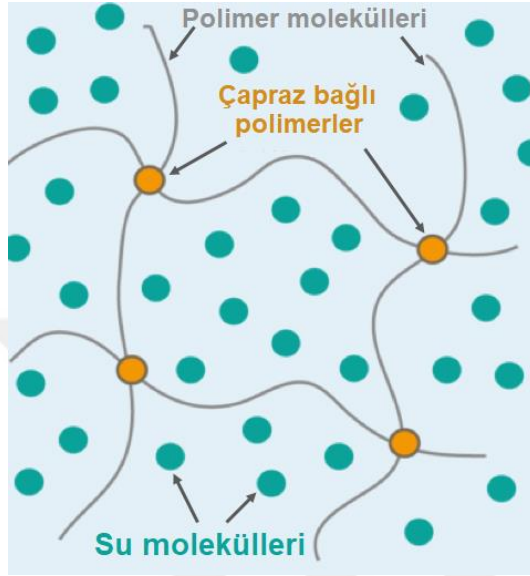
Hidrojeller, sudaki kuru ağırlıklarının binlerce katına kadar sıvı emebilen hidrofilik özellikte polimer ağlardan oluşmaktadır. Polimerik ağın yapısına ve bulunduğu ortamın özelliklerine göre; kimyasallara karşı stabil olabilmekte, bozulabilmekte, parçalanabilmekte veya çözölebilmektedir. Bu polimerik ağlar moleküllerin fiziksel olarak iç içe girmesiyle veya kimyasal bağlar ile oluşturulmuştur, polimerik yapı, moleküler dolaşıklıklar, iyonik etkileşimler, H-bağları ve/veya hidrofobik kuvvetler vb. tarafından bir arada tutulmaktadır. Hidrojeller gaz ve suya karşı geçirgenlik sergilemektedir. Çoğu hidrojin yapışkan olmaması sebebiyle tedavide ikincil bir pansuman kullanılmaktadır. Hidrojeller, minimum veya orta drenaja sahip herhangi bir kalınlıkta yara için kullanılmaktadır. Ağır enfeksiyonlu yaralarda hidrojinlerin kullanımı uygun değildir. (Hoffman 2002). İlerleyen bölümde hidrojinler ile ilgili ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

VIII- Kompozit Yara Örtüleri ve Yardımcı Maddeler

Kompozit veya kombinasyon yara örtüleri, yukarıda belirtilen yara örtülerinin bir birleşiminden oluşan çok katmanlı pansumanlardır. Birincil veya ikincil pansumanlar olarak kullanılabilirler. Çoğu kompozit pansumanın üç katmanı vardır. İç temas tabakası yapışmaz ve yara yatağındaki travmayı önler. Orta tabaka fazla nemi emer ve yaranın iyileşmesi için gerekli olan optimum nem miktarını sağlar. Bu tabaka genellikle bir hidrojel, yarı geçirgen bir köpük, bir hidrokolloid veya bir aljinattan oluşur. Dış tabaka ise yarı geçirgen bir özelliğe sahiptir, mikroorganizmalar için bariyer görevi görürken gaz geçişini sağlar. Kompozit pansumanlar cildin bozulmasını önlemek için cilt üzerinde koruyucu bir tabaka veya kaplama oluştururlar. Yapısındaki sızdırmazlık maddeleri ayrıca daha iyi yapışma sağlamak için cildi de yapışkan hale getirmektedir. Yapısında nem bariyerleri sağlamak amacıyla vazelin, dimetikon ve / veya çinko oksit içeren merhemler veya kremler kullanılmaktadır (Han 2016).

2.2. Hidrojeller

Hidrojeller, vücut dokusuna benzer yüksek oranda su içerebilmesi (şekil 2.9) sebebiyle biyoyoumlu bir malzeme olarak kabul edilen üç boyutlu bir ağdan oluşan, hidrofilik makromoleküler ağlardır ve moleküllerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanması sonucu elde edilmektedir (Tomatsu 2011).



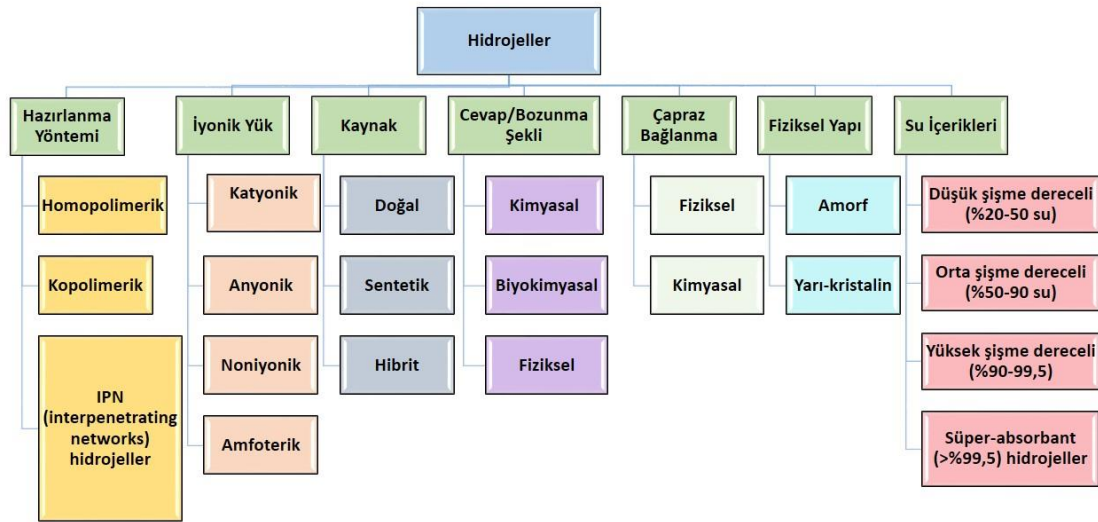
Şekil 2.9. Su moleküllerinin hidrojel yapı içerisinde hapsedilmesi

Hidrojeller, 1960'lı yıllarda Wichterle ve Lim'in çapraz bağlı HEMA hidrojelleri üzerindeki çalışmaları sonucunda büyük ilgi görmüş, eşsiz fiziksel özellikleri ve biyoyoumlu yapıları nedeniyle biyomalzeme alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Wichterle 1960, Hoffman 1972). Bu yapı biyomedikal alanda kontrollü ilaç salınımı alanında, doku mühendisliği için iskele yapımında, yara örtülerinde vb. çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. 1980'de Lim ve Sun, hücrelerin mikrokapsülasyonu için kalsiyum aljinat kullanarak hidrojel yapılar elde etmişlerdir. 1980'lerin sonlarına doğru, Yannas ve arkadaşları, yapay yanık sargıları olarak kullanılmak üzere kollajen ve köpekbalığı kıkırdığı gibi doğal polimerleri sentetik hidrojellere dâhil etmişlerdir. Doğal ve sentetik hidrojellerin birlikte kullanımı farklı fiziksel özelliklere sahip hidrojellerin eldesini mümkün kılmıştır. Günümüzde 'doku mühendisliği' alanında ve çok çeşitli doku ve organların onarımı ve rejenerasyonu amacıyla çok çeşitli hidrojeller tercih edilmektedir (Hoffman 2002).

2.2.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Literatürde hidrojellerin sınıflandırılmasında bazı farklılıklar bulunmasına rağmen şekil 2.10'da hidrojellerin genel sınıflandırılması belirtilmiştir. Hidrojeller hazırlanış yöntemlerine, iyonik yüklerine, doğal ve/veya sentetik olmak üzere kullanılan kaynaklara, dış uyaranlara karşı verdikleri cevap şekillerine, çağraz bağlanma türlerine, fiziksel yapılarına ve su içeriklerine göre ayrılmaktadır. Hazırlanış yöntemine göre; homopolimerik (aynı tip monomerlerin kovalent bağlarla bağlanması sonucunda oluşturdukları polimerik yapı), kopolimerik (farklı yapıdaki monomerlerin birbirlerine

kovalent bağ yapmasıyla oluşturdıkları polimerik yapı) ya da IPN (kovalent bağ yapmadan farklı polimer zincirlerinin iç içe geçmesiyle oluşan yapı) şeklindedir. İyonik yüklerine göre katyonik, anyonik, noniyonik ya da amfoterik olabilir (Varaprasad 2017). Hidrojeller kaynaklarına göre doğal, sentetik veya hibrit (doğal+sentetik) yapıda olabilir. Doğal polimerlere kollajen, fibrinojen, elastin, sentetik polimerlere ise poliglaktik asit, polilaktik asit, polidioksanon, poli-ε-kaprolakton, polivinilpirolidon, polivinil alkol, polietilen glikol örnek olarak verilebilir. Doğal makromoleküller sentetik polimerlere kıyasla nispeten düşük bir mekanik mukavemet göstermektedir (Zahedi 2010). Farklı polimer sistemleri ile bu oranlar optimize edilerek sentetik, doğal veya hibrit hidrojel sistemleri elde edilebilmektedir (Slaughter 2009). Hidrojellerin üç boyutlu yapısı temel olarak moleküllerin birbiri ile çapraz bağlanmaları sonucu inşa edildiğinden dolayı, hidrojeller öncelikle çapraz bağ durumuna göre incelenmektedir (Çizelge 2.1). Hidrojel yapısındaki çapraz bağlanmalar fiziksel ve/veya kimyasal olabilir.



Şekil 2.10. Hidrojellerin genel sınıflandırılması

Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller

Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller veya geri dönüşümlü jeller, üretim kolaylıkları ve sentez protokolleri sırasında çapraz bağlama ajanları kullanmama avantajları nedeniyle önem kazanmıştır. Fiziksel olarak çapraz bağlı jellerin çözünmesi, farklı polimer zincirleri arasında bulunan fiziksel etkileşimlerle önlenmektedir (Slaughter 2009). Hidrokolloid tipinin seçimi konsantrasyona ve pH'a bağlıdır, çok çeşitli jel dokularının oluşumuna yol açabilir ve şu anda gıda, farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda önemli ölçüde dikkat çeken bir alandır, çünkü çapraz bağlama maddelerinin kullanımı genellikle önlenir (Chung 2009). Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller elde etmek için literatürde donma-çözülme, stereocomplex oluşumu, iyonik etkileşim, H-bağları ile etkileşim, olgunlaştırma vb. yöntemler bulunmaktadır (Varaprasad 2017).

I. Donma çözülme

Fiziksel çapraz bağlama tekrarlayan dondurma-çözdürme döngüleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu mekanizma, donma ve çözülme nedeniyle yapıda mikrokristallerin oluşumunu içermektedir. Donma-çözülme ile hazırlanan poli (vinil alkol) (PVA) hidrojenleri popüler bir örnektir. Bu hidrojenler hidrojen bağı ile birbirine bağlanır, diğer yöntemlerle üretilen PVA hidrojenlerinden daha gözenekli, süngerimsi, lastik ve daha yüksek elastik özellikler sergiler. Günümüzde, bu jel matrisler biyoteknoloji alanlarında, özellikle bileşiklerde (protein, peptitler) ve tüm hücre immobilizasyonunda yaygın olarak uygulanmaktadır.

Çizelge 2.1. Çeşitli kimyasal ve fiziksel çapraz bağı yapıda olan hidrojenlere ve uygulandığı yerlere örnekler (Varaprasad 2017)

Çapraz Bağlanma	Yöntem		Polimer	Uygulandığı Yer
Fiziksel	Dondurma Kurutma		Polivinil alkol (PVA) PVA/kitosan, PVA/nişasta, PVA/jelatin	Terapötik uygulamalar, Doku mühendisliği
	Stereo kompleks		Dekstran, polilaktik asit (PLA), Polietilen glikol	İlaç salınımları, Biomedikal ve farmakolojik alanlarda
	İyonik etkileşimler		Selüloz mikrofibriller, kitosan	İlaç salınımı, Antijen salınımı
	H-Bağı		Hiyalüronik asit, Siklodekstrin, polipseudorotaksan	İlaç salınımı, Biomedikal uygulamalar
	Olgunlaştırma		Aljinat kapsülleri, Hiyalüronik asit	Kıkırdak dokusu, Yumuşak doku mühendisliği, hücre iskelesi, rejeneratif tıp ve kıkırdak onarımı
Kimyasal	Kimyasal çapraz bağlama		Peynir altı suyu proteini, Polietilen glikol (PEG)	- Biyomedikal
	Aşılama	Kimyasal	Kitosan-selüloz, Poli (ε-kaprolakton), Polietilen glikol	Tarım uygulamaları Doku mühendisliği
		Radyasyon (ışınlandırma)	Karboksimetil selüloz, stiren, sülfonat, N-Vinilkaprolaktam, Kitosan	Su saflaştırma
	Radikal polimerizasyon		Kolliphor, Polietilen glikol metakrilat (PEGMA)	İlaç salınımı
	Yoğuşma reaksiyonu		B-siklodekstrin, Selüloz nanofiber	Kontrollü salınım
	Enzimatik reaksiyon		Poli (etilen glikol) metakrilat, kitosan	Bio kataliz ve doku mühendisliği, Yara örtüleri
	Yüksek enerjili radyasyon (ışınlandırma)		Polioligo(propilen glikol) metakrilat Poli (vinil metil eter)	Biomedikal uygulamalar

II. Stereo kompleks oluşumu

Son yıllarda stereo kompleks oluşumuna dayanan ilaç taşıyıcı sistemler için hidrojel üretilmiştir. Bu sistemin en büyük avantajı, her ürünün su içinde çözülmesi ve çözeltinin karıştırılması yoluyla bir hidrojinin kolaylıkla oluşturulabilmesidir. İyi stereo kompleks özellikleri gösteren en iyi örneklerden biri PLA'dır. PLA'nın stereo kompleksler oluşturma kabiliyeti ilk olarak Tsuji ve ark. (Tsuji 1995, Tsuji 2005). Bununla birlikte, stereo kompleksleşmenin önemli bir sınırlaması, kullanılabilecek nispeten sınırlı polimer bileşimleridir.

III. İyonik etkileşim

Karşı iyonların etkisiyle çapraz bağlanan iyonik polimerler hidrojel sistemi oluşturur. Bu yöntem, çok değerli karşıt yük iyonları ile bir polielektrolit çözeltisinin jelleştirilmesi ilkesinin temelini oluşturmaktadır. Bu kategoriye ait hidrojelere örnek olarak; kitosan-gliserol fosfat tuzu ve poli- [di (karboksilatofenoksi) fosfazen] kalsiyum tuzu verilebilir.

IV. H-bağı

Moleküller arası hidrojen bağlarının oluşması ile yapı şekillenir. Bu tür hidrojelere en iyi örnek, CMC'yi 0.1 M HCl içinde dağıtarak hidrojen bağlı CMC (karboksimetil selüloz) ağının oluşturulmasıdır.

V. Olgunlaştırma (maserasyon)

Olgunlaşma, hassas bir şekilde yapılandırılmış moleküler boyutlara sahip hidrojel oluşumu ile sonuçlanan ısı kaynaklı bir toplama işlemidir. Bu hidrojel sistemine en iyi örnek, arap zambının ısı kaynaklı jelasyonudur. Bu durum, arap zambkı içinde mevcut olan ve ısı ile indüklenen proteinli bileşenlerin birikmesi nedeniyle gözlenir. Oluşan agregasyon nedeniyle, daha sonra mekanik özellikleri ve su bağlama kapasitesi ile bir hidrojel oluşturan moleküler ağırlıkta bir artış meydana gelir (Varaprasad 2017).

Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojel

Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojellerde, farklı polimer zincirleri arasında kovalent bağların bulunması sebebiyle oldukça kararlıdır. Bu yapıdaki hidrojellerde kovalent çapraz bağlantı noktaları ayrılmadığı sürece hiçbir çözücü içinde çözülemezler (Chung 2009). Çapraz bağlı bir hidrojinin özellikleri; jelasyon süresine, jelin gözenek boyutuna, moleküllerin yapısına, zincir uzunluğuna, fonksiyonel gruplarına vb. bağlıdır (Slaughter 2009). Fiziksel olarak bağlanmaya kıyasla kimyasal çapraz bağlama, yapının içinde yüksek mekanik mukavemete sahip bir ağ oluşturmaktadır ve yapı taşlarındaki kimyasal bağların türüne ve çapraz bağlantıların yoğunluğuna bağlı olarak, nispeten daha uzun ömürlüdür. Literatürde kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojel elde etmek için bildirilen çeşitli yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

I. Kimyasal çapraz bağlama

Kimyasal çapraz bağlı hidrojellerde, glutaraldehit, epiklorohidrin, adipik asit dihidrazid ve çeşitli polialdehitler çapraz bağlayıcı olarak, çeşitli sentetik ve doğal polimerlerin çapraz bağlı hidrojel ağlarını elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimer zincirleri arasındaki kovalent bağlantılar, amin gruplu bileşikler ile karboksilik asitlerin, izosiyanatlar ile hidroksil (OH), amin grubu (NH₂) veya Schiff bazı (R₂C=NR' (R' ≠ H) genel yapısına sahiptir) bulunduran bileşiklerin reaksiyonu ile oluşturulabilmektedir (Hennink 2002). Örnek bir çalışmada ksantan ve PVA bazlı hidrojel kompozitler epiklorohidrin ile çapraz bağlanmıştır (Alupeu 2002).

II. Aşılama

Aşılama dayalı hidrojellerin hazırlanması, bir monomerin önceden oluşturulmuş bir polimerin omurgası üzerinde polimerizasyonunu içermektedir. Aktivasyon başlatıcı tipine bağlı olarak aşılama, kimyasal aşılama veya radyasyon aşılama olarak ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal aşılama, makromoleküler omurgalar kimyasal bir reaktifin reaksiyonu ile aktive edilmektedir. Radyasyon aşılama ise Gama ve elektron demeti gibi yüksek enerjili radyasyon kullanılarak reaksiyon başlatılmaktadır. Sulu çözeltide karboksimetilselülozun (CMC) akrilik asitle aşılama, sulu çözelti içinde radyasyon aşılama için bir örnektir. Elektron ışını, CMC'nin omurgasında akrilik asidin serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak için kullanılmaktadır.

III. Radikal polimerizasyon

Kimyasal olarak çapraz bağlı jeller ayrıca, radikal polimerizasyon yoluyla bir çapraz bağlama maddesi varlığında düşük moleküler ağırlıklı monomerlerden de elde edilebilir. Bu, hidrojellerin hazırlanması için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem oldukça verimli ve hızlıdır. Radikal polimerizasyonu başlatan serbest radikallere; amonyum persülfat (APS) veya potasyum persülfat (KPS) örnek verilebilir.

IV. Yoğuşma reaksiyonu

Genel olarak, karboksilik asit grubu ile hidroksil veya amin gruplarını veya bunların türevlerini içeren yapılar bu hidrojellerin eldesinde kullanılmaktadır. Bu yoğunlaşma reaksiyonlarının en iyi örneği De Nooy ve çalışma arkadaşlarının yoğunlaşma reaksiyonları (Passerini ve ugi yoğunlaşması isimli) yoluyla elde ettiği hidrojellerdir (Nooy 1999, Nooy 1920). Geliştirdikleri Passerini yöntem ile çapraz bağlarında ester bağları olan hidrojeller oluşturulmuştur. Bu tipik işlemde, bir karboksilik asit ve karbonil bileşiği (aldehid veya keton), a- (akriloksi) amit verecek şekilde bir izosiyanit ile yoğunlaştırılır. Ugi yoğunlaştırma prosedüründe ise bu reaksiyon karışımına amin eklenir ve sonucunda a- (akrilamino) amid elde edilir. Bu tip hidrojel, genellikle çapraz bağlarında amid bağları içerir.

V. Enzimatik reaksiyon

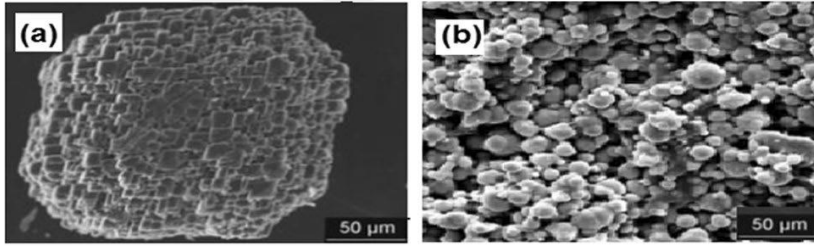
Enzimatik reaksiyona dayanan yeni bir hidrojel konsepti hidrojeller oluşturabilir. İlk kez Sperinde ve çalışma arkadaşları, PEG bazlı hidrojelleri sentezlemek için bir enzim

kullanmışlardır. Çalışmalarında bir tetrahidroksi PEG, glutaminil grupları (PEG-Qa) ile işlevselleştirilmiştir. Sonrasında PEG ağları ve poli (lizin-fenilalanin) sulu çözeltilerine transglutaminaz ilave edilerek PEG ağları oluşturulmuştur (Sperinde 1997).

VI. Yüksek enerjili radyasyon (ışınlandırma)

Doymamış bileşikler, gama (γ) veya elektron ışını radyasyonları gibi yüksek enerjili radyasyon kullanılarak polimerize edilebilir. Suda çözünür polimerler, gama veya elektron ışını radyasyonuna maruz kaldığında, vinil grupları tarafından türevlenerek polimer zincirleri üzerinde radikaller oluşturmaktadır. Ayrıca, yüksek enerjili radyasyon su moleküllerinin polimerik zincirlere saldırabilecek hidroksil grupları oluşturmalarını kolaylaştırır, bu da mikroradikal oluşumuna neden olur. Bu mikroradikallerin farklı zincirler üzerinde rekombinasyonu, çapraz bağlı bir yapı ile sonuçlanan kovalent bağların oluşumuna yol açar. Bu yöntemin avantajı, işlemin su altında yapılabilmesidir (Zhao 2003).

Hidrojellerin fiziksel yapısına bakıldığında ise amorf veya yarı-kristalin yapıda olduğu görülmektedir (şekil 2.11). Amorf hidrojellerde moleküler düzeyde herhangi bir düzen bulunmamaktadır. Sentetik hidrojeller genellikle amorf yapıdadır. Yarı-kristalin hidrojeller ise yapılarında moleküler ölçekte düzenli kısımlar içermektedir. İlk olarak 1994 yılında geliştirilmiştir ve orta derecede suda şişen yapıdadırlar (Okay 2018).

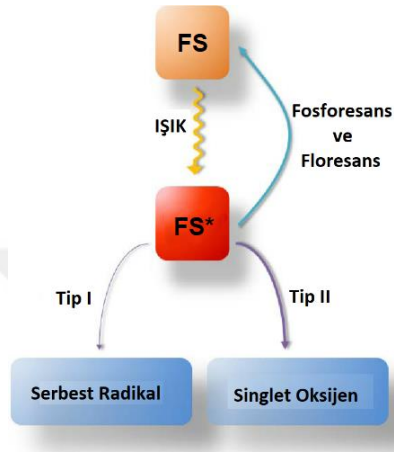


Şekil 2.11. a) amorf hidrojel; b) yarı-kristal hidrojel

Bir hidrojin en önemli özelliği, kuru ağırlığının yüzlerce katına ulaşabilen büyük miktarlarda sulu çözeltileri absorblama yeteneğidir. Bu durum hidrojellerin şişme davranışı olarak bilinir. Hidrojeli oluşturan polimer sistemin fonksiyonel gruplarının yapısına göre; ozmotik basınçtan, konsantrasyon farkından, iyon türünden, çözücünün pH'ından vb. etkilenecek hidrojin yapısına absorbe edilen su miktarı değişebilir (Kamoun 2017). Çoğunlukla, hidrojellerin şişme özelliği; suyu absorbe etmiş hidrojel ağırlığı ile kuru hidrojel ağırlıkları arasındaki bir oran olan su tutma kapasitesiyle ifade edilmektedir. Su tutma kapasitesini etkileyen dinamikler temel olarak kimyasal yapıya ek olarak çapraz bağlama oranını, çözücü konsantrasyonunu ve çözücünün yapısını içermektedir (El-Sayed 2011). Düşük şişme dereceli hidrojeller %20-50, orta şişme dereceli hidrojeller %50-90, yüksek şişme dereceli hidrojeller %90-99,5, süper absorbant hidrojeller ise %99,5 ve üstü su absorbe edebilen hidrojellerdir.

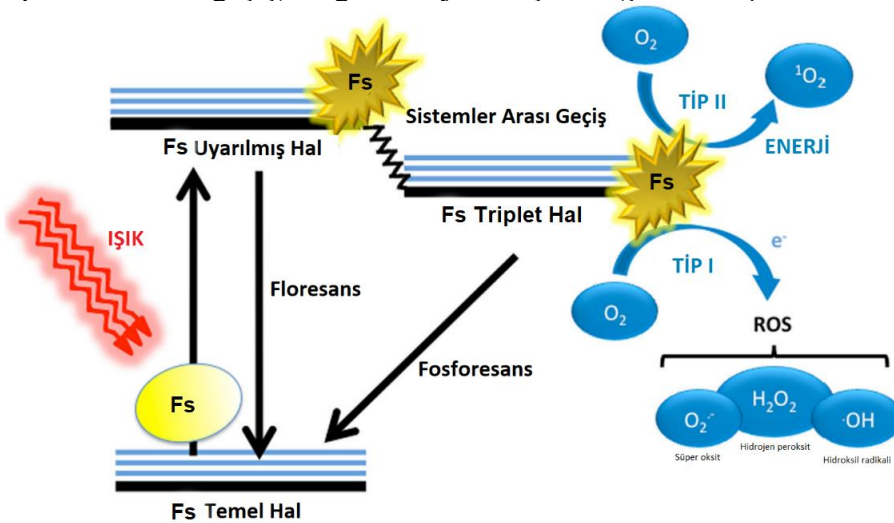
2.3. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi (FDT), uzun zamandır dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji dahil olmak üzere bir çok tıp alanında tercih edilmektedir (Parekh 1999). Fotosensitizör boyar maddede bulunan kromofor gruplar spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kalmasıyla hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi yapılar üretmektedir (Baltazar 2015). Şekil 2.12’de bu durum sembolize edilmiştir.



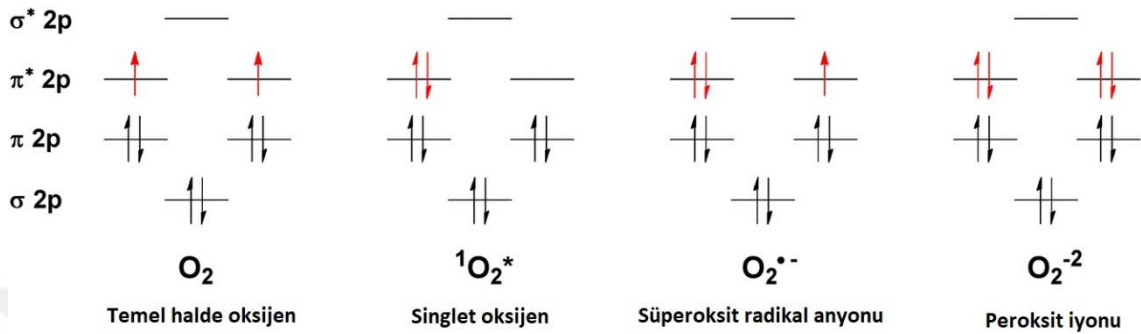
Şekil 2.12. Fotosensitizör boyar maddenin (FS) ışık ile uyarılması (FS* = uyarılmış hal)

Işık ile uyarılma sonucunda gerçekleşen enerji geçişlerinden bahsedecek olursak; uygun dalga boyundaki ışığı absorbe eden fotosensitizör boyar madde (FS) uyarılarak enerji seviyesi yükselir (FS*). Ardından moleküler elektron seviyelerindeki geçişler sonucunda uyarılmış olan tekil FS*, FS*-Triplet haline geçer (T1). T1 halinden ya direkt (Tip I elektron/hidrojen transferi) süper oksit, hidrojen peroksit ve/veya hidroksi radikali oluşturarak serbest radikalleri oluşturur ya da enerjisini oksijen molekülüne aktararak (Tip II elektronik geçiş) singlet oksijen oluşturur (şekil 2.13).



Şekil 2.13. Belirli dalga boyunda ışık ile uyarılan FS'nin mekanizması (Maisch 2007)

Tip I mekanizmasında, fotosensitizör özellikteki molekülden ve substrat molekülünden elektron/hidrojen transferleri, redoks reaksiyonları oluşarak serbest radikaller açığa çıkar. Bu radikaller ortamda bulunan oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Tip II mekanizmasında ise T1 enerjisini moleküler oksijene aktararak singlet oksijen türünü oluşturmaktadır (Parekh 1999, Land 2003). Şekil 2.14'te uyarılmalar sonucu oluşan yapıların moleküler orbitalleri gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Temel haldeki oksijenin uyarılması sonucu oluşan yapılar

Tip II mekanizmasının hücresel mekanizmaları etkileyerek fotooksidatif mikrobiyal hasara yol açtığı bilinmektedir (Redmond 1999). Çoğu durumda, FDT ağırlıklı olarak tip II mekanizmasıyla ilerlemektedir. Bu süreç sonucu oluşan singlet oksijenin kısa yarılanma ömrü nedeniyle çevredeki diğer dokuların hasara uğraması zordur. FDT sonucunda hücreler ya programlı hücre ölümü (apoptozis) ya da istenmeyen hücre ölümü (nekroz) mekanizmaları ile tahribata uğrar. Hücre içi organelleri olan mitokondri, lizozom, sitoplazmik membran ve DNA FDT için olası hedeflerdendir. Mitokondri tarafından absorbe edilen FS'lerin apoptozis yolu (bir seri enzim aktivasyonları sonucunda) ile, sitoplazmik membran tarafından absorbe edilen FS'lerin ise nekroz yolu ile hücrenin ölmesine neden olduğu düşünülmektedir (Konopka 2007, Wainwright 1998).

Hedef hücrenin yapısına göre FDT'nin tahribat mekanizması ve vereceği hasar değişmektedir. Örneğin bakterilerde FDT'nin etkisi, hücrenin gram negatif ve gram pozitif olmalarına göre (FS'lerin hücre tarafından absorbe edilme şekli ve miktarı farklıdır) değişiklik göstermektedir. gram-pozitif bakterin hücre duvarında kalın fakat gözenekli peptidoglikan tabakası bulunmaktadır. Bu yapı anyonik ve nötr FS'lere karşı oldukça duyarlıdır. Gram-negatif bakteriler ise çok ince bir peptidoglikan tabakasının oluşu ve lipopolisakkarit adı verilen ekstra bir dış zara sahip oluşları nedeniyle FS'leri çok daha az bir oranda absorbe ederler. Fakat absorpsiyon miktarında FS'nin yapısı da önemlidir. Katyonik fenotiyazinyum, ftalosiyanın ve porfirin türevlerinin hem gram-pozitif hem de gram-negatif türlerde önemli ölçüde fototoksit olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda, yüksek konsantrasyonda negatif yüklü veya nötr FS'lerin katyonik FS'lerden daha etkili olduğu görülmüştür. Bakteriler tarafından bol miktarda absorbe edilmesine rağmen, çoğu FS maddenin hücre zarına ve zar bileşenlerine yakın olarak hücre dışı olarak biriktiği bilinmektedir.

FS'nin uyarılması sonucu eş zamanlı oluşan tip I veya tip II mekanizmalarının antimikrobiyal etkisi karşılaştırıldığında; gram-negatif türlerin $\cdot\text{OH}$ radikali, $^1\text{O}_2$ 'den daha duyarlı olduğunu saptanmıştır. Genel olarak gram-negatif türler tip I mekanizması sonucu oluşan radikallere karşı oldukça hassastır. FDT yeni keşfedildiğinde doğal formlardaki birçok FS'nin sadece gram-positif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesine rağmen ilerleyen çalışmalarda FS yapılarına fonksiyonel grupların eklenmesi ile (örneğin katyonik fonksiyonel grupların eklenmesi) gram-negatif bakteri türlerine karşı etkinliği artırılmıştır (Liu 2015).

2.3.1. Fotosensitizör maddeler

Fotodinamik terapinin fotosensitizör, ışık ve oksijen olmak üzere üç önemli bileşeni vardır. Fotosensitizör boyalar, ışığı belirli bir dalga boyunda absorbe edebilen, fotokimyasal veya fotofiziksel reaksiyonları tetikleyebilen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Agostinis 2011). Fotosensitizör bir maddenin sahip olması gereken bir dizi özellik ve koşul aşağıdaki şekildedir;

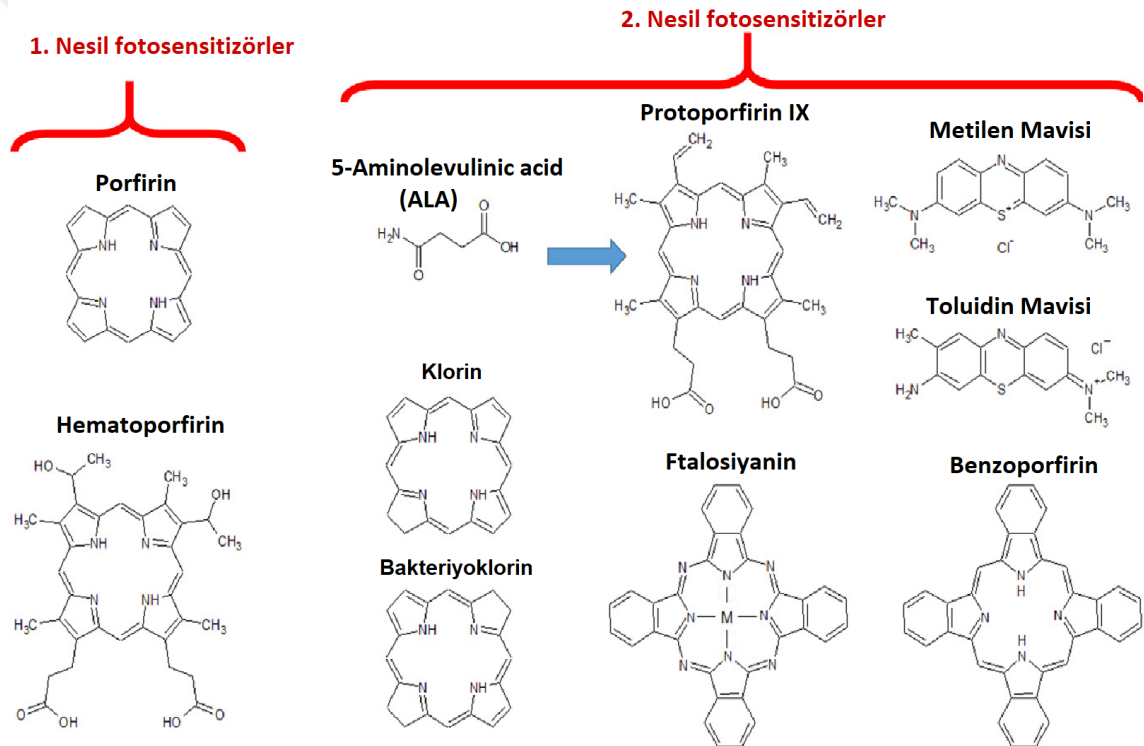
- Yüksek saflık derecesine sahip olmalı,
- Oda sıcaklığında stabil olmalı,
- Sadece belirli dalga boylarında absorpsiyon yapmalı,
- Yüksek fotokimyasal reaktiviteye sahip olmalı (ışığın maksimum absorpsiyonu 600 nm ila 800 nm dalga boylarında (kırmızı bölge) olmalıdır ($\epsilon_{\text{maks}} \sim 50.000\text{--}100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 800 nm'nin üzerindeki bir dalga boyundaki ışığın absorbe edilmesi, tekli durumunda oksijeni uyarmak ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretilmesi için yeterli enerji sağlamaz.)
- Minimum absorpsiyon 400-600 nm aralığında olmalı (bu özellik güneş ışığından kaynaklanan olası ışığa hassasiyeti önlemektedir.
- Absorpsiyon bantları, vücuttaki diğer fotoaktif pigmentler olan melatonin, hemoglobin veya oksihemoglobin vb. maddelerin absorpsiyon bandıyla örtüşmemeli,
- Yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmalı (Φ_Δ),
- Karanlıkta minimal sitotoksikite göstermeli,
- Vücut dokularında kolay çözülmeli,
- Neoplastik dokular için yüksek seçicilik: Fotosensitizör, orada en az birkaç saat kalan etkilenen bölgelerden yavaşça çıkarılmalı, ancak sağlıklı dokulardan hızla uzaklaştırılmalı, böylece tedavinin fototoksik yan etkileri en aza indirilmeli,
- Ucuz ve basit sentez ve kolay bulunabilirlik özelliklerine sahip olmalı (Kwiatkowski 2018).

2.3.1.1. Birinci nesil fotosensitizörler

Oscar Raab isimli Münih'ten bir tıp öğrencisi akrinin boyaları ile yapılan deneyler sırasında boyalarla tedavi edilen ve daha sonra ışınlanan protozoalarda floresan oluştuğunu fark etti. Gözlemleri sırasında bu olgunun oksijen tüketiminin arttırdığını ve protozoanın ölümüne yol açan toksik etkiyi tetiklediğini saptadı. Raab gözlemlerini 1904 yılında bu durumu "fotodinamik etki" olarak tanımlayan ve tanımlayan Profesör Von Tappeiner'a sundu (Allison 2010). 1905 yılında %5 eozin çözeltisi kullanılarak cilt

kanseri tedavisinin ilk etkili denemesi gerçekleştirildi. Ancak bu tedavi şekli daha geniş bir kitleye ulaşamadan onlarca yıl unutulmuştur (Taub 2004). Fotosensitizörler tedaviye 1970'lerde ilk kez Dr. Thomas Dougherty ve meslektaşları tarafından ticari ölçekte tanıtılmıştır (Gold 2011). Bu ekip "Hematoporfirin türevi" (HpD) adı verilen suda çözünür bir porfirin karışımını test etmiştir (şekil 2.15). Bunun için FS-hematoporfirin (Hp) olarak kullanılan ilk porfirini saflaştırarak, HpD eldesi için yapıya fonksiyonel gruplar eklemiştir. HpD, Hp ile karşılaştırıldığında, tümörlü dokular için daha seçici ve daha az ışık yoğunluğunda

yüksek potansiyel gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra, HpD'den izole edilen porfirin dimerleri ve oligomerlerin bir karışımı, "Photofrin" ticari ismi altında üretilmiştir. Günümüzde sodyum porfimer olarak da bilinen Photofrin, en sık kullanılan FS maddeler arasındadır (Abrahamse 2016). Sodyum porfimerin geniş uygulamalara rağmen, düşük kimyasal saflıkta olması, nispeten kısa dalga boyunda maksimum absorptans yapması (630nm), zayıf doku penetrasyonu, dokulardaki birikimi, uzun çok yarılanma ömrü nedenleriyle yeni FS maddelerinin arayışı devam etmiştir (Kwiatkowski 2018).



Şekil 2.15. 1. ve 2. nesil fotosensitizörler yapılarına örnekler

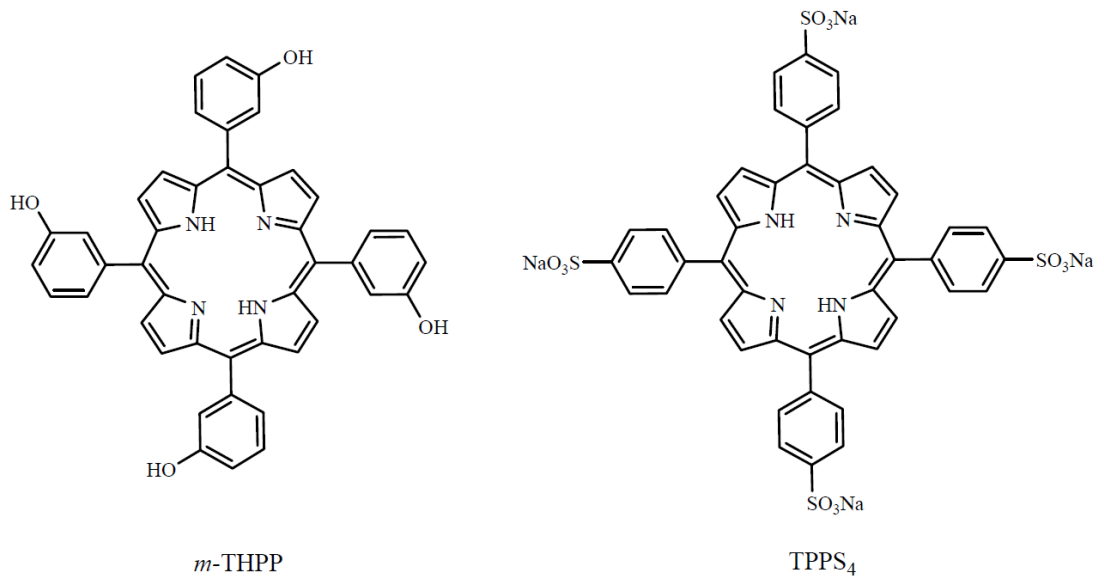
2.3.1.2. İkinci nesil fotosensitizörler

İkinci nesil fotosensitizörler üzerine 1980'li yıllarda çalışmaya başlanmıştır. İkinci kuşak fotosensitizörler grubu içerisinde; porfirin, hemaporfirin, benzoporfirin ve tiyopürin türevleri, 5-aminolevulinik asit, texaphyrinler, klorin ve ayrıca bakteriyoklorin analogları ve ftalosiyeninler vb. bulunmaktadır (Yoon 2013). Şekil 2.15'te 2. Nesil fotosensitizörlere ait bazı örnekler verilmiştir.

İkinci nesil fotosensitizörler, 650-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans yapmaları, daha yüksek bir kimyasal saflığa sahip olabilmeleri, daha yüksek quatum verimli singlet oksijen oluşturmaları ve dokulara daha iyi nüfuz edebilmeleri nedeniyle birçok alanda kullanılmaktadır. Ek olarak, dokular için daha yüksek bir seçicilik gösterirken, fotosensitizörün yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle toksik etkileri daha azdır (Kwiatkowski 2018).

A. Porfirin Türevleri

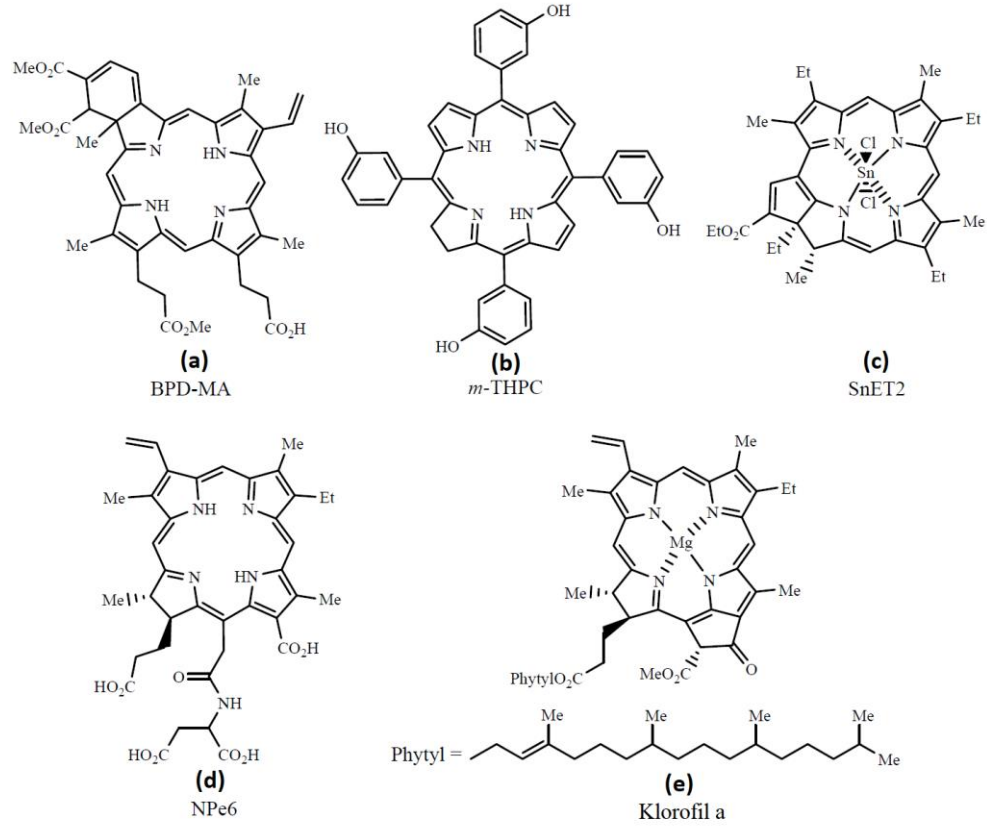
Porfirin yapısına çeşitli gruplar eklenerek, meta-tetra (hidroksifenil) porfirin (*m*-THPP), 5,10,15,20-tetra (hidroksifenil) porfirin ve 5,10,15,20-tetrakis(4-sülfanatofenil'in meta izomeri)-21H,23H-porfirin (TPPS₄) adında ikinci nesil fotosensitizörler elde edilmiştir (şekil 2.16). Elde edilen *m*-THPP, 648 nm'de ışınlandığında tümör fotonekrozunda HpD'den 25 ila 30 kat daha güçlü olduğu keşvedilmiştir (Bonnnett 1995). TPPS₄, daha az sülfonat grubu içeren mezo-ikameli porfirinlere göre daha düşük fotokimyasal etkinlik göstermiştir. TPPS₄'ün 645 nm'de bir argon lambası ile ışınlandırılarak bazal hücreli karsinomu tedavi etmek için kullanılmıştır (Santoro 1990).



Şekil 2.16. Porfin türevi olan ikinci nesil *m*-THPP ve TPPS₄ yapısı

Klorinler

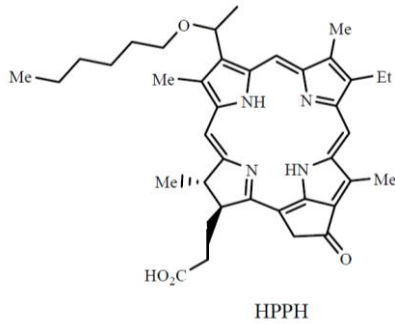
Klorinler, porfirinlerden türetilmiş, ancak bir pirol halkasında azaltılmış bir çift bağa sahip tetrapirel bileşikleridir. Çift bağdaki bu azalma (hidrojen sayısındaki artış), absorpsiyon bandını kırmızıya (650-690 nm) kaydırır ve fotosensitizörü daha güçlü hale getirmektedir ($\epsilon_{\text{maks}} \sim 40,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Şekil 2.17'de klorin yapısına sahip fotosensitizörlere ait örnekler yer almaktadır (N-aspartil klorin e6 (NPe6), klorofil a pigmentinden türetilen bir fotosensitizör maddedir).



Şekil 2.17. a) Benzoporfirin türevi monoasit halka A (BPD-MA, Verteporfin, Visudyne®); b) 5,10,15,20-Tetrakis(m-hidroksifenil)klorin (*m*-THPC, Temoporfin); c) kalay etil etiopurpurin (SnET₂, Rostaporfin, Purlytin™); d) N-aspartil klorin e6 (NPe6, Talaporfin, Ls11); e) klorofil a

Feoforbitler

Feoforbitler bir pirol biriminde iki ekstra hidrojene sahiptir ve bu bileşikler klorofilden türetilmektedir. Feoforbit sınıfından olan 2-(1-heksiloksietil)-2-devinil pirofeoforbit (HPPH, Photochlor®) ve 665 nm'de $\epsilon_{\text{maks}} \sim 47.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile absorbasyon yapmaktadır. HPPH (şekil 2.18) klinik çalışmalarda kullanım için onaylanmıştır ve bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilmektedir (Ormond 2013).



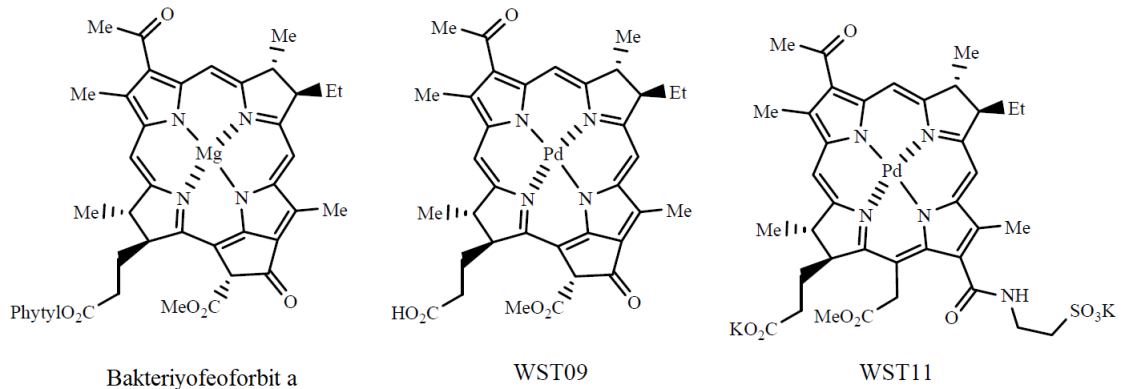
Şekil 2.18. 2-(1-heksiloksietil)-2-devinil pirofeoforbit (HPPH) yapısı

5-aminolevulinik asit (ALA)

ALA kendisi doğrudan ışığa duyarlı olmayan bir maddedir. Deriden emilerek kanda hemoglobin biyosentez yoluna girerek asıl ışığa duyarlandırıcı etkiyi gösteren Protoporfirin IX (PPIX)'a dönüşmektedir. Bu nedenle, ALA veya esterleri birçok klinik uygulamada topikal veya oral olarak kullanılmaktadır (Yoon 2013, Moriwaki 2018).

Bakteriyofeoforbitler

Bakteriyofeoforbitler, bakteriyoklorinlere benzer, ancak yapılarındaki porfirinlerde dört tane daha fazla hidrojen vardır. Genel olarak, bu fotosensitizörlerin λ_{max} 'ı $40_{max} \sim 50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir ve absorbansı 740-800 nm kırmızıya kaymıştır. Bakteriyofeoforbit sınıfında olan WST09 (padoporfirin, Tookad®), bakterilerden izole edilen bakteriyoklorofil a'dan türetilmektedir. WST09 763 nm'de aktive olmaktadır ve cilt yüzeyinde düşük birikim yapar, hızlı metabolize olur. Bu boya duyarlılaştırıcı prostat kanserinin tedavisi için değerlendirilmiştir. Cilt yüzeyinde Photofrin®'den daha derin dokuya penetre olması ve cildin ışığa duyarlılığını minimuma indirmesi bu ilacı bugüne kadar klinik olarak kullanılan diğer ışığa duyarlılaştırıcılardan daha üstün kılmaktadır. Suda çözünür bir WST09 türevi WST11'dir (Stakel®) ve Steba Biotech tarafından üretilmektedir (Brun 2004). Bakteriyofeoforbit grubuna ait bazı fotosensitizörler şekil 2.19'da gösterilmiştir.

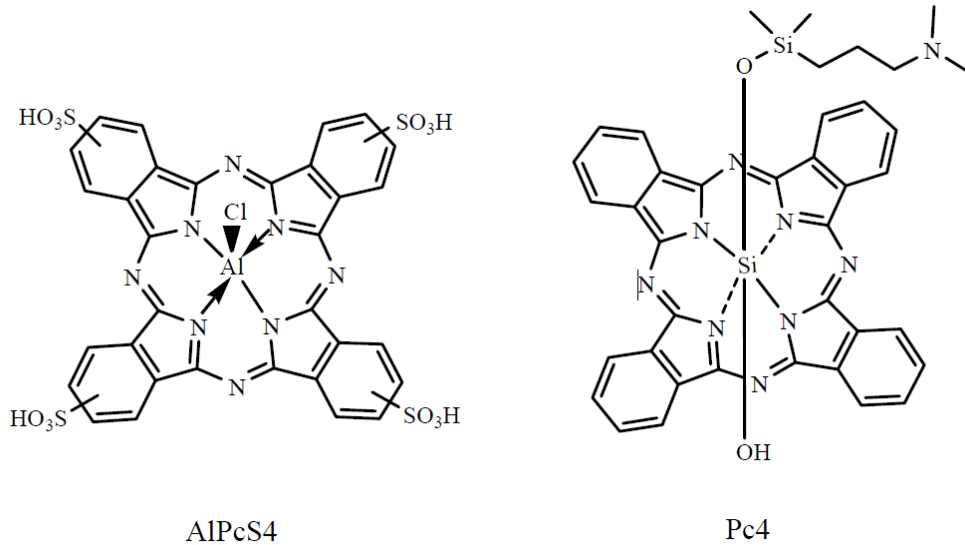


2.19. Bakteriyofeoforbit grubuna ait fotosensitizörlerden bazıları

Ftalosiyaninler

Ftalosiyaninlerin yapılarında fotosensitizör özellik göstermeleri için koordineli bir merkezi metal atomu bulunmaktadır. Geçiş metalleri sistemler arası elektronik geçişlerin gerçekleşmesine izin vererek tekli oksijen üretim verimini ve ışığa duyarlılaştırıcının ömrünü etkiler (Tynga ve diğerleri, 2013). Maksimum absorbans değerleri 670–700 nm'de, $\epsilon_{maks} \sim 200.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Bu sentetik boyalar üzerindeki dört ilave fenil grubu nedeniyle genellikle suda az çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü arttırmak için periferel bağlı sülfonik asit gruplarıyla veya katyonik gruplarla ftalosiyaninlerin sentezlenmesi yollarına gidilmiştir (Fingar ve diğerleri, 1993).

Ftalosiyeninler, dokulara derinlemesine penetre olabilir, bu sebeple çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Spesifik bir ftalosiyenin türevi olan alüminyum ftalosiyenin tetrasülfonat (AlPcS₄) 676 nm'de $\lambda_{\max}$ 'a değerine sahiptir (şekil 2.19). Fotosensetizör olarak AlPcS₄, Rusya'da mide, cilt, dudak, ağız ve meme kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır. Yine ftalosiyenin grubundan metal atomu olarak silikon barındıran silikon ftalosiyenin 4 (Pc4) ise, 675 nm'de absorbens yapan bir bileşiktir ve Bowen hastalığı, cilt kanseri gibi hastalıkların tedavisinde denenmiştir (şekil 2.20) (Ormond 2013).



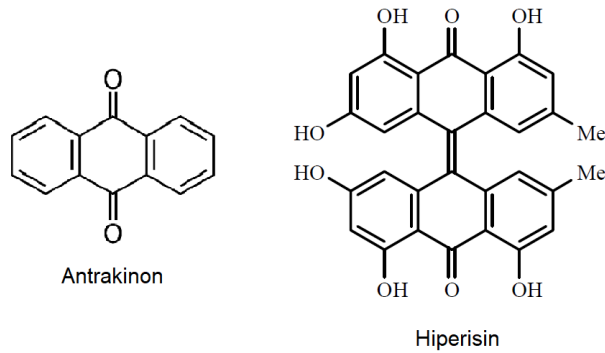
Şekil 2.20. Ftalosiyenin grubundaki fotosensetizörlere örnek

B. Porfirin yapısı içermeyen fotosensetizörler

Fotosensetizörlerin çoğunluğu porfirin yapısında olmasına rağmen, porfirin yapıda olmayan ve fotodinamik aktivite gösteren birçok bileşik bulunmaktadır. Antrakinin, fenotiyazin, ksanten, siyanin ve kurcuminoid yapıları bu özellikteki gruplardır.

Antrakininonlar

Antrakininon C₁₄H₈O₂ formülüne sahip aromatik yapıda bir bileşiktir (Şekil 2.20). Antrakininon bileşiği birçok boyanın temel yapı taşı oluşturmaktadır. Doğada birçok bitkide, mantarlarda, likenlerde ve bazı böceklerde antrakininonun türevi pigmentler bulunmaktadır. Fotosensetizör özelliğe sahip olan ve antrakininonlar grubunda yer alan hiperisin, kanser hücrelerini hedefleyen ROS üretmesiyle bilinmektedir. Hiperisin 590 nm'de $\epsilon_{\max} \sim 44,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ absorbens yapmaktadır. Şekil 2.21'de hiperisin bileşiği gösterilmiştir (Sanovic 2009).

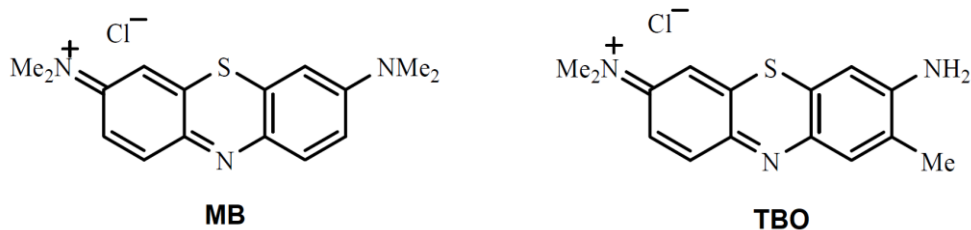


Şekil 2.21. Antrakinon ve bir antrakinon türevi olan hiperisin yapısı

Fenotiazinler

Fenotiazin, bir sülfür atomu ile bir azot atomunun iki benzen halkasını bağlamasıyla oluşan organik bir trisiklik aromatik bileşiktir. Metilen mavisi (MB), toluidin mavisi (TBO) fenotiazinyum ailesine ait katyonik yapıda bileşiklerdir (şekil 2.22). MB ve TBO diğer fotosensetizörler gibi patojenlere karşı etkilidir hatta ilk çalışmalarda virüslere ve bakteriler karşı oldukça etkili olduğu belirtilmiştir (Schultz 1928, Clifton 1930). Sonraki çalışmalarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde de kullanılmıştır. Ayrıca MB ve TBO üzerine özellikle antifungal aktiviteleri açısından umut verici sonuçları bulunmaktadır. İki fotosensetizör de klinik uygulamalar açısından onaylı olup (Calzavara-Pinton 2005) cerrahi alanda oldukça yüksek konsantrasyonda dahi insanda toksik etkiye neden olmadan kullanılabilir (Mashberg 1983).

Metilen mavisi katyonik yapıda bir bileşik olup, $\epsilon_{\text{maks}} \sim 82.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile 666 nm'de absorpsiyon yapmaktadır (Chen 2008). MB absorpsiyon spektrumu, dimerizasyon nedeniyle konsantrasyona bağımlıdır (MB'nin sudaki denge sabiti $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Dimerizasyon iyonik mukavemetteki artışla artar. MB monomerleri çözelti içerisindeyken çoğunlukla kümeleşerek dimerleri ve dimer kümelerinin de birleşmesi ile yüksek mertebede kümeleri oluşturmaktadır. MB'nin hem monomerleri hem de dimerleri 666 nm (monomer piki) ve 600 nm (dimer piki, daha şiddetli) dalga boyunda maksimum absorpsiyon yapan iki bağımlı pik oluşturmaktadır. Metilen mavisinin yüksek mertebe kümeleri ise 550 nm'de yayvan bir pik vermektedir. MB'nin konsantrasyonu arttıkça dimerleşme oranı da artmaktadır (Jockusch 1995). MB'nin floresan kuantum verimi suda düşüktür (yaklaşık 0.04) ve çözücünün bir fonksiyonu olarak değişkenlik göstermektedir. Çözünen - çözünen etkileşimleri arttıkça (iyon çifti oluşumu ve dimerizasyonu) floresan kuantum verimini daha da azaltmaktadır.

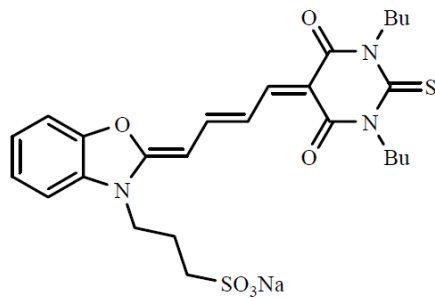


Şekil 2.22. Fenotiazin grubunda yer alan metilen mavisinin (MB) ve toluidin mavisinin (TBO) yapısı

Fenotiyazinyum boyası olan Toluidin mavisi (TBO) katyonik yapıda olup, 596 nm ve 630 nm'de ϵ_{maks} (630 nm) $\sim 51.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ absorbans yapmaktadır. TBO'nun sulu çözeltisi de MB gibi çözelti-çözünen etkileşimlerinden ve oluşan kümelenmelerden dolayı konsantrasyona ve kümelenme şekline bağlı olarak farklı dalga boylarında maksimum absorbans özelliği göstermektedir. Lucio D'Ilario ve Andrea Martinelli'nin yapmış olduğu çalışmada TBO'nun bu özelliği ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Monomer yapıdaki bir TBO 610 nm'de maksimum absorbans verirken, dimer yapıda kümelenmiş TBO 580 nm ve 640 nm'de, trimer yapıda kümelenmiş TBO 550 nm'de, tetramer şeklinde kümelenmiş TBO 520nm, 580nm, 610nm ve 670nm'de maksimum absorbans verdiği saptanmıştır. Daha yüksek mertebeden kümelenen TBO'lar 460-670nm'ye kadar maksimum absorbans değerleri verebilmektedir (D'Ilario 2006).

Siyaninler

Siyanin, polimetin grubuna ait sentetik bir boyadır ve geleneksel olarak mavi-yeşil bir ton anlamına gelen İngilizce "mavi" kelimesinden gelmiştir. Siyaninler grubunda yer alan merosiyanin (şekil 2.23) 540 556 nm'de ϵ_{maks} $\sim 110,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile absorbans yapmaktadır ve lösemi, lenfoma tedavisi üzerine çalışmaları mevcuttur (Tsujino 2006).

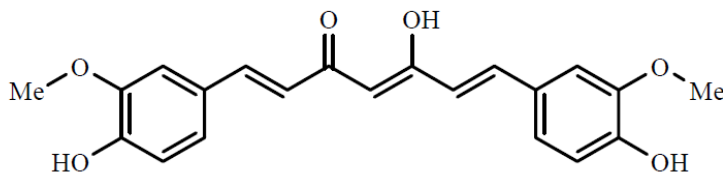


Merosiyanin

Şekil 2.23. Siyanin grubunda yer alan merosiyanin yapısı

Kurkuminoitler

Kurkumin Curcuma longa L.'nin rizomlarından elde edilen polifenol yapıda doğal bir renklendiricidir (şekil 2.24). Zerdeçal baharatının bileşenlerinden biridir. Kurkumin 420 nm'de ϵ_{max} $\sim 55,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ absorbans yapar. Oral cerrahide fotodinamik etki ile dezenfektan amacıyla kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Kurkumin yaygın olarak FDT yoluyla bakterileri yok etmek için bir kullanılabilecek bir ajan olarak önerilmektedir (Araujo 2012).

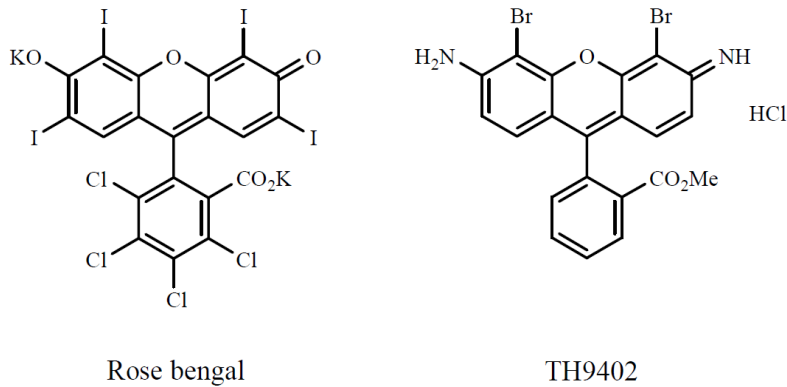


Kurkumin

Şekil 2.24. Kurkumin yapısı

Ksantenler

Ksanten boya ları, tüm sentetik boya ların en eskisi ve en yaygın kullanılan ları arasında yer almaktadır. Rodamin çeşitleri, floresein, eosin, eritrosin ve rose bengal (RB) bu sınıfta yer almaktadır. Rose Bengal, 549 nm'de $\epsilon_{\text{maks}} \sim 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile absorban s yapan suda çözölen ve anyonik yapıda olan bir bileşiktir. Tip II mekanizması ile triplet oksijenden singlet oksijene yüzeysel fotokatalitik dönüşüm sergiler. Rose bengal nispeten yüksek kuantum verimine sahiptir ve sudaki kuantum verimi $1.05 (\pm 0.06)$, metanoldeki kuantum verimi ise $0.90 (\pm 0.08)$ değ erindedir (Neckers 2007). Baş ka bir ksanten türevi olan 4,5-Dibromorodamin metil ester (TH 9409) fotosensetizörü 514 nm'de $\epsilon_{\text{max}} \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile ış ığı absorbe etmektedir. Ksanten boyalarda halojen atom larının varlığı, sistemler arası üçlüye geç iş etkinliğini artırır ve daha çok singlet oksijen üretimini sağlar. Ksanten türevi fotosensetizörler ile yapılan birçok tedavide olumlu sonuçlar alınmıştır (Ormond 2013).



Şekil 2. 25. Rose bengal ve dibromo metil ester (TH9402) yapısı

2.3.1.3. Üçüncü nesil fotosensitizörler

Üçüncü nesil fotosensitizörlerin eldesinde daha çok tümör dokusuna daha yakın afiniteye sahip maddeler sentezlenmiştir. Aynı zamanda çevredeki sağlıklı dokulara verilen zararı azaltmak amaçlanmıştır. Fotodinamik yöntemin biyoyararlanımını etkin bir şekilde arttırmak adına FS maddelere çeşitli fonksiyonel gruplar bağlanmış spesifik tedavi yöntemleri elde edimeye çalışılmıştır. Üçüncü nesil FS maddelerinin eldesinde aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır.

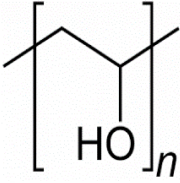
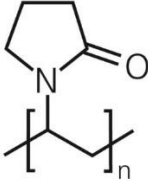
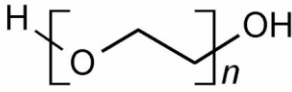
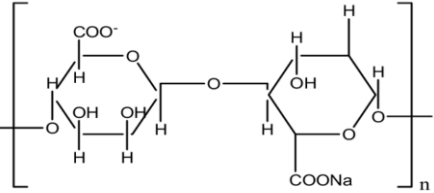
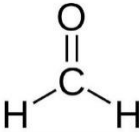
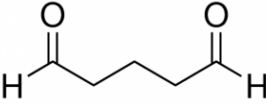
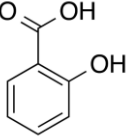
- İkinci nesil fotosensitizörlerin, hedef reseptöre odaklanan moleküller ile kombinasyonu,
- Nano yapılar ile ikinci nesil fotosensitizörlerin kombinasyonu,
- Çoğalan tümör hücrelerinin (hücre zarının sentezi için daha fazla kolesterol gerekmektedir) çoğalması baskılamak amacıyla LDL lipoprotein ile fotosensitizörlerin kombinasyonları,
- Bir fotosensitizörün kanser hücresinin spesifik antijenine yönelik bir monoklonal antikorla konjüge edilmesi,
- Büyüme faktörü reseptörleri, transferrin reseptörleri veya hormonlar gibi tümör yüzey belirteçlerinin kullanımı (örn. insülin) (Josefsenb 2008).

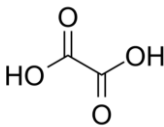
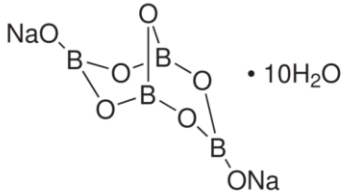
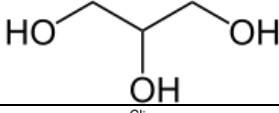
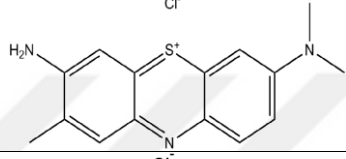
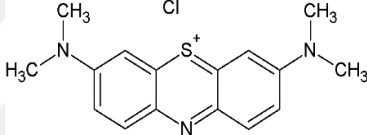
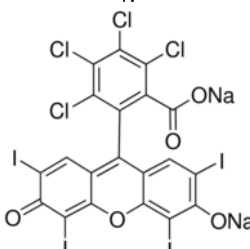
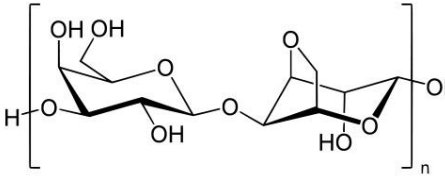
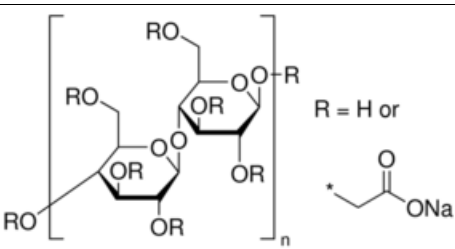
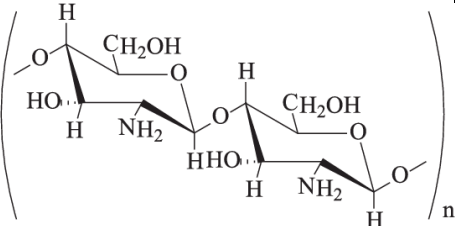
3. MATERYAL VE METOT

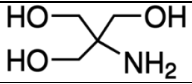
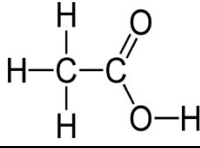
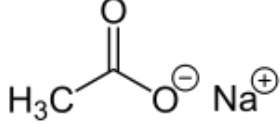
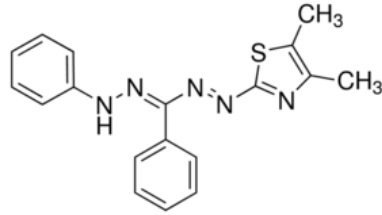
3.1. Materyal

Yara tedavisinde kullanılacak fotosensitizer ajan yüklenmiş hidrojel eldesinde öncelikle matriks sistemlerin yapısının belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

2.1.1. Kullanılan kimyasallar:

Kimyasal Adı	Kimyasal Formülü	Üretici Firma
PVA Mw~15.000		Sigma-Aldrich
PVA Mw~60.000 (Mowiol 10-98)		
PVA Mw~125.000 (Mowiol 20-98)		
PVA Mw~130.000 (Mowiol 18-88)		
PVP 10.000		Sigma-Aldrich
PVP 15.000		
PVP 40.000		
PEG 200		Sigma-Aldrich
PEG 300		
PEG 600		
PEG 3350		
Sodyum Aljinat (NaAlg)		-
Formaldehit (%37)		abcr
Gluteraldehit (%25)		Merck
Salisilik asit		Sigma-Aldrich

Okzalik asit		Sigma-Aldrich
Disodyum tetraborat dekahidrat		Merck
Gliserin		Sigma-Aldrich
Toluidin Mavisi (TBO)		Sigma-Aldrich
Metilen Mavisi (MB)		Merck
Rose Bengal (RB)		Sigma-Aldrich
Agar-agar		Merck
Karboksimetil selüloz sodyum tuzu		Sigma-Aldrich
Kitosan		Sigma-Aldrich

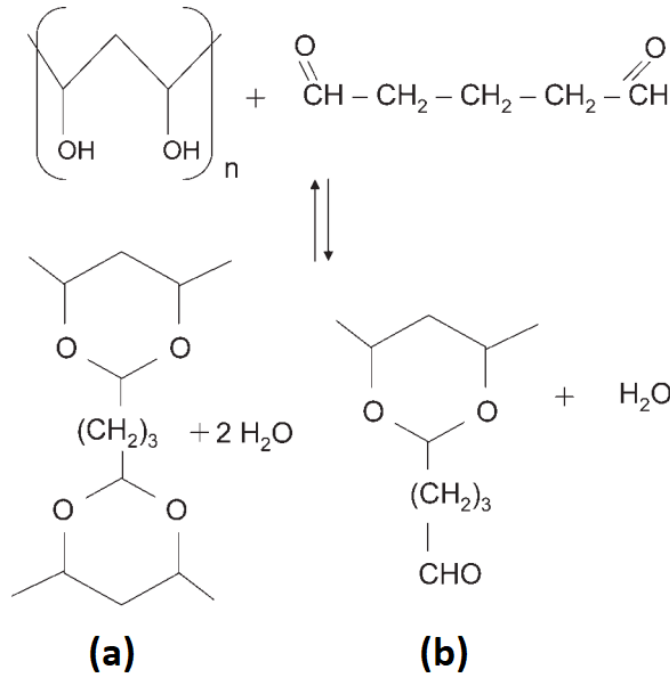
Hidroklorik asit	HCl	Sigma-Aldrich
tris(hidroksimetil)aminometan		Merck
Asetik asit		Merck
Sodyum asetat		Merck
MTT (4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid)		Sigma-Aldrich

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Cihazın Markası / Özellikleri	Çalışmalardaki Kullanım Alanı
Hassas Terazı	Precisa	Tartım işlemlerinde
Isıticılı Magnetik Karıştırıcı	IKA	Çözelti hazırlama işlemlerinde
Ayarlanabilir LED Cihazı	520 adet LED, 130W, 12V Dc, maksimum ışık gücü=9720 lümen	Fotosensitizörleri aktive etmede
Etüv	Thermo Heraeus	Kurutma işlemlerinde
Otoklav	Hırayana Ha-240M	Çözeltileri hazırlama ve in-vitro analizlerde sterilizasyon işlemlerinde
Çalkalayıcı İnkübatör	Edmund Bühler GmbH TH15	Bakterilerin inkübe edilmesinde
UV-Vis Spektrofotometresi	Varian Carry 5000	Çözeltilerin absorbanlarının ölçümünde ve bakteri analizinde kullanılan mikroorganizmaların optik yoğunluklarının belirlenmesinde
FTIR	Bruker Tensor 27	Yapı analizlerinde
Çekme-Basma / Çekme-Kopma Test Cihazı	SHIMADZU AGS-X	Fiziksel testlerde
pH metre	-	Çözelti hazırlamada ve maddenin asitlik bazlık değerini saptamada

2.2. Metot

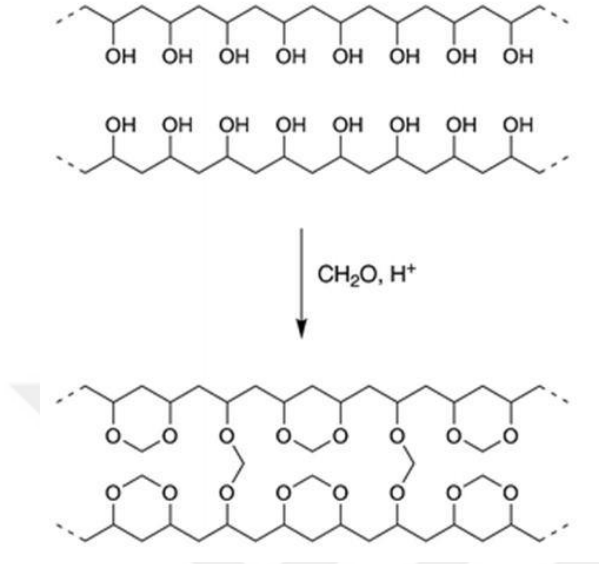
PVA kimyasal olarak birçok organik çözücüye karşı inerttir ve UV Visible bölgesinde optik olarak saydam bir polimerdir. Çalışmada polivinil alkolün 61K ve 125K %20'lik (w/w), 125K ve 130K %15'lik (w/w) olacak şekilde sulu çözeltileri hazırlanmıştır. PVA bileşikleri kullanılarak ilk olarak formaldehit ve glutaraldehyt (GA) çözeltileri ile çapraz bağların oluşumu ve hidrojel eldesi üzerine denemeler yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarında iki fonksiyonlu bir reaktif olan GA'nın oluşturduğu PVA-GA polimer yapısının termal ve depolanabilirlik bakımından fiziksel dayanıklılığı olduğu ile ilgili bilgilere rastlanmıştır (Katia 2008). GA'nın dez avantajı ise canlı yapılar için kısmen toksik etki göstermesidir (Takigawa 2006). Yapılan araştırmalarda polimer sistemlerinde GA %1'in altındaki derişimlerde kullanıldığında toksik etkinin minimuma indirildiğinden bahsedilmektedir (Migneault 2004). Şekil 3.1'de PVA-GA reaksiyonu için önerilen mekanizma yer almaktadır. Polimerin çapraz bağlanmasında tepkime maddeleri arasında optimum bir oran olduğunu bilinmektedir. Aldehitin fazla miktarda kullanılması Şekil 3.1'de gösterildiği gibi PVA'nın dallanmasına (a) yol açabilmektedir. Tez çalışmasında GA/PVA'nın kütlece oranı 0.005, 0.010, 0.05, 0.10, 0.50 ve 1.00 olacak şekilde 6 farklı oran üzerinde çalışma yapılmış pH=2 olacak şekilde sitrik asit kullanılarak tepkime katalizlenmiştir. Hazırlanan sistemler ağzı açık kaplarda oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiş, görsel olarak jel oluşup oluşmadığı, sertliği ve yapısı incelenmiştir. Benzer denemeler formaldehit (FA) çözeltisi ile de yapılmış (şekil 3.2), sonuçlar görsel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.1. PVA ile GA arasındaki tepkime mekanizması, **a)** optimum oranda aldehit kullanımı sonucu oluşan yapı; **b)** aldehitin fazla miktarda kullanılması sonucu oluşan dallanma

24 saat geçtikten sonra oluşan jeller incelendiğinde; jel oluşumunun en iyi olduğu sistemlerin; GA/PVA ve FA/PVA için 0.10, 0.50 ve 1.00 olduğu yaklaşık %45 oranında

suyu tutabilmelerinden dolayı düşük şişme dereceli (%20-50) hidrojeller sınıfında bir yapı oluşturdukları saptanmıştır. Bir hafta süresince oda koşullarında ağzı kapalı kaplarda bekletilen sistemlerin zamanla yapıdaki suyunu salarak sert ve daha kırılğan olduğu gözlemlenmiştir.

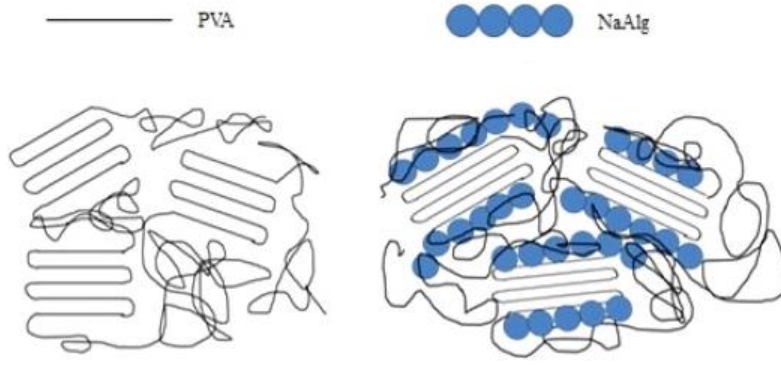


Şekil 3.2. PVA ile FA arasındaki tepkime

Matriks sisteminin esnekliğini arttırmak amacıyla yapıya farklı molekül ağırlıklarına sahip polietilen glikol ve polivinil pirolidon çözeltileri eklenmiş gerekli şeffaflıkta bir matriks sistemi elde edilememiştir. Sağlık açısından GA ve FA'ın dezavantaj oluşturması ve sonuçların nispeten olumsuz olmasından dolayı farklı çapraz bağlayıcıların denenmesine karar verilmiştir.

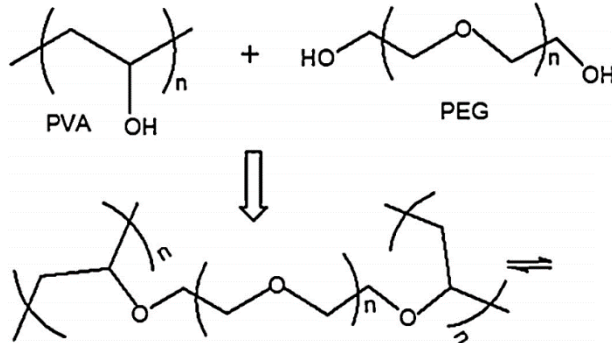
Bir kahverengi yosun özütü olan sodyum aljinat (NaAlg) ile PVA/ NaAlg hidrojel matris tabanlı yara örtüsü sistemlerinin üzerine çalışmalar yapılmıştır (şekil 3.3). Literatürdeki çalışmalar dikkate alınarak (Jong Oh 2008 ve Elbadawy 2015) PVA/ NaAlg ağırlıkça oranları 10/1, 10/2, 10/3, 10/4 ve 10/5 olacak şekilde sulu çözeltileri hazırlanmış donma-çözme metodu kullanılarak (18 saat süreyle buzdolabında -20° C'de dondurulup ve 6 saat boyunca oda sıcaklığında eritilerek üç ardışık döngü yapılmıştır.) hidrojeller elde edilmiştir. PVA olarak PVA Mw~61,000, PVA Mw~125,000 molekül ağırlığına sahip yapılar kullanılmıştır.

Donma-çözme metodu ile çözünmeyen hidrojeller elde edilmesine rağmen NaAlg miktarının artışı ile matriksin daha çok su tuttuğu fakat sistemlerinin daha kırılğan hale geldiği tespit edilmiştir. Yöntemin istenilen esneklikte hidrojel teminini sağlamayı, meşakkatli, maliyetli ve uzun oluşu paralelinde denenilen diğer çapraz bağlayıcı sistemlere odaklanmamıza sebep olmuştur.



Şekil 3.3. PVA-NaAlg yapısı

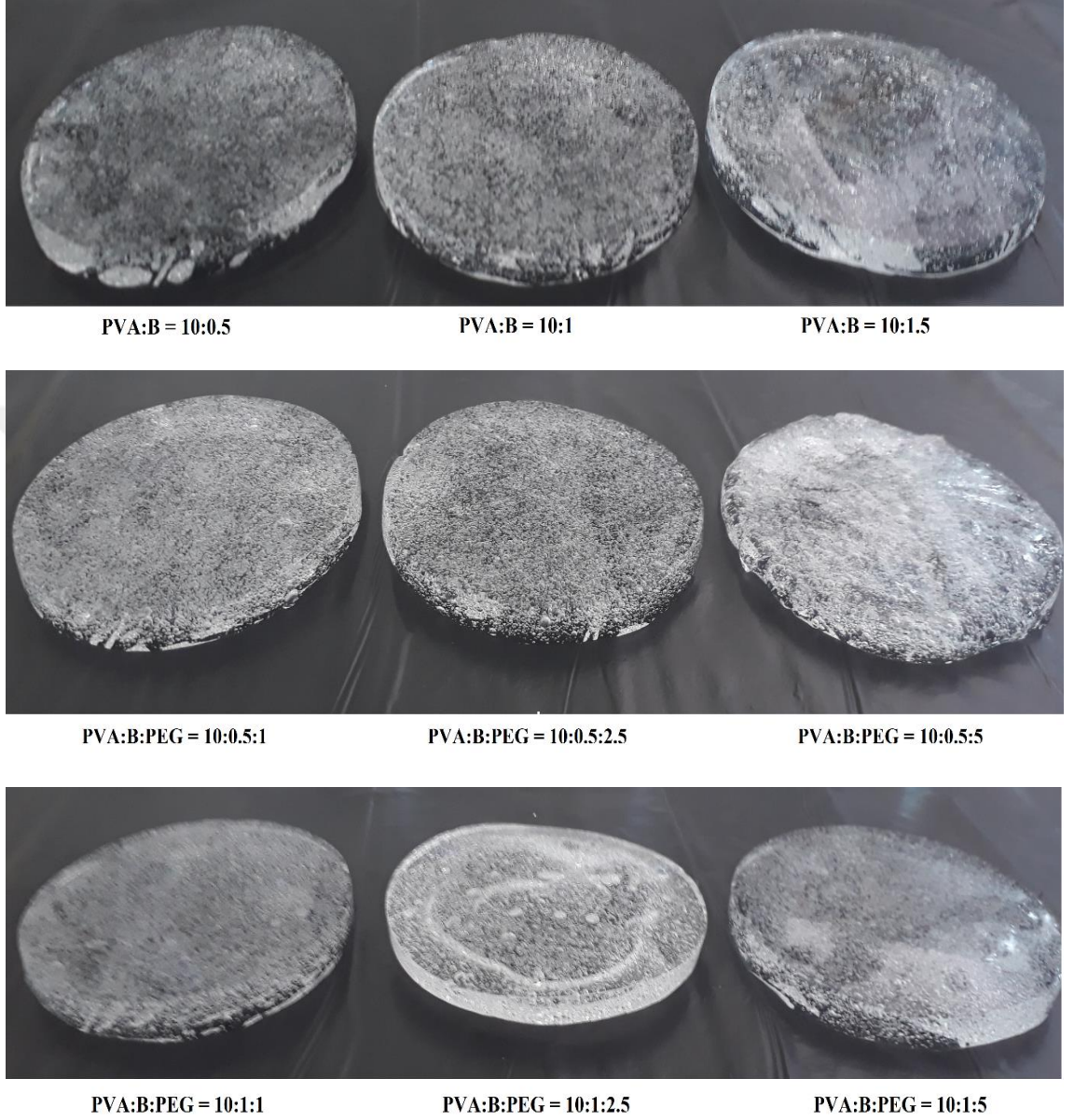
Bir mineral ve borik asit tuzu olan disodyum tetraborat (boraks) deterjanlarda, kozmetik sektöründe, tarım ilaçlarında, anti-fungal formülasyonlarda, biyomedikal uygulamalarda vb. birçok alanda kullanılmaktadır. Boraks, sık bilinen, toksik olmayan gıda katkı maddesidir (Han 2013). PVA hidrojel, 10: 1 oranında disodyum tetraborat dekahidrat, çözeltisi ile basitçe karıştırılarak hazırlanabilir (Kumar 2017). Tez çalışmada ön deneme olarak ağırlıkça %20 PVA 125K içeren sulu çözelti ile PVA:Boraks oranını literatür ile uyumlu şekilde 10:1 oranında hazırlanarak yapıya esneklik kazandırmak amacıyla hangi molekül ağırlığına sahip PEG'in sistemlerde kullanılacağına karar verilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. PEG-PVA Yapısı

Boraks miktarı denenirken, paralelinde farklı molekül ağırlığına sahip PVA bileşikleri ile de PEG yapıları kombine edilerek görsel değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.1). PEG 1450 sistemlere yarı yarıya saf suda çözülerek eklendi. Değerlendirme sonucuna göre seçilen **PVA 125K** ve **PEG 600** ile PVA:Boraks:PEG oranlarını belirlemek amacıyla fiziksel testler gerçekleştirildi. Bu testler için öncelikle %20'lik PVA 125K ağırlıkça %4'lük boraks içeren sulu çözelti ile PVA:Boraks oranı 10:0.5, 10:1 ve 10:1.5 olacak şekilde karıştırıldı. Bu sistemlere ayrıca PEG katkılanarak, sistemler yapıda PVA:PEG oranı 10:1, 10:2.5 ve 10:5 olacak şekilde hazırlandı. Matriks sistemlerin katı oranı ağırlıkça %12-16 aralığında sabit tutuldu. Elde edilen matriks sistemlerinin jelleşme yüzdesi tayini, şişme davranış tayini (farklı zaman, sıcaklık ve pH parametreleri denendi), fiziksel dayanımını saptamak için de görsel olarak çekme kopma testleri yapıldı.

Şekil 3.5'te verilen şekilde ağırlıkça farklı oranlara sahip PVA:B hidrojelleri hazırlandı. PVA:B oranı 10:1.5 olan sistemlerde PEG kullanıldığında, çapraz bağ oluşumu sırasında homojen karışım sağlanamadı.



Şekil 3.5. Farklı PVA:B:PEG oranlarına sahip hidrojel sistemlerin görünümü

3.2.1. Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdelerinin incelenmesi

Farklı polimer oranlarına sahip hidrojellerden belirli bir miktar tartılarak (w_0) etüvde 80°C 'de sabit tartıma gelinceye dek kurutuldu (w_1) (Şekil 3.6). Ardından hidrojeller, ortam koşullarında (ortam sıcaklığı: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, bağıl nem değeri: $\% 45 \pm 10$) ve kapalı bir kapta bulunan saf su içerisinde (saf su belirli aralıklar ile tazeleni) 48 saat süresince bekletildi. Süre sonunda hidrojeller etüv içerisinde tekrar kurutularak sabit tartıma getirildi (w_{jel}). Jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri sırasıyla (3.1) ve (3.2)'de belirtilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı. Deneyler üçerli şekilde tekrarlanıp, verilerin ortalaması alındı.

$$\text{Jelleşme Yüzdesi: } w_{\text{jel}} / w_1 \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Çözünürlük Yüzdesi: } \frac{w_1 - w_{\text{jel}}}{w_1} \times 100 \quad (3.2)$$



Şekil 3.6. Hidrojellerin etüvde kurutulması

3.2.2. Hidrojellerin su tutma kapasitelerinin incelenmesi

Sabit tartıma gelinceye dek etüvde kurutulan hidrojeller (w_1) 48 saat süresince ortam koşullarında saf su içerisinde bekletildi. Süre sonunda suyu emmiş olan hidrojeller bir filtre kağıdı üzerine hafifçe tutularak yüzeydeki aşırı su tahliye edildi, hassas terazide tartıldı (w_2). 3.3'te belirtilen eşitlik kullanılarak su tutma kapasiteleri belirlendi.

$$\text{Su Tutma Kapasitesi: } (w_2 - w_1) / w_1 \times 100 \quad (3.3)$$

Hidrojellerin su tutma kapasitelerinin belirlenmesi elde edilen hidrojin çeşidi hakkında bilgi sahibi olmamız açısından önemlidir. Daha öncede belirtildiği gibi düşük şişme dereceli hidrojeller %20-50, orta şişme dereceli hidrojeller %50-90, yüksek şişme dereceli hidrojeller %90-99,5, süper absorbant hidrojeller ise %99,5 ve üstü su absorbe edebilen hidrojellerdir.

3.2.3. Hidrojellerin şişme davranışlarının incelenmesi

Hidrojellerin şişme davranışları zamana, sıcaklığa ve pH değerlerine karşı incelenmiştir.

3.2.3.1. Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi

Elde edilen hidrojellerin zamanla şişme değerlerinin değişimi pH değeri 7.4'e ayarlanmış simüle vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletilerek incelendi. Etüvde kurutularak sabit tartıma getirilmiş hidrojeller (w_1), 100ml SBF içeren kaplara alınarak ağızları kapalı şekilde 37°C'de bekletildi. Belirli zaman aralıklarıyla hidrojeller kaplardan alınarak matriks sisteme zarar vermeyecek şekilde yüzeyleri kağıtla kurutularak tartıldı ardından kaplara geri konuldu. Ölçümler denge değere ulaşıncaya kadar bu işlemler tekrar edildi. Hidrojeller denge şişme değerlerine ulaştığında ($w_{\text{şiş}}$), 3.4'te belirtilen eşitlik kullanılarak hidrojellerin yüzde şişme değerleri hesaplandı.

$$\text{Yüzde Şişme Değeri: } (w_{\text{şiş}} - w_1) / w_1 \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.3.2. Hidrojellerin farklı sıcaklıktaki şişme değerlerinin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerleri; pH=7.4'e ayarlanmış fosfat tamponu içerisinde 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle incelendi. Etüvde kurutularak sabit tartıma getirilmiş hidrojeller (w_1), 100ml fosfat tamponu içeren kaplara alınarak ağızları kapalı şekilde 4 °C (buzdolabı), 23 °C $\pm$ 2°C (oda koşulları) ve 37°C (etüv)'de bekletildi. Belirtilen sıcaklıklarda, 48 saat bekletilen hidrojel numuneler bulundukları ortamdan alınarak yüzeyleri hafifçe kurutuldu ve tartıldı ($w_{\text{sıcaklık}}$). Şişme değerleri 3.5'te belirtilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Yüzde Şişme Değeri: } (w_{\text{sıcaklık}} - w_1) / w_1 \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.3.3. Farklı pH değerlerinde hidrojellerin şişme değerlerinin incelenmesi

Etüvde kurutularak sabit tartıma getirilmiş hidrojeller (w_1) farklı pH değerlerine sahip, pH=1, pH=5.5 ve pH=7.4'e olacak şekilde ayarlanmış çözeltiler içerisinde 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle bekletilerek incelendi.

- ❖ pH = 1.0 olan 0,1M HCl çözeltisinde (simüle gastirik sıvısı)
- ❖ pH = 5,5 10 mM Asetad tamponunda (simüle cilt pH değeri)
- ❖ pH = 7.4 SBF / içeriği Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. SBF (simüle vücut sıvısı) içeriği (Kokubo 1990)

NaCl	7.996 g
NaHCO ₃	0.350 g
KCl	0.224 g
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.228 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.305 g
1 mol/L HCl	40 mL
CaCl ₂	0.278 g
Na ₂ SO ₄	0.071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ *	6.057 g
1 mol/L HCl	pH'ı 7.4'e ayarlamak için
* tris(hidroksimetil)aminometan	

Süre sonunda hidrojeller çözelti ortamından çıkartılarak, matriks sistem zarar görmeyecek şekilde hafifçe kurulandı ve tartıldı (w_{pH}). Hidrojellerin şişme değerleri 3.6'da belirtilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Yüzde Şişme Değeri: } (w_{pH} - w_1) / w_1 \times 100 \quad (3.6)$$

Veriler incelendiğinde sentetik polimer yapılardan oluşan S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FDA için optik açıdan ve fiziksel dayanım bakımından uygun olacağı görüldü. Fakat sentetik polimerlerden oluşan hidrojel sistemlerin yüksek mekanik mukavemete sahip olması, iyi biyobozunur ve tersinir özellikler göstermesinin yanı sıra hücre proliferasyonunu destekleme açısından doğal polimerlerin daha olumlu sonuçlar vermesi (Leberfinger 2017), hibrit sistem denemelerinin de yapılmasını gerektirdi.

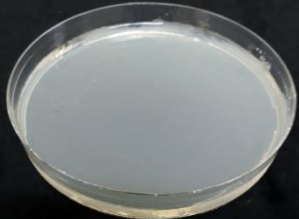
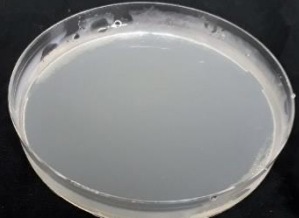
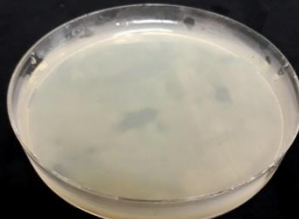
3.2.3.4. Hibrit sistem denemeleri

Matriks sistemi hibrit olan sistem denemelerinde; polivinil prolidon (PVP), karboksimetil selüloz (CMC), agar-agar, polietilen glikol (PEG) ve gliserin farklı oranlarda kullanılarak hibrit sistem hazırlanmıştır. Polivinilpirolidon (PVP) biyoyumuluğa sahip iyi bilinen bir polimerdir; bu nedenle PVP geçici cilt örtüleri veya yara sargıları için psödo hidrojel preparasyonunun ana bileşenlerinden biri olarak kullanılmaktadır. PVP hidrojelinin kendisi iyi bir şişme özelliği göstermez, ancak karboksimetil selüloz (CMC), karboksimetil kitosan veya agar veya aljinat gibi polisakkaritler yapılar ile karıştırıldığında, şişme özellikleri gelişir. Agar hidrojel, insan cildinin sıvı ve iyon akışını simüle eden benzer hidrasyon / dehidrasyon özelliklerine sahip olan poroelastik bir model olarak kullanılmaktadır. Agar, doğal bir çapraz bağlama maddesi olarak hareket eder ve jelleşme özellikleri hidrojellerde mekanik takviye sağlamaktadır (Roy 2010).

Sistem içerisinde agar-agar jelleştirici ajan olarak, CMC ve PVP matriks sistemin fiziksel dayanımını ve su tutma kapasitesini arttırmak amacıyla, PEG iyileşmeyi destekleyici olarak gliserin ise nemlendirici etki sağlaması amacıyla kullanılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları dikkate alınarak kullanılacak kimyasalların oran aralıkları belirlenmiştir (Roy 2010, Roy 2012). Çalışmada Sigma-Aldrich firmasından temin

edilen; 40.000 molekül ağırlıklı PVP40, 3.350 molekül ağırlıklı PEG 3350, agar-agar ve gliserin, ACROS firmasından temin edilen 250.000 molekül ağırlığına sahip karboksimetil selüloz sodyum tuzu kullanılmıştır. CMC'un %5'lik, agar-agar'ın %5'lik, PVP40'ın %20'lik, PEG 3350'nin %10'luk sulu çözeltileri otoklav içerisinde hazırlanmıştır. Bileşenler belirtilen sırayla eklenmiş, süreç boyunca çözelti ve kimyasalların sıcaklıkları 60°C'de tutularak ve petri kaplarına dökülmüş ve jelleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Hibrit sistemlerde kullanılan maddelerin oranları ve örneklerin görünüşleri

Sistem Adı	Sistem Oranları PVP:CMC:PEG:Agar:Gliserin	Görünüm
H-1	0.8 : 0.2 : 1 : 2 : 1	
H-2	0.5 : 0.5 : 1 : 2 : 1	
H-3	0.4 : 0.8 : 1 : 2 : 1	
H-4	0.2 : 0.8 : 1 : 2 : 1	

Denemeler sırasında H-1 ve H-2 sistemlerinin oldukça kolay parçalandığı gözlemlendi. Yapıdaki CMC oranının artırılmasının hem mukavemeti hem de örneklerin su tutma miktarını artırdığı tespit edildi. Test sonuçları ve görsel sonuçlar dikkate alındığında ileriki testlerde H-3 ve H-4 sistemlerinde kullanılan oranlar üzerinden denemelerin yapılmasına karar verildi.

3.2.3.5. Çekme-kopma testleri

Çekme-Kopma test cihazları; zamanın bir fonksiyonu olarak malzemeye bir çekme kuvveti uygulandığında deformasyon miktarının belirlenmesini, sabit kuvvet altında malzenin kopması için gerekli kuvveti ve kopma süresini saptamaktadır. SHIMADZU marka AGS-X serisi çekme-basma test cihazı ile örneklerin maksimum gerilme, kopma gerilmesi ve % kopma gerinimi değerlerine bakıldı. Bunun için örnekler yaklaşık 20mm en, 100mm boy ve 5mm kalınlık olacak şekilde hazırlandı ve cihaz çekme hızı 20mm/min olacak şekilde ayarlandı.

3.2.4. Fotosensitizör Ajanların Matriks Sisteme Yüklenmesi

Fiziksel denemeler sonucunda olumlu sonuç alınan sentetik polimerlerden oluşan S-5 ve doğal-sentetik polimerlerden oluşan hibrit H-4 sistemlerine fotosensitizörlerin sabitlenmesi çalışmaları yapıldı. Toluidin mavisi (TBO), metilen mavisi (MB) ve rose bengal (RB)'in deiyonize su ile ayrı ayrı %0.2'lik (w/w) çözeltileri hazırlandı. Sentetik polimerlerden oluşan sistem için PVA:B:PEG oranının 10:0.5:2.5 olan matriks sisteme (S-5) Çizelge 3.3'de belirtilen miktarlar kullanılarak fotosensitizör ajanlar yüklendi. Bunun için öncelikle %20'lik PVA 125K çözeltisine eklenecek PEG 600 miktarı su ile seyreltildi. Karışır haldeyken PVA'nın üzerine seyreltilmiş PEG yavaş yavaş eklendi. Ardından boyar maddeler sistemlere eklenerek seyreltik disodyum tetraborat çözeltisi ile çapraz bağlanmalar sağlandı. Hidrojeldeki polimer oranı yaklaşık %15-16 olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Doğal-sentetik polimerlerden oluşan sistem için PVP:CMC:PEG:Agar:Gliserin oranının 0.2 : 0.8 : 1 : 2 : 1 olan matriks sisteme (H-4) Çizelge 3.3'de belirtilen miktarlar kullanılarak fotosensitizör ajanlar yüklendi. Bunun için öncelikle %20'lik PVP, %5'lik CMC, %10'luk PEG 3350, %5'lik Agar-Agar ayrı ayrı hazırlanarak otoklavda çözüldü. Sonra Çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda sırasıyla PVP, saf su, fotosensitör, CMC, PEG, Agar-Agar ve gliserin eklenerek karıştırıldı. Karışım sıcakken hazırlandı ve 60°C'de petri kaplarına döküldü. Her örnek 1saat süresince UV ışığı altında steril edildi.

Çizelge 3.3. Bakteri testi için hazırlanan sentetik sistemlerin formülasyonları

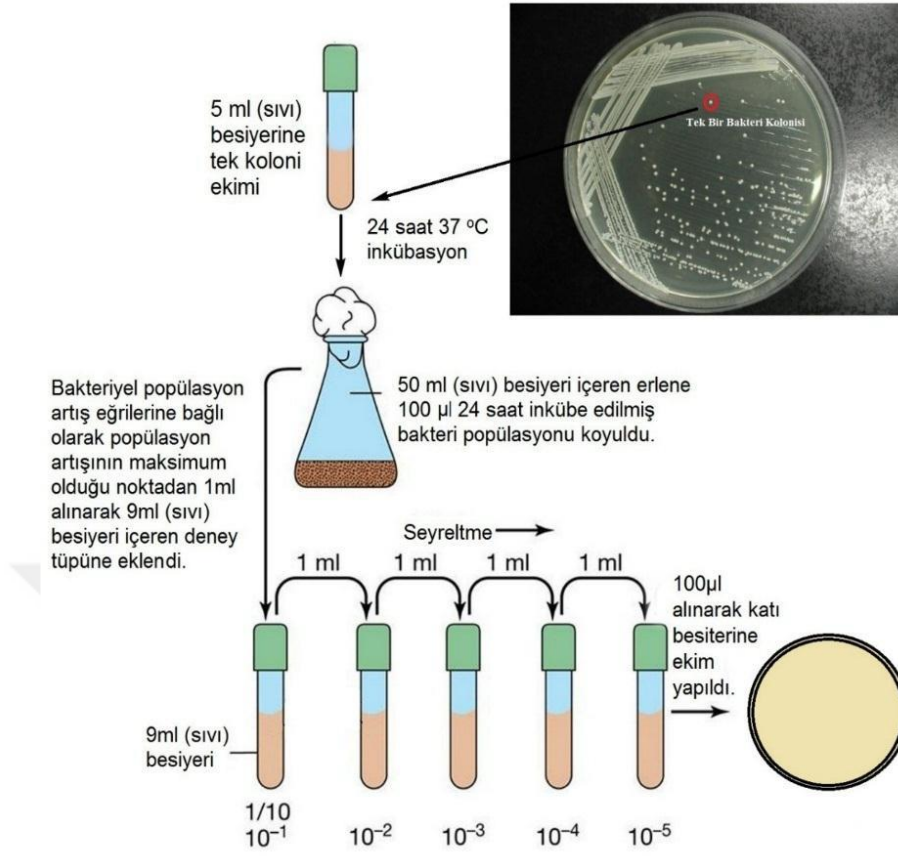
Yüklenen Boyar Madde Miktarları	%20 PVA 125K (g)	Saf Su (g)	PEG 600 (g)	%0.2 PS* (g)	%4 Disodyum tetraborat dekahidrat (g)
0 ppm	30.000	11.000	1.500	0.000	7.500
5 ppm	30.000	10.875	1.500	0.125	7.500
10 ppm	30.000	10.750	1.500	0.250	7.500
20 ppm	30.000	10.500	1.500	0.500	7.500
40 ppm	30.000	10.000	1.500	1.000	7.500
80 ppm	30.000	9.000	1.500	2.000	7.500
*Her bir fotosensitizör madde (TBO, MB veya RB) ile tek tek farklı konsantrasyonlarda çalışıldı, birbirleri ile karıştırılmadı.					

Çizelge. 3.4. Bakteri testi için hazırlanan hibrit sistemlerin formülasyonları

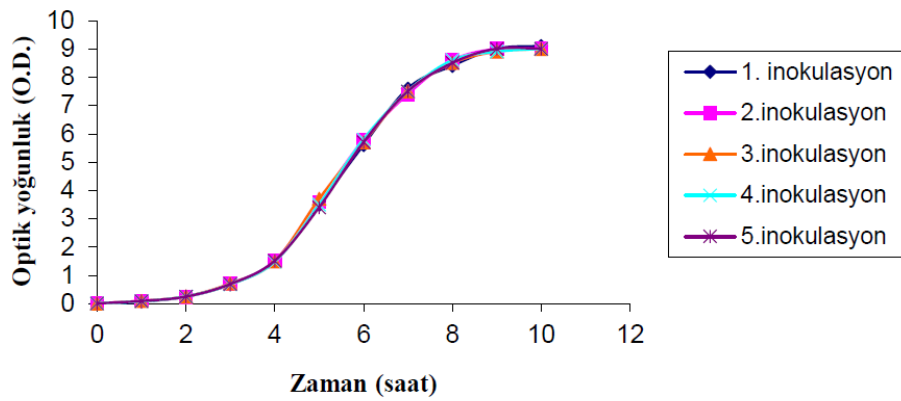
Yüklenen Boyar Madde Miktarları	%20 PVP 40 (g)	Saf Su (g)	%0.2 PS* (g)	%5 CMC (g)	%10 PEG 3350 (g)	%5 Agar (g)	Gliserin (g)
0 ppm	1	3	0	16	10	40	1
5 ppm	1	2.823	0.177	16	10	40	1
10 ppm	1	2.665	0.335	16	10	40	1
20 ppm	1	2.290	0.710	16	10	40	1
40 ppm	1	1.580	1.420	16	10	40	1
80 ppm	1	0.160	2.840	16	10	40	1
* Her bir fotosensitizör madde (TBO, MB veya RB) ile tek tek farklı konsantrasyonlarda çalışıldı, birbirleri ile karıştırılmadı.							

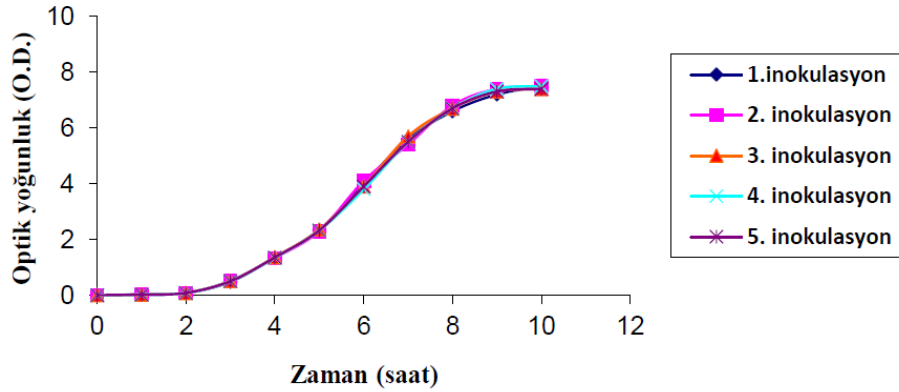
3.2.5. Antibakteriyel aktivite testleri

Hidrojellerin anti-bakteriyel aktivite testleri yapılmadan önce bakteri aktivitesi belirlenecek iki farklı bakterinin, Laktoz Broth (LB) ortamında bakteriyel popülasyon artış eğrileri oluşturuldu. İnsanlarda hastalık yapan patojen sınıfında bulunan mezofil bakterilerin çoğunun inkübasyon sıcaklığı +20 °C ile +40 °C arasında değişmektedir. Tezde çalışılan bakteri türleri de bu sınıfta olduğundan dolayı analiz sürecinde bakterilerin üreme ve gelişimleri için optimum sıcaklık 37 °C olarak sabit tutuldu. Tezde çalışılacak *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakteri türlerinin seçilen inokulumlardaki üreme hızları ve mililitredeki ortalama koloni sayısı (CFU/ml) çalışıldı. Bu yöntemde belirli bir bakteri türüne ait olan katı besiyerindeki kolonilerden tek bir koloni, öze ile 5 ml'lik besi ortamına ekildi ve 24 saat 37 °C'de inkübe edildi (gece ekimi). Bu kültürden, 100 µl alınarak 50 ml sıvı besiyeri içeren erlene aktarıldı (gündüz ekimi). 37 °C'de orbital çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm dönme hızında inkübe edildi ve optik yoğunlukları ölçülerek bakteriyel popülasyon artış eğrileri oluşturuldu. Ayrıca denemeler yapılırken seyreltme işlemi de yapılarak 5. dilüsyon tüpündeki ortalama bakteri sayısı saptanıp, bakteri yoğunlukları kontrollü şekilde çalışıldı. Bakteriyel kültür ortamının hazırlanışı Şekil 3.7'de şematize edilmiştir. Elde edilen bakteriyel popülasyon artış eğrileri ise Şekil 3.8'de ve Şekil 3.9'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Bakteriyel kültür ortamının hazırlanışı

Escherichia coli - Bakteriyel popülasyon artışı eğrisiŞekil 3.8. *E. Coli* bakteriyel popülasyon artışı eğrisi

Staphylococcus aureus - Bakteriyel popülasyon artışı eğrisi**Şekil 3.9.** *S. aureus* bakteriyel popülasyon artışı eğrisi

Bakteriyel popülasyon artış eğrisi çalışmasında her bir eğri çıkarılırken tekrarlanabilirliği sağlamak amacıyla en az üç defa farklı kültür ortamında hazırlanmış ve Varian Cary 5000 Bio UV-Vis spektrofotometre cihazında ayrı ayrı optik yoğunluklarına bakılmıştır. Bu eğrilerden de anlaşılabileceği gibi bakterilerin sıvı kültür içindeki üreme dönemleri dört dönemden oluşmaktadır. Başlangıç döneminde bakteri çoğalma hazırlıkları yapar, metabolizmaları hızlanır ve bakterilerin üremesinde yavaş bir artış olur. Logaritmik üreme dönemi ise bakterilerin sayısının hızla arttığı bir safhadır. Bakteri testlerinde inokulumlar logaritmik dönemden alınmaktadır. Durma döneminde üreyen bakteri ile ölen bakteri sayısı neredeyse eşit olduğundan belirli bir artış gözlenmez bundan sonraki dönemde besin yetersizliğinden ve ortamdaki metabolitlerin artması ile canlı bakteri sayısı sıfıra yaklaşır. Fakat şekillerde gösterilen eğrilerde optik yoğunluk baz alındığından dolayı bunu gözlemleyemeyiz. Bu nedenle minimum 8 saatten sonra inokulasyonların optik yoğunluklarına bakılmamıştır.

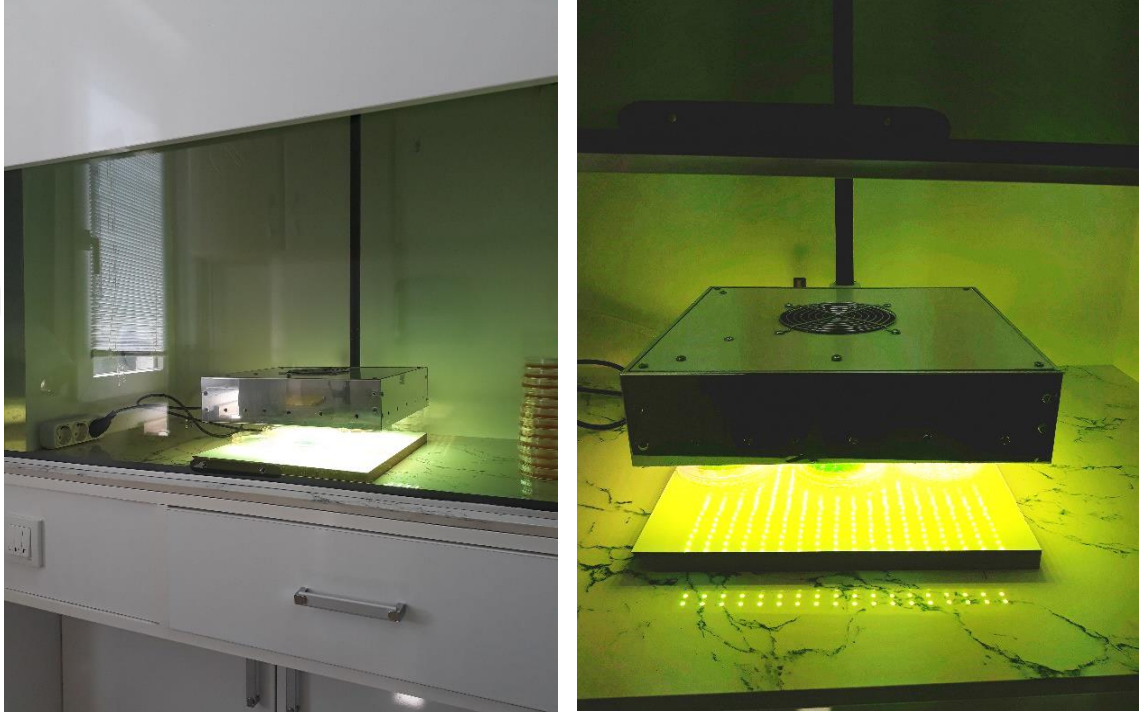
Bu eğriler kullanılarak çalışılan koşullarda bakterilerin popülasyon artışının maksimum olduğu süre belirlenmiştir. Bu süreler *E. coli* için 5.30 saat, *S. aureus* için 6 saat olarak belirlenmiş olup, analizde bu zaman dilimine tekabül eden logaritmik dönemden alınan bakteri inokulumları kullanılmıştır.

Her bakteri türü için popülasyon artışının maksimum olduğu inkübasyon süresi saptandıktan sonra çalışılacak bakteri türlerinin gece ve takiben gündüz ekimleri yapıldı. Gündüz ekiminden (50 ml'lik erlen de bulunan kültür) 1 ml alınarak içerisinde 9 ml sıvı besiyeri bulunan 1. dilüsyon tüpüne alındı. Seyreltmeden sonra 1. dilüsyon tüpü vorteks ile karıştırarak içerisinde 1 ml alındı ve yine 9 ml sıvı besiyeri bulunan 2. dilüsyon tüpüne eklendi. Böylelikle her seferinde bakteri popülasyonu 10-1 kat seyreltilmiş oldu. Bu işleme 10-5 seyrelme faktörüne (5. dilüsyon) varıncaya kadar devam edildi. 5. dilüsyon tüpünden 100 µl alınarak katı besiyerine ekim yapıldı ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gece sonra katı besiyerinde oluşan koloni miktarı sayıldı.

3.2.5.1. Fotosensetizör yüklenmiş hidrojellerin antimikrobiyal analizleri

Toluidin mavisi (TBO), metilen mavisi (MB) ve rose bengal (RB)'in maksimum absorpsiyon değerleri sırasıyla 630nm (turuncu), 666nm (kırmızı) ve 550nm (sarı)'dır.

Bakteri analizinde her boyar madde için belirtilen dalga boylarına tekabül eden renk aralığına yakın ışık kullanılarak kapalı kabin içerisindeki LED cihazına (520 adet LED, 130W, 12V Dc, maksimum ışık gücü=9720 lümen) şekil 3.10'daki gibi yerleştirildi. Örnekler belirli dalga boyu aralığındaki ışık altında 6 saat süresince ışınlandırdıktan sonra 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Kontrol amacıyla aynı formülasyona sahip farklı örnekler karanlıkta 6 saat süresince bekletilerek, ışık görmeden direk 24 saat 37°C'de inkübasyona alındı.



Şekil 3.10. Bakteri analizinde kullanılan LED cihazı

Elde edilen örneklerin bakteri analizleri gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kültürleri kullanılarak, JIS Z 2801 standardı modifiye edilerek gerçekleştirildi. Yüzde azalmalar koloni sayıları sayılarak hesaplandı. Log değerleri ise 3.7 eşitliğinde belirtilen formül ile hesaplandı. Burada P değeri yüzde azalmayı, L ise logaritmik azalma değerini belirtmektedir.

$$L = -[\log_{10}(-P/100 + 1)] \quad (3.7)$$

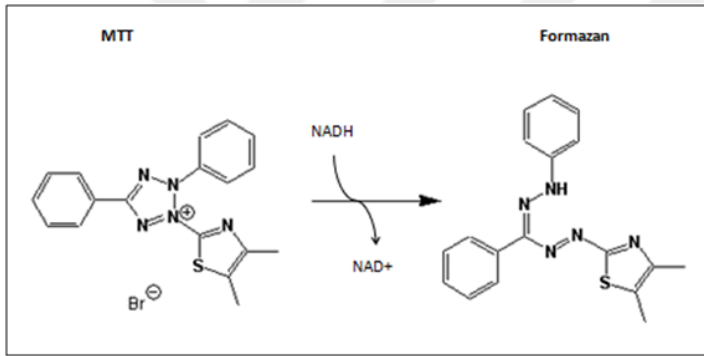
3.2.6. Hücre kültürü testleri

I. Endotel hücre kültürü testleri

Hücrelerin pasajlanmasında, normal hücre hattı olarak insan göbek ven damarından türemiş olan endotel hücre (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC) dizileri kullanıldı. Bu hücre hatları American Type Culture Collection'dan (ATCC) alındı. Hücreler hazırlanan uygun steril besiyerinde, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Çalışmamızda yeterli yoğunluğa ulaşmış flasklardan hücreler pasajlandı.

Tripsin-EDTA enzimi ile kaldırma yapılmadan önce ilk olarak medyum flasktan uzaklaştırıldı ve atıldı. PBS ile yıkama işlemin ardından atıldı ve 25 cm²'lik flask yüzeyi için 1 ml tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenmesi sonrasında hücreler 5-15 dakika inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları flasktan ayrıldıkları mikroskop ile gözlenir gözlenmez 6-8 ml taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı. Flasklardan toplanan hücreler 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve 125xg'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve kalan pelletde olan hücreler yeni flasklara dağıtılacak şekilde 25 cm²'lik flask yüzeyi için 6-8 ml taze medyum eklenerek flasklara paylaştırıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren CO₂ inkübatöründe, 6-8 ml medyum içinde inkübe edilerek üretildi. Alt kültürleme işlemi 1 flaskta 3 veya 6 flask şeklinde gerçekleştirildi. Bu şekilde pasajlanan hücrelerin tam anlamıyla yoğunlaşması 2-5 gün arasında gerçekleşti. Hücre sayısı tüm flasklar yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra deneylere alındı. Tüm çalışmalar en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

Hücre Canlılığı Belirleme Protokolünde, hücre büyümesinin kantitatif ölçümü, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir ve oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür (Şekil 3.11).

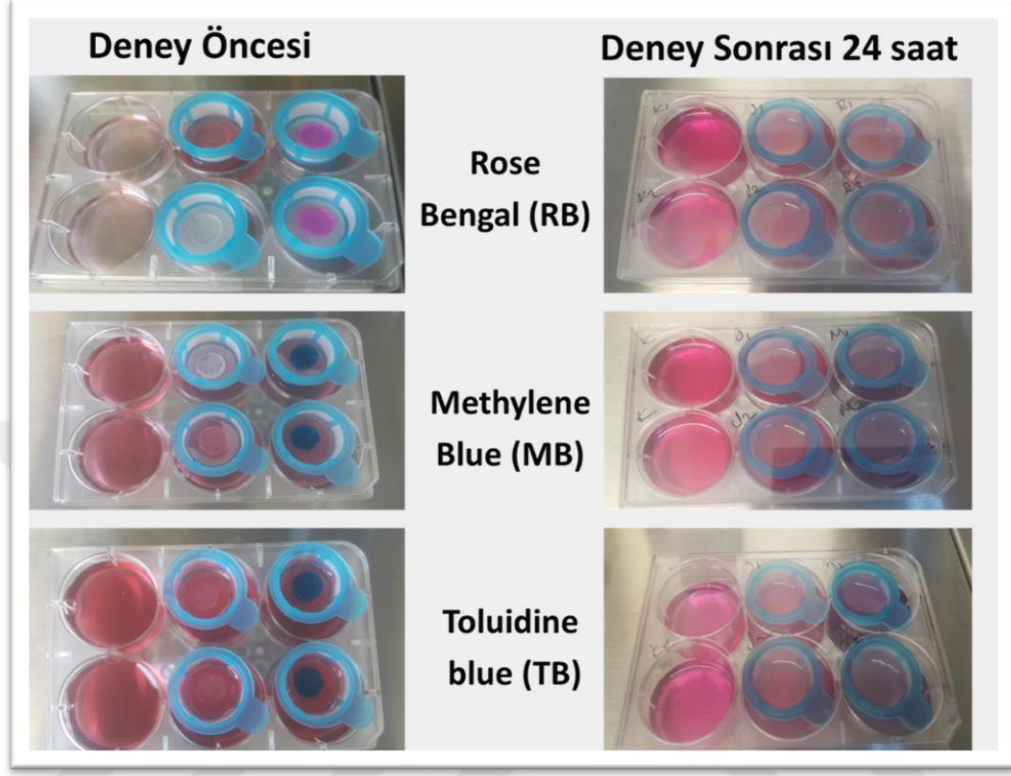


Şekil 3.11. MTT Protokolü

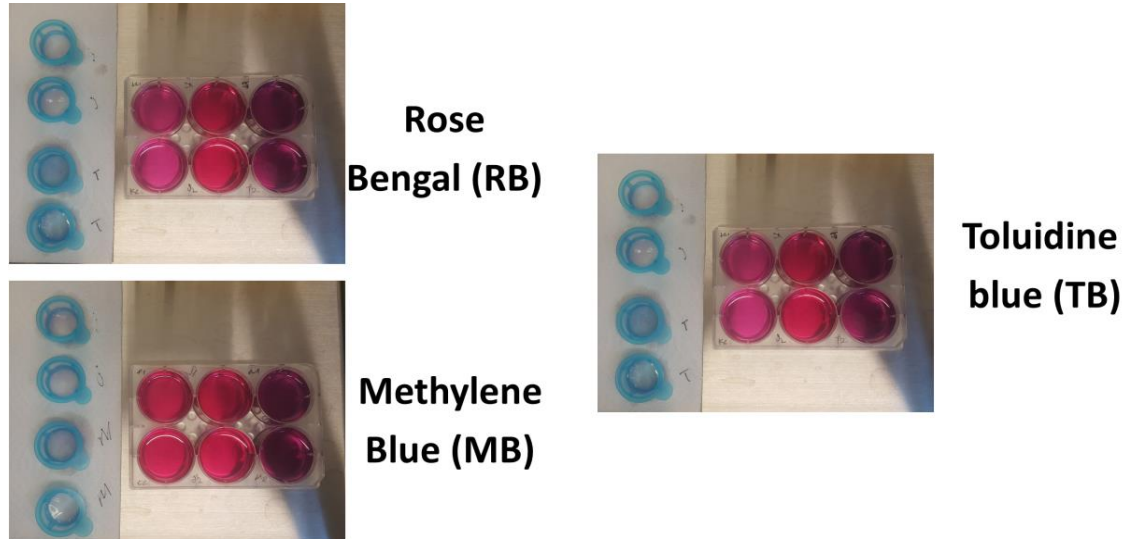
Çizelge 3.12'de belirtilen farklı fotoaktif bileşenler içeren sistemlerinin, hücreler ile olan etkisinin gözlemlenebilmesi için 3 gün süren bir deney protokolü sürdürüldü. Deneyin birinci günü hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Bunun için hücreler tripsin ile flasklardan kaldırıldı. Tripsini inhibe etmek için medyum eklendi, hücreler toplanarak 120xg'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet 1 ml PBS ile resüspanse edildi. Seyreltilen hücre süspansiyonundan 10 µl bir ependorfa alındı Tripan Mavisinden de 10 µl alınarak hücreler ile resüspanse edilerek hücreler sayıldı. Daha sonra PBS'li hücre karışımı yine santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, kalan pellet ise 500 µl'de kuyu başına kaç hücre isteniyorsa medyum ile seyreltildi. 100.000-500.000 hücre/kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 500 µl (ortalama 200000 hücre) ekildi.

Hücrelerin yapışması için bir gece bekletildi. Daha sonra medyum atıldı, örnekler özel bir filtre yardımıyla aşağıdaki şekildeki gibi kuyulara uygulandı (Şekil 3.12). Hücreler, belirlenen dozlardaki H₂O₂ ile ayrı 96 kuyucuklu Plate'lerde 6 saat süresince 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe

inkübe edildi. Daha sonra bu hücrelerde hassasiyeti, MTT sitotoksosite kiti çalışılarak saptandı. Şekil 3.13'te örneklerin bulunduğu ve hücre ekimi yapılan 6 kuyucuklu plakaların 24 saat sonraki görünümü verilmiştir.



Şekil 3.12. Jellerin hücrelere uygulanması



Şekil 3.13. Örneklerin bulunduğu ve hücre ekimi yapılan 6 kuyucuklu plakaların 24 saat sonraki görünümü

Hücre ekiminin takiben örnekler grubuna uygun olarak 1 saat LED ışığı altında tutuldu. Buna göre RB Yeşil ışık altında, MB ve TB Kırmızı ışık altında inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Örnekler fotodinamik terapi uygulanması

Çalışılacak her kuyucuğa 500 µl taze medyum ve 50 µl (MTT+PBS) solüsyonundan eklendi. 4 saat 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT’den oluşan formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 500 µl izopropanol’den her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı (izopropanol, formazanı çözerek absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağlamaktadır.). İzopropanol eklendikten sonra 1 saat içinde, dalga boyu olarak 570 nm ve referans dalga boyu olarak da 630 nm’de, plaka okuyucusunda plağın okuması yapıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorbans değerlerinin hidrojenlerle inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Deneyler üç kere tekrarlandı ve her gruptan 6 örnek çalışıldı.

Bu çalışmada normal insan hücresi olan HUVEC’lere ait inverted mikroskop görüntüleri inkübasyonlardan 24 saat sonra olup hücreler PBS içerisindeyken 4X büyütmeyle alındı ve kontrol grubu ile morfolojik olarak karşılaştırıldı.

II. Fibroblast hücre kültürü testleri

Çalışmada, L929 fibroblast hücre hattı kullanıldı. Öncelikle, -80°C dondurucuda saklanan hücreler çözülerek 5 mL steril PBS içerisinde 5 dk santrifüj edilmiş sonra süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %10’luk fetal sıgır serumu (FBS) çözeltisi ile %1’lik gentamisin bulunduran L-glutaminli DMEM (Dulbecco Modified Eagle’s Medium) (Sigma) besi ortamı ilave edildi. Pellet pipetaj yapılarak kaldırıldı ve hücreler homojenize edildi. Bu hücreler serolojik pipet yardımı ile T-25 hücre kültürü kabına (flask) (Corning) alındı. Bir hafta süresince 37 °C, %5CO₂’li atmosferde ve %95 nemli ortam sağlayan inkübatörde (ESCO) çoğalmaları sağlandı. Çoğalan hücreleri pasajlayabilmek ve deney setini oluşturabilmek için mevcut besi ortamı atıldıktan sonra steril fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Kültür kabındaki hücreler üzerine %0,25 Trypsin / etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi ilave edilerek hücrelerin

tutunduğu yüzeyden kaldırılmaları için 5 dk inkübatörde beklendi. Süspanse hücreler pipetaj ile homojenize edilerek Thoma lamında sayıldı. Sayılan hücreler 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve son hacim 100 uL olacak şekilde besi ortamı ilave edildi ve geceboyu inkübatörde bekletilerek kültür kabı yüzeyine tutunması sağlandı. Ertesi gün 1ppm, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm ve 1000ppm fotosensetizör içeren örnekler ilave edildi. PBS içeren ve herhangi bir fotosensetizör örnek içermeyen grup kontrol olarak değerlendirildi. Her bir konsantrasyon 6 tekrarlı olacak şekilde uygulandı. İnkübasyon ortamı LED ile aydınlatılmış (fotosensetizörlere uygun dalga boyunda) ve aydınlatılmamış olmak üzere ve inkübasyon süreleri 6, 12, 24 ve 48 saat olarak çalışılmıştır. Materyallerin sitotoksitelerinin belirlenmesi için, endotel hücre kültürü testlerinde de kullanılan ‘direkt temas test metodu’ uygulandı. Hücre Canlılığı Belirleme Protokolünde, hücre büyümesinin kantitatif ölçümü, MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir ve oluşan mavi rengin yoğunluğu fibroblastlarda hücre canlılık oranının bir ölçütüdür. Endotel hücre kültürü testlerinde de yapıldığı gibi yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorbans değerlerinin hidrojellerle inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Farklı fotosensetizör madde içeren sentetik hidrojel sistemlerin geniş bir konsantrasyon aralığındaki (1ppm, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm ve 1000ppm) MTT test sonuçları analiz edildi.

Yara iyileşmesi (hücre migrasyon) deneyleri ise, fibroblast hücreleri ile yapılan MTT testi sonuçlarına göre yüzde canlılıkları kıyaslandığında RB için 5ppm, MB için 1ppm ve TBO için 1ppm optimum konsantrasyonlar olarak belirlendi. L929 fibroblast hücreleri 6-kuyucuklu kültür kaplarına tam konfluent olacak şekilde ekildi ve DMEM besiyerinde geceboyu kültüre edildi. Ertesi gün, hücrelerin bulunduğu kuyucuklarda yara veya migrasyon alanını oluşturmak amacıyla 100uL’lik otomatik pipet ucu yardımıyla çizildi. 1xPBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler RB 5ppm, MB 1ppm ve TBO 1ppm konsantrasyonlarında fotosensetizör içeren hidrojel örnekleri ile DMEM besiyerinde 24 saat boyunca kültüre edildi. Kontrol olarak hücreler mevcut besiyeri ile beslenmiştir. Süre sonunda hücreler 10X objektifte fotoğrafları alınmıştır.

3.2.7. Ortam Kaynaklı Mikrobiyal Gelişim

Petri kabı içerisinde bekletilen 20ppm fotosensetizör madde içeren örnekler petrilerin kapakları açık bir şekilde hava güneş ışığı alan bir ortamda ve karanlık bir ortamda ayrı ayrı 1 gün boyunca bekletildi sonrasında kapakları kapatılarak inkübasyon fırınına alındı. Süreç sonunda petri kaplarındaki mikrobiyal gelişim gözlemlendi. Çizelge 3.14’te de görüldüğü gibi ışık almayan ortamda bekletilen hidrojellerde çeşitli mikroorganizmaların oluştuğu gözlemlendi.

3.2.8. Hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki salınım miktarlarının tespiti

Çizelge 3.3’de belirtilen şekilde 20ppm fotosensetizör madde içeren hidrojel örnekler çizelge 3.1’deki formülasyon kullanılarak elde edilen SBF (simüle vücut sıvısı) içerisinde 6 saat süresince bekletildi. Bu süre zarfında her yarım saatte bir Varian Cary 5000 Bio UV-Vis spektrofotometre cihazı ile absorbans ölçümleri alındı. Salınım

miktarlarını hesaplayabilmek için ayrıca TBO, MB ve RB fotosensetizörlerinin 5 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanarak konsantrasyona karşı absorbans miktarlarına bakıldı.

3.2.9. FTIR spektroskopisi ile yapı analizleri

Elde edilen hidrojel yapıda oluşan bağları yorumlayabilmek adına Bruker Tensor 27 FTIR cihazında infrared spektrum analizleri yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Sentetik Hidrojellerin Hazırlanmasında Farklı Oranlarda ve Molekül Ağırlıklarına Sahip PEG-PVA Yapılarının İncelenmesi

Hidrojel sistemlerin hazırlanması için uygun boraks miktarı denenirken eş zamanlı olarak da farklı molekül ağırlığına sahip PVA ve PEG yapıları çalışılarak fiziksel özellikleri görsel olarak incelendi. Çizelge 4.1’de elde edilen sonuçlar belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Molekül Ağırlıklarına sahip PVA-PEG kombinasyonlarının görsel yorumlanması

%20’lik PVA Çözeltileri	Polietilen Glikol	Görsel Yorum*
Mw~15,000	PEG 200	Fazla Akışkan
	PEG 300	Fazla Akışkan
	PEG 400	Fazla Akışkan
	PEG 600	Fazla Akışkan
	PEG 1450 (%50 suda)	Fazla Akışkan, Opak
Mw~61,000 (Mowiol 10-98)	PEG 200	Fazla Akışkan
	PEG 300	Fazla Akışkan
	PEG 400	Fazla Akışkan
	PEG 600	Fazla Akışkan
	PEG 1450 (%50 suda)	Fazla Akışkan, Opak
Mw~125,000 (Mowiol 20-98)	PEG 200	Verilen şekli koruyor, fazla esnek değil
	PEG 300	Verilen şekli koruyor, fazla esnek değil
	PEG 400	Verilen şekli koruyor, fazla esnek değil
	PEG 600	Verilen şekli uzun süre koruyabiliyor, esnek
	PEG 1450 (%50 suda)	Fazla esnek değil, Opak
Mw~130,000 (Mowiol 18-88)	PEG 200	Fazla esnek değil
	PEG 300	Fazla esnek değil
	PEG 400	Fazla esnek değil
	PEG 600	Fazla esnek değil
	PEG 1450 (%50 suda)	Fazla esnek değil, Opak
*%20’lik PVA çözeltileri içerisine PEG yapıları 500 rpm hızda karıştırılarak damla damla eklendi. Görsel değerlendirmeler oluşan köpüklenmenin gitmesi amacıyla yaklaşık 1 saat sonra yapıldı.		

4.2. Sentetik Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdelerinin incelenmesi

S-2, S-3 ve S-7 sistemleri 48 saat saf su içerisinde bekletildiğinde sistemler tamamen çözündü. Diğer sistemlerin jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri metot kısmında belirtilen şekilde hesaplandı. Deneyler üçerli şekilde tekrarlanıp, verilerin ortalaması alındı. Çizelge 4.2’de elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri

PVA:B:PEG*		w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w _{jel} değeri (g)	Jelleşme Yüzdesi (%)	Çözünürlük Yüzdesi (%)
10:0.5:0	S-1	6.061	0.712	-	-	-
10:1:0	S-2	6.069	0.677	-	-	-
10:1.5:0	S-3	6.007	0.759	-	-	-
10:0.5:1	S-4	6.067	0.767	0.626	81.617	18.383
10:0.5:2.5	S-5	6.057	0.876	0.672	76.712	23.288
10:0.5:5	S-6	6.048	1.029	0,668	64.917	35.083
10:1:1	S-7	6.032	0.762	-	-	-
10:1:2.5	S-8	6.014	0.848	0.422	49.764	50.236
10:1:5	S-9	6.000	0.991	0,447	45.106	54.894
10:1.5:1	S-10	Çapraz bağ oluşumu sırasında homojen karışım sağlanamadığı için testler yapılamadı. Ayrıca oluşan polimer diğer sistemlere kıyasla bulanık görünümdeydi.				
10:1.5:2.5	S-11					
10:1.5:5	S-12					
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na2B4O7·10H2O), PEG= Polietilen glikol 600						

4.3. Sentetik Hidrojellerin Su Tutma Kapasitelerinin İncelenmesi

Sabit tartıma gelinceye dek etüvde kurutulan hidrojeller 48 saat süresince ortam koşullarında saf su içerisinde bekletildi. Süre sonunda suyu emmiş olan hidrojeller bir filtre kağıdı üzerine hafifçe tutularak yüzeydeki aşırı su tahliye edildi, hassas terazide tartıldı, su tutma kapasiteleri belirlendi. Çizelge 4.3’te sentetik hidrojellerin su tutma kapasiteleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sentetik hidrojellerin su tutma kapasiteleri

PVA:B:PEG*		w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w ₂ değeri (g)	Su Tutma Kapasitesi (%)
10:0.5:0	S-1	6.061	0.712	-	-
10:1:0	S-2	6.069	0.677	-	-
10:1.5:0	S-3	6.007	0.759	-	-
10:0.5:1	S-4	6.067	0.767	5.012	553.455
10:0.5:2.5	S-5	6.057	0.876	4.128	371.233
10:0.5:5	S-6	6.048	1.029	4.431	330.612
10:1:1	S-7	6.032	0.762	-	-
10:1:2.5	S-8	6.014	0.848	14.135	1566.863
10:1:5	S-9	6.000	0.991	14.369	1349.949
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

4.4. Sentetik hidrojellerinin Şişme Davranışlarının İncelenmesi

Hidrojellerin şişme davranışları zamana, sıcaklığa ve pH değerlerine karşı incelenmiştir.

4.4.1. Sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi

Elde edilen hidrojellerin zamanla şişme değerlerinin değişimi pH değeri 7.4'e ayarlanmış simüle vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletilerek incelenmiştir. Sentetik hidrojellerin yüzde şişme değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi

PVA:B:PEG*		w₀ değeri (g)	w₁ değeri (g)	3saat sonra w_{şiş3} değeri (g)	6 saat sonra w_{şiş6} değeri (g)	21 saat sonra w_{şiş21} değeri (g)	48 saat sonra w_{şiş48} değeri (g)
10:0.5:0	S-1	6.048	0.714	3.118	3.271	3.454	-
10:1:0	S-2	6.021	0.695	3.784	4.715	5.900	-
10:1.5:0	S-3	6.037	0.741	2.514	5.122	-	-
10:0.5:1	S-4	6.025	0.776	2.991	3.110	3.432	3.403
10:0.5:2.5	S-5	6.025	0.850	3.289	3.373	3.620	3.650
10:0.5:5	S-6	6.026	1.013	3.610	3.704	3.798	3.832
10:1:1	S-7	6.015	0.768	4.960	5.214	5.681	5.121
10:1:2.5	S-8	6.021	0.849	4.654	5.047	5.801	5.512
10:1:5	S-9	6.011	1.013	4.286	4.59	4.992	4.859
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600							

4.4.2. Sentetik hidrojellerin farklı sıcaklıktaki şişme değerlerinin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerleri; pH=7.4'e ayarlanmış fosfat tamponu içerisinde 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle incelendi. Çizelge 4.5'te 4°C'de, Çizelge 4.6'da 25°C'de ve Çizelge 4.7'de 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle beklettilen hidrojel örneklerinin verileri yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Sentetik hidrojellerin 4°C sıcaklıktaki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w _{4°C} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.022	0.711	-	-
10:1:0	S-2	6.056	0.699	-	-
10:1.5:0	S-3	6.021	0.739	-	-
10:0.5:1	S-4	6.001	0.769	1.381	79.584
10:0.5:2.5	S-5	6.040	0.852	1.502	76.291
10:0.5:5	S-6	6.002	1.009	1.557	56.293
10:1:1	S-7	6.001	0.764	2.072	171.204
10:1:2.5	S-8	6.061	0.855	2.209	158.362
10:1:5	S-9	6.023	1.015	1.948	91.921
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

Çizelge 4.6. Sentetik hidrojellerin 25°C sıcaklıktaki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri Sentetik hidrojeller in 25°C sıcaklıktak i şişme değerleri (g)	w _{25°C} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.099	0.728	-	-
10:1:0	S-2	6.031	0.696	-	-
10:1.5:0	S-3	6.015	0.738	-	-
10:0.5:1	S-4	6.053	0.779	2.831	263.415
10:0.5:2.5	S-5	6.001	0.842	3.040	261.045
10:0.5:5	S-6	6.020	1.012	3.202	216.403
10:1:1	S-7	6.015	0.768	4.267	455.599
10:1:2.5	S-8	6.056	0.854	4.589	437.354
10:1:5	S-9	6.000	1.009	4.051	301.487
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

Çizelge 4.7. Sentetik hidrojellerin 37°C sıcaklıktaki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w0 değeri (g)	w1 değeri (g)	w37°C değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.003	0.709	-	-
10:1:0	S-2	6.061	0.699	-	-
10:1.5:0	S-3	6.005	0.737	-	-
10:0.5:1	S-4	6.091	0.784	3.511	347.832
10:0.5:2.5	S-5	6.000	0.842	3.684	337.530
10:0.5:5	S-6	6.069	1.021	3.951	286.974
10:1:1	S-7	6.099	0.781	5.128	556.594
10:1:2.5	S-8	6.051	0.853	5.524	547.597
10:1:5	S-9	6.004	1.011	4.868	381.503
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na2B4O7·10H2O), PEG= Polietilen glikol 600					

4.4.3. Farklı pH değerlerinde sentetik hidrojellerin şişme değerlerinin incelenmesi

Etüvde kurutularak sabit tartıma getirilmiş hidrojeller (w_1) farklı pH değerlerine sahip, pH=1, pH=5.5 ve pH=7.4'e olacak şekilde ayarlanmış çözeltiler içerisinde 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle bekletilerek incelendi. Çizelge 4.8'de pH=1 olan, çizelge 4.9'da pH 5.5 olan ve Çizelge 4.10'da pH=7 olan simüle sıvılardaki sentetik hidrojellerin şişme değerleri verilmiştir.

Farklı pH değerlerinin eldesinde;

pH = 1.0 / 0,1 M HCl çözeltisi

pH = 5,5 / 10 mM Asetad tamponu

pH = 7.4 / 50 mM trishidroksimetil aminometan ve 45 mM hidroklorik asit kullanıldı.

Çizelge 4.8. Sentetik hidrojellerin pH=1 olan simüle gastrik sıvısı içindeki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w₀ değeri (g)	w₁ değeri (g)	w_{pH=1} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.051	0.710	2.460	246.479
10:1:0	S-2	6.032	0.722	2.340	224.100
10:1.5:0	S-3	6.016	0.716	2.421	238.128
10:0.5:1	S-4	6.018	0.764	2.522	230.105
10:0.5:2.5	S-5	6.015	0.851	2.734	221.269
10:0.5:5	S-6	6.005	1.002	3.213	220.659
10:1:1	S-7	6.020	0.754	2.422	221.220
10:1:2.5	S-8	6.033	0.844	2.709	220.971
10:1:5	S-9	6.009	1.010	2.837	180.891
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

Çizelge 4.9. Sentetik hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w₀ değeri (g)	w₁ değeri (g)	w_{pH=5.5} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.032	0.714	2.477	246.919
10:1:0	S-2	6.034	0.715	2.878	302.517
10:1.5:0	S-3	6.089	0.731	3.495	378.112
10:0.5:1	S-4	6.023	0.785	2.729	247.643
10:0.5:2.5	S-5	6.023	0.849	2.920	243.934
10:0.5:5	S-6	6.042	1.010	3.333	230.000
10:1:1	S-7	6.016	0.751	3.368	348.469
10:1:2.5	S-8	6.020	0.847	3.094	265.289
10:1:5	S-9	6.006	0.989	3.601	264.105
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

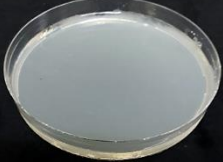
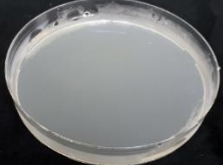
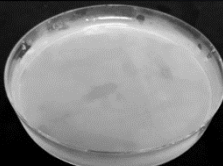
Çizelge 4.10. Sentetik hidrojelilerin pH=7.4 olan simüle vücut sıvısı içindeki şişme değerleri

PVA:B:PEG*		w0 değeri (g)	w1 değeri (g)	wpH=7.4 değeri (g)	Şişme Değeri (%)
10:0.5:0	S-1	6.048	0.714	3.410	377.591
10:1:0	S-2	6.021	0.695	-	-
10:1.5:0	S-3	6.037	0.741	-	-
10:0.5:1	S-4	6.025	0.776	3.403	338.531
10:0.5:2.5	S-5	6.025	0.850	3.650	329.418
10:0.5:5	S-6	6.026	1.013	3.832	278.282
10:1:1	S-7	6.015	0.768	5.121	566.797
10:1:2.5	S-8	6.021	0.849	5.512	549.234
10:1:5	S-9	6.011	1.013	4.859	379.664
*PVA= Mw~125,000 (Mowiol 20-98), B= Disodyum tetraborat dekahidrat (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O), PEG= Polietilen glikol 600					

4.5. Hibrit Sistem Denemeleri

Matriks sistemi hibrit olan sistem denemelerinde; polivinil prolidon (PVP), karboksimetil selüloz (CMC), agar-agar, polietilen glikol (PEG) ve gliserin farklı oranlarda kullanılarak hibrit sistem hazırlanmıştır. Çizelge 4.11’de hazırlanan hibrit hidrojel sistemlerin görünümleri yer almaktadır.

Çizelge 4.11. Hibrit sistemlerde kullanılan maddelerin oranları ve örneklerin görünümüleri

Sistem Adı	Sistem Oranları PVP:CMC:PEG:Agar:Gliserin	Görünüm
H-1	0.8 : 0.2 : 1 : 2 : 1	
H-2	0.5 : 0.5 : 1 : 2 : 1	
H-3	0.4 : 0.8 : 1 : 2 : 1	
H-4	0.2 : 0.8 : 1 : 2 : 1	

4.5.1. Hibrit hidrojenlerin su tutma kapasiteleri

Hibrit hidrojenlerin su tutma kapasiteleri sentetik hidrojenler ile aynı yöntemde test edilmiştir. Elde edilen hibrit hidrojenlerin su tutma kapasitesi Çizelge 4.12’de, pH=1 olan simüle gastrik sıvısı içindeki şişme değerleri Çizelge 4.13’te, pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değerleri Çizelge 3.14’te ve pH=7.4 olan simüle vücut sıvısı içindeki şişme değerleri Çizelge 3.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.12. Hibrit hidrojenlerin su tutma kapasiteleri

Sistem Adı	w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w ₂ değeri (g)	Su Tutma Kapasitesi (%)
H-1	3.991	0.287	0.661	130.314
H-2	4.383	0.288	1.197	315.625
H-3	6.084	0.284	3.386	1092.252
H-4	7.436	0.3269	4.035	1134.322

Çizelge 4.13. Hibrit hidrojenlerin pH=1 olan simüle gastrik sıvısı içindeki şişme değerleri

Sistem Adı	w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w _{pH=1} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
H-1	5.464	0.418	0.647	54.785
H-2	3.436	0.283	2.747	870.671
H-3	5.224	0.249	0.984	295.181
H-4	4.494	0.205	0.764	272.683

Çizelge 4.14. Hibrit hidrojenlerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki şişme değerleri

Sistem Adı	w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w _{pH=5.5} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
H-1	3.864	0.295	0.511	72.220
H-2	3.908	0.345	3.475	907.246
H-3	5.027	0.243	2.790	1048.148
H-4	3.205	0.159	2.005	1161.006

Çizelge 4.15. Hibrit hidrojenlerin pH=7.4 olan simüle vücut sıvısı içindeki şişme değerleri

Sistem Adı	w ₀ değeri (g)	w ₁ değeri (g)	w _{pH=7.4} değeri (g)	Şişme Değeri (%)
H-1	5.108	0.375	1.942	417.867
H-2	6.984	0.474	1.808	218.435
H-3	7.256	0.335	1.150	243.283
H-4	7.247	0.320	0.815	154.687

4.6. Çekme-Kopma Testleri

SHIMADZU marka AGS-X serisi çekme-basma test cihazı ile örneklerin maksimum gerilme, kopma gerilmesi ve % kopma gerinim değerlerine bakılmıştır. Örnekler yaklaşık 20mm en, 100mm boy ve 5mm kalınlık olacak şekilde hazırlanmış ve cihaz çekme hızı 20mm/min olacak şekilde ayarlanmıştır. Çizelge 4.16'da elde çekme-kopma verileri yer almaktadır. Sentetik hidrojel sistemler arasında S-5, hibrit hidrojel sistemler arasından ise H-4 sistemi kendi grupları içerisinde en yüksek % kopma gerilimini vermiştir.

Çizelge 4.16. Hidrojellerin çekme-kopma test sonuçları

PVA:B:PEG	Adı	Maksimum Gerilme N/mm²	Kopma Gerilmesi N/mm²	Kopma Gerinimi %
10:0.5:0	S-1	370.198	367.574	37.9569
10:1:0	S-2	448.930	438.477	58.2003
10:1.5:0	S-3	683.405	683.405	1.71387
10:0.5:1	S-4	300.446	268.536	59.1237
10:0.5:2.5	S-5	276.627	258.041	100.364
10:0.5:5	S-6	302.812	299.415	51.4036
10:1:1	S-7	302.073	302.073	33.5670
10:1:2.5	S-8	302.429	302.429	37.3303
10:1:5	S-9	257.285	236.620	41.3836
PVP:CMC:PEG:Agar:Gliserin				
0.4 : 0.8 : 1 : 2 : 1	H-3	12.5365	-	-
0.2 : 0.8 : 1 : 2 : 1	H-4	62.3345	61.0026	31.0436

4.7. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları

Elde edilen örneklerin bakteri analizleri gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kültürleri kullanılarak, JIS Z 2801 standardı modifiye edilerek gerçekleştirildi.

Bakteri analizi sonucunda (çizelge 4.17) matriks sistemleri için; MB ve TBO 40ppm, RB için 20 ppm konsantrasyon değerlerinin bakteri yükündeki log 3 'lük azalmayı sağladığı saptandı. Hibrit sistemlerde düşük aktivite görüldüğü için in-vitro çalışmalarda sadece sentetik hidrojel sistemleri ile devam edilmesine karar verildi.

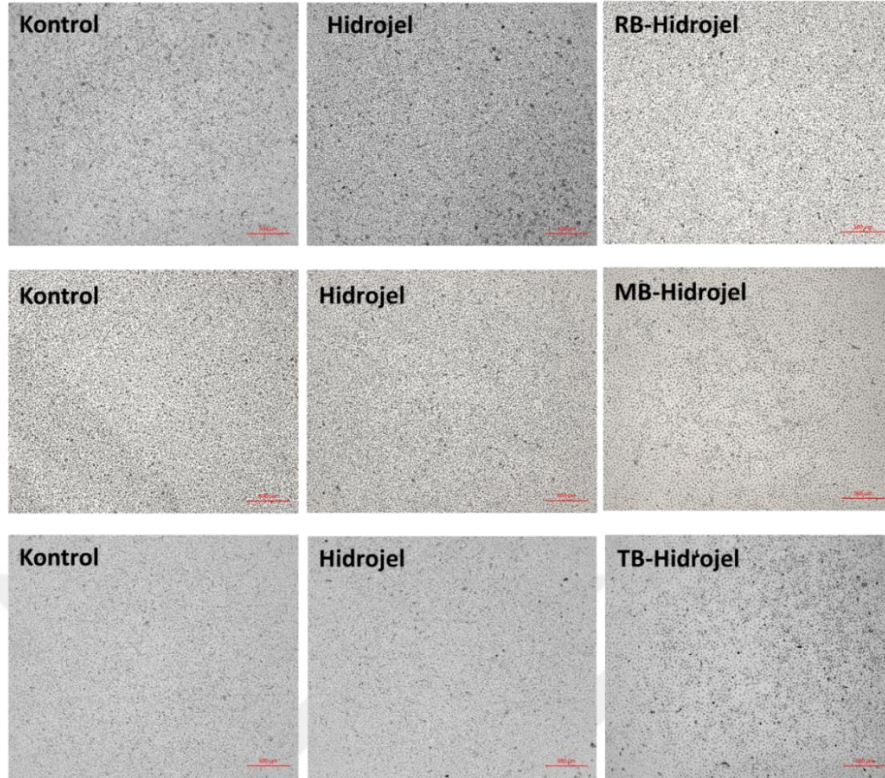
Çizelge 4.17. Antimikrobiyal analiz sonuçları

Sistemler	Bakteriyel yükte % azalma*		Logaritmik azalma miktarları	
Sentetik sistem - TBO	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0 ppm	0	0	-	-
5 ppm	0	0	-	-
10 ppm	30.82	25.53	0.16	0.13
20 ppm	90.00	90.00	1	1
40 ppm	99.90	99.90	3	3
Sentetik sistem - MB	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
5 ppm	0	0	-	-
10 ppm	35.43	35.10	0.19	0.19
20 ppm	98.71	90.00	1.89	1
40 ppm	99.90	99.90	3	3
Sentetik sistem - RB	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
5 ppm	76.01	66.25	0.62	0.47
10 ppm	99.26	99.00	2.13	2
20 ppm	99.90	99.90	3	3
Hibrit Sistem - RB	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
5 ppm	0	0	-	-
10 ppm	0	0	-	-
20 ppm	20.57	20.20	0.10	0.10
40 ppm	64.52	55.08	0.45	0.35
80 ppm	74.30	60.47	0.59	0.40
*Petri kabına uygulanan bakteri yükü yaklaşık = $10^3 - 2 \times 10^3$				

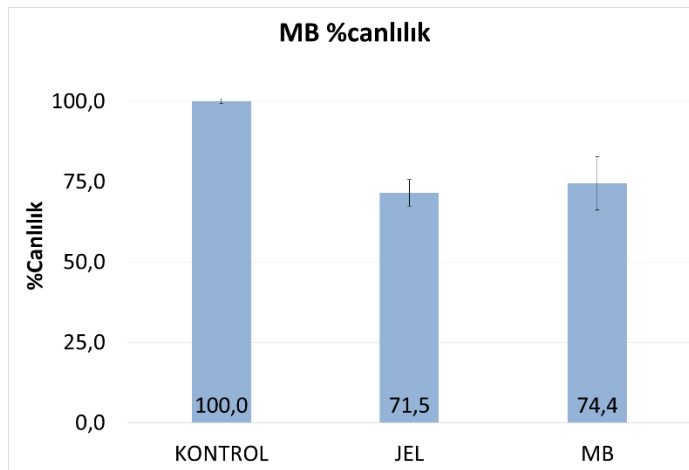
4.8. Hücre Kültürü Testleri

4.8.1. Endotel hücre kültürü testleri

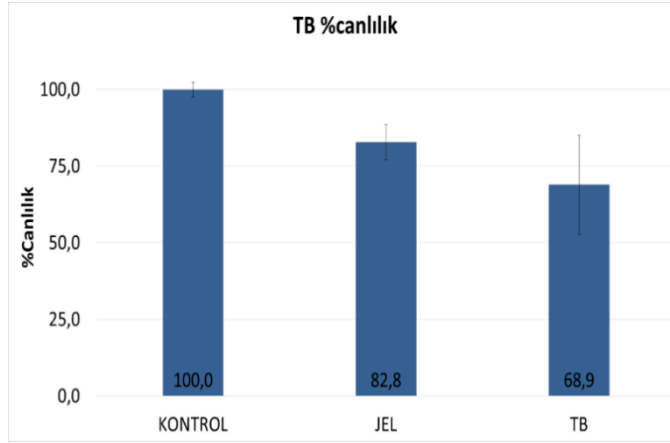
Hücrelerin pasajlanmasında, normal hücre hattı olarak insan göbek ven damarından türemiş olan endotel hücre (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC) dizileri kullanılmıştır. Testler sonucunda elde edilen HUVEC'lere ait inverted mikroskop görüntüleri inkübasyonlardan 24 saat sonra olup hücreler PBS içerisindeyken 4X büyütmeyle alınmış ve kontrol grubu ile morfolojik olarak karşılaştırılmıştır. Şekil 4.1'de hücre ekimi yapılan çözeltideki örneklerin 24 saat sonraki görünümü yer almaktadır. Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te fotosensitizörlerin HUVEC ile MTT sonuçları grafiksel olarak belirtilmiştir. Çizelge 4.18'de HUVEC ile MTT denemelerinin standart sapmaları belirtilmiştir.



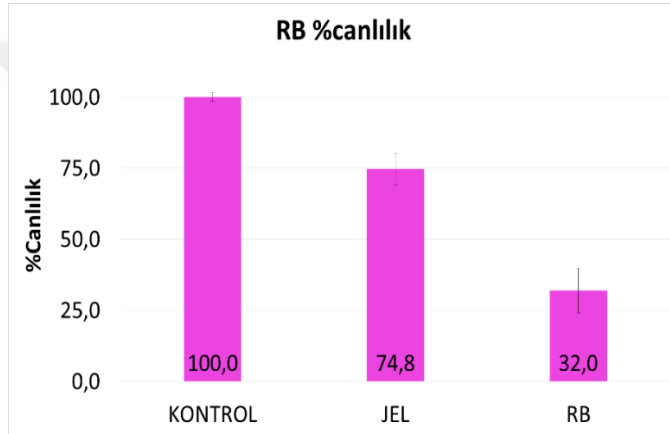
Şekil 4.1. HUVEC hücrelerinin kontrol grubunun sadece jel olan ve fotosensitif madde içeren jeller ile inkübasyon sonucundaki morfolojisi.



Şekil 4.2. MB ve HUVEC ile MTT sonuçları



Şekil 4.3. TBO ve HUVEC ile MTT sonuçları



Şekil 4.4. RB ve HUVEC ile MTT sonuçları

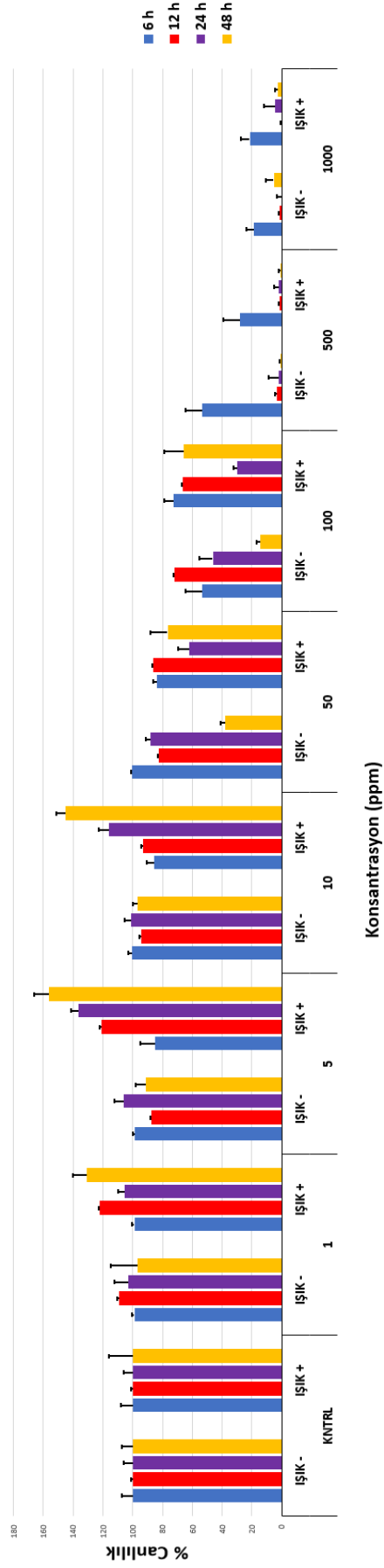
Çizelge 4.18. HUVEC ile MTT denemelerinin standart sapmaları

	%Canlılık	% Standart Sapma
Kontrol	100	1.63
Hidrojel sistem	74.76	5.57
Hidrojel sistem + RB	32.01	7.89
Kontrol	100	0.77
Hidrojel sistem	71.49	4.17
Hidrojel sistem + MB	74.44	8.29
Kontrol	100	2.36
Hidrojel sistem	82.85	5.72
Hidrojel sistem + TBO	68.93	16.17

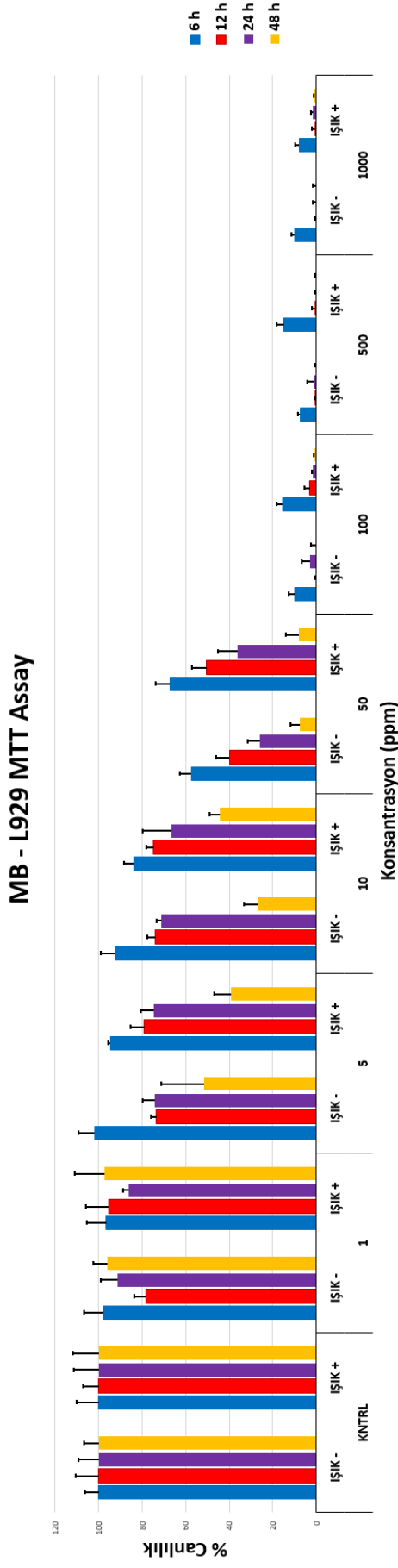
4.8.2. Fibroblast hücre kültürü testleri

Çalışmada, L929 insan fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7’de farklı sistemlerin geniş bir konsantrasyon aralığındaki (1ppm, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm ve 1000ppm) MTT test sonuçları verilmiştir.

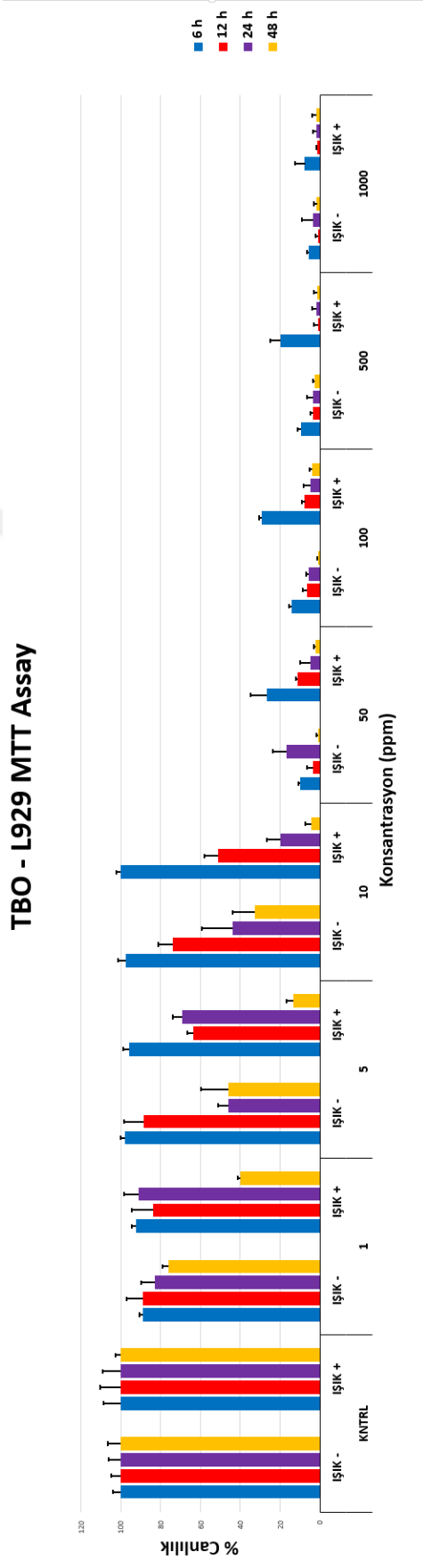
RB - L929 MTT Assay



Şekil 4.5. RB içeren örneğin için MTT test sonucu



Şekil 4.6. MB içeren örneğin için MTT test sonucu



Şekil 4.7. TBO içeren örneğin için MTT test sonucu

Çizelge 4.19. RB içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları

Zaman	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h	100	100	98,918	98,918	98,701	84,735	100,649	85,670	100,649	83,801	53,247	72,586	53,247	27,726	18,615	21,495
12 h	100	100	109,158	121,864	87,179	121,147	94,505	93,190	82,418	86,022	71,795	66,308	3,297	1,075	1,099	0
24 h	100	100	102,985	105,714	105,970	136,191	100,995	115,714	88,060	61,905	46,269	30,000	1,990	1,905	0,000	4,286
48 h	100	100	96,894	130,584	91,097	156,014	96,480	145,361	38,095	76,632	14,286	65,636	0,620	1,031	5,383	2,749
Standart Sapma	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h STD	7,375	7,985	1,634	1,634	1,299	9,905	2,249	4,610	0,649	2,352	11,415	6,081	11,415	11,685	4,874	5,685
12 h STD	8,995	5,376	6,345	3,776	12,641	9,395	16,593	8,953	6,118	19,385	7,480	20,468	1,099	4,687	5,815	2,845
24 h STD	6,214	6,227	9,079	4,286	6,506	5,017	4,560	7,143	2,985	7,868	8,955	2,474	6,730	2,974	2,985	7,559
48 h STD	7,064	16,015	17,970	9,240	6,813	9,906	3,187	5,740	2,801	11,309	2,586	13,415	0,949	1,031	5,283	1,575

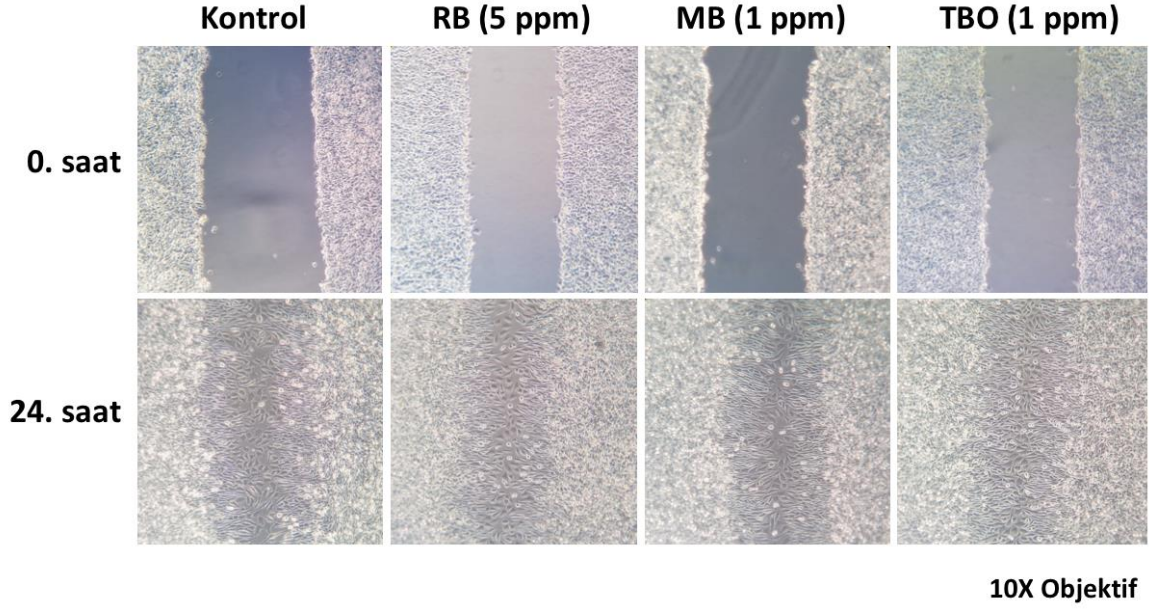
Çizelge 4.20. MB içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları

Zaman	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h	100	100	97,744	96,436	101,754	94,549	92,481	83,857	57,393	67,296	9,774	15,514	7,3934	14,885	9,900	7,757
12 h	100	100	78,142	95,395	73,497	78,947	73,770	74,781	39,890	50,439	0	2,851	0,273	0,658	0	0,658
24 h	100	100	91,453	86,111	74,074	74,537	71,225	66,667	25,926	36,342	2,849	1,620	1,139	0,463	0	1,389
48 h	100	100	96,160	97,436	51,658	39,250	26,876	44,3787	7,330	7,889	0	0,591	0	0,394	0,174	0,986
Standart Sapma	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h STD	6,227	10,245	8,952	9,034	7,351	0,961	6,522	4,417	5,132	6,626	2,936	2,542	0,868	3,464	1,565	1,921
12 h STD	10,379	6,869	5,579	10,340	2,504	6,480	3,756	3,376	6,206	6,590	0,820	2,491	0,473	1,316	0,820	1,140
24 h STD	9,005	11,474	7,597	2,406	5,691	6,067	1,974	13,249	5,495	8,821	4,039	0,401	3,002	0,401	1,709	1,203
48 h STD	6,629	11,820	6,023	13,678	19,459	7,492	6,246	4,697	4,564	6,271	2,399	0,592	0,524	0,342	1,318	0,342

Çizelge 4.21. TBO içeren hidrojel örneğin MTT test sonuçları ve standart sapmaları

Zaman	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h	100	100	88,888	92,424	98,062	95,707	97,416	100,25	10,077	26,515	14,211	29,292	9,6899	19,949	5,5555	7,576
12 h	100	100	89,010	83,838	88,644	63,804	73,992	51,178	3,663	11,111	6,593	7,575	3,663	0,841	1,099	1,346
24 h	100	100	83,137	91,016	45,882	69,030	43,922	19,858	16,862	4,964	5,490	4,964	3,529	1,891	3,529	1,891
48 h	100	100	76,170	39,904	45,816	13,301	32,624	4,487	0,709	2,243	0,851	4,006	2,553	1,282	1,560	1,923
Standart Sapma	Kontrol		1 ppm		5 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +	IŞIK -	IŞIK +
6 h STD	4,101	8,736	1,950	2,004	1,937	3,061	4,034	2,186	0,775	8,436	1,184	1,157	1,343	4,929	0,806	4,731
12 h STD	4,955	10,606	7,924	10,509	9,601	2,782	7,065	6,782	2,765	0,875	1,903	1,336	1,269	2,041	1,099	0,292
24 h STD	6,225	9,220	6,893	7,517	5,391	4,722	15,354	6,765	6,893	4,914	1,358	3,091	3,113	2,167	5,391	1,476
48 h STD	6,388	2,775	2,979	1,442	14,025	3,411	11,099	2,733	0,886	1,000	0,425	1,000	0,851	1,820	1,494	1,820

Fibroblast hücreler için hücre migrasyon deneyi için, fibroblast hücreleri ile yapılan MTT testi sonuçlarına göre yüzde canlılıkları dikkate alınarak RB için 5ppm, MB için 1ppm ve TBO için 1ppm optimum konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Uygulanan prosedürler sonucunda hücrelerin 10X objektifte çekilen fotoğrafları şekil 4.8’de yer almaktadır.



Şekil 4.8. Hücre migrasyon deney sonucu

4.9. Ortam Kaynaklı Mikrobiyal Gelişim

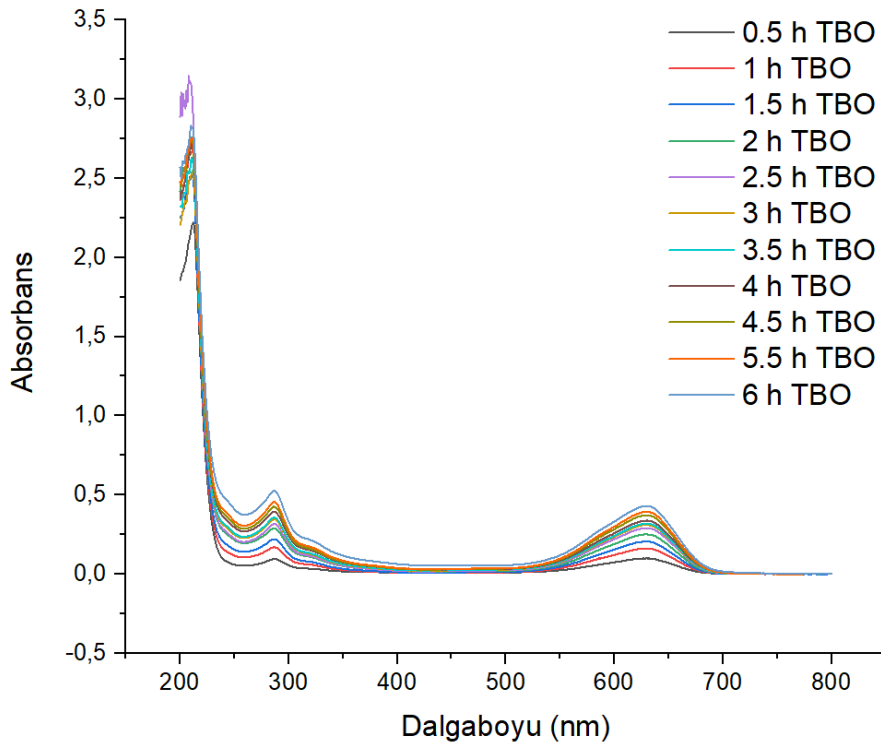
Petri kabı içerisinde bekletilen 20ppm fotosensitizör madde içeren örnekler petrilerin kapakları açık bir şekilde hava güneş ışığı alan bir ortamda ve karanlık bir ortamda ayrı ayrı 1 gün boyunca bekletilmiş sonrasında kapakları kapatılarak inkübasyon fırınına alınmıştır. Çizelge 4.19’da süreç sonrasında petri kaplarında oluşan mikrobiyal gelişim görülmektedir.

Çizelge 4.22. Ortam analizi

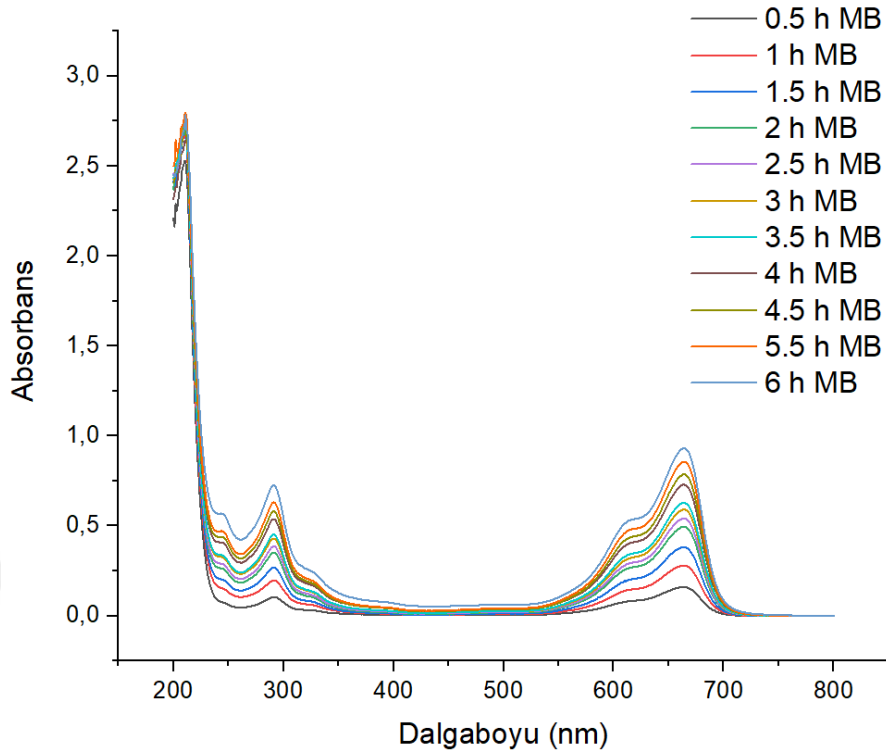
	TBO 20 ppm	MB 20 ppm	RB 20 ppm
Karanlık Ortamda			
Güneş Işığı Alan Ortamda			

4.10. Hidrojellerin pH=5.5 olan simüle cilt sıvısı içindeki salınım miktarları

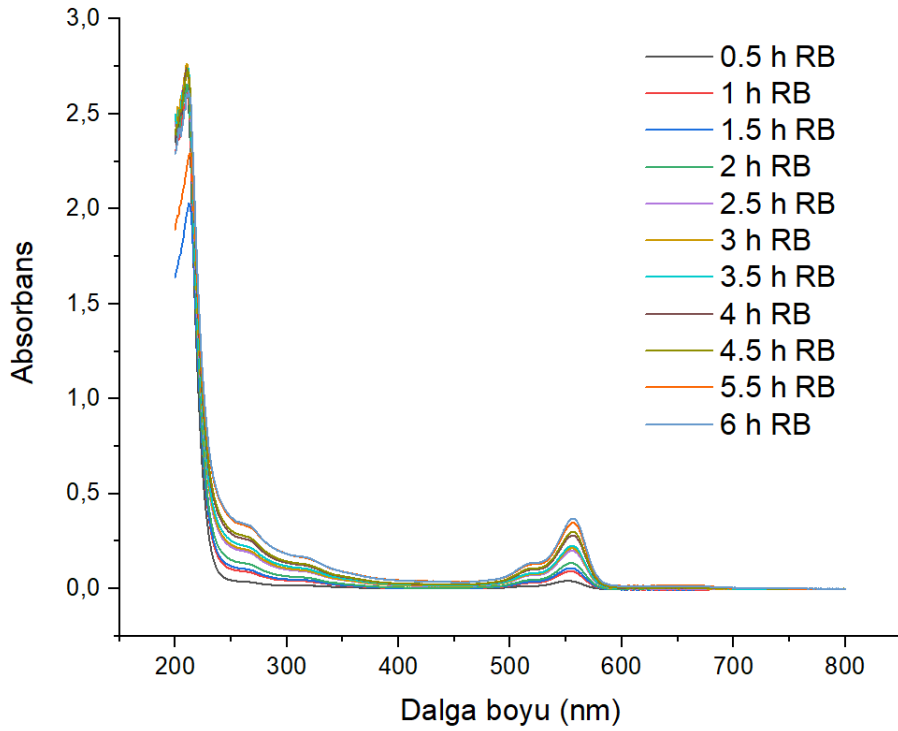
Simüle vücut sıvısı (SBF) içerisinde 6 saat süresince bekletilen 20ppm fotosensetizör madde içeren hidrojel örnekler her yarım saatte bir Varian Cary 5000 Bio UV-Vis spektrofotometre cihazı ile absorbans ölçümleri alındı. Şekil 4.9'da TBO, 4.10'da MB ve 4.11'de RB içeren hidrojellerin zamana bağımlı olarak SBF çözeltisi içerisindeki salınımını ve bu çözeltideki absorbans değişimi gösterilmektedir. Çizelge 4.20'de 6 saat süresince fotosensetizörlerin SBF çözeltisi içerisine salınım miktarları verilmiştir. Salınım miktarlarını hesaplayabilmek için TBO, MB ve RB fotosensetizörlerinin 5 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanarak konsantrasyona karşı absorbans grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.12 TBO, şekil 4.13 MB ve şekil 4.14 RB içeren hidrojellerin zamanla yaptıkları salınım miktarlarının grafiğe aktarılmış halidir.



Şekil 4.9. İçerisinde TBO fotosensetizörü bulunan hidrojinin salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri



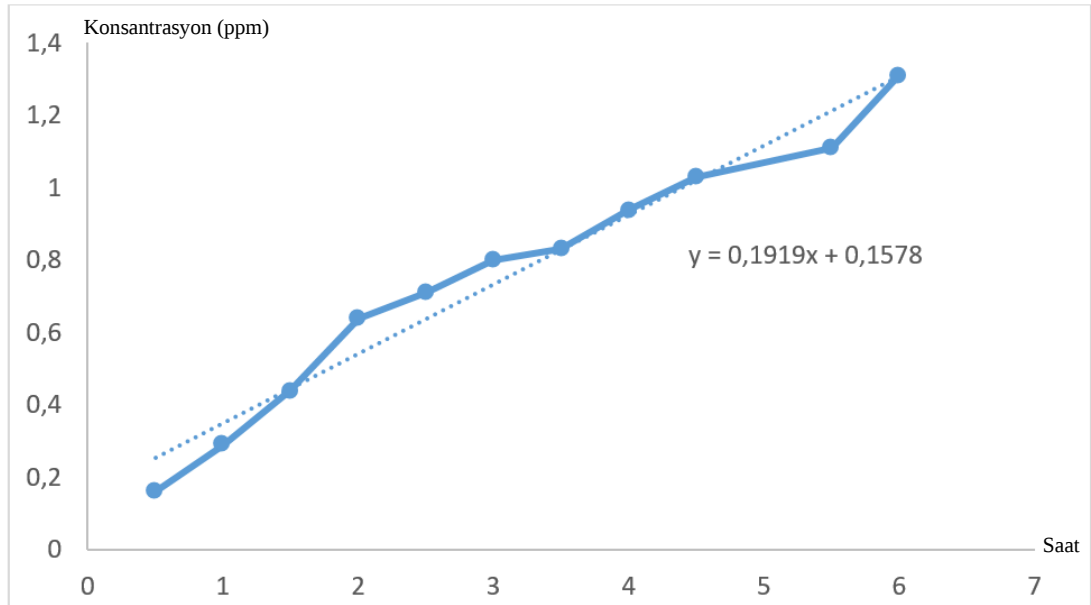
Şekil 4.10. İçerisinde MB fotosensetizörü bulunan hidrojelın salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri



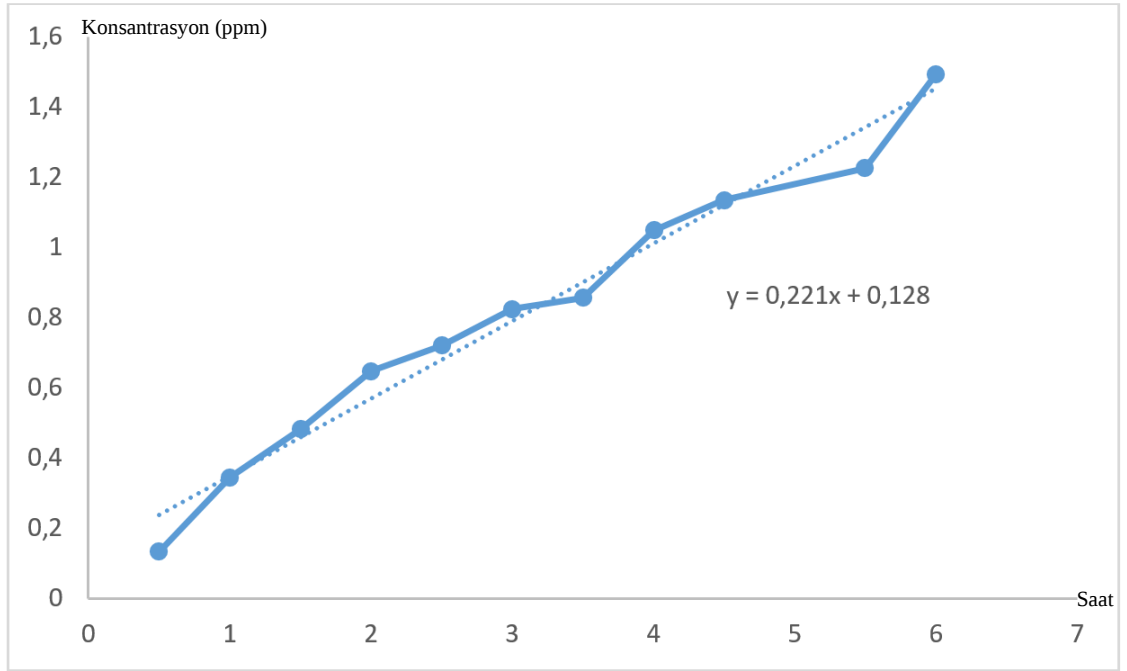
Şekil 4.11. İçerisinde RB fotosensetizörü bulunan salınım yaptığı SBF çözeltisinin absorbans değerleri

Çizelge 4.23. Fotosensetizör içeren hidrojelilerin SBF çözeltisi içerisindeki salınım miktarı

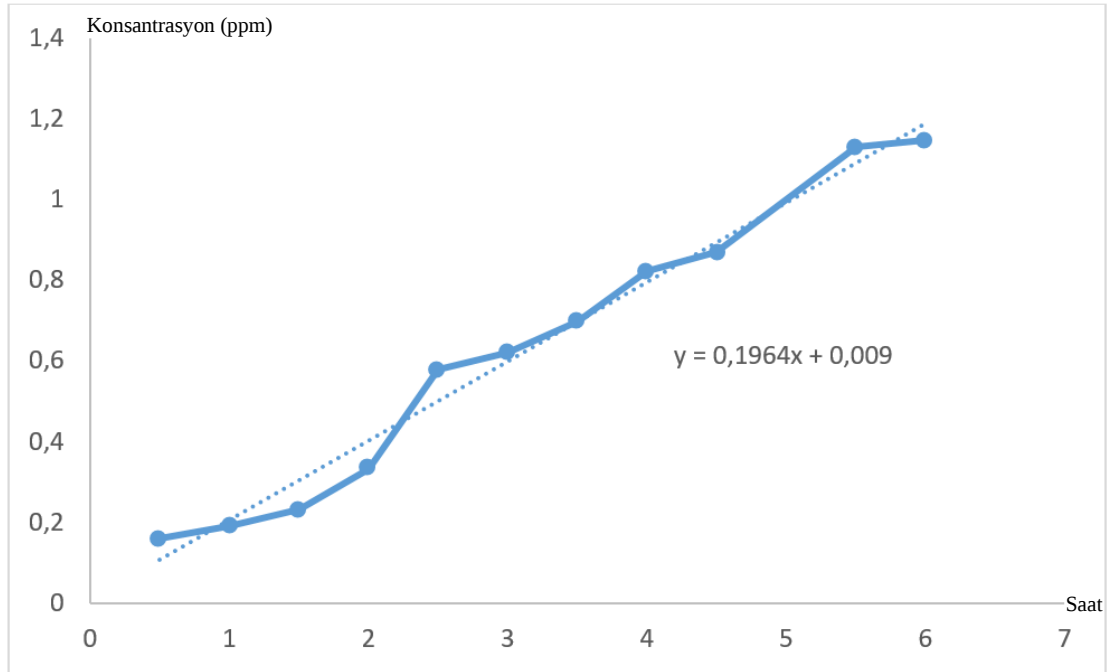
TBO içeren hidrojin SBF içerisindeki konsantrasyon değerleri										
0.5 h	1h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h	4.5 h	5.5 h	6 h
0.16	0.29	0.44	0.64	0.71	0.80	0.83	0.94	1.03	1.11	1.31
MB içeren hidrojin SBF içerisindeki konsantrasyon değerleri										
0.5 h	1h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h	4.5 h	5.5 h	6 h
0,13	0,34	0,48	0,65	0,72	0,82	0,86	1,04	1,14	1,23	1,49
RB içeren hidrojin SBF içerisindeki konsantrasyon değerleri										
0.5 h	1h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h	4.5 h	5.5 h	6 h
0.16	0.19	0.23	0.33	0.58	0.62	0.70	0.82	0.87	1.13	1.14



Şekil 4.12. TBO içeren hidrojin SBF içerisindeki salınım grafiği



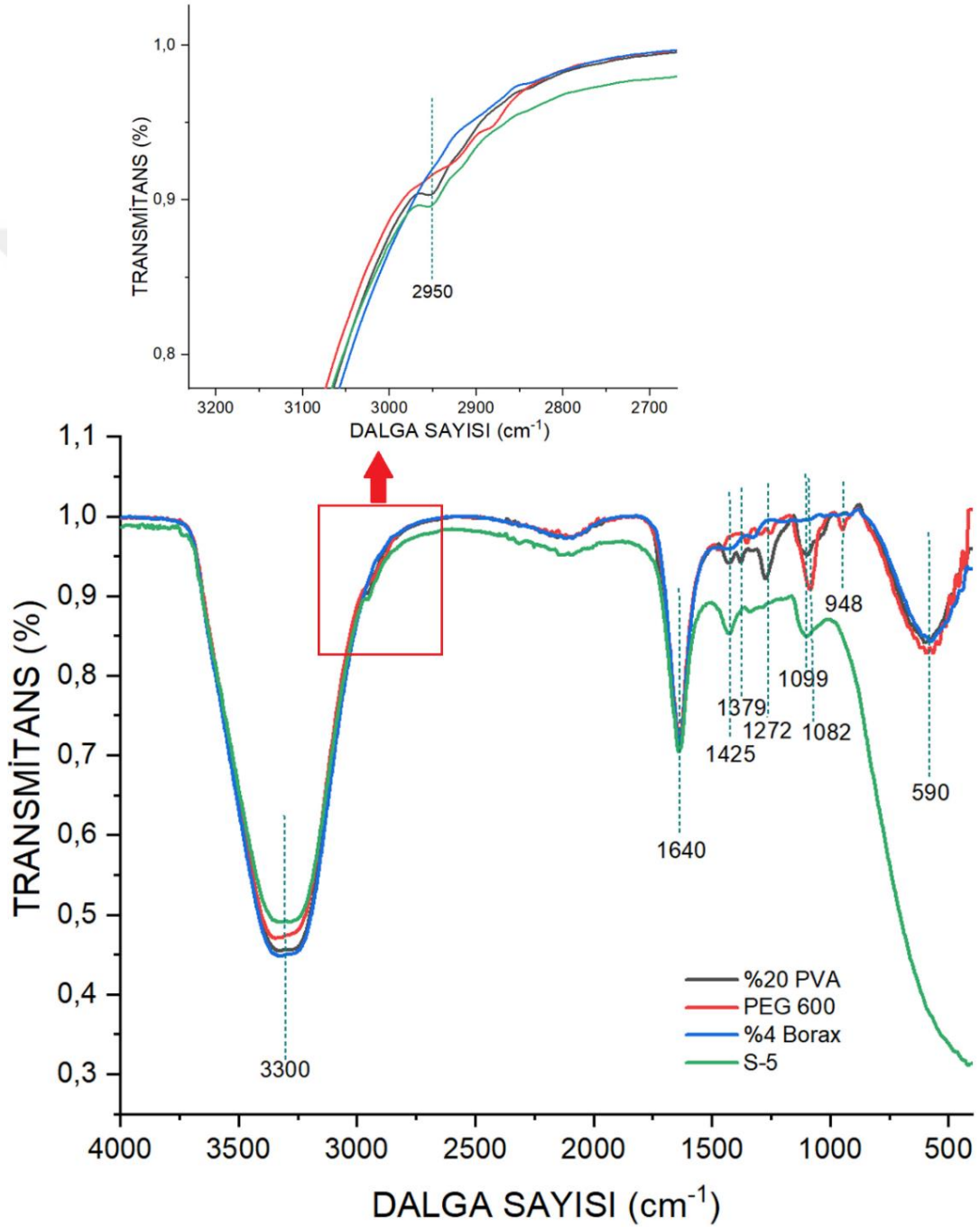
Şekil 4.13. MB içeren hidrojinin SBF içerisindeki salınım grafiği



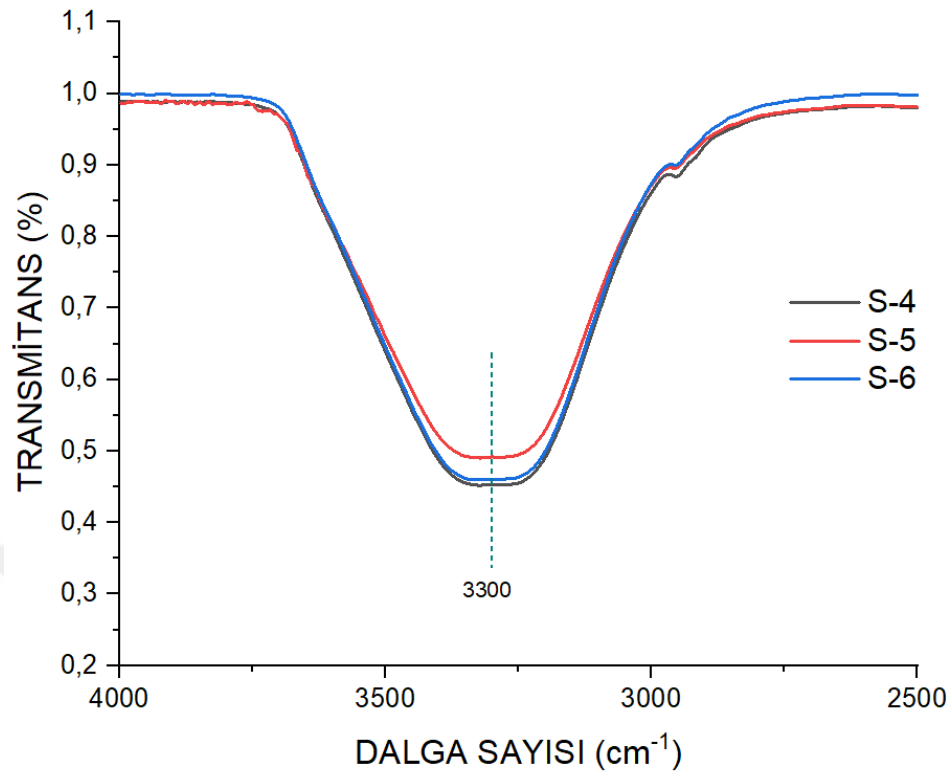
Şekil 4.14. RB içeren hidrojinin SBF içerisindeki salınım grafiği

4.11. FTIR spektroskopisi ile yapı analizleri

FTIR ile yapı analizleri fiziksel, biyolojik testler vb. olumlu sonuç aldığımız S-4, S-5 ve S-6 sentetik hidrojel sistemleri dikkate alınarak incelenmiştir. Şekil 4.15'te nihai olarak fotosensetizör boyar maddelerinin yüklenmesine karar verilen S-4 sisteminin yapı karakterizasyonu için bakılan FTIR analiz sonucu gösterilmiştir. Şekil 4.16'te belirtilen S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin karşılaştırılması ise formülasyon oranlarındaki değişiklikler sonucunda yapıda oluşan çapraz bağların yorumlanması amacıyla verilmiştir.



Şekil 4.15. S-5 sisteminin FTIR spektrumu



Şekil 4.16. S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

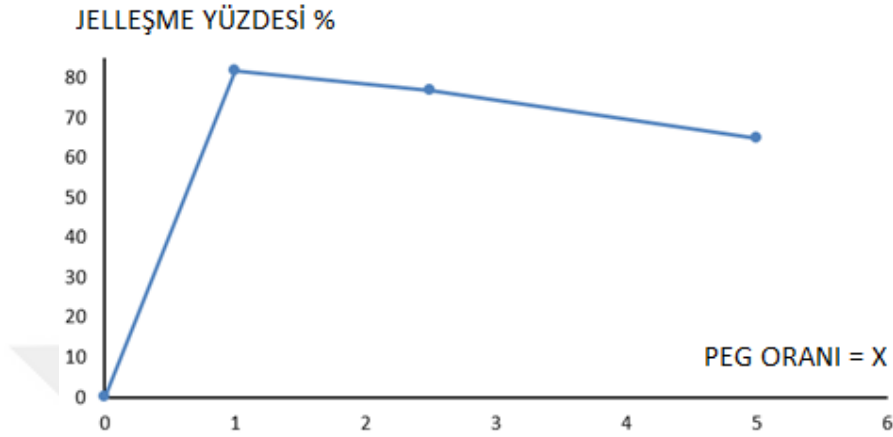
5. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi karmaşık biyokimyasal ve hücrel olayları içermektedir. Bir yaranın iyileşmesi derinliğine, şekline, enfeksiyon durumuna, tedavi yöntemine, çevresel şartlara, hastanın yaşına, tıbbi geçmişine vb. birçok faktöre bağlı olarak aylar ve hatta yıllar alabilmektedir. Yaraların zor iyileşmesi yaşam kalitesini azaltan, enfeksiyon ve hatta ölüm riskini arttıran bir durumdur. Yara tedavisinde kullanılan yara örtüleri yara iyileşmesindeki rollerine bağlı olarak pasif veya aktif yara örtüleri olarak sınıflandırılabilir. Pasif yara örtüleri, temel seviyede sadece yaralanan bölgenin kapatılmasını sağlayan, çevresel etkenlere karşı kısmi bir bariyer görevi gören pansumanlar iken, aktif yara örtüleri ise yara tedavisini kolaylaştıran, antimikrobiyal etki gösterebilen ve yara iyileşmesini hızlandıran pansumanları ifade etmektedir.

Hasarlı cilt bölgesinde enfeksiyona karşı koymak için satılan aktif yara örtülerinin çoğunda yaygın olarak antibiyotikler tercih edilmektedir. Kullanılan antibiyotikler geniş bir yelpazedeki bakterileri hedef almaktan çok spesifik mikroorganizma türlerine karşı etki etmektedir. Antibiyotiklere alternatif olarak kullanılan, güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği bilinen yapısında gümüş, bakır gibi metalleri barındıran ürünler ise doğal direnç mekanizmalarımızı oluşturan vücut florasını yüksek oranda bozmaktadır. Tez çalışması sonucunda elde edilen içerisine fotosensetizör maddeler yüklenmiş hidrojel yara örtülerinde kullanılan maddeler vücut florasını bozmadan, kontrollü bir şekilde etki etmektedir. Işıkla aktive olan fotodinamik terapi (PDT), uzun zamandan beri dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji vb. Çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir tedavi türüdür. PDT'de kullanılan PS, uygun dalga boyunda ışığı absorblayarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilen bir maddedir. ROS, hedef hücrelerde mutajenik veya genotoksik etki olmadan sitotoksik etkiler üreterek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Fotodinamik tedavi imkanı sunan bu örtü cilt yüzeyinin belirli bir katmanına kadar penetre olabilmek, kontrollü salınım yapabilmek, bakteri, virüs ve mantar gibi birçok mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal etki gösterme gibi birçok özelliğe sahiptir. Tez çalışmasında kullanılan RB'in derin dermal tabakalara (Maha-Fadel 2011), MB'nin dermis tabakasına (Genina 2004), TBO'nun epidermis tabakasına (Garcia 2017) kadar penetre olabildiği ile ilgili çalışmalar vardır. Bu fotosensetizör maddelerin kontrollü salınımı sayesinde uygun dalga boyunda ışık verildiği zaman hasarlı dokunun zararlı mikroorganizmalardan arındırılması sağlanabilecektir. Fotosensetizörlerin yüklendiği hidrojel yapı ise yüksek oranda sudan oluşmaktadır. Bu durum yara iyileşmesi için önemli göreve sahip olan Ekstraselüler matriks (ECM) yapısını desteklemekte ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Ayrıca hidrojel yapısının yüksek oranda sudan oluşması nedeniyle yara örtüsünün öz ısını düşük olacağından, örtünün yarayı soğutarak acıyı azaltacağı düşünülmektedir.

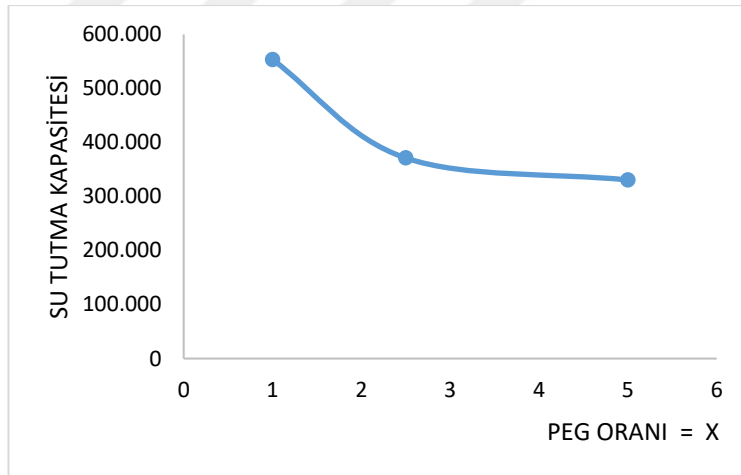
Tez çalışmasında öncelikli olarak fotosensetizör maddelerin depolanacağı uygun fiziksel özelliklere sahip polimer sistemin eldesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Birçok polimer sistemi üzerinde ön denemeler yapılmasına rağmen sentetik sistem için 125,000 molekül ağırlığına sahip PVA ve PEG 600'ün uygun olduğu saptanmıştır. Öncelikli olarak hibrit sistemlerin jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri incelenmiş saf su içerisinde 48 saat bekletilen örneklerden S-4 ve S-5 %75 ve üstü jelleşme özelliği sergilemiştir. Yapıya PEG katılmasının jelleşmeye olumlu yönde etki ettiği fakat PEG miktarındaki fazla artışın jelleşmeyi azalttığı görüşmüştür. Şekil 5.1'de bu durum grafik üzerinde anlatılmıştır. Aynı zamanda çapraz bağ oluşturma amacıyla kullanılan disodyum

tetraborat dekahidrat'ın yapılan denemeler sonucunda PVA ile ağırlıkça oranının 1/20 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu polimer oranlarındaki değişimin jelleşme/çözünürlüğe etkisinin; optimum polimer oranları dışında çalışıldığında polimer zincirlerinin küçük kümelenmeler oluşması ve zincirlerin birbiri arasında zayıf fiziksel bağlar yapmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 5.1. PEG miktarının jelleşme yüzdesine etkisi (PVA:B:PEG = 10:05:X)

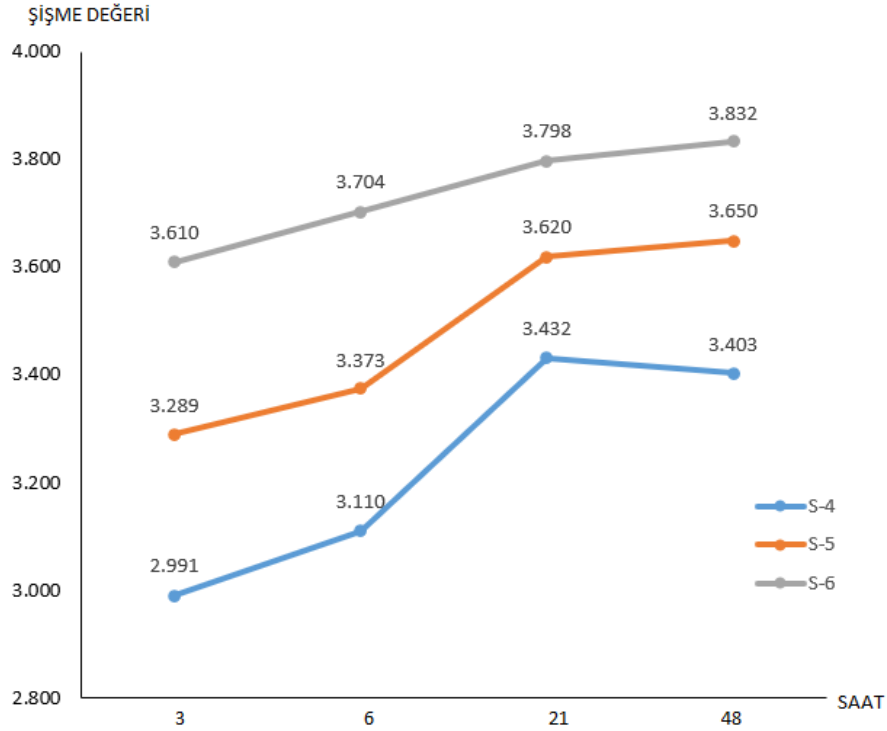
Sentetik hidrojenlerin su tutma kapasiteleri incelendiğinde (Şekil 5.2) çapraz bağlayıcının fazla kullanıldığı durumlarda yapıda daha çok su tutabildiği görüşmüştür. Fakat bu durum polimerin çözünmesine sebep olmaktadır.



Şekil 5.2. Sentetik hidrojenlerin su tutma kapasiteleri (PVA:B:PEG = 10:05:X)

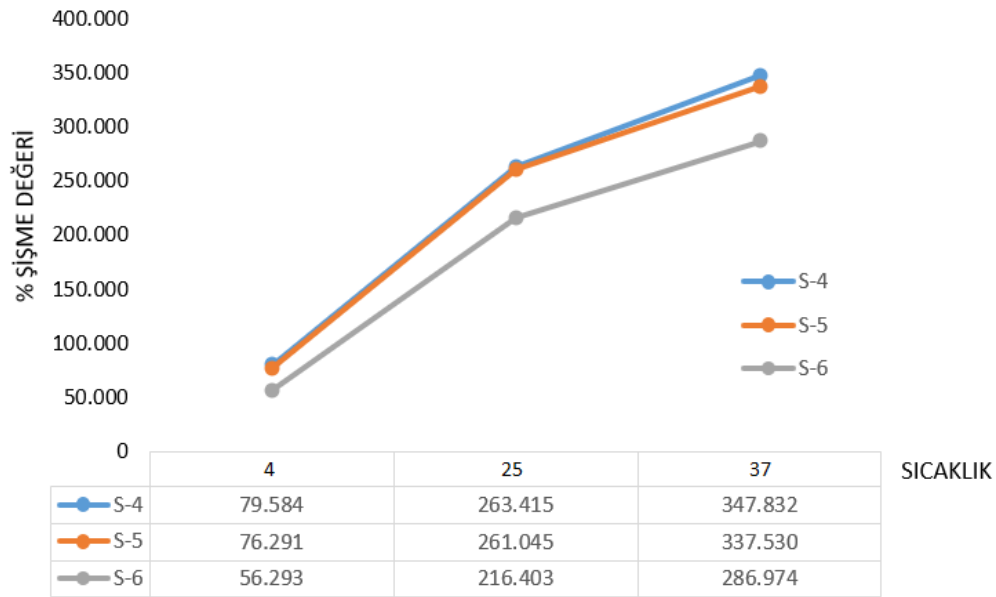
Hidrojenlerin su tutma kapasiteleri, elde edilen çözünürlük yüzdeleri ile tutarlıdır. S-4 hidrojenli kuru ağırlığının 721.58 katı, S-5 hidrojenli kuru ağırlığının 423.78 katı ve S-6 hidrojenli kuru ağırlığının 321.294 katı saf su absorbe etmiştir. S-6 sisteminde S-4'ten 5 kat, S-5 sisteminde S-4'ten 2.5 kat daha fazla PEG kullanılmıştır. PEG daha sonra da bahsedeceğimiz gibi yapıya esneklik kazandırmasının yanı sıra polimer zincirleri arasında daha fazla fiziksel bağ oluşumunu sağladığından dolayı saf su tutma kapasitesini azaltmıştır. Nitekim S-8 ve S-9 sistemlerinde de bu durum görülmektedir. Sentetik hidrojenlerin şişme değerlerinin zamanla değişimi incelendiğinde (Şekil 5.3) S-4

hidrojelinde 48 saatte şişme değerindeki azalma aslında hidrojinin bir kısmının çözünerek sıvıya karıştırının göstergesidir. S-5 ve S-6 hidrojjeleri suyu absorblamaya devam ederken, S-7, S-8 ve S-9 hidrojjelerinde çözünmeler başlamıştır.



Şekil 5.3. Sentetik hidrojjelerin şişme değerlerinin zamanla değişimi

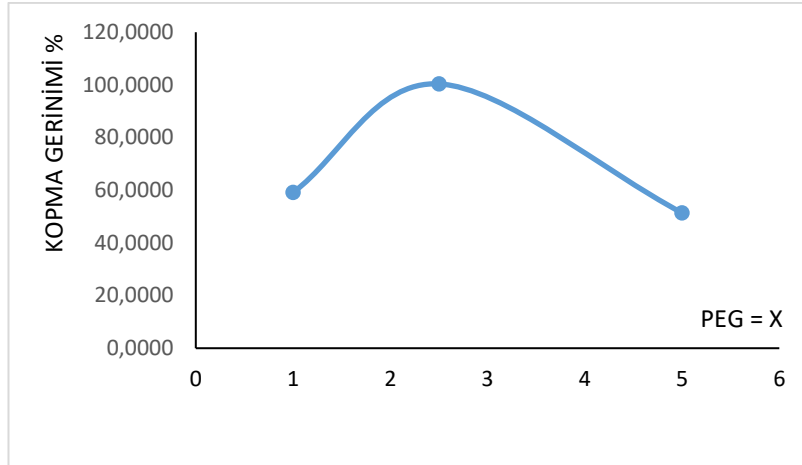
Hidrojjelerin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları incelendiğinde (Şekil 5.4), sıcaklık artışı ile polimer zincirlerinin hareketliliği de benzer oranda artacağından suyu absorblama miktarları artmıştır. Fosfat tamponu içerisinde ve 37°C’de bekletilen S-4, S-5 ve S-6 örneklerinin şişme değerleri sırasıyla kendi kuru ağırlıklarının 443.663, 400.867 ve 281.071 katıdır. Farklı pH değerlerinde ise hidrojel örneklerden yine S-4, S-5 ve S-6 sistemleri diğer sistemlere kıyasla olumlu sonuç vermiştir.



Şekil 5.4. Sentetik hidrojellerin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları

Hibrit sistem denemelerinde; ön çalışması yapılan birçok sisteme kıyasla PVP, CMC, PEG, agar-agar, gliserin içeren sistemlerin fotosensetizörleri yüklemek için gerek fiziksel özellikleri gerek optik özellikleri bakımından uygun olabileceği sonucuna varılmıştır. H-1, H-2, H-3 ve H-4 Hibrit hidrojellerin % su tutma kapasiteleri sırasıyla incelendiğinde 130.314, 315.625, 1092.252 ve 1134.322 değerleri bulundu. Polimer karışımında CMC miktarındaki arttırmanın ve PVP miktarını azaltmanın su absorblama kapasitesini arttırdığı görülmüştür. Farklı pH=1 değerlerinde hibrit polimerlerin şişme değerlerine bakıldığında, H-1 hidrojelinin şişme değerinin az olduğu H-3 ve H-4 hidrojelinin kabul edilebilir sınırlarda olduğu fakat H-2 hidrojelinin bozulmaya başlamasından dolayı şişme değerinin yüksek çıktığı farkedilmektedir. pH=5.5 olan simüle cilt sıvısında ise H-2, H-3 ve H-4 hidrojelleri yüksek oranda şişme göstermiş fakat parçalanmamışlardır. pH=7.4 olan simüle vücut sıvısı çözeltisinde ise PVP polimerini fazla içeren H-1 sisteminin diğerlerine kıyasla daha çok suyu absorbladığı görülmektedir.

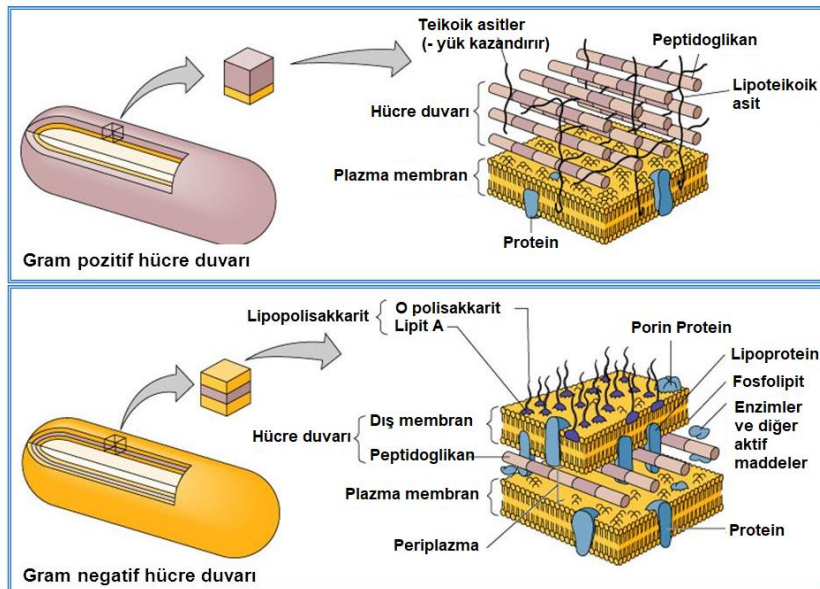
Çekme-kopma test sonuçları incelendiğinde (Şekil 5.5) sentetik sistemlerden PVA:B:PEG oranı sırasıyla 10:0.5:2.5 olan S-5 sisteminin, hibrit sistemlerden ise PVP:CMC:PEG:Agar:Gliserin oranı sırasıyla 0.2:0.8:1:2:1 olan H-4 sisteminin kendi grupları içerisinde en iyi kopma gerilimi değeri verdiği gözlemlenmiştir. Sentetik sistemlerde polimer sisteme PEG esneklik katması amacıyla koyulmasına rağmen daha önce de bahsedildiği gibi fazla miktarda PEG ilavesinin sistem içerisinde polimer kümelenmelerine neden olduğu ve bu durumun esnekliği azalttığı yönünde yorum yapılabilir.



Şekil 5.5. Sentetik hidrojellerin çekme-kopma test sonuçları (PVA:B:PEG = 10:05:X)

Antimikrobiyal test sonuçları incelendiğinde sentetik hidrojel sisteminde TBO kullanıldığı zaman bakteriyel yükte dikkate değer azalma 20ppm'de log 1, 40 ppm'de log 3'lük bir azalma şeklindedir. Bu değerler MB kullanıldığı zaman biraz daha yüksektir. RB'de ise bakteriyel yükte 10 ppm'de log 2'lik, 20ppm'de log 3'lük azalma gözlenmiştir. Hibrit sistemde ise RB fotosensetizörlü 80ppm konsantrasyona sahip örnekte bile bakteriyel yüklerde dikkate değer bir azalma gözlenmemiştir. Bu sebeple sonraki çalışmalar sentetik hidrojel sistem üzerinden devam etmiştir.

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi kullanılan fotosensetizör maddelerden RB anyonik, MB ve TBO ise katyonik yapıda bileşiklerdir. MB 666 nm'de $\epsilon_{\text{maks}} \sim 82.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, TBO 630 nm'de $\epsilon_{\text{maks}} (630 \text{ nm}) \sim 51.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile, RB 549 nm'de $\epsilon_{\text{maks}} \sim 100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile maksimum absorbands yapmaktadır. Antibakteriyel analizde kullanı-



Şekil 5.6. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre yapısı

lan *E. coli* gram negatif, *S. aureus* ise gram pozitif bakteri türleri arasındadır (şekil 5.2). Gram-pozitif bakteriler, çoğunlukla besin maddelerinin, glikopeptitlerin,

polisakkaritlerin ve fotosensetizörlerin geçirgenliğine izin veren yapıdadır. Dış zarlarının gözenekliliği nedeniyle daha kolay fotoaktif hale getirilebilmektedir. Gram-negatif bakteriler ise, sadece düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin porin kanallarından geçişine izin vermektedir. Fakat gram negatif bakterilerin hücre duvarının yapısındaki lipopolisakkaritler, güçlü bir negatif yük oluşturduğu için katyonik fotosensetizör bileşiklerin kendilerine çekerler, difüzyon sürecini kolaylaştırırlar. Benzer şekilde gram pozitif bakterilerin de hücre duvarları negatif yüklüdür. Bu negatif yükün nedeni, peptidoglikana veya alttaki plazma membranına bağlı teikoik asitlerin varlığıdır (Spagnul 2015). Tez çalışmasında kullanılan TBO ve MB pozitif yüklü olmaları sebebiyle hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Ayrıca katyonik fotosensetizörler yara dokusundaki ökaryotik hücrelere kıyasla bakteri hücrelerine, bakteri hücrelerinin bu fotosensetizörlere daha hızlı bağlanması nedeniyle çevre dokulara hasar vermeden seçicilik sağlamaktadır (Vatansever 2013). Fakat TBO ve MB, RB'e kıyasla düşük singlet oksijen kuantum verimine sahiptir. Tez çalışmasında da RB diğer fotosensetizörlere kıyasla daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. RB literatürde gram pozitif bakterilere karşı en çok kullanılan bileşik olmasına rağmen (Spagnul 2015) yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmasından dolayı tez çalışmasında iki türde de yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca polimer yapının gözenekliliğinin yüksek olmasıyla radikal oksijen türlerinin hedef mikroorganizmaları öldürmesi için erişebilirliğini artmaktadır. Böylelikle antimikrobiyal analiz sonuçları incelendiğinde tez çalışmasında kullanılan hidrojel sistem de fotosensetizörlerin hedef hücrelere erişebilirliği artmıştır.

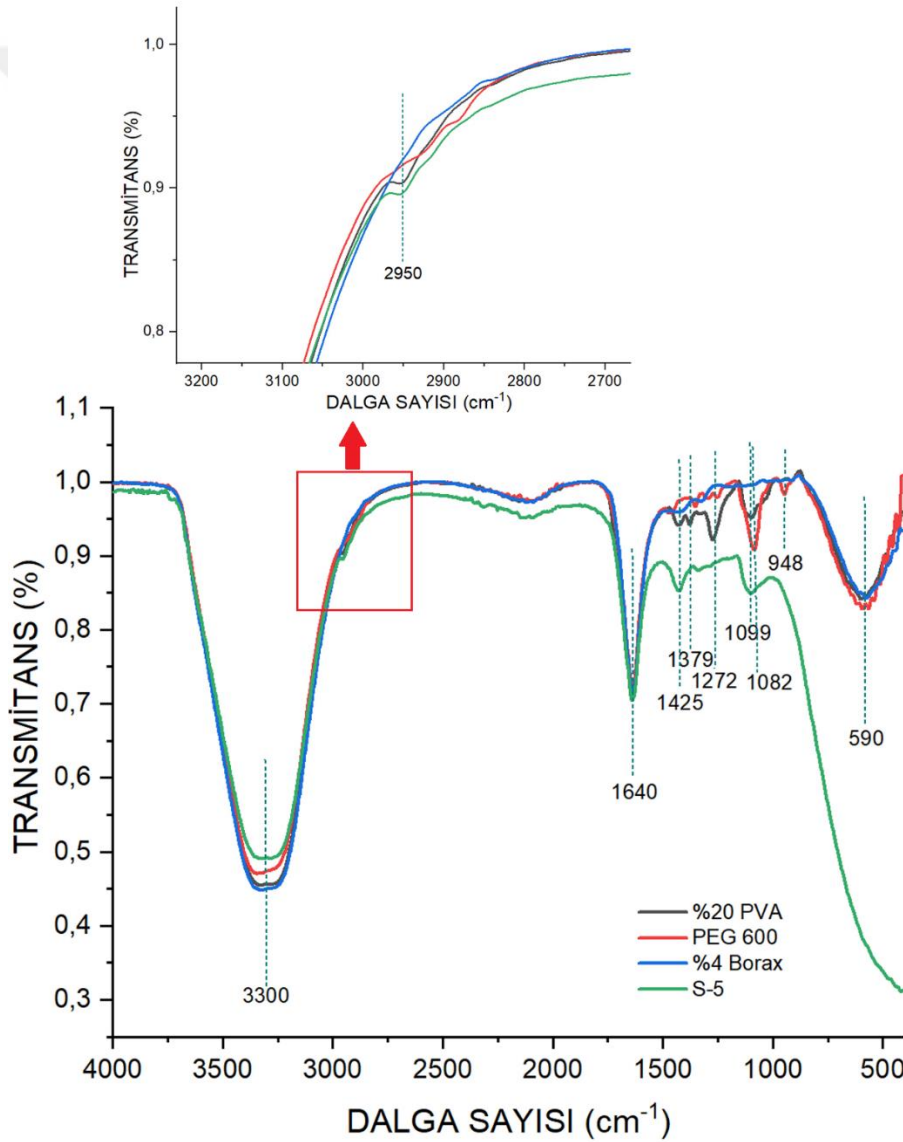
Hücre kültürü testleri ilk olarak endotel hücre kültürleri ile log 3'lük bakteri analizinde aktivite gösteren TBO ve MB için 40 ppm, RB için 20 ppm içeren hidrojel sistemleriyle denendi. Örnekler 6 saat ışınlandıktan sonra MTT sonuçları incelendiğinde bu konsantrasyonlarda TBO %68,9, MB %74,4, RB ise %32,0 canlılık gösterdi. Hidrojelin kendisi de aynı prosedür ile farklı serilerde yapılan çalışmalarda %71,5-%82,8 canlılık oranına sahip değerler verdi. Sonuçlar yorumlandığında HUVEC ile yapılan MTT sonuçları, 40ppm MB, 40ppm TB ve 20ppm RB konsantrasyonları için MB ve TBO'lu sistemlerin canlılık değerlerinin %70-%90 arasında olduğu için bu konsantrasyonların uygulanabilir aralıkta olduğu söylenebilir (Boonkaew 2014).

Fibroblast hücre kültürü çalışmalarında çok daha ayrıntılı çalışılmış, fotosensetizör konsantrasyonlarının ve verilen ışık süresinin hücrelere olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda fibroblast hücrelerinde en düşük toksik etkiyi RB içeren sistem gösterirken, 10-50ppm değerlerinde ise en yüksek toksik etki TBO içeren sistemlerde görülmüştür. Ayrıca tüm sistemler kıyaslandığında RB içeren sistemin 10ppm değerine kadar ışınlandırma sürelerinin artması ile hücre çoğalmalarının da arttığı saptanmıştır. Diğer sistemlerde ise ışınlama süresinin artışı ile tüm konsantrasyon değerlerinde toksik etkinin arttığı görülmektedir. 50ppm değerine kadar RB'nin kullanımı kabul edilebilir aralıktadır (Boonkaew 2014). Fibroblast hücreler için hücre migrasyon deneyi incelendiğinde MTT sonuçlarına göre MB ve TBO'nun toksisite değerlerinin RB'e kıyasla yüksek olmasından dolayı sırasıyla MB 1ppm, TBO 1ppm ve RB 5ppm değerlerinde test edilmiştir. Deney sonucunda 5ppm konsantrasyonundaki RB'nin migrasyonu desteklemekte etkili olduğu görülmektedir. Genel olarak fibroblast hücreler ile yapılan in vitro çalışmalar incelendiğinde sistemlerde sadece RB'nin ışık varlığında migrasyonu destekleyici davrandığı, diğer fotosensetizör ajanların yara iyileşmesine olumlu katkısının RB kadar olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ortam kaynaklı mikrobiyal gelişim testlerinde 20 ppm fotosensetizör madde içeren hidrojel örnekler 1 gün boyunca kapakları açık bir şekilde bekletilmiş ve gün ışığının mikrobiyal üremeye etkisi incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde gün ışığına maruz kalan tüm örneklerde mikrobiyal aktivite bulgularına rastlanmamıştır.

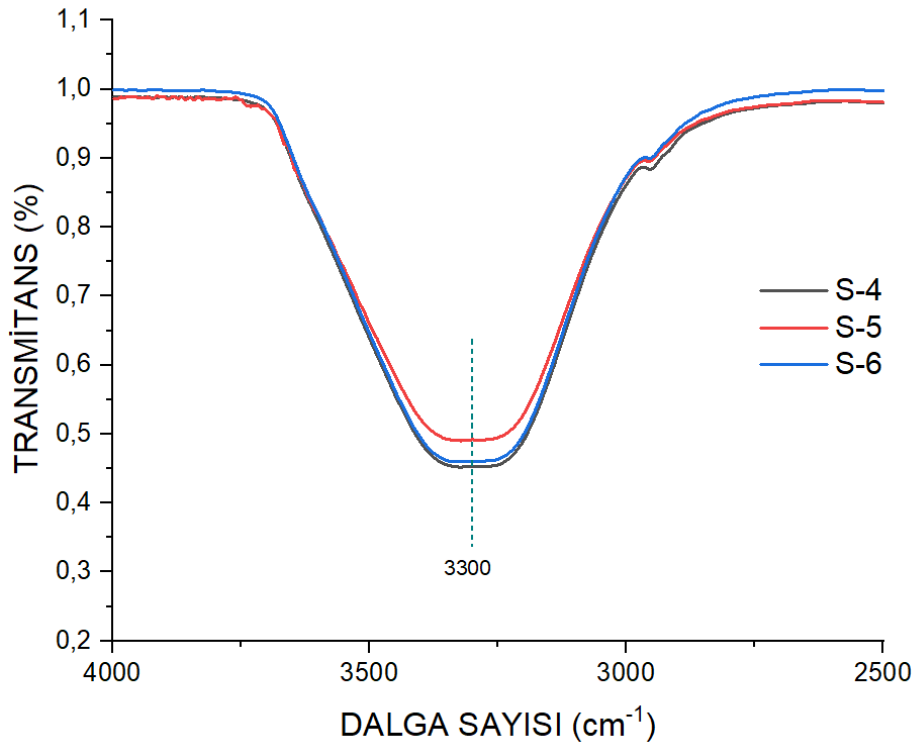
Hidrojellerin simüle cilt sıvısı içinde fotosensetizör madde salınım miktarlarına bakıldığında tüm sistemlerde kontrollü bir salınım olduğu gözlenmiştir. RB'nin anyonik, MB ve TBO'nun ise katyonik yapıda oluşu hidrojel sistemin fotosensetizörleri salma miktarlarını etkilemektedir. RB fotosensetizörünü içeren hidrojel sistem diğer sistemlere kıyasla daha yavaş bir salınım göstermiştir.

Son olarak fiziksel ve biyolojik vb. analiz sonuçları olumlu çıkan nihai sistem olan S-5 ve yapı karakterizasyonu için çapraz bağların durumu hakkında bilgi edinmek amacıyla S-4 ve S-6 sistemlerinin FTIR analizleri incelenmiştir.



Şekil 5.7. S-5 sisteminin FTIR spektrumu

PVA çözeltisine ve PEG eklendiğinde iki farklı polimerin yapısında bulunan hidrojen bağları sayesinde polimerler arasında fiziksel çapraz bağ oluşturmuştur. Disodyum tetraborat dekahidrat ilavesi ile polimer sistemler arasında jel oluşumuna neden olan çapraz bağlanmalar meydana gelmiştir. Bu çapraz bağlanmaların oranı hakkında çözünürlük testleri bir fikir vermesine karşın FTIR spektroskopisi ile daha kesin bir sonuç elde edilebilmiştir. FTIR Spektrumunda $3200\text{--}3615\text{ cm}^{-1}$ arasında O-H gerilmesi görülmektedir. Şekil 5.7’de belirtilen FTIR analizinde 3300 cm^{-1} ’de görülen karakteristik geniş bant O-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 3300 cm^{-1} ’deki bantın yoğunluğu disodyum tetraborat dekahidrat ilavesinden sonra oluşan çapraz bağlardan dolayı azalmıştır (Lim 2015). Spektrumda 2950 cm^{-1} ’de S-5 örneğinde $-\text{CH}_2$ gerilme titreşimlerinin yoğunluğu artmıştır. 1640 cm^{-1} ’deki su moleküllerinin makaslanma denilen eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Borlu bileşiklerin belirgin kırmızı ötesi frekanslarında B-O bağı 1400 cm^{-1} civarında şiddetli pik vermektedir. Şekil 5.7’deki spektrumlarda S-5 örneğinde 1425 cm^{-1} dalga boyundaki eğilme titreşim yoğunluğunun arttığı görülmektedir. Ayrıca S-5 örneği ile PEG 600’ün alifatik C-O-C asimetrik gerilmesi ($1150\text{--}1070\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenir) 1082 cm^{-1} dalga boyunda şiddetli pik olarak görülmektedir. PVA ile PEG çapraz bağ yaptıktan sonra C-O-C etkileşimlerindeki artıştan dolayı S-5 hidrojelinde bu bölgedeki pik şiddetlenmiştir.



Şekil 5.8. S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

Şekil 5.8’de S-4, S-5 ve S-6 sistemlerinin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında S-5 sisteminde O-H gerilmesinden kaynaklanan 3300 cm^{-1} ’deki geniş pikin yoğunluğunun en az olduğu görülmektedir. Bu durum elde edilen hidrojel sistemdeki çapraz bağların varlığından kaynaklanmaktadır (Lim 2015). S-4 sisteminden S-6 sistemine geçişte giderek PEG miktarı artmaktadır. PEG miktarındaki artış hidrojel sistemi içerisinde çapraz bağlanmalardan oluşan kümeleşmelerin artışına neden olduğu

bundan dolayı nispeten homojen bir jel sistemi elde edilemediğinden dolayı spektrum sonucuna bu şekilde yansıdığı düşünölmektedir. Nitekim S-6 sisteminin görsel değeriendirmelerinde yer yer opak kümelenmeler görölmektedir.



6. SONUÇLAR

Deri patojenlere karşı ilk savunma hattıdır ve mikrobiyal istilaya karşı fiziksel bir engel görevi görmektedir. Birçok nedenden dolayı derinin yapısal bütünlüğü bozularak yara oluşabilir. Oluşan yaraların iyileşmesinde, yaranın çeşidine göre farklı aşamalar mevcuttur ve bu aşamaların sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için cilt yüzeyinde patojen olmaması veya patojenlerin minimum düzeye inmiş olması, gerekli nem dengesinin sağlanması, optimum oksijen iletiminin gerçekleştirilebilmesi vb. hususlar gerekmektedir. Gazlı bezler, hidrojel, köpükler, hidrokolloidler (karboksimetil-selüloz), alginat, kollajen, selüloz, pamuk / rayon, şeffaf filmler (poliüretan), sargılar vb. pasif sargılar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu yara örtüleri; yaralı cildi korumak, yara yüzeyinde uygun nemi sağlamak, mikrobiyal biyofilmleri önlemek veya kontrol altına almak, yaralanmış dokuları temizlemek, ağrıyı ortadan kaldırmak veya en aza indirmek, ölü alanları ve yaşayamayan dokuları kaldırmak, yara kaynaklı kokuları kontrol etmek gibi amaçlar için kullanılmaktadır. Aktif yara örtüleri ise pasif yara örtülerinin amaçlarına ek olarak; mikrobiyal biyofilm tabakasının oluşumunu önlemesi, eksüdatları (atıkları) azaltması ve epitelizasyon süresinin (hücre oluşum süresi) kısalmasını sağlaması gibi birçok özelliğe sahiptir.

Tez çalışmasında yara tedavilerinde kullanılmak üzere hidrojel yapıda yara örtüsü geliştirilmiş olup, TBO, MB ve RB fotosensetizör maddeleri elde edilen hidrojel yapıların içerisine hapsedilmiştir. Tez çalışması ile elde edilen sonuçlar;

- 1- Tez çalışmasında çeşitli polimerler organik, hibrit ve sentetik polimer sistemleri denenmiş olup, nihai çalışmalar için sentetik polimerlerden oluşan sisteme karar kılındı. Bu sistem için de PVA:B:PEG oranının ağırlıkça 10:0.5:2.5 olduğu (S-5 sistemi) ve yaklaşık olarak %85 su içeren hidrojel sisteminin uygun olduğu sonucuna varıldı.
- 2- S-5 sistemi için jelleşme yüzdesinin yaklaşık olarak %77 olduğu ve su tutma kapasitesinin %371 olduğu görüldü.
- 3- S-5 sisteminin 4 saatteki pH=7.4'e ayarlanmış fosfat tamponu içerisinde 48 saat bekletildiğindeki şişme değerlerinin; 4°C'de %76, 25°C'de %261 ve 37°C'de %337 olduğu saptandı.
- 4- S-5 sistemi farklı pH değerlerine sahip, pH=1, pH=5.5 ve pH=7.4'e olacak şekilde ayarlanmış çözeltiler içerisinde 37°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle bekletildiğinde ise sırasıyla; %221, %244 ve %329 şişme gösterdiği bulundu.
- 5- Çekme-kopma test sonuçlarına bakıldığında etüvde kurutulmuş olan S-5 sisteminin maksimum gerilmesinin 276.627 N/mm², kopma gerilmesinin 258.041 N/mm², kopma geriliminin %100.364 olduğu ölçüldü.
- 6- JIS Z 2801 standardı modifiye edilerek gerçekleştirilen bakteri analizlerinde gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kültürlerine karşı hedeflenen log 3'lük antibakteriyel etki; TBO için 40ppm, MB için 40ppm ve RB için 20ppm fotosensetizör madde içeren S-5 hidrojel sistemlerinde elde edildi.
- 7- 40ppm TBO hapsedilmiş S-5, 40ppm MB hapsedilmiş S-5 ve 20ppm RB hapsedilmiş S-5 hidrojel örneklerinin endotel hücre kültürüne karşı 6 saat ışınlandırma sonucunda hücrelerin canlılık yüzdeleri sırasıyla %68.93, %74.44 ve %32.01 olarak bulundu.

- 8- Fibroblast hücreleri üzerine yapılan çalışmada ise, en düşük toksik etkiyi gösteren hidrojel sistemin RB içeren sistem olduğu bulundu. Ayrıca tüm sistemler kıyaslandığında RB içeren sistemin 10ppm değerine kadar ışınlandırma sürelerinin artmasının hücre çoğalması üzerine olumlu etki ettiği, biyolojik sistemlerde kullanımının güvenli olduğu saptandı.
- 9- Ortam kaynaklı mikrobiyal gelişim testlerinde 20 ppm fotosensetizör madde içeren hidrojel örnekler 1 gün boyunca kapakları açık bir şekilde bekletildi ve gün ışığının mikrobiyal üremeye etkisi incelendi. Gün ışığına maruz kalan tüm örneklerde mikrobiyal aktivitenin oluşmadığı gözlemlendi.
- 10- Fotosensetizör maddeleri içeren S-5 hidrojellerinin simüle cilt sıvısı içinde fotosensetizör madde salınım miktarlarına bakıldığında tüm sistemlerde kontrollü bir salınım olduğu saptandı.
- 11- FTIR spektrumları incelendiğinde PVA ve PEG ile disodyum tetraborat dekahidratın çapraz bağlanmalarının olduğu, S-5 sistemi için diğer sistemlere kıyasla çapraz bağlanmaların optimum düzeyde olduğu sonucuna varıldı.

- Abrahamse, H. and Hamblin, M.R. 2016. New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.*, 473(4):347-364.
- Ackroyd R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M. 2001. The history of photodetection and photodynamic therapy *Photochem. Photobiol.*, 74(5):656-669.
- Adamian, A.A., Dobysh, S.V., Kilimchuk, L.E., Shandurenko, I.N., Chekmareva, I.A. 2004. Development of new biologically active dressings and methodology of their use. *Khirurgiia (Mosk)*, 12:10-14.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K.A., Foster, T.H. Girotti, A.W., Gollnick, S.O., Hahn, S.M., Hamblin, M.R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbely, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B.C. and Golab, J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.*, 61(4):250-281.
- Allison, R.R. and Sibata, C.H. 2010. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 7(2):61-75.
- Alupei, I.C., Popa, M., Hamcerencu, M. and Abadie, M.J.M. 2002. Superabsorbent hydrogels based on xanthan and poly (vinyl alcohol): 1. The study of the swelling properties, *Eur. Polym. J.*, 38(11):2313-2320.
- Anderson, K.I., Wang, Y.L., Small, J.V. 1996. Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J. Cell Biol.*, 134(5):1209-1218.
- Araujo, N.C., Fontana, C.R., Gerbi, M.E.M. and Bagnato, V.S. 2012. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed. Laser Surg.*, 30(2): 96-101.
- Ashcroft, G.S., Greenwell-Wild, T., Horan, M.A., Wahl, S.M. and Ferguson MW. 1999. Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. *The American Journal of Pathology*, 155(4):1137-1146.
- Bakhshayesh, A.R.D., Annabi, N., Khalilov, R., Akbarzadeh, A., Samiei, M., Alizadeh, E., Alizadeh-Ghods, M., Davaran, S. and Montaseri, A. 2018. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering, *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.*, 46(4):691-705.
- Bala, S.K. and Thangeswaran, P., 2005. Biomaterials in medical applications. *Asian Text. J.*, 14(6):57-61.
- Baltazar, L.M., Ray, A., Santos, D.A., Cisalpino, P.S., Friedman, A.J. and Nosanchuk, J.D. 2015. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front. Microbiol.*, 202(6):1-11
- Baranoski, S. and Ayello, E.A. 2015. Wound Care Essentials: Practice Principles. In: Acute and Chronic Wound, Baranoski, S., Ayello, E.A. Ayello, Harris & Associates, Inc. New York, New York, pp. 176-202

- Baumgartner, R., Krammer, B., Pottier, R. and Stepp, H. 2006. Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook: Basic Principles. In: Pottier, R. (Ed.) Royal Soc. of Chem., Canada, pp.79-248.
- Bonnett, R. 1995. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 24(1):19-33.
- Boonkaew B., Kempf M., Kimble R, Cuttle L. 2014. Cytotoxicity testing of silver containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns*. 40(8):1562-1569.
- Braiman-Wiksmann L., Solomonik, I. Spira, R. and Tennenbaum, T. 2007. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.*, 35(6):76-779
- Breidenbach, A., Fuhrmann, H., Busche, R. and Sallmann, H.P. 1988 Studies on equine lipid metabolism. 1. A fluorometric method for the measurement of lipolytic activity in isolated adipocytes of rats and horses. *Zentralbl Veterinarmed A.*, 45(10):635-43.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N. and Nischt, R. 2009. Basement membranes in skin: Unique matrix structures with diverse functions. *Histochemistry and Cell Biology*, 132 (1): 1–10.
- Broughton, G., Janis, J.E. and Attinger, C.E. 2006. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.*, 117(7):12-34.
- Brun, P.H., DeGroot, J.L., Dickson, E.F.G., Farahani, M. and Pottier, R.H. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumor-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. 2004. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3(11-12):1006-1010.
- Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M., and Sala, R. 2005. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 78:1-6.
- Campos A, Groth A and Branco A. 2008. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11(3):281-288.
- Chen, Y., Zheng, W., Li, Y., Zhong, J., Ji, J. and Shen, P. 2008. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci.*, 99(10):2019-2027.
- Chung, H.J. and Park, T.G. 2009. Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Nano Today*, 4:429-437.
- Clifton, C. E. and Lawler, T. G. 1930. Inactivation of Staphylococcus Bacteriophage by Toluidine Blue. *Royal Society of Medicine Press*, 27(9)1041-1042.
- Cornelius, V.J., Majcen, N., Snowden, M.J., Mitchell, J.C. and Voncina, B., 2006. Preparation of smart wound dressings based on colloidal microgels and textile

- fibres. International Symposium on Smart Materials, Nano- and Micro-Smart Systems, pp. 11-13, 10-13 December, Adelaide, Australia.
- D’Ilario, L. and Martinelli, M. 2006. Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects. *Modelling Simul. Mater. Sci. Eng.*, 14(4):581-595.
- Dai T. et al. 2009. Photodynamic Therapy for *Acinetobacter baumannii* Burn Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9):929-934.
- Dai, T., Fuchs, B.B., Coleman, J.J., Prates, R.A., Astrakas, C., Denis, T.G., Ribeiro, M.S., Mylonakis, E., Hamblin, M.R. and Tegos, G.P. 2012. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Front Microbiol.*, 3(120):1-16.
- De Donatis, A., Ranaldi, F. and Cirri, P. 2010. Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Commun Signal*, 7(8):20.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.*, 9:283-289.
- Elbadawy, A. K., El-Refaie, S. K., Tamer, M., Mahmoud, A.E., Mohamed, S.M., 2015. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1):38-47.
- El-Sayed, M., Sorour, M., Abd El Moneem, N., Talaat, H., Shalaan, H. and El Marsafy, S. 2011. Synthesis and properties of natural polymers -grafted- acrylamide. *World Appl Sci J.*, 13(2):360-368
- Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., 2010. The Extracellular Matrix at a Glance. *Journal of Cell Science*, 123(24):4195-4200.
- Garcia, M.T.J., Freitasb, C.P., Gracianob, T.B., Coutinhob, T.S., Cressonib, C.B., Pereirac, S.A.L. and Shimanod, M.M. 2017. Chitosan-based mucoadhesive gel for oral mucosal toluidine blue O delivery: The influence of a non-ionic surfactant. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 20:48-54.
- Genina, E.A. Bashkatov, A.N., Tuchin V.V. 2004. Methylene Blue diffusion in skin tissue. *The International Society for Optical Engineering*, 5(30):315-323.
- Gold, M.H. 2011. History of photodynamic therapy, *Photodyn. Ther. Dermatology*, Springer, ss. 1-4, New York, New York, NY.
- Guo, S. and DiPietro, L.A. 2010. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res.*, 89(3):219-229.
- Gursoy, H., Ozcakil, C., Ozcakil, T., Tanalp, J. and Yılmaz, S. 2012. Photodynamic therapy in dentistry : a literature review. *Clin Oral Invest.*, 17(4):1113-1125.
- Güneş, Ü. Y., Eşer İ. 2006. Nemli yara iyileşmesi ve oklusif pansumanların nemli yara İyileşmesindeki önemi. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 10(2)

- Hackam, D.J. and Ford, H.R. 2002. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surg. Infect.*, 3(1):23-35.
- Han, J., Lei, T., and Wu, Q. 2013. Facile preparation of mouldable polyvinyl alcohol-borax hydrogels reinforced by well-dispersed cellulose nanoparticles: physical, viscoelastic and mechanical properties. *Cellulose*, 20(6):2947-2958.
- Han, S.K. 2015. *Innovations and Advances in Wound Healing*, Springer, Korea, pp.26-28.
- Han, S.-K. 2016. *Innovations and Advances in Wound Healing: Interactive Wound Dressings*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 39-60.
- Harding, K.G., Moore, K. and Phillips, T.J. 2005. Wound chronicity and fibroblast senescence implications for treatment. *Int. Wound J.*, 2:364-368.
- Hennink, W.E., Nostrum, C.F. 2002. Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:13-36.
- Henriksen, N.A., Yadete, D.H., Sorensen, L.T., Agren, M.S. and Jorgensen, L.N. 2011. Connective tissue alteration in abdominal wall hernia. *Br J Surg.*, 98(2):210-219.
- Hinz, B. 2006. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol.*, 85(3-4):175-181.
- Hoffman A. S., 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1):3-12.
- Hoffman, A.S., Schmer, G., Harris, C. and Kraft, W.G. 1972. Covalent binding of biomolecules to radiation-grafted hydrogels on inert polymer surfaces. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.*, 18(0):10-18.
- Jockusch, S., N.J. Turro, and D.A. Tomalia, 1995. Aggregation of Methylene Blue Adsorbed on Starburst Dendrimers. *Macromolecules*, 28(22):7416-7418.
- Jong-Oh, K., Jung-Kil, P., Jeong H.K., Sung-Giu, J., Chul-Soon, Y., Dong-Xun, L., Jun Young, C., Jong-Soo, W., Bong-Kyu, Y., Won-Seok, L., Jung-Ae, K. and Han Gon, C., 2008. Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2):79-86.
- Josefsen, L.B. and Boyle, R.W. 2008. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br. J. Pharmacol.*, 154(1):1-3.
- Kamoun, E.A., Kenawy, E.R. and Chen, X. 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res.*, 8(3):217-233.
- Katia, C. S., Figueiredo, T. L. M. and Alves, C.P.B. 2008. Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions. *Wiley InterScience*, 111(6):3074 -3080.

- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro, T. 1990. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.*, 24:721-734.
- Konapka, K. and Goslinski, T. 2007. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.*, 86(8):694-707.
- Kordestani, S.S. 2019. Wound Classification: Atlas of Wound Healing. In: Kryhl, C. (Ed.) Elsevier, Iran, pp. 49-50.
- Kumar, A.C. and Erothu, H. 2017. Synthetic Polymer Hydrogels. In: Francis R. and Kumar, D.S. (Ed.), *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*. Wiley-VCH, Germany. pp. 151-152.
- Kurz A, Sessler, D.I. and Lenhardt, R. 1996. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of wound infection and temperature group. *N Engl J Med.*, 334(19):1209-1215.
- Kutlubay, Z., Pehlivan, Ö. ve Engin, B. 2011. Fotodinamik Tedavi. *Dermatoz*, 2:391-404.
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K. and Kulbacka, J. 2018. Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106:1098-1107.
- Land, J. and Brown, G.C. 2003. Update on photodynamic therapy. *Current opinion in Ophthalmol*, 14(3):163-168.
- Landis, S.J. 2008. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv. Skin Wound Care*, 21(11):531-540.
- Leberfinger, A.N, Ravnic, D.J, Dhawan, A. and Ozbolat I.T. 2017. Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication. *Bioprinting of Stem Cells*, 6:1-10.
- Lee, C.K. Hansen, S.L. 2009. Management of acute wounds, *Surg. Clin.*, 89(3):659-676.
- Lim, M., Kwon, H., Kim, D., Seo, J., Han, H. and Khan S.B. 2015. Highly-enhanced water resistant and oxygen barrier properties of cross-linked poly(vinyl alcohol) hybrid films for packaging applications. *Progress in Organic Coatings*, 85:68-75.
- Liu, Y., Qin, R., Zaat, S.A.J., Breukink E. and Heger, M. 2015. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*, 1(3):140-167.
- Livshits, V.S., 1988. Polymer dressings for wounds and burns (review). *Pharm. Chem.J.*, 22(7): 515-522.
- Maha-Fadel M.A. 2011. Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal Rose Bengal. *Lasers Med. Sci.*, 26(2):267-275.

- Maisch, T., 2007. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future. *Lasers Med. Sci.*, 22(2):83-9.
- Mashberg A., 1983. Final evaluation of tolonium chloride rinse for screening of high-risk patients with asymptomatic squamous carcinoma. *J. Am. Dent. Assoc.*, 106(3):319-323.
- McGrath, J.A., Eady, R.A.J. and Pope, F.M. 2004. Anatomy and Organization of Human Skin. In Burns T; Breathnach S; Cox N; Griffiths C. (eds.). *Rook's Textbook of Dermatology* (7th ed.). Blackwell Publishing. pp. 4190.
- Mcguiness W. 2004. Influence of dressing changes on wound temperature. *Journal of Wound Care*, 13(9):383-385.
- Midwood, K.S., Williams, L.V. and Schwarzbauer J.E. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.*, 236(6):1031-1037.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. and Waldron, K., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5):790-802.
- Moriwaki, K., Sawada, T., Akiyama, M. Ikeda, A., Kikuchi, J., Matsumura, T., Yano, S., Kataoka, H., Inoue, M. and Akashi, H. 2018. Synthesis and photophysical properties of S-Mannosylated chlorins and their effect on photocytotoxicity in HeLa cells, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 91(2):230–236.
- Moura, L.I., Dias, A.M., Carvalho, E. and de Sousa, H.C., 2013. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment : a review. *Acta Biomater.*, 9:7093-7114.
- Myers, S.R., Leigh, I.M. and Navsaria, H. 2007. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound Repair and Regeneration*, 15(5): 693-701.
- Neckers, D.C. and. Valdes-Aguilera, O.M. 1993. Photochemistry of the Xanthene Dyes. *Advances in Photochemistry*, 68:351-358.
- Nooy, D.A.E.J., Capitani, D., Masci, G., and Crescenzi, V. 2000. Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization. *Biomacromolecules*, 1(2):259-267.
- Nooy, D.A.E.J., Masci, G. and Crescenzi, V. 1999. Versatile synthesis of polysaccharide hydrogels using the Passerini and Ugi multicomponent condensations. *Macromolecules*, 32(4):1318-1320.
- Okay, O. 2018. Semicrystalline physical hydrogels with shape-memory and self-healing properties. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(10).
- Onat H. ve Gül T., 2014. Dış hekimliğinde fotodinamik tedavi, *Atatürk Üni. Dış Hk. Fak. Derg.*, 24(1):119-124.

- Ormond, A.B. and Freeman, H.S. 2013. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 6:817-840.
- Parekh, S.G., Trauner, K.B., Zarins, B., Foster, T.E., and Anderson, R.R. 1999. Photodynamic Modulation of Wound Healing With BPD-MA and CASP. *Lasers in Surgery and Medicine*, 24(1):375-381.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G., Sawaya, A.S., Patel, S.B., Khalid, L.K., Isseroff, R.R. and Canic, M.T. 2014. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, 1;3(7):445-464.
- Percival, N.J. 2002. Classification of wounds and their management, *Surgery (Oxford)*, 20:114-117.
- Redmond, R.W. and Gamlin, J.N. 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol*, 70(4):391-475.
- Ricard-Blum, S. 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1):a004978.
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T. and Saha, P. 2010. Development and Characterization of Novel Medicated Hydrogels for Wound Dressing. *Soft Materials*, 8(2):130-148.
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T. and Saha, P. 2012. Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 89(2):346-353.
- Sanovic, R., Krammer, B., Grumboeck, S. and Verwanger, T. 2009. Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. *Int. J. Oncol.*, 35(4):921-939.
- Santoro, O., Bandieramonte, G., Melloni, E., Marchesini, R., Zunino, F., Lepera, P. and de Palo, G. 1990. Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 50(15): 4501-4503.
- Sawant, S.V., Sankpal, S.V., Jadhav, K.R. and Kadam, V.J., 2012. Hydrogel as drug delivery system. *Res. J. Pharm. Technol.*, 5(5):561-569.
- Schultz, E.W. 1928. Inactivation of Staphylococcus Bacteriophage by Methylene Blue. *Royal Society of Medicine Press*, 26(2):100-101.
- Scott, D. and Miller W. 2011. Equine Dermatology: Structure and Function of the Skin. Elsevier, Ithaca, pp. 1-34.
- Shaw, T.J. and Martin, P.J. 2009. Wound repair at a glance. *Cell Sci.*, 122(18):3209-3213.
- Singh, M.R., Saraf, S., Vyas, A., Jain, V., Singh, D., 2013. Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 41:202-212.

- Slaughter, B.V., Khurshid, S.S., Fisher, O.Z., Khademhosseini, A. and Peppas, N.A. 2009. Hydrogels in regenerative medicine, *Adv. Mater.*, 21:3307-3329.
- Sokolov, V.E. 1982. Mammal skin, Berkeley, University of California Press.
- Spagnul, C., Turner, L.C. and Boyle, R.W., 2015. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 150:11–30.
- Sperinde, J.J. and Griffith, L.G. 1997. Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels. *Macromolecules*, 30(18):5255-5264.
- Swaim, S.F., Bradley, D.M. and Hinkle, S.H. 2001. Wound contraction: basic and clinical factors. *Compendium on Continuing Education For The Practising Veterinarian-North American Edition*, 23(1):20-35.
- Takigawa, T. and Endo Y. 2006. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. *J. Occup. Health*, 48(2):75-87.
- Taub, A.F. 2004. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons, *J. Drugs Dermatol.* 3 (1 Suppl) ss 8-25,
- Tomatsu, I., Peng, K. and Kros A. 2011. Photoresponsive hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1):14-15.
- Tsuji, H. 2005. Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation and applications, *Macromol. Biosci.*, 5:569-597.
- Tsuji, H., Horii, F., Nakagawa, M., Ikada, Y., Odani, H. and Kitamaru, R. 1992. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 7. Phase structure of the stereocomplex crystallized from a dilute acetonitrile solution as studied by highresolution solid-state carbon-13 NMR spectroscopy, *Macromolecules*, 25:4114-4118.
- Tsujino, I., Miyagi, K., Sampson, R.W. and Sieber, F. 2006. Potentiation of the antitumor effect of merocyanine 540-mediated photodynamic therapy by amifostine and amphotericin B. *Photochem. Photobiol.*, 82(2):458-465.
- Türsen, B. ve Türsen, Ü., 2015. Dermatolojide Işık Yayan Diyot. Mersin Devlet Hastanesi, Deri ve Zührevi Hastalıkları Bölümü, 2:1-13
- Ueno, C., Hunt, T.K. and Hopf H.W. 2006. Using physiology to improve surgical wound outcomes. *Plast Reconstr Surg.*, 117(7):59-71.
- Varaprasad, K., Raghavendra, G.M., Jayaramudu, T., Yallapu, M.M. and Sadiku, R. 2017. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering*, 79(1):958-971.
- Vatansever, F., De Melo, W.C.M.A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N.A., Yin, R., Tegos, G.P., Hamblin, M.R., 2013. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species

- bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:955–989.
- Vecchio, D., Dai, T., Huang, L., Fantetti, L., Roncucci, G. and Hamblin, M. 2013. Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion. *J. Biophotonics*, 6(9):733-742.
- Velnar, T., Bailey, T. and Smrkolj V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.*, 37(5):1528-1542.
- Wainwright M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1):13-28.
- Wainwright, M. and Crossley, K.B. 2004. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down bio'lms : a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53:119-126.
- Watsky, M.A., Weber, K.T. Sun, Y. and Postlethwaite, A. 2009. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 282:165-192.
- Weinzweig, J. and Weinzweig, J. 2010. Plastic Surgery Secrets Plus E-Book. In: Tissue Expansion Senchenkov, A. and Manders, E.K., Elsevier Health Sciences, The Chicago Center for Plastic & Reconstructive Surgery, Chicago, pp. 3-645.
- Wichterle, O. and Lim, D. 1960. Hydrophilic gels in biologic use, *Chemical gel Nature*, 185:117.
- Yalçın, H. ve Özkalp B. 2005. Vücut Hijyeninin Önemi ve Yara bakımında Yeni Gelismeler, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, ss. 287-308, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 20-24 Nisan, Samsun.
- Yamaguchi, Y. and Yoshikawa, K. J. 2001. Cutaneous Wound Healing: An Update. *The Journal of Dermatology*, 28:521-534.
- Yang, J. and Weinberg, R.A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6):818-829.
- Yoon, I., Li, J.Z. and Shim, Y.K. 2013. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy, *Clin. Endosc.*, 46(1):7–23.
- Young, A. and McNaught, C.-E. 2011. The physiology of wound healing. *Basic Science*, 29(10):475-479.
- Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.O., Jafari, S.H. and Supaphol, P., 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.*, 21(2):77–95.
- Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.O., Jafari, S.H., Supaphol, P., 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.*, 21:77-95.

Zhao, L., Mitomo, H., Zhai, M., Yoshii, F., Nagasawa, N. and Kume, T. 2003. Synthesis of antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogels with electron beam irradiation, *Carbohydr. Polym.*, 53(4):439-446.

Zilberman, M. and Elsner, J.J., 2008. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control Release*, 130(3):202-215.



ÖZGEÇMİŞ

Gül Merve GENÇER

gulmervekurtbelen@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2015-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2012-2015	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Lisans 2007-2011	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Ön Lisans 2005-2007	Eskişehir Üniversitesi Laborantlık ve Veterinerlik Önlisans

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Proje Uzmanı 2020-Devam Ediyor	Akdeniz Üniversitesi Antalya Teknokent Yönetim Ofisi
Şirket Müdürü / Şirket Kurucusu 2018-Devam Ediyor	BelenMed Ar-Ge Danışmanlık Medikal Tic. Ltd. Şti.
Araştırmacı & Bursiyer veya Danışman 2012-2017	Çeşitli TÜBİTAK projelerinde
Stajyer (Laboratuvar Çalışmaları) 2010	1-Bayer Türk Kimya San. Tic. Ltd. Şti. 2-Antalya İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü

GÖREV ALINAN PROJELER

PROJE ADI	KURUM	TARİH	GÖREV
Fotodinamik Tedavi İmkani Sunan Aktif Yara Örtüleri	TÜBİTAK Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP)	2018-2020	Araştırmacı (Doktora Tez Konusu)
Yanık Yaralarında Kullanılmak Üzere Fotodinamik Tedavi İmkani Sunan Hidrojel Yara Örtüleri ve Kremlerinin Üretilmesi	TÜBİTAK Teknogirişim 1512 Sermaye Destek Programı	2017-2019	Proje Yürütücüsü
Doğal ve Biyoyumlu Aktif Oklusif Bantların Eldesi (Final aşamasında ödül)	TÜBİTAK 2204 Proje Yarışması	2017-2018	Danışman
Ultrasonik Homojenizatör İle Farklı Çözgen Sistemleri Kullanılarak Akdeniz Hurması Kabuğu Bileşenlerinin Ekstraksiyonu ve Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi (Final aşamasında ödül)	TÜBİTAK 2204 Proje Yarışması	2016-2017	Danışman
Dental İmplant Dayanakları Ve İyileşme Başlıklarında Kullanılan Ti6Al4V Alaşımı İçin Antimikrobiyal Sol Jel Kaplamaların Üretilmesi ve İncelenmesi	TÜBİTAK 1001 Araştırma Projesi	01.2014 - 01.2016	Araştırmacı & Bursiyer
Fotodinamik Yöntemle Aktive Edilen Gümüş Nanopartiküllerin Enfekte Kök Kanallarındaki Antibakteriyel Etkinliğinin Değerlendirilmesi	TÜBİTAK Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP)	23.10.2015 - 30.06.2016	Araştırmacı
Antibakteriyel Özellik Taşıyan Pirolidin Bazlı İyonik Sıvıların Sentezi	TÜBİTAK Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP)	2013-2015	Araştırmacı (Yüksek Lisans Tez Konusu)
Hekzagonal Bor Nitrür İçeren, Dereceli Nanokompozit Kaplamaların Sol Jel Yöntemiyle Üretimi ve Karakterizasyonu	TÜBİTAK 3501 Kariyer Projesi	01.10.2012 - 01.04.2013	Araştırmacı & Bursiyer

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Aydın H., Er K., Kustarci A., Akarsu M., Gencer G.M., Er H., Felek R. Antibacterial activity of silver nanoparticles activated by photodynamic method in infected root canals. Dental and Medical Problems (DMP-01393-2020-02/baskıda).

Fikri sınıai mülkiyet hakları listesi (Patentler)

1. Murat Akarsu, Esin Burunkaya, Gül Merve Kurtbelen, Ahmet Gencer, Ertugrul Arpac, (Nanoen Ar-Ge Dan. Muh. Ltd. Sti.), "Bitki büyümesini destekleyici karışım", TPE Başvuru No: 2013/0026, Evrak Numarası: 2013-G-6733
2. Gül Merve Kurtbelen, (BelenMed Ar-Ge Dan. Med. Tic. Ltd. Sti.) "Cilt hastalıklarında kullanılmak üzere fotodinamik terapi imkânı sunan biyouyumlu ve biyoaktif hidrojel örtü ile kremleri ve üretim yöntemi", TPE Başvuru No: 2019/05409

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. 15-17 Şubat 2013, Antalya. *E. Burunkaya, G. M. Kurtbelen, B. Becer, M. Akarsu, E. Arpac, "Kozmetik Ürünlerde Nanoteknoloji Kullanımı", 3.Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi
2. 6-9 Kasım 2014, Antalya. *Samed KOÇ, Gül Merve GENCER, Ahmet GENCER, Ertuğrul ARPAÇ, Hüseyin ÇETİN "Dermatophagoides pteronyssinus ve D. farinae Ev Tozu Akarlarına Karşı Bazı Bitki Uçucu Yağ Bileşenlerinin Öldürücü Etkisinin Araştırılması", II. Ulusal Vektör Mücadelesi Sempozyumu
3. 6-9 Kasım 2014, Antalya. *Esin AKARSU, Gül Merve GENCER, Emre YAVUZ, Ertuğrul ARPAÇ, Hüseyin ÇETİN "Vektör Mücadelesinde Kullanılan Bazı Ürünlerin Farklı Saklama Koşullardaki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi"
4. 4-7 Ekim 2018, Aydın H, Er K, Kustarci A, Akarsu M, Gencer GM, Er H, Felek R. Antibacterial activity of silver nanoparticles activated by photodynamic therapy in infected root canals. IFEA 11th World Endodontic Congress, Seoul, Korea.
5. 17-20 Ekim 2019, *Gül Merve GENÇER, Murat AKARSU, Suray PEHLİVANOĞLU Photodynamic Therapy With Active Hydrogel Wound Dressings, P068. 24th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2019), İzmir, Turkey.