

**ZnO NANOPARTİKÜL YÜKLÜ ANTİBAKTERİYEL
HEMOSTATİK SÜNGERLER: SENTEZ,
KARAKTERİZASYON VE *İN-VİTRO* ÇALIŞMALAR**

**ZnO NANOPARTICLES LOADED HEMOSTATIC
SPONGES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *İN-VİTRO* STUDIES**

Başak KURİN ATASOYU

Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ZnO NANOPARTİKÜL YÜKLÜ ANTİBAKTERİYEL HEMOSTATİK SÜNGERLER: SENTEZ, KARAKTERİZASYON VE *İN-VİTRO* ÇALIŞMALAR

Başak KURİN ATASOYU

Yüksek lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Eş Danışman: Doç. Dr. Bengi Özkahraman

Haziran 2023, 103 sayfa

Bir dokunun bütünlüğünün anatomik ve fizyolojik olarak bozulması yara olarak tanımlanır. Yara oluşumu ile cilt bütünlüğü bozulduğunda, kan ve diğer vücut sıvılarının kaybı kontrol altına alınmalı, bakteriyel enfeksiyon riski engellenmeli ve hasarlı doku en kısa sürede onarılacak işlevi geri kazandırılmalıdır. Bazı küçük yaralar vücuttaki doğal mekanizmalar tarafından kendi kendine iyileştirilebilirken, büyük yaralarda iyileşmeyi sağlamak için dışarıdan müdahale etmek gerekir. Yara tedavilerinde çeşitli yara örtüleri sıklıkla kullanılmaktadır. Yara iyileşmesi sürecini desteklemek amacıyla geçmişten günümüze dek birçok yara örtüsü geliştirilmiştir ancak herhangi bir standart yara örtüsü bulunmamaktadır. Her yara örtüsünün farklı yara tiplerine ve yaranın bulunduğu vücut bölgesine bağlı olarak avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle günümüzde hala çeşitli malzemeler içeren yara örtüleri geliştirilmeye devam etmektedir.

Hidrojel yüksek oranda su içeren, gözenekli, oldukça hidrofilik yapıda polimerik ağlar olarak tanımlanmaktadır. Yüksek miktarda sıvı emme yetenekleri, yüksek biyoyumlulukları, elastik yapıları ve ideal gaz geçirgenliği özellikleri nedeniyle yara örtü

malzemesi olarak kullanılmaları uygundur. Bu tez çalışmasında ZnO nanopartikül yüklü jellan gam içeren antibakteriyel ve hemostatik özellikte süngerler sentezlenmiştir. Jellan gam, sentezlenen süngerlerde biyouyumlu polimer matriks oluşturmak, ZnO nanopartiküller ise antibakteriyel özellik sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle ZnO nanopartikülleri sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonu FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir ve ZnO nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiği belirlenmiştir. XRD analizi ile elde edilen ZnO nanopartiküllerin yüksek saflıkta olduğu tespit edilmiştir. TEM görüntülerinin incelenmesi sonucunda elde edilen nanopartiküllerin morfolojik yapılarının küresele yakın olduğu ve ortalama parçacık boyutlarının ise 70 nm olduğu tespit edilmiştir. DLS analizi ile ortalama çaplarının $74,39 \pm 5,08$ d.nm (çap.nanometre) olduğu ve homojen boyut dağılımına sahip oldukları belirlenmiştir. Sentezlenen süngerlerin karakterizasyonu için ise SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin şişme testleri sonuçlarına göre süngerlerdeki ZnO nanopartikül miktarının artması şişme oranını azaltmıştır. Ancak üretilen süngerlerin kanama durdurucu özellikte olması için gereken şişme derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ZnO nanopartikül miktarındaki artışın süngerlerin degradasyon süresini kısalttığı gözlemlenmiştir. Antibakteriyel özelliğin belirlenmesi amacıyla agar disk difüzyon testi ve koloni oluşturan ünite testi (CFU) uygulanmıştır. Agar disk difüzyon testi ve koloni oluşturan ünite testi (CFU) sonuçları incelendiğinde ZnO nanopartikül yüklü süngerlerin tamamının *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisinin yüksek olduğu görülmüştür.

Nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun *E. coli*'de %0, *S. aureus*'da %49,5 antibakteriyel etki gösterdiği, en düşük düzeyde nanopartikül içeren grup olan GG-ZnNP-1 grubunun *E. coli* için %94,2 ve *S. aureus* için %80,8 antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kan deneyleri sonucunda ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun kan absorpsiyon kapasitesi %86,2 iken farklı miktarlarda nanopartikül içeren diğer gruplarda sırasıyla GG-ZnNP-1 için %95,5 , GG-ZnNP-2 için %89,7 , GG-ZnNP-3 için %99,8 olarak ölçülmüştür. Jelatin temelli ticari süngerde kan absorpsiyon kapasitesi ise %32,8 olarak tespit edilmiştir. Sentezlediğimiz süngerlerin ve ticari süngerin kan tutma kapasiteleri karşılaştırıldığında ZnO nanopartikül içeren süngerlerin 15. dakikada %87,3 , ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0'nin %81,9 , ticari hemostatik süngerin ise %23,7 kan tutma kapasitesi gösterdiği görülmüştür. Sentezlenen süngerlerin biyouyumluluk deneyleri

in vitro ortamda L929 (Fare Fibroblast Hücre Hattı) hücreleri ile MTT canlılık analizi yapılarak belirlenmiştir. Hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları incelendiğinde en başarılı gruplar GG-ZnNP-0 ve GG-ZnNP-1 grupları olarak tespit edilmiştir. Ancak daha yüksek dozlarda ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin (GG-ZnNP-2, GG-ZnNP-3) beklenildiği üzere hücre canlılığını düşürdüğü ve toksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde sentezlediğimiz süngerler içindeki en düşük dozda ZnO nanopartikül içeren grubumuz olan GG-ZnNP-1'in yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılmak üzere en uygun özellikte olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ZnO nanopartikül, hidrojel, jellan gam, hemostatik, yara örtüsü, antibakteriyel

ABSTRACT

ZnO NANOPARTICLES LOADED HEMOSTATIC SPONGES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN-VITRO* STUDIES

Başak KURİN ATASOYU

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Co- Supervisor: Doç. Dr. Bengi Özkahraman

June 2023, 103 pages

A disruption of the integrity of the skin or tissue is defined as a wound. When the skin integrity is compromised, it is necessary to control the loss of blood and other body fluids, prevent the risk of bacterial infection, and expedite the repair of damaged tissue to restore function. While some small wounds can heal on their own through natural mechanisms in the body, larger wounds require external intervention to facilitate healing. Various wound dressings are commonly used in wound treatments. Throughout history, numerous wound dressings have been developed to support the process of wound healing. However, there is no standard wound dressing available. Each wound dressing has its own advantages and disadvantages depending on the type of wound and the location on the body. Therefore, the development of wound dressings containing various materials continues to this day.

Hydrogels are defined as highly hydrated, porous, and hydrophilic networks of polymer chains. They are suitable materials for wound dressings due to their high fluid absorption capacity, high biocompatibility, elastic structure, and ideal gas permeability properties. In this thesis study, sponge-like materials containing ZnO nanoparticle-loaded hydrogels were synthesized with antibacterial and hemostatic properties. The gellan gum was used to ensure biocompatibility in the synthesized sponges, while ZnO nanoparticles were incorporated to impart antibacterial properties.

In the scope of the thesis study, firstly, ZnO nanoparticles were synthesized. FTIR analysis confirmed the successful synthesis of ZnO nanoparticles, while XRD analysis indicated the high purity of the obtained ZnO nanoparticles. Upon examination of the TEM images, it was determined that the morphological structure of the obtained nanoparticles was close to spherical, with an average particle size of 70 nm. DLS analysis revealed that their diameter was $74,39 \pm 5,08$ d.nm (diameter in nanometers) and they had a homogeneous size distribution. SEM analysis was performed for the characterization of the synthesized sponges. According to the swelling tests of the gellan gum sponge containing ZnO nanoparticles, an increase in the amount of ZnO nanoparticles reduced the swelling ratio. However, it was determined that the produced sponges had the necessary degree of swelling to possess hemostatic properties. Additionally, an increase in the amount of ZnO nanoparticles was observed to shorten the degradation time of the sponges. To determine the antibacterial properties, agar disk diffusion test and colony-forming unit assay (CFU) were performed. When examining the results of the agar disk diffusion test and colony-forming unit assay, it was observed that all ZnO nanoparticle-loaded sponges exhibited a high antibacterial effect against *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

The GG-ZnNP-0 group, which does not contain nanoparticles, exhibited 0% antibacterial activity against *E. coli* and 49,5% against *S. aureus*. The group with the lowest level of nanoparticles, GG-ZnNP-1, demonstrated 94,2% antibacterial activity against *E. coli* and 80,8% against *S. aureus*. Blood tests revealed that the blood absorption capacity of the GG-ZnNP-0 group without ZnO nanoparticles was 86,2%, while it was measured as 95,5% for GG-ZnNP-1, 89,7% for GG-ZnNP-2, and 99,8% for GG-ZnNP-3, which contained different amounts of nanoparticles. The commercial gelatin-based sponge had a blood absorption capacity of 32,8%. When comparing the blood holding capacities of our synthesized sponges and the commercial sponge, the sponge containing ZnO nanoparticles

demonstrated 87,3% blood holding capacity at 15 minutes, while GG-ZnNP-0 exhibited 81,9% and the commercial hemostatic sponge showed 23,7% blood holding capacity. The biocompatibility experiments of the synthesized sponges were determined through in vitro tests using L929 (Mouse Fibroblast Cell Line) cells and MTT viability analysis. Cell viability analysis (MTT) indicated that the most successful groups were GG-ZnNP-0 and GG-ZnNP-1. However, it was observed that jellan gum sponges containing higher doses of ZnO nanoparticles (GG-ZnNP-2, GG-ZnNP-3) decreased cell viability and exhibited toxic effects, as expected.

Considering all these results, it can be concluded that our group with the lowest dose of ZnO nanoparticles, GG-ZnNP-1, is the most suitable for use in wound healing applications.

Keywords: ZnO nanoparticles, hydrogel, jellan gum, hemostatic, wound dressing, antibacterial.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara İyileşmesi Aşamaları	3
2.1.1. Hemostaz.....	3
2.1.2. İnflamasyon	4
2.1.3. Proliferasyon.....	4
2.1.4. Yeniden Yapılanma (Remodeling)	5
2.2. Kronik Yaraların İyileşme Süreci ve Ekonomik Etkileri.....	6
2.3. Yara Örtüleri	9
2.3.1. Yara Örtüsü Çeşitleri.....	11
2.3.1.1. Nanofiber Temelli Yara Örtüleri	11
2.3.1.2. Film ve Membran Tipi Yara Örtüleri	12
2.3.1.3. Hidrokolloidler	12
2.3.1.4. Süngerler ve Bandajlar	13
2.3.1.5. Hidrojeller.....	13
2.3.1.6. Köpükler.....	14
2.3.2. Yara Örtülerinde Kullanılan Doğal Malzemeler	15
2.3.2.1. Kollajen	15
2.3.2.2. Jelatin	16
2.3.2.3. Kitin ve Kitosan	16
2.3.2.4. Aljinat	16
2.3.2.5. Jellan Gam.....	17

2.3.2.6. Selüloz	17
2.4. Yaralarda Bakteriyel Enfeksiyonlara Karşı Kullanılan Antibakteriyel Yöntemler	18
2.4.1. Metal Nanopartiküller	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	23
3.2. ZnO Nanopartiküllerin Sentezi	24
3.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Sentezi.....	24
3.4. ZnO Nanopartiküllerin Yapısal Ve Morfolojik Karakterizasyon Çalışmaları	25
3.5. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	25
3.5.1. Yapısal ve Morfolojik Karakterizasyonu	25
3.5.2. Şişme Kapasitesi Belirlenmesi.....	25
3.5.3. <i>In Vitro</i> Hidrolitik Bozunma Oranı (%)	26
3.6. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	26
3.6.1. Agar Disk Difüzyon Deneyi	26
3.6.2. Koloni Oluşturan Ünite Deneyi (CFU)	27
3.7 ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hemostatik Etkinliklerinin Değerlendirilmesi	28
3.7.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin <i>In Vitro</i> Kan Absorpsiyonunun SEM ile Değerlendirilmesi	29
3.8. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin <i>In Vitro</i> Hücre Canlılık Deneyleri.....	30
3.8.1. Hücre Kültürü Koşulları	30
3.8.2. L929 Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması	30
3.8.3. L929 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	30
3.8.4. MTT Canlılık Analizi	31
3.8.5. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Çizik Testi Deneyleri	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. ZnO Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
4.1.1. ZnO Nanopartiküllerin Yapısal Karakterizasyonu	33

4.1.2. ZnO Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu	34
4.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Karakterizasyonu	38
4.2.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Yapısal Analiz	
Sonuçları.....	38
4.2.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Morfolojik Analiz	
Sonuçları.....	39
4.2.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Şişme Davranışı	
Sonuçlarının Değerlendirilmesi	41
4.2.4. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerinin <i>in vitro</i> hidrolitik	
degradasyon sonuçlarının değerlendirilmesi.....	42
4.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel	
Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	43
4.3.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel	
Aktivitelerinin Agar Disk Difüzyon Deneyi ile Değerlendirilmesi	43
4.3.2. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin antibakteriyel	
aktivitelerinin koloni oluşturan birim deneyi ile değerlendirilmesi	44
4.4. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hemostatik Etkinliklerinin	
Değerlendirilmesi	45
4.4.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Kan Absorpsiyonu	
Sonrasındaki SEM Görüntülemeleri.....	50
4.5. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi ve çizik	
testi	52
4.5.1 ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hücre Canlılık Analizi..	52
4.5.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Çizik Testi.....	53
5. YORUM	56
6. KAYNAKLAR.....	61
EKLER	73
Ek-1 Etik Kurul Belgesi	73
Ek-2 Tez Çalışması Orjinallik Raporu	74
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Derinin yapısı ve katmanları [6].....	2
Şekil 2.1. Yara İyileşmesinin Aşamaları [23].....	6
Şekil 2.3. Akut ve kronik yaraların farkları [29]	7
Şekil 2.3. Hidrojellerin özellikleri	14
Şekil 2.5. Reaktif oksijen türlerinin antibakteriyel etkisi [85]	21
Şekil 3.1. ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlerin sentezlenmesi, karakterizasyon testleri ve yapılan çalışmaların özeti	23
Şekil 4.1. ZnO nanopartiküllerine ait FTIR analizi sonuçları	34
Şekil 4.2. ZnO nanopartiküllerine ait XRD diyagramı.....	34
Şekil 4.3. ZnO nanopartiküllerine ait pH 7.4'te boyut analizi.	35
Şekil 4.4. ZnO nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	36
Şekil 4.5. ZnO nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri 100 nm (a) ve 50 nm (b) skala büyüklüğünde.	37
Şekil 4.6. ZnO nanopartikül içeren GG-ZnNP-0 (i), GG-ZnNP-1 (ii), GG-ZnNP-2 (iii), ve GG-ZnNP-3 (iv), kodlu jellan gam süngerlere ait FTIR spektrumları.	38
Şekil 4.7. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait SEM görüntüleri. (a) GG-ZnNP-0, (b) GG-ZnNP-1, (c) GG-ZnNP-2 ve (d) GG-ZnNP-3 süngerler.....	40
Şekil 4.8. Farklı oranlarda ZnO nanopartikülü içeren jellan gam süngerlere ait şişme oranları.	41
Şekil 4.9. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait <i>in vitro</i> hidrolitik degradasyon profili	42
Şekil 4.10. Jellan gam süngerlerin agar disk difüzyon deneyi sonuçları (a) <i>E.coli</i> , (b) <i>S.aureus</i>	44
Şekil 4.11. Jellan gam süngerlerin <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> için koloni oluşturan ünite deneyi sonuçları.	45
Şekil 4.12. Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyon etkinliklerinin birbirleriyle ve ticari sünger ile kıyaslanması.....	46
Şekil 4. 13. Jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin kan tutma kapasitelerinin 15, 30 ve 45. dakikalara göre kıyaslanması.....	48

Şekil 4.14. Kan sızıntısının görüntülenmesi. (a) disk şeklinde kesilen süngerlerin ve ticari (commercial) süngerin cam şişeler içerisindeki görüntüsü, (b) tam kan uygulanan jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin 60 saniye sonrasındaki görünüşleri, (c) salin çözeltisi ile muamele edilen jellan gam süngerlerin ve ticari süngerden gerçekleşen kan sızıntısının görüntülenmesi.....	49
Şekil. 4.15. Kan absorpsiyonu öncesi ve kan absorpsiyonu sonrasında alınmış SEM görüntülemeleri. Sırasıyla kan absorpsiyonu öncesi (1) ve sonrası (2) süngerler: (a1, a2) Jellan gam (GG-ZnNP-0), ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerler (b1, b2) GG-ZnNP-1, (c1, c2) GG-ZnNP-2 ve (d1, d2) GG-ZnNP-3 ve (e1, e2) Ticari sünger.	52
Şekil 4.16. L929 hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüsü (skala 100µm).	52
Şekil 4.17. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi.	53
Şekil 4.18. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin çizik testi.	54
Şekil 4.19. Jellan gam ve ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait yara kapanma yüzdeleri.	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitre
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
wt	Ağırlık
g	Gram
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

NP	Nanopartikül
ZnO	Çinko Oksit
GG	Jellan Gam
FTIR	Fourier Dönüşümlü Transform Kızılötesi
XRD	X Işını Kırınımı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
FSS	Fötal Sığır Serumı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

1. GİRİŞ

Deri, insan vücudundaki en geniş ve en ağır organ olarak tanımlanmaktadır. Bir kişinin toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak altıda biri deri ağırlığıdır. Derinin vücudun normal işleyişi için son derece önemli ve hayati görevleri bulunmaktadır [1,2]. Genel olarak diğer doku ve organları dış ortamdan izole eder, vücudun etrafında bir bariyer oluşturarak temel maddelerin geçişini düzenler ve mikroorganizmaların girişine izin vermeyerek vücut savunmasında görev almaktadır. Bunun yanı sıra vücut sıcaklığını düzenleme, ağrı, sıcaklık ve diğer mekanik etkilerin algılanması ve iletimi gibi önemli fizyolojik olaylarda önemli roller üstlenmektedir [3,4].

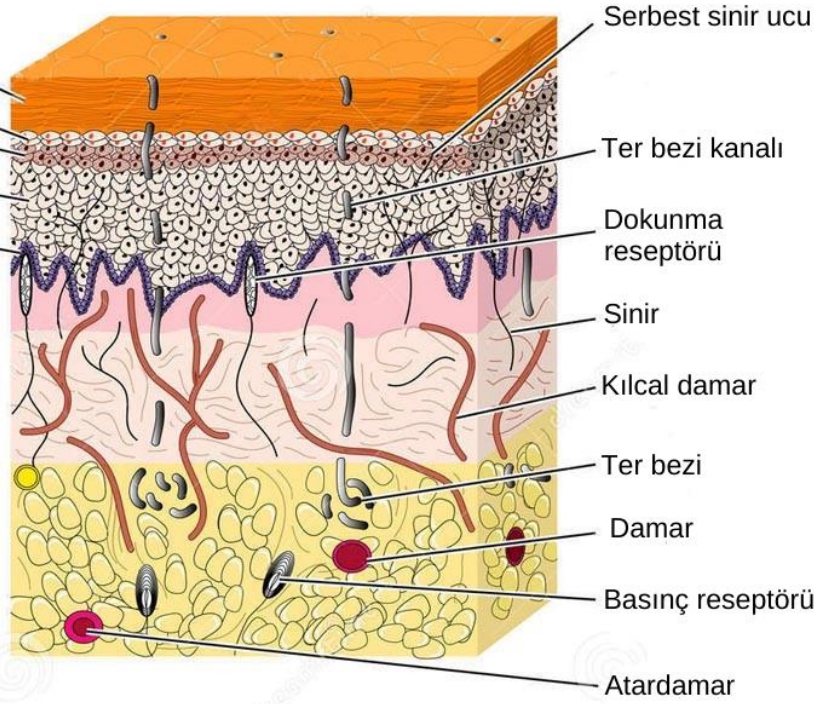
İnsan cildi farklı dermal katmanlardan oluşmaktadır. Derinin yapısı epidermis, dermis ve hipodermis (subkutanöz doku) olmak üzere üç ayrı katmandan meydana gelmektedir. Epidermis, bu üç katmanın en dış tabakasıdır ve vücudun ilk savunma hattını temsil etmektedir. Stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basale ve bazal membran olmak üzere yapısında birçok alt katman bulunmaktadır. Dış mikrobiyotadan ve zararlı ultraviyole ışınlarından vücudu korumaktadır. Ayrıca epidermisin nem tutma, vücut sıcaklığını dengeleme, fiziksel ve duyuşsal algılama gibi çeşitli farklı işlevleri bulunmaktadır [2,4]. Dermis katmanı, papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki bağ dokudan meydana gelmektedir. Temel bileşenleri dermal fibroblastlar, elastin ve kolajen lifler, glikozaminoglikan (GAG) gibi temel maddeler ve kan ile lenf damarlarıdır. İçerdiği kan damarları sayesinde diğer katmanların besin ve oksijen ihtiyacını karşılar ve aynı zamanda cilde esneklik ve alt katmanlara fiziksel destek sağlamaktadır. Hipodermis katmanı, subkutan yağ tabakası olarak da adlandırılır. Yapısında yağ doku, kan damarları ve sinirler bulunur. Hipodermis ısı yalıtımı sağlar, cildi mekanik darbelerden korur, dermis tabakasını gerekli organlara bağlar, endokrin ve parakrin sinyalleşme ile ilişkilendirilmektedir [2,5].

Epidermis:

Stratum corneum
Stratum lucidum
Stratum granulosum
Stratum spinosum
Stratum basale

Dermis:

Papiller dermis
Retiküler dermis

Hipodermis:

Şekil 1.1. Derinin yapısı ve katmanları [6]

Yara oluşumuna sebep olan etkenler genel olarak fiziksel, kimyasal ve termal etkenler veya altta yatan fizyolojik bir bozukluktur. Bu etkenler sebebiyle ciltteki veya iç organlardaki normal anatominin ve normal fonksiyonunun bozulması durumu yara olarak tanımlanmaktadır. Yaralar günümüzde dünya çapında en yaygın karşılaşılan sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır [7,8]. Yaralar tip (venöz, diyabetik), altta yatan sorunlar (iskemik, iskemik olmayan, enfeksiyonlu, enfeksiyonu olmayan) ve iyileşme süresine (akut, kronik) göre sınıflandırılmaktadır [9]. Yaklaşık olarak 8-12 haftalık iyileşme süresi gerektiren yaralar akut yaralar olarak tanımlanmaktadır. Kronik yaralar ise çok daha uzun iyileşme süreleri gerektirir ve iyileşme gerçekleşse bile ciltte çok ciddi yara izleri bırakabilmektedir [5]. Küçük yaraların neden olduğu kanama genellikle doğuştan gelen hemostatik mekanizmalar tarafından durdurulur ancak daha ciddi yaralanmalarda kanama kontrolü için dışarıdan müdahale gerekmektedir [7].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara İyileşmesi Aşamaları

Yara iyileşmesi, insan vücudunda gerçekleşen normal bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, doku hasarı oluştuktan hemen sonra başlayan, birbiriyle bağlantılı bir dizi olay içeren karmaşık ve dinamik bir yapıya sahiptir. Hemostaz (kanama durdurma), inflamasyon (iltihaplanma), proliferasyon (hücre çoğalması) ve remodelling (yeniden şekillenme) olmak üzere birbirini takip eden dört evre şeklinde gerçekleşir [10].

2.1.1. Hemostaz

Hemostaz, yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır ve doku hasarı meydana geldiği andan itibaren birkaç dakika içinde başlar. Hemostaz evresinde kronolojik olarak sırasıyla trombosit tıkaç oluşumu, trombosit yapışması, trombosit aktivasyonu, trombosit agregasyonu, intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma kaskadlarının aktivasyonu ve pıhtı çözünmesi olayları gerçekleşir [4]. Öncelikle trombositler aktive olur, pıhtının (fibronektin, fibrin, vitronektin ve trombospondinden meydana gelir) oluşumu için gerekli kimyasal sinyaller gönderir ve trombosit tıkaç meydana getirir. Ayrıca onarım sürecinin başlaması için büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, trombosit kökenli büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü-beta ve kemokinler) salgılanır [11–13]. Çeşitli nedenlerden kaynaklı olarak meydana gelebilecek cilt yaralanmaları genellikle kanama ile birlikte gerçekleşir. Kanama, ile birlikte hemostazı başlatan pıhtılaşma faktörü fibrinojen aktive olarak fibrine dönüşür. Oluşan fibrin iplikleri yaralarda ağsı bir yapı oluşturarak küçük boyutlu kanamaların durmasını sağlar [1]. Hemostaz fazının başlangıcında kan bileşenlerinin dışarı sızması, hücre göçünün gerçekleşebilmesi için ilk hücre dışı matriksi oluşturan kan pıhtısının meydana gelmesini sağlar. Pıhtı oluşumuna neden olan prokoagülan moleküller sayesinde kanın viskozitesi artar ve daha fazla trombosit ve kan hücresinin hapsolmesi sağlanır. Kan pıhtısının oluşması ile kanama kontrol altına alınmış olur. [4,14].

Normal süreçte trombositler damar duvarına tutunmaz ve birbirleriyle agregasyon oluşturmaz. Ancak yaralanma meydana geldiğinde trombositler protrombotik faktörler tarafından aktive edilir ve trombosit yüzey reseptörleri adezyon proteinlerine, kemokinlere, büyüme faktörlerine ve sitokinlere bağlanır. Trombositler, trombosit türetilen büyüme faktörü (PDGF) üreterek bir araya gelirler ve damar duvarında düz kas kasılmasını teşvik

ederler. Daha sonra protrombin aktifleşerek trombine dönüşür. Bu süreç sayesinde vücut, doku hasarının oluşturabileceği bakteriyel kontaminasyon ve vücut sıvılarının kaybindan korunur [15]. Oluşan pıhtı, yara bölgesine güç ve destek sağlayan bir kabuk oluşturmak üzere kurur, yara iyileşmesi için koruyucu bir rol oynar. [1].

2.1.2. İnflamasyon

Yaralanmadan kısa bir süre sonra nötrofillerin bir araya gelmesiyle inflamasyon evresi başlar. Bu aşamada trombositler ve lökositler immün sistem hücrelerinin bölgeye çekilmesini ve aktivasyonunu indükler. Lökositlerin yanıtı başlangıçta nötrofiller tarafından kontrol edilir, üçüncü günden sonra bu görev makrofajlara devredilir [15]. Yara oluşumu sırasında açığa çıkan kolajen lifler, pıhtılaşma kaskadını (intrinsik ve ekstrinsik yolları) başlatarak inflamasyon fazını başlatır. Dokuda yaralanma meydana geldikten sonra, hücre zarları güçlü vazokonstriktörler olan tromboksan A2 ve prostaglandin 2- α moleküllerini salgılar. Oluşan pıhtı trombositler, trombin, kolajen ve fibronektin içerir bunlar da büyüme faktörlerini salar ve inflamatuvar tepkiyi başlatır. Oluşan fibrin pıhtısı nötrofiller, fibroblastlar, monositler ve endotelyal hücreler gibi bu bölgeye gelen hücreler için iskele görevi görür. Ayrıca sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yoğunlaşmasında görev yapar [16].

Kanama durdurulduktan hemen sonra başlayan inflamasyon evresinde bağışıklık sistemi hücreleri etkin rol oynar. Bu sayede hem doku hasarı azaltılır hem de zararlı mikroorganizmalara karşı bir bağışıklık bariyeri meydana getirilir [13,17]. İlk olarak nötrofiller olmak üzere lökositler mikroorganizmaları ve yabancı cisimleri yok etmek için yara bölgesine gelirler. Nötrofiller tarafından yara bölgesindeki istilacı bakterileri ve ölü dokuları ortadan kaldırmak için proteolitik enzimler salgılanır. [16,18]. Aynı zamanda yakındaki dokularda ve kanda bulunan monositler de yara bölgesine göç eder ve genellikle yaralanmadan sonraki 48 ila 96 saat içinde makrofajlara farklılaşırlar [13,16].

2.1.3. Proliferasyon

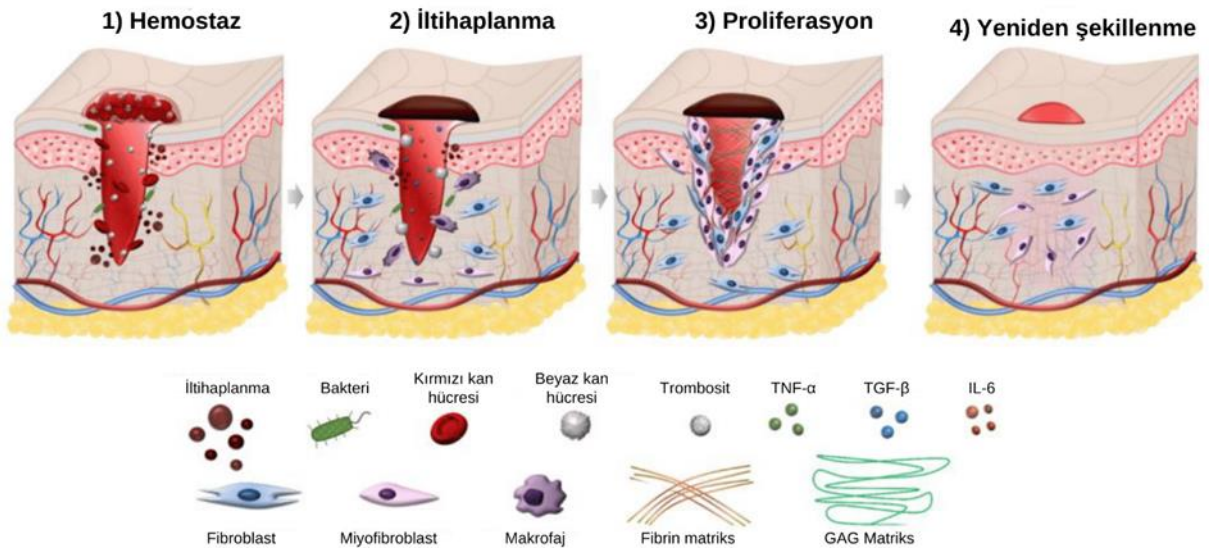
Proliferasyon aşaması kademeli olarak deri dokusunun yeniden sentezlenmesi, damar yapısının restore edilmesi, yara bölgesinin kapanması ile karakterize edilir [4]. Birkaç gün ile birkaç hafta arasında devam eden bu süreçte lezyonlu dokunun azaltılması amaçlanır.

Proliferasyon evresinde epidermal rejenerasyon, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu ve kolajen birikimi gerçekleşir [14,19].

Başlangıçta aktive olmuş fibroblastlar yara bölgesine göç eder ve ekstra selüler matriks proteinleri (hiyalüronik asit, fibronektin ve proteoglikan) üretilir, daha sonra dokuya dayanıklılık kazandırmak için kolajen sentezlenir. Bu oluşan bağ doku granülasyon dokusu olarak adlandırılır ve tip 3 kolajen bakımından oldukça zengindir. Granülasyon dokusu yeniden ekstraselüler matriks oluşumu için bir iskelet görevi görür, yeni kan damarlarının oluşumunu (anjiyogenez) destekler. Ayrıca bu evrede fibroblastlar miyoblastlara farklılaşarak kolajen sentezini artırır, yaranın büzülmesine ve yara boyutunun azalmasına neden olur. [9,20]. Proliferasyon evresinin sonlarına doğru epidermis tekrar kazanılır ve fibrin pıhtısı kolajen ekstraselüler matriks ile değiştirilir [9] .

2.1.4. Yeniden Yapılanma (Remodeling)

Son aşama olan yeniden yapılanma evresinde 2 yıla kadar sürebilen bir zaman aralığında ekstraselüler matriks olgun bir yara izine (skar) dönüşür [20]. Proliferasyon aşamasında oluşturulan kolajen lifler düzensizdir ve bu durum düşük dayanıklılığa sebep olmaktadır. Ancak yeniden yapılanma evresinde ekstraselüler matrikste üretilen tip 3 kolajen tip 1 kolajene dönüştürülür ve artık ihtiyaç duyulmayan hücreler apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır. Böylece skarın kalınlığı azalır ve daha dayanıklı hale gelir. Ancak yeniden yapılanma evresinin sonunda cilt sadece maksimum %80 gerilme dayanıklılığına ulaşır. [4,21,22]



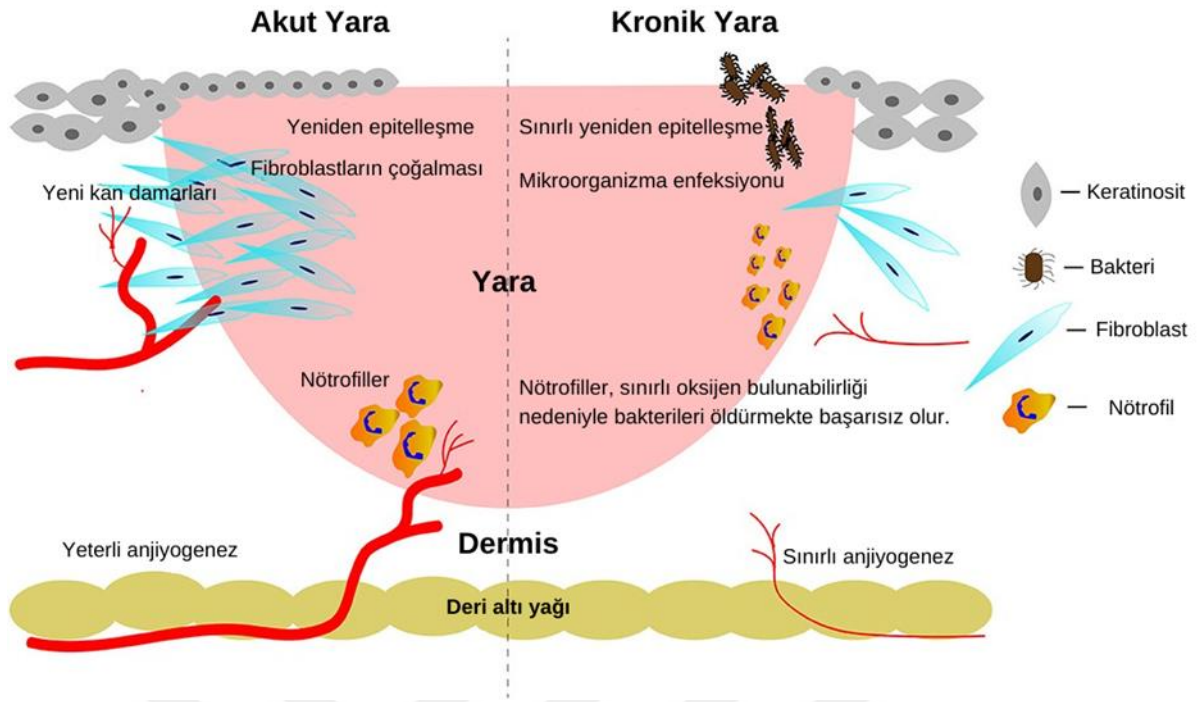
Şekil 2.1. Yara İyileşmesinin Aşamaları [23]

Yara iyileşmesi aşamaları diyabet, venöz yetmezlik gibi mevcut hastalıklar, hasta yaşı, yaranın enfeksiyon durumu, yaranın boyutu ve derinliği gibi bazı özel ve bireysel faktörlerden etkilenir [5]. Her şey yolunda gitse bile, yara dokusu asla yaralanmadan önceki gücüne ulaşamaz ve birden fazla anormal iyileşme durumunun yaşanması kronik yaraların oluşumuna neden olabilir [24,25].

2.2. Kronik Yaraların İyileşme Süreci ve Ekonomik Etkileri

Kronik bir yara, anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünü kazanmak için düzenli ve zamanında onarım sürecini yürütememiş veya sürdürülebilir bir anatomik ve fonksiyonel bütünlük sağlanmadan onarım sürecinden geçmiş yaradır. Bu yaralar daha basitçe iyileşmesi zor yaralar veya ülserler olarak adlandırılır [26]. Kronik yaralar, beklenen süre içinde iyileşememe özelliğiyle karakterize edilir. Ancak iyileşme süresiyle ilgili kesin bir tanım yapılamamıştır. Çoğu kaynakta iyileşme süreci ile ilgili sınırlama 4 hafta ile 3 ay arasında değişmektedir. Son yıllarda kronik yaraların görülme sıklığı ve ekonomiye yükü artış gösterdiğinden kronik yaraların iyileştirilmesi konusu giderek önem kazanmaktadır [26,27].

Kronik yaralar genellikle yara bölgelerinde yetersiz anjiyogenez ile karakterize edilir ve iyileşme süreci için dokuya gerekli besin ve oksijen ulaştırılamaz. Bu durum iyileşme sürecinin daha fazla zorlaşmasına neden olmaktadır [28]. Bazı kronik yaraların iyileşmesi birkaç yıl sürerken bazılarının ise onlarca yıl iyileşemediği bilinmektedir. Bu süreçte hastalar şiddetli ağrı, ruhsal ve fiziksel travmalar, hareket kısıtlaması ve sosyal izolasyon yaşamaktadırlar. Kronik yaralar tüm dünya için ciddi bir sorundur. Dünya genelinde nüfusun yaklaşık %1-2'sinin hayatlarının bir evresinde kronik yaralar ile karşılaşacağı tahmin edilmektedir [27].



Şekil 2.3. Akut ve kronik yaraların farkları [29]

Kronik yaralar, mevcut tüm tedavilere rağmen sıklıkla amputasyon (uzuv kaybı) ile sonuçlanmaktadır. Ülserler amputasyonların yaklaşık %85'inden sorumlu iken diyabetik ülserler tüm alt ekstremité amputasyonlarının %75'inden sorumludur. İyileşme süreci tamamlanamayan bir diyabetik ülser nedeniyle dünya genelinde her 30 saniyede bir amputasyon gerçekleşmektedir. Kronik yaralar sağlık sistemi için önemli bir ekonomik yük olmakla birlikte etkilenen bireylerin yaşam kalitesinde önemli düşüş meydana getirmektedir. Hatta ileri boyutlara oluşan kronik yaralar erken ölüm gibi ciddi sonuçlar yaratmaktadır. [26] Bir tek diyabetik ülserin maliyetinin yaklaşık olarak 50.000 ABD doları olduğu tahmin edilmektedir. Kronik yaraların genel maliyetinin ise diyabet ve diğer kronik hastalıkların yaygınlığının da her yıl artması nedeniyle yıllık yaklaşık 50 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir. Bu sebeple kronik yaralar hem hastalar hem de sağlık sistemi için ağır bir ekonomik yük oluşturmaktadır [24,30]. Çeşitli travmalar, yanık, diyabet, cerrahi operasyonlar ve genetik bozukluklar sebebiyle oluşan kronik yaraların ABD'de nüfusun yaklaşık %2'sini yaşamının bir döneminde etkilediği bilinmektedir [31].

Son dönemde dünya genelinde yaşlı nüfusun artışı ve obezite, diyabet, venöz hipertansiyon ve periferik vasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların yaygınlaşması ile birlikte kronik

yaraların görülme sıklığında da artış meydana gelmiştir. Bu durum yara bakımı konusundaki gelişmeleri acil ve kritik hale getirmektedir [32].

Gelişmemiş ülkelerde mevcut ekonomik durum ve sağlık altyapısı gelişmiş ülkelere göre oldukça kısıtlı olabilmektedir. Örneğin beslenme yetersizliği, parazit bulaşı, kronik fungal enfeksiyonlar gibi olumsuzluklar iyileşme sürecinin tam olarak gerçekleşmemesi ve kronik yara oluşumu şeklinde sonuçlanabilmektedir [27]. Ayrıca yaşlanma süreci, cildin biyokimyasal, yapısal ve fiziksel özelliklerinde değişikliklere yol açarak cildin biyolojik işlevlerinin aksamasına ve dolayısıyla yara iyileşmesinin de gecikmesine veya tam olarak gerçekleşmemesine neden olabilmektedir [2].

Kronik yaralar için uygulanan mevcut tedaviler, çalışmakta olan hastaların bu yaralar iyileşene kadar çalışamaması anlamına gelir. Bu durum da genellikle iş kaybı ile sonuçlanır. Kişinin sağlığı, ekonomik durumu, sosyal hayatı, psikolojisi ve yaşam kalitesi bu yaralar nedeniyle olumsuz şekilde etkilenir. Yaşlılar, ileri yaşa bağlı olarak yara iyileşmesinin yavaşlaması, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik yaraların oluşma ihtimalini arttıran sağlık problemleri nedeniyle en yüksek risk grubudur. [33–35]

Yara iyileşmesi sürecinde hücre ve doku homeostazı için ilgili bölgeye sürekli ve yeterli oksijen ulaşması çok önemlidir. Oksijen hücrelerde enerji üretimi, hücre zarı onarımı, mitokondri fonksiyonlarının gerçekleşmesi ve hücresel onarımda önemli rol oynamaktadır. Ciltte meydana gelen fiziksel hasar bazı durumlarda dokunun arteriyel, venöz ve kapiller sistemlerinin zarar görmesine neden olabilir. Bu hasarlar ise ilerleyen süreçte hipoksi ve iske mi gibi ciddi sağlık sorunlarını oluşturabilir [36]. Oksijen, özellikle enerji üretim sürecinde gerekli olduğundan tüm yara iyileşme mekanizmaları için hayati bir faktördür. Yara bölgesindeki yeterli oksijenasyon yara iyileşmesini destekler, keratinositleri göç etmesini, farklılaşmasını ve epitel doku oluşumunu artırır, fibroblastların proliferasyonunu ve kolajen üretimini artırır, bakteriyel üremeyi azaltır [37].

Yara bölgelerinde sıklıkla karşılaşılan bakteriyel üremeyi önlemek amacıyla çeşitli antibakteriyel ajanlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar normal cilt florasının bir parçası olmakla birlikte yara oluşumu sonrasında fırsatçı patojenlerin de etkinliği ile ortaya çıkan enfeksiyonlar yara iyileşmesini yavaşlatabilir hatta iyileşmeyi güçleştirebilir [24]. Bazı araştırmacılar 2050 yılına kadar antibiyotik direncine sahip bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların kanserden daha fazla insan ölümüne sebep olabileceğini öngörmektedir. Avrupa’da antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalar sebebiyle yılda yaklaşık 25.000 ölüm

meydana gelmektedir ve her yıl yaklaşık 1,5 milyar dolar harcanmaktadır. Ayrıca yara bakımının maliyeti de geçmişten günümüze artmaya devam etmektedir [38].

Yara bakımı için gerekli maliyetlerin değerlendirilmesi ve birçok problemin çözümünü sağlayabilecek etkili ürünlerin geliştirilmesi ile tedavide büyük ilerlemeler sağlanacağı tahmin edilmektedir. Etkili yara bakım tedavileri sayesinde muhtemelen yaralardan kaynaklı hastane yatışlarının sayısı azalacak, antibiyotik tüketimi azalacak ve aynı zamanda dünya genelinde ciddi bir sorun olan antibiyotik direncinin de önüne geçilmesi mümkün olacaktır. Bu amaca yönelik tedaviler özellikle akut yaraları iyileştirmek amacıyla kullanıldığı takdirde bu yaraların kronik yaralara dönüşmesi de engellenmiş olacaktır. Bu durumda önerilecek tedavi yöntemi hastanın yaşam kalitesini ve sosyal hayatını olumsuz etkilememelidir, kolay uygulanabilir olmalıdır. Böylece hastanın psikolojik ve duygusal sağlığının da gözetildiği etkili bir yara tedavisi gerçekleştirilebilir [4].

Özellikle hücresel ve moleküler biyoloji temelli araştırmalardaki ilerlemeler (doku mühendisliği ve kök hücre çalışmaları gibi) ve yara iyileşmesi sürecini destekleyen yara örtülerinin tasarlanması konusunda her geçen gün ilerleme kaydedilmektedir. Bu ilerlemelere rağmen kronik yaralar günümüzde hala ciddi bir problemdir ve genel olarak bu zarar görmüş iyileşme sürecinin nasıl işlediğine dair araştırmalar devam etmektedir [27].

2.3. Yara Örtüleri

Yara bakımının hedefleri temel olarak yaranın bulunduğu dokuyu daha fazla hasardan korumak, en kısa sürede yaranın kapanmasını sağlamak, yaralı dokunun işlevini tekrar kazandırmak, hastanın normal hayatına hızlıca dönmesini sağlamak, hastanın yaşam kalitesini arttırmak olarak özetlenebilir [15]. Doğal cilt yapısı en ideal yara örtüsü olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle nemli (yaklaşık olarak %85 su içeriği bulunan) ve geçirgenlik bakımından gerçek cilt dokusunu taklit eden yara örtülerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç günümüzde yara örtülerinin geliştirilmesi üzerine çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Yaranın daha uzun süre nemli kalması ve iyileşme sürecinin hızlanması için kullanılan yara örtüsünün bazı gereksinimleri karşılaması gerekir [39]. Yara iyileşmesi sürecinin nemli ortamda kuru ortamlara kıyasla daha verimli ve hızlı şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle kullanılacak yara örtüsünün yara bölgesini nemli tutması çok önemlidir. Yaralı ciltlerde sıvı kaybı normal ciltlere göre yaklaşık 20 kat daha fazladır. Kullanılacak yara örtüsünün aşırı dehidrasyonu kontrol etmesi, eksüdasyon ve

kabuk oluşumunu önlemesi gerekir. Mevcut çalışmalar sağlıklı bir ciltten düzenli olarak kaybedilen suyun 35 °C'de günlük 250 g/m² olduğunu göstermektedir ve bu miktar yaralı ciltte yaranın özelliklerine göre artış gösterebilir [5].

Yara örtüsü, yaranın özelliklerine bakılarak seçilmelidir. Uygun yara örtüsü seçimi yara iyileşme süreci için çok önemlidir. İdeal bir yara örtüsü biyouyumlu ve esnek yapıda olmalı, yara yüzeyine yapışmamalı, toksik bileşenler içermemeli, alerjik bir tepkiye neden olmamalı, mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturmali, mekanik koruma sağlamalı, yüzey nekrozunu azaltmalı, büyüme faktörlerini uyarmalı ve yeni doku oluşumunu desteklemelidir. Ayrıca yara bölgesine kolaylıkla uygulanabilmeli, rahatlıkla değiştirilebilmeli, kolay sterilize edilebilmeli ve yara yüzeyine gaz geçişini engellememelidir. Son olarak ideal yara örtüsü mümkün olduğunca düşük maliyetli tüm ve hastalar için ulaşılabilir olmalıdır [31,40,41] .

Yara örtü malzemeleri genel olarak geleneksel, biyolojik ve yapay yara örtü malzemeleri olarak sınıflandırılır [5]. Geleneksel yara örtüleri düşük maliyetli oldukları ve nispeten daha kolay üretildikleri için günümüzde de sıkça kullanılmaktadır. Ancak bu malzemeler yara bölgesinde nemli ortam sağlayamadıklarından yara iyileşmesinin gecikmesine sebep olabilirler. Geleneksel pansumanların bariyer özellikleri zayıftır ve enfeksiyon durumlarında yetersiz kalmaktadır. Yaradaki granülasyon dokusu, yara örtüsüne doğru büyüme eğilimindedir. Bu durum pansumanın yaraya yapışmasına ve pansuman değişimi esnasında doku hasarının oluşmasına sebep olabilir [42]. Geleneksel yara örtülerine örnek olarak pamuk, gazlı bez, yara bandı ve bandaj verilebilir. Bu malzemeler yaranın kurummasına neden olabildiği ve yara yüzeyine yapışma eğilimi gösterdiğinden bazı durumlarda sorunu çözememektedir. Ayrıca bu malzemelerin yara iyileşmesi süresini kısaltmak veya bakteri üremesini engellemek için herhangi bir özellikleri bulunmamaktadır [43]. Aynı zamanda bu yara örtüleri yara eksudasını sızdırdığı için bakteriyel enfeksiyon riskini artırır ve yara yüzeyinden ayrılırken cilde zarar verebildiği için kullanışlı değildir [37]. Geleneksel yara örtülerinin en sık kullanılan örneği 1970'lerden beri kullanılan gazlı pamuklu kompozit bandajlardır. Bu malzeme düşük maliyetli olması, kolay kullanılması ve kolay üretilmesi nedeniyle yaygın olarak tercih edilmiştir. Ancak yara eksudasını tamamen emerek yara bölgesinde hızlı bir dehidrasyona neden olması, bakteri üremesine yatkın olması, tedavinin sonunda bandaj çıkarılırken epitel floraya zarar vererek kanamaya ve ikincil bir hasara neden olması gibi ciddi dezavantajları bulunmaktadır [5]. Modern yara örtüleri ise yara yüzeyine yapışmaz ve yara salgılarını etkili şekilde absorbe eder. Ayrıca yara iyileşme sürecini

destekler ve enfeksiyon oluşumu riskini azaltır [43]. Biyolojik yara örtüleri ise bir çeşit doku nakli olarak kabul edilmektedir. Derin ve kronik yaraların iyileştirilmesi için tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem insan veya hayvanlardan alınan derinin nakledilmesi prensibine dayanır. Elastin ve kolajen lifler içerdiğinden yara yüzeyinde uyum kolay sağlanmaktadır. Bu uygulamanın en temel dezavantajı derin veya büyük yaralarda deri bağışının yetersiz kalmasıdır. Yapay yara örtüleri, normal cilt bileşiminde bulunmayan sentetik malzemelerden üretilmektedir. Bu pansumanların bileşiminde vücut için zararsız, mekanik olarak stabil, doku onarımına uygun bir ortam sunan malzemeler bulunmaktadır [5].

Günümüzde kullanılan bazı yara örtülerinin gaz geçirgenliğinin zayıf olması, yeterli nem ortamından yoksun olması, alerjik reaksiyonlara sebebiyet vermesi ve yara iyileşme sürecini uzatması özellikleri nedeniyle bu alanda yeni alternatiflere acil şekilde ihtiyaç duyulmaktadır [37].

Kullanmakta olduğumuz yara örtülerinin hiçbirisi mükemmel olarak kabul edilebilecek veya bir yaranın tüm gereksinimlerini karşılayabilecek durumda değildir. Örneğin film yara örtüleri nemli ortam oluşturma, bakteriyel üremeyi engelleme ve gaz değişimine izin verme yönleriyle kullanışlıdır ancak yara akıntılarını absorbe etme konusunda iyi değildir. Köpük yara örtüleri ise büyük miktarda yara akıntısını absorbe etme, uygun sıcaklık oluşturma ve gaz değişimine izin verme özellikleri ile kullanışlıdır ancak az akıntılı yaralarda bölgeye yapışarak doku tahrişlerine neden olabilir. Sonuç olarak tüm yara tiplerinde (akut, kronik, eksudalı, eksudasız) kullanılabilecek ve ideal özelliklere sahip bir yara örtüsü geliştirme ihtiyacı bulunmaktadır [44].

2.3.1. Yara Örtüsü Çeşitleri

Yara iyileşmesini desteklemek amacıyla kullanılan çok sayıda yara örtüsü geliştirilmiştir. Bunlar çeşitli şekillerde (sünger, hidrojel, hidrokolloid, köpük, nanofiber, film ve membran gibi) kullanılabilir [7,45]

2.3.1.1. Nanofiber Temelli Yara Örtüleri

Ortalama çap boyutları 1 mikrometreden küçüktür. Uygulandıktan sonra yara bölgesinden kolay ayrılırlar. Küçük çapları, çok porlu yapısı, yüksek gaz geçirgenliği gibi olumlu özellikleri sayesinde özellikle kronik yaralarda ilaçların yara bölgesine yüksek verimlilik ve

düşük toksisite ile taşınması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bu yara örtüleri ekstraselüler matriks (ECM) ile benzer boşluklara sahip olduğundan yara iyileşmesi sürecini de destekler [46]. Hasarlı dokuların hemostazını ve epitel hücrelerinin çoğalmasını uyarır, bakteriyel üremeye engel olur. Ancak sıcaklık değişimlerine karşı hassas olmaları, bazı üretim basamaklarında yüksek sıcaklık gerekliliği, yüksek maliyet ve üretim aşamalarında kontrol edilmesi gereken çok sayıda değişken bulunması nanofiber yara örtülerinin olumsuz özellikleridir [47].

2.3.1.2. Film ve Membran Tipi Yara Örtüleri

Film tipi yara örtüleri genellikle yapışkan ve şeffaf poliüretan (PU) içerir. Bu örtüler hem gazların geçişini sağlar hem de ölü dokuların yaradan uzaklaştırılmasında kullanışlıdır. Yüksek elastik özellikleri sayesinde kolayca herhangi bir şekle dönüştürülerek birçok vücut bölgesine uygulanabilirler. İnce yapıları ve transparan özellikleri ile pansuman çıkarılmadan yaranın iyileşme sürecinin gözlemlenmesine olanak sağlar. Bu malzemelerin sağlam yapışma özellikleri eklem gibi hareketli yüzeylere de uygulanmasına olanak sağlar. Ancak bazı durumlarda bu özellik pansuman değişimi sırasında doku hasarlarına neden olabilmektedir [30].

Membran tipi yara örtüleri film yara örtülerine benzer bir yapıya sahiptir. Polimer tabanlı membran yara örtüleri daha yüksek miktarda sıvı emebilme, yara iyileşmesi sürecinde gerek duyulan nemli ortamı oluşturma gibi özellikleriyle film yara örtülerinden daha avantajlıdır. Esnek ve yumuşak özellikleri sayesinde kolay uygulanırlar. Farklı biyoaktif maddeler yüklenerek üretilen polimer tabanlı film ve membranların çoğu mekanik özelliği insan cildi ile uyum gösterdiğinden biyouyumluluk ve iyileşme sürecini destekleme bakımından avantajlıdır. Vücutta birçok bölgedeki yaralara uyum sağlayabilirler, gaz geçirgenlikleri uygundur. Ancak yara eksudasını emme yetenekleri sınırı olduğundan her tip yaraya uygulanamazlar [37,41,48].

2.3.1.3. Hidrokolloidler

Hidrokolloid yara örtüleri jel oluşturan jelatin, pektin, karboksimetil selüloz gibi doğal ve sentetik polimerlerin diğer malzemeler ile kombinasyonu ile elde edilir. Kolay şekil alabilirler ve yapıları esnektir. Genellikle şeffaf veya yarı şeffaf özellikte olduklarından yara

iyileşme sürecinin gözlemlenmesini kolaylaştırırlar. Yüksek yapışkanlık özelliği gösterirler, bakteriyel enfeksiyonları azaltırlar. Hidrokolloid pansumanlar yara eksudası ile temas ettiğinde içerdiği hidrofilik partiküller yara üzerinde katı bir jel oluşturarak yara iyileşmesini destekleyen nemli bir ortam oluşturur [48]. Su buharına karşı geçirgen ancak bakterilere karşı geçirimsiz yara örtüleridir. Hafif veya orta düzeyde eksudalı yaralarda kullanımları uygundur. Yara yüzeyinden kolaylıkla ayrılırlar. Ancak çok eksudalı yaralar için kullanımları uygun değildir [49]. Bu yara örtülerinin enfekte olmuş yaralarda kullanımı aşırı nemli ve hipoksik ortam oluşturacağından nekrotik doku otolizini arttırdığı görülmüştür [50].

2.3.1.4. Süngerler ve Bandajlar

Süngerler ve bandajlar yumuşak ve esnek özellikli, bağlantılı gözenekli yapılar içeren yara örtüleridir. Gözenekli yapıları sayesinde yüksek miktarda sıvı emebilirler ve yüksek eksudalı yaralar için kullanışlıdır [46]. Süngerler yarayı nemli tutar, bakteriyel enfeksiyonları büyük ölçüde engeller ve hücre göçünü destekler. Yara tedavisi uygulamalarında terapötik ajanların taşınması için kullanılan birçok sünger yara örtüsü mevcuttur. Polimer temelli bandajlar, süngerler ile benzer özelliklere sahiptir. Yara bakımı amacıyla çeşitli biyoaktif maddeler ile birleştirilerek kullanılır. Biyoaktif ajanların yapıya eklenmesiyle uygulandığı bölgede kan pıhtılaşmasını hızlandıran, kontrollü çözünürlüğe sahip, antibakteriyel aktivite gösteren ve yara eksudasını başarılı şekilde emebilen bandajlar üretilmektedir. Ancak bandaj yara örtüleri çok yüksek gözeneklilikleri nedeniyle yara eksudasının gereğinden fazla emilerek yaranın kurummasına ve iyileşme sürecinin gecikmesine neden olabilir [37].

2.3.1.5. Hidrojeller

Hidrojeller yüksek oranda su bulunduran (%90'dan fazla su içeriğine sahip), polimerlerin fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanmasıyla oluşan 3 boyutlu ağlar içeren materyallerdir. Canlı dokulara çok benzemeleri ve kolay şekillendirilebilme özellikleri sayesinde özellikle son yıllarda yara örtüsü olarak en iyi seçeneklerden biri haline gelmiştir. Yara yüzeyine kolay uygulanırlar ve sınırlı yapışkan özellikleri sayesinde bölgeden kolaylıkla ayrılırlar. Bu yara örtüleri gaz alışverişi sayesinde yaranın soğumasına neden olur ve bu durum ise hastaların ağrılarının azalmasına yardımcı olur. Bazı çeşitleri şeffaf olarak tasarlanır ve böylece pansuman çıkarılmadan yara iyileşme süreci klinik olarak takip

edilebilir. Ayrıca hücre göçü için elverişli bir ortam sağlar, ideal nemliliğe sahiptir, yüksek miktarlarda yara eksudasını emer ve enfeksiyon oluşumunu büyük ölçüde engeller. Ayrıca ilaç toksisitesini azalttığı için ilaç taşıma sistemi olarak da kullanılır [37,41].



Şekil 2.3. Hidrojellerin özellikleri

Şekil 2.3'te hidrojellerin yara örtüsü olarak kullanımını avantajlı hale getiren bazı özellikler belirtilmiştir. Hidrojellerin viskozitesi düşük olduğundan yara yüzeyine tutunmaları genellikle zordur. Bu nedenle yapılarına çeşitli bileşenler eklenerek amaca yönelik modifiye hidrojeller tasarlanmaktadır [42]. Nanopartiküllerin hidrojellere dahil edilmesi ile kontrollü ilaç salımında, eksudanın giderilmesinde, bakteriyel enfeksiyonun engellenmesinde ve yara bölgesinin ideal nemlilikte tutulmasında başarılı sonuçlar elde edilmektedir [51]. Hidrojel hazırlıklarında kullanılan çeşitli polisakkaritler; bitkisel kaynaklı (akasya zambkı, guar zambkı), hayvansal kaynaklı (kitosan), mikroorganizma kaynaklı (ksantan zambkı, jellan gam) ve alg kaynaklı (aljinat) olarak örneklendirilebilir [52]. Polisakkarit temelli hidrojeller, yara örtüsü olarak kullanım için idealdir. Bazı polisakkarit temelli hidrojel yara örtüleri şeffaf olmaları sayesinde yara iyileşme döngüsünün kolaylıkla takip edilebilmesini sağlar [53]. Hidrojel pansumanlar ayarlanabilir mekanik özellikleri sayesinde diyabetik ülserler, basınç ülserleri, cerrahi yaralar, birinci ve ikinci derece yanıklar, cilt yırtıkları gibi durumlarda kullanıma uygundur [30].

2.3.1.6. Köpükler

Genellikle poliüretan veya silikon bazlı malzemelerden oluşurlar [48]. Köpük yara örtüleri hidrofilik ve hidrofobik köpükten oluşan, biyolojik yapışma özelliği sınırlı olan katı

gözeneklere sahip yara örtüleridir. Dış kısmında bulunan hidrofobik tabaka yaranın sıvı ile temasını engeller ancak su buharının iletimine izin verir. Bu yara örtüleri yeterli gaz alışverişi sağlar, nemli ortam oluşturur ve yüksek miktarda eksuda emebilir. Bu özellikleriyle orta veya yüksek akıntılı yaralarda (yanıklar, travmatik yaralar, diyabetik ülserler) kullanımı uygundur. Ancak bu malzemeler yüksek sıvı emme özellikleri nedeniyle yeterince nemli olmayan yaralarda kullanıldığında pansuman değişimi sırasında hasara neden olabilir. Bu nedenle kuru yaralar veya az eksudalı yaralar için kullanımı uygun değildir. Ayrıca nekrotik yaralar ve sık bakım gerektiren yaralarda da tercih edilmezler. [30,37]

2.3.2. Yara Örtülerinde Kullanılan Doğal Malzemeler

Doğal polimerler, biyopolimerler olarak da isimlendirilen, canlı organizmalar tarafından üretilen organik bileşiklerdir. Biyopolimerler aminoasitlerin, esterlerin, monosakkaritlerin veya nükleotitlerin tekrarlayan birimlerini içerir. Biyopolimerlerin kaynakları arasında bitkiler (selüloz, pektin, nişasta, kauçuk), hayvanlar (jelatin, kolajen, kitosan), mantarlar, algler ve bakteriler (ekzopolisakkaritler, bakteriyel selüloz) bulunur. Doğal polimerler ve sentetik polimerler bir arada kullanılarak özellikle yara örtüleri olmak üzere yeni polimerik malzemeler geliştirilmektedir. Bu malzemeler sentetik polimerler ile karşılaştırıldığında hücre dışı matriks (ECM) ile biyolojik uyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve düşük antijen özellikleri nedeniyle daha avantajlıdır [54]. Ayrıca toksik olmamaları ve ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmaları nedeniyle yara iyileşme uygulamalarının yanı sıra hücre taşıma ve ilaç taşıma alanlarında da yaygın şekilde kullanılmaktadırlar [52]. Günümüzde biyopolimerlerden elde edilen yara örtü malzemeleri (örn: aljinat, kitosan, jelatin, jelan gam) üstün özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Yara tedavisi uygulamalarına devam eden gereksinim nedeniyle biyopolimer bazlı yara örtüleri üzerine araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır [55].

2.3.2.1. Kollajen

Hayvanlarda fibroblastlar tarafından sentezlenen dallanmamış lifli bir proteindir. Tendonlarda, bağ dokuda, kıkırdakta ve deride bol miktarda bulunur. Kolaylıkla elde edilebilir ve saflaştırılabilir, biyouyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve emilebilir özelliktedir, immün yanıtlara sebep olma olasılığı çok düşüktür. Kolajen yara örtülerinin

yüksek sıvı emme kapasiteleri bulunur ve bu sebeple eksudalı yaralarda kullanımı son derece uygundur [48]. Antibakteriyel özelliğinin olmaması ve zayıf mekanik özellikleri nedeniyle kolajene ek olarak çeşitli moleküllerin yapıya katılmasıyla tasarlanan yara örtüleri daha kullanışlıdır [56].

2.3.2.2. Jelatin

Kolajenin kısmi denatürasyonu ve hidrolizi ile elde edilen bir malzemedir. Biyolojik olarak kolay parçalanır, yüksek biyouyumluluk gösterir. Kolajen ile kıyaslandığında immün yanıt oluşturma ihtimali daha düşüktür [48]. Özellikle sentetik polimerler ile birlikte yara örtüsü uygulamalarında sıkça kullanılır. Hidrofilik bir protein olduğundan yara eksudasını etkin şekilde emer ve bölgenin nem seviyesini korur. Ancak jelatin antibakteriyel aktiviteye sahip değildir bu yüzden çeşitli antibakteriyel ajanlarla kullanımı daha uygundur [46].

2.3.2.3. Kitin ve Kitosan

Kitin bazı kabukluların ve yumuşakçaların iskeletlerinde ve mantarların hücre duvarında bulunur. Özellikle yengeç ve karides gibi kabuklulardan kolay ve düşük maliyetle elde edilebilmektedir. Kitosan ise kitinin deasetillenmesi ile elde edilen bir üründür ve yara yüzeyinde N-asetilglukozamin birimlerine dönüşür. Bu moleküller epidermal hücreler tarafından alınır ve bu hücrelerin çoğalmalarını destekler. Kitosan yara örtülerinin kullanımıyla yaralı dokuda kolajen sentezinin arttığı ve mekanik dayanıklılığın arttığı, yara iyileşmesinin hızlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca biyouyumlu, antibakteriyel, hemostatik ve biyobozunur olduğundan hidrojel, nanopartikül, film gibi çeşitli şekillerde yara örtülerinin tasarımında başarılı şekilde uygulanmaktadır [42].

2.3.2.4. Aljinat

Aljinat, kahverengi alglerden elde edilen doğal bir polimerdir. Kendiliğinden yapışkan değildir, genellikle ikincil bir pansuman ile birlikte kullanılır [30]. Aljinat içerikli yara örtüleri son derece hidrofilik özelliktedir [57]. Ana bileşenleri metil sodyum karboksil selüloz ve kalsiyum aljinattır. Yüksek nem tutma kapasitesi, kolay şekil alabilmesi ve hemostatik özelliği sayesinde özellikle eksudalı yaralarda tercih edilirler. Ağırlığının yirmi

katına kadar sıvı emebilir ve gazlı bezlere kıyasla 5-7 kat daha emicidir. Yara bölgesinin nemli ortamını korurken aynı zamanda kalsiyum iyonları salar, trombositlerin aktivasyonunu ve dolayısıyla yara iyileşmesini destekler. Ayrıca kalsiyum aljinat bakterileri tutarak enfeksiyon oluşumunu büyük ölçüde engeller ve aynı zamanda makrofajların aktivasyonunda rol oynar. Ancak aljinat yaradaki sıvı ile temas ettiğinde jel oluşturur ve işlevli olabilmesi için mutlaka bu nemli ortama ihtiyaç duyar. Eğer yara bölgesinde akıntı yoksa yüzeye fazlasıyla yapışabilir ve pansuman değişimi sırasında doku hasarlarına neden olabilir. Bu nedenle özellikle yüksek salgılı yaralar için kullanımı önerilmektedir [42,58].

2.3.2.5. Jellan Gam

Jellan gam, bakteriyel bir ekzopolisakkarittir. Doğada biyolojik olarak parçalanabilir yapıdadır ve toksik değildir [52]. Jellan gam ticari olarak *Sphingomonas elodea* veya *Pseudomonas elodea* bakterisinden mikrobiyal fermentasyon yoluyla elde edilir [59]. Isı ve asit kararlılığına, ayarlanabilir esnekliğe ve yüksek geçirgenliğe sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı kolayca şekil değiştirebilir ve birçok farklı alanda kullanılabilir. Geleneksel jelleştirici materyaller olan agaroz ve karragenan düşük pH'ta daha az jelleşme kapasitesine sahiptir ancak jellan gam güçlü jelleşme kapasitesi nedeniyle daha avantajlıdır [60]. Yüksek biyouyumluluğa sahiptir. Ayrıca jelleşme özelliği, yüksek miktarlarda sıvı emebilme kapasitesi ve kolay şekil alabilmesi yönüyle yara örtüsü uygulamalarına uygundur. Yara iyileşmesi uygulamalarında hücre çoğalmasını desteklediği yönünde bulgular vardır. Jellan gam bazlı hidrojeller yüksek sıvı emme kapasiteleri nedeniyle özellikle yüksek eksudalı yaralar için kullanıma uygundur [61,62].

2.3.2.6. Selüloz

Selüloz bitkilerin hücre çeperinde bulunan yapısal bir polisakkarittir. Ayrıca bazı bakteri, mantar ve algler tarafından fermentasyon ile üretilebilir. β -1,4 bağıyla birbirine bağlanan çok sayıda glikozdan meydana gelir [30]. Bakteriyel selüloz kimyasal olarak bitki selülozuyla eşdeğerdir ancak pektin, lignin ve hemiselüloz gibi yan ürünlerden arındırılmış olduğundan pansumanlarda daha sık tercih edilir. Biyouyumluluğu, toksik olmaması, iyi nem tutma yeteneği ve granülasyonu hızlandırması nedeniyle yara örtülerinde selüloz kullanımı yaygındır [63]. Yüksek hidrofilik özelliği sayesinde özellikle eksudalı yaralar için tercih edilirler. Ancak bu malzemeler antibakteriyel ve antienflamatuvar özelliklerden

yoksun olduğundan çeşitli moleküllerin takviyeleriyle tasarlanmış ve modifiye edilmiş selüloz bandajların kullanımı daha avantajlıdır. Yapılarına antibiyotikler, antienflamatuvar ilaçlar, çeşitli peptitler ve proteinlerin eklenmesiyle tasarlanan bakteriyel selüloz bazlı kompozit yara örtüleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [64].

Biyopolimerlerin çok sayıda üstün özelliği bulunmaktadır ancak mekanik özellikleri genellikle zayıftır. Bu nedenle mekanik performanslarını yükseltmek için sıklıkla sentetik polimerler ile çapraz bağlanarak yeni kombinasyonlar denenmektedir. Yara örtülerinin formülasyonlarında doğal polimerlere çapraz olarak bağlanarak kullanılan sentetik polimerler arasında poliglikolik asit (PGA), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), polihidroksi etil metakrilat (PHEMA), poliüretan (PU), ve polivinil pirolidon (PVP) bulunmaktadır [37].

2.4. Yaralarda Bakteriyel Enfeksiyonlara Karşı Kullanılan Antibakteriyel Yöntemler

Cilt bütünlüğü bozulduğunda ilk olarak ortaya çıkan tehlikelerden biri bakteriyel enfeksiyon riskidir. Bakteriler bu bölgede çoğalarak yara bölgesinin yenilenmesini engeller ve bunun sonucunda yara bölgesinin büyümesi muhtemeldir. Bakteriyel kolonizasyon dermis (subkutanöz) katmanlara doğru ilerlediğinde, damarların etrafındaki bölgeleri enfekte ederek kan dolaşımına katılabilir ve buna bağlı olarak septisemi başta olmak üzere birçok hayati risk ortaya çıkabilir. Bu durumu engellemek için bakteriyel enfeksiyon subkutanöz katmanlara göç etmeden önce bunu durdurabilecek bir antibakteriyel yöntem belirlemek önemlidir [4]. Özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi gram pozitif bakteriler yara enfeksiyonlarının erken evrelerinde görülür. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakteriler ise daha ileri evrelerde yara bölgesine yerleşir. Yara iyileşmesinin doğal sürecinde bağışıklık sistemi patojen bakterileri ortadan kaldırarak onarım sürecinin etkilenmesini engeller. Genel olarak bu süreçte makrofajlar yara bölgesine göç ederek patojenleri fagosite eder, kazanılmış ve humoral bağışıklık yanıtı koordine edilir. Bireyin bağışıklık sistemi patojen bakterileri ortadan kaldıramadığında bu enfeksiyonlar ilerler ve granülasyon dokusu, büyüme faktörleri, hücreler arası matriks yapılarının bozulmasına yol açarak normal iyileşme sürecinin gerçekleşememesine neden olur [24,65–67]. Yarada devam eden bakteriyel üreme lipaz ve proteaz gibi enzimlerin birikimine neden olur ve bunlar ekstraselüler matriksi parçalayarak enfeksiyonun daha derin

dermal katmana ulaşmasına neden olur [68]. Bakteriyel üreme hem yara iyileşmesini geciktirerek kronik yara riskini artırır hem de çevresindeki diğer doku ve organların işlevlerini tehdit eder. Bu tür komplikasyonların gelişmesini önlemek için topikal antibiyotikler, topikal biyosidler ve nano-metaller gibi topikal antibakteriyel yöntemler kullanılmaktadır [4].

Bugün kullanılmakta olan çoğu hemostatik materyal antibakteriyel özelliğe sahip değildir. Bu sebeple antibiyotikler, nanopartiküller ve diğer antibakteriyel ajanlar hemostatik materyallerle birleştirilir. Günümüzde hala hem antibakteriyel hem de hemostatik aktivitelere sahip biyouyumlu materyallerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [69] .

Antibiyotik uygulamaları, bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele etmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılan antibiyotikler arasında mupirosin, fusidik asit, basitrasin, polimiksin B, neomisin ve retapamulin bulunmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımıyla ilgili genel yargı, enfeksiyon öncesinde koruyucu önlem olarak ve enfeksiyon oluşumu sonrasında kullanılabilecekleridir. Genellikle etkileri hızla ortaya çıkar ve çeşitli türde bakteriler üzerinde öldürücü etkileri bulunur. Antibiyotik kullanımı ile ilgili en ciddi problem dünya genelinde yaygın antibiyotik kullanımı sonucunda gelişen bakteriyel dirençtir. Bu durum antibiyotiklerin etkinliğinde giderek azalmaya neden olmaktadır [70]. Antibiyotik çeşitlerinin sınırlı etki spektrumu ve etkinliğinin yetersiz kalması, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi tedavileri çıkmaza sokmaktadır [71]. Antibiyotik uygulamalarında karşılaşılan bir diğer olumsuzluk da hastanın belirli antibiyotiklere karşı doğuştan biyo-uyumsuzluğudur. Bu durum istenmeyen bağışıklık tepkilerine neden olmaktadır. Ayrıca antibiyotik kullanımıyla birlikte vücut için yararlı olan bakterilerin de yok edilmesiyle belirli mantar türlerinin sayısında artma ve buna bağlı fungal enfeksiyonlar görülebilir. Bu nedenlerle antibiyotik kullanımı uzun vadeli sürdürülebilir bir yöntem değildir. Topikal biyotikler de antibiyotikler gibi bakterilerin ölümüne yol açan temel hücresel süreçlerin inhibisyonu yoluyla işlev görürler, ancak mutasyonlar sebebiyle bazı bakteri suşları hayatta kalabilir ve sonrasında bu dayanıklılık geninin diğer bakterilere transferini gerçekleştirebilir. Antibiyotiklerden farklı olarak biyositler genellikle sentetik kaynaklardan türetilir. Yaygın olarak kullanılan biyositler arasında klorheksidin, triklosan, povidon-iyot, hidrojen peroksit ve alkol bulunur [72].

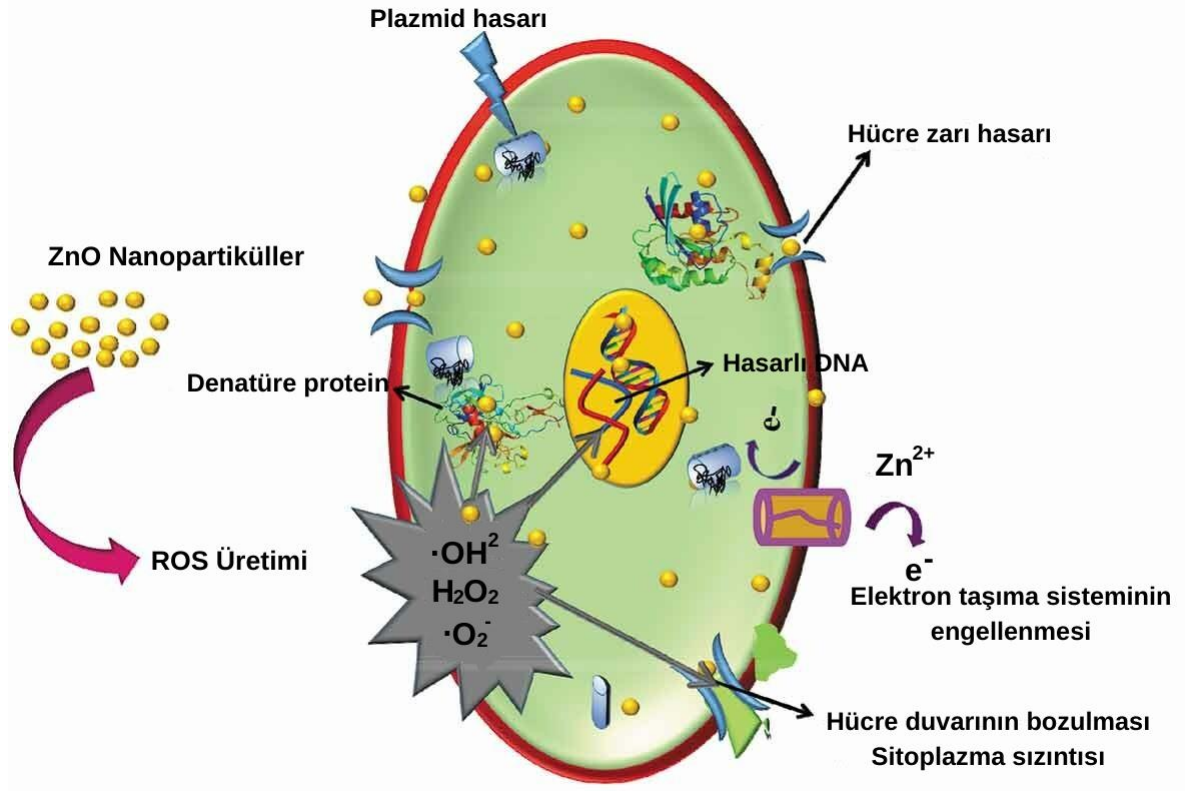
Metal bazlı nanopartiküller içeren yara örtülerinin bakteri üremesini önemli ölçüde engellediği ve yaranın iyileşme sürecini olumlu etkilediği çalışmalar ile tespit edilmiştir

[73]. Metal oksit nanopartiküller yüksek çeşitlilikleri, bakterilerin direnç geliştirme olasılığının düşük olması, yüksek antibakteriyel etkileri nedeniyle antibiyotikler ile kıyaslandıklarında daha avantajlıdır [71].

2.4.1. Metal Nanopartiküller

Nano-metaller ve nano-metal oksitler esnek yapıları, morfolojik boyutlarının uygunluğu, şekilleri, pürüzsüz yapıda olmaları, güçlü antibakteriyel özellikleri ve daha birçok özellikleriyle enfeksiyonlara karşı kullanılmaktadır. Yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılan başlıca nano-metal ve nano-metal oksitler; altın, gümüş, bakır, alüminyum oksit, kalsiyum oksit, seryum oksit, bakır oksit, gümüş oksit, magnezyum oksit, titanyum dioksit ve çinko oksittir [74–84].

Metal nanopartiküllerinin antibakteriyel özellik göstermesinin temel sebebi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasını sağlamasıdır. Bu reaktif oksijen türleri arasında süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen en belirgin olarak mevcut olanlardır. ROS türleri hücredeki bileşenler ile (örneğin proteinler, nükleik asitler, lipid membran gibi) etkileşime girerek bakteri hücresinin hayati fizyolojik işlevlerinin bozulmasına neden olur. ROS birikiminin hücrede oluşturduğu oksidatif stres DNA, mRNA, ribozomlar gibi yapıları etkilemesinin yanı sıra sinyal iletimini bloke eder ve iyon kanalları ile reseptörler de dahil olmak üzere membran proteinlerinde fonksiyon bozukluğuna neden olur. Bu durum bakteride membran hasarına ve seçici geçirgen özelliğın bozulmasına sebep olur [4]. Sağlıklı hücrelerde reaktif oksijen türlerinin seviyesi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) peroksidoksin (Prx) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidanlar ile ve enzimatik olmayan bazı bileşikler ile kontrol altında tutulur. Hücrelerde ROS miktarının aşırı artması sebebiyle protein ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve hatta hücre ölümleri meydana gelmektedir. ROS'un hücrelere etkisi doz ile ilişkilidir. Düşük düzeyde ROS, hücre siklusunu durdurabilir. Normal seviyelerde seyreden ROS fizyolojik olarak hücre fonksiyonlarının (örneğin adezyon, migrasyon, proliferasyon, farklılaşma gibi) gerçekleşmesi için gereklidir. Ancak hücrede ROS seviyesinin normal düzeyin üzerine çıkması hücre tabanlı savunma tepkilerini tetikler, hücre ölümünü teşvik eder ve komşu dokunun nekrozuna yol açabilir [15].



Şekil 2.5. Reaktif oksijen türlerinin antibakteriyel etkisi [85]

Yapılan çalışmalar sonucunda hücredeki ROS konsantrasyonu arttıkça bakteri hücresinin iç ve dış bileşenlerinde o kadar fazla hasar ve işlev kaybı olduğu ortaya çıkmıştır. Bakteriyel yüzeyindeki negatif yük ile metal katyonları arasında elektrostatik çekim meydana gelir ve bu durum metal katyonlarının hücre zarı yüzeyine artan şekilde bağlanmasına neden olur. Böylece hücre duvarının yapısal bütünlüğünde değişikliklere yol açarak hücre zarının geçirgenliğini artırır. Sonuç olarak bakterinin metabolizmasını sürdürmesi için gerekli olan hücresel maddeler aşamalı olarak kaybedilir ve bu durum ölümle sonuçlanır [4]. Reaktif oksijen türlerinin hem Gram-pozitif (örneğin *S.aureus*) hem de Gram-negatif (örneğin *E.coli*) bakteriler üzerinde bakterisidal etkisinin olduğu tespit edilmiştir [71].

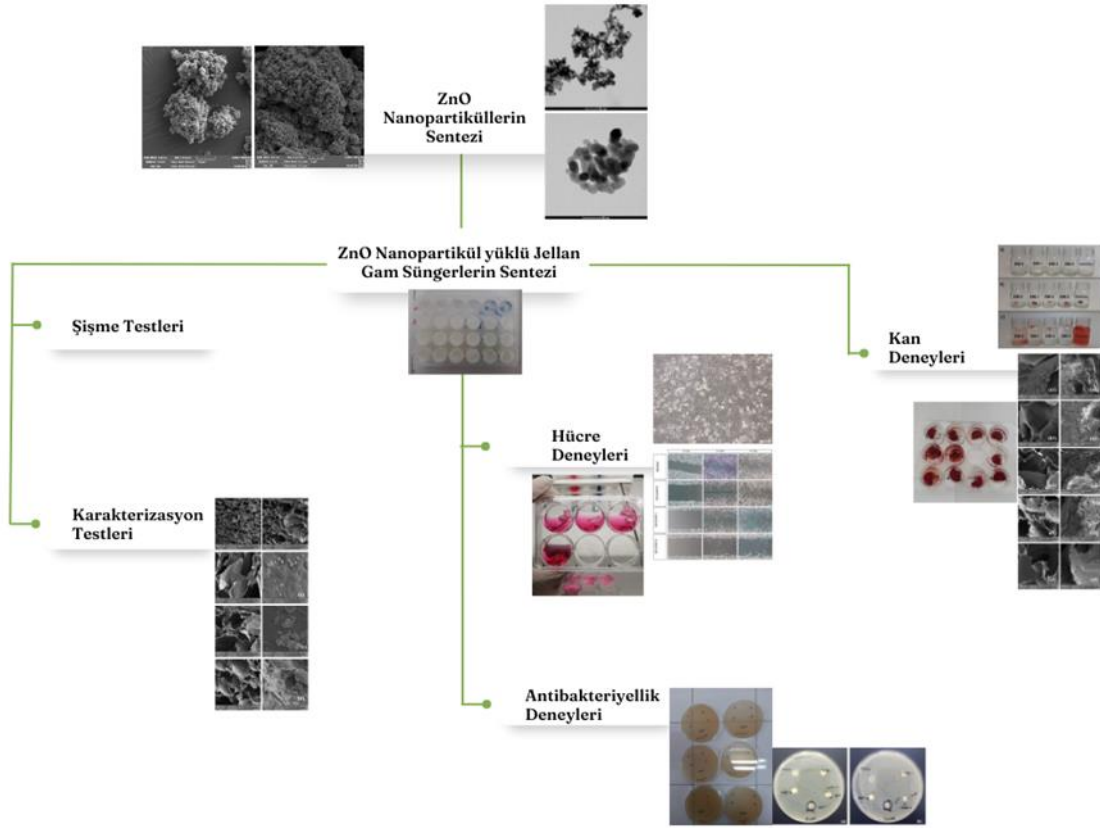
Bir araştırmada ROS üretim mekanizmalarını aydınlatmak için yedi çeşit metal oksit (TiO_2 , CeO_2 , ZnO , SiO_2 , CuO , Al_2O_3 ve Fe_2O_3) karşılaştırılmış ve UV ışınımı (365 nm) altında ROS üretim kinetiği incelenmiştir. Sonuç olarak farklı metal oksitlerin farklı fotogenerasyon ROS kinetiğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle TiO_2 (Titanyum dioksit) ve ZnO (Çinko oksit) nanopartiküllerinin üç tür ROS (süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen) ürettiği, diğer metal oksitlerin ise bazılarının bir veya iki tür ROS ürettiği tespit edilmiştir, bazılarında ise hiç ROS oluşumuna rastlanmamıştır [86].

Çinko oksit nanopartiküllerin çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir [73]. ZnO nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada boyutun antibakteriyel etkinlik üzerindeki etkileri araştırılmış ve daha küçük boyuttaki (<20 nm) partiküllerin bakteriyel membran ile temas etme ve geçme ihtimalini arttırdığı tespit edilmiştir [87]. Ayrıca ZnO'dan salınan Zn^{2+} iyonları hücre çoğalmasını, hücre farklılaşmasını ve cilt yenilenmesini desteklemektedir [88].



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasında kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda sunulan şematik (Şekil 3.1.) gösterimde özetlenmiştir. Çalışmada öncelikle ZnO nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiş, daha sonra nanopartiküller üzerinde karakterizasyon testleri uygulanmıştır. Sonraki aşamalarda ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlerin sentezi gerçekleştirilmiş ve sentezlenen süngerlerin yara iyileşmesi uygulamaları için uygunluğunun tespit edilebilmesi için karakterizasyon ve şişme testleri, *in vitro* hücre biyoyumluluk deneyleri, antibakteriyel deneyler ve kan absorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlerin sentezlenmesi, karakterizasyon testleri ve yapılan çalışmaların özeti

3.1. Kullanılan Malzemeler

Sentezlenen sünger yapılarda: polimerik matris için kullanılan jellan gam (GG) MP Biomedicals-Fisher Scientific (Pittsburgh, USA) firmasından, çapraz bağlayıcı olarak

kullanılan 1-etilen-3-(3-dimetilaminopropil) karbodimid (EDAC), nanopartikül sentezinde kullanılan çinko nitrat heksahidrat ($[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$), ve fosfat buffer saline (PBS) tablet Sigma(St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Antibakteriyel çalışmalar için kullanılan LB agar ve LB broth Merck (Berlin, Almanya) firmasından karşılanmıştır. SEM örneklerinin hazırlanmasında ve hücre deneylerinde kullanılan kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]difenilterazolyum bromür (MTT), PBS (0,01M, toz halde), dimetil sülfoksit (DMSO), heksametildisilazan (HMDS) ve amonyak Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. SEM örneklerinin dehidrasyonunda ve sterilizasyon için kullanılan alkol Riedel de haen (Seelze, Almanya) firmasından alınmıştır. Hücre deneylerinde kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri Hücre Kültür Kataloğu (HÜKÜK) (Ankara, Türkiye)'ndan elde edilmiştir. Besiyeri olarak kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Merck (Berlin, Almanya) firmasından, Fetal Sığır Serum Cegrogen (Stadtallendorf Almanya) firmasından, penicilin, streptomisin, tripsin/EDTA çözeltisi Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.2. ZnO Nanopartiküllerin Sentezi

Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin sentez aşamasında, 100 mL distile suda 14,85 gr $[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$ 70°C'de 1 saat süresince karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Bu sırada başka bir beherde hazırlanmış olan 100 mL 1 M'lık NaOH çözeltisine buret yardımıyla hazırlanan $[Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O]$ çözeltisi damla damla eklenmiştir. Takiben oluşan bulanık çözelti 2 saat süresince 100°C'de karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti 1 saat süresince dinlendirilmiş ve süpernant kısmı uzaklaştırılmıştır. Çökelti kısmı ise 2 kez distile su ve 1 kez de etanol ile yıkanarak saflaştırılması sağlanmıştır. Son olarak elde edilen çökelti 70 °C'de kurutulmuştur [89].

3.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Sentezi

Tez çalışması kapsamında, jellan gam temelli ZnO nanopartikül içeren kanama durdurucu süngerler dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır [90–92]. Öncelikle 2 gr jellan gam 100 mL destile suda 50 °C'de 2 saat süresince karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışıma değişen oranda ZnO nanopartikül: 0, 0,5 , 1 ve 2 (%wt) eklenerek ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus, UW 200) yardımıyla 20 dk süresince homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Takiben karışım 12 kuyucuklu plakalara

eklenerek -20 °C’de dondurulmuş ve liyofilizatörde (Telstar, LyoQuest) -80 °C’de 48 saat süresince kuruması sağlanmıştır. Elde edilen sünger yapılar 15 mM 1-etilen-3-(3-dimetilaminopropil) karboimid aseton:su (90:10) karışımında, 24 saat süresince oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda (WiseBath) 50 rpm’de bekletilerek çapraz bağlanması sağlanmıştır. Çapraz bağlanma aşamasının ardından polimer öncüllerinin ve çapraz bağlayıcının saflandırılması amacıyla 40 °C’de distile su ile yıkanmıştır. Saflandırılmış sünger yapılar kurutulmuştur.

3.4. ZnO Nanopartiküllerin Yapısal Ve Morfolojik Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin yapısal analizi Fourier Transform Infrared (FTIR) (ATR-FTIR, Bruker, Almanya) cihazı ile 500-4500 cm⁻¹ dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. ZnO nanoparçacıklarının kristalin yapısının karakterizasyonu X ışını kırınımı (XRD, Malvern PANalytical EMPYREAN) analizi ile yapılmıştır. Parçacık boyutu dağılımı ise Nanosizer cihazında (NanoZS Malvern Instrument, Birleşik Krallık) 25 °C ve pH 7.4’te gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini belirlemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM, Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM FEI, Tecnai G2 Spirit Biotwin) kullanılmıştır.

3.5. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.5.1. Yapısal ve Morfolojik Karakterizasyonu

Farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin gözenek yapılarını, gözenek bağlantılarını, yüzey morfolojisini belirlemek için ve ZnO nanopartiküllerin süngerlerin yapısında görüntülenmesi için SEM kullanılmıştır. Örnekler analiz öncesinde liyofilizatörde kurutulmuştur ve altın paladyum ile kaplanmışlardır.

3.5.2. Şişme Kapasitesi Belirlenmesi

Jellan gam süngerlerin su tutma kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, öncelikle sünger yapılar kuru şekilde tartılarak 37 °C’deki PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve denge şişme değerine ulaşması sağlanmıştır. 24 saat sonunda PBS içerisinde bulunan örnekler çıkarılmış yüzey suları filtre kağıdı yardımıyla alınarak tartılmıştır. Şişme kapasiteleri aşağıda verilmiş olan eşitlik 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır [73].

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} * 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Burada W_0 kuru ağırlığı ifade ederken W_t ise şişmiş örneklerin ağırlıklarını gösterir. Bütün ölçümler 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. *In Vitro* Hidrolitik Bozunma Oranı (%)

Jellan gam süngerlerin *in vitro* hidrolitik bozunmasının belirlenmesi amacıyla, öncelikle sünger yapılar kuru şekilde tartılarak 37 °C'deki PBS çözeltisi içerisinde daldırılmış ve belirli zaman aralıklarında (1., 3., 5., ve 7. gün) örnekler bozunma ortamından alınarak kurutulmuştur. Takiben kurutulan örnekler tekrar tartılmıştır. *In vitro* hidrolitik bozunma (%) aşağıda verilmiş olan eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır [73] .

$$\text{Degradasyon oranı (\%)} = 100 - \frac{W_f - W_i}{W_i} * 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Burada W_i ilk ağırlığı ifade ederken W_f ise şişmiş örneklerin ağırlıklarını gösterir. Bütün ölçümler 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında hazırlanan ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlerin antibakteriyel özellikleri agar disk difüzyon deneyi ve koloni oluşturan ünite deneyi ile değerlendirilmiştir.

3.6.1. Agar Disk Difüzyon Deneyi

Liyofilize edilmiş süngerler jilet yardımı ile yüksekliği 1,5 mm olacak şekilde kesilmişlerdir. Süngerlerden diskler oluşturabilmek adına 3 numaralı kesici (cutter) kullanılarak cutter ile çapı 6mm olacak şekilde diskler kesilmiştir. Kesilen disklerin 2 tarafı 10'ar dakika UV altında 10 dakika steril edilmiştir. Agar disk difüzyon deneyi için *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) kullanılmıştır. Deney öncesinde bakteri suşlarından süspanse kültür

elde etmek amacıyla 10 mL LB besi ortamı içerisine *E. coli* ve *S. aureus* inoküle edilmiş ve 37 °C’de, 150rpm’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bakteri yoğunluğu besiyeri ile sulandırma yapılarak 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) değerine ayarlanmıştır. Üretilmiş bakterilerden 100 µL alınarak LB agarlara ekim yapılmış ve L baget steril edilerek tüm agar yüzeyine bakteriler yayılmıştır. Steril edilmiş jellan gum süngerler LB agar üzerinde önceden işaretlenmiş bölgelere yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak 10 µg ampisilin içeren antibiyotik diskleri bakteri ekimi yapılmış LB agarlar üzerine yerleştirilmiştir. Devamında LB agarlar 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda zon çapları ölçülmüştür. ZnO nanopartikül içeren yüklü jellan gam süngerlerin antibakteriyel özellikleri zon çapları üzerinden değerlendirilmiştir [93,94].

3.6.2. Koloni Oluşturan Ünite Deneyi (CFU)

Koloni oluşturan ünite deneyi kapsamında, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinden süspanse kültür elde edebilmek için bakteriler 10 mL LB besi ortamı inoküle edilmiş ve 37 °C’de, 150 rpm’de, 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Yeni üretilen bakterinin LB besiyeri içerisindeki oranı 1/10 olacak şekilde bakteri ekimi yapılmıştır ve örnekler vortekslenmiştir. Devamında UV altında her yüzü 10’ar dakika steril edilen ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerler steril edilmiş ve 20 mg/mL olacak şekilde süngerler LB besiyeri+bakteri içerisine eklenmiştir. Örnekler bu şekilde 37 °C’de, 150 rpm’de, 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örneklerle seri sulandırma uygulanmıştır. Her sulandırma basamağında vorteksleme işlemi yapılmıştır. Örnekler 10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} ‘e kadar sulandırılmış ve bu sulandırmalardan 100 µL alınarak LB agarlara L baget yardımı ile yayılmıştır. Deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçların ortalamaları alınarak eşitlik 3.3’te verildiği gibi hesaplamalar yapılmış ve yüzde antibakteriyel aktivite hesaplanmıştır [95].

$$\text{Koloni oluşturan birim} = \frac{\text{Seyreltme katsayısı} \times \text{Bakteri kolonisi sayısı}}{\text{Ekilen bakteri miktarı}} \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

3.7 ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hemostatik Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan olan ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hemostatik etkinlikleri tam kan absorpsiyon kapasitesi deneyleri, hemoliz testi ve kan absorpsiyonu sonrası SEM görüntülemeleri ile incelenmiştir. Bu deneyler için gerekli olan insan kanı Hacettepe Üniversitesi Beytepe Gün Hastanesi'nde etik kurul izni doğrultusunda gönüllülük esasına dayanılarak temin edilmiştir. Tez çalışmasının etik kurul onay belgesi GO 22/1286 kayıt numarası ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Deneylerde pıhtılaşmanın olmaması için kan EDTA'lı tüpler ile alınmış ve deneyler sonlanana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyon sürelerini belirlemek için en başta süngerlere çok dikkatli bir şekilde 200 µL kan uygulanmıştır ve süre tutulmuştur. 60 saniyede jellan gam süngerlerin kanı tamamen absorbe edebildiği görülmüştür ve deneyler için absorpsiyon süresi olarak 60 saniyenin uygulanmasına karar verilmiştir. *In vitro* kan absorpsiyon ve hemoliz testleri kapsamında liyofilize jellan gam süngerler 1,5 mm yükseklikte ve 16 mm çapında diskler şekilde kesilmişlerdir. Aynı zamanda kıyaslama yapabilmek amacıyla ticari olarak satılan hemostatik özellikte jelatin temelli sünger kan absorpsiyon ve hemoliz testlerinde kullanılmıştır.

Tam kan absorpsiyon kapasitesi deneyleri kapsamında ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerler cam şişeler içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 0,150 mL kan eklenmiştir. Süngerler 37 °C sıcaklıkta 60 saniye boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda dikkatli bir şekilde cam şişelerin kenarından 20 mL distile su eklenmiş ve örnekler 37 °C sıcaklıkta inkübatöre kaldırılmıştır. 60 saniye sonrasında 1 mL örnek alınmıştır. Pıhtı oluşturabilen kan hücreleri jellan gam süngerlerin yüzeyinde kalacaktır ancak pıhtı oluşturmayan kırmızı kan hücreleri distile su içerisine hemolize olacaktır. Alınan örneklerin (hemoglobinin) absorbans değeri spektrofotometrede (UV–VIS spektrofotometre, Thermo Scientific, Genesis) 540 nm'de belirlenmiştir. Referans değer olarak boş cam şişeye eklenmiş 0,150 mL kan üzerine 20 mL distile su eklenmiştir ve spektrofotometrede okutulmuştur. Örneklerden elde edilen absorbanslar referans değeri ile kıyaslanmıştır ve örneklerin kan absorpsiyon yüzdeleri elde edilmiştir [96]. Elde edilen sonuçlara göre jellan gam süngerlerin kan durdurucu özellikleri değerlendirilmiştir.

Jellan gam süngerlerin daha uzun sürelerde kan tutma kapasitelerini değerlendirebilmek adına süngerlere yukarıda yazıldığı 0,150 mL kan eklenmiş ve cam şişelerin kenarından dikkatli bir şekilde 20 mL distile su eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 15, 30 ve 45 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübatörde tutulmuş, bu belirlenen sürelerde ortamdan 1 mL örnek alınmıştır. Alınan örnekler spektrofotometrede 540 nm’de okutulmuştur. Elde edilen absorpsiyon değerleri yukarıda verilen referans örneğine göre karşılaştırılmıştır ve süngerlerin yüzde kan tutma kapasiteleri değerlendirilmiştir [97] .

Tam kan absorpsiyon kapasitesi deneyleri kapsamında jellan gam süngerler cam şişelere yerleştirilmiş ve 0,150 mL kan süngerler üzerine uygulanmıştır. Kan eklenmiş süngerler 37 °C sıcaklıkta 60 saniye boyunca inkübe edilmiştir ve süre sonunda 20 mL salin (%0,9’luk NaCl) çözeltisi dikkatli bir şekilde eklenmiştir. Tüm süngerlerin optik görüntüleri alınmıştır ve süngerlerden kan sızıntı miktarları değerlendirilmiştir [98] .

3.7.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin *İn Vitro* Kan Absorpsiyonunun SEM ile Değerlendirilmesi

SEM analizi kan absorpsiyonundan önce karakterizasyon amacıyla ve kan absorpsiyonundan sonra süngerlerin kan tutma etkinliklerinin görüntülenebilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Boş örneklerin analizi için örnekler liyofilizatörde kurutulmuş ve altın-paladyum ile kaplanmıştır. Boş örneklerde süngerlerin gözenekleri ve gözenek yapıları incelenmiştir. Kan absorbe edilmiş örneklerin hazırlığı için, 0,150 mL kan jellan gam süngerler ve ticari olarak satın alınan süngerin üzerine eklenmiştir ve örnekler 60 saniye boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında süngerlerin üzerine karanlık ortamda %2,5’luk glutaraldehit çözeltisi eklenmiş ve süngerler 30 dakika boyunca karanlık ortamda +4 °C sıcaklıkta fikse edilmiştir. 30 dakika sonrasında süngerler seri olarak %30, %50, %70 ve %100’lük alkol çözeltileri içerisinde 5’er dakika boyunca tutulmuştur. Sonrasında süngerler HMDS içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve oda ısısında kurutulmuştur. Devamında jellan gam süngerler altın-paladyum ile kaplanarak SEM’de görüntülenmiştir [97,99] .

3.8. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin *In Vitro* Hücre Canlılık Deneyleri

3.8.1. Hücre Kültürü Koşulları

Çalışmada L929 Fare Fibroblast Hücre hattı kullanılmıştır. L929 (CCL-1) hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC®, Manassas, Virginia Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Hücre Biyolojisi Laboratuvarının hücre stoklarında bulunmaktadır. Çalışmalar L929 hücreleri için 20-21 pasaj aralığında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tamamı aseptik koşullar altında ve laminar akımlı kabin Esco, Laminar Kabin Plus II BSC'de gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. L929 Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması

L929 hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) besiyerinde (Sigma, D5796, Almanya), % 10 fetal sığır serum premium (FSS) (Cegrogen Biotech GmbH, Stadtallendorf, Almanya), % 1 penisilin-streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) ile uygun besiyeri hazırlanarak hücreler üretilmiştir. İnkübe edilen L929 hücreleri Olympus CKX18 inverted mikroskop altında incelenmiştir.

Hücreler bulundukları flaskta yaklaşık %80 miktarında kaplama gösterdiklerinde tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Hücrelerin ürettiği flasktan besiyerleri uzaklaştırılmış ve Tripsin/Etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) uygulaması yapılmıştır. Son tripsin yıkamasından sonra Tripsin/EDTA'nın bir miktarı flask içerisinde bırakılıp etüvde yaklaşık 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda süspanse hale gelen hücreler besiyeri ile bir araya getirilmiştir. Hazırlanan hücre süspanسیونları yeni flaslara aktarılmıştır.

3.8.3. L929 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücreler tripsinize edildikten sonra süspanse hale gelen hücreler 800 rpm hızla 5 dakika (Eppendorf Centrifuge, 5810R) santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti dondurma vasatı (%10 DMSO/FSS) ile bir araya getirilmiş ve kriyotüplere dağıtılmıştır. Kriyotüp içindeki hücreler dereceli soğutularak azot tankından önce -80 °C 'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılmak üzere azot tankından alınan hücreler su banyosunda 2-3 dakika 37 °C 'de çözdürülmüştür. Ardından 800 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti hazırlanmış besiyeri ile bir araya getirilmiş ve içinde bir miktar besiyeri

bulunan flaska alınmıştır. İnkübasyonlar %5 CO₂ ve 37 °C koşullar altındaki etüvde (Sanyo, MCO18AC) gerçekleşmiştir.

3.8.4. MTT Canlılık Analizi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilen kolorimetrik metotla hücrelerin canlılık oranlarının saptanmasını sağlayan bir sitotoksitesite analizidir. MTT sarı renkli bir formazan tuzudur ve hücrenin mitokondriyal aktivitesi ile mor renkli fakat suda çözünemeyen kristallere dönüşürler. Bu aşamada %95 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applchem, 01A3672, 0100) ve %5 Amonyak (Merck, K13391922) çözeltisi kullanılarak mor rengi ortaya çıkması sağlanır. Spektral ölçümler sonucunda hücrelerin yüzde canlılık oranları belirlenir [100].

ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerler sterilizasyon için 1 saat boyunca UV ışık altında bekletilmiştir. Ardından 25 mg jel ağırlığına 1 mL serumsuz DMEM besiyeri eklenmiştir ve etüvde %5 CO₂'li ortamda 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir [101]. Ardından besiyerleri 800 rpm'de 5 dk santrifüj ve edilmiş ve sterilizasyonun sağlanması amacıyla 0,22 µm porlu filtreden (Merck) geçirilmiştir ve süngerlere uygulamak üzere süpernatantlar elde edilmiştir. Hücre ekimi 6x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında gerçekleştirilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe olup adherent hale geldiklerinde uygulama gerçekleştirilmiştir. Ardından hücrelerin 24 ve 48 saatlik MTT canlılık verileri elde edilmiştir. MTT analizi için öncelikle ortamdan besiyerleri uzaklaştırılmış ve yerine 100 µL/kuyucuk serumsuz DMEM ve 13 µL/kuyucuk MTT (Acros organics, 158990010) eklenmiştir. Plakalar alüminyuma sarılı şekilde 3 saat etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plakaların besiyeri uzaklaştırılmış ve yerine DMSO/Amonyak çözeltisi eklenmiştir. Tetrazolyum tuzlarının çözülmesi için plakalar 10 dk çalkalayıcıda bırakılmıştır. Ardından Spektrofotometrede (BIO-TEK µQuant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiştir. Hücre canlılık değeri aşağıda verilen eşitlik 3.4'e göre hesaplanmıştır [97].

$$\text{Hücre canlılık değeri} = \frac{\text{Grup OD}}{\text{Kontrol OD}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.4})$$

3.8.5. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Çizik Testi Deneyleri

Yara iyileşmesi deneyi için 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 4×10^5 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücreler % 5 CO₂ içeren ortamda 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler %100 konflüe olduğu zaman 200 µL’lik pipet ucu kullanılarak yavaşça hücre kültür kabı kuyucuğu ortasına çizik atılmıştır (0. saat). Devamında hücre kültür kapları PBS ile yıkanmıştır ve yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlanmış süngerlerden (GG-ZnNP-0, GG-ZnNP-1 ve GG-ZnNP-3) elde edilen ekstraktlar yara modeli oluşturulan kuyucuklara uygulanmıştır. Örneklerin fotoğrafları 24 ve 48. saatlerde inverted mikroskop (Olympus CKX18, Cellsens Master software V1.12) kullanılarak alınmıştır. Devamında elde edilen görüntüler ImageJ (NIH) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Yara kapanma yüzdesi aşağıda verilen eşitlik 3.5’e göre hesaplanmıştır [102].

$$Yara\ iyileşmesi\ (\%) = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \times 100 \quad (Eşitlik\ 3.5)$$

T₀: çizik modelinin oluşturulduğu zamandaki yara alanı,

T_x: kaydedilen zamandaki yara alanı.

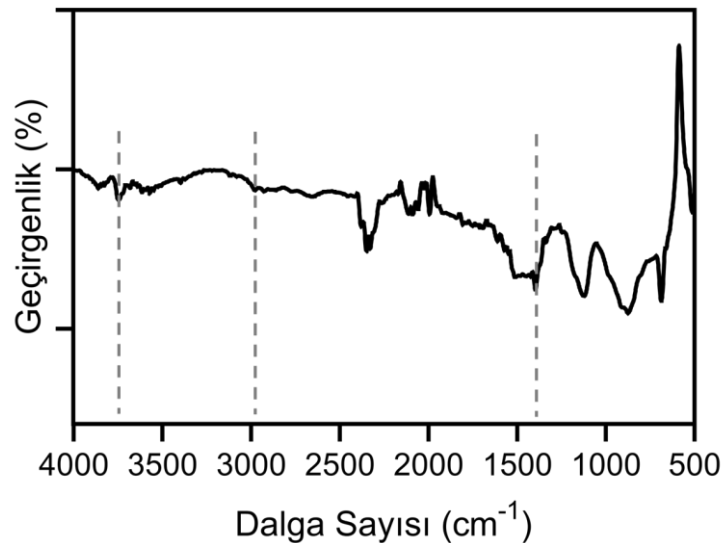
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasının amacı, doğal bir polimer olan jellan gam temelli antibakteriyel özellikte hemostatik sünger yapıda biyomalzemeler tasarlamaktır. Bu amaçla, öncelikle antibakteriyel özellikte olan çinko oksit nanopartikülleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Takiben farklı oranlarda çinko oksit nanopartikülü içeren jellan gam temelli süngerik yapılar hazırlanmıştır. Elde edilen antibakteriyel özellikteki hemostatik malzeme yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Bu malzemelerin antibakteriyel testleri, tam kan absorpsiyon testleri ve hücre canlılık testleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. ZnO Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

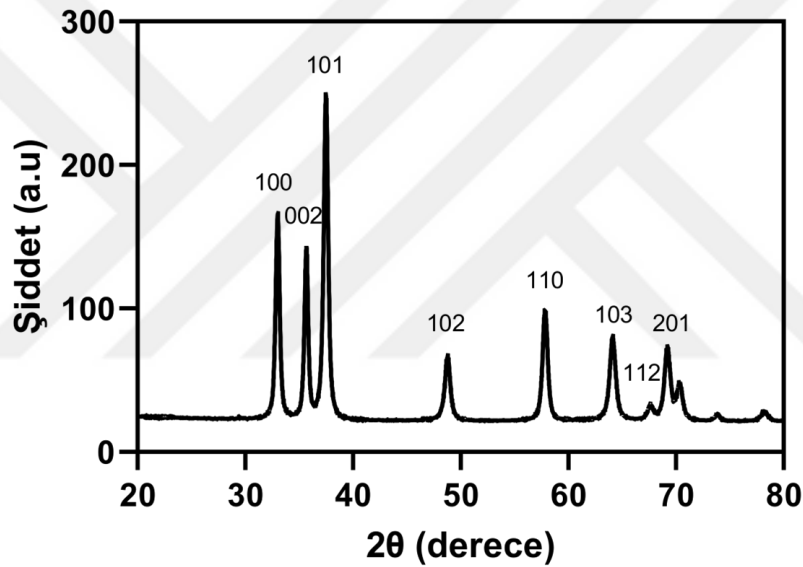
4.1.1. ZnO Nanopartiküllerin Yapısal Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ZnO nanopartiküllerin infrared spektrumların alınmıştır. FTIR analizi sonucunda ZnO nanopartiküllerine ait spektra Şekil 4.1’de sunulmuştur. Grafikte verilen spektrum incelendiğinde, ZnO nanopartikülüne ait verilen dalga boyları görülmektedir. FTIR spektrumlarına bakıldığında, ZnO nanopartikülüne ait 3755 cm^{-1} ve 2974 cm^{-1} bölgelerinde bulunan bantlar sırasıyla -OH ve -CH gerilmesi gruplarını temsil ederken, 1405 cm^{-1} ’de bulunan piki ise C=O bükülme titreşimine atfedilmektedir [103,104]. $865\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ metal oksit varlığından kaynaklanan esneme titreşimlerinden atfedilmektedir [105]. Bütün bu sonuçlar ZnO nanoparçacıklarının başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.1. ZnO nanopartiküllerine ait FTIR analizi sonuçları

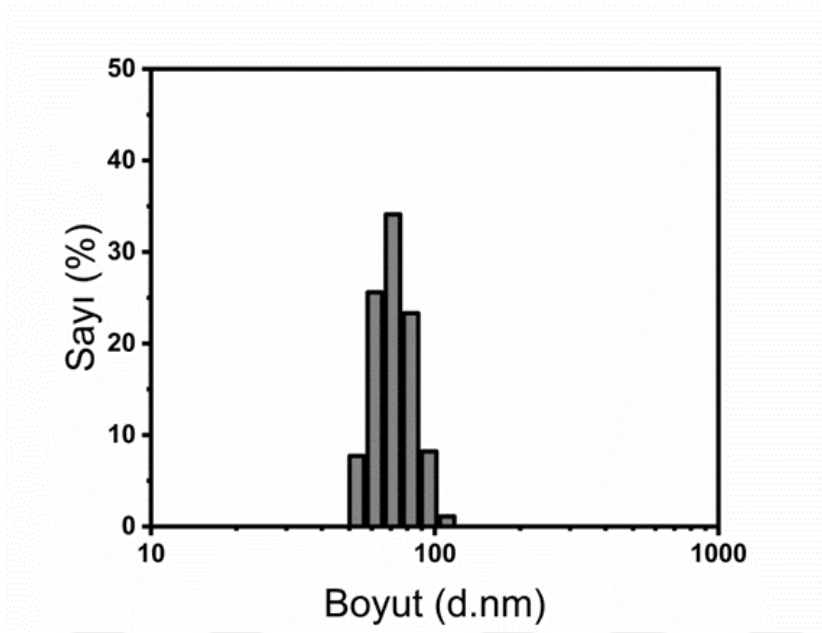
Sentezlenen ZnO nanopartiküllerine kristalin yapısı XRD analizi ile araştırılmıştır ve nanopartiküllere ait XRD sonuçları Şekil 4.2’de sunulmuştur. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerine ait XRD diyagramında $2\theta=32.50^\circ$ (100), 34.75° (002), 36.75° (101), 47.85° (102), 56.75° (110), 63.20° (103), 66.50° (112), ve 68.25° (201) pikleri literatürdeki karakteristik ZnO nanopartikül pikleri ile uyumlu olduğu görülmüştür [106,107]. Yukarıda bahsedilen ana pikler dışında pikin yer almaması yüksek saflıkta ZnO nanopartiküllerin elde edildiğini anlaşılmaktadır. Bununla birlikte piklerin dar ve güçlü olması ZnO nanopartiküllerinin oldukça iyi kristal bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir [108,109].



Şekil 4.2. ZnO nanopartiküllerine ait XRD diyagramı

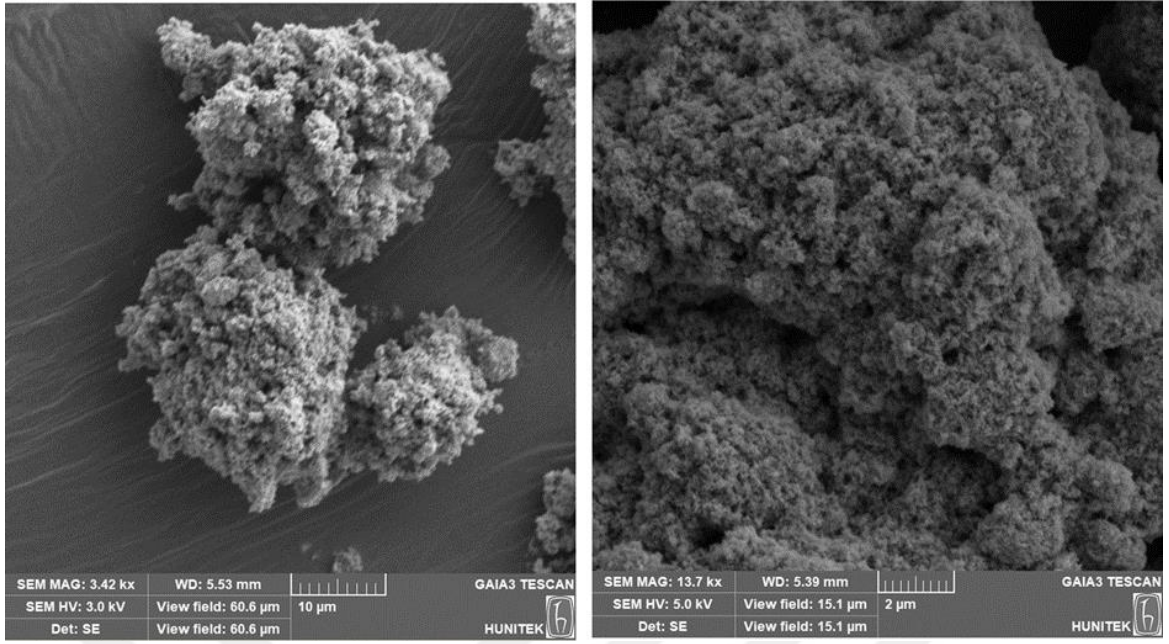
4.1.2. ZnO Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu

ZnO nanopartiküllerinin 25°C ve pH 7.4’te gerçekleştirilen boyut analizi sonuçları Şekil 4.3’te sunulmuştur. ZnO nanopartikülüne ait parçacık boyut analizi incelendiğinde, elde edilen nanoparçacıklarının homojen boyut dağılımına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte nanoparçacıklarının çapı $74,39\pm 5,08$ d.nm (çap.nanometre) olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyel değeri ise $-32,7\pm 5,9$ mV olarak ölçülmüştür. Bu durum nanoparçacık örneklerin yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir [103,110].



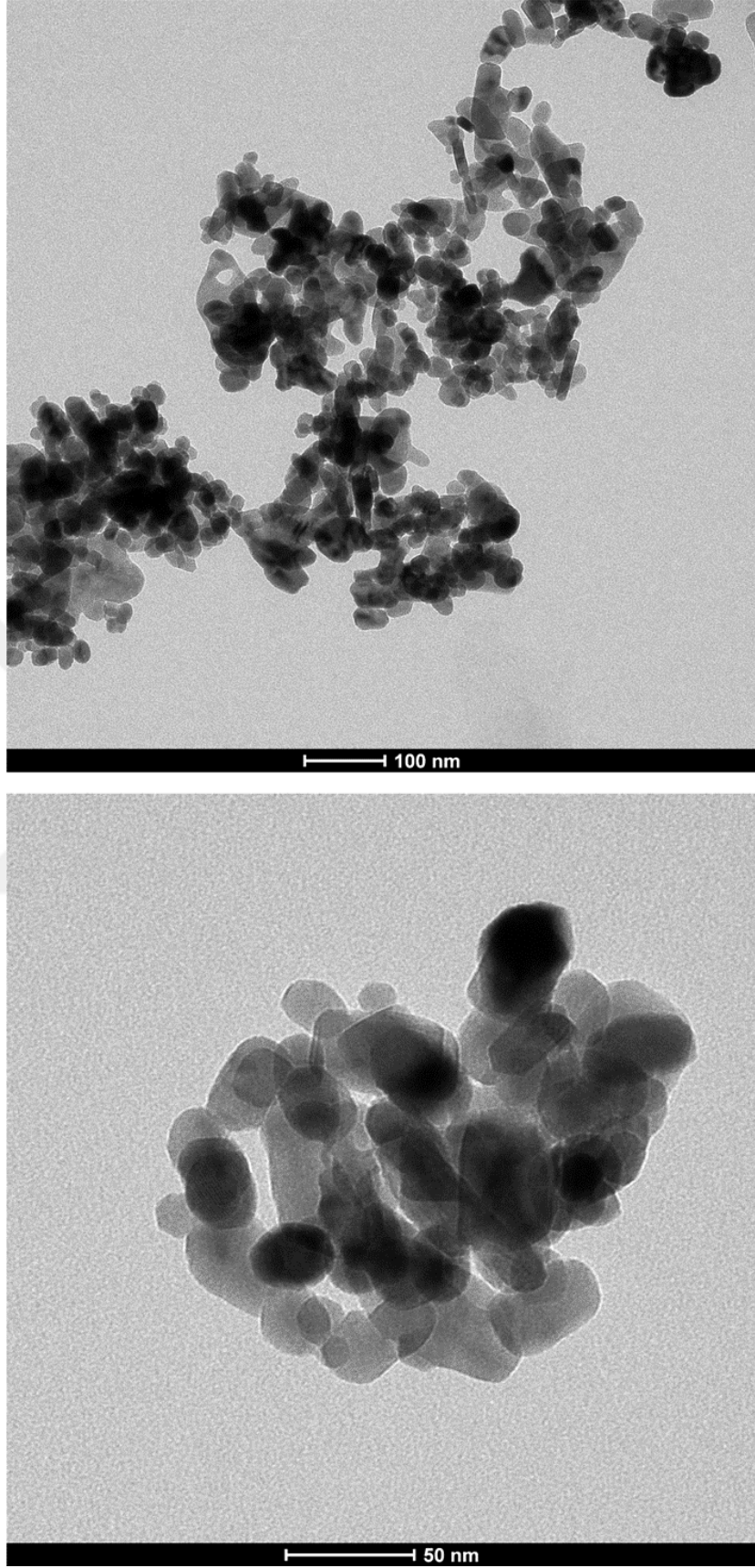
Şekil 4.3. ZnO nanopartiküllerine ait pH 7.4'te boyut analizi.

Çalışma kapsamında sentezlenen ZnO nanopartiküllerin karakterizasyonu için SEM görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Görüntüler Şekil 4.4. de sunulmuştur. Literatürde yapılan incelemeler sonrasında sentezlenen nanopartiküllerin benzer görünümde oldukları sonucuna varılmıştır [111].



Şekil 4.4. ZnO nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

Çalışma kapsamında sentezlenen ZnO parçacıklarının morfolojileri TEM ölçümleri ile belirlenmiş ve Şekil 4.5'te sunulmuştur. TEM görüntülerinden hesaplanan ortalama parçacık boyutlarının 70 nm civarında olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte TEM görüntülerinde nanoparçacıkların morfolojik yapısının küresele yakın olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde yer verilen ZnO nanopartiküllere ait TEM görüntüleri incelendiğinde bizim elde ettiğimiz görüntülemeye benzer görüntülere rastlanmıştır [112].

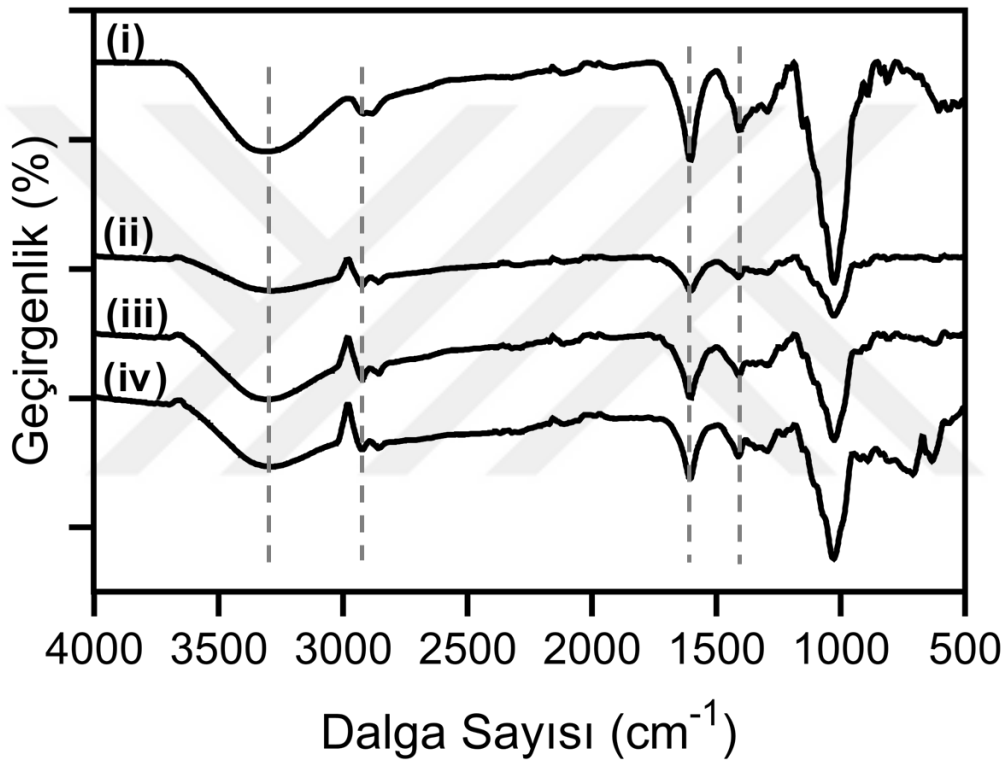


Şekil 4.5. ZnO nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri 100 nm (a) ve 50 nm (b) skala büyüklüğünde.

4.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Karakterizasyonu

4.2.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Yapısal Analiz Sonuçları

Tez çalışması kapsamında, farklı ZnO nanopartikül içeriklerine sahip jellan gam temelli hemostatik süngerler hazırlanmıştır. Elde edilen örneklerin yapısal karakterizasyonu FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Ürünlere ait FTIR spektrumları Şekil 4.6’da sunulmuştur.



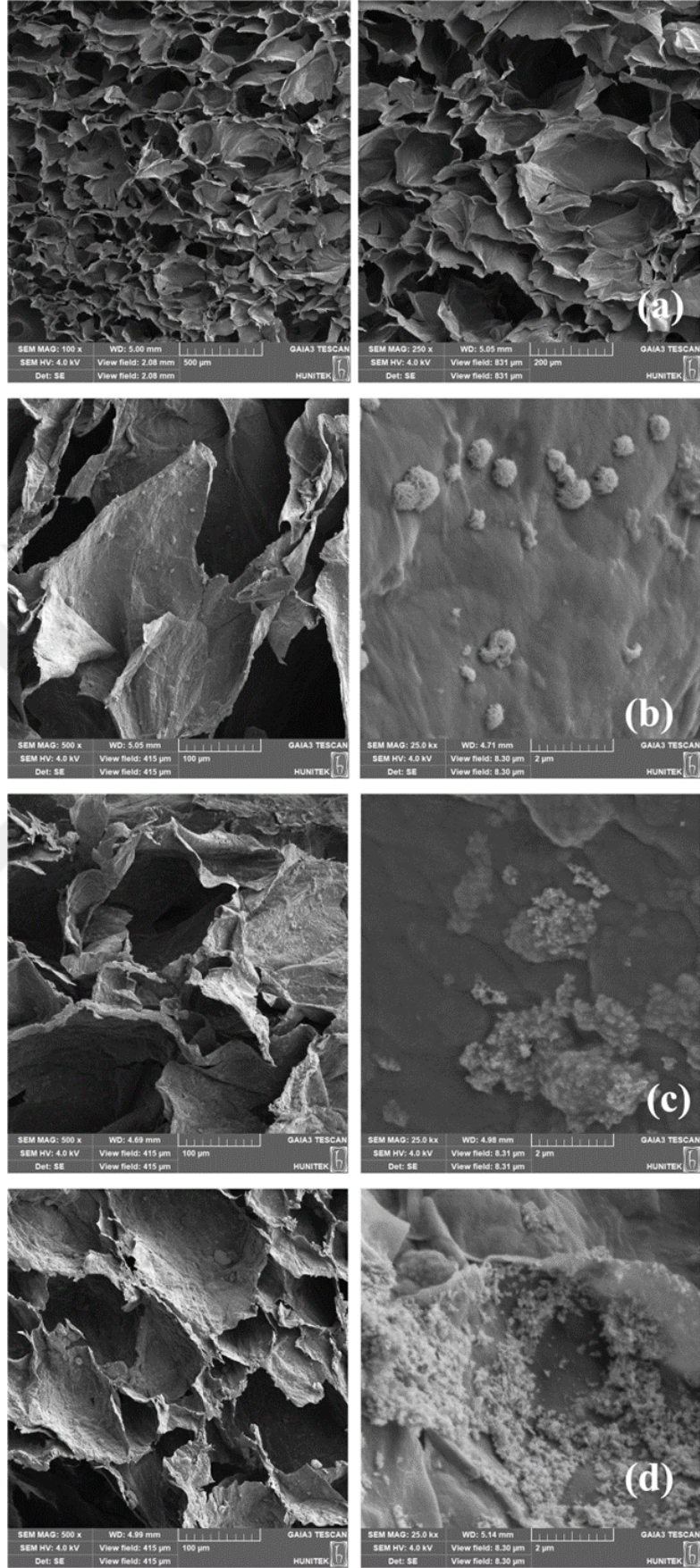
Şekil 4.6. ZnO nanopartikül içeren GG-ZnNP-0 (i), GG-ZnNP-1 (ii), GG-ZnNP-2 (iii), ve GG-ZnNP-3 (iv), kodlu jellan gam süngerlere ait FTIR spektrumları.

Örneklere ait FTIR spektrumları incelendiğinde, 3700-3000 cm⁻¹ arasında değişen geniş pikin yer alması yapıdaki su varlığından kaynaklanan -OH gerilme titreşimlerine atfedilmektedir. Bununla birlikte ZnO nanopartikül içermeyen örnekte (GG-ZnNP-0) 3408, 1666 ve 1424 cm⁻¹'de OH gerilme, COO⁻ ve C-C bağlarına karşılık gelen geniş pikler görülmektedir. 2940 ve 2886 cm⁻¹ arasında yer alan piki ise sünger yapıdalar bulunan -CH gruplarına karşılık gelmektedir. 2936 ve 1043 cm⁻¹'de yer alan pikler ise galakturonik şeker ünitesine bağlanan glikozidik bağlardan kaynaklandığı öne sürülmektedir. Metal oksit (Zn-

O) bağına ait germe titreşimleri ise 800 cm^{-1} altında gözlemlenmektedir. Tüm bu sonuçlar hemostatik süngerlerin başarılı bir şekilde sentezlendiği göstermektedir [113–115].

4.2.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Morfolojik Analiz Sonuçları

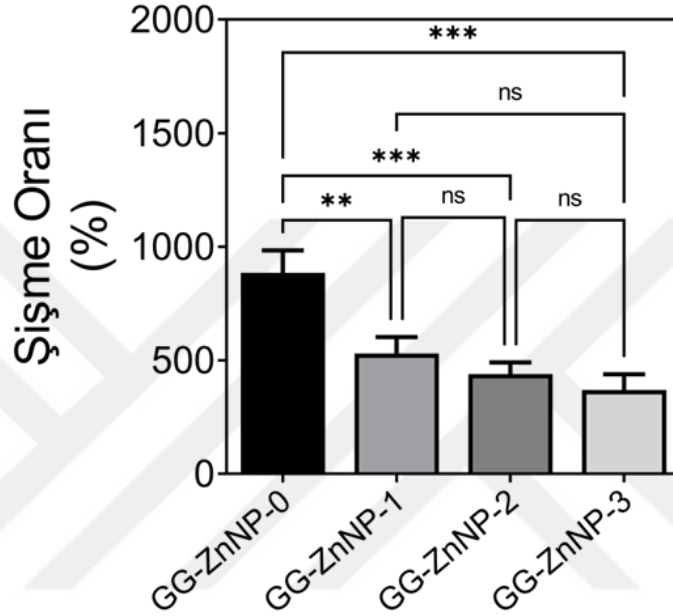
ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin SEM görüntüleri şekil 4.7’de sunulmuştur. Şekil 4.7. (a)’da ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 süngerine ait SEM görüntüsü sunulmuştur. GG-ZnNP-0 süngerlerin içeriğinde nanopartiküllerin olmaması sebebiyle daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.7. (b), (c) ve (d)’de sırasıyla içeriğindeki ZnO nanopartikül miktarı giderek artan GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2, GG-ZnNP-3 süngerlerin SEM görüntüleri verilmiştir. Bu süngerlerin görüntüleri GG-ZnNP-0 süngerin görüntüsü ile karşılaştırıldığında nanopartikülün varlığından dolayı daha pürüzlü bir yüzeye sahip olduğunu görmekteyiz. Ayrıca süngerlerdeki ZnO nanopartikül miktarının artan etkisinin oldukça net bir şekilde süngerlerin daha yüksek büyütmede (25.000 X) alınmış görüntülerinde görmekteyiz. Bununla beraber jellan gam süngerlerin yapısına ZnO nanopartiküllerin eşit bir şekilde ağırlaştırılmadan katıldığını görmekteyiz. Şekil 4.7. (e)’de ZnO nanopartiküllerin SEM görüntüleri sunulmuştur. Tek başına daha ağırlaştırılmış olan ZnO nanopartiküllerin, jellan gam süngerlerin yapısına katılmasının nanopartiküllerin daha eşit şekilde dağılmasını sağladığı SEM görüntüleri ile gösterilmiştir. Literatürde yer alan benzer çalışmalar incelendiğinde bizim hazırladığımız örnekler gibi ZnO nanopartiküllerin süngerlerin yüzeyinde eşit şekilde dağıldığı görülmektedir [116,117] .



Şekil 4.7. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait SEM görüntüleri. (a) GG-ZnNP-0, (b) GG-ZnNP-1, (c) GG-ZnNP-2 ve (d) GG-ZnNP-3 süngerler

4.2.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerinin Şişme Davranışı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında sentezlenen hemostatik süngerlerin ZnO nanopartikül içeriğinin şişme davranışlarına etkisi 37 °C ve PBS ortamında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de sunulmuştur.

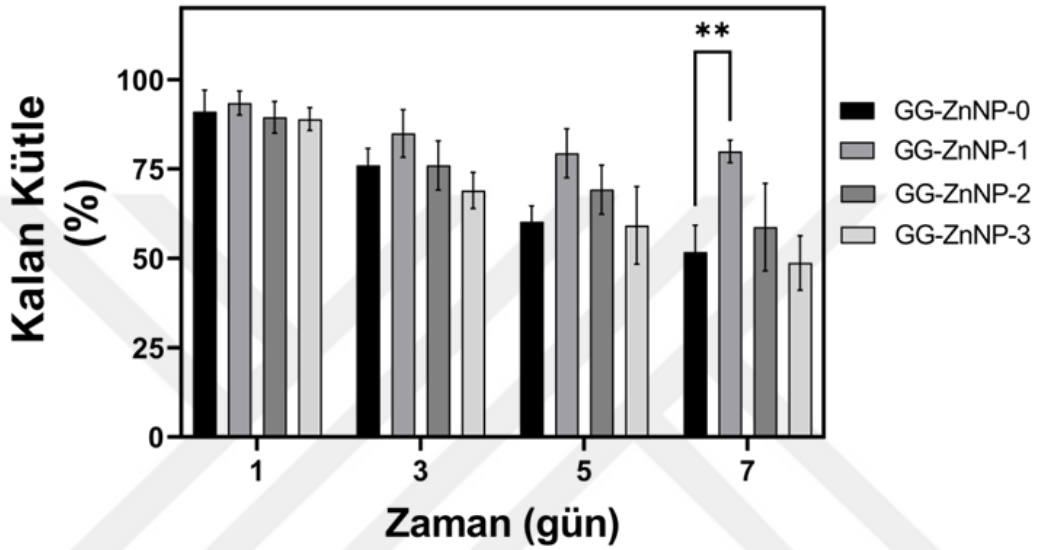


Şekil 4.8. Farklı oranlarda ZnO nanopartikülü içeren jellan gam süngerlere ait şişme oranları.

Şişme oranının belirlenmesi, yara bölgesinde kullanılan süngerlerin yüksek su absorplama kapasitesi ve nem içeriğine sahip olması potansiyelinin belirlenmesinde önemli bir faktördür [118]. Bu kapsamda hazırlanan jellan gam temelli GG-ZnNP-0, GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2, ve GG-ZnNP-3 hemostatik süngerlere ait ortamındaki şişme oranları incelenmiş ve sırasıyla %885,66±98,30 , %530,33±71,98 , %439,33±51,78 , ve %369,33±69,00 olarak ölçülmüştür (p<0.05). Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda sünger yapıdaki ZnO nanopartikül miktarının artmasıyla şişme oranının azaldığı belirgin biçimde görülmüştür. Bu durum ZnO nanopartiküllerinin sünger yapı içindeki boşlukları işgal ederek su penetrasyonunu engellemesine atfedilebilir [119,120]. Bütün bu sonuçlar literatürle kıyaslandığında kanama durdurucu özellikler için gereken şişme derecesini koruğu görülmektedir [117,121].

4.2.4. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerinin *in vitro* hidrolitik degradasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Tez kapsamında sentezlenen hemostatik süngerlerin ZnO nanopartikül içeriğinin *in vitro* hidrolitik bozunma davranışına etkisi 37 °C ve PBS ortamında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.9. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait *in vitro* hidrolitik degradasyon profili

İdeal hemostatik bir malzeme, kalıntı maddelerin canlı vücudunda neden olduğu ikincil hasarı önlemek amacıyla uygun biyobozunurluk performansına sahip olmalıdır [122,123]. Elde edilen hemostatik jellan gam süngerlerin sırasıyla 1, 3, 5, ve 7. gün inkübasyonu sonrasında kalan kütle (%) belirlenmiştir. Bu kapsamda hazırlanan jellan gam temelli GG-ZnNP-0, GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2, ve GG-ZnNP-3 hemostatik süngerlere ait 7 günlük bozunmanın sonucunda kalan kütle oranları sırasıyla $51,71 \pm 6,54$, $79,93 \pm 2,73$, $58,72 \pm 10,60$ ve $46,27 \pm 5,45$ olarak hesaplanmıştır. Hemostatik malzemelerin degradasyon sonuçları karşılaştırıldığında, GG-ZnNP-1 örneğinin diğer malzemelere oranla daha yavaş degrede olduğu görülmüştür. Bununla birlikte yapıdaki ZnO nanopartikül miktarının artması ile degradasyon hızının arttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Soubhagya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ZnO nanopartikül katkılı biyomalzemelerin degradasyon hızlarını incelemişlerdir. ZnO miktarının artmasıyla degradasyon hızının arttığını saptamışlardır, bu

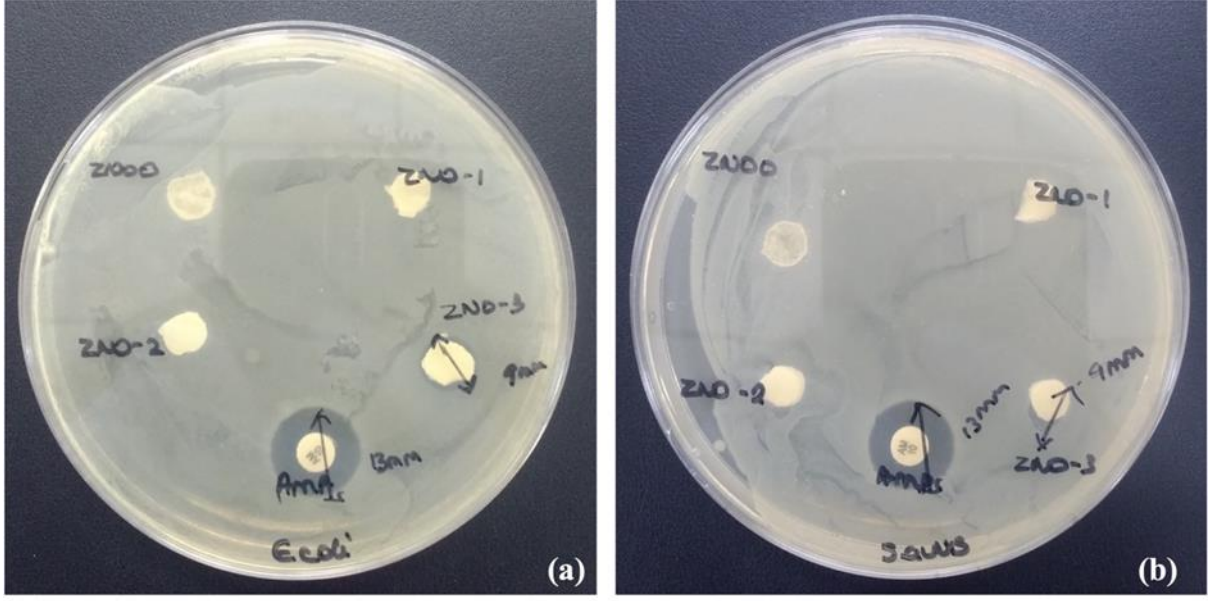
durumu ZnO nanopartikül varlığına bağlı yetersiz çapraz bağlanma yoğunluğu ile ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır [124].

4.3. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

4.3.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Agar Disk Difüzyon Deneyi ile Değerlendirilmesi

ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin antibakteriyel aktiviteleri agar disk difüzyon deneyi ve koloni oluşturan ünite deneyi ile belirlenmiştir. Agar disk difüzyon deneyinde çinko nanopartiküllerin süngerlerden difüze olarak salınması ve bakteri üremesini önleyerek bir zon oluşturmaya beklenmekteydi. Sonuçlar incelendiği zaman hem *E. coli* hem de *S. aureus* için 9mm çapında zon oluştuğu gözlenmektedir. Aynı zamanda kullanılan 10 µg'lık ampisilin içeren disklerin iki bakteride de 13 mm zon çapı oluşturduğu gözlenmektedir. Deney sonrasında zon oluşturmayan diğer süngerler çıkarılıp süngerlerin altında bakteri üremesi olup olmadığı değerlendirilmiştir. Yapılan inceleme sonrasında süngerlerin temas ettiği noktalarda bakteri üremesinin olmadığı gözlemlenmiştir. Şekil 10'da ZnO nanopartikül içeren Jellan gam süngerlerin *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri için zon inhibisyon deneyi sonuçları sunulmuştur.

Literatürde yer alan bir çalışmada çinko oksit nanopartikül içeren jellan gam ve ksantan gamdan oluşan nanokompozitler paketleme çalışmaları için hazırlanmıştır ve antibakteriyel etkinlikleri *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinde agar disk difüzyon deneyi ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçların bizim çalışmamızda olduğu gibi çinko oksit dozuna bağlı olarak değiştiği sonucuna varılmıştır [125].



Şekil 4.10. Jellan gam süngerlerin agar disk difüzyon deneyi sonuçları (a) *E.coli*, (b) *S.aureus*.

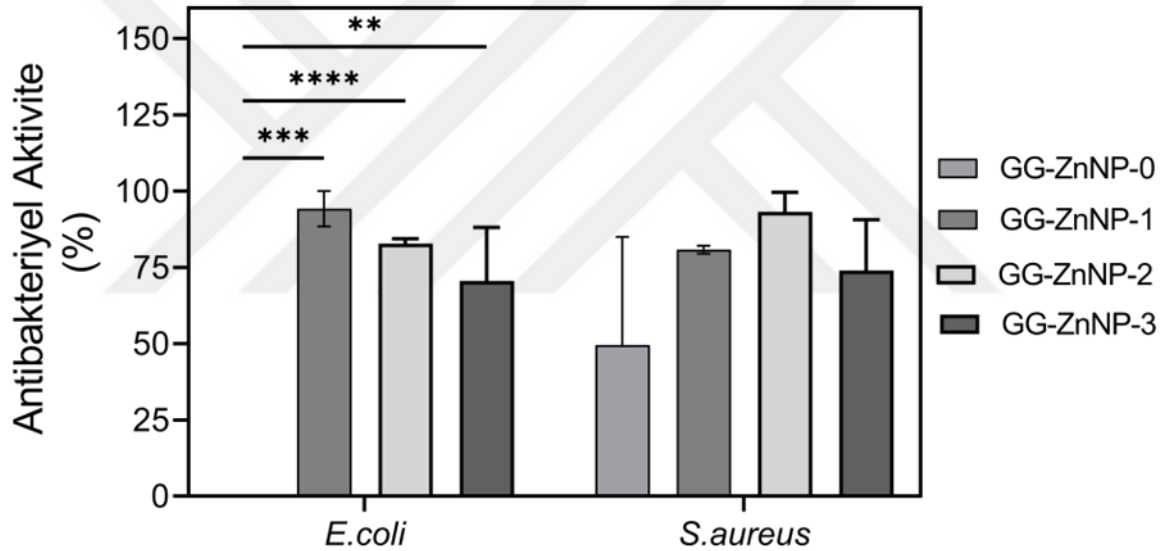
4.3.2. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin antibakteriyel aktivitelerinin koloni oluşturan birim deneyi ile değerlendirilmesi

ZnO nanopartiküller genel olarak antibakteriyel etkilerini bazı mekanizmalarla göstermektedirler. Bunlar hücre duvarının mekanik hasarı, metal iyonlarının hücre içine salınımı ve hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin oluşturulması olarak sıralanabilir. ZnO nanopartiküllerin pozitif yüklü yüzeyi ile negatif yüklü bakteri duvarı arasındaki elektrostatik etkileşim nanopartiküllerin bakteri yüzeyinde birikmesine neden olarak parçalanmaya, dış zarın geçirgenliğine ve sonunda bakteri fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir. Ayrıca, Zn^{2+} iyonlarının hücre içine salınımı, ROS üretimi ve bozulmuş solunum yolu yoluyla bakteri hücre toksisitesinde temel rol oynar. ROS, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oldukça reaktif türlere sahip eşlenmemiş elektronlar içerir. Bu serbest radikallerin mikroorganizmalardaki yüksek seviyeleri, glutatyon antioksidan rezervuarını oksitleyebilir ve plazma zarındaki lipid peroksidasyonunu artırabilir. Bu süreç lipid zarlarına zarar verir ve bakteri ölümüyle sonuçlanır [126].

ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin koloni oluşturan birim deneyindeki antibakteriyel özellikleri Şekil 4.11’de sunulmuştur. Deney sonuçları incelendiğinde ZnO nanopartikül yüklü tüm jellan gam süngerlerin yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. GG-ZnNP-0 grubunun *E. coli*’de %0, *S. aureus*’da %49,5 antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. GG-ZnNP-1 grubu incelendiğinde *E. coli* için antibakteriyel

aktivitenin %94,2 ve *S. aureus* için antibakteriyel aktivitenin %80,8 olduğu bulunmuştur. GG-ZnNP-2 grubu incelendiğinde *E. coli* için antibakteriyel aktivitenin %82,8 ve *S. aureus* için antibakteriyel aktivitenin %93,3 olduğu gözlenmektedir. GG-ZnNP-3 grubunun *E. coli* ve *S. aureus* için sırasıyla %70,5 ve %74 antibakteriyel etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Literatürde çalışmamıza benzer bir çalışmada bakır ve çinko oksit ve sadece çinko oksit nanopartiküller içeren karboksimetil selüloz ve jelatinden oluşan süngerler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler antibakteriyel etkinlikleri çalışmamıza benzer bir şekilde koloni oluşturan birim deneyi ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda çalışmamızdaki gibi *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılmıştır. Örneklerin antibakteriyel etkinlikleri %49'un üzerinde çıkmasına ve en yüksek antibakteriyel etki %81 olarak bulunmuş olmasına rağmen bizim çalışmamızdaki kadar yüksek antibakteriyel etkiye ulaşamamıştır [126].

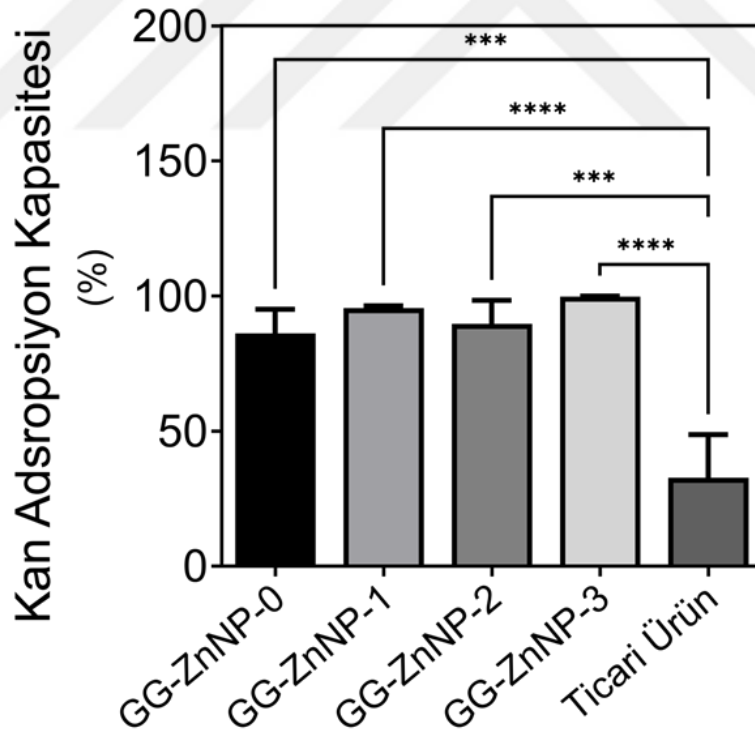


Şekil 4.11. Jellan gam süngerlerin *E. coli* ve *S. aureus* için koloni oluşturan ünite deneyi sonuçları.

4.4. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hemostatik Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan ZnO nanopartikül içeren Jellan gam süngerlerin hemostatik etkileri kan pıhtılaşma testleri, hemoliz testi ve kan absorbe edilmiş örneklerin SEM görüntülemesi ile değerlendirilmiştir.

Hazırlanan ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hemostatik etkilerinin belirlenmesi amacıyla tam kan absorpsiyon etkinlikleri değerlendirilmiştir. 0,150 mL insan kanı süngerlere uygulanmıştır ve 60 saniye beklenmiştir devamında spektrofotometrede 540 nm’de hemoglobin yoğunluğu okutulmuştur. Elde edilen veriler referansa göre kıyaslanmıştır ve sonuçlar yüzde olarak Şekil 4.12’de sunulmuştur. Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyon performansları artan çinko miktarına ve ticari sünger ile kıyaslandığında üstün bir performans ortaya koyduğu görülmektedir. Çinko oksit nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun %86,2 kan absorpsiyon kapasitesi gösterildiği görülmüştür. Çinko oksit nanopartikül içeren sünger incelendiğinde üç süngerinde oldukça yüksek yüzde ile etkinlik gösterdiği görülmüştür. Sırasıyla GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2 ve GG-ZnNP-3 grupları; 95,5 , 89,7 ve 99,8 kan absorpsiyon kapasitesi göstermiştir. Jelatin temelli ticari süngerin kan absorpsiyon etkinliği performansı incelendiğinde jellan gam süngerlerin etkinliğine kıyasla oldukça düşük etkinlik (%32,8) gösterdiği görülmüştür.

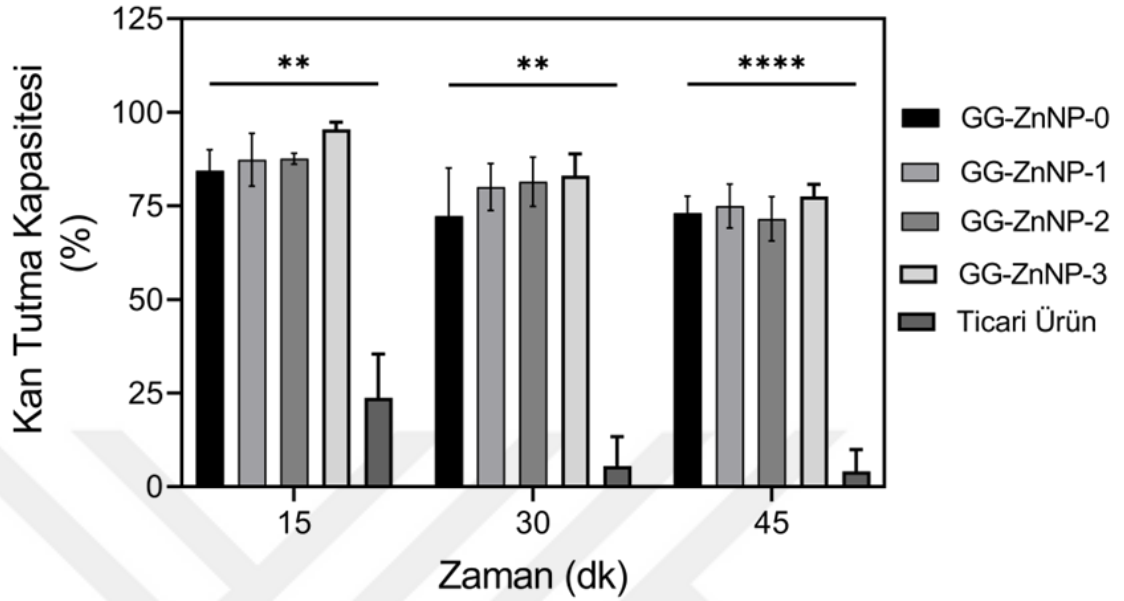


Şekil 4.12. Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyon etkinliklerinin birbirleriyle ve ticari sünger ile kıyaslanması.

Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyon deneyleri sonrasında yüksek hemostatik aktivite gözlemlememiz ile birlikte bu süngerlerin daha uzun sürelerde kan tutma kapasitelerinin de incelenmesine ve ticari hemostatik sünger ile kıyaslanmasına karar verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'te sunulmuştur. Sonuçlar incelendiği zaman çinko oksit nanopartikül içeren süngerlerin 15. dakikada %87,3'ün üzerinde kan tutma kapasitesi gösterdiği, çinko oksit nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0'nin %81,9, ticari hemostatik süngerin ise %23,7 kan tutma kapasitesi gösterdiği görülmüştür. Çinko oksit nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin 30. dakikada %80'in üzerinde, 45. dakikada ise %71,5'in üzerinde kan tutma kapasitesi gösterdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde uzun sürelerde de süngerlerin başarılı bir şekilde kan tutmaya devam ettiğini vurgulamaktadır. Özellikle ticari olarak satılan hemostatik sünger ile kan tutma kapasiteleri kıyaslandığı zaman ticari süngerin kan tutma performanslarının oldukça düşük kaldığı görülmüştür. Çinko oksit nanopartikül içermeyen süngerin kan tutma potansiyeli ZnO içeren süngerlerle karşılaştırıldığında, çinko içeren grupların daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Ancak GG-ZnNP-0 kan tutma kapasitesi oldukça iyidir, çinko partiküllerin kan tutma kapasitesini artırdığı düşünülmektedir.

Pozitif yüklü olan ZnO, kanın pH'ının ($\text{pH} \sim 7.3-7.4$) üzerinde bir izoelektrik noktaya sahip olmasına rağmen ZnO nanopartikülleri fizyolojik koşullar altında güçlü bir pozitif yüzey yüküne sahiptir. Bununla birlikte, kan bileşenleri ve fibrin gibi pıhtılaşma reaksiyon ürünleri oksit yüzeyine yapışır ve ZnO nanopartiküllerin doğal yüzey yükünü değiştirir. Bu nedenle, kan ve fibrin lifi, elektrostatik çekim sayesinde negatif yüklü kan ile ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerler kolayca etkileşir ve kan süngerlerin yüzeyine tutunur. Kan pıhtı yüzeyinde kalın bir fibrin ağı oluşturur ve kanın pıhtılaşma kinetiğini hızlandırır [127].

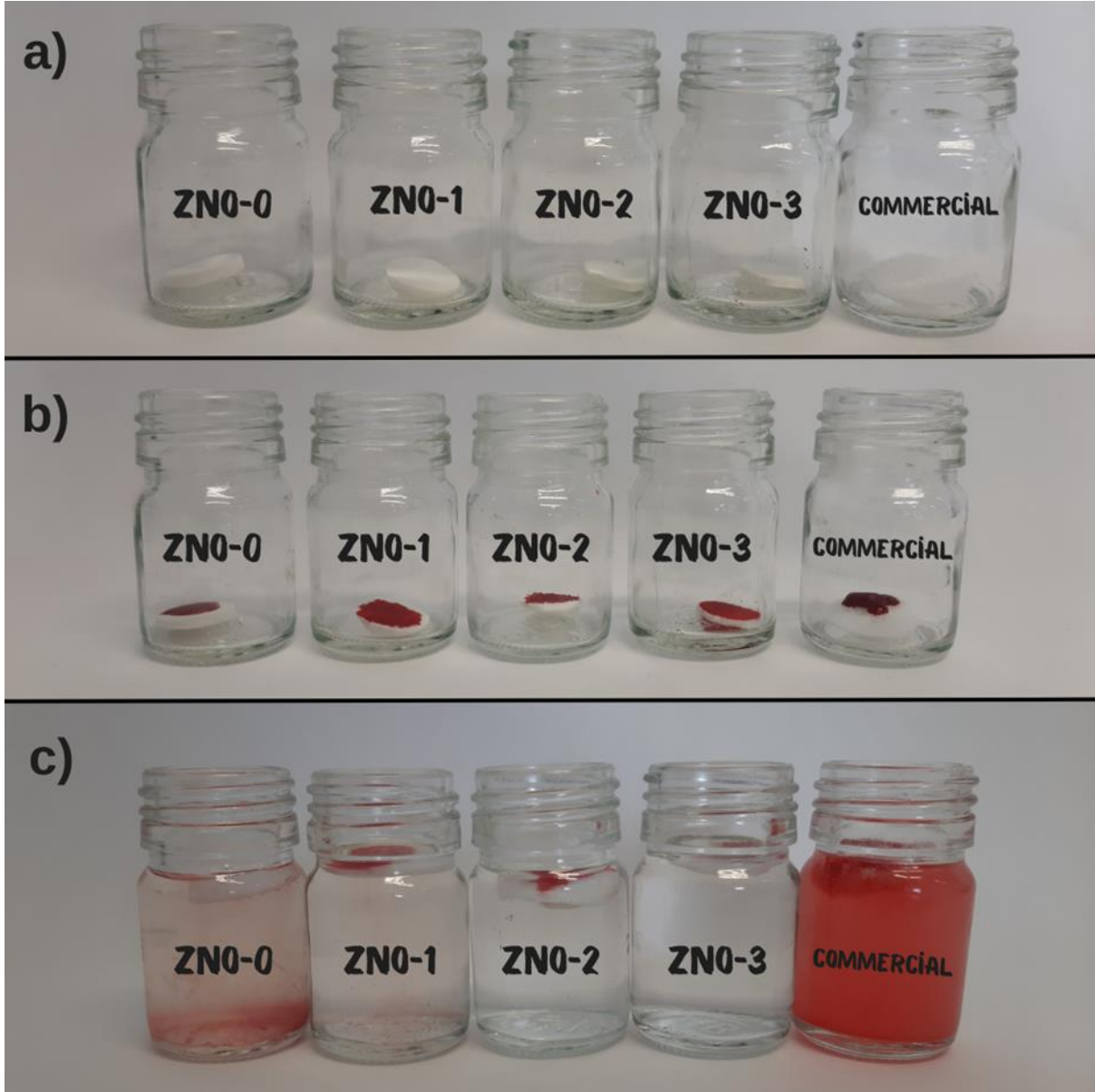
Şekil 4.12'de verilen kan absorpsiyon kapasitesi grafiğinde ve Şekil 4.13'de verilen kan tutma kapasitesi deneylerinde de görüldüğü gibi ZnO nanopartiküllerin varlığı yüksek kan tutma özelliği sağlamıştır. En düşük dozda olan gruplarda oldukça yüksek etkinlik göstermişlerdir. En yüksek etkinliği, en yüksek dozdan çinko nanopartikül içeren GG-ZnNP-3 göstermiştir.



Şekil 4. 13. Jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin kan tutma kapasitelerinin 15, 30 ve 45. dakikalara göre kıyaslanması.

Jellan gam sünger, ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerler ve ticari olarak alınan hemostatik süngerin hemoliz deneyi, salin çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.14'te sunulmuştur. Şekil 4.14 (a)'da kan uygulaması yapılmadan önce liyofilize edilip disk şeklinde kesilen jellan gam süngerlerin ve ticari (commercial) süngerin cam şişeler içerisindeki görüntüsüne yer verilmiştir. Şekil 4.14 (b)'de tam kan uygulanan jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin 60 saniye sonrasındaki görünüşleri verilmiştir. Şekil net bir şekilde incelendiğinde 60 saniyelik uygulama sonrasında jellan gam süngerlerin hızlıca kanı absorbe ettiği görülmektedir. Şekil 4.14 (c)'de salin çözeltisi ile 60 saniye muamele edilen jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin kan sızıntıları optik olarak görüntülenmiştir. Şekil incelendiğinde süngerlerden gerçekleşen kan sızıntısının Şekil 4.12'de verilen kan absorpsiyon kapasitesi sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Özellikle ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerden oldukça az miktarda kan sızıntısı gerçekleştiği görülmektedir. En yüksek dozda ZnO nanopartikül içeren GG-ZnNP-3 grubunun kan absorpsiyon kapasitesi sonuçlarıyla (%99,8) uyumlu olarak neredeyse ihmal edilebilir bir sızıntı gerçekleştirdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan kanın jellan gam ve ZnO

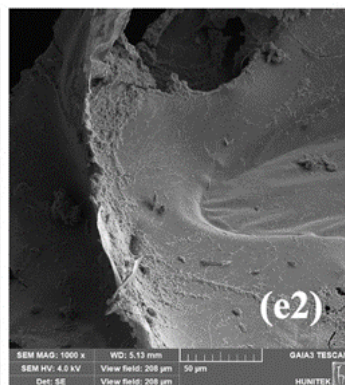
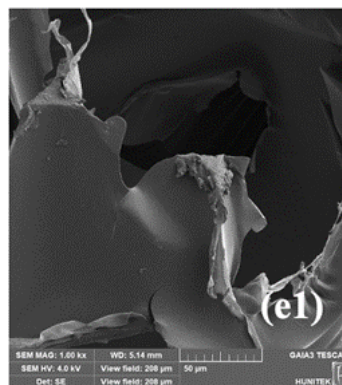
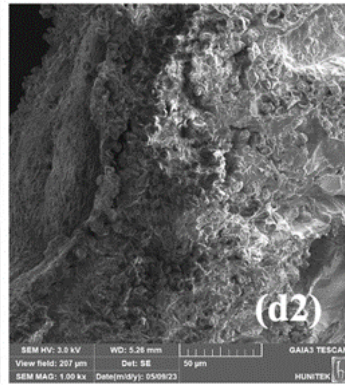
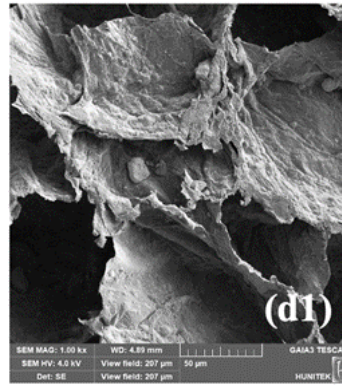
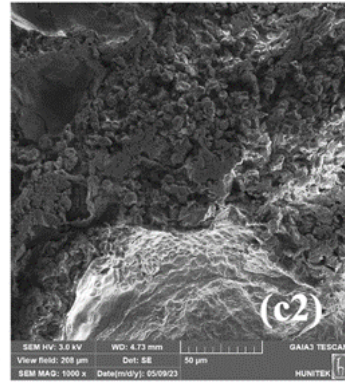
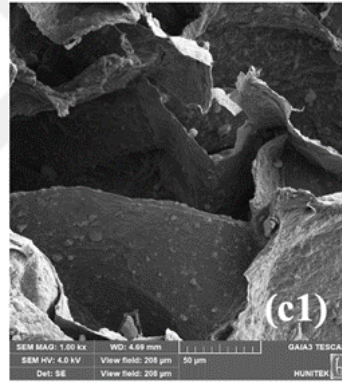
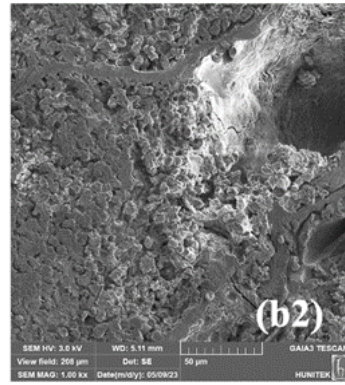
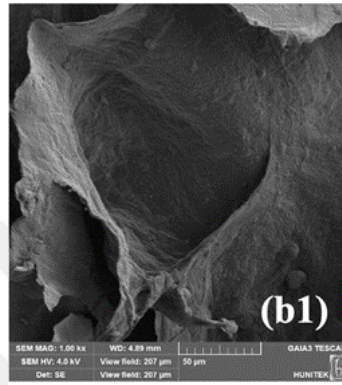
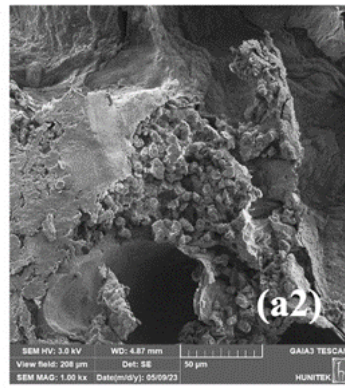
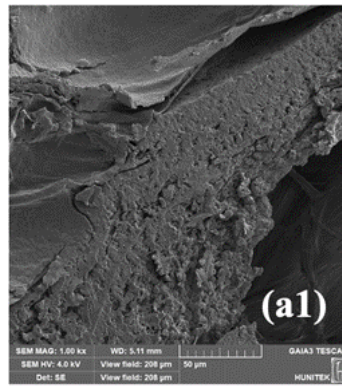
nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin yüzeyinde koagüle olduğunu ve salin çözeltisi içerisinde çok az miktarda hemolize olarak sızıntı yaptığını vurgulayabiliriz. Ticari (commercial) hemostatik süngerlerden salin çözeltisi içerisine kan sızıntısı yüksek seviyelerde gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar kan absorpsiyon deneyleri ile uyumludur.



Şekil 4.14. Kan sızıntısının görüntülenmesi. (a) disk şeklinde kesilen süngerlerin ve ticari (commercial) süngerin cam şişeler içerisindeki görüntüsü, (b) tam kan uygulanan jellan gam süngerlerin ve ticari süngerin 60 saniye sonrasındaki görünüşleri, (c) salin çözeltisi ile muamele edilen jellan gam süngerlerin ve ticari süngerden gerçekleşen kan sızıntısının görüntülenmesi.

4.4.1. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Kan Absorpsiyonu Sonrasındaki SEM Görüntülemeleri

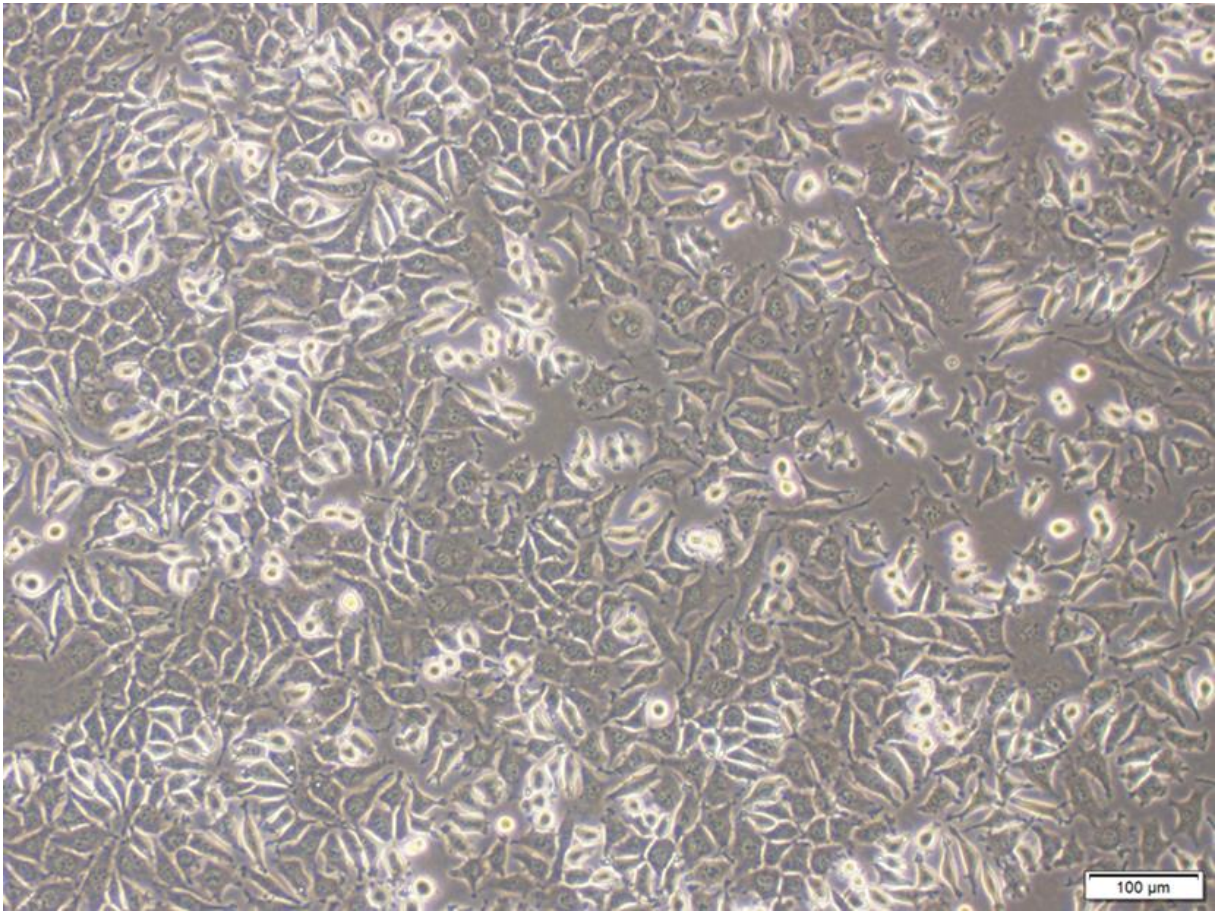
Şekil 4.15’te jellan gam, ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlere ve ticari süngere ait kan absorpsiyonu öncesi (sırasıyla (a1, b1, c1, d1 ve e1)) ve kan absorpsiyonu sonrasında alınmış SEM görüntülemeleri verilmiştir. Kan absorpsiyonu sonrasında gerçekleştirilen SEM görüntülemeleri incelendiğinde eritrositlerin jellan gam (Şekil 4.15 (a2)) ve ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin yüzeyine tutundukları görülmektedir. Kan absorpsiyon ve hemoliz deneyleriyle de uyumlu olarak ZnO nanopartikül içeren süngerlerin (Şekil 4.15 (b2, c2 ve d2)) (GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2 ve GG-ZnNP-3) yüzeyinde GG-ZnNP-0’e kıyasla daha fazla eritrosite rastlanmıştır. Jellan gam süngerlerin kan absorpsiyonları ticari süngerlerle (Şekil 4.15 (e2)) kıyaslandığında ticari süngerin yüzeyine tutunmuş seyrek sayıda eritrosite rastlanmıştır. SEM görüntülemeleri kan absorpsiyon deneyleri ve hemoliz deneyi ile uyumlu sonuçlar verilmiştir. Literatürde yer alan ZnO nanopartikül yüklü süngerlere ait SEM görüntüleri incelendiğinde çalışmamızda yer alan görüntülere benzer görüntülere rastlanmaktadır. ZnO nanopartiküllerin varlığı ve konsantrasyonundaki artışın hemostatik etkiyi artırdığı vurgulanmaktadır [128,129].



Şekil. 4.15. Kan absorpsiyonu öncesi ve kan absorpsiyonu sonrasında alınmış SEM görüntülemeleri. Sırasıyla kan absorpsiyonu öncesi (1) ve sonrası (2) süngerler: (a1, a2) Jellan gam (GG-ZnNP-0), ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerler (b1, b2) GG-ZnNP-1, (c1, c2) GG-ZnNP-2 ve (d1, d2) GG-ZnNP-3 ve (e1, e2) Ticari sünger.

4.5. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi ve çizik testi

Jellan gam ve ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi ve çizik testi L929 fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L929 fibroblast hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüsü Şekli 4.16’da sunulmuştur.

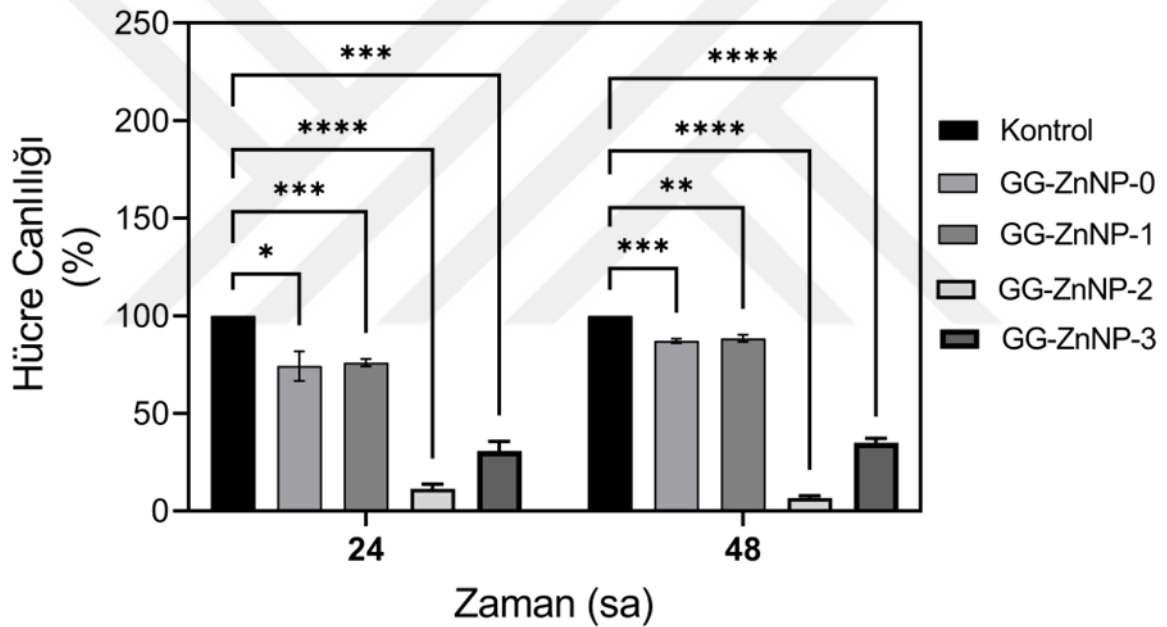


Şekil 4.16. L929 hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüsü (skala 100µm).

4.5.1 ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Hücre Canlılık Analizi

Jellan gam ve ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları Şekil 4.17’de sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde GG-ZnNP-0 grubunda ve GG-ZnNP-1 grubunda hücre canlılığının kontrol grubuna yakın sonuçlar verdiği görülmüştür.

GG-ZnNP-0 grubunda 24. saatte hücre canlılığı %72,7 , 48. saatte %87 olarak bulunmuştur. GG-ZnNP-1 grubunda 24. saatte hücre canlılığı %75,7 , 48. saatte %88,4 olarak bulunmuştur. İçeriğinde ZnO içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun hücre canlılığının kontrole benzer şekilde çıkması beklenen bir durumdur. Literatürde de daha önce jelatin ve jellan gam dan hazırlanmış hidrojellere ait hücre canlılık analizleri mevcuttur ve bizim çalışmamızdaki gibi kontrole benzer şekilde yüksek hücre canlılığı gösterdiği görülmektedir [73]. Çinko hücreler için temel elementlerden birisidir. Hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını teşvik eder ancak yüksek seviyelerde olması toksik etki gösterip hücrelerin ölmesine neden olmaktadır [126]. Bizim tez çalışmamızda da daha yüksek dozlarda ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin (GG-ZnNP-2, GG-ZnNP-3) hücre canlılığını düşürdüğünü ve toksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

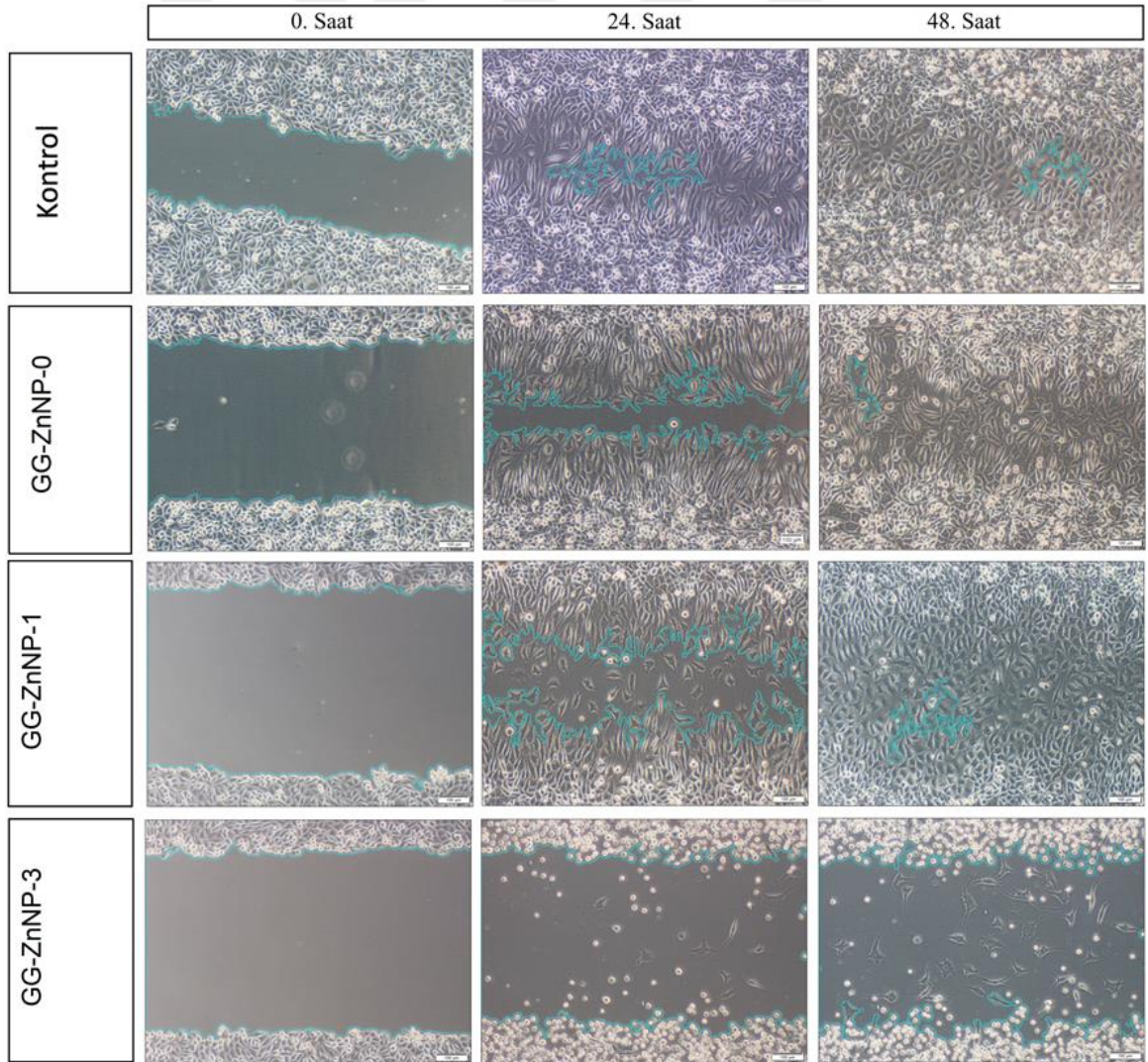


Şekil 4.17. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin hücre canlılık analizi.

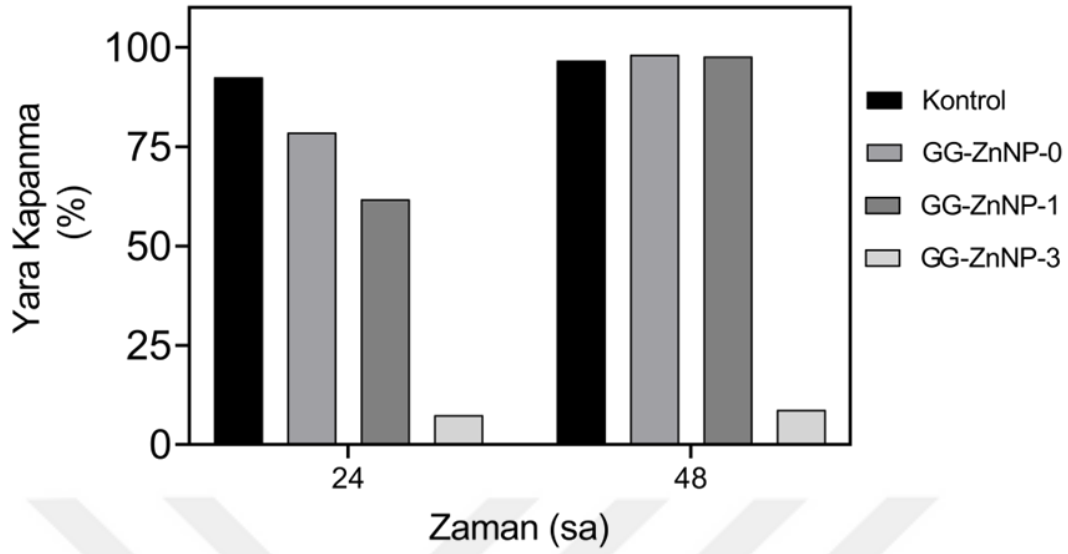
4.5.2. ZnO Nanopartikül İçeren Jellan Gam Süngerlerin Çizik Testi

Hücre canlılık analizleri sonrasında en iyi performans veren GG-ZnNP-0 ve GG-ZnNP-1 grupları için yara modeli oluşturulmasına karar verilmiştir. MTT sonucuna göre en yüksek dozda ZnO nanopartikül içeren GG-ZnNP-3 grubunun hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olduğu görülmüştür. Bu durumun çizik testinde de gösterilmesi amacıyla GG-ZnNP-3 grubu da çizik testine dahil edilmiştir. Çizik testi öncesinde çizik oluşturulan bölgeler kontrol grubu ve GG-ZnNP-0, GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-3 süngerler için 0. saat olarak

belirtilmiş, 24. ve 48. saatlerde yara kapanma etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çizik testinin sonuçları Şekil 4.18’de sunulmuştur. Şekil incelendiğinde MTT testi ile benzer olarak GG-ZnNP-0 ve GG-ZnNP-1 gruplarının kontrol grubuna çok yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Yine MTT testi sonuçları ile uyumlu olarak GG-ZnNP-3 grubunun yara kapanma görüntüleri incelendiğinde oldukça az kapanmanın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca GG-ZnNP-3 grubunun 24 ve 48. saat sonuçları, 0. saat sonuçları ile kıyaslandığında çizik bölgesinin etrafında ölü hücreler görülmektedir. Şekil 4.19’da çizik testi sonucunda elde edilen görüntüler ImageJ (NIH) programı ile değerlendirilmiştir ve yara alanının kapanmasına göre sonuçlar elde edilip bu sonuçlar grafiklendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 24. saatte GG-ZnNP-0 (%78) ve GG-ZnNP-1 (%62) gruplarının kontrol grubuna (%92) göre yara kapanma etkinliklerinin biraz düşük kaldığı ancak 48. saatte GG-ZnNP-0 ve GG-ZnNP-1 gruplarının %98 ile kontrol grubunun (%96,6) üzerinde yara kapanma etkinliği gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.18. ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin çizik testi.



Şekil 4.19. Jellan gam ve ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlere ait yara kapanma yüzdeleri.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde yara iyileşmesi performansı ve biyoyumluluk testlerinde en başarılı grup GG-ZnNP-1 grubu olmuştur. Sentezlediğimiz ZnO nanopartikül yüklü tüm süngerler antibakteriyel etki göstermiştir ancak yüksek konsantrasyonda bulunan nanopartiküller fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki yaratmıştır ve canlı hücre sayısının azaldığı görülmüştür. GG-ZnNP-1 grubu ise yapılan çizik testi ve MTT analizinde kontrol grubuna yakın sonuç vermiştir. Ayrıca agar disk difüzyon deneyinde süngerin temas ettiği bölgelerde bakteriyel üremenin gerçekleşmemesi bu grubun yeterli antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu veriler değerlendirildiğinde sentezlediğimiz ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerler içindeki yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılmaya uygun olan grubumuzun GG-ZnNP-1 olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

5. YORUM

- Yara iyileşmesi günümüzde hala ciddi bir sağlık sorunudur ve dünya genelinde pek çok kişiyi etkilemektedir. Gelecekte yara bakımına ihtiyaç duyacak bireylerde artış beklenmektedir. Ayrıca yaralar sağlık sistemi ve etkilenen bireyler için ciddi bir maddi yük oluşturmaktadır. Günümüzde tüm hastalarda kullanılabilecek ve gerekli tüm özelliklere sahip ideal bir yara örtüsü bulunmamaktadır. Bu nedenle yara örtülerinin geliştirilmesi ve daha kullanışlı hale getirilmesi zorunlu bir ihtiyaç haline gelmiştir.
- Hidrojellerin esnek ve gözenekli yapısı, yüksek biyouyumluluğu, yüksek sıvı emme kapasitesi, uygun gaz geçirgenliği gibi birçok üstün özelliği bulunmaktadır. Ayrıca yara yüzeyine kolay uygulanırlar ve pansuman değişimi esnasında yaraya yapışarak ikincil bir hasar oluşturmazlar. Bakteriyel üremeyi engellediklerinden ve yarada nemli bir ortam oluşturdıklarından yara iyileşmesi sürecini destekledikleri tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular nedeniyle hidrojeller yara örtüsü olarak kullanılmaya son derece uygun materyallerdir. Bu tez çalışması kapsamında yeni bir yara örtüsü geliştirmek amacıyla ZnO nanopartikül yüklü, jellan gam içeren hemostatik süngerler sentezlenmiştir. Hidrojellerin yapısında doğal polimerlerin bulunması doku ile olan biyouyumluluğunu arttırmaktadır [130]. Bu nedenle bu tez çalışmasında sentezlenen hidrojelin yapısına doğal bir polisakkarit olan jellan gam eklenmiştir. Jellan gam esnek yapısı, yüksek biyouyumluluğu, toksik özellik göstermemesi, yüksek miktarlarda sıvıyı emebilmesi ve kolay şekil alabilmesi nedeniyle yara örtüsü uygulamalarında kullanılmaya uygun bir doğal polimerdir. Jellan gam içeren hidrojellerin yara iyileşmesi uygulamalarında hücre çoğalmasını olumlu yönde etkiledikleri tespit edilmiştir [131,132].
- Bakteriyel enfeksiyon yara bölgelerinde iyileşmeyi geciktirebilir veya tamamen engelleyebilir. Bu nedenle antibakteriyel yara örtülerinin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bakteriyel enfeksiyonlara karşı uygulanan en yaygın yöntemlerden biri olan antibiyotik ilaçların kullanımı son yıllarda beklenen etkiyi yaratmamaktadır. Çünkü bakterilerde ortaya çıkan antibiyotik direnci nedeniyle antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki öldürücü etkileri azalmıştır. Bu durum ise yeni antibakteriyel ajanların kullanılmasını

gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında antibakteriyel özelliği sağlamak amacıyla hidrojenlerin yapısına ZnO nanopartiküller eklenmiştir.

- Tez çalışması kapsamında sentezlenen ZnO nanopartiküllerin FTIR analizi sonuçları ZnO nanopartiküllerinin doğru bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Daha sonrasında uygulanan XRD analizi sonuçları incelendiğinde ana pikler haricinde pik tespit edilmemesi sentezlenen ZnO nanopartiküllerin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. SEM ve TEM görüntülemelerinde DLS analizleri sonucunda ZnO nanopartiküllerin boyutu yaklaşık $74,39 \pm 5,08$ d.nm (çap.nanometre) çapında ve homojen boyut dağılımına sahip oldukları görülmüştür, parçacıkların boyutlarının ise ortalama 70 nm olduğu tespit edilmiştir.

- ZnO nanopartikül içeren jellan gam temelli hemostatik süngerler 4 grup halinde sentezlenmiştir. Hiç ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubudur. Diğer gruplar olan GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2, ve GG-ZnNP-3 grupları sırasıyla artan ZnO nanopartikül içeriğine sahiptir. Böylece ZnO nanopartiküllerin yokluğunun ve artan düzeylerinin hemostatik süngerin özelliklerine olan etkisi incelenerek karşılaştırılmıştır. Sentezlenen süngerlerin SEM incelemesinde ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum nanopartikül içermemesinden kaynaklanır. GG-ZnNP-1, GG-ZnNP-2, ve GG-ZnNP-3 grupları incelendiğinde yapılarında bulunan ZnO nanopartiküllerden dolayı pürüzlü yapıda oldukları net bir şekilde görülmüştür. Süngerlerin yapısında bulunan jellan gam, başlangıçta agram durumunda olan ZnO nanopartiküllerin daha homojen şekilde konumlanmasını sağlamıştır.

- Üretilen ZnO nanopartikül yüklü hemostatik süngerlerin kullanım amacı yara tedavisi uygulamaları olduğundan şişme davranışları çok önemlidir. Çünkü yara bölgesinde kullanılabilmesi için yüksek miktarda sıvı absorplama kapasitesinin ve bölgede nemli ortam oluşturma özelliğinin bulunması beklenmektedir [133]. Uygulanan şişme testlerinin sonuçları değerlendirildiğinde süngerlerin yapısında bulunan ZnO nanopartikül miktarının artmasıyla süngerlerin sıvı tutma kapasiteleri görünür şekilde azalmıştır. Bu durum süngerlerdeki gözeneklerin partiküller içermesinden ve dolayısıyla suyun bu gözeneklere yeterince nüfuz edememesinden kaynaklanmaktadır [119]. Şişme özelliğinin azalması hemostatik yetenek için değerlendirildiğinde herhangi bir sorun oluşturmadığı ve süngerlerin kan durdurucu özelliğinin yeterli olduğu görülmüştür.

- Sentezlenen süngerlerin biyobozunurluk performanslarının belirlenmesi için süngerler 1, 3, 5, ve 7 gün inkübe edilmiş ve gün sonlarında kalan kütle (%) belirlenmiştir. Bu test sonucunda süngerlerin yapısındaki ZnO nanopartikül miktarının artışının bozunma hızını arttırdığı belirlenmiştir. Bu etkinin sebebi ZnO nanopartiküllerin miktarının artmasıyla süngerlerin yapısında bulunan çapraz bağlanma yoğunluğunun azalması olarak tespit edilmiştir [124].

- İyileşme sürecini tamamlayamayan yaralarda en sık karşılaşılan problem bakteriyel üremedir [57]. Daha önce literatürde yer alan çalışmalar ZnO nanopartiküllerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisinin bulunduğunu, hatta yüksek sıcaklık ve yüksek basınca dayanıklı sporları inhibe etmede etkili olduğunu göstermektedir [134]. Yaralarda özellikle *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin neden olduğu enfeksiyonlar yaygın şekilde görüldüğünden bu çalışmada antibakteriyel özelliğin test edilmesi için bu türler tercih edilmiştir. Yapılan disk difüzyon testlerinde süngerlerin besiyeri ile temas ettiği bölgelerde bakteriyel üremenin gerçekleşmediği görülmüştür. Koloni oluşturan birim testinin sonuçları da antibakteriyel etkinin varlığını desteklemektedir. Nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunda antibakteriyel aktivite *E. coli* için %0, *S. aureus* için %49,5 olarak tespit edilmiştir. Nanopartikül içeren diğer gruplarda ise antibakteriyel aktivitenin *E. coli* için %94,2'ye, *S. aureus* için %93,3'e kadar arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde sentezlenen süngerlerin bakteriyel üremeye izin vermediği dolayısıyla bulunduğu bölgede enfeksiyon oluşumu riskini azalttığı sonucu elde edilmiştir.

- Süngerlerin hemostatik özelliklerini tespit etmek amacıyla kan absorpsiyon deneyleri, hemoliz deneyleri ve SEM görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen süngerlerin kan absorpsiyon kapasiteleri kıyaslandığında GG-ZnNP-0 grubunun %86,2 ile en düşük kapasitede olduğu görülmüştür. Diğer gruplarda ise ZnO nanopartiküllerin etkisiyle %99,8'e varan kan absorplama kapasitesi tespit edilmiştir. Satın alınan jelatin temelli hemostatik süngerde ise kan absorpsiyon değeri %32,8 ile oldukça düşük performans göstermiştir. Süngerlerin kan tutma başarıları incelendiğinde 15. Dakikada GG-ZnNP-0'nin %81,9 , ticari hemostatik süngerin ise %23,7 , ZnO nanopartikül yüklü süngerlerin ise %87,3'ün üzerinde kan tutma kapasitesi gösterdiği görülmüştür. Kan absorpsiyon

deneylerinin sonuçları değerlendirildiğinde sentezlenen tüm süngerlerin ticari olarak elde edilen hemostatik süngerden daha başarılı olduğu ve süngerlerin yapısında bulunan ZnO nanopartiküllerin kan absorpsiyonu üzerinde pozitif yönde etkili olduğu tespit edilmiştir.

- Sentezlenen ve ticari olarak elde edilen süngerlerin kan absorpsiyonu öncesinde ve sonrasındaki SEM görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir. Kan absorpsiyon deneylerinden alınan sonuçlar ile uyumlu olarak ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin yüzeyinde ticari süngere ve GG-ZnNP-0'a göre daha fazla eritrosit bulunduğu görülmüştür. GG-ZnNP-0 (ZnO nanopartikül içermeyen jellan gam sünger) yüzeyinde de ticari süngere kıyasla daha fazla sayıda eritrosit olduğu görülmüştür. SEM görüntülerinin ve kan hemoliz deneylerinin sonuçlarına göre süngerlerin yapısında ZnO nanopartiküllerin bulunmasının ve konsantrasyonlarındaki artışın hemostatik etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir.

- Sentezi gerçekleştirilen ZnO nanopartikül yüklü jellan gam süngerlerin biyoyumluluğunun tespit edilmesi için hücre canlılık analizi ve çizik testi uygulanmıştır. Bu deneyler in vitro koşullarda L929 (fare fibroblast hücreleri) üzerinde gerçekleştirilmiştir. MTT (Hücre Canlılık Analizi) sonuçları incelendiğinde ZnO nanopartikül içermeyen GG-ZnNP-0 grubunun ve en az düzeyde ZnO nanopartikül içeren GG-ZnNP-1 grubunun canlılığı kontrol grubuna yakın sonuç vermiştir. Bu sonuç son derece olumlu olup, süngerin içerdiği ZnO nanopartikül konsantrasyonunun hücreler üzerinde toksik etki yaratmayacak düzeyde olduğunu göstermektedir. ZnO nanopartiküllerinin varlığı belli bir düzeye kadar hücre için olumlu sonuçlar ortaya çıkarırken, yüksek düzeylerde olması hücreler üzerinde toksik etki göstermekte ve hücre canlılığını azaltmaktadır [126]. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında daha yüksek konsantrasyonlarda ZnO nanopartikül içeren jellan gam süngerlerin (GG-ZnNP-2, GG-ZnNP-3) hücreler üzerinde toksik etki göstererek hücre canlılığını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Yapılan çizik testinin sonuçları incelendiğinde MTT sonuçlarına benzer olduğu tespit edilmiştir. 48. saatte GG-ZnNP-0 ve GG-ZnNP-1 gruplarının %98, kontrol grubunun ise %96,6 oranında yara kapanma etkinliği gösterdiği görülmüştür.

- Ulaşılan sonuçlardan hareketle bu tez çalışması kapsamında sentezlenen tüm süngerlerde uygulanan testler sonucu başarılı sonuçlar elde edilmiştir ancak GG-ZnNP-1 grubu taşıdığı antibakteriyellik, kan absorpsiyon, biyoyumluluk gibi üstün özellikleri bir

arada bulundurması nedeniyle yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılmaya en uygun gruptur. Ticari olarak temin edilen hemostatik sünger ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda sentezlenen GG-ZnNP-1 grubu süngerlerin sahip olduğu umut verici özellikler daha kapsamlı çalışmalar ile geliştirilerek gelecekteki yara tedavilerine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- [1] K. Suvarna, M. Munira, Journal of Pharma Research Wound Healing Process and Wound Care Dressing: A Detailed Review, Journal of Pharma Research. (2013) 6–12. www.jprinfo.com.
- [2] S. Park, Biochemical, structural and physical changes in aging human skin, and their relationship, Biogerontology. 23 (2022) 275–288. <https://doi.org/10.1007/s10522-022-09959-w>.
- [3] C. Zhang, G.R. Merana, T. Harris-Tryon, T.C. Scharschmidt, Skin immunity: dissecting the complex biology of our body's outer barrier, Mucosal Immunol. 15 (2022) 551–561. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00505-y>.
- [4] E. Man, C. Hoskins, Towards advanced wound regeneration, European Journal of Pharmaceutical Sciences. 149 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105360>.
- [5] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, X. Chen, A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, J Adv Res. 8 (2017) 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>.
- [6] Skin Cross Section Labeled Stok Vektör (Telifsiz) 24129712 | Shutterstock, (n.d.). <https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/skin-cross-section-labeled-24129712> (accessed June 16, 2023).
- [7] B. Guo, R. Dong, Y. Liang, M. Li, Haemostatic materials for wound healing applications, Nat Rev Chem. 5 (2021) 773–791. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00323-z>.
- [8] N. Mayet, Y.E. Choonara, P. Kumar, L.K. Tomar, C. Tyagi, L.C. Du Toit, V. Pillay, A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems, J Pharm Sci. 103 (2014) 2211–2230. <https://doi.org/10.1002/jps.24068>.
- [9] G. Singh, A. Chanda, Biomechanical modeling of progressive wound healing: A computational study, Biomedical Engineering Advances. 4 (2022) 100055. <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100055>.
- [10] J. Zhu, H. Zhou, E.M. Gerhard, S. Zhang, F.I. Parra Rodríguez, T. Pan, H. Yang, Y. Lin, J. Yang, H. Cheng, Smart bioadhesives for wound healing and closure, Bioact Mater. 19 (2023) 360–375. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.04.020>.
- [11] A.M. Behrens, M.J. Sikorski, P. Kofinas, Hemostatic strategies for traumatic and surgical bleeding, J Biomed Mater Res A. 102 (2014) 4182–4194. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35052>.
- [12] T. Kondo, Y. Ishida, Molecular pathology of wound healing, Forensic Sci Int. 203 (2010) 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.004>.
- [13] T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms, 2009.

- [14] H. Sinno, S. Prakash, Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review, *Plast Surg Int.* 2013 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/146764>.
- [15] G. Wang, F. Yang, W. Zhou, N. Xiao, M. Luo, Z. Tang, The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 157 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114004>.
- [16] G. Broughton, J.E. Janis, C.E. Attinger, Wound healing: An overview, *Plast Reconstr Surg.* 117 (2006). <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>.
- [17] T. Kurahashi, J. Fujii, Roles of antioxidative enzymes in wound healing, *J Dev Biol.* 3 (2015) 57–70. <https://doi.org/10.3390/jdb3020057>.
- [18] H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, U. Mirastschijski, Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts, *European Surgical Research.* 58 (2017) 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>.
- [19] M. Hoffman, The Tissue Factor Pathway and Wound Healing, *Semin Thromb Hemost.* 44 (2018) 142–150. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1606181>.
- [20] A. Young, C.-E. Mcnaught, *The physiology of wound healing*, 2011.
- [21] N.X. Landén, D. Li, M. Ståhle, Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 73 (2016) 3861–3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>.
- [22] A.C.D.O. Gonzalez, Z.D.A. Andrade, T.F. Costa, A.R.A.P. Medrado, Wound healing - A literature review, *An Bras Dermatol.* 91 (2016) 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- [23] X.T. Trinh, N. Van Long, L.T. Van Anh, P.T. Nga, N.N. Giang, P.N. Chien, S.Y. Nam, C.Y. Heo, A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective, *Int J Mol Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23179573>.
- [24] G. Han, R. Ceilley, Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments, *Adv Ther.* 34 (2017) 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- [25] S. Guo, L.A. DiPietro, Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing, *J Dent Res.* 89 (2010) 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
- [26] K. Järbrink, G. Ni, H. Sönnnergren, A. Schmidtchen, C. Pang, R. Bajpai, J. Car, The humanistic and economic burden of chronic wounds: A protocol for a systematic review, *Syst Rev.* 6 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0400-8>.
- [27] V. Falanga, R.R. Isseroff, A.M. Soulika, M. Romanelli, D. Margolis, S. Kapp, M. Granick, K. Harding, Chronic wounds, *Nat Rev Dis Primers.* 8 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00377-3>.

- [28] A. Andleeb, A. Mehmood, M. Tariq, H. Butt, R. Ahmed, A. Andleeb, H. Ghufraan, A. Ramzan, A. Ejaz, K. Malik, S. Riazuddin, Hydrogel patch with pretreated stem cells accelerates wound closure in diabetic rats, *Biomaterials Advances*. 142 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213150>.
- [29] Y. Wang, U. Armato, J. Wu, Targeting Tunable Physical Properties of Materials for Chronic Wound Care, *Front Bioeng Biotechnol*. 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00584>.
- [30] H.M. Nguyen, T.T. Ngoc Le, A.T. Nguyen, H.N. Thien Le, T.T. Pham, Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications, *RSC Adv*. 13 (2023) 5509–5528. <https://doi.org/10.1039/d2ra07673j>.
- [31] A. Bal-Öztürk, B. Özkahraman, Z. Özbaş, G. Yaşayan, E. Tamahkar, E. Alarçin, Advancements and future directions in the antibacterial wound dressings – A review, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 109 (2021) 703–716. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34736>.
- [32] M.J. Carter, Economic evaluations of guideline-based or strategic interventions for the prevention or treatment of chronic wounds, *Appl Health Econ Health Policy*. 12 (2014) 373–389. <https://doi.org/10.1007/s40258-014-0094-9>.
- [33] A. Gosain, L.A. DiPietro, Aging and Wound Healing, *World J Surg*. 28 (2004) 321–326. <https://doi.org/10.1007/s00268-003-7397-6>.
- [34] L. Gould, P. Abadir, H. Brem, M. Carter, T. Conner-Kerr, J. Davidson, L. Dipietro, V. Falanga, C. Fife, S. Gardner, E. Grice, J. Harmon, W.R. Hazzard, K.P. High, P. Houghton, N. Jacobson, R.S. Kirsner, E.J. Kovacs, D. Margolis, F. McFarland Horne, M.J. Reed, D.H. Sullivan, S. Thom, M. Tomic-Canic, J. Walston, J.A. Whitney, J. Williams, S. Zieman, K. Schmader, Chronic wound repair and healing in older adults: Current status and future research, *J Am Geriatr Soc*. 63 (2015) 427–438. <https://doi.org/10.1111/jgs.13332>.
- [35] J.B. Halter, N. Musi, F.M.F. Horne, J.P. Crandall, A. Goldberg, L. Harkless, W.R. Hazzard, E.S. Huang, M.S. Kirkman, J. Plutzky, K.E. Schmader, S. Zieman, K.P. High, Diabetes and cardiovascular disease in older adults: Current status and future directions, *Diabetes*. 63 (2014) 2578–2589. <https://doi.org/10.2337/db14-0020>.
- [36] S.C. Davis, A.L. Cazzaniga, C. Ricotti, P. Zalesky, L.-C. Hsu, J. Creech, W.H. Eaglstein, P.M. Mertz, Topical Oxygen Emulsion A Novel Wound Therapy, 2007. www.archdermatol.com.
- [37] S. Alven, X. Nqoro, B.A. Aderibigbe, Polymer-based materials loaded with curcumin for wound healing applications, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 1–25. <https://doi.org/10.3390/polym12102286>.
- [38] N.A.A. Yusof, N.M. Zain, N. Pauzi, Synthesis of ZnO nanoparticles with chitosan as stabilizing agent and their antibacterial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Int J Biol Macromol*. 124 (2019) 1132–1136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.228>.

- [39] B. Singh, L. Pal, Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties, *J Mech Behav Biomed Mater.* 9 (2012) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.021>.
- [40] B. Özkahraman, E. Tamahkar, N. İdil, A. Kılıç Suloglu, I. Perçin, Evaluation of hyaluronic acid nanoparticle embedded chitosan–gelatin hydrogels for antibiotic release, *Drug Dev Res.* 82 (2021) 241–250. <https://doi.org/10.1002/ddr.21747>.
- [41] J. Xiang, L. Shen, Y. Hong, Status and future scope of hydrogels in wound healing: Synthesis, materials and evaluation, *Eur Polym J.* 130 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109609>.
- [42] W. Peng, D. Li, K. Dai, Y. Wang, P. Song, H. Li, P. Tang, Z. Zhang, Z. Li, Y. Zhou, C. Zhou, Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications, *Int J Biol Macromol.* 208 (2022) 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.002>.
- [43] S.P. Kumar, Y. Asokan, K. Balamurugan, B. Harsha, A review of wound dressing materials and its fabrication methods: emphasis on three-dimensional printed dressings, *J Med Eng Technol.* 46 (2022) 318–334. <https://doi.org/10.1080/03091902.2022.2041750>.
- [44] L.T.T. Le, N.N. Giang, P.N. Chien, X.T. Trinh, N. Van Long, L.T. Van Anh, P.T. Nga, X.R. Zhang, S.Y. Nam, C.Y. Heo, Enhancement of Wound Healing Efficacy by Chitosan-based Hydrocolloid on Sprague Dawley Rats, *In Vivo (Brooklyn)*. 37 (2023) 1052–1064. <https://doi.org/10.21873/invivo.13180>.
- [45] S. Mutlu, E. Yilmaz, *Yara Yönetiminde Güncel Yaklaşımlar Current Approaches in Wound Management*, 2019.
- [46] S.P. Ndlovu, K. Ngece, S. Alven, B.A. Aderibigbe, Gelatin-based hybrid scaffolds: Promising wound dressings, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13172959>.
- [47] R.S. Ambekar, B. Kandasubramanian, Advancements in nanofibers for wound dressing: A review, *Eur Polym J.* 117 (2019) 304–336. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.020>.
- [48] Y. Xu, Q. Hu, Z. Wei, Y. Ou, Y. Cao, H. Zhou, M. Wang, K. Yu, B. Liang, Advanced polymer hydrogels that promote diabetic ulcer healing: mechanisms, classifications, and medical applications, *Biomater Res.* 27 (2023). <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00379-6>.
- [49] S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini, Wound dressings - A review, *BioMedicine (Netherlands)*. 5 (2015) 24–28. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>.
- [50] L.I.F. Moura, A.M.A. Dias, E. Carvalho, H.C. De Sousa, Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7093–7114. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.033>.

- [51] M. Berthet, Y. Gauthier, C. Lacroix, B. Verrier, C. Monge, Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 770–784. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.005>.
- [52] M. Das, T.K. Giri, Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery, *J Drug Deliv Sci Technol.* 56 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101586>.
- [53] T.N. Yudanov, I. V Reshetov, *Drug Synthesis Methods And Manufacturing Technology*, 2006.
- [54] R. Gobi, P. Ravichandiran, R.S. Babu, D.J. Yoo, Biopolymer and synthetic polymer-based nanocomposites in wound dressing applications: A review, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13121962>.
- [55] K.M. Zia, S. Tabasum, M.F. Khan, N. Akram, N. Akhter, A. Noreen, M. Zuber, Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review, *Int J Biol Macromol.* 109 (2018) 1068–1087. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099>.
- [56] L. Ge, Y. Xu, X. Li, L. Yuan, H. Tan, D. Li, C. Mu, Fabrication of Antibacterial Collagen-Based Composite Wound Dressing, *ACS Sustain Chem Eng.* 6 (2018) 9153–9166. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01482>.
- [57] X. Xu, Y. Zeng, Z. Chen, Y. Yu, H. Wang, X. Lu, J. Zhao, S. Wang, Chitosan-based multifunctional hydrogel for sequential wound inflammation elimination, infection inhibition, and wound healing, *Int J Biol Macromol.* 235 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123847>.
- [58] P. Trucillo, E. Di Maio, Classification and production of polymeric foams among the systems for wound treatment, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13101608>.
- [59] H. Warren, M. In Het Panhuis, Highly conducting composite hydrogels from gellan gum, PEDOT:PSS and carbon nanofibres, *Synth Met.* 206 (2015) 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2015.05.004>.
- [60] G. Lorenzo, N. Zaritzky, A. Califano, Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.014>.
- [61] Z. Feketshane, S. Alven, B.A. Aderibigbe, Gellan Gum in Wound Dressing Scaffolds, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14194098>.
- [62] T. Osmałek, A. Froelich, S. Tasarek, Application of gellan gum in pharmacy and medicine, *Int J Pharm.* 466 (2014) 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.038>.
- [63] R. Portela, C.R. Leal, P.L. Almeida, R.G. Sobral, Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications, *Microb Biotechnol.* 12 (2019) 586–610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>.

- [64] H.N. Phan, H.M. Bui, N.K. Vu, H.T.K. Trinh, Fabrication of fabric-like Bacterial Cellulose/Collagen membranes by applying textile padding method for wound dressing applications, *Cellulose*. 30 (2023) 2289–2321. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-05003-9>.
- [65] A.F. Cardona, S.E. Wilson, Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment, *Clinical Infectious Diseases*. 61 (2015) S69–S78. <https://doi.org/10.1093/cid/civ528>.
- [66] M. Andonova, V. Urumova, Immune surveillance mechanisms of the skin against the stealth infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa*-Review, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 36 (2013) 433–448. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.03.003>.
- [67] D. Simões, S.P. Miguel, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, A.G. Mendonça, I.J. Correia, Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 127 (2018) 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>.
- [68] Y. Hanakawa, N.M. Schechter, C. Lin, K. Nishifuji, M. Amagai, J.R. Stanley, Enzymatic and Molecular Characteristics of the Efficiency and Specificity of Exfoliative Toxin Cleavage of Desmoglein 1, *Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004) 5268–5277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311087200>.
- [69] B. Bhattacharjee, R. Mukherjee, J. Halder, Biocompatible Hemostatic Sponge Exhibiting Broad-Spectrum Antibacterial Activity, *ACS Biomater Sci Eng*. 8 (2022) 3596–3607. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00410>.
- [70] J.H. Yang, P. Bhargava, D. McCloskey, N. Mao, B.O. Palsson, J.J. Collins, Antibiotic-Induced Changes to the Host Metabolic Environment Inhibit Drug Efficacy and Alter Immune Function, *Cell Host Microbe*. 22 (2017) 757–765.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.020>.
- [71] S. Stankic, S. Suman, F. Haque, J. Vidic, Pure and multi metal oxide nanoparticles: Synthesis, antibacterial and cytotoxic properties, *J Nanobiotechnology*. 14 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0225-6>.
- [72] E.Y. Klein, T.P. Van Boeckel, E.M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S.A. Levin, H. Goossens, R. Laxminarayan, Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115 (2018) E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>.
- [73] B. Özkahraman, Z. Özbaş, G. Bayrak, E. Tamahkar, I. Perçin, A. Kılıç Süloğlu, F. Boran, Characterization and antibacterial activity of gelatin–gellan gum bilayer wound dressing, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 71 (2022) 1240–1251. <https://doi.org/10.1080/00914037.2021.1960341>.

- [74] A.K. Chatterjee, R. Chakraborty, T. Basu, Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles, *Nanotechnology*. 25 (2014). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>.
- [75] H.J. Haugen, S.P. Lyngstadaas, Antibacterial effects of titanium dioxide in wounds, in: *Wound Healing Biomaterials*, Elsevier Inc., 2016: pp. 439–450. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00021-0>.
- [76] M. Hossein Toodehzaeim, H. Zandi, H. Meshkani, A. Hosseinzadeh Firouzabadi, C. Author, Hosseinzadeh Firouzabadi A. The Effect of CuO Nanoparticles on Antimicrobial Effects and Shear Bond Strength of Orthodontic Adhesives, 2018.
- [77] A.J. Noori, F.A. Kareem, The effect of magnesium oxide nanoparticles on the antibacterial and antibiofilm properties of glass-ionomer cement, *Heliyon*. 5 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02568>.
- [78] S. Pasupathy, M. Rajamanickam, SYNTHESIS OF PURE AND BIO MODIFIED CALCIUM OXIDE (CaO) NANOPARTICLES USING WASTE CHICKEN EGG SHELLS AND EVALUATION OF ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY, *Int J Pharm Sci Res*. 10 (2019) 4731. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(10\).4731-37](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(10).4731-37).
- [79] K.R. Raghupathi, R.T. Koodali, A.C. Manna, Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles, *Langmuir*. 27 (2011) 4020–4028. <https://doi.org/10.1021/la104825u>.
- [80] I.M. Sadiq, B. Chowdhury, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles, *Nanomedicine*. 5 (2009) 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.002>.
- [81] G.A. Sotiriou, S.E. Pratsinis, Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material, *Curr Opin Chem Eng*. 1 (2011) 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2011.07.001>.
- [82] G. V. Vimbela, S.M. Ngo, C. Frazee, L. Yang, D.A. Stout, Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials, *Int J Nanomedicine*. 12 (2017) 3941–3965. <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>.
- [83] J. Yang, S. Wang, Polysaccharide-Based Multifunctional Hydrogel Bio-Adhesives for Wound Healing: A Review, *Gels*. 9 (2023). <https://doi.org/10.3390/gels9020138>.
- [84] M. Zhang, C. Zhang, X. Zhai, F. Luo, Y. Du, C. Yan, Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles, *Sci China Mater*. 62 (2019) 1727–1739. <https://doi.org/10.1007/s40843-019-9471-7>.
- [85] I. Kim, K. Viswanathan, G. Kasi, S. Thanakkasaranee, K. Sadeghi, J. Seo, ZnO Nanostructures in Active Antibacterial Food Packaging: Preparation Methods, Antimicrobial Mechanisms, Safety Issues, Future Prospects, and Challenges, *Food*

[86] Y. Li, W. Zhang, J. Niu, Y. Chen, Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano*. 6 (2012) 5164–5173. <https://doi.org/10.1021/nn300934k>.

[87] M. Saliani, R. Jalal, E.K. Goharshadi, Effects of pH and temperature on antibacterial activity of zinc oxide nanofluid against *Escherichia coli* O157: H7 and *staphylococcus aureus*, *Jundishapur J Microbiol*. 8 (2015) 1–6. <https://doi.org/10.5812/jjm.17115>.

[88] C. Mao, Y. Xiang, X. Liu, Z. Cui, X. Yang, K.W.K. Yeung, H. Pan, X. Wang, P.K. Chu, S. Wu, Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO Nanostructures, *ACS Nano*. 11 (2017) 9010–9021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03513>.

[89] R. Sridhar, U.U. Ramanane, M. Rajasimman, ZnO nanoparticles – Synthesis, characterization and its application for phenol removal from synthetic and pharmaceutical industry wastewater, *Environ Nanotechnol Monit Manag*. 10 (2018) 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.09.003>.

[90] S.J. Chang, Y.T. Huang, S.C. Yang, S.M. Kuo, M.W. Lee, In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space, *Carbohydr Polym*. 88 (2012) 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.017>.

[91] K.T. Shalumon, K.H. Anulekha, S. V. Nair, S. V. Nair, K.P. Chennazhi, R. Jayakumar, Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings, *Int J Biol Macromol*. 49 (2011) 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.005>.

[92] M.T. Khorasani, A. Joorabloo, H. Adeli, P.B. Milan, M. Amoupour, Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation, *Int J Biol Macromol*. 166 (2021) 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.142>.

[93] E. Tamahkar, B. Özkahraman, A.K. Süloğlu, N. İdil, I. Perçin, A novel multilayer hydrogel wound dressing for antibiotic release, *J Drug Deliv Sci Technol*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101536>.

[94] S.K. Bajpai, M. Jadaun, S. Tiwari, Synthesis, characterization and antimicrobial applications of zinc oxide nanoparticles loaded gum acacia/poly(SA) hydrogels, *Carbohydr Polym*. 153 (2016) 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.019>.

[95] F. Wahid, H. Bai, F.P. Wang, Y.Y. Xie, Y.W. Zhang, L.Q. Chu, S.R. Jia, C. Zhong, Facile synthesis of bacterial cellulose and polyethyleneimine based hybrid hydrogels for antibacterial applications, *Cellulose*. 27 (2020) 369–383. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02806-1>.

- [96] S.J. Chang, Y.T. Huang, S.C. Yang, S.M. Kuo, M.W. Lee, In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space, *Carbohydr Polym.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.017>.
- [97] A. Kılıç Suloğlu, B. Özkahraman, Z. Özbaş, G. Bayrak, I. Perçin, Y. Kanca, F. Boran, E. Tamahkar, Evaluation of kappa carrageenan and gelatin based sponges for dental applications, *Chemical Papers.* 76 (2022) 4005–4015. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02149-5>.
- [98] P.L. Kang, S.J. Chang, I. Manousakas, C.W. Lee, C.H. Yao, F.H. Lin, S.M. Kuo, Development and assessment of hemostasis chitosan dressings, *Carbohydr Polym.* 85 (2011) 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.015>.
- [99] C. Wang, W. Luo, P. Li, S. Li, Z. Yang, Z. Hu, Y. Liu, N. Ao, Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/*Bletilla striata* polysaccharide composite hemostatic sponges, *Carbohydr Polym.* 174 (2017) 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.112>.
- [100] G. Bayrak, I. Perçin, A. Kılıç Suloğlu, A. Denizli, Amino acid functionalized macroporous gelatin cryogels: Characterization and effects on cell proliferation, *Process Biochemistry.* 110 (2021) 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.002>.
- [101] M. Wojcik, P. Kazimierczak, A. Belcarz, A. Wilczynska, V. Vivcharenko, L. Pajchel, L. Adaszek, A. Przekora, Biocompatible curdlan-based biomaterials loaded with gentamicin and Zn-doped nano-hydroxyapatite as promising dressing materials for the treatment of infected wounds and prevention of surgical site infections, *Biomaterials Advances.* 139 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213006>.
- [102] A. Bal-Öztürk, G. Torkay, N. İdil, B. Özkahraman, Z. Özbaş, Gellan gum/guar gum films incorporated with honey as potential wound dressings, *Polymer Bulletin.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04763-z>.
- [103] D. Liu, L. Liu, L. Yao, X. Peng, Y. Li, T. Jiang, H. Kuang, Synthesis of ZnO nanoparticles using radish root extract for effective wound dressing agents for diabetic foot ulcers in nursing care, *J Drug Deliv Sci Technol.* 55 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101364>.
- [104] Z. Obeizi, H. Benbouzid, S. Ouchenane, D. Yılmaz, M. Culha, M. Bououdina, Biosynthesis of Zinc oxide nanoparticles from essential oil of *Eucalyptus globulus* with antimicrobial and anti-biofilm activities, *Mater Today Commun.* 25 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101553>.
- [105] P. Ramesh, K. Saravanan, P. Manogar, J. Johnson, E. Vinoth, M. Mayakannan, Green synthesis and characterization of biocompatible zinc oxide nanoparticles and evaluation of its antibacterial potential, *Sens Biosensing Res.* 31 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100399>.

- [106] M.K. Debanath, S. Karmakar, Study of blueshift of optical band gap in zinc oxide (ZnO) nanoparticles prepared by low-temperature wet chemical method, *Mater Lett.* 111 (2013) 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.069>.
- [107] H. Agarwal, A. Nakara, S. Menon, V.K. Shanmugam, Eco-friendly synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Cinnamomum Tamala* leaf extract and its promising effect towards the antibacterial activity, *J Drug Deliv Sci Technol.* 53 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101212>.
- [108] H. Chandra, D. Patel, P. Kumari, J.S. Jangwan, S. Yadav, Phyto-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles of *Berberis aristata*: Characterization, antioxidant activity and antibacterial activity with special reference to urinary tract pathogens, *Materials Science and Engineering C.* 102 (2019) 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.035>.
- [109] A.M. Hezma, A. Rajeh, M.A. Mannaa, An insight into the effect of zinc oxide nanoparticles on the structural, thermal, mechanical properties and antimicrobial activity of Cs/PVA composite, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 581 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123821>.
- [110] G. Kamarajan, D.B. Anburaj, V. Porkalai, A. Muthuvel, G. Nedunchezian, Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extract and their photocatalyst degradation and antibacterial activity, *Journal of the Indian Chemical Society.* 99 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100695>.
- [111] S.G. Ali, M.A. Ansari, M.A. Alzohairy, M.N. Alomary, M. Jalal, S. Alyahya, S.M.M. Asiri, H.M. Khan, Effect of biosynthesized zno nanoparticles on multi-drug resistant *pseudomonas aeruginosa*, *Antibiotics.* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050260>.
- [112] K. Singh, J. Singh, M. Rawat, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Punica Granatum* leaf extract and its application towards photocatalytic degradation of Coomassie brilliant blue R-250 dye, *SN Appl Sci.* 1 (2019). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0610-5>.
- [113] J. Liu, N.A. Ismail, M. Yusoff, M.H. Razali, Physicochemical Properties and Antibacterial Activity of Gellan Gum Incorporating Zinc Oxide/Carbon Nanotubes Bionanocomposite Film for Wound Healing, *Bioinorg Chem Appl.* 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/3158404>.
- [114] S. Malathi, P. Balashanmugam, T. Devasena, S.N. Kalkura, Enhanced antibacterial activity and wound healing by a novel collagen blended ZnO nanoparticles embedded niosome nanocomposites, *J Drug Deliv Sci Technol.* 63 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102498>.
- [115] N.A. Ismail, K.A. Mat Amin, M.H. Razali, Novel gellan gum incorporated TiO₂ nanotubes film for skin tissue engineering, *Mater Lett.* 228 (2018) 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.05.140>.

- [116] R. Monfared-Hajishirkiaee, H. Ehtesabi, S. Najafinobar, Z. Masoumian, Multifunctional chitosan/carbon dots/sodium alginate/zinc oxide double-layer sponge hydrogel with high antibacterial, mechanical and hemostatic properties, *OpenNano*. 12 (2023) 100162. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100162>.
- [117] A. Bal-Ozturk, O. Karal-Yilmaz, Z.P. Akguner, S. Aksu, A. Tas, H. Olmez, Sponge-like chitosan-based nanostructured antibacterial material as a topical hemostat, *J Appl Polym Sci*. 136 (2019). <https://doi.org/10.1002/app.47522>.
- [118] A.A. Aly, M.K. Ahmed, Nanofibers of cellulose acetate containing ZnO nanoparticles/graphene oxide for wound healing applications, *Int J Pharm*. 598 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120325>.
- [119] H. Izgis, E. Ilhan, C. Kalkandelen, E. Celen, M.M. Guncu, H. Turkoglu Sasmazel, O. Gunduz, D. Fikai, A. Fikai, G. Constantinescu, Manufacturing of Zinc Oxide Nanoparticle (ZnO NP)-Loaded Polyvinyl Alcohol (PVA) Nanostructured Mats Using Ginger Extract for Tissue Engineering Applications, *Nanomaterials*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12173040>.
- [120] S. Tantiwatcharothai, J. Prachayawarakorn, Property improvement of antibacterial wound dressing from basil seed (*O. basilicum* L.) mucilage- ZnO nanocomposite by borax crosslinking, *Carbohydr Polym*. 227 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115360>.
- [121] J. Ranjbar, M. Koosha, H. Chi, A. Ghasemi, F. Zare, M.A. Abdollahifar, M. Darvishi, T. Li, Novel chitosan/gelatin/oxidized cellulose sponges as absorbable hemostatic agents, *Cellulose*. 28 (2021) 3663–3675. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03699-9>.
- [122] Y. Huang, X. Zhao, Z. Zhang, Y. Liang, Z. Yin, B. Chen, L. Bai, Y. Han, B. Guo, Degradable Gelatin-Based IPN Cryogel Hemostat for Rapidly Stopping Deep Noncompressible Hemorrhage and Simultaneously Improving Wound Healing, *Chemistry of Materials*. 32 (2020) 6595–6610. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c02030>.
- [123] C. Lv, X. Zhou, P. Wang, J. Li, Z. Wu, Z. Jiao, M. Guo, Z. Wang, Y. Wang, L. Wang, P. Zhang, Biodegradable alginate-based sponge with antibacterial and shape memory properties for penetrating wound hemostasis, *Compos B Eng*. 247 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.110263>.
- [124] A.S. Soubhagya, A. Moorthi, M. Prabakaran, Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing, *Int J Biol Macromol*. 157 (2020) 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.156>.
- [125] B. Rukmanikrishnan, F.R.M. Ismail, R.K. Manoharan, S.S. Kim, J. Lee, Blends of gellan gum/xanthan gum/zinc oxide based nanocomposites for packaging application: Rheological and antimicrobial properties, *Int J Biol Macromol*. 148 (2020) 1182–1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.155>.

- [126] F. Naserian, A.S. Mesgar, Development of antibacterial and superabsorbent wound composite sponges containing carboxymethyl cellulose/gelatin/Cu-doped ZnO nanoparticles, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 218 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112729>.
- [127] M. Kaushik, R. Niranjana, R. Thangam, B. Madhan, V. Pandiyarasan, C. Ramachandran, D.H. Oh, G.D. Venkatasubbu, Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles, *Appl Surf Sci*. 479 (2019) 1169–1177. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.02.189>.
- [128] Y. Jin, C. Wang, Z. Xia, P. Niu, Y. Li, W. Miao, Photodynamic chitosan sponges with dual instant and enduring bactericidal potency for treating skin abscesses, *Carbohydr Polym*. 306 (2023) 120589. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.120589>.
- [129] A.A. Shefa, M. Taz, M. Hossain, Y.S. Kim, S.Y. Lee, B.T. Lee, Investigation of efficiency of a novel, zinc oxide loaded TEMPO-oxidized cellulose nanofiber based hemostat for topical bleeding, *Int J Biol Macromol*. 126 (2019) 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.079>.
- [130] J. Cai, J. Guo, S. Wang, Application of Polymer Hydrogels in the Prevention of Postoperative Adhesion: A Review, *Gels*. 9 (2023). <https://doi.org/10.3390/gels9020098>.
- [131] S. Park, S.-I. Kim, J.-H. Choi, S.-E. Kim, S.-H. Choe, Y. Son, T. Kang, J.-E. Song, G. Khang, Evaluation of Silk Fibroin/Gellan Gum Hydrogels with Controlled Molecular Weight through Silk Fibroin Hydrolysis for Tissue Engineering Application, *Molecules*. 28 (2023) 5222. <https://doi.org/10.3390/molecules28135222>.
- [132] J. Silva-Correia, B. Zavan, V. Vindigni, T.H. Silva, J.M. Oliveira, G. Abatangelo, R.L. Reis, Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study, *Adv Healthc Mater*. 2 (2013) 568–575. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200256>.
- [133] J. Lu, X. Fan, J. Hu, J. Li, J. Rong, W. Wang, Y. Chen, W. Liu, J. Chen, Y. Chen, Construction and function of robust and moist bilayer chitosan-based hydrogel wound dressing, *Mater Des*. 226 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111604>.
- [134] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, N. Daskalakis, L. Jeuken, M. Povey, A.J. O'Neill, D.W. York, Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*, *Journal of Nanoparticle Research*. 12 (2010) 1625–1636. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9711-1>.