

AKUT DERİ YARALARI İÇİN BİTKİ TÜREVLİ ÇOK FONKSİYONLU KRİYOJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF PLANT BASED MULTIFUNCTIONAL CRYOGELS FOR ACUTE SKIN WOUNDS

SİMGE VARLIK

PROF. DR. IŞIK PERÇİN DEMİRÇELİK

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır

2023

ÖZET

AKUT DERİ YARALARI İÇİN BİTKİ TÜREVLİ ÇOK FONKSİYONLU KRİYOJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Simge VARLIK

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Haziran 2023, 148 sayfa

Günümüzde kriyojeller, birçok alanda kullanım alanı bulabilen polimer malzemeler olarak kullanılmaktadır. Doğal malzemelerle yapısal olarak desteklenen kriyojeller yara iyileşmesi, doku iskeleti, ilaç salımı gibi birçok alanda destekleyici bir tedavi uygulaması olabilmektedir. Bu doktora çalışmasında, *Melaleuca alternifolia* yağı metabolitlerinin teröpotik etkilerinden faydalanmak amacıyla bitki türevli bir kriyojel hazırlanması, bu bitki türevli kriyojelin olay anında hızlı ve etkili müdahalede kullanılması, akut yara iyileştirici, antibakteriyel özellikte ve kanama durdurucu özelliği ile literature kazandırılması istenmektedir. Bu amaçla jelatin ve aljinat içeren biyoyumlu kriyojeller hazırlanmıştır ve bu kriyojellerin çay ağacı yağı ilave edilerek antibakteriyel özelliğinin artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sentezlenen kriyojeller FTIR, şişme testleri, SEM ve TGA ile karakterize edilmişlerdir. Kriyojellerin içeriğine eklenen çay ağacı yağının yapıya katılması GC-MS/HS ile belirlenmiştir. Ayrıca kriyojellerden çay ağacı yağının kümülatif salımı ve kriyojellerin degradasyonları değerlendirilmiştir. Elde edilen kriyojellerin biyoyumlulukları *in vitro* ortamda HaCaT (İnsan Keratinosit Hücre hattı)

hücreleri ile indirekt MTT testi yaparak belirlenmiştir. Çalışma sonunda, çay ağacı yağının aljinat ve jelatin kriyojellere başarılı bir şekilde yüklendiği ve antibakteriyel etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek antibakteriyel etkinlik % 90 oranında TTO100-ACry kriyojelde görülmüştür. Tüm kriyojellerin biyouyumlu olduğu gözlemlenmiş, jelatin grupları içinde hücre canlılığı en yüksek olan grup olan TTO0-GCry olup oranı 24 sa için % 146,2; 48 sa için %151,4 olmuştur. Aljinat gruplarında 24 sa için %100,0; 48 sa için %106,0 ile TTO100-ACry kriyojel en yüksek hücre canlılığı oranına sahip olmuştur. Çizik testi sonuçlarına göre tüm gruplarda en yüksek yara iyileşmesi 24 sa için en yüksek yara iyileşmesi %45,7 ile TTO0-GCry kriyojelde, 48 sa için %51,9 ile TTO100-ACry kriyojelde görülmüştür. Kan absorpsiyon analizlerine göre hızlı müdahalede hemostatik etkinliğe sahip olarak kullanılmaya en uygun aday ilk 15 dk için %94,1 ile TTO100-ACry olmuştur. Doğal kaynaklarla desteklenen kriyojelin yara iyileşmesinde, olay anında hızlı ve etkili bir kan durdurucu olarak kullanılabileceği ve buna bağlı çalışmalar için öncü bir yaklaşım olarak değerlendirilebileceği söylenebilir. Bu tezde uygulanması planlanan yöntem, kullanılan materyal de dahil olmak üzere tez konusu literatür için özgün değer taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kriyojel, çay ağacı yağı, jelatin, aljinat, yara iyileştirme, kan durdurucu

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PLANT BASED MULTIFUNCTIONAL CRYOGELS FOR ACUTE SKIN WOUNDS

Simge VARLIK

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

June 2023, 148 pages

Cryogels, today, are polymer materials that can find applications in various fields. Cryogels supported structurally by natural materials can serve as a supportive treatment modality in many areas such as wound healing, tissue scaffolding, and drug delivery. The aim of this doctoral study is to prepare a plant-derived cryogel utilizing the therapeutic effects of *Melaleuca alternifolia* oil metabolites and to use this plant-derived cryogel for rapid and effective intervention during incidents. For this purpose, biocompatible cryogels containing gelatin and alginate were prepared, and the aim was to enhance their antibacterial properties by incorporating tea tree oil into these cryogels. The synthesized cryogels were characterized using FTIR, swelling tests, SEM, and TGA. The incorporation of tea tree oil into the cryogel matrix was determined using GC-MS/HS. Additionally, the cumulative release of tea tree oil from the cryogels and the degradation of the cryogels were evaluated. The biocompatibility of the obtained cryogels was determined in vitro using HaCaT (Human Keratinocyte Cell Line) cells through an indirect MTT assay. At the end of the study, it was observed that tea tree oil was

successfully loaded into alginate and gelatin cryogels, and its antibacterial activity was enhanced. The highest antibacterial activity was observed in the TTO100-ACry cryogel with a rate of 90,00 %. All cryogels were observed to be biocompatible, and among the gelatin groups, the TTO0-GCry group exhibited the highest cell viability with percentages of 146,2 % at 24 h and 151,4 % at 48 h. Among the alginate groups, the TTO100-ACry cryogel showed the highest cell viability with percentages of 100,0 % at 24 h and 106,0 % at 48 h. According to the scratch test results, the highest wound healing at 24 h was observed in the TTO0-GCry cryogel with 45,71 %. The highest wound healing was observed in the TTO100-ACry cryogel with 51,90 % at 48 h. According to the clotting analysis, the most suitable candidate for use as a rapid hemostatic agent in early intervention was TTO100-ACry with a percentage of 94,10% for the first 15 min. The cryogel supported by natural resources can be considered as a fast and effective hemostatic agent for wound healing, making it a pioneering approach for related studies. The methodology applied in this thesis, including the materials used, carries original value for the literature.

Keywords: Cryogel, tea tree oil, gelatin, alginate, wound healing, hemostatic

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin tüm süreçlerinde gösterdiği destek ve rehberlik için, bilgi ve deneyimleri sayesinde tez çalışmamın her aşamasında büyük bir ilerleme kaydedebildiğim tez danışmanım Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK'e içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Deneysel süreçlerimde yardımını asla esirgemeyen ve manevi olarak da bana büyük destek sağlayan Gülsen BAYRAK'a teşekkür ediyorum. Laboratuvar çalışma arkadaşım Başak KURİN ATASOYU'na deney süreçlerimdeki destekleri için teşekkür ediyorum.

Hücre Biyolojisi labındaki çalışmalarımda deneyimi ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU ve Selen ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Tez izleme sürecime yönlendirici destek sağlayan, önerileriyle tezimi geliştirmeme yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT'e ve Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneysel süreçlerimde laboratuvar ve cihazları tez çalışmam için kullanmamı sağlayan Polis Akademisi Adli Bilimler Enstitüsü'ne teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Tezimin tüm süreçlerinde manevi desteğini asla eksik etmeyen, bana her zaman inanan arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Merve Reyhan BAYGELDİ ve Dr. Öğr. Üyesi Orhan ÇİFÇİ'ye içten teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Tez sürecimde yardımını asla eksik etmeyen, her zaman yanımda olan kardeşim Gözde VAROL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

İşin içinden çıkamadığım zamanlarda her zaman sırtımı yaslayabildiğim eşim Murat VARLIK'a büyük teşekkürlerimi iletmek istiyorum. Doğduğundan beri bana yaşama ve ilerleme gücü veren kızım Arya VARLIK'ı sevgiyle kucaklıyorum.

Her koşulda yanımda duracağını bildiğim aileme içten teşekkürlerimi iletmek istiyorum. Bunun dışında kalan ve tezime katkı sağlayan herkese değerli katkıları, destekleri ve inancı için en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Polimer ve Polimer Çeşitleri.....	4
2.2. Hidrojeller.....	6
2.2.1. Hidrojellerin Tarihçesi.....	8
2.2.2. Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	9
2.2.3. Hidrojellerin Oluşturulması.....	12
2.2.4. Krijojeller, Elde Edilişi ve Kullanım Alanları.....	16
2.2.4.1. Krijojeller.....	16
2.2.4.2. Krijojellerin Elde Edilişi.....	18
2.2.4.3. Krijojellerin Kullanım Alanları	22
2.3. Hidrojel ve Kriyojel Polimerizasyonunda Kullanılan Doğal Malzemeler.....	24
2.3.1. Kollajen	24
2.3.2. Jelatin.....	25
2.3.3. Aljinat	26
2.3.4. Kitosan.....	28
2.3.5. Bitki Ekstratları ve Yağları.....	29
2.3.5.1. Çay Ağacı (<i>Melaleuca alternifolia</i>) Yağı ve Özellikleri	29
2.4. Yaralanma ve Yara Çeşitleri.....	30
2.4.1. Yara Tanımı ve Yara İyileşme Süreçleri	31

2.4.2. Yara Çeşitleri.....	32
2.4.2.1. Akut Yara	32
2.4.2.2. Kronik Yara	33
2.4.3. Yara Bakımında Yara Örtüleri ve Acil Müdahalede Kullanımı.....	36
2.5. Yara İyileşmesinde Bitki Bazlı Yara Örtüsü Çalışmaları	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	41
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	41
3.2. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması	41
3.2.1. TTO-GCry Kriyojellerin Hazırlanması	42
3.2.2. TTO-ACry Kriyojellerin Hazırlanması	44
3.3. TTO-GCry ve TTO-ACry Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	46
3.3.1. Şişme Deneylerinin Yapılması	46
3.3.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi/Headspace (GC-MS/HS) Analizinin Yapılması	47
3.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi ile Kriyojellerin Yapı Analizi	48
3.3.4. Termogravimetrik Analizinin Yapılması (TGA).....	48
3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi.....	49
3.4. Salım Analizinin Yapılması.....	49
3.4.1. Kinetik Modeller	51
3.5. <i>In vitro</i> Degradasyon Analizi.....	53
3.6. Antibakteriyel Deneyler.....	53
3.6.1. Koloni Oluşturan Ünite Deneyi (CFU)	53
3.6.2. UV-VIS Spektrofotometre Ölçümü.....	54
3.7. <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	55
3.7.1. MTT Hücre Testinin Yapılması	55
3.7.2. <i>In Vitro</i> Çizik Testinin Yapılması	56
3.8. Hemostatik Aktivite ve Kan Absorbsiyon Deneyleri	57
3.9. İstatistiksel Analiz.....	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
4.1. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Sentezlenmesi	59
4.1.1. PHEMA Kriyojelin Sentezlenmesi.....	59

4.1.2. TTO-GCry Kriyojellerin Sentezlenmesi	59
4.1.3. TTO-ACry Kriyojellerin Sentezlenmesi	60
4.2. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Karakterizasyonu	63
4.2.1. Şişme Deneyleri.....	63
4.2.2. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) Headspace Analizi..	68
4.2.3. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektrometresi ile Kriyojellerin Yapı Analizinin Yapılması.....	70
4.2.3.1. TTO-GCry Kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizinin Yapılması	70
4.2.3.2. TTO-ACry Kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizinin Yapılması	75
4.2.4. Termogravimetrik Analizi (TGA)	79
4.2.4.1. TTO100-GCry Kriyojel Termogravimetrik Analizi (TGA).....	79
4.2.4.2. TTO100-ACry Kriyojel Termogravimetrik Analizi (TGA).....	81
4.2.5. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Görüntü Analizi	82
4.3. Kümülatif Salım Analizi.....	86
4.3.1. Kümülatif Salım Kinetik Modellerinin Uygulanması	88
4.4. <i>In vitro</i> Degradasyon Analizi.....	90
4.5. Antibakteriyel Çalışmalarının Değerlendirilmesi	93
4.6. <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	97
4.6.1. MTT Hücre Testi Değerlendirmesi	97
4.6.2. <i>In vitro</i> Çizik Testi Değerlendirmesi.....	101
4.7. Hemostatik Aktivite ve Kan Absorbsiyon Deneyleri Değerlendirmesi.....	104
5. YORUM.....	112
7. KAYNAKLAR	115
EKLER.....	125
EK 1 – TTO100-GCry ve TTO100-ACry için Termogravimetrik Analiz (TGA) Grafiği, ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) karşılaştırması.....	125
EK 2 – Tez Orijinallik Raporu.....	126
ÖZGEÇMİŞ	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Polimer jellerin bazı ayırt edici özellikleri	6
Şekil 2.2. Kimyasal ve fiziksel hidrojel oluşumu (Chirani ve ark., 2016).....	16
Şekil 2.3. Kriyojelleşmenin aşamaları (dondurma, çözündürme ve kurutma sonrası SEM görüntüsü)	21
Şekil 2.4. Kollajenin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.5. Jelatin α -zincirinin bir parçasının örnek kimyasal yapısı	26
Şekil 2.6. Sodyum aljinatın elde edilme süreci.....	27
Şekil 2.7. Aljinatı oluşturan kimyasal birimler (guluronik asit (G) ve mannuronik asit (M) blokları ve MGM Bloğu)	28
Şekil 2.8. ISO/FDIS 4730:2004 standartlarına göre çay ağacı yağında bulunan bileşenlerin kimyasal formülleri.....	30
Şekil 2.9. Akut ve kronik yaralanma ve yara iyileşmesinin genel mekanizmaları, a)akut yara iyileşmesi mekanizması, b) kronik yara iyileşmesi mekanizması..	34
Şekil 3.1. TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve genel çalışmaların özeti	43
Şekil 3.2. Kriyojellerin genel sentez aşamaları, a) polimer solüsyonun hazırlanması, b) -18 °C’de muhafaza edilmek üzere hazırlanan cam yüzeylerin üstten görünüşü, c) cam yüzeylerin önden görünüşü, d) oda sıcaklığına getirilmiş kriyojel, e) yıkama sonrası kriyojelin genel görünüşü	45
Şekil 3.3. <i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları, a) HaCat hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü, b) MTT hücre testinin uygulanması	55
Şekil 4.1. PHEMA kriyojel (jelatin, aljinat ve TTO içermeyen).....	59
Şekil 4.2. TTO GCry kriyojel grupları (sırasıyla, 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren jelatin- kriyojeller).....	60
Şekil 4.3. TTO-ACry kriyojel grupları (sırasıyla, 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren aljinat-kriyojeller).....	61
Şekil 4.4. Sentezlenen kriyojellerden alınan dairesel kesitlerin karşılaştırılması, a) PHEMA kriyojel (TTO, jelatin veya aljinat içermeyen kontrol grubu), b) Aljinat-kriyojel (ACry) c) Jelatin-kriyojel (GCry).....	61

Şekil 4.5. Kriyojel gruplarının her birinden alınan örnekler (TTO0,TTO25, TTO50, TTO 100 GCry ve ACry grupları, 8mm çapında)	62
Şekil 4.6. TTO-GCry gruplarının jelleşme verimi karşılaştırılması (%)	65
Şekil 4.7. TTO-GCry gruplarının şişme oranı karşılaştırılması (%).....	65
Şekil 4.8. TTO-GCry gruplarının makrogözenek miktarı karşılaştırması (%)	65
Şekil 4.9. TTO-ACry gruplarının jelleşme verimi karşılaştırılması (%)	66
Şekil 4.10. TTO-ACry gruplarının şişme oranları karşılaştırması (%).....	67
Şekil 4.11. TTO-ACry gruplarının makrogözenek miktarı karşılaştırması (%)	68
Şekil 4.12. TTO- GCMS-Headspace Kriyojel Kütle Spektrometresi (TTO25-GCry için ana bileşeni olan terpinen-4-ol'ün pik değeri), a. Kriyojel kütle/zaman spektrumu (terpinen-4-ol'ün pik değeri) b. kütle-zaman, m/z spektrumu, terpinen-4-ol'ün iyon kromatogramı	70
Şekil 4.13. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kriyojellerin spektrumları, (400-4000 cm ⁻¹ , FT/IR-6600 tip A (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren TTO GCry kriyojeller).....	71
Şekil 4.14. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile PHEMA kriyojel ve gelPHEMA (GCry) kriyojel spektrumları amid I, amid II ve amid III bantları karşılaştırması	72
Şekil 4.15. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (400-4000 cm ⁻¹ , FT/IR-6600 tip A) ile TTO-GCry kriyojellerinin karşılaştırmalı spektrumları, farklı miktarlarda (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren tüm kriyojellerin karşılaştırma spektrumları	73
Şekil 4.16. TTO ve farklı miktarlarda (0,25,50,100 µl) çay ağacı yağı içeren kriyojellerin karşılaştırmalı spektrumları.....	74
Şekil 4.17. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kriyojellerin spektrumları, (400-4000 cm ⁻¹ , FT/IR-6600 tip A (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren TTO-ACry kriyojeller).....	75
Şekil 4.18. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile PHEMA kriyojel ve ACry kriyojel spektrumları CH ₂ esnemesi, üronik asit ve manuronik asit bantları karşılaştırması	76
Şekil 4.19. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (400-4000 cm ⁻¹ , FT/IR-6600 tip A) ile TTO ACry kriyojellerinin karşılaştırmalı spektrumları, farklı miktarlarda (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren tüm kriyojellerin karşılaştırma spektrumları	77

Şekil 4.20. TTO ve farklı miktarlarda (0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren ACry kriyojellerin karşılaştırmalı spektrumları.....	78
Şekil 4.21. TTO100-GCry kriyojel termogravimetrik analizi (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi (oda sıcaklığından 900 °C'ye 10 °C/dak), a. ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının TGA karşılaştırılması, b. ısı akışı (mW) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının DSC karşılaştırılması	80
Şekil 4.22. TTO100-ACry kriyojel termogravimetrik analizi (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi (oda sıcaklığından 900 °C'ye 10 °C/dak), a. ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının TGA karşılaştırılması, b. ısı akışı (mW) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının DSC karşılaştırılması	82
Şekil 4.23. PHEMA, çay ağacı yağı içermeyen TTO 0 GCry ve çay ağacı yağı içeren TTO 100 GCry (100 µl) kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a-b) TTO0 GCry (TTO içermeyen kriyojel), a. 500 X, bar 100µm, b. 1000 X, bar 50 µm, c-d) TTO100 GCry (100 µl TTO içeren kriyojel) c. 500 X, bar 100µm, d. 1000 X, bar 50 µm, e-f) Kontrol-PHEMA kriyojel (jelatin veya TTO içermeyen kriyojel), e. 500 X, bar 100µm, f. 1000 X, bar 50 µm	84
Şekil 4.24. PHEMA, çay ağacı yağı içermeyen TTO 0 ACry ve çay ağacı yağı içeren TTO 100 ACry (100 µl) kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a-b) TTO0 ACry (TTO içermeyen kriyojel), a. 500 X, bar 100µm, b. 1000 X, bar 50 µm, c-d) TTO100 ACry (100 µl TTO içeren kriyojel) c. 500 X, bar 100µm, d. 1000 X, bar 50 µm, e-f) Kontrol-PHEMA kriyojel (aljinat veya TTO içermeyen kriyojel), e. 500 X, bar 100µm, f. 1000 X, bar 50 µm	85
Şekil 4.25. Kriyojel standart kalibrasyon grafiği, absorbans (267 nm) ve konsantrasyon (µg/ml) karşılaştırması (Phyton 3.0, $p \leq 0,05$).....	87
Şekil 4.26. Kriyojellerin zamana bağlı kümülatif salım oranı (%).....	88
Şekil 4.27. Seri seyreltme metodu ile elde edilen bakteri (<i>E.coli</i> -EC ve <i>S. aureus</i> -SA) içeren agar plak örneklerinde (10^{-9}) çay ağacı yağının (TTO) kontrol grubuna kıyasla antibakteriyel etkisi (5µl/900µl).....	93
Şekil 4.28. Seri seyreltme metodu ile elde edilen bakteri grupları(<i>E.coli</i> ve <i>S.aureus</i>) ve kriyojel grupları koloni oluşumu, agar plak örnekleri	94
Şekil 4.29. TTO-GCry grupları EC(<i>E.coli</i>) ve SA(<i>S.aureus</i>) koloni sayımı (10^{10} cfu/ml) ve 620 nm absorbans değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi.....	95

Şekil 4.30. TTO ACry grupları EC(<i>E.coli</i>) ve SA(<i>S.aureus</i>) koloni sayımı (10^{10} cfu/ml) ve 620 nm absorbans değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi.....	96
Şekil 4.31. MTT Genel Analizi 3B tüm kriyojel grupları ve 2B saf çay ağacı yağı ile HaCaT hücre hattı kontrol grubu için % hücre canlılığı karşılaştırması	98
Şekil 4.32. MTT testi sonuçlarına göre 24 ve 48 sa için jelatin veya TTO içermeyen PHEMA kriyojel kontrol grubu ile TTO GCry kriyojellerinin hücre canlılığı karşılaştırması (% , sırasıyla kontrol, 0, 25, 50, 100 µl içeren kriyojeller, %95 güven düzeyinde $p<0,05$ değerinde, 24 sa "x" ve 48 sa "y" olarak anlamlı kabul edilmiştir)	99
Şekil 4.33. MTT testi sonuçlarına göre 24 ve 48 sa için jelatin veya TTO içermeyen PHEMA kriyojel kontrol grubu ile TTO ACry kriyojellerinin hücre canlılığı karşılaştırması (% , sırasıyla kontrol, 0, 25, 50, 100 µl içeren kriyojeller, %95 güven düzeyinde $p<0,05$ değerinde, 24 sa "x" ve 48 sa "y" olarak anlamlı kabul edilmiştir)	100
Şekil 4.34. Kriyojel grupları ve kontrol grubu için inkübasyon sürelerine göre (24 sa ve 48 sa) Yara kapanma yüzdesi (%) karşılaştırması	102
Şekil 4.35. Kriyojel grupları ve kontrol grubu yara (çizik) modelleri ışık mikroskopunda, başlangıç 24, 48 sa için HaCaT hücreleri yara kapanma görüntüsü.....	104
Şekil 4.36. Kriyojel grupları ve ticari ürün için 20 ml %0,9 salin solüsyonu içinde kan örnekleri pıhtılaşma analizi (sırasıyla PHEMA, TTO0-GCry, TTO100-GCry, TTO0-ACry, TTO100-ACry, ticari ürün, her biri için 250 µl insan kanı)	107
Şekil 4.37. Boş ve insan kanı emdirilmiş, eritrosit hücreleri fikse edilmiş PHEMA, TTO 0 GCry ve TTO 100 GCry kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş PHEMA kriyojel (1000 X, bar 50 µm), b) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 GCry kriyojel (1000 X, bar 50 µm), c) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO100 GCry kriyojel (1000 X, bar 50 µm)	109

Şekil 4.38. Boş ve insan kanı emdirilmiş, eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 ACry ve TTO100 ACry kriyojellerin ve ticari ürünün SEM görüntüleri karşılaştırması, a) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 ACry kriyojel (1000 X, bar 50 µm), b) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO100 ACry kriyojel (1000 X, bar 50 µm), c) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş kan durdurucu ticari ürün (sırasıyla, boş,250x, bar 200 µm,eritrosit fikse edilmiş, 500x, bar 100 µm) 110



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	12
Çizelge 2.2. Hidrojel Geliştirilmesi için Sentez Parametreleri.....	14
Çizelge 2.3. Kriyojelin oluşum sürecinde değiştirilebilir parametreler ve ortaya çıkan etkileri	22
Çizelge 4.1. Kriyojel gruplarının sentezinde kullanılan toplam monomer miktarı (%),gr/ml), yağ miktarı (µl), Kriyojelin polimer çözeltisindeki yağ konsantrasyonu (mg/ml) ve sentezlenen kriyojelin formu	63
Çizelge 4.2. Kriyojel tiplerine bağlı jelleşme verimi (%), şişme oranı (%) ve makrogözenek derecesi(%)	64
Çizelge 4.3. ISO/FDIS 4730:2004 standartlarına göre çalışmada kullanılan çay ağacı yağı bileşenlerinin minimum/maksimum (%) değerleri ve çalışmada kullanılan çay ağacı yağı yüzde aralığı (%)	69
Çizelge 4.4. Kriyojelleri Zamana Bağlı Kümülatif Salım Yüzde (%) Karşılığı.....	88
Çizelge 4.5. Kümülatif salım kinetik modelleri kriyojel sonuçları.....	90
Çizelge 4.6. Kriyojellerin zamana bağlı <i>in vitro</i> degradasyon analizi sonuçları, 1,7, 14, 21, 28. gün ağırlıkları (g), 1, 7, 14, 21, 28 gün toplam ağırlık kayıpları (%).....	92
Çizelge 4.7. Tüm gruplarının <i>E .coli</i> ve <i>S. aureus</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği(%).....	95
Çizelge 4.8. Kriyojel Grupları 24 sa ve 48 sa için Hücre Canlılığı Yüzde Değerleri (%).....	99
Çizelge 4.9. Kriyojellerin 24-48 sa aralığı için canlılık ve yara kapanma değişim değerleri (%).....	103
Çizelge 4.10. Kriyojel grupları ve ticari ürüne bağlı kan absorpsiyon yüzde oranları (% , UV-Spektrofotometre, 540 nm).....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
cfu	koloni oluşum birimi
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
M0	Başlangıçtaki kuru ağırlık
Mf	Düzenli zaman aralıklarında ölçülen son kuru ağırlık
Q	Salınan ilaç miktarı (µg)
Q0	Başlangıçta salınan ilaç miktarı
Qt/Q∞	Salınan ilaç miktarının toplam ilaç miktarı
k	Salım kinetik sabiti
t	Zaman, salınım süresi
T0	Çizik oluşturulduğu zamanki yara alanı
Tx	Herhangi bir zaman noktasındaki yara alanı

Kısaltmalar

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
ECM	Extracellular Matrix
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-MS/HS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi/Headspace
HMDS	Hexamethyldisilazan
HUNITEK	Hacettepe Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma-Uygulama Merkezi
İTS	İlaç Taşıyıcı Sistemleri
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PEGDA	Polietilen Glikol Diakrilat

PHEMA	Polihidroksietil Metakrilat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen diamin
TGA	Termogravimetrik Analiz
TTO	Tea Tree Oil
UV-VIS	Ultraviyole-Visible Spektroskopisi



1. GİRİŞ

Günümüzde polimer malzemelerin birçok alanda kullanıldığı görülmektedir. Bu yeni nesil malzemelerden daha fazla alanda yararlanabilmek için kullanım alanına göre kullanışlı ve benzersiz özellikler göstermesi gereklidir. Bu özelliklere sahip olan, şişirme ajanı ve ağ bileşeninden oluşan bu jellerin doku mühendisliği alanında, medikal uygulamalarda teröpotik uygulama gerektiren alanlarda kullanımı oldukça yaygın görülmektedir (Memic ve ark., 2019).

Jel adı verilen polimerik malzemeler, makromoleküller tarafından üç boyutlu ağ oluşturularak meydana gelen polimer immobilize eden çözücü sistemlerdir (Lozinsky ve ark., 2003). Jel kullanımında ise hidrojel avajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Hidrojel, birçok alanda üç boyutlu, çözünmeyen, çapraz bağı ve doku benzeri özellikler gösteren, çok fazla miktarda su ve biyolojik sıvı tutabilme kapasitesine sahip olan malzemeler olarak kullanılmaktadır (Sharma ve Tiwari, 2020). Hidrojel, ağ bileşeni hidrofilik polimer bir malzeme ve şişirme maddesi su olan jeldir (Memic ve ark., 2019).

Hidrojel gıda, ilaç, tıp, mühendislik, adli uygulamalar ve tarımda kullanım alanı bulan çok yönlü malzemelerdir. Çok işlevli hidrojel tasarım, çevresel iyileştirme, algılama, ilaç salımı, biyotıp ile ilgili mevcut ve gelecekteki zorlukların üstesinden gelmek amacıyla ortaya çıkmaktadır. Kullanım alanları ve polimer yapısı itibarıyla çeşitlilik göstermektedirler.(Sharma ve Tiwari, 2020). Üç boyutlu mikro yapıları birçok alanda kurtarıcı bir rol oynamaktadır, çünkü bu mikro yapı hücre dışı matrislerin stabilizasyonundan sorumludur. Polimerik hidrojel yumuşak doku benzeri elastik, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak karşılaştırılabilir özelliklere sahiptir (Suzuki ve ark., 1993; Zhai ve ark., 2002; Sharma ve Tiwari, 2020).

Hidrojel, polisakkaritler (selüloz, nişasta, pektin, aljinat, kitosan), proteinler (jelatin, ipek fibroin, yumurta albümini, kazein) ve lipidler (bitkisel yağ, yağ asitleri) gibi çok çeşitli doğal malzemelerle destekleyip, kullanım alanına göre, dayanıklılığı ve işlevselliğini arttırmak mümkündür. (Ajday ve ark.,2020).

Hidrojel içeriğindeki malzeme çeşitliliği kadar, elde edilğinde kullanılan yöntemler de farklılık arz edebilir. Sınıflandırma şekilleri açısından çok zengin bir kullanım olanağı sağlamaktadırlar. Daha detaylı sınıflandırılacağı üzere, hidrojel hazırlanma yoluna ve

fiziksel özelliklerine göre sınıflandırılabilir. (Sharma ve Tiwari, 2020). Bu doktora tez çalışmasında kullanılan ve bu sınıflandırmaya göre elde edilen hidrojel türlerinden biri de kriyojellerdir. Bir jel çeşidi olan kriyojeller diğer bilinen jellerin aksine soğuk ortamda polimerleşen malzemelerdir (Lozinsky ve ark., 2003). Suyla dolu bir polimer ağ yapısına sahip olan hidrojeller, tıbbi kullanım açısından yara eksüdalarını emmek ve oluşabilecek yeni enfeksiyonlara karşı bir dış doku ile koruyuculuk sağlamak açısından kullanılmaktadır (Catanzano ve ark., 2015). Aynı şekilde polimerleşme aşamasında farklı bir faz ile yeni özellik kazandırılan kriyojeller bu amaçla kullanılma konusunda ekstra bir avantaja sahip olmuştur. Bu sebeple aynı sınıftan olmalarına rağmen hidrojeller ve kriyojeller arasında bu iki malzemeyi birbirinden ayıran farklar mevcuttur (Memic ve ark., 2019).

Son yıllarda kullanımı artan bir polimer malzeme olan kriyojeller alternatif tedavi yöntemleri ile birlikte değerlendirilmeye başlanmıştır. Özellikle biyouyumlu malzemelerin ve bitki içeriklerinin katkısı ile kriyojelin iyileştirici etkisi de giderek arttırılmıştır. Bu jelin yapısını geliştirmek ve çok fonksiyonlu bir polimer haline getirmek için bitki bazlı desteklerin kullanılması mümkündür. Jelatin, aljinat ve kitosan gibi bitkisel kökenli destek malzemeleri, kriyojelin özelliklerini iyileştirerek çeşitli uygulama alanlarında kullanılabilir. Bu desteklerin eklenmesiyle, kriyojel daha yüksek mekanik dayanıklılığa, stabiliteye ve biyolojik uyumluluğa sahip olabilmektedir. Ayrıca, bitki bazlı desteklerin eklenmesi, kriyojelin yüzey özelliklerini, hücre yapışma ve büyüme yeteneklerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle, bitki bazlı desteklerin sentezlenmesi ve kriyojelin yapılandırılması, biyomedikal araştırmalar ve uygulamalar açısından büyük potansiyele sahip bir alandır (Antunes ve ark., 2021). Bu çalışmada da, kriyojelin yara iyileştirici etkinliğini araştırmak amacıyla teröpotik etkinliği önceki çalışmalarda gösterilen çay ağacı bitkisinden faydalanılmıştır.

Çay ağacı yağı (TTO), Avustralya'da yayılım gösteren *Melaleuca alternifolia*'nın (Myrtales: Myrtaceae) yapraklarının ve uç dallarının buharla damıtılmasıyla elde edilen uçucu bir yağdır (Pazyar ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda çay ağacı yağı bitkisinin yara iyileştirmesini hızlandırdığı, akne gibi cilt yağlanma sorunlarında tedavi edici olarak kullanıldığı, antibakteriyel, antifungal özelliklere sahip olduğu ve anti-kanser aktivitesi gösterdiği gösterilmiştir. Doğal olarak oluşan bileşenler içeren bu yağ, birçok bakteri türüne karşı etkili olan güçlü antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, insanlar için düşük toksisiteye sahip olduğu kanıtlanmıştır, bu da güvenli bir şekilde

kullanılmasını sağlar. ay ağacı yağı ayrıca yaraların iyileşmesini destekler. Yara bölgesine uygulandığında, enfeksiyon riskini azaltır ve doğal iyileşme sürecini hızlandırır. Bu özellikleri sayesinde çay ağacı yağı, sağlık ve cilt bakımı alanında popüler bir bileşen haline gelmiştir (Carson ve ark., 2006; Lee ve ark., 2013; Nenoff ve ark., 1996).

Bunun dışında kriyojel gibi makrogözenekli malzemeler ilkyardım uygulamalarında kan durdurucu olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Özellikle acil müdahale gerektiren durumlarda kan ve vücut sıvılarını makrogözeneklerine hapsedip pıhtılaşmayı kolaylaştırması ve mevcut yarayı dış etkilerden koruyarak iyileştirmeyi kolaylaştırması bu alanda avantajlı bir kullanım alanı sağlar.

Bu çalışmada, bahsedilen tüm fonksiyonların kriyojele kazandırılması için bitki bazlı desteklerle geliştirilmesi hedeflenmiş ve sonuç olarak multifonksiyonel özellikte kriyojeller geliştirilmiştir. Bu doktora tez çalışması, literatüre kazandırılmak istenen özgün bir çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimer ve Polimer Çeşitleri

Polimer yapılar günümüzde çok çeşitli kullanım alanı bulabilen yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır. (Lozinsky ve ark., 2003). Jel temelli biyoteknolojik birçok uygulamada kullanım alanı bulmaktadırlar. Bunlardan bazıları, hücre iskeletleri, yara tedavileri, ilaç salım mekanizmaları, kromatografik yöntemler için materyaller, hücre immobilizasyonu, elektroforez gibi uygulamalarda ve katı kültürlerde matris uygulamalarıdır.

Polimerik jeller bir sıvı ile şişebilen çapraz bağlı polimerler olarak bilinir. Bu jeller, polimerik bir matrisin sıvılar tarafından şişirilen ancak içinde çözünmeyen, üç boyutlu ağ oluşturmak için çapraz bağlandıkları katı-sıvı sistemlerdir. Jel tarafından emilen bir sıvı jelin ağırlığından daha fazla olabilir. (Rogovina ve ark., 2008). Geliştirilen polimer malzeme sıvıyı bir arada tutmak için bir matris formunda bulunur.

Polimerik jeller, çözücü içinde çözünmüş durumda olan monomerik ve polimerik öncüler yardımıyla hazırlanabilir. Bunun için çözelti içine monomer (çapraz bağlayıcı) ile başka bir monomerin kopolimerizasyonu söz konusudur (Okay ve Lozinsky, 2014). Polimerik jeller, matris yapısının üç boyutlu karakterini koruduğu sürece, çapraz bağ noktaları arasındaki mesafe arttıkça jelin denge şişme değeri de doğru orantılı olarak artış gösterecektir. Yani daha gevşek çapraz bağlı bir yapıya sahip zarların, daha yoğun zarlardan daha hızlı şiştiği gösterilmiştir (Gudeman ve ark., 1995). Bir jelin çapraz bağlanması, kimyasal bir bağlanmanın sonucu olarak elde edildiğinde, insan vücudu sıcaklığında genellikle geri döndürülemez. Böyle bir jel, kimyasal olarak çapraz bağlı veya 'tersinmez' olarak tanımlanır. Bir jel, çapraz bağlanmasının bir kısmına hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, kompleks reaksiyonlar, kristalli bölgeler gibi daha zayıf kuvvetler neden olduğunda, fiziksel olarak çapraz bağlı veya 'tersinir' olarak tanımlanır (Jagur-Grodzinski, 2009).

Ayrıca, jeller, üretim süreci, polimerleşme aşaması, kullanılan malzemeler, kullanım alanı açısından oldukça çeşitlidirler. Polimerik jel ve jel oluşumlarına bakıldığında, üç boyutlu kovalent ağ ile oluşan moleküller arası kimyasal bağların olduğu kemotropik jeller, moleküler arası iyonik bağlara kararlılık kazandıran iyon değişim tepkimelerini içeren iyonotropik jeller, moleküller arasında şelatlanma tepkimelerini içeren şelatotropik jeller, çözücü bileşeninin değiştirilmesiyle oluşturulan solvatotropik jeller, polimer sisteminin oluşum aşamasında ısıtılarak oluşturulan ve moleküller arasındaki hidrofobik

etkileşimlerin jel oluşumunda önemli olduğu termotropik jeller, polimer sistemin oluşum aşamasında soğutularak oluşturulan psikotropik jeller ve son olarak başlangıç sisteminin dondurulmasıyla elde edilen jel sistemleri olan kriyotropik jeller (kriyojeller) olarak bir çok sınıfa sahip oldukları görülmektedir (Lozinsky ve ark., 2003).

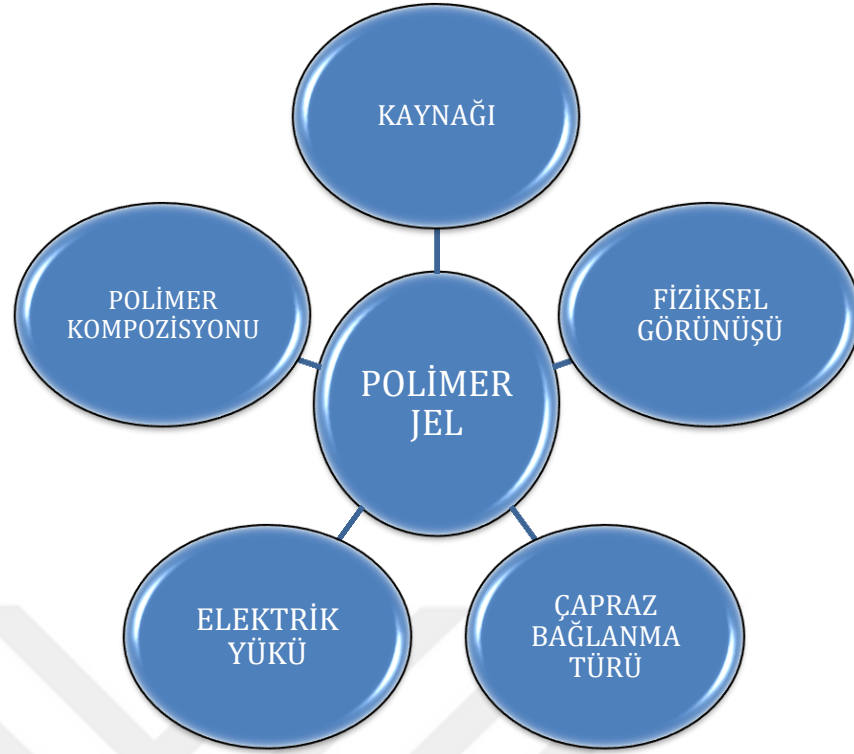
Jellerin uygulama şekillerine bakmadan önce, yara iyileşmesi veya tedavi süreçlerinde uygulanma şekillerini bilmek gerekir. Cilt yüzeyine yapılan uygulamalar, topikal ve transdermal olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Topikal formülasyonlar, sistemik maruziyet olmadan ciltin belirli bir bölgesine ilaç verilmesi ile uygulanmaktadır. Diğer taraftan, transdermal formülasyonlar, ilaın sistemik dolaşımında etkili konsantrasyonun sağlanması ve sürdürülmesi amacıyla cilt yüzeyine uygulanmaktadır. Transdermal formülasyonların üç temel tipi, aerosol püskürtme, yarı-katılar ve yapıştırıcılardır. Bunların içinde, kremler, merhemler ve jeller gibi yarı-katı transdermal ilaç formülasyonları sık kullanılır ve cilt üzerinden ilaç taşıyarak sistemik etki sağlarlar (Delgado-Charro ve Guy, 2014).

Jeller, tüm seçenekler arasında en çok tercih edilenleridir, çünkü hızlı ilaç salımı, uygun yoğunlukta olmaları, üretim ve uygulama kolaylığı ve stabiliteye sahiptir (Raut ve ark., 2012).

En önemlisi, jeller ilaç salım kapasiteleri ve uzun süreli ilaç verme uygulamalarında da oldukça kullanışlıdır. İdeal bir jel, aşağıdaki üç önemli özelliği taşımalıdır (Parhi,2017):

- Jelleştirici madde ve bir sıvı bileşen olmak üzere en az iki bileşen içermelidir
- Her bileşen jel yapısının sürdürülebilirliğini sağlamalıdır
- Katı hal mekanik özelliklerini sergilemelidir.

Biyolojik olarak uyumlu polimer malzeme geliştirilmesi son yıllarda, hem çevreye zarar vermemesi hem de biyolojik doku ve organlara çeşitli özellikleri yönünden uyum göstermesi yönünden sıklıkla tercih edilmektedir. Biyobozunur ve biyouyumlu polimerler, biyobazlı (polihidroksialkanoatlar [PHA], nişasta, protein, polilaktik asit [PLA], kitin, kitosan, aljinat, polibütillen süksinat [PBS] ve selülozikler) ile fosil veya petrol bazlı malzemeler (polikaprolakton [PCL], poli[vinil alkol]) yoluyla üretilmektedir. Hem insan yapımı sentetik polimerler hem de doğal polimerler günlük hayatta oldukça önemli rol oynamaktadır (İlyas ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Polimer jellerin bazı ayırt edici özellikleri

Polimer jeller, genel olarak kaynağına göre (doğal sentetik), polimer kompozisyonuna göre (homopolimerik, kopolimerik veya çoklu polimerik), fiziksel görünüşüne göre (amorf, yarı kristal, kristal), elektrik yüküne göre (noniyonik-*nötr*, iyonik-*anyonik* veya *katyonik*, amfoterik-*hem asidik hem de bazik grupları içeren*, veya *zwitteriyonik-her yapısal tekrarlayan ünite de hem anyonik hem katyonik gruplar içeren*) ve çapraz bağlanma türüne göre (fiziksel ve kimyasal çapraz bağlanma) farklı şekillerde elde edilebilmektedir (Şekil 2.1) (Chelu ve Musuc, 2023).

Polimer jellerin farklı kategorilerine göre sınıflandırılması hidrojeller başlığı altında detaylıca ele alınmıştır.

2.2. Hidrojeller

Günümüzde birçok çalışmada tercih edilen bir jel çeşidi olan hidrojeller, çözünür polimerlerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla üretilen büyük ölçüde hidrofilik makromoleküler ağlardır (Kamoun ve ark., 2017). Hidrojeller, sulu yarı-katı/katı jel ağları oluşturmak için polimerik zincirleri arasında büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları emebilen hidrofilik, üç boyutlu çapraz bağlı polimer sistemleridir (Singhal ve Gupta, 2015; Flood ve ark., 2016). Hidrojeldeki polimer ağlar, suyu kuru ağırlığının %10-20' sinden binlerce katına kadar emebilir. Hidrojeller, kimyasal olarak

kararlı olabilir veya zamanla bozulabilir ve sonunda parçalanıp çözülebilir. (Hoffman, 2012).

Farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan hidrojellerin ana özellikleri aşağıdaki gibidir (Peppas, 2000; Koetting ve ark., 2015):

- Bileşim açısından (glikozaminoglikanlar gibi) ve mekanik olarak hidrojeller doğal hücre dışı matrise benzerler. Bu nedenle doku rejenerasyonu sırasında hücreler için destekleyici bir malzeme olabilir ve terapötik bir maddenin iletilmesinde taşıyıcı olarak hizmet edebilirler.
- Suyu emme eğilimindedirler ve böylece yumuşak bir doku gibi işlev görerek vücuttaki hücrelerin doğasına uygun davranırlar.
- Tamamen şişmiş veya hidratlanmış hidrojellerin elastik özelliğinin uygulamadan sonra uygulandığı dokularda tahrişi en aza indirdiği bulunmuştur.

Doğal hücre dışı matrise (ECM) benzer özellikleri ile doku mühendisliği, biyomühendislik, biyomedikal ve teröpotik yaklaşımlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Li ve ark., 2020a; Nguyen ve ark., 2015; Liu ve ark., 2017). Fizyolojik ortamlara karşı hassas olmaları, yüksek su içeriği ve esneklik gibi özellikleri sebebiyle yumuşak dokuya benzemeleri, biyomedikal uygulamalarda tercih edilebilir olmalarını sağlamıştır. Sıcaklık, pH ve iyonik kuvvetlerle, su ile olan ilişkileri nedeniyle (tersinir yönde şişebilir olmaları) kullanılırlar. Makrogözenekli yapıları ve esnek olmaları onları suyu ve biyolojik sıvıları tutma konusunda benzersiz kılmıştır (Pourshahrestani ve ark., 2020).

Yakın zamanda enjekte edilebilir özelliğe sahip hedef bölgeye minimal invaziv uygulamalar yoluyla kolayca uygulamalara izin veren multifonksiyonel özelliklere sahip hidrojeller, kanamayı etkili bir şekilde durdurabilen ve yara iyileşmesini hızlandırabilen umut verici matrisler ortaya çıkmıştır. Enjekte edilebilir hidrojeller, düzensiz şekilli yaraları tamamen doldurma yeteneğinin yanı sıra daha az ağrı ve yara izi ile sonuçlanan derin kanayan yaralara ulaşma yeteneği gibi oldukça başarılı özellikler sunmaktadır (Patenaude ve ark., 2014; Liang ve ark., 2019).

Doku mühendisliğinde yakın zamanda biyomateryallerin tasarlama sıklığı artmıştır. Geliştirilen biyomateryalin ECM ile biyouyumluluğu oldukça önemlidir (Chaterji ve ark., 2007). Bu sayede hidrojeller teröpotik amaçla kullanılabilmekte ve sıklıkla tercih edilmektedir.

2.1.1. Hidrojellerin Tarihçesi

Hidrojeller, "nem tutucu polimerler"dir ve günümüzde birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Peppas ve Hoffman, 2020). Ancak hidrojellerin tarihçesi, birçok yıl öncesine dayanmaktadır. 1940'lı yılların ortalarına gelindiğinde, hidrojellerin kullanımı, birçok farklı alanda hızlı bir şekilde yaygınlaşmaya başlamıştır (Thakur ve ark., 2018).

Yapılan araştırmalara göre ilk hidrojel kelimesi 1894 yılında yayımlanan bir makalede rastlanmıştır. Lee, Kwon ve Park (2013)'a göre "hidrojel" kelimesi çok eskilere dayanmaktadır. Buna göre, ilk kez kullanılan hidrojel günümüzde tarif edildiği gibi bir yapı olmayıp; inorganik tuzlardan yapılan koloidal bir jeldi (Thakur ve ark., 2018). Bununla birlikte, ilk hidrojel örnekleri, 1950'lerin sonlarına doğru biyomedikal uygulamalar için sentezlenmiştir (Wichterle ve Lim, 1960). Literatürde ortaya çıkan ve yüksek su afinitesine sahip hidrojel olarak tanımlanan ilk çapraz bağlı ağ malzemesi olarak sentezlenen bu hidrojeller, etilen dimetakrilat ile çapraz bağlanmış polihidroksietil metakrilat (PHEMA) bazlı ilk kontakt lenslerdi. İnsan dokuları ile kalıcı temas uygulamalarında kullanma hedefiyle, hasta içinde kullanılmak üzere geliştirilen ilk malzemeler olarak bilinmekte idi (Kopecek, 2007; Lee ve ark., 2013a). Wichterle ve Lim (1960) tarafından yumuşak hidrojellerin ilk kez kullanımı daha akıllı ve gelişmiş özelliklerdeki yeni biyomalzemelerin geliştirmesinde öncü olmuştur (Gyles ve ark., 2017).

1960'lı yılların ortalarında ise, hidrojellerin kullanım alanı daha da genişledi. Doku benzeri amaçlarla kullanılabileği düşünülen hidrojeller, biyomedikal uygulamalarda da kullanım alanı buldu (Chirani ve ark., 2016).

Son yıllarda, sentetik polimer hidrojellerin sentezi, karakterizasyonu ve ayrıştırma teknolojisinde kullanımı üzerine odaklanılmıştır. Bu hidrojeller, tıbbi, ilaç, çevre gibi çeşitli alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir. Hidrojeller ayrıca diğer bazı uygulamalar için modifiye edilmiş ve karakterize edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, hücre mühendisliği için kalsiyum aljinat mikrokapsüller elde edilmiş olup başka bir çalışmada yanıkları iyileştirmek için en uygun koşulları sağlayan yeni pansumanlar elde etmek için kollajen ve köpekbalığı kıkırdağı gibi bazı doğal maddelerle sentetik hidrojeller modifiye edilmiştir. Nihai hidrojel ürünü, doku mühendisliğinde ve trombozu, ameliyat sonrası adhezyon oluşumunu iyileştirmede, ilaç dağıtım sistemlerini, biyosensörler için kullanılabilmektedir (Saini, 2017).

2.2.2. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller kullanımı itibariyle çeşitlilik göstermekte olup farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma, yan grubun niteliğine göre, nötr veya iyonik olarak ayrılabilir. Elektrik yükünün varlığı, sentezde kullanılan monomer/polimer ve gözenek boyutu gibi farklı temellerde çeşitli şekillerde de sınıflandırılması mümkündür (Singhal ve Gupta, 2015). Ayrıca, hazırlanma yöntemine göre, homopolimer veya kopolimer ağlara ayrılabilir. Ağların fiziksel yapılarına göre ise amorf, yarı kristal, hidrojen bağlı yapılar, supermoleküler yapılar ve hidrokoloidal agregatlar olarak sınıflandırılabilir (Peppas, 2000).

Hidrojeller, çapraz bağlı zincirlerde elektrik yükünün bulunup bulunmamasına göre üç ana gruba ayrılabilir. Bunlar nötr/iyonik olmayan hidrojeller, iyonik hidrojeller ve amfolitik hidrojellerdir. Tablo 1’de çeşitli iyonik ve iyonik olmayan hidrojel tiplerinin şematik gösterimini yer almaktadır. İyonik olmayan hidrojellerin omurgasında veya yan gruplarında yük yoktur. Bu hidrojeller yalnızca su-polimer etkileşimleri nedeniyle sulu ortamda şişer (Singhal ve Gupta, 2015). Non-iyonik hidrojel örnekleri arasında poliakrilamid (PAAm), polihidroksietil metakrilat (PHEMA), polivinil alkol (PVA) ve polietilen glikol (PEG) yer alır (Deligkaris ve ark., 2010).

İyonik hidrojeller, katyon (pozitif yük taşıyan) hidrojelleri ve anyonik (negatif yük taşıyan) hidrojelleri içerir. İyonik hidrojinin şişmesi, iyonik zincirlerin ayrışma derecesini belirleyen sulu ortamın pH’ı tarafından yönetilir. Şişme kapasitelerini arttırmak için reaksiyon karışımına iyonik bir komonomer de eklenir. Hidrojel preparasyonu için monomerler genellikle olağan polimerizasyon sıcaklığında katı olduğundan, polimerizasyon reaksiyonlarının sulu bir çözelti içinde gerçekleştirilmesi gereklidir. Hidrojel yapısı ve dolayısıyla hidrojel özellikleri, hidrojellerin oluştuğu koşullarla, yani çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, monomerlerin başlangıç seyreltme derecesi ve ağ yapısını oluşturan birimlerin kimyası ile yakından ilişkilidir (Okay, 2009). Katyonik hidrojellerin sentezinde kullanılan monomerlerin örnekleri arasında Vinil piridin, aminoetil metakrilat (AEMA), Dietilaminoetil metakrilat (DEAEMA) yer alır (Singhal ve Gupta, 2015).

Anyonik hidrojeller ise omurgalarında negatif yük taşırlar. Büyük miktarlarda su veya sulu çözücüler emerek şişebilen üç boyutlu polimer ağlardır ve şişme davranışları, pH, iyonik kuvvet, çözücü bileşimi ve sıcaklık gibi dış çevre koşullarındaki değişikliklere

bağlı olabilir. Özellikle, anyonik hidrojel, çevresel pH değişikliğine bağlı olarak şişmede şiddetli değişiklik sergilemektedir. Bu pH'a duyarlı şişme davranışı, çevreleyen ortamın pH'ına bağlı olan jellerdeki fonksiyonel grupların iyonlaşmasından kaynaklanır. Bu iyonizasyon, polimer ağların penetrant taşıma mekanizmasını önemli ölçüde etkiler. Anyonik hidrojellerde, iyonlaşma derecesinin artması, yüklü gruplar arasındaki elektrostatik itmeye katkıda bulunur ve bu nedenle jelleri yüksek derecede şişirir (Kim ve ark., 2003). Anyonik hidrojellerin monomerlerinin örnekleri arasında Akrilik asit (AA), krotonik asit (CA), maleik asit (MA) ve metakrilik asit (MAA) yer almaktadır (Singhal ve Gupta, 2015).

Amfolitik hidrojel aynı polimer zinciri üzerinde pozitif ve negatif yükler taşırlar. Bu hidrojel, her bir yapısal tekrar biriminde hem asidik hem de bazik gruplar içerir. Bu yükler izo-elektrik noktasında dengelenir. pH'daki küçük bir değişiklik, bu tür hidrojellerin genel iyonik özelliklerini değiştirebilir (Mahdavinia ve ark., 2004; Omidian ve Park, 2010).

Hidrofobik modifiye hidrojel, asılı hidrofobik grup ile hidrofilik bir omurga (iyonik veya iyonik olmayan) içeren özel bir hidrojel kategorisine aittir. Sulu çözeltide hidrofilik ve hidrofobik etkileşim arasındaki denge sıcaklıkla değişir. Böylece, belirli bir sıcaklıkta, jelleşme ile sonuçlanan hidrofobik agregasyon meydana gelir. Yapılan bir çalışmada hidrofobik segment içeren hidrofobik olarak modifiye edilmiş jelatinden hidrojel üretilmiştir. Bu çalışmada hidrofobik olarak modifiye edilmiş hidrojellerin (HMG), jelatinin uzun alkil zinciri ile modifikasyonu yoluyla hidrofobik etkileşimi artırarak, amino asit kalıntılarının sayısına bakılmaksızın hidrojelin stabilitesini ve mekanik dayanıklılığını artırma konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda yüklü hidrofilik ve hidrofobik moleküllerin bu hidrojele (HMG) adsorbsiyonu ve hidrojelden salımı ayrı ayrı incelenmiş ve HMG hidrojelinin hem yüklü hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlar için bir taşıyıcı olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Takei ve ark., 2020).

Zıt yüklü polimerik zincirler arasındaki etkileşimi içeren jeller, kompleks koaservat jel olarak bilinmektedir. Bu hidrojellerde, zıt yüklü (pozitif ve negatif yüklü) iki polimer birlikte karıştırılır. Polimerler birbirlerini çekerek birbirine yaklaşırlar ve içinde bulundukları çözeltinin konsantrasyonuna ve pH'ına bağlı olarak çözünebilen ve çözünemeyen kompleksler oluştururlar. Daha çok termo geridönüşümlü ilaç taşımınında kullanılmaktadırlar. Örneğin katyonik kitosan ve anyonik aljinat birlikte kullanıldıklarında kompleks koaservat oluştururlar (Li ve McClements, 2011).

Hidrojel sentezinde kullanılan monomer/polimer türüne göre hidrojeller doğal ve sentetik olmak üzere iki farklı kategoride de sınıflandırılabilirler (Çizelge 2.1). Doğal hidrojeller, kollajen, fibrin, hyaluronik asit, kitosan, aljinat ve doğal lifler gibi malzemelerin türevlerini içerir. In vivo hücre dışı matrisin (ECM) bileşenleri oldukları için en iyi fizyolojik hidrojeller olarak anılırlar. Doğal hidrojeller daha biyouyumludurlar, ancak deneysel olarak tekrarlanabilirlikleri daha düşüktür. Poli(etilen glikol) diakrilat, poli(HEMA/ akril amid), poli(vinil alkol) gibi sentetik hidrojeller ise nihai yapılarını polimerizasyon koşulları altında kazanırlar ve doğal hidrojellere kıyasla daha tekrarlanabilir özelliktedir (Chirani ve ark., 2016). Polimerizasyonu ortam ve sıcaklık koşullarına bağımlıdır ve titizlikle oluşturulması gerekir (Lee ve ark., 2013b).

Kolay hazırlanmaları ve kolay karışabilmeleri nedeniyle sentetik ve doğal hidrojellerin kombinasyonu ile hibrit hidrojeller üretilmiştir. Bu karışım, yüksek elastikiyete ve iyi mukavemete sahip ve biyouyumlu bir malzeme meydana getirmektedir; bu nedenle, doğru oranlarda sentetik ve doğal hidrojellerin kullanılması ile elde edilen karışım, insan dokularınıninkine benzer mekanik özelliklere sahip olabilmekte ve bu amaçla kullanılmaktadır (Garnica-Palafox ve Sánchez-Arévalo, 2016).

Polimer ağlar arasındaki gözenek boyutuna bağlı olarak, hidrojin ağ yapısı gözeneksiz, mikro gözenekli veya süper gözenekli olarak sınıflandırılabilir. Gözenekler hidrojin şişme mekanizmasını etkiler. Gözeneksiz hidrojelde difüzyon, ortamdaki şişen suyun taşınması için tek mekanizmadır. Mikro gözenekli hidrojelde birkaç mikron ila birkaç yüz mikron arasında küçük gözenekler mevcuttur. Bu hidrojellerde şişme mekanizması, polimerik substrattan difüzyonun yanı sıra gözeneklerden sızma şeklinde bir kombinasyona sahiptir. Bu kombinasyon, daha yüksek difüzyon oranı sağlamaktadır (Singhal ve Gupta, 2015; Riley ve ark., 2019). Süper gözenekli hidrojeller ise çok yüksek hacimde büyük boyutlu gözenekler içerir; çok kısa sürede son derece yüksek şişme oranları elde etmede avantajlıdır. Bu hidrojeller, farmasötik uygulamalarda ve biomateriyal sentezinde kullanılabilir (Kuang ve ark., 2011).

Çizelge 2.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Sınıf	Alt sınıf	Referans
Elektrik yükü durumuna göre hidrojeller	Nötral	Deligkaris ve ark., 2010
	Katyonik	Shaghaleh ve ark., 2022
	Anyonik	Zhou ve ark., 2014
	Amfolitik	Mahdavinia ve ark., 2004; Omidian ve Park 2010
	Hidrofobik Modifiye	Takei ve ark, 2020
	Kompleks Koaservatlar	Li ve McClements, 2011
Hidrojel Sentezinde kullanılan monomer/polimer türüne göre hidrojeller	Doğal	Catoira ve ark., 2019
	Sentetik	Madduma-Bandarage ve Madihally, 2021
	Hibrit	Garnica-Palafox ve Sánchez-Arévalo, 2016
Por boyutuna göre hidrojeller	Gözeneksiz	Moghaddam ve ark., 2019
	Mikrogözenekli	Riley ve ark., 2019
	Süper Gözenekli	Chen ve Park, 2000; Kuang ve ark., 2011

2.2.3. Hidrojellerin Oluşturulması

Hidrojellerin oluşturulmasında kullanım amacına bağlı olarak çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Bu parametreler, hidrojellerin biyobozunurluğu, biyoyumluluğu, toksisitesi, şişme parametreleri, çevreye duyarlı olup olmaması gibi durumların belirleyicisidir. Çizelge 2.2’de, yeni bir hidrojel geliştirilmesi için gerekli olan parametreler yer almaktadır (Ganji ve ark., 2010).

Monomerin yapısı, sayısı ve oranına göre; hidrojeller homopolimerik, kopolimerik, multipolimerik, iç içe geçen ağlar olarak ayrılabilir. Bu hidrojeller, farklı monomer kombinasyonları seçilerek veya orijinal hidrojel yapısında ikinci bir polimerizasyon/çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilerek hazırlanabilir. Örneğin akrilamid gibi oldukça hidrofilik bir monomer, hidrofobik bir monomer (Bütül metakrilat

gibi) veya çevreye duyarlı bir monomer seçilerek; farmasötiklerin kontrollü salımında kullanılabilir. Böylece istenilen parametrelerle bir denge sağlanabilir (Singhal ve Gupta, 2015).

Homopolimer hidrojelere, bir tür monomerik birimden elde edilen çapraz bağlı polimer ağları denir. Tek monomer bazlı hidrojel özellikle biyomedikal uygulamalarda gereklilikleri tam olarak karşılamayabilir. Örneğin şişme oranı çok yüksek olmasına rağmen mekanik özellikleri zayıf kalabilir. Bu durumda multikomponent hidrojel ve birden fazla çapraz bağlama işlemi uygulanabilir (Gyles ve ark., 2017).

Kopolimerik hidrojel ise, genellikle ikisinden birinin hidrofilik özelliklere sahip olduğu iki veya daha fazla farklı monomer sınıfından oluşur. Bu tip polimer konfigürasyonu, polimer ağının omurgası üzerinde blok veya düzensiz konfigürasyon ile rastgele düzenlenmiş bir polimer zincirine sahiptir. Hidrofilik monomer, hidrojin şişme profilinden sorumludur. Kopolimerik hidrojel genellikle her iki monomerin bir başlatıcı ve çok işlevli çapraz bağlayıcı kullanılarak, tercihen uygun çözücünün varlığında kimyasal çapraz bağlanması/polimerizasyonu yoluyla hazırlanmaktadır (Madsen ve ark., 2008; Singhal ve Gupta, 2015).

Hidrojellerin çoklu uyaranlara yanıt verme kabiliyeti biyomedikal uygulamalar için uygundur (Fu ve ark., 2018). Homopolimer/kopolimer hidrojin mekanik zayıflığı ve kırılabilirliği, bazı durumlarda kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu hidrojellerin bu sınırlamasının üstesinden gelmek için, yüksek mekanik mukavemet ve başarılı genel hidrojel yapısı sunan multipolimer hidrojel hazırlanmıştır. Örneğin, PAAm/jelatin bazlı hidrojel ve PAAc-HEMA/jelatin bazlı hidrojel multipolimer hidrojelere örnek olabilir (Singhal ve Gupta, 2015; Fu ve ark., 2018).

Hibrit ağlar olarak da bilinen çoklu polimer ağlar, genellikle önceden polimerize edilmiş hidrojel, monomerlerden ve bir polimerizasyon başlatıcısından oluşan polimerik ağ çözeltisinden meydana gelmektedir. Bu çözeltide bulunan iki veya daha fazla polimerin polimerizasyonunu içeren İç içe giren ağlar (*Interpenetrating network*, IPN) ve Yarı iç içe giren ağlardan (Yarı IPN) oluşmaktadır (Gyles ve ark., 2017). IPN hidrojelieri genellikle her iki polimer arasında herhangi bir kimyasal bağlantı olmaksızın iç içe geçmiş iki polimer ağdan oluşur. İlk polimerik ağın doğrusal olması ve başka bir çapraz bağlı ağa (aralarında başka herhangi bir kimyasal bağ olmadan) nüfuz etmesi durumu, yarı IPN olarak adlandırılır (Jones ve ark., 2012).

Tüm bunların dışındaki parametrelerden biri de çapraz bağlamada kullanılan hidrojel ağ yapısının türüne ve çapraz bağlayıcının miktarına karar vermektedir. Bu karar hidrojinin ne amaçla sentezlendiğine göre değişiklik gösterebilir. Hidrojeli çapraz bağlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar iki ana kategoride incelenir. Bunlar fiziksel ve kimyasal çapraz bağlayıcılardır.

Çizelge 2.2. Hidrojel Geliştirilmesi için Sentez Parametreleri

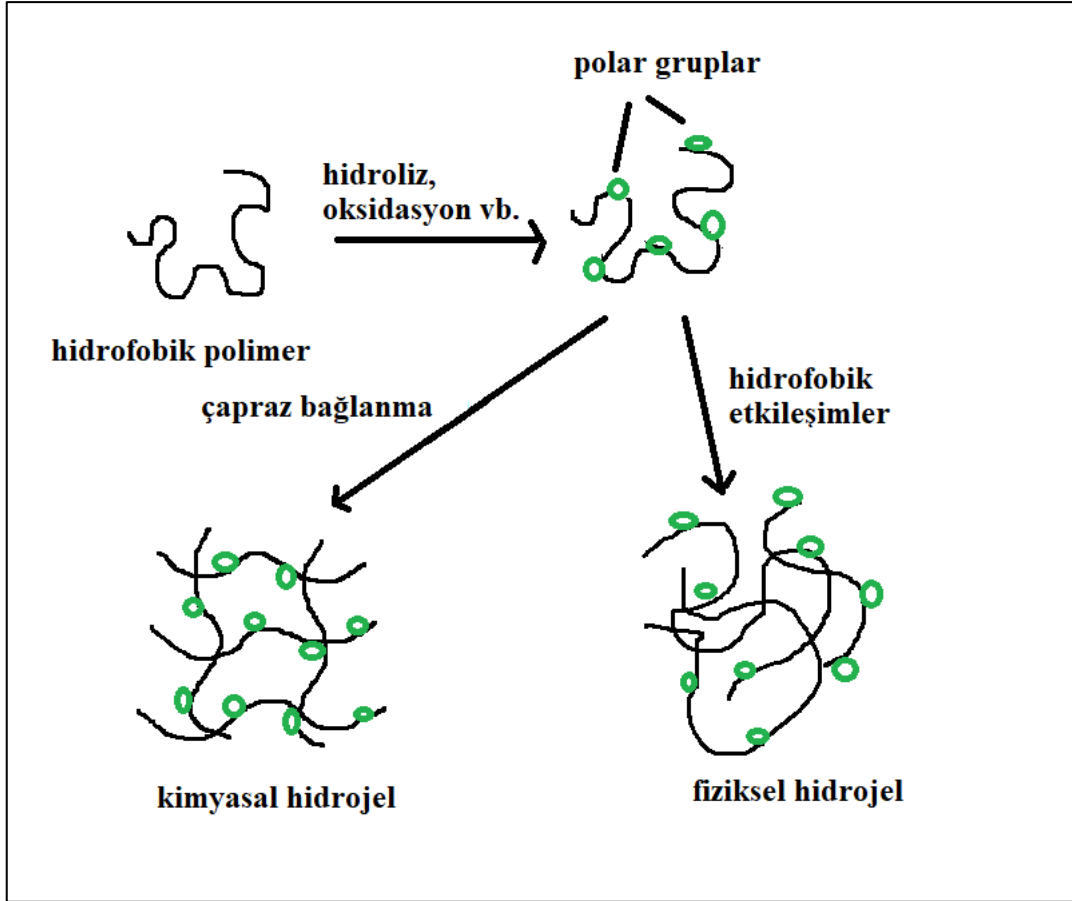
Sentez Parametreleri		Alt Sınıf	Referans	
Monomer türü, miktarı ve oranı		Homopolimer Hidrojeller	Gyles ve ark., 2017; Du ve ark., 2020;	
		Kopolimer Hidrojeller	Madsen ve ark., 2008; Thankam ve Muthu, 2014	
		Multipolimer Hidrojeller	Fu ve ark., 2018	
		İç içe giren Ağ (IPN) Hidrojeller	Banerjee ve ark., 2012	
Uygun çapraz bağlanma yönteminin seçimi	Fiziksel Çapraz Bağlama	Hidrojen Bağ Etkileşimi	Guo ve ark., 2014	
		Dondurarak Çözdürme	Zhang ve ark., 2013; Memic ve ark., 2019	
		Termojelasyon	Chang ve ark., 2015	
		Yük Etkileşimleri	Cappuccio ve ark., 2004; Parhi,2017	
		Mikrojeller ve Nanojeller	Sivakumaran ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2014	
	Kimyasal Çapraz Bağlama	Radikal Polimerizasyon	Das ve ark., 2018	
		Fonksiyonel Grupların Kimyasal Reaksiyonu	Yiğit ve ark., 2011	
		Yüksek Enerjili Işınlama	Fekete ve ark., 2016	
		Enzim Kullanarak Çapraz Bağlama	Teixeira ve ark., 2012	
		Özel Yapısal Konfigürasyonlar	Slide-ring (SR) jel	Ito, 2007; Feng ve ark., 2020
			Double network (DN) hidrojeller	Chen ve ark., 2015
			Nano-kompozit Hidrojeller	Gaharwar ve ark., 2014

Polimerik moleküller arasındaki bağın doğasına bağlı olarak sınıflandırılan fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı hidrojellerde üretim yöntemi oldukça önemlidir. (Sikdar ve ark., 2021; Sánchez-Cid ve ark., 2022). Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojellerin yapılanması,

temel olarak iyonik bağlar, hidrofobik kuvvetler ve hidrojen bağları gibi tersinir olan ve çevresel değişikliklerle (örn. sıcaklık ve pH) değiştirilebilen zayıf etkileşimlere bağlıdır. Kimyasal yapıda herhangi bir değişiklik meydana getirmez. Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller, kovalent bağlarla bağlı oldukları için polimerik zincirleri arasında kalıcı ve güçlü etkileşimler ile oluşurlar (Catoria ve ark., 2019) (Şekil 2.2).

Fiziksel hidrojeller, jellerin kovalent olmayan bağlarla çözünmez hale getirilmesiyle karakterize edilir ve farklı etkileşimlerle oluşabilir. Kimyasal ağlardaki kovalent çapraz bağlama noktalarının aksine, fiziksel jeller, birkaç yan yana bağlı polimer zincirinin genişletilmiş bağlantı bölgeleri aracılığıyla oluşmaktadır. Doğal polimerlerin büyük bir çoğunluğu fiziksel ağlar oluşturur. Fiziksel hidrojeller, çapraz bağların türü, ağ oluşumunun rastgeleliği ve bu parametrelerin oluşan ağların sertliği ve elastik modülleri üzerindeki etkileri açısından kimyasal hidrojellerden farklılık gösterir. Fiziksel hidrojeller, viskoelastik katılar olarak görülebilir ve hazırlama yöntemlerine göre sınıflandırılabilir. Polimer zincirlerinin fiziksel çapraz bağlanması, çeşitli çevresel tetikleyiciler (pH, sıcaklık, iyonik güç) ve çeşitli fizikokimyasal etkileşimler (hidrofobik etkileşimler, yük yoğunlaşması, hidrojen bağı v.b.) kullanılarak elde edilebilir. Farklı tiplerdeki fiziksel jeller, beş kategoride incelenebilir (Çizelge 2.2). Bunlar hidrojen bağ etkileşimleri (Guo ve ark., 2014), dondurarak çözündürme (Zhang ve ark., 2013; Memic ve ark., 2019), termojelasyon (Chang ve ark., 2015), yük etkileşimleri (Cappuccio ve ark., 2004; Parhi, 2017), mikrojel ve nanojel uygulamalarını (Sivakumaran ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2014) kapsamaktadır.

Kimyasal çapraz bağlanmalar ise kendi içinde radikal polimerizasyon (Das ve ark., 2018), fonksiyonel grupların kimyasal reaksiyonu (Yiğit ve ark., 2011), yüksek enerjili ışınlama (Fekete ve ark., 2016), enzim kullanarak çapraz bağlama ve Slide-ring (SR), Double network (DN), nanokompozit hidrojeller gibi özel yapısal konfigürasyonlar şeklinde gerçekleştirmelerine göre ayrılmaktadır.



Şekil 2.2. Kimyasal ve fiziksel hidrojel oluşumu (Chirani ve ark., 2016)

Dondurarak çözündürme tekniği, fiziksel çapraz bağlama yöntemleri arasında yer almakta olup özellikle polisakkarit içeren jellerle hazırlanan biyomalzemelerde verimli olabilecek bir tekniktir, çünkü yüksek biyolojik uyumluluğa, düşük toksisiteye ve fizyolojik koşullarda enzimatik veya kimyasal olarak çözünebilme özelliğine sahiptir. Dondurma-çözme işlemi sonucunda yapıda mikrokristallerin oluşumu söz konusudur (Zhang ve ark., 2013). Kriyojeller olarak da adlandırılan bu yöntemle göre makrogözenekli bir polimer malzeme meydana gelmektedir.

2.2.4. Kriyojeller, Elde Edilişi ve Kullanım Alanları

2.2.4.1. Kriyojeller

Kriyojeller, polivinil alkol (PVA) bazlı ilk kriyojelin sentezinden itibaren günümüze kadar üzerine çalışılan bir alan haline gelmiştir. Safılaştırmadan doku mühendisliğine ve medikal uygulamalara kadar hayatın çoğu alanında gereksinimler dahilinde uygulama imkanı bulunmuştur (Yavaşer ve Karagözler, 2021).

Bir jel çeşidi olan kriyojel kelimesinin kökeni Yunancaya dayanmaktadır. Yunanca'da kri'os (kryos) buz ya da donma anlamına gelmektedir (Lozinsky, 2018). Kriyojeller diğerk bilinen jellerin aksine soğuk ortamda polimerleşen malzemelerdir (Lozinsky ve ark., 2003). Birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekleri, hidrofilik yapıları, sentezlenirken çözücü ve gözenek yapıcı olarak toksik madde gerektirmemeleri ve mekanik olarak dayanıklı olmalarının yanında esnek yapıya sahip olmaları sayesinde birçok kullanım avantajı sunmaktadırlar.

Kriyojellerin yaklaşık 50 yıllık bir geçmişı bulunmaktadır (Öncel ve ark., 2017). Yayınlanan makalelere bakıldığında, "kriyojel" teriminin, ılık donmuş organik ortamlarda makromoleküler öncüllerin kimyasal çapraz bağlanması yoluyla hazırlanan polimerik malzemeleri tanımlamak için ilk kez 1984 yılında yayınlanan bir makalede kullanıldığı söylenebilir (Lozinsky, 1984). Bahsi geçen makaleye ek olarak, donmuş sistemlerde (çoğunlukla sulu sistemlerde) oluşan jeller için farklı terimler kullanılmıştır: cryocoacervates (Schulze ve ark., 1964), cryocoagulates (Vol'khin ve ark.,1973), cryo-concentrated gels (Lawrence ve ark., 1986), anomalous gels (Watase ve ark., 1983), freeze-thaw gels (Nagura ve İshikava, 1984), bu terimlerden bazılarıdır. Bununla birlikte, 1980'lerin sonundan bu yana "kriyojel" terimi daha popüler hale gelmiştir.

Dondurarak kurutma (freeze-drying) yoluyla elde edilen bazı polimer matrisler de birtakım yazarlarca kriyojel olarak adlandırılmıştır. Polimerik özeltilerin veya koloidal dispersiyonların dondurulması, katı-sıvı faz ayırımına neden olur ve ardından katılaşımış çözücü kristallerinin süblimleşmesi, bu şekilde yapılanmış sistemi "sabitler", ancak bu ardışık adımlar sırasında jelleşme meydana gelmez. Bu nedenle bu şekilde hazırlanmış matrislerin kriyojel olarak adlandırılması doğru olmayabilir.

Bunun dışında, ticari olarak üretilen serinletici etkili jöleye benzeyen ilaçların, bazı kompleks immün hastalıkları olan hastalardan alınan kan plazmasının düşük pozitif sıcaklıkta soğutulması ile oluşan proteinli, suyla şişmiş pıhtıların da, herhangi bir donma-çözme işlemi içermediğinden kriyojel olarak adlandırılmaması daha uygun olmaktadır (Lozinsky, 2014).

Kriyojellerin performansı, gözenek boyutu, gözenek duvarının kalınlığı ve yoğunluğu gibi parametrelerden etkilenir. Gözenek boyutu akış direncini etkiler. Gözenek duvarının kalınlığı ve yoğunluğu kriyojelin makroskopik mekanik özelliklerini belirler. Tamamen suyla şişirilmiş bir kriyojelin toplam ağırlığının ortalama %3-4'ü kurutulmuş polimer

ağırlığıdır. Ağırlığın %4-5'i polimerle bağlı su içerir. Böylece kriyojelin geriye kalan ağırlığının %90'ı gözenekler içindeki sudan oluşur. Kriyojellerin elastikiyeti nedeniyle, büyük gözeneklerdeki suyun %70'i mekanik sıkıştırma yoluyla çıkarılabilir. Bu özellik, kriyojel hacminin büyük bir kısmının birbirine bağlı gözeneklerden oluştuğunu göstermektedir (Plieva ve ark., 2004).

Tipik olarak, kriyojeller, birkaç μm kalınlığında gözenekli duvarlara sahip (ortalama gözenek çapı $1 < d < 300 \mu\text{m}$ aralığında) mikro/makroporöz malzemelerdir. Yaşam bilimleri sınıflandırmasına göre, $d_{\text{nano}} < 0,1 \mu\text{m}$, $0,1 < d_{\text{micro}} < 100 \mu\text{m}$ ve $d_{\text{macro}} > 100 \mu\text{m}$ çaplarındaki gözenekler sırasıyla nano-, mikro- ve makroporlara karşılık gelir. Bu gözenek sınıflandırması, IUPAC gözenek sınıflandırmasından daha uygun bir şekilde makroporöz kriyojeller için kullanılır çünkü IUPAC sınıflandırmasında $d > 50 \text{ nm}$ olan tüm gözenekler makroporolar olarak tanımlanır. Nanogözeneklerin daha ayrıntılı bir sınıflandırmasında, bunlar, dar ($0,4 < d_{\text{nn}} < 2 \text{ nm}$), orta ($2 < d_{\text{nn}} < 50 \text{ nm}$) ve geniş ($50 < d_{\text{bn}} < 100 \text{ nm}$) olmak üzere üç tip olarak sınıflandırılabilir. Bu nanopore boyut aralıkları sırasıyla IUPAC gözenek sınıflandırmasındaki mikro- (nano-), mezo- ve makroporlara karşılık gelir (Gun'ko ve ark., 2013).

Kriyojeller fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanmış homojen veya heterojen polimer ağlarının oluşturulmasıyla elde edilebilirler (Kathuria ve ark., 2009). Ayrıca kriyojellerin yapımında farklı öncüller kullanılarak ve farklı kimyasal reaksiyon uygulanarak kullanılacağı alan doğrultusunda çok farklı şekil ve özelliklerde sentezlenebilirler (Henderson ve ark., 2013; Luo ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2018).

2.2.4.2. Kriyojellerin Elde Edilişi

Kriyojeller, monomerlerin çapraz bağlanması ile veya donmuş çözeltilerdeki lineer polimerlerin çapraz bağlanması yoluyla hazırlanmaktadır. Sentezlenen kriyojel, kullanılan monomerik ve polimerik öncüller, çapraz bağlayıcılar, genel hazırlık koşulları ve karakterizasyon teknikleri bakımından çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.1).

Serbest radikal çapraz bağlı kopolimerizasyon yoluyla, çeşitli monovinil-divinil komonomer çiftleri kriyojellerin hazırlanmasında kullanılabilir. Genellikle, akrilamid (AAm), N,N-dietylakrilamid, N,N-dimetilakrilamid (DMA), akrilik asit (AAc), N-izopropilakrilamid (NIPA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit sodyum tuzu (AMPS) gibi suda çözünebilen monomerler kriyojellerin sentezinde kullanılmıştır. Bu monomerler, N,N-metilen(bis)akrilamid

(BAAm), polietilen glikol diakrilat veya biyolojik olarak parçalanabilen çapraz bağlayıcılar ile birlikte kullanılmaktadır (Ehrburger-Dolle ve ark., 2009; Kirsebom ve ark., 2009a). Nanoboyutlu kil partikülleri (Laponit), çok yüksek esnekliğe sahip kriyojellerin hazırlanmasında çok fonksiyonlu bir çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilir (Zheng ve ark., 2013). Polimerizasyon reaksiyonlarının başlatılması için genellikle bir amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametiletientriamin (TEMED) redoks reaksiyon başlatıcı sistemi kullanılır. Radikal başlatıcıların ayrışması sıcaklığa bağlı olduğundan, reaksiyon çözeltileri başlatıcı eklenmeden önce soğutulmalıdır. Aksi takdirde, reaksiyon sisteminin dondurulmasından önce jel oluşumu başlar ve geleneksel jellerin oluşumuna neden olur. Alternatif olarak, hidrokinon gibi polimerizasyon inhibitörleri reaksiyon sistemi içine dahil edilebilir (Okay ve Lozinsky, 2014).

Kriyojeller, doğal veya sentetik polimerlerin kimyasal çapraz bağlayıcıları ve polimerlerle hazırlanabilir. Proteinler için en fazla kullanılan çapraz bağlayıcı, sulu çözeltilerdeki peptit zincirinin amin grubuna karşı oldukça aktif olan glutaraldehitir. Glutin, fibrinojen, kollajen ve sığır serum albumini gibi proteinler, kitosan, hyaluronik asit gibi polisakkaritler ve poliakrilamid (PAAm) ve poli(vinil alkol) (PVA) gibi sentetik polimerler, donmuş çözeltilerinde glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanabilir (Ivanov ve ark., 2007).

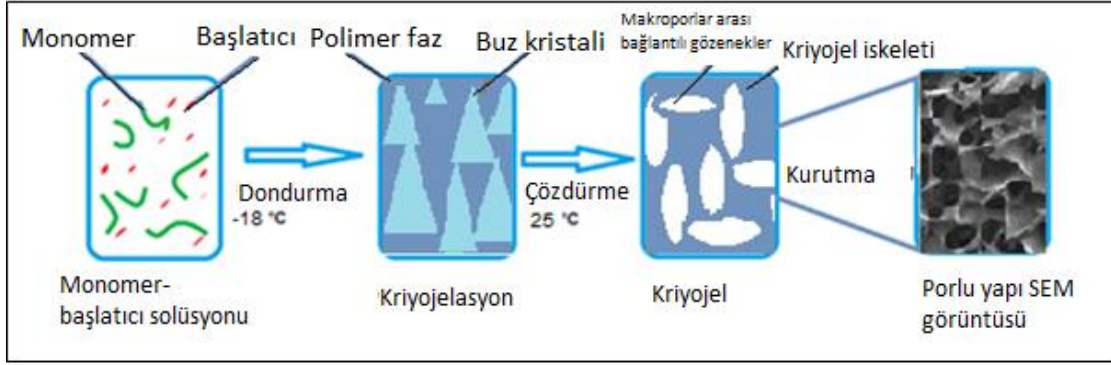
Kriyojellerin oluşturulması için, lineer polimerler yerine mikro boyutlu jel partiküller de kullanılabilir. Bu yöntemde, PNIPA jel partiküllerinin dondurulmuş sulu süspansiyonları veya glutaraldehit kullanılarak küresel ve çubuk şekilli bakteri hücrelerinin dondurulmuş sulu süspansiyonları gibi çeşitli jel partikülleri, çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak sıkıca paketlenmiş partiküllerden oluşan gözenek duvarlarına sahip kriyojel yapıları elde edilebilmektedir (Kirsebom ve ark., 2009b; Zhao ve ark., 2011).

PNIPA, N-izopropilakrilamid adı verilen bir polimerdir (Hiramure ve ark., 2018). Bu polimer, belirli koşullarda su içinde çözünürken, başka koşullarda ise çökelir ve jel benzeri yapılar oluşturur. PNIPA jel partikülleri ise bu polimerin jel formundan elde edilen ve belirli boyutlarda küresel veya diğer şekillerde olan partiküllerdir. Kriyojel yapımında kullanılan PNIPA jel partikülleri, glutaraldehit veya diğer çapraz bağlama maddeleri ile birleştirilerek, sıkı paketlenmiş partiküllerden oluşan gözenek duvarlarına sahip kriyojel yapılarına dönüştürülebilir (Tang ve ark., 2021).

Kriyotropik jelleşme fenomeninin çeşitli yönleri üzerine yapılan çok sayıda çalışma, kriyojellerin, pozitif sıcaklıklarda oluşan geleneksel jellere benzer şekilde, aşağıdaki kategorilere giren öncü sistemlerden hazırlanabileceğini göstermiştir (Plieva ve ark., 2011; Gun'ko ve ark., 2014):

- Kolloidal dispersiyonlar: Kolloid solların donması ve bunun sonucunda ortaya çıkan kriyokonsantrasyon etkiler, parçacıklar arası sıkı temasların oluşmasına yol açar. Bu temaslar ya kohezyon kuvvetleri tarafından ya da bazı reaktif yardımcı maddeler mevcutsa, tanecikli madde taneleri arasında kimyasal bağların oluşumu ile stabilize edilir. Kolloid sistemlerinin donma-çözülme yapılanması ve jelleşmesi, kriyotropik jelleşmenin en eski örneğidir ve özellikle gıda maddelerinin donmuş halde depolanmasıyla uğraşan kişiler tarafından yıllardır bilinmektedir.
- Monomerik öncüllerin çözeltileri: Kimyasal veya radyasyonla indüklenen çapraz bağlı polimerizasyon veya polikondensasyon, genellikle geniş gözenekli süngerimsi bir morfolojiye sahip olan kovalent olarak çapraz bağlı jel malzemelerine neden olan ılık donmuş sulu veya organik ortamlarda gerçekleşir (monomerlerin kimyasal doğasına bağlı olarak).
- Yüksek molekül ağırlıklı öncüllerin çözeltileri: Kimyasal ajanlar veya ışıınım (gama ışınları, elektron ışınları, UV ışıınlama, uygun bir foto-başlatıcı varlığında fotoliz) ile makromoleküllerin kürleşmesi, sistemlerde kimyasal olarak çapraz bağlı yüksek gözenekli matrislere neden olur. Bu jel malzemelerin gözenekliliğinin özellikleri (yani makroporöz veya süpermakroporöz süngerimsi dokusu), donma koşulları, dondurulabilen çözücünün miktarı ve çözücü polikristallerinin boyutu, yani porojen partiküller tarafından yönetilir.
- Kendiliğinden jelleşen polimer çözeltileri: Bu tür öncü sistemler, çözücünün termodinamik kalitesinin değişmesi üzerine veya bir protein denatüranı gibi makromoleküler zincirlerin konformasyonunda bir değişikliğe neden olan, çözünen bir maddenin eklenmesiyle fiziksel (kovalent olmayan) jeller oluşturma yeteneğine sahiptir.
- Düşük molekül ağırlıklı veya polimerik çapraz bağlı karşı iyonları içeren polielektrolit çözeltileri: Polielektrolit çözeltileri, düşük molekül ağırlıklı veya polimerik çapraz bağlı karşı iyonları içerebilir ve bu sayede polielektrolit

zincirleri arasında yeterince stabil iyonik köprüler oluşabilir. Ancak, bu tür jel oluşumu, iyon değişimi reaksiyonlarının hızlı süreçler olması nedeniyle kriyotropik jel oluşumunun nadir bir varyasyonudur ve bu nedenle öncül çözeltinin jel oluşumundan önce dondurulması teknik olarak zor olabilir (Lozinsky, 2014).



Şekil 2.3. Kriyojelleşmenin aşamaları (dondurma, çözündürme ve kurutma sonrası SEM görüntüsü)

Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, makroporöz jeller üretmek için kullanılan teknikler arasında, kriyojelasyon genellikle zaman ve kaynak açısından verimli bir yöntem olarak görülmektedir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarla, bazı parametrelerde yapılabilecek değişikliklerle, kriyojeller kullanım amacına göre özelleştirilebileceği görülmektedir (Çizelge 2.3). Buna göre, kriyojeller çapraz bağlanma türüne göre gözenek boyutu değişiklik gösterebilir (Memici ve ark., 2019). Fiziksel çapraz bağlı jellerde donma hızı arttıkça dayanıklılık azalır. Ayrıca, fiziksel çapraz bağlı jellerde donma hızı arttıkça gözenek boyutu küçüldüğü belirtilmektedir. Kimyasal çapraz bağlarda büyük gözenek elde edilebileceği belirtilmektedir.

Kriyojelasyon sıcaklığı arttıkça gözenek kalınlığı ve yoğunluğu artmaktadır. Polimer molekül ağırlığı arttıkça jel sertliği artmakta, azaldıkça gözenek boyutu artmaktadır. Kriyojelin konsantrasyonunun artması ile elastikiyet artmakta, azaldıkça kriyojel oluşma süresi artmaktadır. Son olarak soğutma hızı ne kadar yavaş olursa, gözenek boyutu o kadar büyük olacaktır.

Çizelge 2.3. Kriyojelin oluşum sürecinde değiştirilebilir parametreler ve ortaya çıkan etkileri (Memic ve ark., 2019)

Parametreler	Etkileri
Çapraz bağlanma türüne göre	- Fiziksel çapraz bağlar: donma hızıyla ters orantılı olan yeterince büyük gözenekleri olan jeller verir. Bu jellerin dayanıklılığı donma hızıyla ters orantılıdır. - Kimyasal çapraz bağlar: potansiyel sitotoksitelerine rağmen yeterince büyük gözenekli jeller verir.
Kriyojelasyon sıcaklığına göre	Arttığında: gözenek boyutu, gözenek duvarı kalınlığı ve yoğunluğu artar.
Polimer molekül ağırlığına göre	- Arttığında: jelin sertliği artar. - Azaldığında: gözenek boyutu artar.
Kriyo-konsantrasyon	- Arttığında: elastikiyet artar. - Azaldığında: jel oluşma süresi artar.
Soğutma hızı	Arttığında: gözenek boyutu azalır.

Aynı sınıftan olmalarına rağmen hidrojellerin kriyojellere göre elastikiyeti daha azdır. Ayrıca hidrojellerde, kriyojellerde bulunan birbirleriyle bağlantılı gözeneklere daha az sayıda rastlanır (Memic ve ark., 2019). Hidrojellerin kriyojellere oranla gözenek boyutunun daha küçük olması sebebiyle hidrojellerin şişme oranı daha düşüktür. Hidrojeller kriyojellere oranla mekanik olarak daha az dayanıklı jellerdir, bu durum birçok çalışmada hidrojellerin yerine kriyojellerin tercih edilmesine sebep olmaktadır (Karacan ve Okay, 2013).

2.2.4.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Makroporöz polimerik yapıların kullanımı son yıllarda gittikçe artmaktadır. Süpermakroporöz polimerik materyallerin yüksek ve hızlı saflaştırma yetenekleri, farklı biyolojik makromoleküllerin ayrıştırılmasında uygulanabilirliğini sağlamaktadır. Kriyojeller ise biyoteknoloji, bioayırıştırma ve biyomedikal alanlarında geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Bu malzemeler, proteinlerin, nükleik asitlerin ve

polisakkaritlerin saflaştırılması ve immobilizasyonu gibi birçok uygulamada kullanılabilir (Bakhshpour ve ark., 2019). Kriyojeller saflaştırma ve ayrıştırma uygulamalarında da çözünmeyen polimerik matrisler olarak tercih edilmektedir. Kan, idrar, hücre parçalama, hedef molekülün ortamdan ayrıştırılması için kullanılabilir. Diğer geleneksel ayrıştırma metodlarının nispeten zor ve maliyetli olması, kriyojellerin bu alanda kullanımını artmasına neden olmaktadır (Saylan ve Denizli, 2019).

Kriyojellerin kullanıldığı biyomedikal alanlardan biri ilaç taşıyıcı sistemleri (Drug Delivery System, İTS) dir. Polimerik taşıyıcıları kullanan bu sistemler, belirli bir zamanda ve belli bölgelerde çeşitli ilaçların taşınması için tasarlanmıştır. İTS'ler, ilaçların terapötik etkisini artırırken toksisitelerini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda biyomedikal ve eczacılık alanındaki bilim adamları tarafından araştırılmaktadır. Difüzyon-kontrollü, şişme-kontrollü, erozyon-kontrollü ve uyarı-kontrollü taşıma sistemleri olarak toplam dört tür İTS belirtilmiştir. Bu sistemler, ilaç dozajının formülasyonuna göre polimerik kapsüller, miseller, lipozomlar ve jeller şeklinde sınıflandırılır. Kriyojeller, biyoaktif bileşikler için İTS'lerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu anlamda kriyojeller yapısı gereği ilaç taşıyıcıları olarak akıllı İTS'ler olarak tanımlanmaktadır (Wang ve Von Recum, 2011).

Supergözenekli polimerik yapılar, yüksek su içeriği, toksik olmayan, kullanıcı dostu yapıları, hafif ve etkili olmaları gibi avantajlara sahiptir. Tekrar kullanılabilirlikleri ve kolay depolanmaları ek avantajlar sunar. Bu nedenle, mekanik ve kimyasal sağlamlıkları, kolay üretimleri, mekanik dayanıklılıkları ve düşük maliyetleri nedeniyle, bu malzemeler ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilir (Çetin ve Denizli, 2015).

Kriyojellerin mikrobiyoloji alanında kullanımları da mevcuttur. Hücre immobilizasyonu için matrisler olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda kriyojellerin hücre izolasyonu ve hücre kültürü uygulamalarında potansiyel taşıdığı da görülmektedir (Plieva ve ark., 2008).

Kriyojellerin kullanıldığı başka bir alan ise biyosensör uygulamalarıdır. Biyosensörler, biyolojik algılama bölümü ve biyolojik algılamayı ölçülebilir bir çıkış sinyaline dönüştüren bir transdüserden oluşan analitik cihazlardır. Kriyojeller biyosensörlerin hassasiyetini ve stabilitesini arttırmak için bir destek materyali olarak kullanılabilir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada glukoz tespitinde kullanılmak

üzere geliştirilen aljinat bazlı kriyojel temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, aljinat içeren kriyojel solüsyonuna Glukoz oksidaz enzimi (GOD) ilave edilerek kriyojelasyona bırakılmış, daha sonra glukozlu ortamda renk değişimi ile glukozun tespit edilmesi hedeflenmiştir (Fatoni ve ark., 2016).

Doku mühendisliğinde kriyojel kullanımı da sıklıkla görülmektedir. Doğal malzemelerle desteklenen polimer doku iskeleleri belirli bir dokuya uygun özellikler sağlamakla birlikte, mekanik dayanıklılığı ve gözenek boşluklarıyla bu alanda uygun bir matris görevi görmektedir (Saylan ve Denizli, 2019; Tavares ve ark., 2020).

Kriyojellerin son yıllarda yaygın kullanım alanlarından biri de yara örtüsü olarak kullanıldıkları biyomedikal uygulamalardır. Makrogözenekli, biyobozunur ve biyoyumlu bir malzeme olmaları, bitki bazlı ve doğal malzemelerle daha biyoyumlu hale getirilebilmeleri, büyük porlarıyla kanı durdurucu etkiye sahip olmaları, iyileştirici malzeme desteğiyle yaraya uygun özelleştirilerek geliştirilebilmeleri sayesinde kriyojeller, uygun bir yara örtüsü adayı olarak literatürde yer bulmaktadırlar (Zhao ve ark., 2018; Yu ve ark., 2019).

2.3. Hidrojel ve Kriyojel Polimerizasyonunda Kullanılan Doğal Malzemeler

Bugün birçok araştırma bitki bazlı biyopolimerlerin yapı-fonksiyon ilişkisine odaklanmıştır. Bu doğal polimerlerin yüksek biyoyumluluğu, özellikle bitki polisakkarit bazlı polimerlerin (selüloz, hemiselüloz, lignin, nişasta ve pektin) ve bitki proteini bazlı hidrojellerin (örneğin, soya) terapötik ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanımını kolaylaştırmaktadır. Yüksek uyumlulukları, hücre dışı matriksle ilgili yeni çalışmalarda kullanılmalarına olanak tanımaktadır.

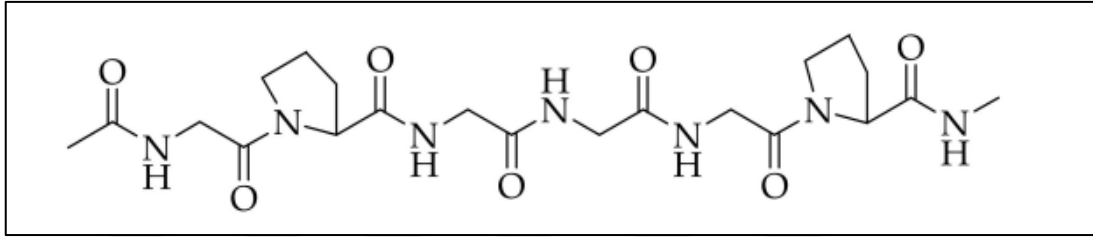
Yara örtüsü polimerleşme aşamasında bitki özütleri ve etken maddeler eklenerek hazırlanabilir. Bugün, tıbbi tedavi için jelatin, kollajen (Col), ipek fibroin (SF), aljinat, kitosan (CS), inorganik malzemeler vb. gibi çeşitli yara örtü malzemeleri geliştirilmiştir (Yu ve ark., 2019; Mohammadinejad ve ark., 2019).

2.3.1. Kollajen

Bu hayvansal protein, beyaz bağ dokusu liflerinin ana yapısal bileşenidir ve tüm dokularda ve organlarda bulunur. Omurgalılarda ve omurgasızlarda toplam proteinin neredeyse %30'unu oluşturur ve mikroskop altında diğer proteinler ve mukopolisakkaritlerle çevrili beyaz opak lifler olarak görünür.

Kollajen, birçok özelliği nedeniyle cilt yenilenmesi ve yara iyileştirmede sıkça kullanılan bir biyopolimerdir. Bu özelliğinin sebebi kollajenin hücre dışı matrisinin (ECM) ana bileşeni olmasıdır. Kollajen ile hücreler arasındaki etkileşimler, yara iyileşme sürecinde önemlidir, çünkü kollajen, hücre fenotiplerinin korunmasını ve farklılaşmasını teşvik eder (Lee ve ark., 2001).

Kollajen genellikle domuz ve sığır kesimhane atıklarından elde edilmektedir. Ancak son zamanlarda deniz ürünleri yan ürünleri kollajen için önemli bir alternatif kaynak haline gelmiştir (Mbese ve ark., 2021).



Şekil 2.4. Kollajenin kimyasal yapısı

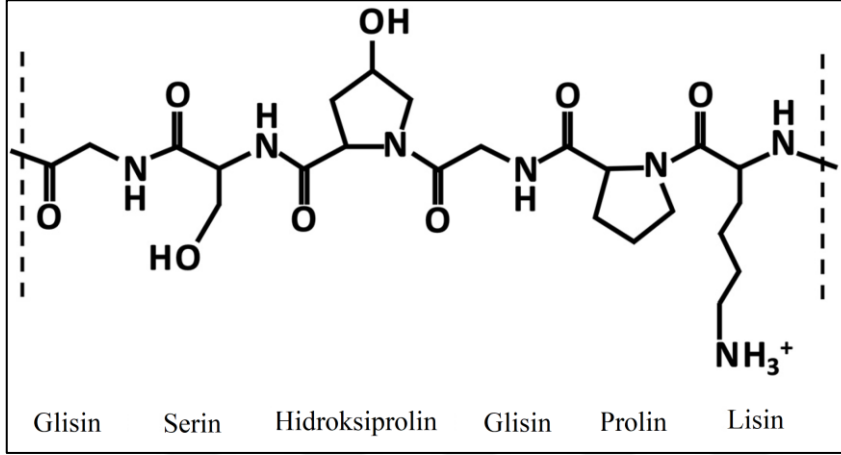
Memelilerin kollajen amino asit bileşimi dikkate değer derecede sabittir: genel olarak proteinlerde bulunan 20 amino asitten 18'i her zaman mevcuttur. Kollajen, yüksek bir glisin, prolin ve hidroksiprolin içeriği ile karakterize edilir ve bu son amino asit kollajende %13- 15'i temsil eder. Hidroksiprolin neredeyse sadece kollajen için özgüdür ve elastinde yaklaşık %2 oranında bulunur (Poppe, 1992). Kollajenin moleküler yapısı Şekil 2.4 'te gösterilmiştir.

2.3.2. Jelatin

Jelatin, hayvan vücudunun deri, kemikler, deriler ve beyaz bağ doku bileşenlerinde bulunan ana protein bileşeni olan kollajenin kısmi hidrolizi yoluyla elde edilen bir proteindir. Tip A jelatin, kollajenli ham maddelerin asit işlemesiyle üretilir; tip B ise alkalın veya kireç işlemesiyle üretilir. Amino asitlerin uzun zincirleri boyunca birbirine bağlanmasıyla oluşan bir moleküler yapıya sahiptir. Kontrollü kısmi hidroliz yoluyla kollajenden elde edildiği ve doğada bulunmadığı için, türetilmiş bir protein olarak sınıflandırılır. Bu türev, Gly-X-Y olarak bilinen amino asit düzenlemesinin tekrarlarından oluşur, burada X ve Y sırasıyla prolin ve hidroksiprolindir. Jelatin, yaklaşık olarak 1:1:1 oranında kationik, anyonik ve hidrofobik gruplara sahiptir. Bu nedenle, jelatinin polipeptit zincirinin yaklaşık %13'ü pozitif yüklü amino asit kalıntılarından oluşur (özellikle lizin ve arginin kalıntıları), yaklaşık %12'si negatif yüklü amino asit kalıntılarından oluşur (özellikle glutamik ve aspartik asit), ve yaklaşık %11'i leusin,

izolösün, metiyonin ve valin gibi hidrofobik kalıntılardan oluşur (Şekil 2.5) (Elzoghby, 2013).

Jelatin birçok gıda ve ilaç ürünlerinin yapımında kullanılmakta olup yara örtüsü polimer malzemelerinde de tercih edilmektedir. Jelatin, güçlü, homojen, açık ve orta derecede esnek kaplamalar oluşturur, suyu kolayca şişirir ve emer (Keenan, 2000).



Şekil 2.5. Jelatin α -zincirinin bir parçasının örnek kimyasal yapısı

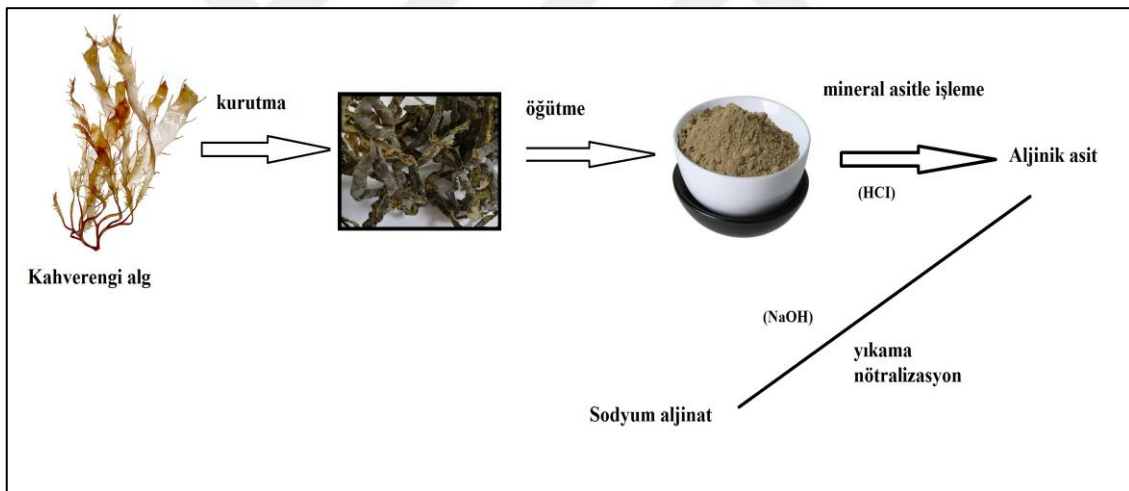
Yara örtüsü polimer malzemelerde kullanılmasının sebebi, polimerik yapıya dayanıklılık kazandırması, biyouyumluğunun yüksek olması, hücre düzeyinde iyileştiriciliği arttırmasıdır. Ayrıca, jelatin, yaraların nemli ortamda iyileşmesine yardımcı olan bir özelliğe sahiptir. Jelatin bazlı yara örtüsü malzemeleri, yaraların iyileşme sürecini hızlandırır ve enfeksiyon riskini azalttığından kriyojellerde de sıklıkla tercih edilen doğal bir malzemedir (Jain ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2013).

2.3.3. Aljinat

Aljinat birçok uygulamada kullanılabilen çok yönlü polissakkaritlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu çok yönlülüğü ile bu polimer, yüzey örtüsü, kompozit iskele gibi birçok biyomühendislik uygulamasında kullanım potansiyeline sahiptir (Tripathi ve Kumar, 2011). Aljinat kahverengi deniz yosunlarından üretilen, polianyonik kopolimer ailesine dahil olan ve çapraz bağ oluşturma yeteneği ile oluşan herhangi bir yara lezyonunu uygun nem sağlayarak ve uygun sıcaklıkta tutan bir katman görevi görerek iyileştirme potansiyeli olan biyouyumlu bir malzemedir (Peng ve ark., 2012; Catanzano ve ark. 2015). Çeşitli kahverengi alg türlerinin hücre duvarından sentezlenebilir. *Laminaria hyperborea*, *Ecklonia maxima*, *Ascophyllum nodosum*, *Eisenia bicyclis* ve *Macrocystis pyrifera* gibi türler aljinat sentezlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca, çeşitli bakteri

türlerinden de (*Azotobacter* ve *Pseudomonas*) aljinat sentezlenebilir (Freund ve ark., 2022).

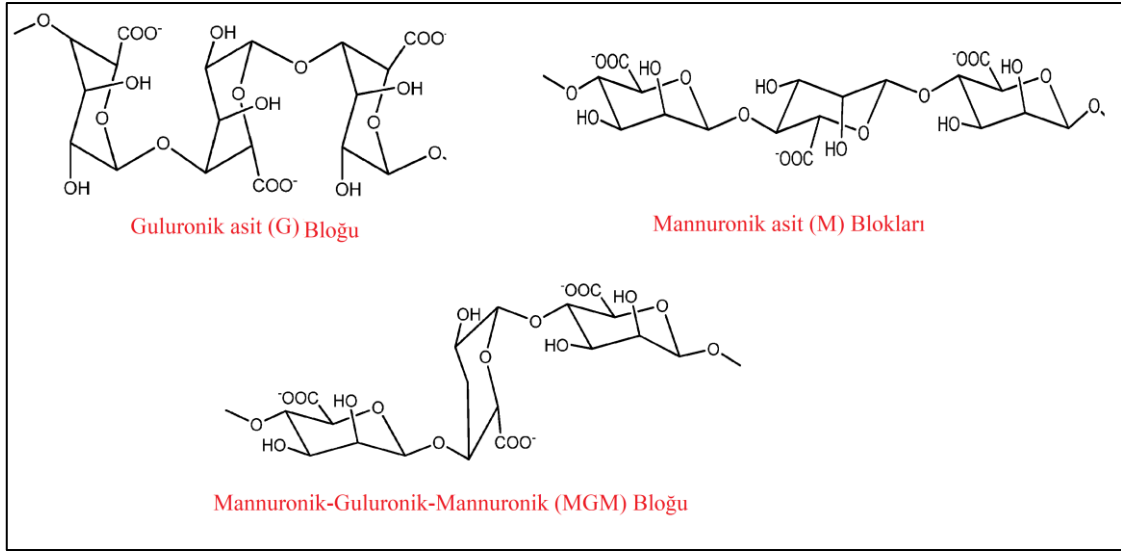
Aljinat ekstraksiyon süreci birden fazla adımdan oluşur (Şekil 2.6). İlk adımda, ham yosun malzemeleri mekanik olarak hasat edilir ve kurutulur. Ancak *M. pyrifera* adlı yosun türü, ıslak koşullarda işlenir. Kurutulmuş yosun malzemeleri mineral asitlerle işlenerek karşı iyonlarının uzaklaştırılması sağlanır. İkinci adımda, aljinat, aljinik asidin çözünmeyen fraksiyonlarının nötralizasyon yöntemiyle çözülebilmesi için ekstrakte edilir. Sodyum hidroksit veya sodyum karbonat gibi alkali maddeler kullanılarak aljinik asidin nötralize edilmesi gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda oluşan çözeltideki çökeltiler, santrifüj veya flotasyon gibi ayırım yöntemleriyle ayrıştırılır. Daha sonra, çökeltiler mineral asitler veya alkoller kullanılarak işlenerek sodyum aljinat elde edilir. Bu adımda, aljinat içinde bulunabilecek potansiyel kirlilik maddeleri olan laminarin ve fukoidin gibi homopolisakkaritlerin ortadan kaldırılması hedeflenmektedir (Hasnain ve ark., 2020).



Şekil 2.6. Sodyum aljinatın elde edilme süreci

Biyomalzemelerin oluşturulmasında iyonik çapraz bağlı polimer olarak aljinat kullanılır. Mannuronik asitler (M birimleri) ve guluronik asitlerden (G birimleri) oluşan bir polisakkarit olan aljinat, ardışık M birimleri, ardışık G birimleri ve birbirini izleyen M ve G birimlerinden oluşan bloklardan oluşur (MG blokları) (Şekil 2.7). Bir çözeltide, G blokları kalsiyum (Ca) gibi çok değerlikli katyonlarla iyonik çapraz bağlar oluşturarak hidrojellerin oluşumuna neden olur. Ayrıca, aljinat jellerin iyonik çapraz bağ yoğunluğu, çok değerlikli katyonlar ile modüle edilebilir. Spesifik olarak, üç değerlikli Fe^{3+} ve Al^{3+} katyonlu aljinat jeller, iki değerlikli katyonlara sahip olanlardan daha yüksek sertlik sergilemektedir (Kim ve ark., 2019). Ayrıca, aljinat çözeltilerinin viskozitesi, pH değeri

düştükçe artar ve pH = 3-3.5 civarında maksimum değere ulaşır. Bu durum, aljinat yapısındaki karboksilat gruplarının protonlanması ve hidrojen bağları oluşturması nedeniyle gerçekleşir. Bu nedenle, aljinatın çapraz bağ oluşturma için en uygun pH aralığı asidik bölgelerde denilebilir (Lee ve Mooney, 2012).



Şekil 2.7. Aljinatı oluşturan kimyasal birimler (guluronic asit (G) ve mannuronik asit (M) blokları ve MGM Bloğu)

Malzemeye mukavemet kazandırma özelliği sayesinde aljinat jellerin kanıtlanmış biyoyumluluğu, yara örtüleri, farmasötikler, hücre kültürü ve doku rejenerasyonu gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımlarını mümkün kılar. Ayrıca aljinatın özellikle yara iyileşmesinde kullanımı tümör nekroz faktörü (TNF- α) üretimi ile yara makrofajlarını aktive etmesi ile olmuştur. Bu sayede yara iyileşmesini hızlandırarak enflamatuvar sinyalleri başlattığı da bildirilmiştir (Thomas ve ark., 2000).

2.3.4. Kitosan

Son zamanlarda, farmasötik uygulamalarda, polimer malzemelerde ve ilaç salım uygulamalarında kitosan dikkate değer bir malzeme olarak uygulanmaya başlanmış; emilimi artırıcı, kontrollü salım ve biyoyumlu özelliklerine odaklanmıştır. Kitosan, d-glukozamin ve N-asetil-d-glukozamin içeren lineer bir polisakkarittir. Doğal bir kaynaktan sentezlenen bu polimerin hem biyoyumluluk hem de biyolojik olarak parçalanabilir olduğu gösterilmiş ve bu özellikleri ile yara örtüsü modellerinde de sıklıkla tercih edilmeye başlamıştır. Geniş bir doğal yayılımı olan kitinin (kabuklu deniz hayvanları, böcekler ve belirli mantarlarda bulunur) deasetilasyonu ile kolayca elde edilir (Dodan ve Vilivalam, 1998; Wang ve ark., 2016).

2.3.5. Bitki Ekstratları ve Yağları

Bitkilerde bulunan flavonoid veya biflavonoidler antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile terapötik çalışmalarda kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Mohammadinejad, 2019).

Bitki bazlı kimyasal bileşikler, birincil ve ikincil metabolitler olarak sınıflandırılabilirler. İkincil metabolitler, terpenoidler (bitki uçucuları, karotenoidler, steroidler vb.), fenolikler (tanenler ve ligninler vb.) ve nitrojen içeren bileşikler gibi birçok karasal bitkide bulunur. Botanik ekşiyanlar, hücre duvarları, gövde eksüdatları ve deniz yosunları gibi bir bitkinin farklı kısımlarından kaynaklanan organik maddelerdir (Mohammadinejad, 2019). Bu metabolitlerin yoğunlukla bulunduğu bitki özütleri ve yağları, bitkilerin farklı bölgelerinden elde edilmekte ve tedavi amacıyla kullanılabilir. Bitkilerin tedavi edici etkisini yara örtüsü ile birleştirmek mümkündür. Antibakteriyel, antiviral, antifungal etkisi olan, yara iyileştirici, kan durdurucu özelliğe sahip bitkisel içerikler polimer malzemeler veya diğer yara örtülerinin etkinliğini artırmaktadır.

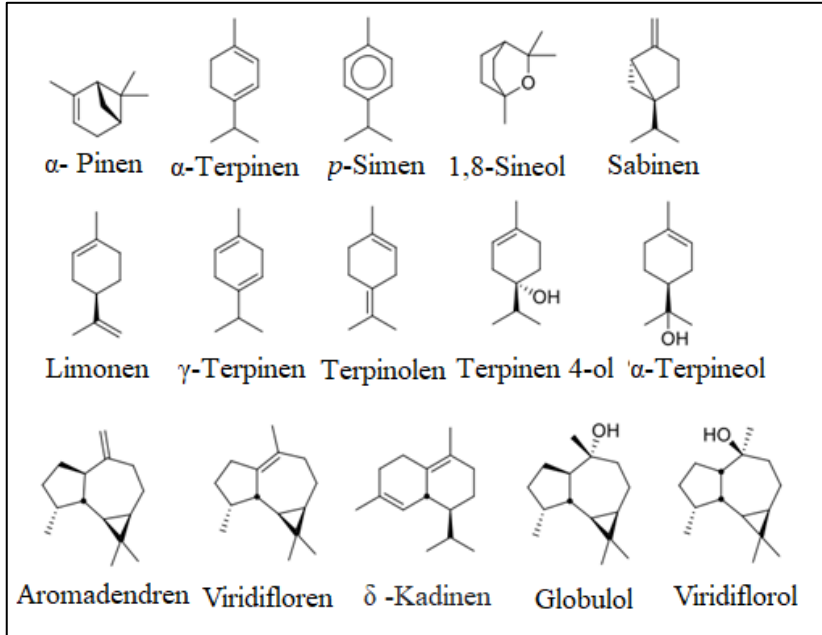
Alternatif tıp alanında kullanılan esansiyel yağlar, bitkisel materyallerin damıtılması yoluyla elde edilirler ve binlerce yıldır hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır. Esansiyel yağlar cilde topikal olarak uygulandığında, kısa bir süre içinde cilt tarafından emilerek kana karışırlar (Teissedre ve Waterhouse, 2000; Pazyar ve ark., 2013).

2.3.5.1. Çay Ağacı (*Melaleuca alternifolia*) Yağı ve Özellikleri

Melaleuca alternifolia (çay ağacı), güçlü anti-enflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklere sahip Avustralya ve Yeni Zelanda'da yetişen bir bitkidir ve bileşenlerinin zenginliği nedeniyle çoğunlukla yağ formunda kullanılmaktadır.

Ticari çay ağacı yağlarında bulunan bileşenler ISO/FDIS 4730:2004'e göre düzenlenmektedir. ISO/FDIS 4730:2004 (Uluslararası Standart Organizasyonu), çay ağacı yağının gerçek bir yağ olarak kabul edilmesi için gerekli bileşenleri belirtmektedir (Şekil 2.8). Buna göre, çay ağacı yağında bulunan temel bileşenler, α - pinen (%1-6), sabinen (% 0- 3,5), α -terpinen (%5- 13), *p*-simen (%0,5- 8), 1,8-sineol (%0- 15), limonen (% 0,5- 1,5), γ -terpinen (%10- 28), terpinolen (%1,5- 5), terpinen 4-ol (%30- 48), α -terpineol (%1,5- 8), aromadendren (%0- 3), viridifloren (%0- 3), δ -kadinen (%0- 3), globulol (%0- 1) ve viridiflorol (%0- 1)'dir. Bu bileşenler, terpenlerin ve bunlara karşılık gelen alkol grupları olmakla birlikte, ana bileşen terpinen-4-ol metabolitidir (Avonto ve ark., 2016).

ISO 4730 tarafından belirtilen oranlar esas alındığında, *M. alternifolia* ticari uçucu yağı minimum %30,0 terpinen-4-ol bileşimine sahip olması ve antiseptik özelliği korumak için 1,8 sineol seviyesinin %15,0'i geçmemesi gereklidir (Silva ve ark., 2007).



Şekil 2.8. ISO/FDIS 4730:2004 standartlarına göre çay ağacı yağında bulunan bileşenlerin kimyasal formülleri

M. alternifolia'dan elde edilen yağ, dermatolojik uygulamalarda kullanılan ve birçok cilt hastalığının ve enfeksiyonun iyileşmesini etkili bir şekilde sağlayan esansiyel bir yağdır. Yağda bulunan temel metabolit terpinen-4-ol antimikrobiyal özellikleri nedeniyle bir çok cilt ürünüde kullanılmış olup, iyileştirici özelliği nedeniyle son yıllarda malzeme olarak araştırılmaktadır (Frag ve ark., 2004).

Çay ağacı yağının antibakteriyel aktivitesi suya karşı itici olan terpen bileşiklerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu hidrofobik terpenler, bakteri hücre zarını bozan ve geçirgenliğini etkileyen lipidler içerir (Cox ve ark., 2001). Bu nedenle, gram negatif bakterilerin gram pozitiflere göre uçucu yağlara karşı daha dirençli olduğu düşünülmektedir (Nazzaro ve ark., 2013). Bu durumun sebebi gram negatif bakterilerin daha karmaşık bir hücre duvarına sahip olmasıdır. Bu kompleks yapı ilaçların, antibiyotiklerin ve esansiyel (uçucu) yağlarda bulunan fenolik bileşiklerin yapıya kolayca nüfuz etmesine izin vermemektedir (Trombetta ve ark., 2005).

2.4. Yaralanma ve Yara Çeşitleri

Günümüzde yara iyileşmesi klinik bir problem olmaya devam etmektedir. Yara iyileşmesi karmaşık ve dinamik bir süreçtir ve yara bölgelerinde benzersiz mikro çevre

oluşturan bir dizi olayı içermektedir. Yara yükünü azaltmak için iyileşmenin fizyolojisini anlamaya ve yara bakımına odaklanarak yeni terapötik yaklaşımların, akut ve uzun vadeli yara yönetimi için teknolojilerin sürekli geliştirilmesine önemli çaba harcanmaktadır (Velnar ve ark., 2009). Nihai iyileşme etkinliğini arttırmak için tüm iyileşme süreçlerinde rollerini oynayabilecek çok işlevli deri örtülerinin geliştirilmesi bu hedefi desteklemektedir (Han ve ark., 2019).

2.4.1. Yara Tanımı ve Yara İyileşme Süreçleri

Yara, normal anatomik yapı ve işlevde bir tür bozulma ya da hasarlanma durumudur. Bu hasarlanma, ciltteki epitel bütünlüğündeki basit bir kırıktan daha derin olabilir ve subkutanöz dokuya kadar ilerleyerek tendonlar, kaslar, damarlar, sinirler, parenkimal organlar ve hatta kemik gibi diğer yapıların da zarar görmesine sebep olabilir. Yaralar, etkilenen organın içerisinde veya dışarıdan başlayan patolojik süreçlerden kaynaklanabilirler. Kazayla veya kasıtlı bir sebepten ortaya çıkabilecekleri gibi, bir hastalık sürecinin sonucu da olabilirler. Nedeni ne olursa olsun, yara dokuyu hasarlayarak ve içindeki doğal ortamı bozarak meydana gelir. Zararlı faktöre karşı fizyolojik bir tepki, kanama, damarların kasılması ve pıhtılaşması, komplement aktivasyonu ve inflammatuar bir yanıt şeklinde ortaya çıkar (Velnar ve ark., 2009).

Normal yara iyileşmesi, kanama, pıhtılaşma, ilk hasara karşı akut inflammatuar bir yanıtın başlatılması, bağ dokusu ve parenkimal hücrelerin rejenerasyonu, hücrelerin göçü ve proliferasyonu, ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi, yeni parankimal ve bağ dokusunun yeniden yapılanması ve kollajen birikmesi gibi bir dizi koordine edilmiş olayı içeren dinamik ve kompleks bir süreçtir. İyileşme süreci bu düzen ile gerçekleşir ve yaralanmış dokuların tamiriyle sonuçlanır (Strecker-McGraw ve ark., 2007).

Yaralanmadan sonra doku bütünlüğünü ve homeostazı yeniden sağlamak için çeşitli hücre tipleri ve yolları aracılığıyla aktive edilen karmaşık bir fizyolojik süreç olan yara iyileşmesi, dört farklı aşamadan oluşur. Bu aşamalar, i) koagülasyon ve hemostaz fazı, ii) enflamasyon, iii) yeni dokuların ve kan damarlarının olduğu proliferasyon ve iv) yeni dokuların yeniden şekillendirilmesinin gerçekleştiği maturasyon fazıdır. Bu mekanizmalar fiziksel yaralanma anında başlatılır ve onarım süreci boyunca sürekli olarak devam eder. Bu süreçte çeşitli hücre tipleri (endotelial hücreler, keratinositler ve fibroblastlar, bağışıklık hücreleri) yer almaktadır (Pancur ve ark., 2022). Bu bağlamda bu fazlar büyük ölçüde bağışıklık hücreleri ve sinyal moleküllerinin aracılık ettiği bir dizi olaydan kaynaklanır (Şekil 2.9). Hem hasarlı ekstraselüler matriks (ECM) hem de dokuda

yerleşik hücrelerden gelen sinyallere yanıt olarak trombositler ve bağışıklık hücreleri yara bölgesinde adım adım birikir. Trombositler ilk gelen hücrelerdir ve bu noktada daha fazla kan kaybını önlemek için pıhtılaşma kaskadını başlatmaya yardımcı olurlar ve daha fazla hücre infiltrasyonu için geçici bir ECM sağlarlar. Ayrıca, dönüştürücü büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörlerini (PDGF) salgılayarak, fibroblastların ve mezenkimal hücrelerin aktivasyonunun yanı sıra nötrofillerin ve makrofajların toplanması ve aktivasyonunda kritik bir rol oynarlar. Ayrıca, trombositlerin hatalı çalışması düzenlenemeyen yara iyileşmesi ile ilişkilidir.

Yara rejenerasyonu söz konusu olduğunda dokular arasında bazı farklılıklar da olmaktadır. Yara iyileşme süresi çeşitlilik gösterir ve bazı yaraların tamamen iyileşmesi bir yıl veya daha uzun sürebilir. Tamamen iyileşmiş bir yara, dokunun normal anatomik yapı, işlev ve görünümüne makul bir sürede geri döndürülmüş olan yaradır. Çoğu yara genellikle basit yaralanmaların sonucudur (Velnar ve ark., 2009).

2.4.2. Yara Çeşitleri

Yaraları farklı kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Yaralanma şekli ve yara iyileşmesi açısından zaman önemli bir faktördür. Bu nedenle, yaralar iyileşme süreleri açısından akut ve kronik yaralanma olarak olarak sınıflandırılabilir (Robson, 2001).

Beş ana büyüme faktörü ailesinin her birinden (Epidermal büyüme faktörü [EGF], Trombosit kökenli büyüme faktörü [PDGF], İnsüline benzer büyüme faktörü [IGF], Dönüştürücü büyüme faktörü [TGF- β] ve fibroblast büyüme faktörü [FGF]) gelen proteinler, yara modelleri için *in vitro* ortamda önemli kemotaktik aktiviteye sahiptir. İlginçtir ki, büyüme faktörleri genellikle çektiikleri hücre türü açısından belli bir seçiciliğe sahiptirler. Örneğin, TGF- β insan periferik kan monositleri için son derece etkili bir kemotaktik faktördür. PDGF fibroblastlar için kemotaktiktir ancak monositler için değildir, FGF ve IGF-I vasküler endotel hücreler için kemotaktiktir ve EGF epitel hücrelerinin kemotaktik göçünü uyarır (Bennet ve Schultz, 1993).

2.4.2.1. Akut Yara

Kendiliğinden iyileşen ve zamanında ve düzenli bir iyileşme sürecini takip ederek hem fonksiyonel hem de anatomik restorasyona neden olan yaralar akut yaralar olarak sınıflandırılır. İyileşme süreci genellikle 5 ila 10 gün veya 30 gün içinde tamamlanır. Akut yaralar, doku kaybının travmatik bir sonucu veya cerrahi bir işlem sonucu edinilebilir. Örneğin, ameliyat yaraları, sıyrıklar ve çizikler, çatlamlar, yanıklar, silah yaralanmaları gibi yaralar akut yara olarak kabul edilmektedir (Koyutürk ve Soyaslan, 2016).

Akut yara iyileşmesi, üst üste binen dört aşamaya bölünmüş iyi koordine edilmiş bir dizi olaydan kaynaklanır: hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon/matris birikimi ve doku yeniden şekillenmesi bu mekanizmalardır (Larouche ve ark., 2018). Nötrofiller ve makrofajlar bu sürece aracılık etmede özellikle önemlidir ancak T hücreleri ve trombositler de özellikle önemli roller oynamaktadır (Şekil 2.9.(a)). Başlangıçta, bağışıklık hücreleri yara bölgesine göç eder ve enfeksiyonla mücadele etmenin yanı sıra, iyileşme sürecini de yönetirler. Cildin ilk yaralanması meydana geldiğinde keratinositler bir interlökin-1 (IL-1) deposunu serbest bırakır. Bu proenflamatuvar sitokin iyileşme kaskadının başlatılmasında önemlidir. Hemostaz aşamasından enflamatuvar (iltihaplanma) evreye geçiş sırasında salınan diğer sitokinler arasında; fibroblast büyümesi ve işlevinin yanı sıra, yeni doku oluşumunu teşvik eden önemli bir madde olan EGF ve PDGF yer alır. Nötrofil, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu enflamatuvar aşamanın başlangıcını işaret eder. Makrofajlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin üretilmesiyle doku iyileşmesinde önemli bir rol oynarlar.

Yaranın iyileşmesi, proliferatif aşamada yaranın yüzeyini kaplamak ve vasküler ağı yeniden oluşturmak için granülasyon dokusu üretmek üzerine odaklanır. Bu aşamada geçici bir matris üzerinde epitel proliferasyonu gerçekleşir.

Makrofaj sayısındaki azalma veya işlev bozukluğu yara kapanmasını bozabilir ve granülasyon dokusunun gecikmeli oluşumuna neden olabilir. Bu aşamada, fibroblastlar ve endotelial hücreler kapiller gelişimi, kollajen oluşumunu ve granülasyon dokusu oluşumunu destekleyen baskın hücre tipleridir.

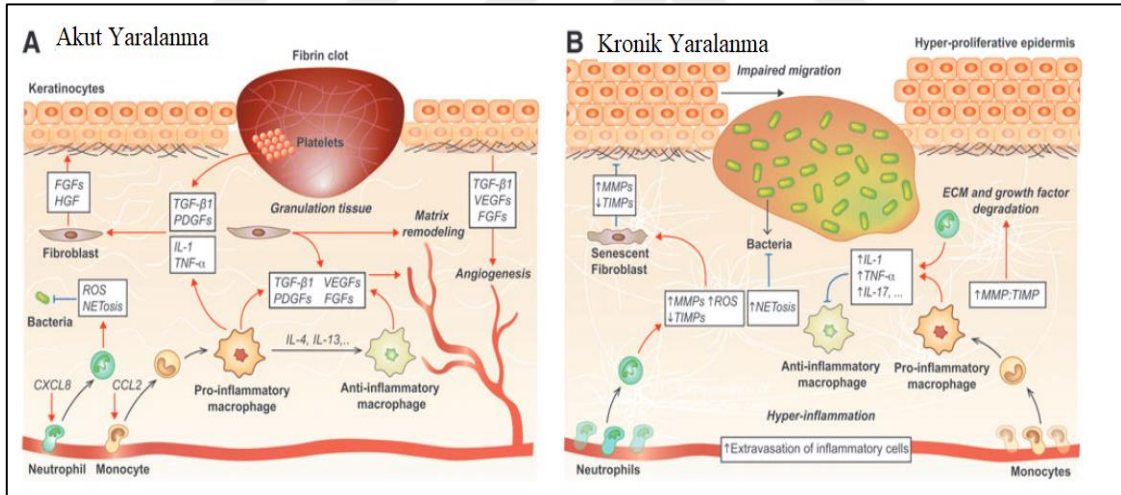
Bazı fibroblastlar miyofibroblastlara farklılaşırlar. Miyofibroblastlar kasılabilen hücrelerdir ve bu nedenle yaranın kasılması, yeniden modelleme veya olgunlaşma aşamasına, yani iyileşmenin son aşamasına yol açar. Olgunlaşma veya yeniden şekillenme aşaması, özellikle geniş cilt yüzeylerini içeren tam kalınlıkta yaralarda 1 yıldan daha uzun sürebilir. Bu süre zarfında granülasyon dokusu oluşumu, makrofajlar, endotelial hücreler ve miyofibroblastların apoptozu veya yaradan çıkışı ile birlikte gerçekleşir. Yaraların iyileşme hızları sinirlerin dağılımı ile pozitif bir korelasyon gösterir (Martin ve Nunan, 2015).

2.4.2.2. Kronik Yara

Kronik yaralar uzun süre içinde iyileşmeyen yaralardır. Bu süre üç ayı bulabilir. Kronik yaralarda yaraya sebep olan faktör sürekli olduğundan dolayı bu yaralar yavaş iyileşen

hatta duruma göre iyileşmeyen yaralardır. Bu tür yaralarda yara tekrar eder ve iyileşmeyi engelleyen birçok etken olabilir (Koyutürk ve Soyaslan, 2016).

Akut yaraların aksine kronik yaralar çözilemeyen patolojik süreçlerle karakterize edilir ve sürekli inflamasyon, kalıcı enfeksiyonlar ve nekroz gibi özellikler gösterirler. Yara iyileşmesi sırasında bağışıklık yanıtının düzensizleşmesi kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olur. Kronik yaralarda, inflamatuvar aşama çözilemez ve iyileşme zayıf ve gecikir. Bu tür yaralardaki sürekli inflamasyon birkaç özelliğe sahiptir. Özellikle pro-inflamatuvar makrofajların miktarı aşırıdır, anti-inflamatuvar fenotipli makrofaj miktarı ise düşüktür (Raziyeva ve ark., 2021). Bunun dışında kronik yaralarda bulunan makrofajların ölü nötrofilleri temizleme kapasitesi sınırlıdır. Bu durum, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interleukin-1 β (IL-1 β) gibi inflamatuvar aracı maddelerin aşırı miktarda bulunduğu yüksek inflamasyon ortamının oluşmasına neden olur (Şekil 2.9.(b)). Dahası, kronik yara makrofajları ECM parçalayan birkaç matriks metalloproteinaz (MMP), özellikle MMP-2 ve MMP-9 salgılarlar ve iyileşmenin proliferatif aşamasının başlamasını önlerler (Larouche ve ark., 2018; Krzyszczyk ve ark., 2018).



Şekil 2.9. Akut ve kronik yaranın iyileşmesi ve yara iyileşmesinin genel mekanizmaları, a) akut yara iyileşmesi mekanizması, b) kronik yara iyileşmesi mekanizması (Larouche ve ark., 2018).

Yaralar iyileşme mekanizmalarının dışında kalınlıklarına, travmaya (deri bütünlüğünün bozulması), travmanın meydana gelmesinden sonra geçen zamana, morfolojilerine ve şiddetlerine göre de sınıflandırılabilir.

a) Yaranın kalınlığına göre:

- ✓ Yüzeysel yaralar sadece epidermis ve dermisin dermal papillalara kadar olan kısmını içeren yaralardır.
- ✓ Kısmi kalınlıkta yaralar alt dermise kadar cilt kaybını içeren yaralardır (cildin bir kısmı kalır).
- ✓ Tam kalınlıkta yaralar cilt ve subkutanöz dokuyu içeren yaralardır (doku kaybı oluşur ve cilt kenarları aralıktır).
- ✓ Derin yaralar, kan damarlarının ve sinirlerin kesilmesi gibi karmaşık yaraları, doğal boşluklara nüfuz eden yaraları ve organ veya dokuya nüfuz eden yaraları içerir.

b) Diğer yapıların dahil olmasına göre:

- ✓ Basit yaralar yalnızca 1 organ veya dokuyu içeren yaralardır.
- ✓ Kombine yaralar (örneğin, karışık doku travması)

c) Travmanın meydana gelmesinden geçen süreye göre:

- ✓ Taze yaralar, travmadan itibaren 8 sa içinde oluşan yaralardır.
- ✓ Eski yaralar, travmadan 8 sa sonra veya deri bütünlüğünün bozulmasından sonra oluşan yaralardır.

d) Morfolojiye göre:

- ✓ Sıyrıklar, aynı bir ipin yarattığı gibi, cildin bir başka yüzeyle sürtünmesi sonucu meydana gelen ve cildin dökülmesi ile karakterize olan yaralanmalardır, örneğin ip yanıkları ve çizik dizler.
- ✓ Kopmalar bir yapı veya bir bölümü zorla çekildiğinde meydana gelir, örneğin kalıcı bir dişin veya kulak memesinin kaybı; hayvan ısırıkları kopmalara neden olabilir.
- ✓ Kesik yaralar, genellikle cerrahi müdahale sonucu oluşabilen yaralardır; keskin bir alet tarafından oluşturulan temiz bir kesimdir, koşullara bağlı olarak yara steril veya enfekte olabilir.
- ✓ Kesikler, keskin bir aletle yapılan kesici yaralanmalardır, düzgün kenarlar bırakarak kağıt kesiminden cerrahi kesime kadar her türlü boyutta olabilirler.

- ✓ Ezik yaralar, ağır bir nesnenin bir kişinin üzerine düşmesiyle oluşur, cildi parçalar ve altındaki yapıları parçalar veya yırtar (örneğin balta, kılıç).
- ✓ Dilimleme yaraları (örneğin, epikraniyal epinörozun koparılmasıdır)
- ✓ Cildin kırıldığı ve yaraya neden olan etkenin deri altı dokuya veya derin bir yapıya veya boşluğa girdiği nüfuz edici yaralar (bir çivi, kılcal damar veya sivri uçlu bir nesnenin yol açtığı yaralar)
- ✓ Delici yaralar çiviler, bıçaklar ve kırık camlar gibi keskin nesnelerle oluşan derin ve dar yaralar
- ✓ Cildin hasar gördüğü ve parçalandığı açık yaralar (kontüzyonlar), silah yaraları, kesilmiş veya yırtılmış yaralar örnek verilebilir.

Ayrıca keskin bir alet veya silahla yapılan bıçak yarası, mermi yarası, ısırık yarası, zehirli yaralar da örnek verilebilir (Suvarna ve Munira, 2013).

2.4.3. Yara Bakımında Yara Örtüleri ve Acil Müdahalede Kullanımı

Yara türü ne olursa olsun yara olan yüzeyi dış etkilere korumak gereklidir. Bunun için farklı malzemelerden yapılan yara örtüleri kullanılabilir. Yara örtüleri, yaraların tipine ve fizyolojik iyileşme aşamasına göre belirli özelliklere sahip, lokal terapötik ajanlardır ve yara iyileşmesi için optimal bir ortam oluşturmayı amaçlar. Yara örtülerinin ideal özellikleri, doğrudan yaranın tipine ve fizyolojik özelliklerine bağlıdır. İdeal bir yara örtüsünün genel özellikleri, yüzeyin nemli ortamını muhafaza etmesi, mekanik bir bariyer görevi görmesi ve termal izolasyon sağlaması, sekonder enfeksiyonlara karşı antibakteriyel, antiviral veya antifungal koruma sağlaması, yüzeydeki gaz değişimine olanak tanınması ve hava alan bir yüzey imkanı sağlaması, kanı, eksudatları ve mikroorganizmaları emebilmesi, biyouyumlu olması, toksik etkisinin olmaması ve uygun maliyetli olmasıdır (Lawrence ve Diegelmann, 1994; Murray ve ark., 2019).

Yara örtüleri, çeşitli malzemeler ve farklı bileşenler kullanılarak üretilmektedir. Örneğin, fiber matlar ve hidrojeller, kriyojeller gibi malzemeler tercih edilebilir ve bitkisel destekler, lifler, gümüş gibi antimikrobiyal özelliklere sahip materyaller de ilave edilerek hem yapısal dayanıklılığı hem de antibakteriyel özellikleri geliştirilebilir. Geleneksel yara örtülerinin yanı sıra son yıllarda biyoteknolojik gelişmelerden yararlanılarak geliştirilen yara örtüleri ise, hücresel göçten ECM bileşenlerinin üretimine kadar yara iyileşme sürecini aktive eden veya teşvik eden biyolojik maddelerin

entegrasyonu konusunda önemli ilerlemeler kaydetmiştir (Mohammadinejad ve ark., 2019; Murray ve ark., 2019).

Hasarlı kan damarlarındaki kanamanın durmasını sağlayan fizyolojik bir süreç olan hemostaz, pıhtı oluşumu yoluyla gerçekleşir ve yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır. Vücudun doğal hemostaz süreci büyük travma, kaza veya tıbbi operasyonlar gibi kontrolsüz kanama durumlarında devam eder. Ancak, bu durumlarda hemostaz süreci kanamayı yeterince kontrol edemez ve ciddi kan kaybına ve yara iyileşmesinin gecikmesine yol açabilir (Pourshahrestani ve ark., 2020).

Hemostatik teknolojilerin temel amacı, acil durumlarda kullanılabilen ve yaralanmalarda deri üzerine uygulanabilen bir yöntem olmaktır. Bandaj, yara bandı ve turnike pansuman gibi dışarıdan erişilebilen malzemeler kullanarak bu amaca hizmet ederler. Hemostatik polimerik sistemler, jelatin, aljinat, keratin, ipek, kitosan, hyaluronik asit, karagenan ve polietilenglikol bazlı polimer malzemelerden (hidrojel, kriyojel vb.) oluşur ve bu malzemelerin kullanımı son dönemde araştırmaların odağı haline gelmiştir (Huang ve ark., 2016).

Buna bağlı olarak yara örtüleri, bir yaralanma sonrasında ilk yardım müdahalesinde kullanılması gereken önemli araçlardan biridir. Yaralanma anında, yaralı bölgenin temizlenmesi ve enfeksiyon riskinin azaltılması önemlidir. Bu nedenle, bir yara örtüsü kullanarak yarayı temizlenebilir ve enfeksiyon riskini azaltılabilir. Ayrıca, yara örtüleri kanamayı durdurmak için de kullanılabilir. Özellikle, kriyojellerin makroporlu yapısı kanama kontrolü için son derece etkilidir. Kriyojel, yaralı bölgeye uygulandığında gözenekli yapısı sayesinde kanın pıhtılaşmasına yardımcı olur ve kanama kontrolü sağlar. Bu nedenle, akıllı yara örtüleri, ilk yardım müdahalesi sırasında kullanıldığında, yaralanmanın tedavisi için önemli bir araçtır ve yaralanmanın iyileşme sürecini hızlandırabilir (Zou ve ark., 2022).

2.5. Yara İyileşmesinde Bitki Bazlı Yara Örtüsü Çalışmaları

Yara örtüsü olarak polimer malzemelerinin kullanımıyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Buna rağmen yara örtüsü olarak bitkisel yağların kullanıldığı kriyojel çalışmaları az sayıdadır. Çay ağacı yağı içeren kriyojel çalışmasına ise literatürde rastlanmamıştır. Bu anlamda bu doktora çalışmasında geliştirilen çay ağacı yağı içeren kriyojel özgün bir çalışma niteliğindedir.

Bu anlamda yapılan ve araştırmamıza en yakın bulunan bazı çalışmalar derlenmiştir. Çay ağacı yağının antibakteriyel etkinliğinden faydalanmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Edwards-Jones ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, yalnız başına ve kombinasyonlar halinde, paçuli, çay ağacı, sardunya, lavanta esansiyel yağları ve CitricidalTM (greyfurt tohumu özü) antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildi. Çalışmada, çay ağacı yağının, yalnız kullanıldığında MRSA (metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) büyümesini önlemede özellikle etkili olduğu bulundu.

Chin ve Cordell tarafından yapılan bir çalışma farklı yaş gruplarından ve cinsiyetlerden 10 katılımcı ile gerçekleştirildi. In vivo çalışmada, *M. alternifolia* ile yapılan yara örtüsünün, kontrol grubuna kıyasla iyileşme süresini kısalttığı gözlemlendi. Bu durumda *M. alternifolia*'nın önceki *in vitro* çalışmasının sonuçları da *in vivo* olarak desteklenmiştir (Chin ve Cordell 2013). Bu çalışma *M. alternifolia* bitkisinin yara iyileşmesinde destek olarak kullanılabileceği ile sonuçlanmıştır.

2015 yılında yapılan bir çalışmada, yara iyileşmesi için çay ağacı yağı nanokapsülleri ve nanoemülsiyonlar içeren antidemojenik hidrojeller geliştirilmiştir (Flores ve ark., 2015). Bu çalışmada, UVB etkisinden kaynaklanan cilt hasarını korumak ve kesikli yaraların iyileşmesini değerlendirmek için geliştirilen hidrojellerin *in vivo* etkinliği değerlendirilmeyi amaçlanmıştır. Kesikli yara tipinde iyileşme farelerde değerlendirilmiş ve yağın iyileşme sürecinde biyolojik aktiviteyi arttırdığı ve UVA kaynaklı radyasyon nedeniyle oluşan cilt hasarı ve ödemi azalttığı gözlemlenmiştir.

Beyranvand ve ark. (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Satureja khuzistanica* bitkisinin yaprak ve kök bölgesinde elde edilen özütünün hidrojel aljinat içinde kapsülasyonunun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi değerlendirildi. Buna göre boyun derisinde bir delik yarası oluşturulan otuz iki erkek Wistar sıçanı, kontrol grubu, *S. khuzistanica* ile tedavi edilen grup, hidrojel aljinat ile tedavi edilen grup ve *S. khuzistanica*'nın hidrojel aljinat içinde kapsüllenmiş olduğu grup olmak üzere rastgele dört gruba ayrıldı. 22 gün boyunca yapılan değerlendirmeler sonucunda, *S. khuzistanica*'nın hidrojel aljinat içinde kapsüllenmiş olduğu grubun diğer gruplara göre yüksek iyileşme gösterdiği gözlemlendi.

Bölgen ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, yara iyileşme sürecinde kullanılmak üzere kitosan (CS) içeren kantaron yağı (*Hypericum perforatum*, HP) ile kriyojel bir yara örtüsü malzemesi üretilmiştir. Çalışmanın amacının, terapötik yağların

kullanımıyla dokuların oluşumunu teşvik eden ve yara iyileşmesini hızlandıran potansiyel bir polimerik malzeme elde etmek olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda, HP yüklü kitosan kriyojel iskeleleri yüzey örtüsü olarak uzun süreli yaraların iyileştirilmesinde umut verici bir seçenek olduğu anlaşılmıştır.

Yıldırım ve Küçük (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada, St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) eklenmiş kitosan ve jelatin bazlı yüzey yara örtüsü hazırlandı. Çalışmaya göre, *Hypericum perforatum* bazlı yüzey örtüsünün iyileştirici potansiyele sahip olduğu anlaşıldı.

Zahid ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *Raphanus sativus* L. tohum özütü içeren aljinat bazlı antibakteriyel aktiviteye sahip bir yara iyileştirici hidrojel sentezlendi ve cilt lezyonlarını iyileştirme potansiyeli değerlendirildi. Çalışmada sentezlenen hidrojeller, döllemiş tavuk yumurtalarının korioallantoik membranına yerleştirildi. İyileştirme yetenekleri incelenen hidrojellerden tohum özütü içeren hidrojeller, kontrol hidrojeline kıyasla açık bir iyileştirici etki gösterirken, özüt oranı azaldıkça iyileşme oranının da azaldığı görüldü.

Mahmood ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, yara pansumanı olarak kullanılmak üzere iyonotropik jelleşme yöntemiyle hazırlanan gellan gum bazlı hidrojel filmlere ofloksasinin çay ağacı yağı veya lavanta yağı ile birlikte eşzamanlı kapsülasyonu gerçekleştirildi. Hazırlanan filmlerin esnek bir yapıya sahip olduğu ve antioksidan aktivite sergilediği gözlemlendi. Elde edilen yara örtüsünün yara üzerinde yaygın olarak bulunan gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı üstün antibakteriyel etki sağladığı görüldü. *In vitro* salım çalışmalarına göre, filmlerden başlangıçta hızlı bir salınımın gerçekleştiğini, ancak kalan kısmın kontrollü bir şekilde 48 sa boyunca salındığı gözlemlenmiş olup yağların ofloksasin salınımını etkilemediği rapor edildi. Ofloksasin ve hacimsel olarak %25 oranında lavanta/çay ağacı yağı içerecek şekilde optimize edilmiş formülasyon, *in vivo* çalışmalarda, farelerde on günlük tedavi sonrasında %98 yara iyileşmesi göstermiştir.

Meza-Vale ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada Restauder® adında geliştirilen *Aloe vera* ile geliştirilmiş hidrojel olan ticari ürünün yara iyileşmesine katkısı değerlendirildi. Çalışmada, 1,2-propanediol (propanediol) ve trietanolamin (TEA) ile formüle edilen bir hidrojel sentezlendi. Buna göre hidrojinin kesikli cilt yara iyileşmesini hızlandırıcı olarak etkinliği *in vivo* çalışmada gösterildi. Hidrojinin cilt yara iyileşme

süreci üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere topikal olarak dişi Wistar sıçanları üzerinde 2 cm kalınlığında yara oluşturuldu. Sıçanlar rastgele olarak kontrol ve hidrojelle tedavi edilenler olmak üzere 2 gruba ayrıldı. 0, 4, 8, 15 ve 21. günlerde yaranın fotoğrafı çekilip değerlendirildi. 21. gün sonunda *A. vera* içeren hidrojelin olduğu gruptaki yaranın tamamen kapandığı gözlemlendi.

2022 yılında yapılan bir başka çalışmada, karanfil yağı içeren antibakteriyel jelatin-kitosan kriyojeller tasarlanmıştır (Saha ve Tayalia, 2022). Bu çalışmada, jelatin, kitosan ve karanfil yağı kullanılarak biyoaktif bir kriyojel geliştirilmiştir. Çalışmaya göre, kriyojel antibakteriyel özelliklere sahip biyolojik olarak uyumlu bir dermal malzeme olarak kullanılabilir sonucuna varılmıştır.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda bitki kökenli bir kriyojel sentezlemek amacıyla *M. alternifolia* yağında bulunan terapötik bileşikleri kullanılması hedeflenmiştir. Kullanımı acil durumlarda hızlı ve etkili bir ilk yardım için uygun olan yeni bir antibakteriyel özelliğe sahip ve biyolojik olarak uyumlu polimer malzemesi ile literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda çay ağacı yağı içeren bir kriyojel yara örtüsünün kullanımı rapor edilmemiştir. Karşılaştırma yapmak açısından kriyojelin polimer oluşumunda jelatin ve aljinat içeren farklı gruplar oluşturuldu ve çalışma bu yönden de değerlendirildi.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda çay ağacı yağı içeren kriyojeller sentezlendi ve bu kriyojellerin karakterizasyonu yapıldı. Kriyojellerin jelleşme verimi (%), şişme oranı (%) ve makrogözenek derecesi (%) hesaplandı ve özellikleri anlaşılmaya çalışıldı. Daha sonra, FTIR (Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi ve TGA (Termogravimetrik Analiz) yapıldı. Kriyojelin makroporöz yapısı, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılarak görselleştirildi. Kriyojelin biyodegradasyon analizi (%) hesaplandı ve salım analizi (%) yapıldı. Ayrıca, kriyojelin HaCat hücreleri üzerinde canlılık analizi ve çizik testi çalışmaları yapıldı. Son olarak kan pıhtılaşma çalışmaları gerçekleştirildi.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kriyojellerin sentezinde polimer yapımı aşamasında kullanılan çay ağacı yağı %100 saflıkta olup ticari bir firmadan temin edilmiştir (Casel Ecz. Cahit Selimoğlu İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti). Monomer olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) kullanılmıştır (Sigma, St Louis, ABD). Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan polietilen glikol diakrilat (PEGDA) Sigma (St Louis, USA) firmasından, reaksiyon hızlandırıcı olarak kullanılan N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından, reaksiyon başlatıcı olarak kullanılan amonyum persulfat (APS, $\geq 98\%$), jelatin (domuz derisinden, Tip A), aljinat (kahverengi algten elde edilen aljinik asit sodyum tuzu, orta seviye viskozite) kullanıldı Sigma (St Louis, ABD). Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit (%25) Sigma (St Louis, ABD) firmasından alınmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ön hazırlık sürecinde kullanılan hekzametildisilazan (HMDS, reagent grade, $\geq 99\%$), MTT testlerinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] difenilterazolyum bromür, antibakteriyel analizler ve kriyojel salım analizinde kullanılan fosfat tamponu (PBS, 0,01M, toz halde), MTT analizinde kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) ve amonyak Sigma (St Louis, ABD) firması aracılığıyla temin edilmiştir. MTT testinde kullanılan DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium-L0103, yüksek glikoz/ stabil glutamin/ sodyum pirüvatlı) Biowest (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Çalışmalarda sterilizasyonun gerçekleştirilmesinde ve SEM örneklerinin dehidrasyonunda kullanılan etanol (farklı konsantrasyonlarda) Riedel de haen (Seelze, Almanya) firmasından alınmıştır. Antibakteriyel analizlerde kullanılan *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşları ile MTT analizinde kullanılan analizde HaCaT P/16 hücre hattı Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Kan deneylerinde kullanılan insan tam kanı Beytepe Gün Hastanesi'nden EDTA'lı tüplerle temin edilmiştir.

3.2. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması

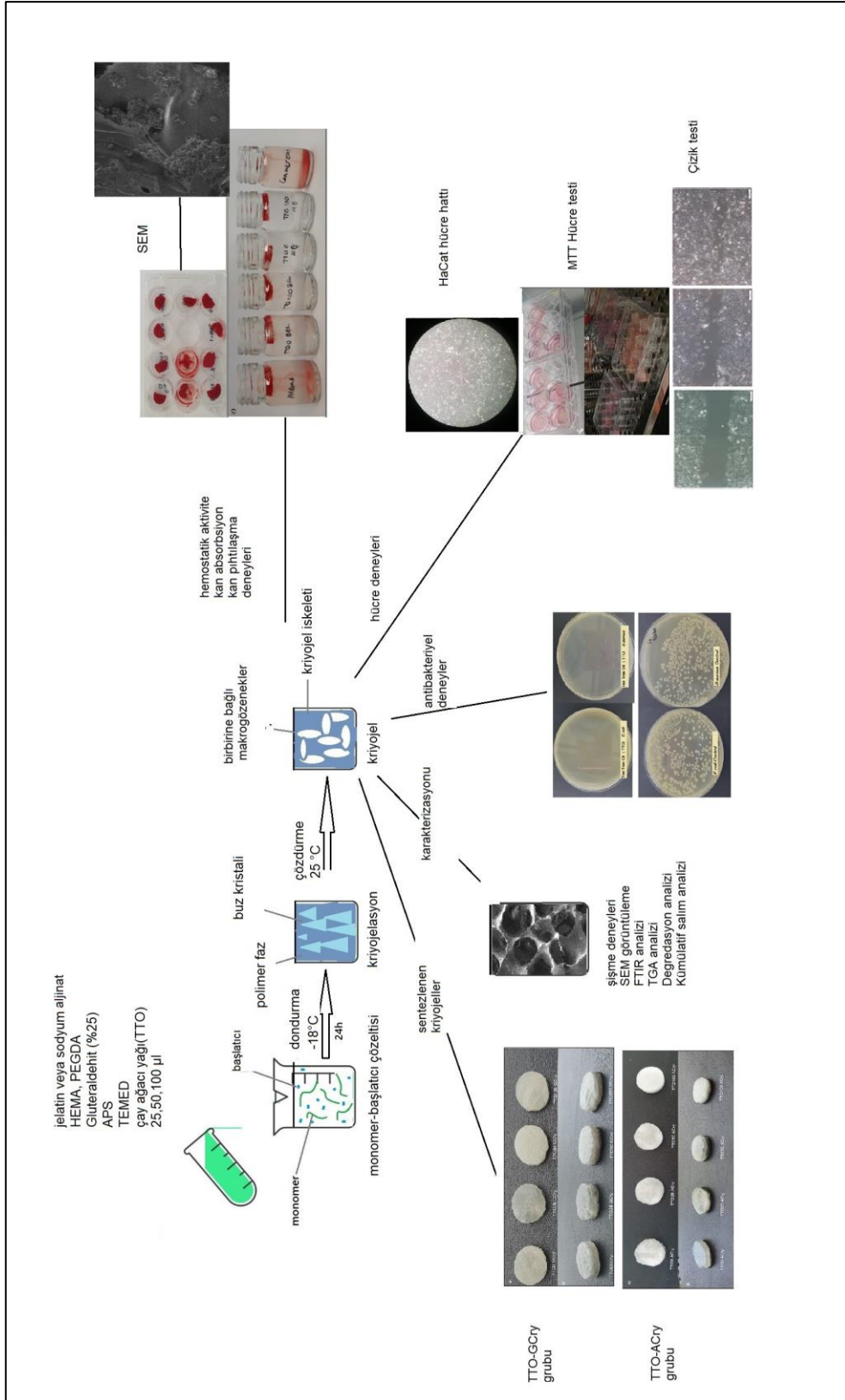
Kriyojellerin hazırlanması, karakterizasyonu (şişme deneyleri, FTIR analizi, TGA analizi, degradasyon analizi, kümülatif salım analizi), antibakteriyel deneyleri, hücre deneyleri ve kan deneylerini (hemostatik aktivite, kan absorpsiyon ve pıhtılaşma

deneyleri, SEM görüntüleme) özetleyen genel şema Şekil 3.1’de özetlenmiştir. Kriyojelin genel aşamaları Şekil 3.2 (a-e)’ de gösterilmiştir.

3.2.1. TTO-GCry Kriyojellerin Hazırlanması

Kriyojelin sentezlenme aşamasında jelatin (0.05 gr) yaklaşık 45°C ılık su içeren büyük bir beher kap içerisinde bulunan ayrı bir beher kaptaki 13,5 ml saf su ile yaklaşık 1 sa manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözdürme sonrasında, %100 saflıktaki çay ağacı yağı homojen jelatin- saf su solüsyonu içine kontrol grubu hariç 3 farklı konsantrasyonda damlatma metoduyla ilave edildi (Şekil 3.2(a)). Kontrol grubuyla birlikte (çay ağacı yağı içermeyen grup), 25, 50 ve 100 µl çay ağacı yağı içeren toplam 4 grup kriyojel oluşturulması hedeflendi. Toplam polimer çözeltisindeki çay ağacı yağı konsantrasyonları sırasıyla yaklaşık 1,67 mg/mL, 3,33 mg/mL ve 6,43 mg/mL olarak hesaplanmıştır (çay ağacı yağının yoğunluğu 0.9 g/mL olarak kabul edilmiştir).

Çözdürme sonrasında sıcak su alındı ve sırasıyla monomer HEMA (1,3 mL) ve PEGDA (0,506 mL) ilave edildi. İşlem sırasında kriyojelin oda sıcaklığında polimerleşmemesi için buzlu su ile muamele edildi. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak 25 µL gluteraldehit (%25) ilave edildi.



Şekil 3.1. TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve genel çalışmaların özeti

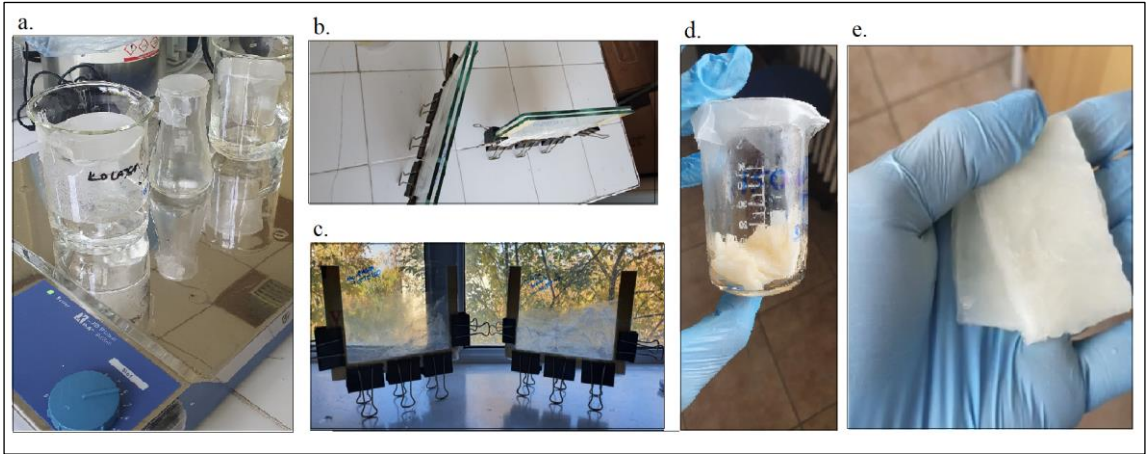
Ardından 0,02 g polimerizasyon başlatıcısı amonyum per sülfat (APS) eklendi ve ardından 25 µL N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) ilavesi yapıldı. TEMED ilavesinden sonra polimerleşme başlamadan, önceden hazırlanıp soğutulmuş iki cam yüzey arasına polimer malzeme döküldü ve -18 °C'de 24 sa bekletildi (Şekil 3.2(b-c)).

24 sa sonunda 25 °C oda sıcaklığında çözülene kadar tutuldu (Şekil 3.2(d)). Tamamen çözündükten sonra distile su ile yaklaşık 1 sa boyunca 25 °C'de 150 rpm'de santrifüj edilerek yıkandı ve kriyojel son halini aldı (Şekil 3.2(e)). Polimerleşmeye katılmayan malzemelerin arındırılması ile numunelerden deneylere hazırlamak amacıyla 8 mm çapındaki kesitler alındı ve karakterizasyon işlemine başlandı. Kriyojeller kullanılmaya ihtiyaç duyulana kadar distile su içinde +4 °C'de tutuldu. Kontrol grubuyla birlikte 0, 25, 50 ve 100 µl çay ağacı yağı içeren toplam 4 grup kriyojel elde edildi (TTO0-GCry, TTO25-GCry, TTO50-GCry, TTO100-GCry). Maksimum çay ağacı yağı miktarını belirlemek için bir TTO GCry grubu daha sentezlendi. Bunun için sentez aşamasında 150 µl saf çay ağacı yağı kullanıldı. Sentezlenen kriyojel stabil bir form oluşturmadığından, çalışmaya dahil edilmedi.

TTO-GCry kriyojel grupları sentezi sonrasında gerçekleştirilen UV-VIS-spektrofotometre analizleri (GENESYS 10S UV-VIS Spektrofotometre), antibakteriyel analizler, hücre hattı çalışmaları ve kan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2.2. TTO-ACry Kriyojellerin Hazırlanması

TTO ACry kriyojellerin sentezlenmesinde, kriyojelin polimerleşme aşamasında TTO GCry kriyojellerden farklı olarak jelatin yerine aljinat ilave edilmiştir. Aljinatın çözdürülme süreci dışında, genel olarak TTO GCry kriyojellerin sentezlenme süreçleri birbirine hemen hemen benzerdir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kriyojellerin genel sentez aşamaları, a) polimer solüsyonun hazırlanması, b) - 18 °C’de muhafaza edilmek üzere hazırlanan cam yüzeylerin üstten görünüşü, c) cam yüzeylerin önden görünüşü, d) oda sıcaklığına getirilmiş kriyojel, e) yıkama sonrası kriyojelin genel görünüşü

Kriyojelin sentez aşamasında 0,06 gr toz aljinat (alginic acid sodium salt from Brown algae, medium viscosity) hassas terazi tartılarak bir beher kaptaki 6 ml saf su ile yaklaşık 2 sa manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Viskoz bir hal alan aljinat-su karışımı çözünmeye devam ederken, 7 ml saf su içerisinde %100 saflıktaki çay ağacı yağı kontrol grubu hariç 3 farklı konsantrasyonda damlatma metoduyla ilave edildi ve beher kap içerisinde 1 sa homojen bir karışım elde edilinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Kontrol grubuyla birlikte (çay ağacı yağı içermeyen grup), 25, 50 ve 100 µl çay ağacı yağı içeren toplam 4 grup aljinat kriyojel oluşturulması hedeflendi. Toplam polimer çözeltisindeki çay ağacı yağı konsantrasyonları sırasıyla yaklaşık 1.32 mg/mL, 2.81 mg/mL ve 5.39 mg/mL olarak hesaplanmıştır (çay ağacı yağının yoğunluğu 0.9 g/mL olarak kabul edilmiştir).

Çözdürme sonrasında aljinat çözeltisi, çay ağacı yağı çözeltisi içerisine ilave edilerek yaklaşık 30 dk santrifüj edildi. Sırasıyla monomer HEMA (1,3 mL) ve PEGDA (0,506 mL) ilave edildi. İşlem sırasında kriyojelin oda sıcaklığında polimerleşmemesi için buzlu su ile muamele edildi. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak 30 µL gluteraldehit (%25) ilave edildi. Ardından 0,02 g polimerizasyon başlatıcısı amonyum per sülfat (APS) 0,5 ml saf su içerisinde çözdürülerek polimer çözeltiye eklendi ve ardından 25 µL N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) ilavesi yapıldı. TEMED ilavesinden sonra polimerleşme başlamadan, önceden hazırlanıp soğutulmuş iki cam yüzey arasına polimer malzeme döküldü ve -18 °C’de 24 sa bekletildi. 24 sa sonunda 25 °C oda sıcaklığında çözülene

kadar tutuldu. Tamamen çözüldükten sonra distile su ile yaklaşık 1 sa boyunca 25 °C’de 150 rpm’de yıkandı. Polimerleşmeye katılmayan malzemelerin arındırılması ile numunelerden deneylere hazırlamak amacıyla 8 mm çapındaki kesitler alındı ve karakterizasyon işlemine başlandı. Kriyojeller kullanılmaya ihtiyaç duyulana kadar distile su içinde +4°C’de tutuldu.

Kontrol grubuyla birlikte 0, 25,50 ve 100 µl çay ağacı yağı içeren toplam 4 grup kriyojel elde edildi (TTO0-ACry, TTO25-ACry, TTO50-ACry, TTO100-ACry kriyojeller).

TTO-ACry kriyojel gruplarının hazırlanması sonrasında gerçekleştirilen UV-VIS-spektrofotometre analizleri (GENESYS 10S UV-VIS Spektrofotometre), antibakteriyal analizler, hücre kültürü çalışmaları ve kan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada karakterizasyonu yapılmak üzere kriyojel grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

- Çay ağacı yağı, jelatin veya aljinat içermeyen kontrol grubu PHEMA kriyojel
- Jelatin ile zenginleştirilmiş, farklı konsantrasyonlarda çay ağacı içeren üç grup ve çay ağacı yağı içermeyen bir kontrol grubu olmak üzere toplam dört grup olan TTO-ACry kriyojeller
- Aljinat ile zenginleştirilmiş, farklı konsantrasyonlarda çay ağacı yağı içeren üç grup ve çay ağacı yağı içermeyen bir kontrol grubu olmak üzere toplam dört grup olan TTO-ACry kriyojeller

Çalışmada bu şekilde belirlenmiş toplam 9 grup yer almaktadır.

Analizlerde kontrol grubu olarak kullanılmak üzere PHEMA kriyojel (çay ağacı yağı, jelatin ve aljinat içermeyen) kullanıldı. PHEMA kriyojel, FTIR analizi, hücre deneyleri, kan durdurucu deneylerde kontrol grubu olarak kullanıldı. Sentezlenmesinde kullanılan malzemeler çay ağacı yağı, jelatin ve aljinat hariç tamamen aynı metotla hazırlandı (Şekil 3.2).

3.3. TTO-ACry ve TTO-ACry Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.3.1. Şişme Deneylerinin Yapılması

Belirlenen 8 grubun şişme deneylerini yapmadan önce, her bir kriyojelden 8mm çapında kesitler alındı. Her bir kriyojelden 3’er numune alındı. Kriyojel örneklerinin şişme deneyleri kapsamında, her bir kriyojelin şişmiş ağırlıkları (su ile doyurulmuş), kuru ağırlıkları (50 °C’de kurutulmuş) ve sıkılmış ağırlıkları (emici bir yüzeye emdirilmiş)

hassas terazi ile tartıldı. Her bir numunenin ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Standart sapmalar sayısal değerlere ve grafiklere yansıtıldı.

Şişme deneyleri için jelleşme verimi (%), şişme oranı (%) ve makrogözenek miktarı (%) hesaplandı. Bunun için, suyu çekerek dengeli şişme durumuna ulaşan şişmiş kriyojellerin ağırlıkları ölçüldü (şişmiş jel). Daha sonra bu kriyojellerin fazla suyu bir selüloz kağıt üzerinde sıkılarak son hallerinin ağırlıkları (sıkılmış jel) ölçüldü. Son olarak jeller 50 °C' lik bir fırında kurutuldu (1 sa) ve kuru kriyojellerin ağırlığı kuru jel ağırlığı (kuru jel) olarak ölçüldü. Kriyojel oluşturulmasında kullanılan monomerlerin toplam kütlesi belirlendi (mt). Jelleşme verimi (%) aşağıda verilen Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$Jelleşme\ verimi\ (\%) = \frac{m(kuru\ jel)}{mt} \times 100 \quad (3.1)$$

Şişme oranları(%) aşağıda verilen Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır:

$$Şişme\ oranı(\%) = \frac{m(şişmiş\ jel) - m(kuru\ jel)}{m(şişmiş\ jel)} \times 100 \quad (3.2)$$

Aşağıdaki denklem kullanılarak kriyojellerdeki süpermakroporların toplam hacmini yüzde olarak belirlemek için makrogözenek miktarı hesaplanmıştır. Makrogözenek miktarı aşağıda verilen Eşitlik 3.3'e göre hesaplanmıştır:

$$Makrogözenek\ miktarı\ (\%) = \frac{m(şişmiş\ jel) - m(sıkılmış\ jel)}{m(şişmiş\ jel)} \times 100 \quad (3.3)$$

Oranların belirlenmesinde üç tekrarlı olarak alınan ölçümler ile standart sapmalar belirlenerek grafikler oluşturulmuştur (Phyton 3.0, $p \leq 0.05$).

3.3.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi/Headspace (GC-MS/HS) Analizinin Yapılması

Çalışmada kullanılan çay ağacı yağının ana bileşenlerini ve yüzde oranlarını belirlemek için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi Headspace (GC-MS/HS) analizi

yapılmıştır. Ayrıca, çay ağacı yağının ana metaboliti olan terpinen-4-ol'ün sentezlenen kriyojel yapısına katılıp katılmadığını anlamak için de aynı analiz yöntemi kullanılmıştır (Agilent 5977B GC/MSD ve Agilent 7697A Headspace Sampler, Polis Akademisi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Kimya Laboratuvarı). Analiz için kullanılacak yöntem için literatürdeki çalışmalardan faydalanılmış olup yöntemin uygulanma aşamasında optimizasyon yapılmıştır (Avonto ve ark., 2016; Varlık ve ark, 2022).

Buna göre, 1 cm kenar uzunluğuna sahip kare şeklinde kesilmiş selüloz kağıdına 5 µL TTO emdirildi ve sıkıca kapatılmış 20 mL headspace uyumlu vialle yerleştirildi. Ayrıca, TTO25-GCry kriyojel ve TTO25-ACry kriyojel örneğinden 2 mm çapında kesitler alındı, 20 mL GC-MS/Headspace uyumlu vialle yerleştirildi ve şişe kapağı sıkıca kapandı. Numune içeren vialler, GC-MS/Headspace ünitesine yerleştirildi. Deney çift tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Örnek tam buharlaştırma için 250 °C'de bekletildi, basınç 10.121 psi' ye ayarlandı ve septum temizleme akış hızı 3 mL/dak olarak ayarlandı. Split modu, "Split" olarak ve 25:1 oranıyla ayarlandı. Sütun akış hızı 1,3 mL/dak olarak belirlendi. Sütun basıncı ve sabit akış otomatik olarak oluşturuldu. İlk sıcaklık 40°C olarak ayarlandı. İkinci aşamada, 5 °C aralıklarla 100 °C'ye kadar (1-15 dk arasında 2 dk'da bir) artırıldı. İkinci aşamada, 20 °C aralıklarla 200 °C'ye kadar (15-22 dk arasında, 2 dk'da bir) artırıldı. GC-MS/Headspace parametrelerinde, fırın sıcaklığı, döngü sıcaklığı ve transfer hattı sıcaklığı 10 °C artışlarla (100 °C, 110 °C ve 120 °C olacak şekilde) ayarlandı. Genel ayarlamalar MSD-Mass Hunter programı ile yapıldı. Ardından, MSD Data Analysis (MSD Veri Analizi) ve Quantitative Data Analysis Software (Nicel Veri Analizi Yazılımı) ile karşılaştırmalar yapıldı. Ek olarak, literatür ve ticari kaynaktan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

3.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi ile Kriyojellerin Yapı Analizi

4 mm kesit alınan kriyojeller oda sıcaklığında (25 °C) 24 sa bekletildi. Kuruyan tüm kriyojel numuneleri küçük parçalara ayrıldı. Kuru kriyojeller, jelatin, aljinat ve saf çay ağacı yağı örneklerinin FTIR (FT/IR-6600typeA) ile spektrumları alındı. Numunelere 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığına bakıldı. Literatür karşılaştırılması yapılarak polimer oluşumu ve bağların yapısı gözlemlendi (Rytwo ve ark., 2015).

3.3.4. Termogravimetrik Analizinin Yapılması (TGA)

TTO100-GCry ve TTO100-ACry kriyojel tozu örneklerinin (oda sıcaklığında kurutulmuş ve toz haline getirilmiş) termal tepkisini belirlemek için bir TGA analizi yapılmıştır.

Deney başlangıcında, kriyojel tozlarının ağırlıkları belirlenmiştir (Kuru toz ağırlıkları, TTO100-GCry için 5,7 mg, TTO100-ACry için 6,3 mg olarak ölçülmüştür).

Deneyler, 900 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızıyla inert bir ortamda (azot gazı kullanarak) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerlerden erime sıcaklığı belirlenmiştir (Odabaş 2018). Kalan kütle yüzdesi-sıcaklık grafiği ve ısı akışı-sıcaklık grafiği oluşturulmuştur. TGA analizi, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (HUNITEK) gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri HUNITEK'te yapıldı. Kriyojeller öncelikle glutaraldehit çözeltisinde sabitlendi. Ardından alkol ve HMDS (hexamethyldisilazan) kullanılarak dehidre edildi. Bu işlemde, her biri 6 mm çapında olan aynı boyuttaki her kriyojelin üzerine 1 ml %2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi eklenerek, kriyojeller 30 dk boyunca karanlıkta bekletildi. Dehidrasyon işlemi için, kriyojeller sırasıyla %30, %50, %70 ve %100 (v/v) etanol çözeltisinde 5 dk boyunca bekletildi; ardından her bir örnek 1ml HMDS içinde 10 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra, kriyojeller oda sıcaklığında kurutuldu.

Kan absorpsiyon SEM görüntüleme için kullanılacak tüm örnekler işlem öncesinde liyofilizatörde kurutuldu. Yukarıdaki tüm işlemler, kan absorpsiyon çalışması sonrası SEM görüntülerini alabilmek için kırmızı kan hücrelerini kriyojele fikse etme işlemi olarak da aynı şekilde uygulandı. Daha iyi görüntüleme için parçalara ayrıldı ve görüntüleme için 4nm altın-paladyum ile kaplandı.

3.4. Salım Analizinin Yapılması

Bu çalışmada çay ağacı yağının akut deri yaralanmalarında deri üzerine kontrollü salımı hedeflendi. Bu nedenle belirli koşullar altında ve belirli sürelerle numunelerin ölçümüne dayanan bir salım deneyi hedeflendi.

Bu çalışma toplam 6 grupta çalışıldı. Buna göre 25, 50 ve 100 µL yüklü jelatin kriyojeller (TTO-GCry) ve 25, 50, 100 µL yüklü aljinat kriyojellerden (TTO-ACry) kesici yardımıyla 18 mm kesitler alındı; şişmiş ağırlıkları üç tekrarlı olacak şekilde tartıldı. Kriyojellerin kuru olarak kullanılmamasının sebebi çay ağacı yağı içerisinde bulunan uçucu metabolitlerin buharlaşmasını engellemek içindi.

Her bir kriyojel numunesi 20 ml PBS tamponu içeren cam beher içerisine ayrı ayrı konuldu ve 150 rpm'de 37 °C' de 3 gün çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. 3 gün boyunca

her bir beherden 0sa(başlangıç), 2sa, 4sa, 8sa, 12sa, 24sa, 72 sa boyunca 0,5 ml (3 tekrarlı olduğundan toplam 1,5 ml) PBS tampon örneği alındı ve ayrı eppendorflara konuldu. Kriyojellerin içinde bulunduğu solüsyon her alımda 1,5 ml PBS ile yeniden 20 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu örneklerle çay ağacı yağının çözünürlüğünü arttırmak amacıyla 0,5 ml methanol (%50 PBS/metanol çözeltisi olacak şekilde) ilave edildi ve 1ml ye tamamlandı. Her bir örnek spektrofotometrede 267 nm'de ölçüldü.

Kullanılan çay ağacı yağı ile son konsantrasyon 1-5 µL aralığında (kriyojel kesitlerinin boyutuna göre hacme düşen çay ağacı yağı maksimum 5 µL olarak belirlendi) standart grafiği hazırlandı. Bunun için 20 mL PBS tamponu içeren beher içerisine 5 µL saf çay ağacı yağı ilave edildi. PBS ve çay ağacı yağı karışımı beherin ağzı flaster ile kapalı olacak şekilde yaklaşık 1sa boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Daha sonra PBS tampon ve çay ağacı yağı çözeltisi ile son konsantrasyon %50 PBS/metanol çözeltisi olacak şekilde metanol ilave edildi. Bu stok çözeltisinden 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml ve 1ml olacak şekilde örnekler alınıp eppendorflara konuldu. Daha sonra 1ml alınan numune hariç (maksimum konsantrasyon), diğer eppendorfların üzeri %50 PBS-metanol çözeltisiyle 1 ml'ye tamamlandı. Bu sayede kriyojel numunelerin miktarı esas alınarak 1, 2, 3, 4 ve 5 µl çay ağacı yağı konsantrasyonu için standart elde edildi. Her bir numune spektrofotometrede 267 nm'de ölçüldü ve standart grafiği oluşturuldu. UV-Spektrofotometre ölçümüne göre elde edilen OD değerleri esas alınarak numunelerin kümülatif salım yüzdeleri aşağıdaki Eşitlik 3.4'e göre belirlendi:

$$\textbf{Kümülatif Salım Oranı (\%)} = \left(\frac{\text{Numunedeki TTO miktarı, } \mu\text{g/ml}}{\text{numunedeki maksimum TTO miktarı, } \mu\text{g/ml}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

Burada TTO'nun kümülatif salım oranı (%); , farklı saatlerde alınan numunelerde bulunan TTO miktarının kümülatif olarak artışının yüzdesini ifade eder. Numunedeki TTO miktarı her bir numunelerdeki TTO konsantrasyonunu (mikrog/ml) ifade eder. Numunedeki maksimum TTO miktarı, her bir kriyojel numunesinde bulunması gereken maksimum TTO miktarını ifade eder. Metodun belirlenmesinde literatürden faydalanılmış ve çalışma için optimizasyon yapılmıştır (Ge ve ark., 2019; Manjula ve ark., 2021).

3.4.1. Kinetik Modeller

Polimer malzemelere yüklenen malzemelerin salım süreçleri farklı şekilde ilerleyebilir. Bu sebepler, farklı koşullar ve malzemeler için matematiksel salım kinetik modelleri geliştirilmiştir (O'Hara ve ark., 1998). Önceki çalışmalara bakıldığında, TTO'nun bir polimer malzemeden salınım kinetiği 4 ana model kullanılabilir (Ge ve ark, 2019). Bunlar, Zero order model, First order model, Higuchi model, Korsmeyer-Pappas modelidir. Zero-order kinetik salım modeli aşağıdaki Eşitlik 3.5'e göre hesaplandı:

$$\text{Zero – order modeli: } Q = Q_0 - kt \quad (3.5)$$

Zero-order kinetik modelinde, Q , salınan ilaç miktarı (μg), Q_0 , başlangıçta salınan ilaç miktarı (μg), k , zero-order kinetik sabiti ($\mu\text{g/sa}$) ve t : salınım süresini (sa) ifade eder. Bu denklemde, ilaç salınım hızı, ilacın konsantrasyonundan bağımsız olarak sabit kalır, yani ilaç sıfırıncı derece kinetiğe uygun olarak salınır.

First-order kinetik salım modeli aşağıdaki Eşitlik 3.6'ya göre hesaplandı:

$$\text{First – order modeli: } \log Q_t = \log Q_0 + \frac{Kt}{2,303} \quad (3.6)$$

First-order kinetik modelinde, Q_t , salınan ilaç miktarı (μg), Q_0 , başlangıçta salınan ilaç miktarı (μg), k , first-order kinetik sabiti (s^{-1}) ve t , salınım süresini (sa) ifade eder. Bu denklemde, ilaç salınım hızı, ilaç konsantrasyonunun yarıya düşmesi için geçen süre ile doğru orantılı olarak azalır. Bu nedenle, first-order kinetiği, ilaç salınımında en sık gözlenen kinetik modellerden biridir.

Higuchi Kinetik Salım Modeli, ilaç salımını tanımlamak için kullanılan başka bir matematiksel modeldir. Bu modele göre, ilaç molekülleri sabit bir hızda çözünerek, ilaç dozunun zamanla değişen oranlarda serbest bırakılmasına neden olur. Higuchi kinetik salım modeli aşağıdaki Eşitlik 3.7'ye göre hesaplandı:

$$\text{Higuchi modeli: } Q_t = k_H \times t^{0.5} \quad (3.7)$$

Burada Q, zaman içinde serbest bırakılan ilaç miktarını temsil eder; t, serbest bırakma süresini temsil eder ve k_H , Higuchi sabiti olarak adlandırılan bir sabittir. Higuchi sabiti, ilacın çözünürlüğü ve dozuna bağlı olarak değişebilir. Bu modele göre, ilaç salımı, zamanın kareköküne bağlı olarak artar.

Korsmeyer-Peppas modeli, etken madde salımını tanımlamak için kullanılan bir matematiksel modeldir. Bu model, ilaç salım hızının ilaç moleküllerinin difüzyon hızına ve ilaç formülasyonunun fiziksel özelliklerine bağlı olduğunu varsayar. Korsmeyer-Peppas modeli, ilaç salımını karakterize etmek için kullanılan en yaygın modelleştirme yöntemlerinden biridir.

Korsmeyer-Peppas kinetik salım modeli aşağıdaki Eşitlik 3.8'e göre hesaplandı:

$$\text{Korsmeyer – Peppas modeli: } \log \frac{Qt}{Q_\infty} = \log k_m + n \log t \quad (3.8)$$

Burada Qt/Q_∞ , salınan ilaç miktarının toplam ilaç miktarına oranını temsil eder; t, serbest bırakma süresini temsil eder; k_m , salım hız sabiti olarak adlandırılan bir sabittir ve n, difüzyon sisteminin karakteristik özelliğini ifade eden bir üstel terimdir.

Bu model, ilaç salımının zamanla değişen bir hızda gerçekleştiğini ve bu hızın ilacın moleküler yapı ve formülasyon özelliklerine bağlı olduğunu gösterir. Korsmeyer-Peppas modeli söz konusu olduğunda n değeri Fickian difüzyonu hakkında bilgi verebilmektedir. Fickian difüzyonu kimyasal veya fiziksel maddelerin, konsantrasyon gradyanına bağlı olarak yüksek konsantrasyon bölgelerinden düşük konsantrasyon bölgelerine doğru doğal olarak yayılması veya hareket etmesidir. Bu süreç, Fick'in difüzyon yasalarına dayanmaktadır. Fick'in birinci yasasına göre, difüzyon hızı, konsantrasyon gradyanının negatif yöne doğru değişim hızına bağlıdır. Fick'in ikinci yasasına göre ise, difüzyonun zamanla nasıl yayıldığını ve konsantrasyonun nasıl değiştiğini açıklar. Buna göre n değeri 0,5'in altında olduğunda Fickian difüzyonu uygulanabilirken, 0,5 üzerinde 1 değerinin altında olduğunda hem Fickian hem non-Fickian difüzyonu uygulanabilir. Non-Fickian difüzyonu, karmaşık materyal yapıları, heterojen sistemler, poröz yapılar veya difüzyon sırasında kimyasal reaksiyonların etkisi gibi faktörlerin varlığıyla ilişkilendirilebilir (Ge ve ark, 2019).

Bu çalışmada bahsedilen salım modelleri arasından en uygun kinetik salım modelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.5. *In vitro* Degradasyon Analizi

In vitro degradasyon analizi için, PHEMA, TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojel grupları olmak üzere toplam 9 gruptan 18 mm çapında ve 2 mm genişliğinde kriyojel kesitleri alınıp inkübasyonda 37 °C’de 3 sa kurumaya bırakıldı. Daha sonra jellerin kuru ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı ve ağırlıklar ilk ağırlık olarak kabul edildi. Daha sonra her biri 10 mL PBS (pH=7.4) ile dolu plastik tüplerde 150 rpm de 37 °C’de inkübe edildi. Farklı zaman noktalarında (0, 7, 14, 21 ve 28 gün), örnekler alındı, 45 °C’de inkübatörde kurutuldu ve her seferinde her örneğin kuru ağırlığı ölçüldü. Kriyojellerin bozunma hızı, aşağıdaki denklem kullanılarak örneklerin başlangıç ve son kuru ağırlığı arasındaki fark analiz edilerek belirlendi. Degradasyon değeri (%) aşağıdaki Eşitlik 3.9’a göre hesaplandı:

$$\text{Degradasyon (\%)} = \frac{(M_0 - M_f)}{M_0} \times 100 \quad (3.9)$$

Burada, M_0 , örneklerin başlangıç kuru ağırlığını; M_f , düzenli zaman aralıklarında inkübasyondan sonra örneklerin son kuru ağırlığını ifade etmektedir. Formül ile kriyojel bozunma yüzde miktarı hesaplanmıştır (Zhang ve ark., 2014; Bölgen ve ark., 2020).

3.6. Antibakteriyel Deneyler

Tez çalışması kapsamında sentezlenen TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojel gruplarının antibakteriyel özellikleri koloni oluşturan ünite deneyi ve UV-VIS spektrofotometre ölçümü ile değerlendirildi.

3.6.1. Koloni Oluşturan Ünite Deneyi (CFU)

Antibakteriyel çalışmalar için hem sıvı hem de katı besiyeri hazırlandı. Sıvı Luria Bertani (LB)-Brot besiyeri ve katı Agar besiyeri elde edildi. Bu çalışmada *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) suşları kullanıldı. Bu iki suş TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojellerinin gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerindeki etkisini görmek için kullanıldı. Bakteri kültüründe her iki grup için bir kontrol grubu oluşturuldu. *E. coli* ve *S. aureus* için 2 steril eppendorf içine 1 ml ortam eklenerek eppendorflar inoküle edildi. Bakteriler ortamla birlikte 18-24 sa boyunca 37 °C 'de ve 150 rpm'de inkübe edildi. Ardından, her bakteri grubu için (*E.coli* ve *S.aureus*), 100 µl bakteri ve 900 µl besiyeri

ile eppendorf tüplerine inoküle edildi. Sentezlenen kriyojellerin her birinden 4'er adet 8 mm çapında kesitler alındı. Kriyojeller, 10 dk UV ile sterilize edildi. Daha sonra kriyojel kesitlerinden birer tane eppendorfların içine ilave edildi (kontrol ve çay ağacı hariç). Aljinat ve jelatin grupları ve her bir bakteri grubu ile (*E. coli* ve *S. aureus*) için oluşturulan gruplar:

- Jelatin grupları: TTO0 GCry-EC, TTO25 GCry -EC, TTO50 GCry -EC, TTO100 GCry -EC, TTO0 GCry -SA, TTO25 GCry -SA, TTO50 GCry -SA, TTO100 GCry -SA,
- Aljinat grupları: TTO0 ACry- EC, TTO25 ACry -EC, TTO50 ACry -EC, TTO100 ACry -EC, TTO0 ACry -SA, TTO25 ACry -SA, TTO50 ACry -SA, TTO100 ACry -SA,
- Kontrol grupları: TTO-SA, TTO-EC, Kontrol-SA, Kontrol-EC olacak şekilde belirlendi.

Agar besiyeri ile koloni sayım deneyi için, 24 sa boyunca 37 °C 'de inkübe edilen *E.coli* ve *S.aureus* bakteri gruplarına seri seyreltmeler (100 µl bac/900 ortam) yapıldı. Her seyreltme aşamasında vorteksleme yapıldı. Örnekler 10⁻⁷, 10⁻⁸ ve 10⁻⁹ 'e kadar sulandırıldı ve bu sulandırmalardan 100' er µL alınarak her bir LB agara L baget yardımı ile yayıldı. 24 sa boyunca 37 °C 'de tutuldu (Wahid ve ark., 2020).

Koloni sayımı 24 sa sonra yapıldı. Koloni sayımı için aşağıdaki Eşitlik 3.10 kullanıldı:

$$N(\text{Toplam mikroorganizma sayısı}) = \frac{(\text{Koloni sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü})}{\text{Hacim (mL)}(\text{Ekilen mikroorganizma miktarı})} \quad (3.10)$$

3.6.2. UV-VIS Spektrofotometre Ölçümü

Seri seyreltme ile elde edilmiş 10⁻⁹ seyreltilmiş eppendorflardan ölçümler 620 nm'de UV-VIS spektrofotometre ile alındı. 3 kere tekrarlanan ölçümlerin ortalaması alındı (Shinde ve ark., 2014).

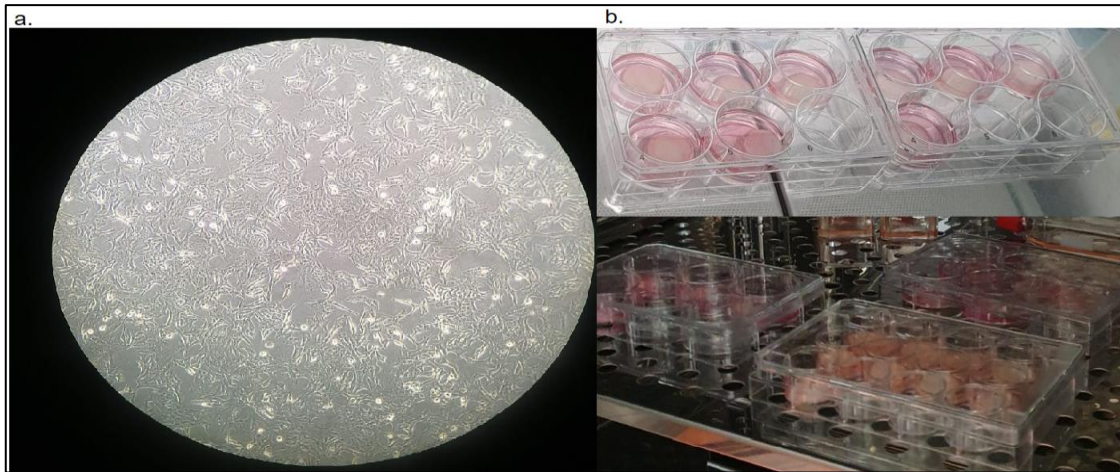
Ardından koloni sayımı yöntemi ile UV-VIS spektrofotometre ve ölçüm yöntemi arasındaki korelasyon ilişkisi karşılaştırmalı analiz için hesaplandı (Python 3.0, $p \leq 0.05$). Elde edilen sonuçlara göre, TTO GCry VE TTO ACry gruplarının *E. coli* ve *S. aureus* suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği (%) hesaplandı.

3.7. In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

3.7.1. MTT Hücre Testinin Yapılması

MTT analizi hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksite göstergesi olarak hücrelerin metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. MTT reaktifi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür), dörtlü tetrazol halka çekirdeği, içinde iki fenil parçacığı ve bir tiyazol halkası bulunan üç aromatik halkayı içeren bir mono-tetrazol tuzudur. MTT'nin indirgenmesi çekirdek tetrazol halkasının bozulmasına ve formazan adı verilen mor-mavi, suyla çözünmeyen bir molekülün oluşumuna neden olur (Ghasemi ve ark., 2021).

Yapılan analizde HaCaT (Pasaj/16) hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 3.3.(a)). Hücre ekiminden önce kriyojeller serum içermeyen Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) besiyerinde, % 5 CO₂ içeren ve 37 °C koşullar altındaki etüvde (Sanyo, MCO18AC) 1 sa inkübe edildi. Örneklerin üzerine pellet formundaki hücrelerin ekimi gerçekleştirilmeden önce 1 sa boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Kriyojel grupları için, MTT testi için hazırlanan 24 ve 48 sa grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Her iki grup da aynı protokole tabi tutuldu ve kriyojellere hücre ekimi 3 boyutlu olarak gerçekleştirildi. Her kriyojele için 1x10⁶ hücre/kriyojel sayıda ekim gerçekleştirildi. İlk aşamada, 1x10⁶ hücrenin yarısı olacak şekilde 500.000 hücre/kriyojel ekildi. 1 sa inkübasyon sonrasında kalan hücrelerin ekimi tamamlandı. Hücre ekimi gerçekleştirilmiş kriyojellerde hücrelerin üremesi ve canlılık sonuçlarının alınması için 24 ve 48 sa inkübasyon yapıldı. Daha sonra, hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp 400 µl serum içermeyen DMEM ve 40 µl MTT eklendi. Ardından hücreler karanlıkta 3 sa inkübe edildi (Şekil 3.3.(b)).



Şekil 3.3. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları, a) HaCat hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü, b) MTT hücre testinin uygulanması

Ardından süpernatantlar uzaklaştırıldı ve yerine her kriyojel için 400 µl DMSO/amonyak solüsyonu (5% amonyak ile hazırlanmış) eklendi. Daha sonra 15 dk boyunca çalkalama işlemi yapıldı ve kriyojeller 1 µl pipet ucu ile parçalandı. Renk değiştiren DMSO/amonyak solüsyonu her kuyucukta 100 µl olacak hacimde non-steril 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına aktarıldı ve çözeltiler mikrolaka okuyucu (BIOTEK, µQuant) kullanılarak 550 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kriyojellere eklenen hücrelerin canlılık yüzdesi, ölçümlerden elde edilen optik yoğunluk (OD) değerlerine dayanarak belirlendi. Kriyojeller için hücre canlılığını yorumlamak için aşağıdaki Eşitlik 3.11 kullanılarak MTT analizi yapıldı:

$$\text{Hücre canlılığı \%} = \frac{\text{OD değeri}}{\text{Kontrol grubu OD değeri}} \times 100 \quad (3.11)$$

Veriler normal dağılım gösterdiği için çift karşılaştırma işlemi %95 güven düzeyinde Student's t-testi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.7.2. *In Vitro* Çizik Testinin Yapılması

Kriyojellerin yara iyileştirici etkisini değerlendirebilmek için *in vitro* çizik testi uygulanmıştır. Her bir kriyojelden 18 mm çapında kesitler alındı. Kriyojeller kurutulmadan sterilize edildikten sonra (UV ışığıyla 1 sa), kriyojel başına 1.5 mL serum içermeyen DMEM falkonlara alındı (Kriyojelde bulunan TTO'nun uçucu bir yağ olması ve kriyojelden ayrışmaması için kurutma işlemi uygulanmamıştır). Daha sonra 24 saat inkübe edildi. Sonrasında süpernatantlar santrifüj edilmiş (800 rpm, 5 dk) ve steril filtre edilmiştir. HaCaT hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında 1.5×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi ve hücrelerin %90'lık bir konfluansa ulaşması için 48 sa beklendi. Yarayı oluşturmak için 200 µL steril pipet ucu kullanılarak hücre hattı üzerinde yatay bir çizik oluşturuldu. Ardından hücreler PBS ile yıkandı. Kriyojel ile hazırlanan ekstratlar plakaların içine eklendi. Plakalar %5 CO₂'de 37 °C'de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (0, 24 ve 48 sa) koordinatlı görüntüler, inverted (ters) mikroskop (Olympus CKX18, Cellsens Master yazılımı V1.12) kullanılarak alındı. ImageJ (NIH) yazılımı, çizik iki tarafı arasındaki kapanmayı hesaplamak için kullanılmıştır. Yara kapanması (%), aşağıdaki Eşitlik 3.12 ile hesaplanmıştır (Suarez-Arnedo ve ark., 2020; Bal-Öztürk ve ark., 2023):

$$\text{Yara Kapanma (\%)} = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \times 100 \quad (3.12)$$

Burada T0, çizik oluşturulduğu zamanki yaranın alanı, Tx, herhangi bir zaman noktasındaki yaranın alanıdır (scale bar: 100 µm).

3.8. Hemostatik Aktivite ve Kan Absorbsiyon Deneyleri

Yapılan doktora tez çalışmasında TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojelleri için hemostatik aktivite, kan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma deneyleri değerlendirildi. Kriyojellerin kan absorpsiyon analizi insan tam kanı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan kan örneği Beytepe Gün Hastanesi'nden temin edildi. Kan örneği gönüllülük esasına göre doğrudan 3 ml'lik EDTA'lı tüplerle alınıp +4 °C'de muhafaza edildi. EDTA'lı tüplerin kullanılması kanın kullanım öncesi pıhtılaşmasının önlenmesi içindi. Çalışmanın Etik Kurul Onayı GO 22/1255 kayıt numarası ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından alındı.

Metodun belirlenmesinde yapılmış benzer çalışmalardan faydalanıldı. Yapılan bir çalışmada kan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma analizi değerlendirmesi için diş dolgu süngerleri ile çalışılmış ve absorpsiyon oranı, verilen kanın diş dolgu süngerleri tarafından tamamen emilmesi için gereken süre olarak tanımlanmıştır. (Chang ve ark., 2012; Kang ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada bu bilgi esas alınarak yapılan çalışmalarda uygulanan metodlar çalışmaya uygun olarak optimize edildi.

Bu çalışmada toplam 6 grup tasarlandı. Bu gruplar, PHEMA (jelatin, aljinat ve çay ağacı yağı içermeyen kontrol grubu), TTO0-GCry, TTO100-GCry, TTO0A-Cry ve TTO100-ACry ve karşılaştırma amacıyla hemostatik jelatin bazlı ticari bir ürün belirlendi. Ara gruplar kullanılmadı.

Kriyojellerden ve ticari üründen 18 mm çapında ve 1,5 mm yükseklikte kesikler alınarak, liyafilizatörde kurutuldu (HUNITEK, Hacettepe Üniversitesi). Kriyojeller cam şişelerin dibine yerleştirildi ve +4 °C'de EDTA'lı tüpte muhafaza edilen ve oda sıcaklığında bir süre bekletilen tam insan kanı örneğinden 250 µl kriyojellere dikkatlice dağıtıldı. Numuneler, 37 °C'de inkübe edildi. Kan Emilimi için 60 sn yeterli olduğu görüldüğünden, numuneler 60 sn 37°C'de etüvde bekletildikten sonra, cam şişelerin kenarlarından su damlatılarak dikkatlice 20 ml distile su ilave edildi. Bu sayede pıhtılaşmış kanın bozulması önlenmiş oldu. 20 mL distile su ile karıştırılmış 250 µl insan kanının absorbansı, referans değer olarak kullanıldı. Kan tutma kapasitesini belirlemek amacıyla 0, 15, 30 ve 45 dk sürelerde kriyojel numunelerinin hemoglobin solüsyonlarından 1 ml numune alınarak eppendorflara konuldu ve 540 nm'de absorbans değerleri ölçüldü (UV–VIS spektrofotometre, Thermo Scientific, Genesis). Beklenen zaman aralıklarında

numune içeren şişeler 37 °C'de etüvde tutuldu. Daha sonra bu değerlerin standart değer ile karşılaştırılması ile salınan kan miktarının yüzde (%) karşılığı hesaplandı.

Kan pıhtılaşma analizi için liyafilizatörde kurutulmuş 18mm çapındaki tüm numuneler, kan absorbsiyon analizinde olduğu gibi cam şişelerin dibine yerleştirildi. Örneklerin üzerine 37 °C 'de bir süre bekletilmiş 250 µl insan kanı ilave edildi ve 5 dk bekletildi. Daha sonra önceden hazırlanmış olan 1,25 ml % 0,9 salin solüsyonundan cam şişelerin kenarından her bir şişe için 20 ml olmak üzere ilave edildi. Daha sonra fotoğrafları çekilip yorumlandı.

Kan hücrelerini tutan kriyojellerin görüntüsü SEM görüntüleme tekniği ile incelendi. Hücreleri fikse etmek için karakterizasyon için numunelerin SEM incelenmesinde uygulanan metod aynı şekilde uygulandı. Bunun için kan ile muamele edilmiş kriyojeller öncelikle 24 well-kuyucuklara yerleştirildi. Kriyojeller her bir kuyucuk için glutaraldehit çözeltisinde sabitlendi. Bu işlemde, her biri 18 mm çapında olan aynı boyuttaki her kriyojelin üzerine 1 ml %2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi eklenerek, kriyojeller 30 dk boyunca karanlıkta ve +4 °C'de bekletildi. Sabitleme işleminden sonra dehidrasyon işlemi için, kriyojeller sırasıyla %30, %50, %70 ve %100 (v/v) etanol çözeltiğinde 5 dk boyunca bekletildi; ardından her bir örnek 1ml HMDS (hexamethyldisilazan) içinde 10 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra, kriyojeller oda sıcaklığında kurutuldu. Daha iyi görüntüleme için parçalara ayrıldı ve görüntüleme için 4nm altın-paladyum ile kaplandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

Antibakteriyel aktivite ve şişme sonuçlarını değerlendirmede spektrofotometri ve koloni sayımı ölçüm yöntemleri arasındaki korelasyon ilişkisi, Salım deneyi için kalibrasyon eğrisi Python 3.0 kullanılarak hesaplandı ($p \leq 0.05$). MTT analizi, veriler normal dağılım gösterdiği için çift karşılaştırmalı Student t-testi kullanılarak yapıldı ($p < 0.05$).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Sentezlenmesi

4.1.1. PHEMA Kriyojelin Sentezlenmesi

Kontrol grubu olarak kullanılan TTO, jelatin ve aljinat içermeyen PHEMA kriyojelin başarıyla sentezlendiği görüldü (Şekil 4.1). Şişmiş halinin sarıya yakın beyaz bir renkte olduğu görülürken, içerdiği toplam polimer miktarı toplam kriyojel ağırlığına göre %13,8 olarak hesaplandı (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. PHEMA kriyojel (jelatin, aljinat ve TTO içermeyen)

4.1.2. TTO-GCry Kriyojellerin Sentezlenmesi

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda TTO (0, 25, 50, 100 μ l) içeren TTO-GCry kriyojelleri hazırlandı ve -18°C 'de 24 sa bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına bırakılarak çözünmeleri sağlandı. Yapılan tekrarlı deneyler sonucu tüm kriyojellerin başarıyla sentezlenmiş olduğu gözlemlendi. Daha sonra kriyojellerin her birinden 8mm çapında kesitler alındı (Şekil 4.2.). Kriyojellerin şişmiş ağırlığı, sıkılmış ağırlığı ve kuru ağırlıkları (mg) 3 tekrarlı olarak ölçüldü. 3 tekrarla alınan ölçümlerin aritmetik ortalaması kullanıldı. Toplam monomer yüzdeleri (%), her bir kriyojeldeki toplam yağ içeriği (μ l), toplam polimer çözeltisindeki yağ konsantrasyonu (mg/ml) ve elde edilen kriyojellerin formları Çizelge 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.2. TTO GCry kriyojel grupları (sırasıyla, 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren jelatin- kriyojeller)

4.1.3. TTO-ACry Kriyojellerin Sentezlenmesi

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda TTO (0, 25, 50, 100 µl) içeren TTO-ACry kriyojelleri hazırlandı ve -18°C'de 24 sa bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına bırakılarak çözünmeleri sağlandı. Yapılan tekrarlı deneyler sonucu tüm kriyojellerin başarıyla sentezlenmiş olduğu gözlemlendi. Daha sonra kriyojellerin her birinden 8mm çapında kesitler alındı (Şekil 4.3). Kriyojellerin şişmiş ağırlığı, sıkılmış ağırlığı ve kuru ağırlıkları (mg) 3 tekrarlı olarak ölçüldü. 3 tekrarla alınan ölçümlerin aritmetik ortalaması kullanıldı. Toplam monomer yüzdeleri (%), her bir kriyojeldeki toplam yağ içeriği (µl), toplam polimer çözeltisindeki yağ konsantrasyonu (mg/ml) ve elde edilen kriyojellerin formları Çizelge 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.3. TTO-ACry kriyojel grupları (sırasıyla, 0, 25, 50, 100 μ l çay ağacı yağı içeren aljinat-kriyojeller)

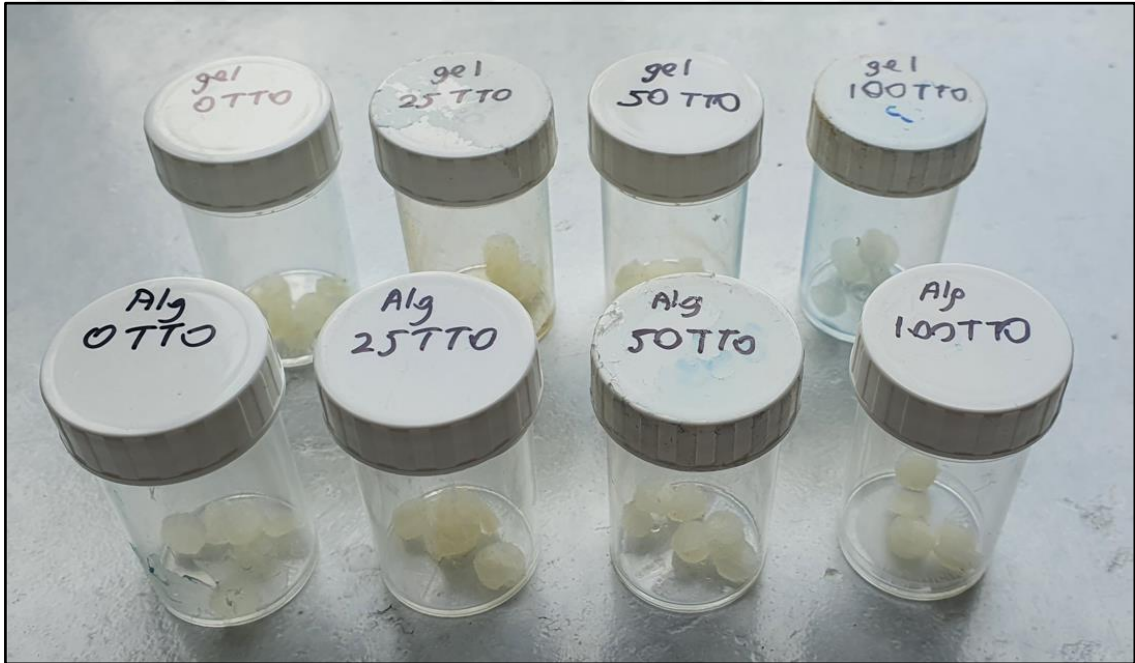
Sentezlenirken jelatin eklenen (GCry) ve aljinat eklenen (ACry) gruplar kontrol grubu olan PHEMA kriyojel ile karşılaştırıldığında, jelatin içeren grupların sarı tonlarında, aljinat içeren grupların beyaza yakın bir renkte olduğu gözlemlendi. Sadece gözlemsel olarak bu malzemelerin kriyojelin yapısına başarıyla katıldığı söylenebilir (Şekil 4.4). Sentezlenen kriyojellerin görünümü, elastikiyeti ve renk özellikleri literatürle uyumlu bulundu (He ve ark.,2021; Bayrak ve ark.,2021).



Şekil 4.4. Sentezlenen kriyojellerden alınan dairesel kesitlerin karşılaştırılması,
a) PHEMA kriyojel (TTO, jelatin veya aljinat içermeyen kontrol grubu),
b) Aljinat-kriyojel (ACry) c) Jelatin-kriyojel (GCry)

Polimer çözeltisindeki toplam monomer miktarının yüzde karşılığı değerlendirildi. Buna göre PHEMA kriyojel içindeki toplam monomer miktarı %13,8 idi. Jelatinli grupların toplam monomer miktarlarına bakıldığında TTO0-GCry %14 TTO25-GCry %16 TTO50-GCry %16 TTO100-GCry %15 olduğu görüldü. Sentezlenen her bir kriyojelin toplam ağırlığının birbirine yakın değerlere sahip olduğu gözlemlendi. Aljinatlı grupların monomer miktarına bakıldığında, TTO0-ACry %13,5, TTO25-ACry %13 TTO50-ACry %14 ve TTO100-ACry %13 idi. Gruplardaki genel monomer miktarı yüzdelерinin birbirine yakın olduğu görüldü (Çizelge 4.1).

Yapılacak şişme deneyi çalışmalarda kullanılmak üzere şişmiş numunelerden alınan 8mm çapında örneklerin üç tekrarlı olarak alınan şişmiş, sıkılmış ve kurutulmuş ağırlıkları alınmak üzere plastik kaplara ayrıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kriyojel gruplarının her birinden alınan örnekler (TTO0,TTO25, TTO50, TTO100 GCry ve ACry grupları, 8mm çapında)

Çizelge 4.1. Kriyojel gruplarının sentezinde kullanılan toplam monomer miktarı (% ,gr/ml), yağ miktarı (µl), Kriyojelin polimer çözeltisindeki yağ konsantrasyonu (mg/ml) ve sentezlenen kriyojelin formu

Kriyojel Adı	Polimer Çözeltisindeki toplam Monomer Miktarı (% ,gr/ml)	Yağ Miktarı (µl)	Polimer Çözeltisindeki Yağ konsantrasyonu (mg/ml)	Kriyojel Formu
PHEMA	13,8	0	0	Sarımsı beyaz, esnek
TTO0-GCry	14	0	0	sarımsı, esnek
TTO25-GCry	16	25	1,67	sarımsı, esnek
TTO50-GCry	16	50	3,33	sarımsı, esnek
TTO100-GCry	15	100	6,43	sarımsı, esnek
TTO0-ACry	13,5	0	0	Kirli beyaz, esnek
TTO25-ACry	13	25	1,32	Kirli beyaz, esnek
TTO50-ACry	14	50	2,81	Kirli beyaz, esnek
TTO100-ACry	13	100	5,39	Beyaz, esnek

4.2. TTO-GCry ve TTO-ACry ve PHEMA Kriyojellerin Karakterizasyonu

4.2.1. Şişme Deneyleri

Çalışmada, örneklerin jelleşme verimi (%), şişme oranları (%) ve makrogözenek derecesi (%) çizelge ve şekillerle gösterilmiştir. (Çizelge 4.2, Şekil 4.6- 4.11)

TTO-GCry kriyojellerin jelleşme verimleri değerlendirildiğinde, TTO0-GCry en yüksek verime (%81,70) sahip olduğu görüldü. Çay ağacı yağı eklenen kriyojellerde sırasıyla jelleşme verimi, TTO25-GCry %73,8, TTO50-GCry %70,50, TTO100-GCry %70,00 şeklinde belirlendi (Şekil 4.6). PHEMA (kontrol) kriyojelin jelleşme verimine bakıldığında (%86,20), jelatinin jelleşme verimini bir miktar azalttığı, TTO-jelatin etkileşiminin TTO miktarı arttıkça jelleşme miktarını daha da azalttığı görüldü. Polimerleşme sürecinde ilave edilen TTO'nun jelatinin çapraz bağlanma kapasitesini

azaltmış olabileceği düşünülebilir. Yağların hidrofobik etkileşimleri bu etkiye sebep olabilir (Xu ve ark., 2018).

TTO-GCry şişme oranlarına bakıldığında, kriyojeller genellikle birbirine yakın sonuçlar vermiş olup değerler %88,55 ile %90,28 arasındadır. En yüksek çay ağacı yağı miktarına sahip olan TTO100-GCry (% 90,28) en yüksek şişme oranına sahiptir. Şişme oranlarının birbirine yakın olmasının çay ağacı yağının kriyojelin stabilitesini negatif yönde etkilemediği, aksine şişme oranını bir miktar arttırdığı sonucunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.7).

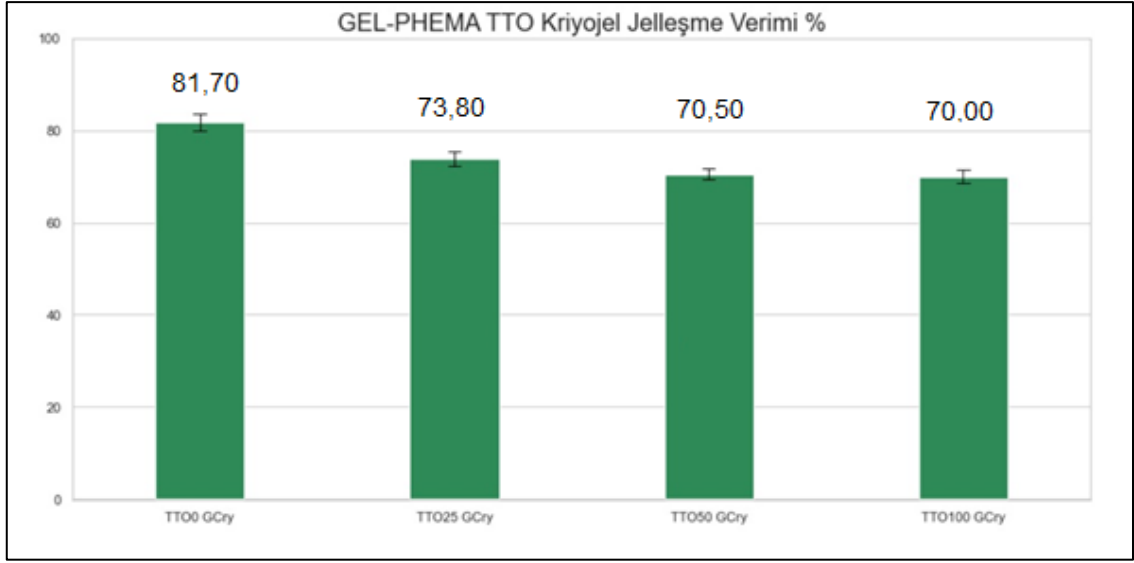
Makrogözenek derecesine (%) miktarlarına bakıldığında, sonuçlar TTO0-GCry için %71,77, TTO25-GCry için %73 63, TTO50-GCry için %74,89 ve TTO100-GCry için %70,99 olarak bulunmuştur. En yüksek makroporozite TTO50-GCry'de görülmüştür (Şekil 4.8).

Sonuçlar, belirli bir miktar TTO ilave edildiğinde kriyojelin makrogözenekliliğinin artırılabilirdiğini, ancak yüksek miktarda TTO ilavesinin belirli bir noktadan sonra makrogözenekliliği azaltılabildiğini gösterdi. Belirli bir miktarda ilave edilen yağ molekülleri, polimerleşme aşamasında kriyojelin donma sürecinde, daha kanallı ve homojen bir makrogözeneklilik sağlamış olabilir. Bu sonuç benzer bir çalışma ile uyumludur (Bölgen ve ark., 2020).

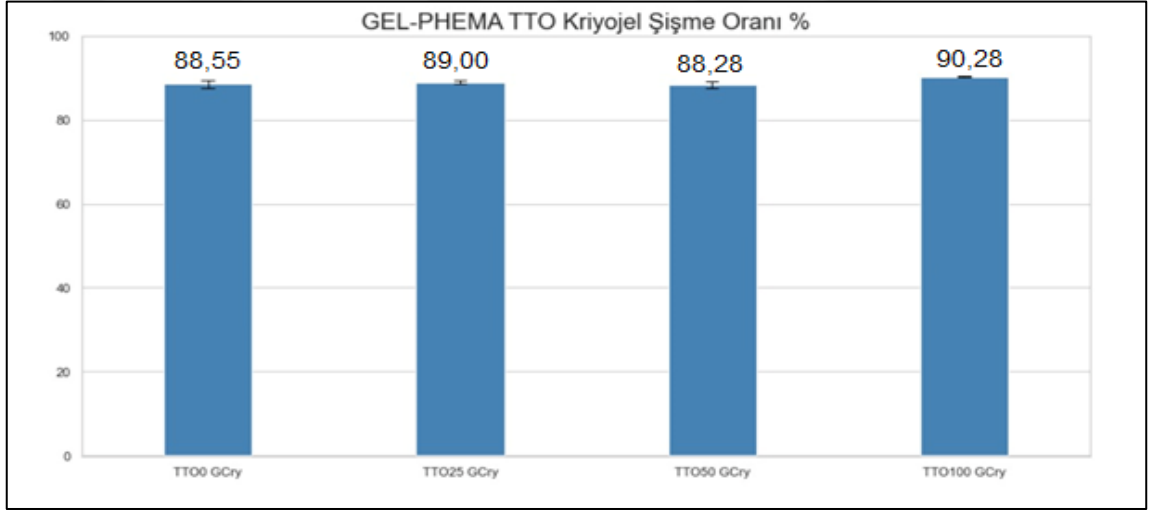
Genel olarak şişme özelliklerine bakıldığında, çay ağacı yağı katkısının, yapıya dahil edilmesine rağmen, kriyojelin stabilizasyonu, jelleşme verimi, makrogözenekliliği, şişme oranları üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.2. Kriyojel tiplerine bağlı jelleşme verimi (%), şişme oranı (%) ve makrogözenek derecesi(%)

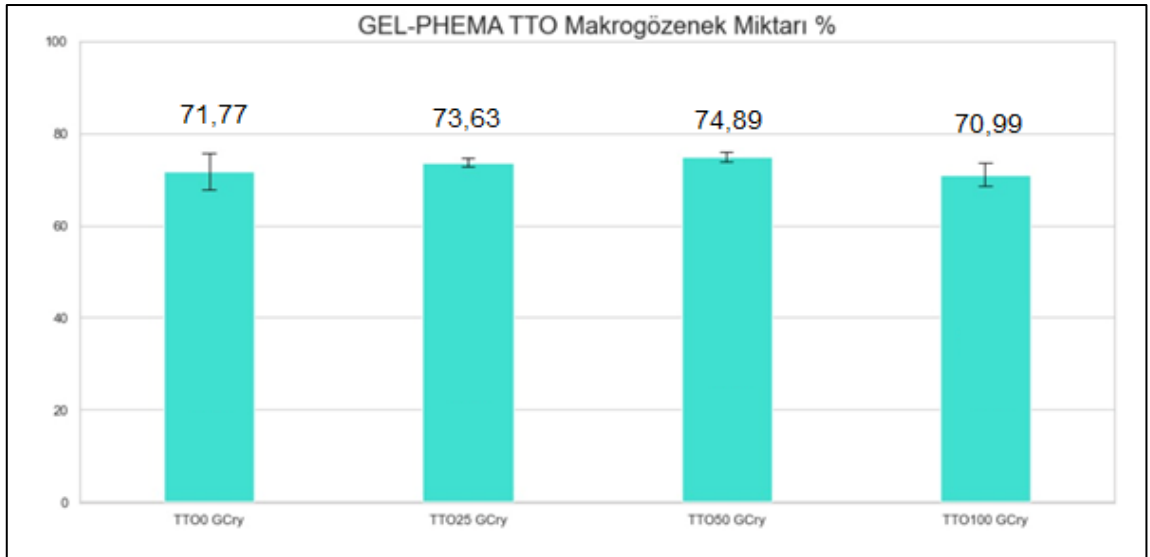
Kriyojel tipi	Jelleşme Verimi (%)	Şişme Oranı (%)	Makrogözenek derecesi (%)
PHEMA (Kontrol)	86.20±1,72	88.20±0,78	75.68±1,95
TTO0-GCry	81.70±2,30	88,55±1,14	71,77±4,80
TTO25-GCry	73.80±1,70	89,00±0,50	73.63±1,09
TTO50 -GCry	70.50±1,70	88,28±0,90	74.89±1,21
TTO100-GCry	70,00±1,70	90,28±0,20	70,99±3,02
TTO0-ACry	80,56±2,60	89,28±0,62	78,25±1,56
TTO25-ACry	83,33±2,90	89,16±0,98	79,50±1,68
TTO50-ACry	86,11±2,54	87,50±0,36	78,94±0,74
TTO100-ACry	84,00±2,00	89,84±0,50	80,90±0,36



Şekil 4.6. TTO-GCry gruplarının jelleşme verimi karşılaştırılması (%)



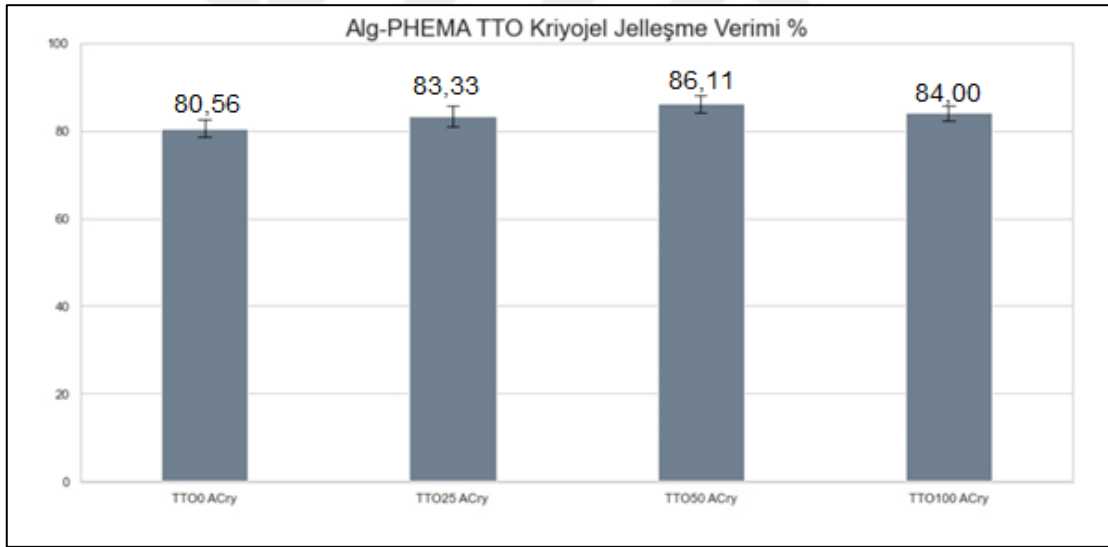
Şekil 4.7. TTO-GCry gruplarının şişme oranı karşılaştırılması (%)



Şekil 4.8. TTO-GCry gruplarının makrogözenek miktarı karşılaştırması (%)

TTO-ACry kriyojellerin jelleşme verimi (%) değerlendirildiğinde, TTO50-ACry kriyojelin en yüksek verime (%86,11) sahip olduğu görüldü. Tüm TTO-ACry kriyojellerde sırasıyla jelleşme verimi, TTO0-ACry %80,56; TTO25-ACry %. 83,33; TTO50-ACry % 86,11 ve TTO100-ACry % 84,00 şeklinde gösterildi. Çay ağacı yağı ilavesinin jelleşme verimi üzerine olumlu etkisi, TTO'nun ortam pH'ını etkilemesi sebebiyle olabilir. Bu durum aljinatın çapraz bağlanma kapasitesini arttırdığı yönünde yorumlanabilir. Aljinatın asidik ortamlarda daha iyi çapraz bağlanma kapasitesine sahip olduğu önceki çalışmalarda ifade edilmiştir (Lee ve Mooney, 2012). Bu sonuçlara göre, TTO eklenen örneklerde çay ağacı yağının belirli bir konsantrasyona kadar eklenmesinin jelleşme verimini arttırdığı söylenebilir (Şekil 4.9).

TTO-ACry kriyojel grubu TTO-ACry kriyojel grubuyla jelleşme verimi bakımından karşılaştırıldığında, TTO-ACry grubunun jelleşme veriminin genel olarak TTO-ACry grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu durumda aljinatın jelleşme verimini arttırdığı söylenebilir.

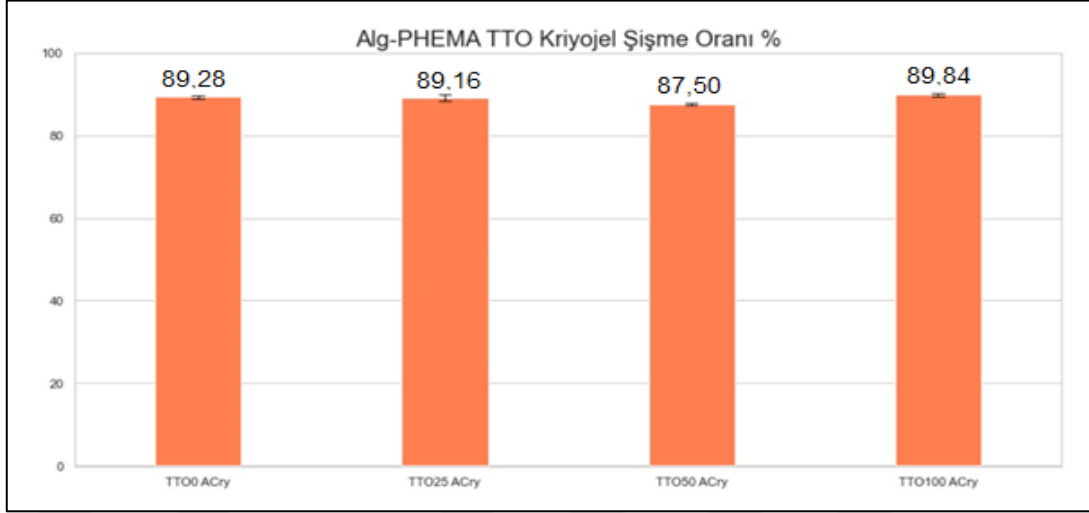


Şekil 4.9. TTO-ACry gruplarının jelleşme verimi karşılaştırılması (%)

TTO-ACry kriyojel grupları şişme oranlarına bakıldığında, kriyojeller genellikle birbirine yakın sonuçlar vermiş olup değerler % 87,50 ile % 89,84 arasındadır. En yüksek çay ağacı yağı miktarına sahip olan TTO100-ACry (% 89,84) en yüksek şişme oranına sahiptir. Şişme oranlarının birbirine yakın olması, çay ağacı yağının kriyojelin stabilitesini negatif yönde etkilemediğini gösterdi (Şekil 4.10).

TTO-ACry kriyojel grubunun TTO-ACry kriyojel grubu yaklaşık olarak benzer sonuçları vermiş olduğu değerlendirilebilir. Her iki grupta da en yüksek şişme oranı en fazla çay

ağacı yağı yüklemesi yapılan kriyojellerde görülmüştür (TTO100-GCry ve TTO100-ACry kriyojeller).



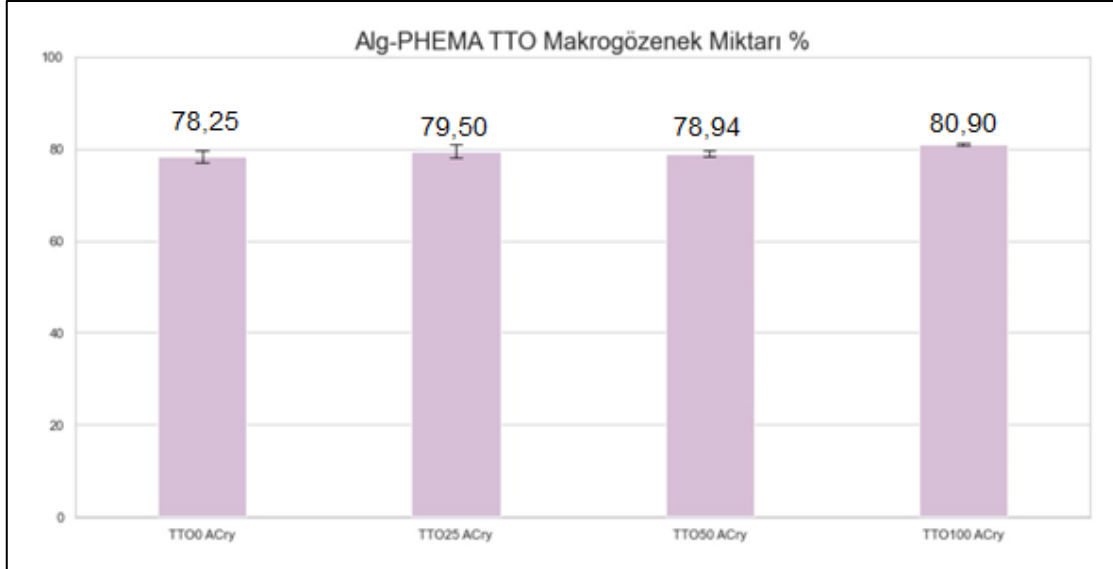
Şekil 4.10. TTO-ACry gruplarının şişme oranları karşılaştırması (%)

TTO-ACry kriyojel grupları makrogözenek derecesine (%) bakıldığında, sırasıyla, TTO0-ACry %78,25, TTO25-ACry %79,50, TTO50-ACry %78,94 ve TTO100-ACry %80,90 olduğu görülmektedir. Makrogözenek derecesini hiç çay ağacı yağı eklenmemiş kriyojele göre artmış olduğu görülmektedir. Genel olarak değerler birbirine yakındır, ancak maksimum makrogözenek derecesi TTO100-ACry %80,90 olmuştur. Çay ağacı yağının en yüksek çay ağacı yağı eklenen gruba göre makrogözenek derecesi üzerinde yaklaşık %2 değerinde arttırıcı bir etkisi olduğu söylenebilir (Şekil 4.11).

TTO-GCry kriyojel grupları ve TTO-ACry kriyojel grupları arasında kıyaslama yapıldığında, TTO-ACry kriyojel gruplarının makrogözenek derecesinin TTO-GCry kriyojel gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda, aljinatın jelatine göre makrogözenek derecesini arttırıcı etkisi olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak çay ağacı yağı içeren gruplar içermeyenlere göre daha yüksek makrogözenek derecesi sağlarken, aljinat içeren gruplar da jelatin içeren gruplara göre daha yüksek makrogözenek derecesine sahiptir, denilebilir. Kontrol grubu olan PHEMA ile karşılaştırıldığında, jelatin veya aljinat ilavesinin jelleşme verimini azalttığı, ancak bu azalma oranının jelatin ilaveli kriyojel gruplarında daha fazla olduğu görülmektedir (PHEMA jelleşme verimi % 86,2). Şişme oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sonuçlar genel olarak benzer görülsede, TTO100-GCry kriyojel (%90,28) ve TTO100-ACry kriyojelin (%89,84) en yüksek şişme oranına sahip olduğu görüldü (PHEMA şişme oranı %88,2). Daha önce belirtildiği üzere, genel olarak tüm gruplara bakıldığında,

TTO'nun şişme oranını pozitif yönde etkilediği görüldü. Makrogözenek dereceleri karşılaştırıldığında, TTO-GCry kriyojel grubunun PHEMA kriyojel değerinden daha düşük olduğu görüldü. TTO-ACry kriyojel grubunun PHEMA kriyojel değerinden daha yüksek olduğu görüldü (PHEMA makrogözenek derecesi %75,88).



Şekil 4.11. TTO-ACry gruplarının makrogözenek miktarı karşılaştırması (%)

4.2.2. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) Headspace Analizi

Çalışmada kullanılan ticari çay ağacı yağının bileşenleri, Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) Headspace analizi sonuçlarına göre tanımlandı ve değerleri ISO/FDIS 4730:2004 referans aralığı ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmadan elde edilen sonuçların, referans değerlerin aralığında olduğu görüldü (Çizelge 4.3) TTO'nun bileşenleri ve yüzde (%) aralıkları şu şekildedir: α -pinen %2-3; sabinen %0-1; % α -terpinen 8-9; p-simen %1-2; 1,8-sineol %5-6; limonen %0,5-1; γ -terpinen %21-22; terpinolen %3-4; terpinen-4-ol %40-41; α -terpineol %2-3; aromadendren %2-3; viridifloren %0-1; δ -kadinen %1-2; δ -kadinen %0-1; viridiflorol %0-1. Ticari TTO'da bulunan bileşenler ve oranları, literatür ve ISO/FDIS 4730:2004 değerleri ile uyumlu olduğu bulundu (Carson vd., 2006; Avonto vd., 2016).

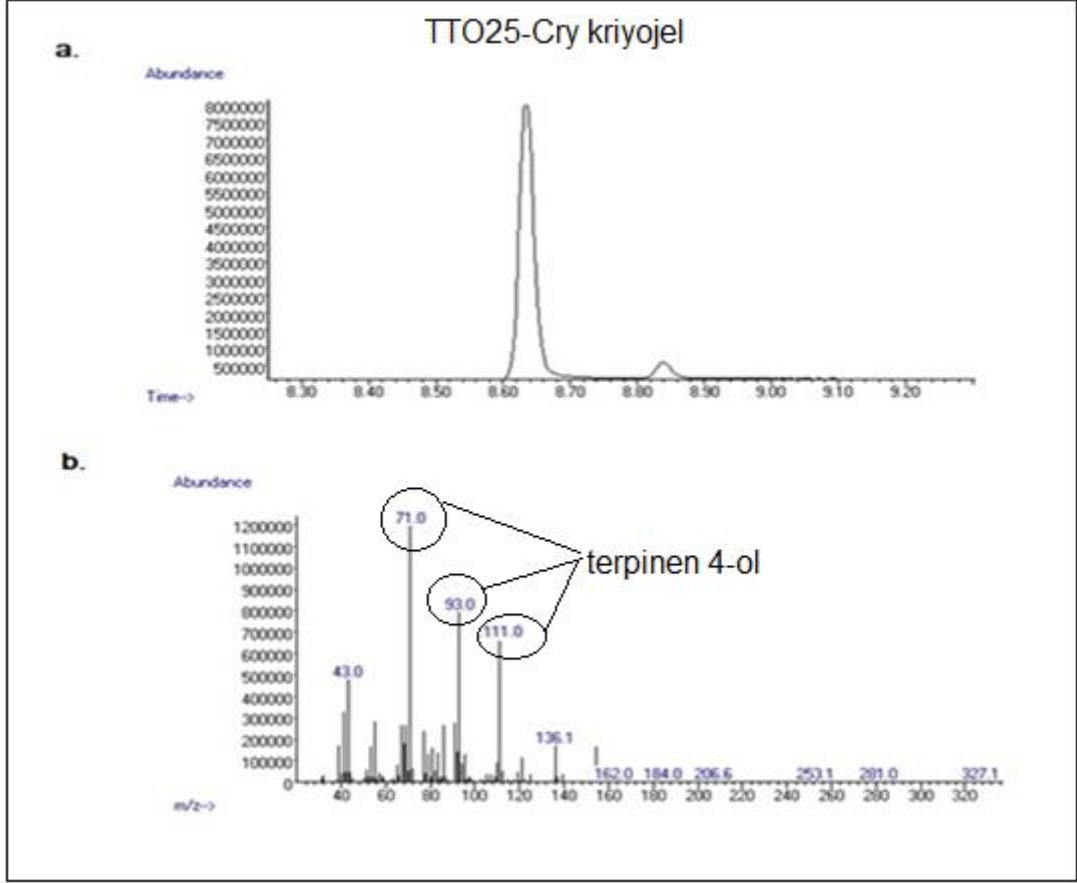
GC-MS Headspace ile TTO'nun kriyojel yapısına katılıp katılmadığı belirlendi. Bunun için, TTO yapısındaki ana bileşen olan terpinen-4-ol, GCMS-Headspace Kütle Spektrumunda gösterildi. Çalışmanın ilk aşamasında, en az miktarda TTO ile yüklenmiş kriyojel örnekleri (TTO25-GCry, 25 μ l, TTO25-ACry, 25 μ l yüklenmiş kriyojel) için elde edilen sonuçlar, TTO'nun kriyojel yapısına hapsoldüğünü göstermiştir. Geçmiş çalışmaları incelediğimizde ve TTO'nun ana metaboliti olan terpinen 4-ol'ün iyon

kromatogramı ile karşılaştırdığımızda, bu iyonların kriyojel yapısında bulunduğu görülmüştür (NIST Mass Spectrometry Data Center; Hadi ve ark., 2016).

TTO'nun ana metaboliti olan terpinen 4-ol'ün Q (m/z)(kalifikasyon iyonu) değeri 71, q1 (m/z) ve q2 (m/z) değerleri (kalifikasyon iyonları) ise sırasıyla 93 ve 111'dir. Buna göre, TTO ve ana metaboliti terpinen 4-ol'ün kriyojellerin yapısına katıldığı görülmüştür (Şekil 4.12).

Çizelge 4.3. ISO/FDIS 4730:2004 standartlarına göre çalışmada kullanılan çay ağacı yağı bileşenlerinin minimum/maksimum (%) değerleri ve çalışmada kullanılan çay ağacı yağı yüzde aralığı (%)

No	Bileşen	Min/ Maks. (%)	Çalışmada kullanılan TTO bileşenleri miktarı yüzde aralığı (%)
1	α - Pinen	1 / 6	2-3
2	Sabinen	- / 3,5	0-1
3	α -Terpinen	5 / 13	8-9
4	<i>p</i> -Simen	0,5 / 8	1-2
5	1,8-Sineol	- / 15	5-6
6	Limonen	0.5 / 1,5	0,5-1
7	γ -Terpinen	10 / 28	21-22
8	Terpinolen	1,5 / 5	3-4
9	Terpinen 4-ol	30 / 48	40-41
10	α -Terpineol	1,5 / 8	2-3
11	Aromadendren	- / 3	2-3
12	Viridifloren	- / 3	0-1
13	δ -Kadinen	- / 3	1-2
14	Globulol	- / 1	0-1
15	Viridiflorol	- / 1	0-1



Şekil 4.12. TTO- GCMS-Headspace Kriyojel Kütle Spektrometresi (TTO25-GCry için ana bileşeni olan terpinen-4-ol'ün pik değeri), a. Kriyojel kütle/zaman spektrumu (terpinen-4-ol'ün pik değeri) b. kütle-zaman, m/z spektrumu, terpinen-4-ol'ün iyon kromatogramı

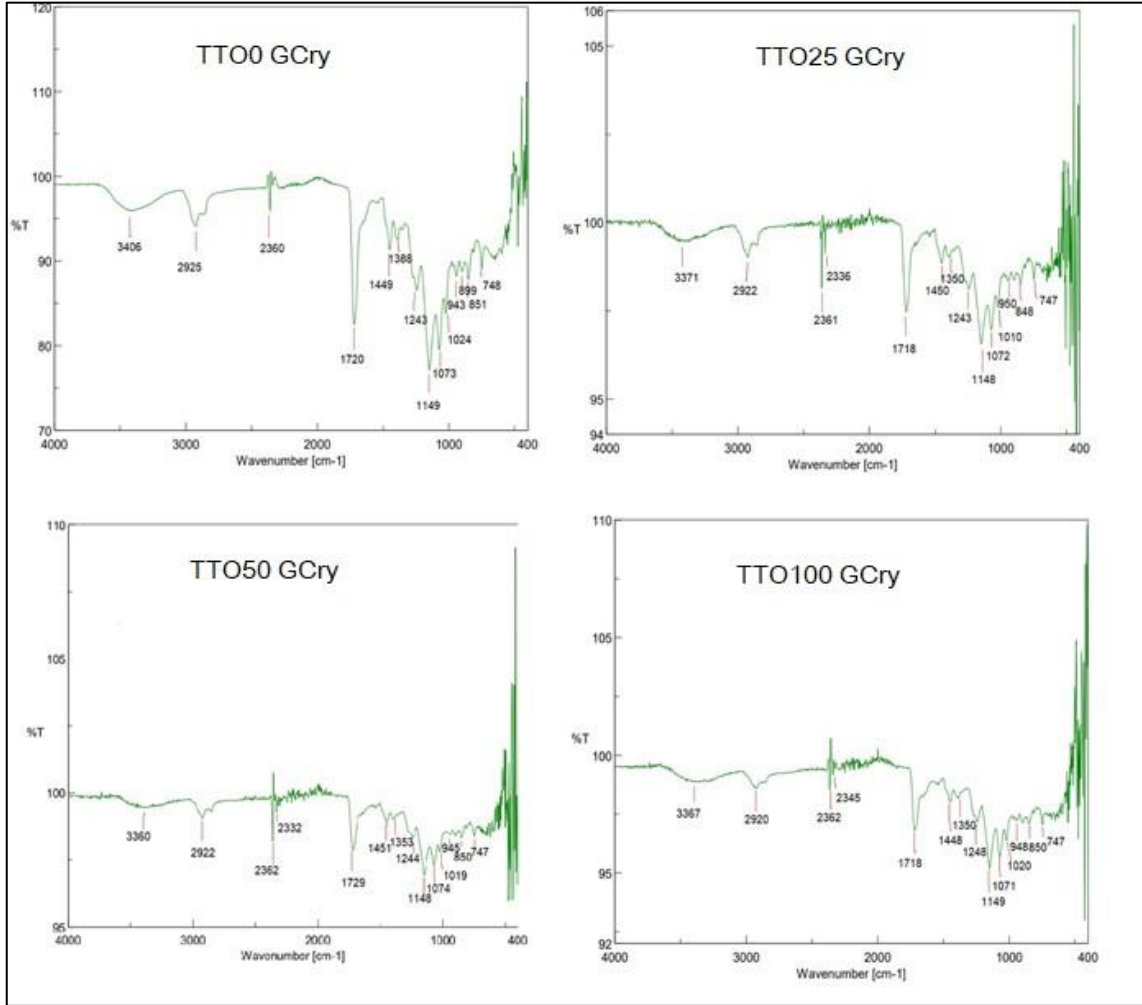
4.2.3. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektrometresi ile Kriyojellerin Yapı Analizinin Yapılması

Bu çalışmada, her kriyojel için FTIR sonuçları ayrı ayrı ve birlikte değerlendirildi. Bunun yanı sıra, saf çay ağacı yağı ve kontrol grubu olan PHEMA kriyojelin spektrum karşılaştırmaları da değerlendirildi.

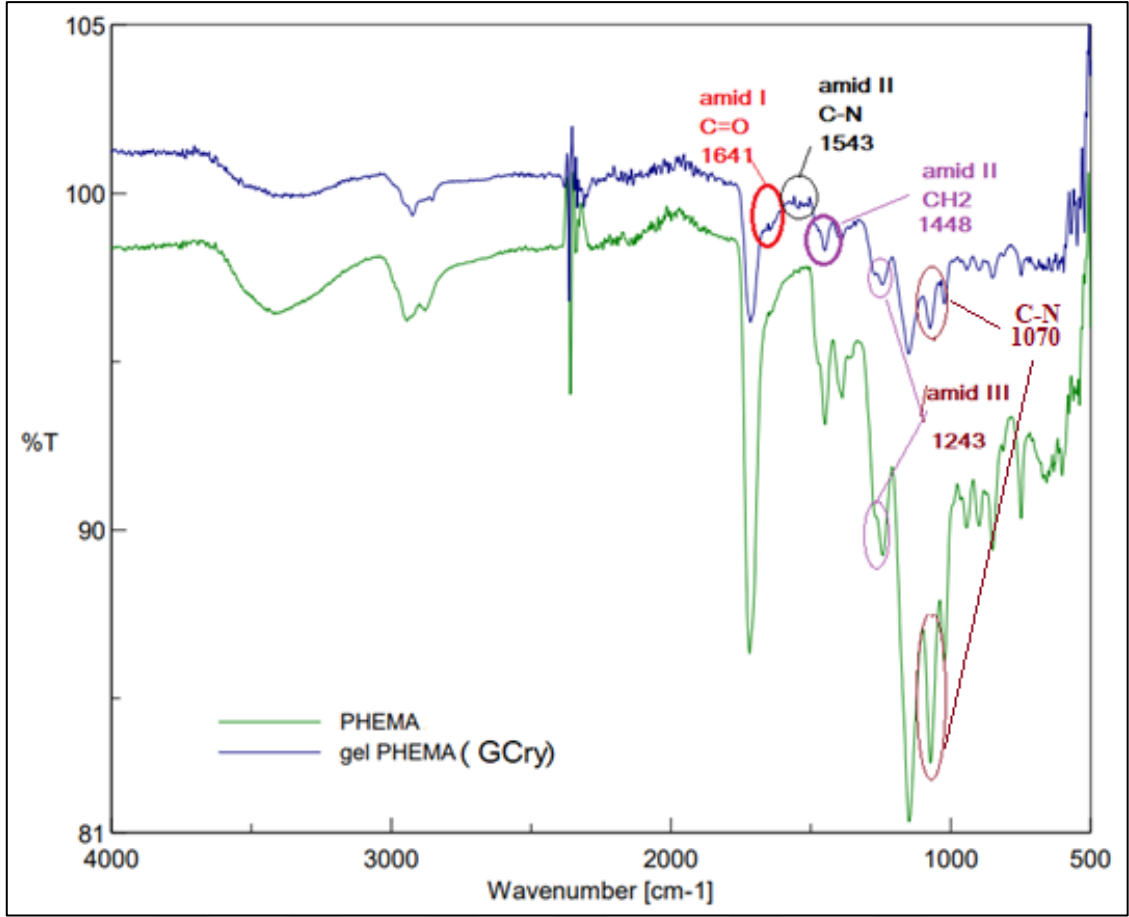
4.2.3.1. TTO-GCry Kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizinin Yapılması

TTO-GCry kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen spektrumların beklenen şekilde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13). Buna göre tipik PHEMA spektrumu, jelatin ve çay ağacı yağı varlığında meydana gelen değişimler, elde edilen spektrumların karşılaştırılması ile değerlendirildi.

Genel olarak değerlendirildiğinde, önceki çalışmalara dayanarak, yaklaşık 2920 cm⁻¹'deki bantların sırasıyla asimetrik ve simetrik C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı söylenebilir. Yaklaşık 3300-3400 cm⁻¹'deki karakteristik geniş tepe, O-H gerilme titreşimlerini gösterir (Şekil 4.13-15). 1720 cm⁻¹'de yüksek yoğunluklu bandın varlığı, C-O esneme titreşimlerinin varlığına işaret eder (Şekil 4.13-14). Amidler, N-H ve C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan soğurma bantları ile karakterize edilir (Derazshamshir ve ark., 2010).

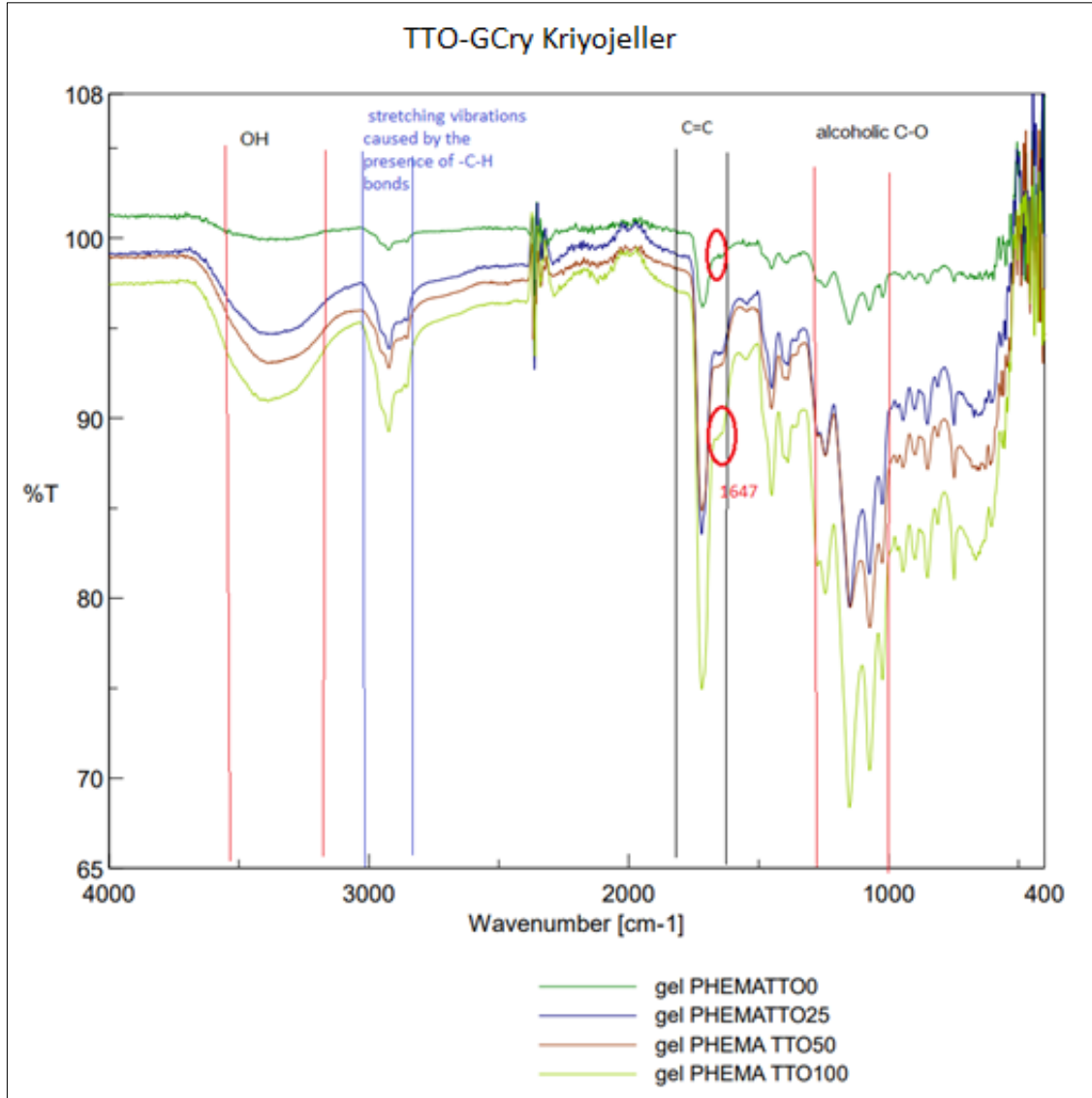


Şekil 4.13. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kriyojellerin spektrumları, (400-4000 cm⁻¹, FT/IR-6600 tip A (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren TTO GCry kriyojeller)

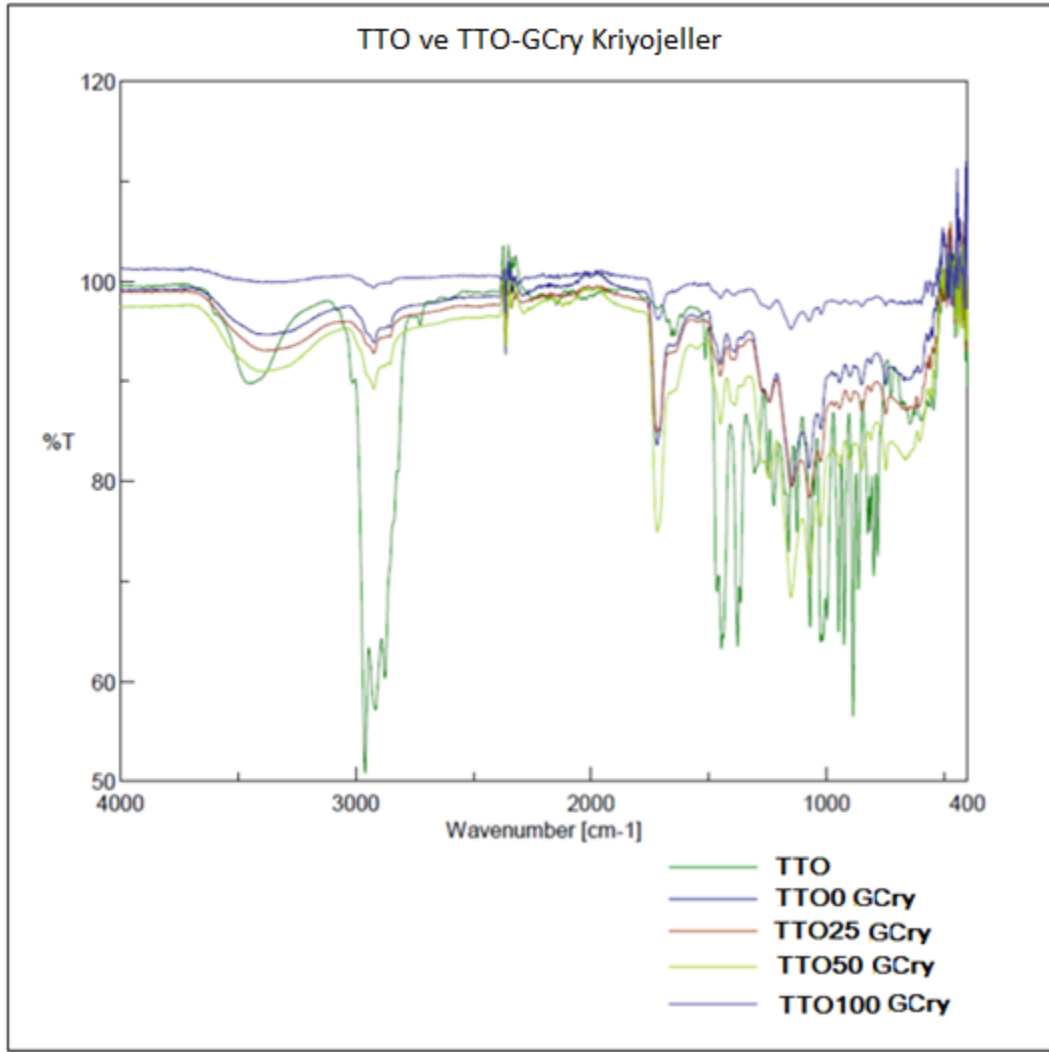


Şekil 4.14. Fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile PHEMA kriyojel ve gelPHEMA (GCry) kriyojel spektrumları amid I, amid II ve amid III bantları karşılaştırması

PHEMA kriyojel ve gelPHEMA (GCry) kriyojel kızılötesi spektrumunu incelediğimizde, jelatine özgü amid I bandının 1641 cm⁻¹'de (C=O germe), amid II bantlarının 1543 cm⁻¹'de (çift bükülme ile C-N gerilme) ve (CH₂ bükülme frekansı) 1448 cm⁻¹'de görüldüğünü görüyoruz. Çalışma ile karşılaştırıldığında, bu bantların literatürdeki çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmüştür. PHEMA'dan ve jelatinden kaynaklanan amid III bantları, 1243 cm⁻¹'de görülmekte olup 1070 cm⁻¹'de C-N gerilmeleri görülmektedir (Şekil 4.14) (Sharma ve ark., 2013; Elzey ve ark., 2016). Amid bantlarının tespiti, jelatinin GCry kriyojel yapısına dahil edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (400-4000 cm⁻¹, FT/IR-6600 tip A) ile TTO-GCry kriyojellerinin karşılaştırmalı spektrumları, farklı miktarlarda (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren tüm kriyojellerin karşılaştırma spektrumları

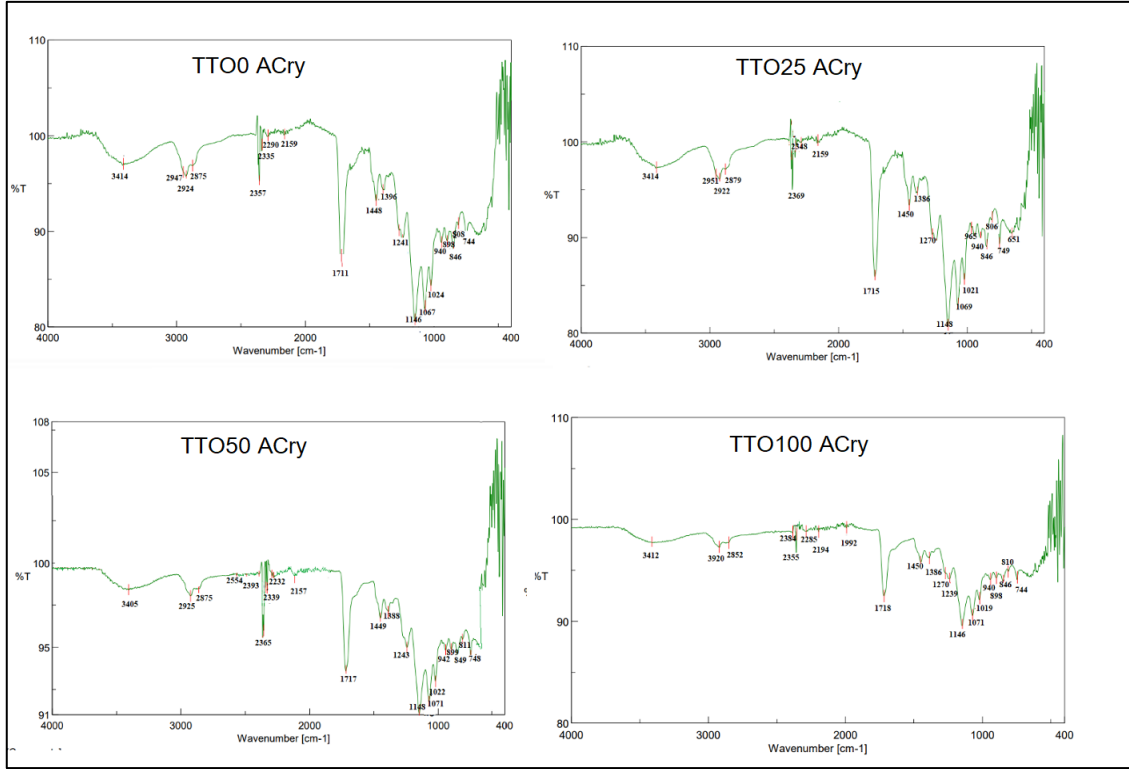


Şekil 4.16. TTO ve farklı miktarlarda (0,25,50,100 µl) çay ağacı yağı içeren kriyojellerin karşılaştırmalı spektrumları

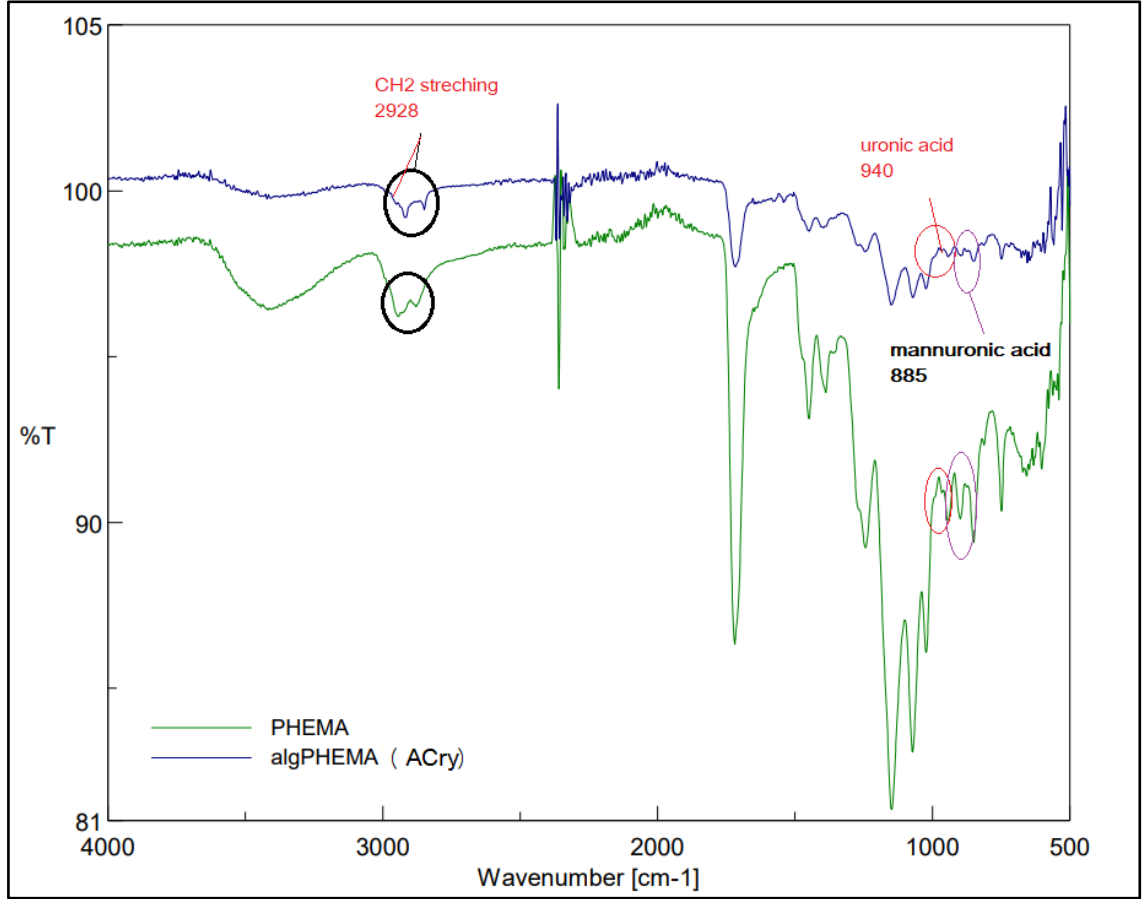
Şekil 4.15'e bakıldığında, kriyojellerdeki TTO miktarının artmasıyla, belirli dalga boylarındaki çizgilerin uzunluğunun da arttığı görülmektedir. Aromatik yağlardaki terpenoidlerin karakteristik C-H bağı $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$, C=O bağı ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$), büyük bir O-H gerilimi $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ ve C-O gerilimi $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ civarında görülür (Elzey ve ark., 2016). Bu dalga boylarındaki genişlemeler, çay ağacı yağı spektrumunda da görülür. Sonuç olarak, aynı dalga boylarındaki uzamaların çay ağacı yağı eklenmesiyle artması, yağın kriyojel yapısında olduğunu ve Emilimi etkilediğini gösterir. Şekil 4.16' da, çay ağacı yağı için özgül bir nokta olan $\sim 1647 \text{ cm}^{-1}$ 'in zirvesi, kriyojelin içine yüklenen çay ağacı yağı miktarı arttıkça daha belirgin hale gelmiştir (Thiagarajan ve ark., 2021).

4.2.3.2. TTO-ACry Kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizinin Yapılması

TTO-ACry kriyojellerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen spektrumların beklenen şekilde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.17). Buna göre tipik PHEMA spektrumu, aljinat ve çay ağacı yağı varlığında meydana gelen değişimler, elde edilen spektrumların karşılaştırılması ile değerlendirildi.

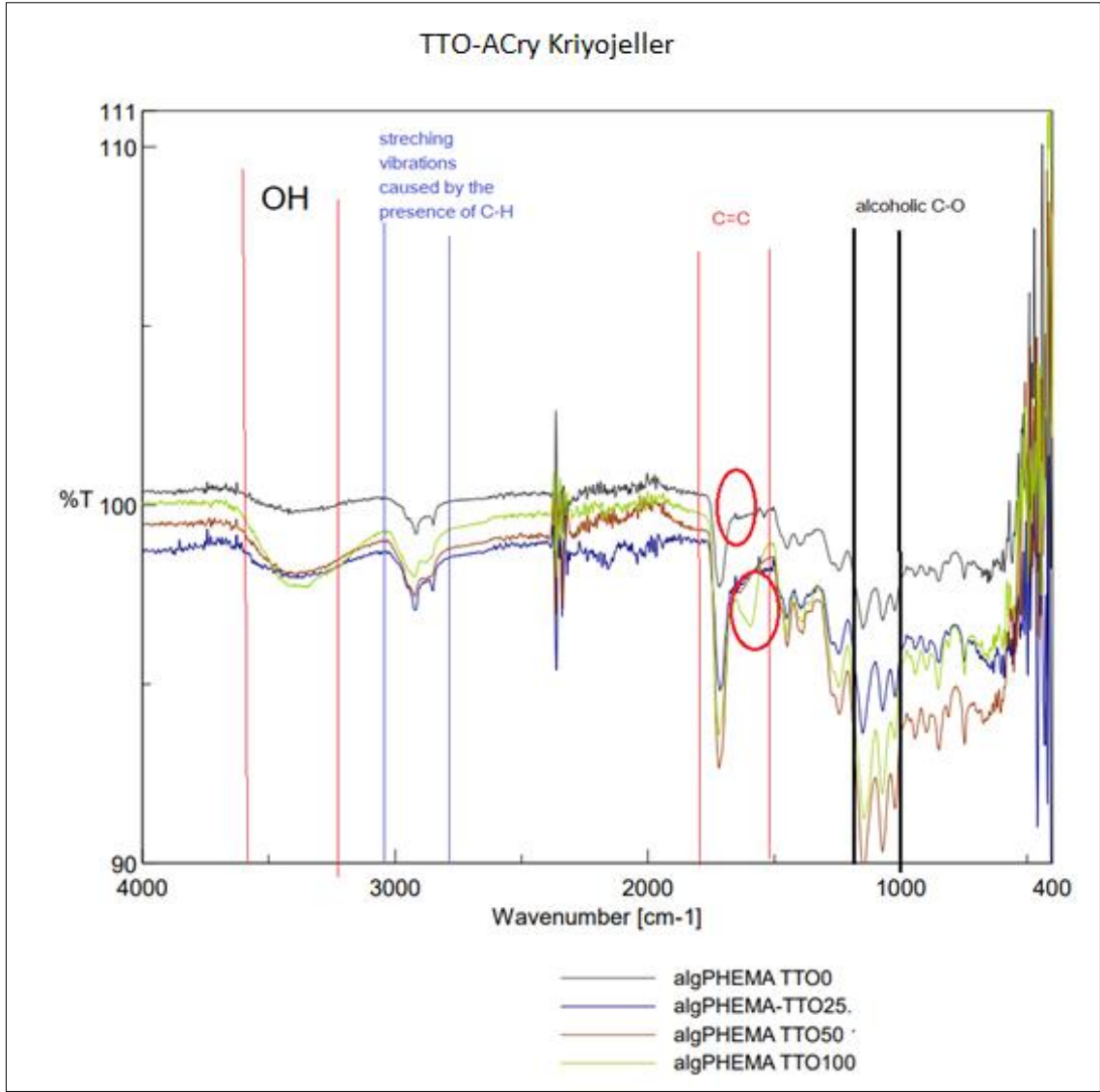


Şekil 4.17. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kriyojellerin spektrumları, (400-4000 cm⁻¹, FT/IR-6600 tip A (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl çay ağacı yağı içeren TTO-ACry kriyojeller)



Şekil 4.18. Fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile PHEMA kriyojel ve ACry kriyojel spektrumları CH₂ esnemesi, üronik asit ve manuronik asit bantları karşılaştırması

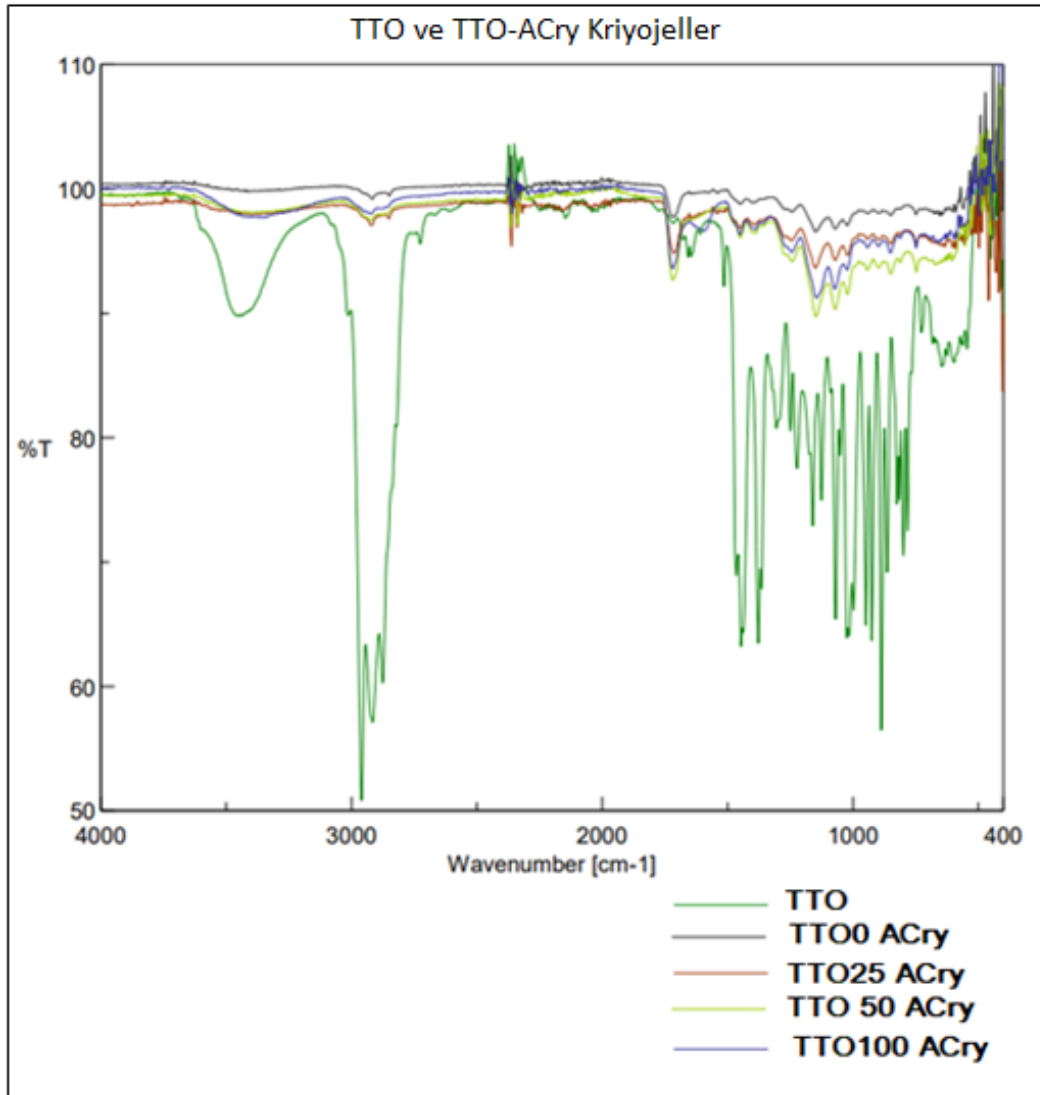
PHEMA ve ACry kriyojellerin FTIR spektrumları şekilde karşılaştırılmıştır. ACry kriyojele aljinatın yapıya katıldığı, aljinata özgü 884 cm⁻¹ dalga boyunda görülen manuronik asit fonksiyonel grubu ve 939 cm⁻¹ dalga boyunda görülen üronik asit ve 2928 cm⁻¹ dalga boyunda CH₂ esneme bölgelerinde meydana gelen yapı değişiklikleri ile anlaşılmaktadır (Şekil 4.18) (Aprilliza, 2017).



Şekil 4.19. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (400-4000 cm⁻¹, FT/IR-6600 tip A) ile TTO ACry kriyojellerinin karşılaştırmalı spektrumları, farklı miktarlarda (sırasıyla 0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren tüm kriyojellerin karşılaştırma spektrumları

Daha önce yapılan çalışmalara dayanarak, yaklaşık 2920 cm⁻¹'deki bantlarının sırasıyla asimetrik ve simetrik C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı söylenebilir. Yaklaşık 3300-3400 cm⁻¹'deki karakteristik geniş tepe, O-H gerilme titreşimlerini gösterir. 1720 cm⁻¹'de yüksek yoğunluklu bandın varlığı, C-O esneme titreşimlerinin varlığına işaret eder. Amidler, N-H ve C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan soğurma bantları ile karakterize edilir. Aljinattan kaynaklanan 3200-3400 cm⁻¹ dalga boyu OH fonksiyonel grubu ve 2920-2928 cm⁻¹ dalga boyunda CH₂ stretching varlığının olması, çakışmaya

sebepl olabilir (Şekil 4.19). Bu nedenle pikler TTO için ayırt edici olmayabilir (Aprilliza, 2017; Thiagarajan ve ark., 2021).



Şekil 4.20. TTO ve farklı miktarlarda (0, 25, 50, 100 µl) çay ağacı yağı içeren ACry kriyojellerin karşılaştırmalı spektrumları

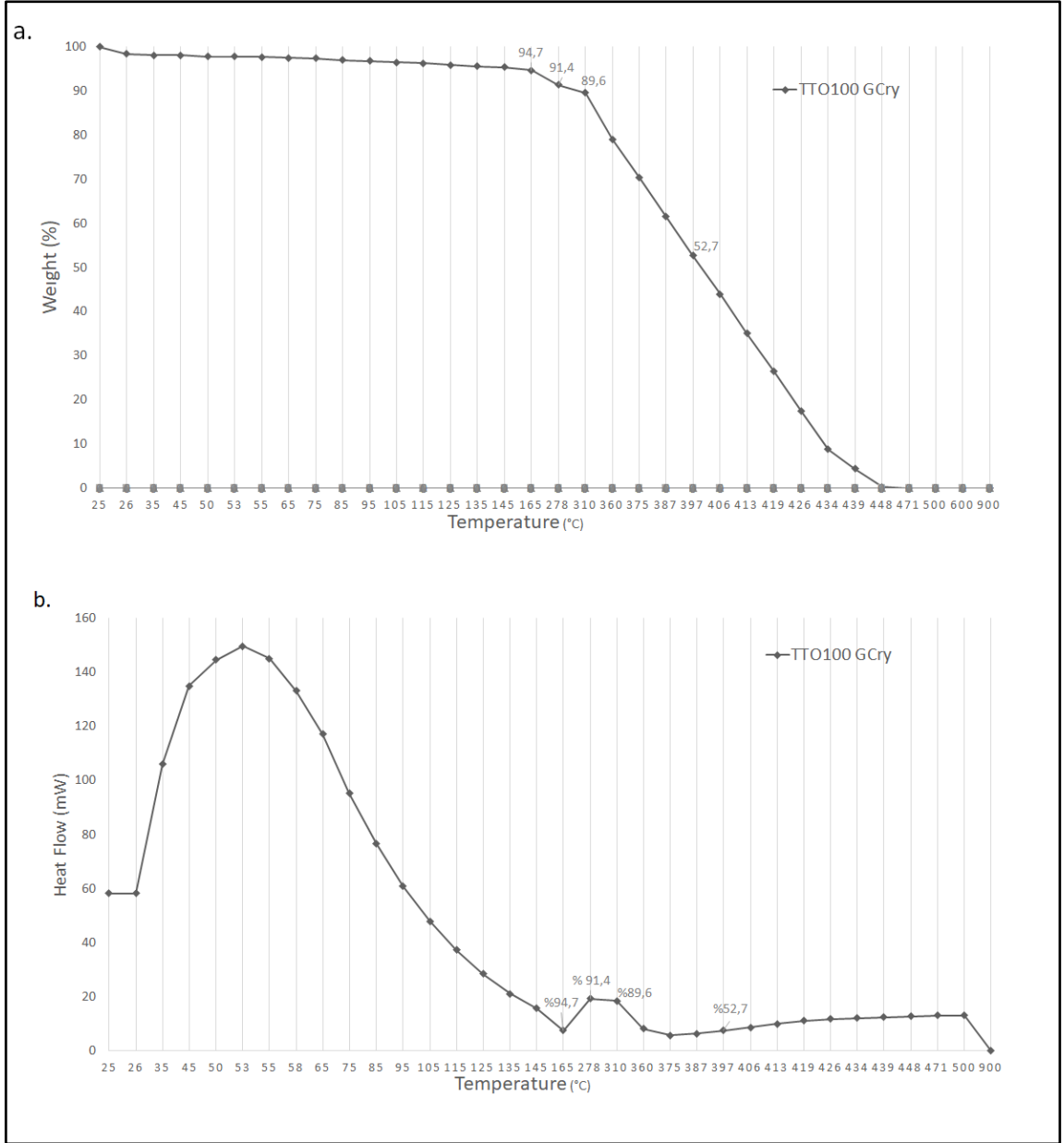
Şekil 4.20'ye bakıldığında, çay ağacı yağı için özgül bir nokta olan ~1647 cm⁻¹'in zirvesi, kriyojelin içine yüklenen çay ağacı yağı miktarı arttıkça daha belirgin hale gelmiştir (Thiagarajan ve ark., 2021).

4.2.4. Termogravimetrik Analizi (TGA)

4.2.4.1. TTO100-GCry Kriyojel Termogravimetrik Analizi (TGA)

Termogravimetrik analiz (TGA) sıcaklık artışına bağlı kalan madde miktarı yüzdesi (%) hesaplanarak, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) sonuçları ısı akışı verileri ve sıcaklık grafiği ile gösterilmiştir. 100 µl çay ağacı yağı yüklü TTO100GCry kriyojelin analiz sonuçlarına göre kriyojel 165 °C’de ağırlığının yaklaşık %5’ini kaybetmiştir. 400 °C’de yaklaşık %50’sini kaybetmiş olup 448 °C’de tamamı bozunmuştur. Kriyojel 165-310 °C arası daha yavaş bir bozunma, 310 °C’den sonra daha hızlı bir bozunma profili göstermiştir. Isı akışı-sıcaklık grafiği incelendiğinde, 50-55°C’de arasında maksimum pik vermiş olup, bozunma hızının en yüksek olduğu 165-360 °C’de aralıkta bir pik daha vermiştir. DSC grafiği sonuçlarına bakıldığında polimer malzemenin T_c (kristalleşme) sıcaklığı 165 °C, T_m (erime) sıcaklığının 310 °C olduğu söylenebilir. Bu değerler benzer özellikteki polimer malzemelerin değerleri ile uyushmaktadır (Bai ve ark., 2013).

Literatürde jelatin için, %5 ve %10 ağırlık kaybı için sırasıyla yaklaşık 75,8°C ve 123,4°C sıcaklıkların gözlemlendiği belirtilmiştir (Bai ve ark., 2013). Yaptığımız çalışmada kriyojelin 165 °C’de ağırlığının yaklaşık %5’ini kaybettiği düşünöldüğünde yapının saf jelatine göre daha stabil olduğu söylenebilir.



Şekil 4.21. TTO100-GCry kriyojel termogravimetrik analizi (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi (oda sıcaklığından 900 °C'ye 10 °C/dak), a. ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının TGA karşılaştırılması, b. ısı akışı (mW) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının DSC karşılaştırılması

4.2.4.2. TTO100-ACry Kriyojel Termogravimetrik Analizi (TGA)

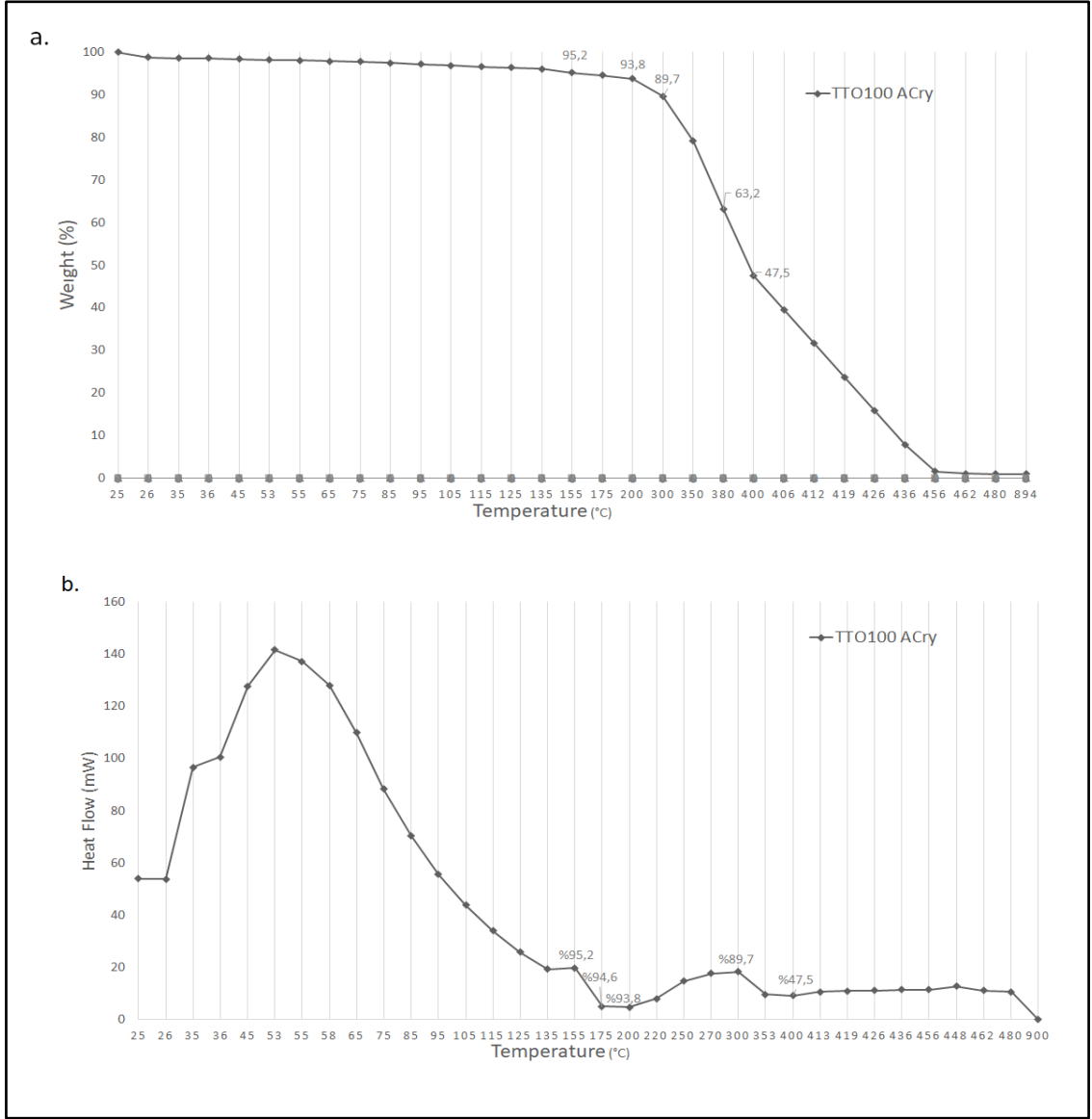
TGA ve DSC sonuçları ısı akışı verileri ve sıcaklık grafiği ile gösterilmiştir. 100 µl çay ağacı yağı yüklü TTO100ACry kriyojelin analiz sonuçlarına göre kriyojel 155 °C’de ağırlığının yaklaşık %5’ini kaybetmiştir. Yüzde 10’unu 300°C’de, yaklaşık %50’sini, 398°C’de kaybetmiş olup 456 °C’de %1’i kalmış ve bozunmamıştır.

Kriyojel 25-200°C arası daha yavaş bir bozunma, 200 °C’den sonra hızlı bir bozunma profili göstermekle beraber, 300 °C’den sonra daha hızlı bir bozunma profili göstermiştir. Isı akışı-sıcaklık grafiği incelendiğinde, 53 °C’de maksimum pik vermiş olup, bozunma hızının en yüksek olduğu 175 °C’de bir pik daha vermiştir. DSC grafiği sonuçlarına bakıldığında polimer malzemenin Tc (kristalleşme) sıcaklığı 175 °C, Tm (erime) sıcaklığının 300 °C olduğu söylenebilir.

Literatürde aljinat için, en yüksek ağırlık kaybı sıcaklığının 213 °C olduğu belirtilmiştir (Fan vd, 2005). Yaptığımız çalışmada kriyojelin 300 °C’den sonra maksimum biyobozunma gösterdiği düşünüldüğünde yapının saf aljinata göre daha stabil olduğu söylenebilir.

TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojeller karşılaştırıldığında, TTO-GCry jellerin ağırlığının %10’unu kaybettiği sıcaklığın 310 °C, TTO-ACry kriyojelin 300 °C olması, jelatinin aljinata göre yapıyı bu sıcaklık değerleri arasında yapıyı daha dayanıklı hale getirdiği sonucuna yol açabilir. Kriyojellerin ağırlıklarının %50’sini kaybettiği sıcaklıklar ise TTO-GCry için 400 °C, TTO-ACry için 398 °C’dir.

Sonuç olarak TTO ACry’in %10’unun, TTO GCry kriyojele göre daha hızlı bozunduğu, ancak belirli bir sıcaklıktan sonra %50’sinin bozunma hızına bakıldığında bozunma hızının birbirine yaklaştığı görülmüştür. Jelatinin mevcut polimeri sıcaklığa daha dayanıklı hale getirdiği söylenebilir. Bu sonuç, literatüre bilgisi ile karşılaştırıldığında, jelatinin aljinattan daha yavaş bozunduğu bilgisi ile uyusmaktadır (Fan ve ark., 2005).

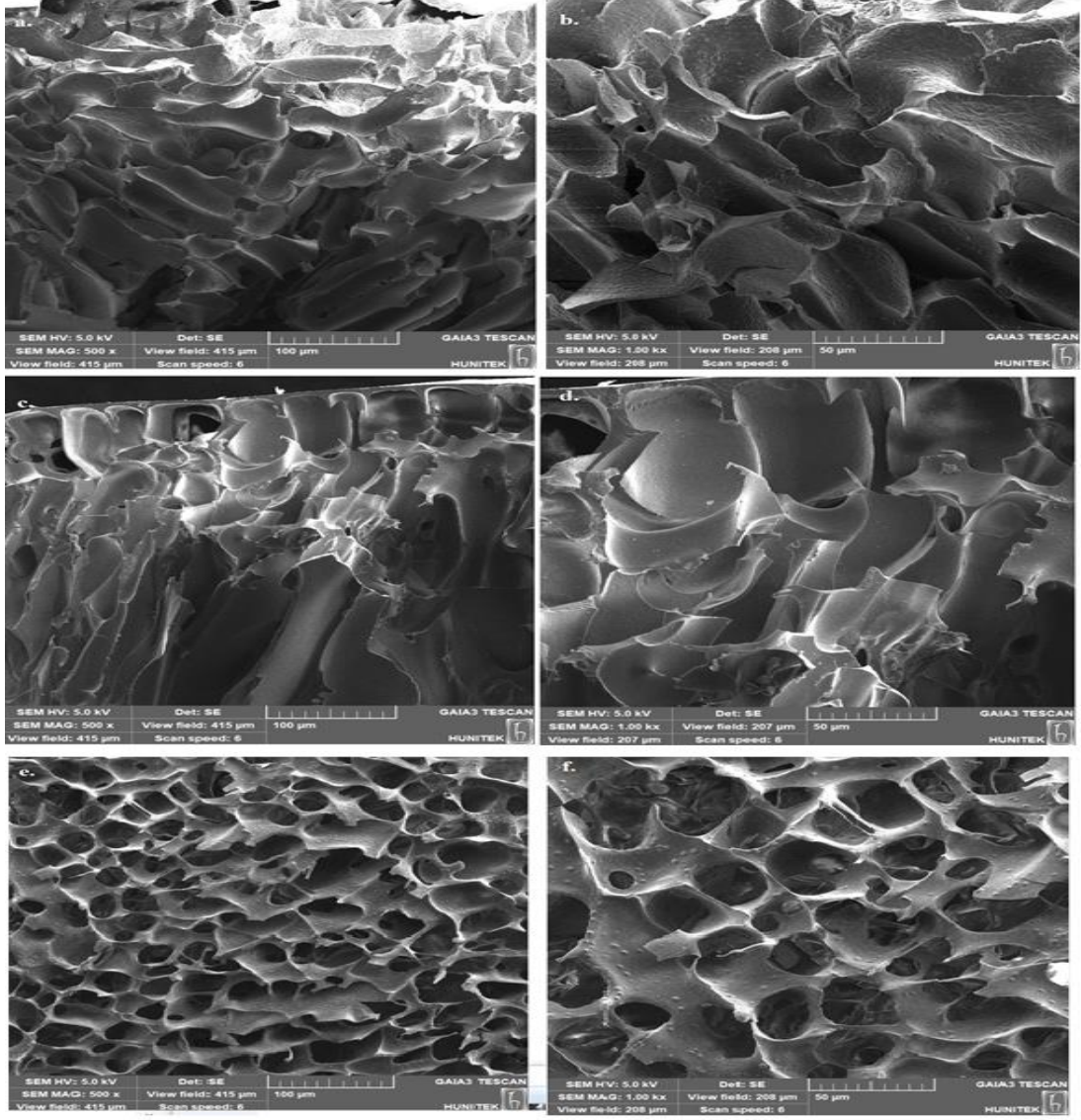


Şekil 4.22. TTO100-ACry kriyojel termogravimetrik analizi (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi (oda sıcaklığından 900 °C'ye 10 °C/dak), a. ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının TGA karşılaştırılması, b. ısı akışı (mW) ve sıcaklık (°C) sonuçlarının DSC karşılaştırılması

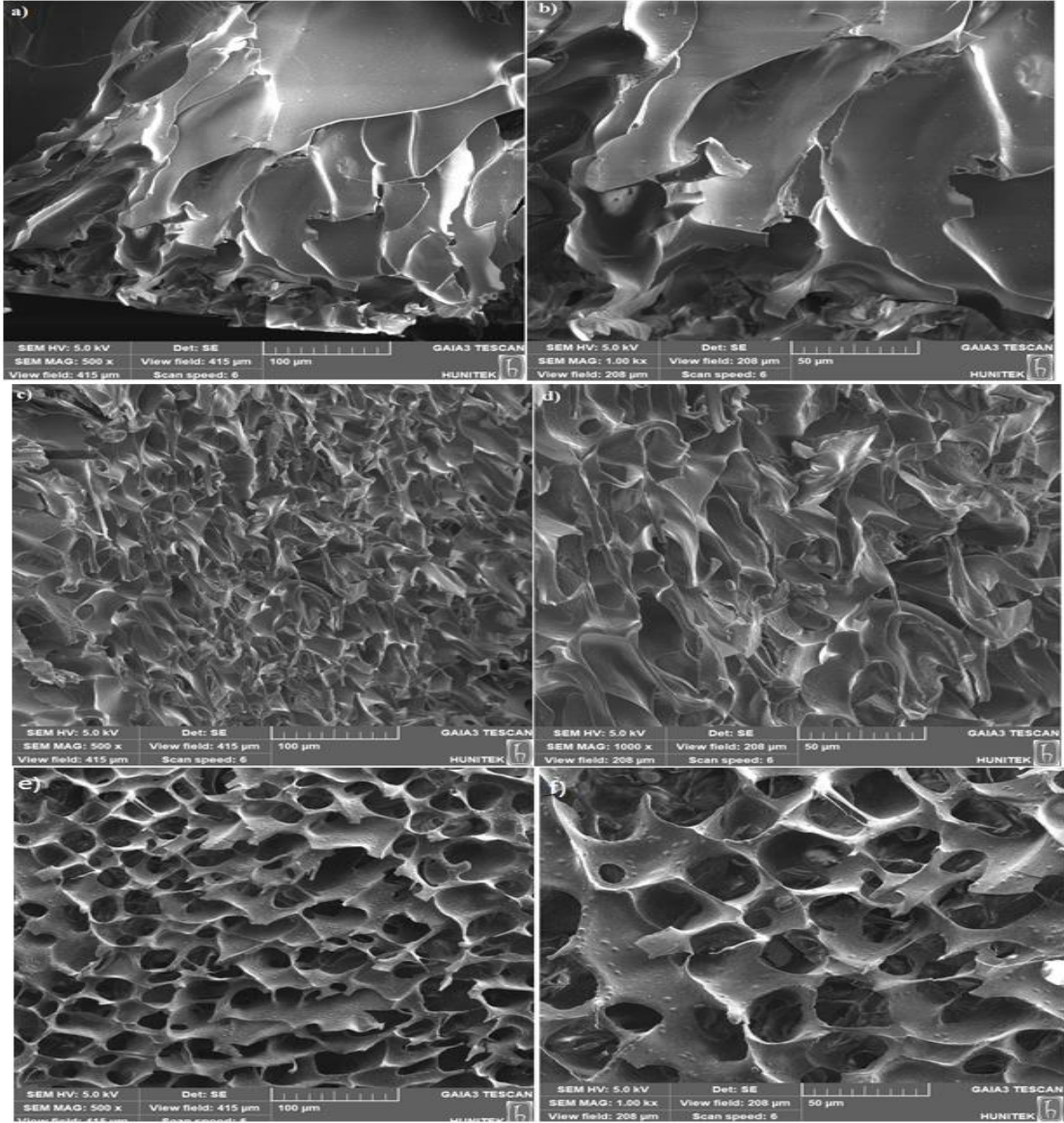
4.2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntü Analizi

Bu çalışmada, yapısal özellikleri gözlemlemek için yüzey analizleri yapılmış ve kriyojelde kullanılan jelatin ve çay ağacı yağının kriyojel üzerindeki etkileri incelendi (Memic vd., 2020). Her bir kriyojel grubunun 500 X, bar 100µm ve 1000 X, bar 50 µm ölçeklendirme ile görüntüleri elde edildi. PHEMA kriyojellerinin SEM görüntüleri

değerlendirildiğinde, her kriyojelde beklenildiği gibi makroporların olduğu ve kriyojellerin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmüştür. SEM görüntülerine göre, TTO eklenmesiyle kriyojel makro gözenek boyutlarının daha homojen olduğu gözlemlenmiştir. Bu homojenlik, yara iyileştirme gibi uygulamalarda cilt üzerinde kullanımı için çay ağacı yağının eşit bir şekilde yayılmasına olanak tanır (Şekil 4.23). Bu ayrıca, önceki yağ eklenmiş kriyojel çalışmasıyla uyumludur (Bölgen vd., 2020). SEM analizine göre, ortalama gözenek boyutları TTO0-GCry için 30-140 μm , TTO100-GCry için 30-120 μm , TTO0-ACry 30-110 μm , TTO100-ACry 30-100 μm ve kontrol-PHEMA için 30-150 μm arasında değişmektedir (jelatin, aljinat veya TTO yok). Ortalama gözenek boyutlarının, jelatin eklenmesi ile daha homojen bir etki yaratmış olduğu görülmüş, çay ağacı yağının ve jelatinin birlikte kullanımı ile ortalama değerlere daha yakın makrogözenek boyutları değerleri gözlemlenmiştir. Benzer şekilde aljinatlı gruplar da, kontrol-PHEMA ile karşılaştırıldığında, daha homojendir. Çay ağacı yağı eklenmiş olan TTO100-ACry kriyojelin çay ağacı yağı ilavesiyle aljinata göre daha homojen makrogözenek boyutuna sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. PHEMA, çay ağacı yağı içermeyen TTO 0 GCry ve çay ağacı yağı içeren TTO 100 GCry (100 µl) kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a-b) TTO0 GCry (TTO içermeyen kriyojel), a. 500 X, bar 100µm, b. 1000 X, bar 50 µm, c-d) TTO100 GCry (100 µl TTO içeren kriyojel) c. 500 X, bar 100µm, d. 1000 X, bar 50 µm, e-f) Kontrol-PHEMA kriyojel (jelatin veya TTO içermeyen kriyojel), e. 500 X, bar 100µm, f. 1000 X, bar 50 µm



Şekil 4.24. PHEMA, çay ağacı yağı içermeyen TTO 0 ACry ve çay ağacı yağı içeren TTO 100 ACry (100 µl) kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a-b) TTO0 ACry (TTO içermeyen kriyojel), a. 500 X, bar 100µm, b. 1000 X, bar 50 µm, c-d) TTO100 ACry (100 µl TTO içeren kriyojel) c. 500 X, bar 100µm, d. 1000 X, bar 50 µm, e-f) Kontrol-PHEMA kriyojel (aljinat veya TTO içermeyen kriyojel), e. 500 X, bar 100µm, f. 1000 X, bar 50 µm

Genel olarak değerlendirildiğinde, gözenek boyutlarının daha homojen ve yakın boyutlarda olmasının hem yara iyileşmesinde yara üzerinde eşit dağılımlı bir etki yaratabileceği hem de kan ve vücut sıvısı absorpsiyonu daha verimli şekilde yapabileceği sonucunu doğuracağı düşünülebilir. Ayrıca, gözenek boyutlarının homojen olması kriyojelin kan absorpsiyon ve pıhtılaşma anali sonuçlarına da etki etmektedir. Buna göre, homojenlik arttıkça, belirli bir alana uygulanan kriyojelin kanı tutma özelliğinde daha başarılı olabileceği beklenmektedir.

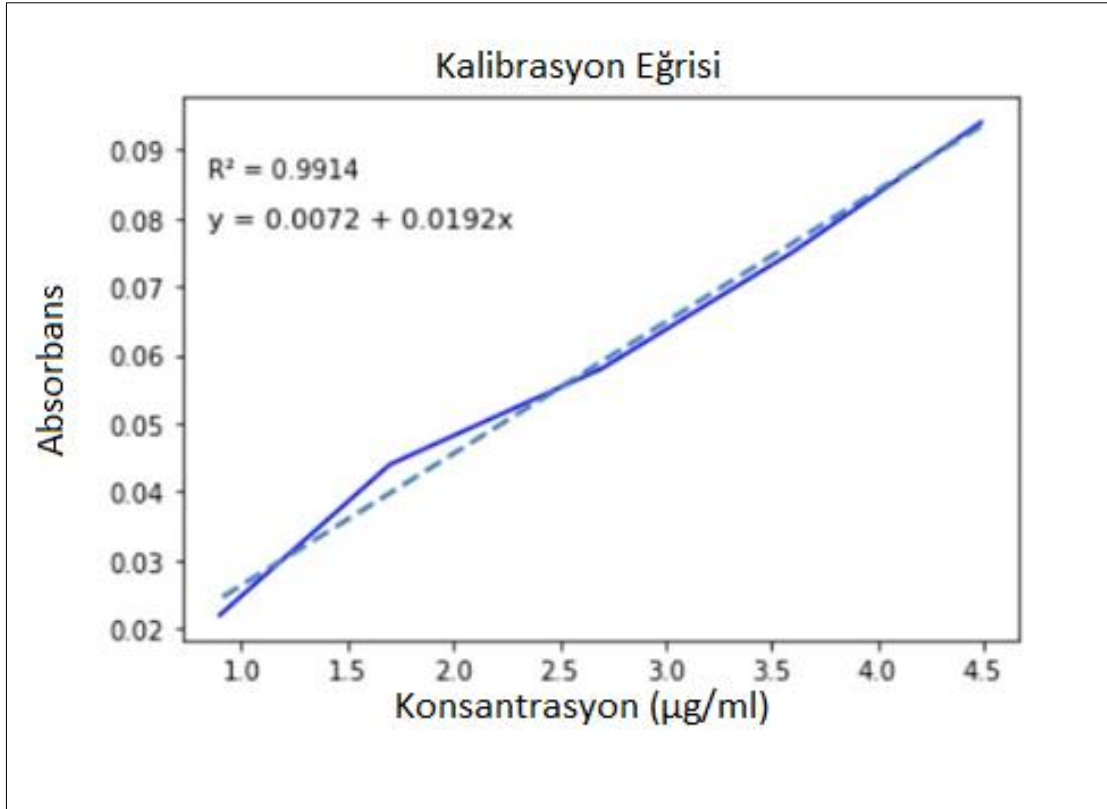
4.3. Kümülatif Salım Analizi

Kriyojellere yüklenmiş olan TTO'nun kümülatif salım analizi çalışmaları değerlendirildiğinde maksimum salım oranına 24-48 h aralığında ulaşıldığı sonucuna varılabilir.

İlk değerlendirmede, UV Spektrofotometre ölçümlerine göre belirlenen standart konsantrasyon değerleri (1-5 µg) 267 nm'de dalga boyu ölçülen değerler ile absorbans-konsantrasyon (µg/ml) değerini gösteren bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.25, $R^2=0.9914$, $p \leq 0,05$).

Bu değerler esas alınarak, farklı oranlarda çay ağacı yağı ilave edilen her bir kriyojelin zamana bağlı kümülatif salım yüzde (%) oranları hesaplandı (Çizelge 4.4, Şekil 4.26).

0-72 h aralığında elde edilen sonuçlara göre, salım 2 sa itibariyle TTO25-GCry için %12, TTO50-GCry için %18, TTO100-GCry için %14 olarak ölçüldü. Saatlere göre değerlerin TTO-GCry kriyojeller için ortalama olarak yakın olduğu gözlemlendi. 2 sa itibariyle TTO25-ACry için TTO'nun %52'si, TTO50-ACry için %60'ı, TTO100-ACry için %9'unun salındığı görüldü. Düşük konsantrasyondan TTO içeren aljinat bazlı kriyojellerin diğer gruplara göre daha hızlı salım gerçekleştirdiği görüldü. Genel olarak 37 °C'de aljinatlı kriyojellerin jelatinli kriyojellere göre daha hızlı salım gösterdiği söylenebilir. Aljinatın yüksek sıcaklarda jelatine oranla daha hızlı ayrışma göstermesi, yapının stabilitesini ters orantılı olarak etkilemesi ve dolayısıyla gözeneklerinde tuttuğu TTO'nun daha hızlı salınmasına sebep olabileceği yorumu yapılabilir.



Şekil 4.25. Kriyojel standart kalibrasyon grafiği, absorbans (267 nm) ve konsantrasyon (µg/ml) karşılaştırması (Phyton 3.0, $p \leq 0,05$).

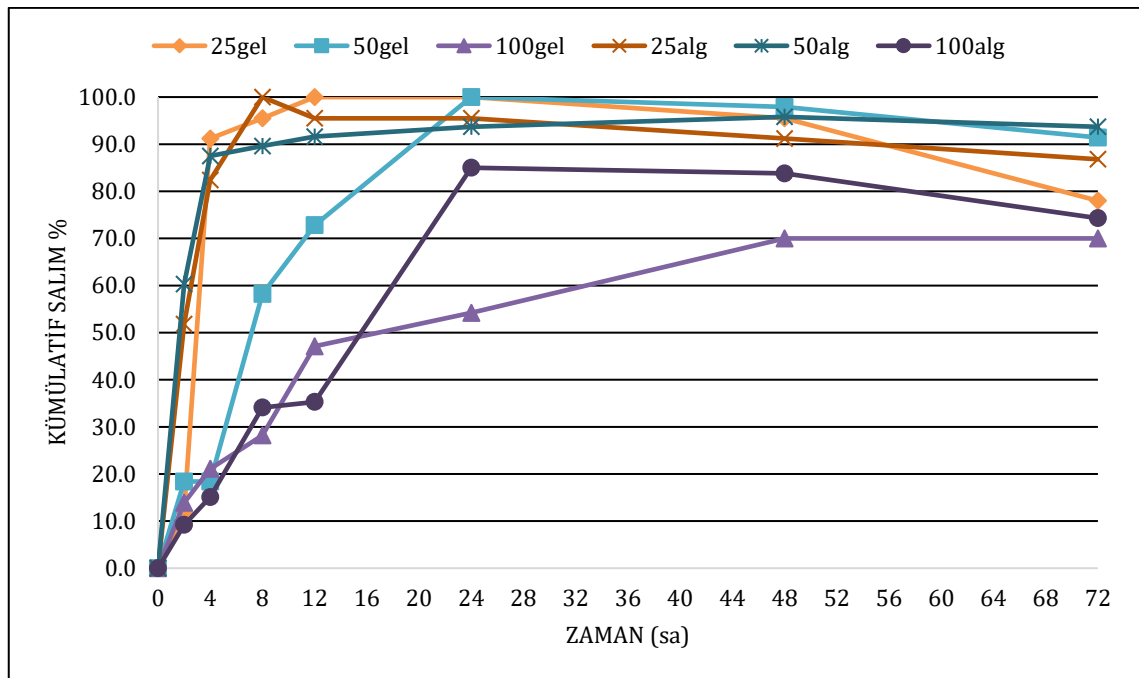
Genel olarak kriyojellerde, salımın maksimum orana ulaştığı zaman 24-48 sa aralığında oldu. Kriyojeller 48 sa itibariyle yapılarındaki çay ağacı yağının tamamını saldılar. En yüksek TTO konsantrasyonuna sahip kriyojellerde durum değişmedi.

Daha düşük konsantrasyonda TTO içeren TTO25-GCry ve TTO25-ACry grupları için 8 sa itibariyle; TTO50-GCry ve TTO50-ACry grupları için 12 sa itibariyle yapılarındaki TTO'nun tamamına yakınının salındığı görüldü. En yüksek konsantrasyonda TTO içeren TTO100-GCry ve TTO100-ACry gruplarında 48 sa itibariyle en yüksek salıma ulaşıldığı görüldü. Bu nedenle, çalışmamızda MTT analizi ve yara çizik testi değerlendirmeleri de maksimum 48 sa göre gerçekleştirildi.

TTO yüklü TTO-GCry ve TTO-ACry kriyojellerde zamana bağlı TTO kaybı görüldü. Bu kaybın buharlaşmadan kaynaklandığı söylenebilir.

Çizelge 4.4. Kriyojelleri Zamana Bağlı Kümülatif Salım Yüzde (%) Karşılığı

Kümülatif Salım (%)	TTO25 GCry	TTO50 GCry	TTO100 GCry	TTO25 ACry	TTO50 ACry	TTO100 ACry
0 h	0	0,0	0,0	0	0	0
2h	12	18	14	52	60	9
4h	91	18	21	82	88	15
8h	96	58	28	100	90	34
12h	100	73	47	96	92	35
24h	100	100	54	96	94	85
48h	96	98	70	91	96	84
72h	78	91	70	87	94	74



Şekil 4.26. Kriyojellerin zamana bağlı kümülatif salım oranı (%)

4.3.1. Kümülatif Salım Kinetik Modellerinin Uygulanması

Kriyojellerin zamana bağlı kümülatif salım oranlarının değerlendirilmesi kinetik salım modelleri parametreleri ile değerlendirildi (Çizelge 4.5). Jelatinli kriyojel grupları değerlendirildiğinde, TTO25-GCry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,32, First-order model için 0,44, Higuchi modeli için 0,56, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,67 idi. TTO50-GCry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,70, First-order model için 0,83, Higuchi modeli için 0,88, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,93 idi. TTO100-GCry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,83, First-order model için 0,93, Higuchi modeli için 0,97, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,98 idi.

Aljinatlı kriyojel grupları değerlendirildiğinde, TTO25-ACry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,31, First-order model için 0,43, Higuchi modeli için 0,60, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,68 idi.

TTO50-ACry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,28, First-order model için 0,56, Higuchi modeli için 0,56, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,62 idi. Son olarak TTO100-ACry kriyojel için R^2 değerleri, Zero-order modeli için 0,82, First-order model için 0,83, Higuchi modeli için 0,91, Korsmeyer-Peppas modeli için 0,91 idi.

Gruplar değerlendirildiğinde, modellerin genelinde yüklenen TTO miktarı arttıkça R^2 değerinin arttığı görüldü. En yüksek R^2 değerinin TTO100-GCry ve TTO100-ACry gruplarında olduğu görüldü. Çay ağacı yağı miktarının zamana bağlı salımının daha doğru sonuçlar vermesinin sebebi, salımın bu gruplarda daha uzun sürede gerçekleşmesine bağlandı. Tüm gruplar için en uygun modelin Korsmeyer-Peppas modeli olduğu görüldü. Korsmeyer-Peppas modeli söz konusu olduğunda en yüksek R^2 değerlerine sahip olan TTO100-GCry ve TTO-100ACry' bakabiliriz. Korsmeyer-Peppas modeli söz konusu olduğundan n değeri de önem taşımaktadır.

Korsmeyer-Peppas modelinde " n " değeri, ilaç salımının mekanizmasını ve polimer matrisin davranışını ifade eden önemli bir parametredir. Salınan ilacın serbestleşme mekanizmasını tanımlamaktadır. " n " değeri 0,5'e yaklaştıkça, ilaç salımı Fick difüzyonu gibi yüzey kontrollü bir mekanizma ile gerçekleşir. Bu durumda, ilaç molekülleri matrisin yüzeyinden serbestleşir ve salım hızı zamanla azalır. Fick difüzyonu, ilacın polimer matrisinden çözünerek veya difüzyonla geçerek salınmasını ifade eder. Bu durumda, ilaç molekülleri matris içindeki boşluklardan geçerken bir difüzyon direnciyle karşılaşır.

" n " değeri 1'e yaklaştıkça, ilaç salımı Fick difüzyonunun yanı sıra diğer mekanizmalarla da etkileşime girebilir. Bu durum "non-Fick difüzyonu" olarak adlandırılır ve genellikle karmaşık serbestleşme mekanizmalarını ifade eder. Bu mekanizmalar arasında çözünme, polimerin bozunması gibi faktörler yer alabilir (Ahmed ve ark., 2019; Ge ve ark., 2019).

TTO100-GCry için " n " değeri 0,3952'dir (Çizelge 4.5). " n " değerinin 0,5'ten az olması Fick difüzyon kurallarına göre değerlendirilebileceğini göstermektedir. TTO100-ACry için " n " değeri 0,5287 olduğundan non-Fick difüzyon kurallarına göre değerlendirilebileceği öngörülebilir. Bu durumda aljinat bazlı kriyojel için ilaç salımının kısmen polimer malzemenin çözünme hızından etkilenebileceği yorumu yapılabilir. Sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur (Ge ve ark., 2019).

Çizelge 4.5. Kümülatif salım kinetik modelleri kriyojel sonuçları

Salım Modeli ve parametreleri		TTO25-GCry	TTO50-GCry	TTO100-GCry
Zero-order modeli	Denklem	$y=1,481x+50,507$	$y=2,0164x+24,314$	$y=1,3138x+15,106$
	R^2	0,32	0,70	0,83
	$K_o (sa^{-1})$	1,481	2,0164	1,3138
	$Q_o (\%)$	50,507	24,314	15,106
First-order modeli	Denklem	$y=-0,0224x+1,169$	$y=-0,0476x +1,935$	$y=-0,0103x +1,9735$
	R^2	0,44	0,83	0,93
	$K_I(sa^{-1})$	0,0516	0,1096	0,0237
	$Q_o (\%)$	50,507	24,314	15,106
Higuchi modeli	Denklem	$y=14,63x+26,25$	$y=16,718x+1,1142$	$y=10,514x+1,155$
	R^2	0,56	0,88	0,97
	$K_H (sa^{-1/2})$	14,63	16,718	10,514
Korsmeyer-Peppas modeli	Denklem	$y=0,5348x+0,2267$	$y=0,6106x-0,01091$	$y=0,3953x-0,005$
	R^2	0,67	0,93	0,98
	$K_m (sa^{-1})$	-	-	-
	n	0,5348	0,6106	0,3953
Salım Modeli ve parametreleri		TTO25-ACry	TTO50-ACry	TTO100-ACry
Zero-order modeli	Denklem	$y=1,241x+58,94$	$y=1,08x+58,952$	$y=0,01845x+0,1184$
	R^2	0,31	0,28	0,82
	$K_o (sa^{-1})$	1,241	1,08	1,8453
	$Q_o (\%)$	58,94	58,952	11,838
First-order modeli	Denklem	$y=-0,0349x+1,1932$	$y=-0,0213x+1,4491$	$y=-0,0193x+1,9663$
	R^2	0,43	0,56	0,83
	$K_I (dk^{-1})$	0,0804	0,4905	0,0444
	$Q_o (\%)$	58,94	58,952	11,838
Higuchi modeli	Denklem	$y=12,81x+36,92$	$y=11,296x+39,321$	$y=14,361x-6,5065$
	R^2	0,60	0,56	0,91
	$K_H (dk^{-1/2})$	12,81	11,296	14,361
Korsmeyer-Peppas modeli	Denklem	$y=0,4552x+0,3487$	$y=0,3987x +0,379$	$y=0,5287x-0,0799$
	R^2	0,68	0,62	0,91
	$K_m (dk^{-1})$	-	-	-
	n	0,4552	0,3987	0,5287

4.4. In vitro Degradasyon Analizi

Kriyojel gruplarının in vitro degradasyon analizleri için, 18 mm çapında kesitler alınan kriyojel örneklerinin 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerde kuru ağırlıkları alındı. Bunun için örnekler falkon tüplerdeki 10 ml PBS solüsyonlar 150 rpm ile 37 °C'deki inkübasyon cihazından alındıktan sonra kriyojeller bu solüsyondan çıkarıldı ve yine 37 °C'de

tamamen kuruyana kadar bekletildi. Kurutulduktan sonra alınan ağırlıkların başlangıç ağırlıkları ile ağırlık farkı hesaplandı ve yüzde degradasyon değerleri belirlendi (Çizelge 4.6). Değerlendirmelere göre, PHEMA kriyojel 7.gün %2,2, 14.gün %2,2, 21. gün %3,4 ve 28.gün %9,1 ağırlık kaybetti. TTO0-GCry kriyojelin 7.gün %1,1, 14.gün %2,2, 21.gün %7,6 ve 28.gün %13,0 ağırlık kaybettiği görüldü. TTO25-GCry kriyojel 7.gün %4,8, 14.gün %19,2, 21.gün %19,2 ve 28.gün %19,2 ağırlık kaybetti. 14.günden itibaren herhangi bir ağırlık kaybı olmadı. TTO50-GCry kriyojel 7.gün %8,9, 14.gün %20,8, 21.gün %25,7, 28.gün %25,7 ağırlık kaybına sahip oldu. 21.gün itibariyle herhangi bir ağırlık kaybı olmadı. TTO100-GCry kriyojel 7.gün %7,1, 14.gün %16,7, 21.gün %16,7, 28.gün %16,7 ağırlık kaybına sahip oldu. 14.gün itibariyle herhangi bir ağırlık kaybı olmadı.

TTO0-ACry kriyojel için 7. gün %3,3, 14.gün %7,8, 21. gün %27,8, 28.gün %33,3 ağırlık kaybı oldu. TTO25-ACry kriyojel için 7. gün %9,5, 14. gün %21,1, 21. gün %21,1, 28.gün %21,1 ağırlık kaybı oldu. 14.gün itibariyle herhangi bir ağırlık kaybı görülmedi. TTO50-ACry kriyojelde 7. Gün %5,1, 14.gün %12,8, 21.gün %18,8 ve 28. gün %18,8 ağırlık kaybı olmuştur. Bu kriyojel için 21. günden itibaren ağırlık kaybı görülmedi. Son olarak TTO100-ACry kriyojelde 7.gün %7,1, 14.gün %16,7, 21.gün %16,7 ve 28.gün %16,7 ağırlık kaybı olmuştur. Kriyojelde 14.gün itibariyle ağırlık kaybı olmamıştır.

Tüm kriyojellere bakıldığında 7.gün için en fazla ağırlık kaybı TTO25-ACry kriyojelde, en az ağırlık kaybı TTO0-ACry kriyojelde gerçekleşti. Genel olarak en az ağırlık kaybı PHEMA kriyojelde gerçekleşti. Diğer kriyojellerde ortalama %20 ağırlık kaybı gerçekleşirken, PHEMA kriyojelde bu ağırlık kaybı %9,1 idi. Bunun nedeninin, biyobozunur malzemeler olan jelatin, aljinat ve çay ağacı yağından kaynaklanan kayıplar olduğu düşünülebilir. Bununla bağlantılı olarak, 14. gün itibariyle çay ağacı yağı ilavesi olan kriyojellerde konsantrasyon ile doğrusal olmasa da hızlı bir ağırlık kaybı görüldü. Bunun nedeni çay ağacı yağının kriyojel yapısına eklenmesinin bozunma hızını etkilediği ve bu etkinin kriyojelin hidrolitik bozunmasını arttırabileceği bunun da yağın hidrofobik doğasından kaynaklanabildiği düşünülebilir. Daha yüksek bozunabilirlik, yağın polimer zincir-zincir etkileşimi ile interferansının sonucu olabilir. Çay ağacı yağının varlığının, polimer moleküllerinin etkileşimini zayıflatabildiği ve bunun da daha yüksek bir bozunma hızına yol açabildiği yorumu yapılabilir (Hosseini ve ark. 2015; Bölgen ve ark.,2020). Xu ve ark.(2018) tarafından yapılan çalışmaya göre, hızlı degradasyon, yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkiye sahip olabilir.

Jelatin-PHEMA ile sentezlenen bir kriyojelin degradasyon analizinin yapıldığı bir çalışmada, toplam PHEMA-jelatin konsantrasyonun % 4(v/v) olduğu belirtilmiş ve PBS içinde farklı zaman aralıklarında ağırlık kaybı hesaplanmıştır (Tabatabae ve ark., 2022). Çalışmaya göre, 4. haftanın sonunda jelatin-PHEMA kriyojel ağırlığının yaklaşık %60'ını kaybetmiştir. Çalışmamızda kullanılan PHEMA-jelatin konsantrasyonu tüm polimer hacminin yaklaşık %0,4 (v/v) 'ünü oluşturmaktadır. Çalışmada yüksek oranda kayıp olması jelatinin daha yüksek miktarda kullanılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bölgen ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, *H. perforatum* yüklü ve benzer özelliklerde sentezlenen kriyojelin degradasyon analiz sonuçları çalışmamız ile oldukça uyumludur. 28 gün sonunda ağırlık kayıpları ortalama %15-30 aralığında gerçekleşmiştir.

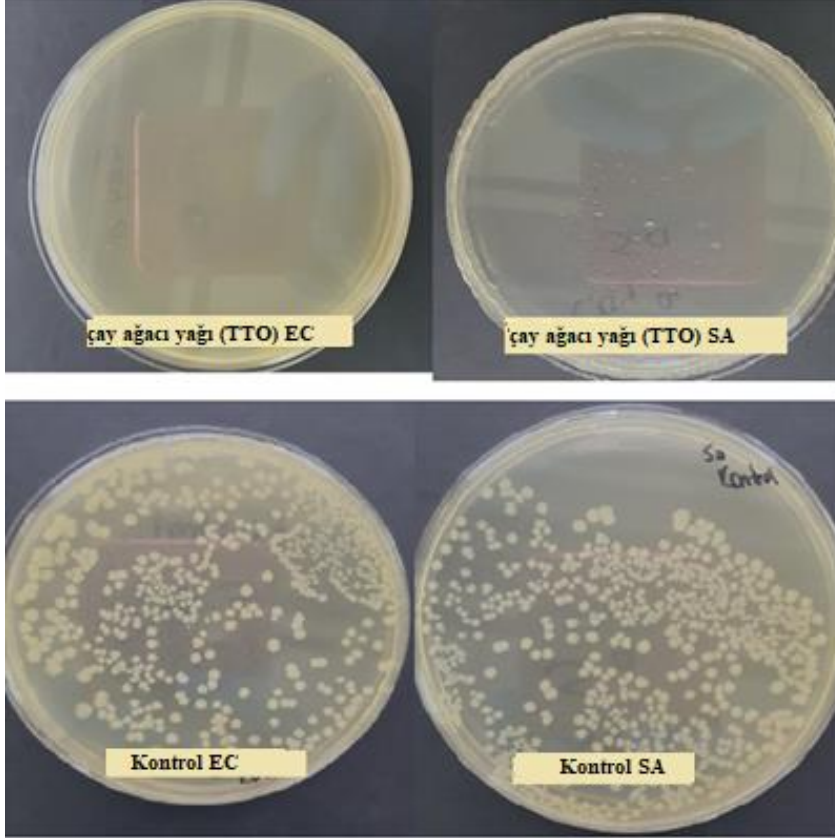
Aljinat ve jelatinin biyobozunur özelliklerinin yapıya etkisi, literatür ile uyumludur (Sun ve Tan, 2013).

Çizelge 4.6. Kriyojellerin zamana bağlı *in vitro* degradasyon analizi sonuçları, 1,7, 14, 21, 28. gün ağırlıkları (g), 1, 7, 14, 21, 28 gün toplam ağırlık kayıpları (%)

Kuru Ağırlıklar (g)	1.GÜN	7.GÜN	14.GÜN	21.GÜN	28. GÜN
PHEMA	0.088	0.087	0.087	0.085	0.080
TTO0 GCry	0.092	0.091	0.090	0.085	0.080
TTO25GCry	0.104	0.099	0.084	0.084	0.084
TTO50 GCry	0.101	0.092	0.080	0.075	0.075
TTO100 GCry	0.084	0.078	0.070	0.070	0.070
TTO0 ACry	0.090	0.087	0.083	0.065	0.060
TTO25 A Cry	0.095	0.086	0.075	0.075	0.075
TTO50 ACry	0.117	0.111	0.102	0.095	0.095
TTO100 ACry	0.084	0.078	0.070	0.070	0.070
Toplam Ağırlık kaybı (%)	1.GÜN	7.GÜN	14.GÜN	21.GÜN	28.GÜN
PHEMA	0	2.2	2.2	3.4	9,1
TTO0 GCry	0	1.1	2.2	7.6	13,0
TTO25GCry	0	4.8	19.2	19.2	19.2
TTO50 GCry	0	8.9	20.8	25.7	25.7
TTO100 GCry	0	7.1	16.7	16.7	16,7
TTO0 ACry	0	3.3	7.8	27.8	33,3
TOO25 A Cry	0	9.5	21.1	21.1	21.1
TTO50 ACry	0	5.1	12.8	18.8	18.8
TTO100 ACry	0	7.1	16.7	16.7	16.7

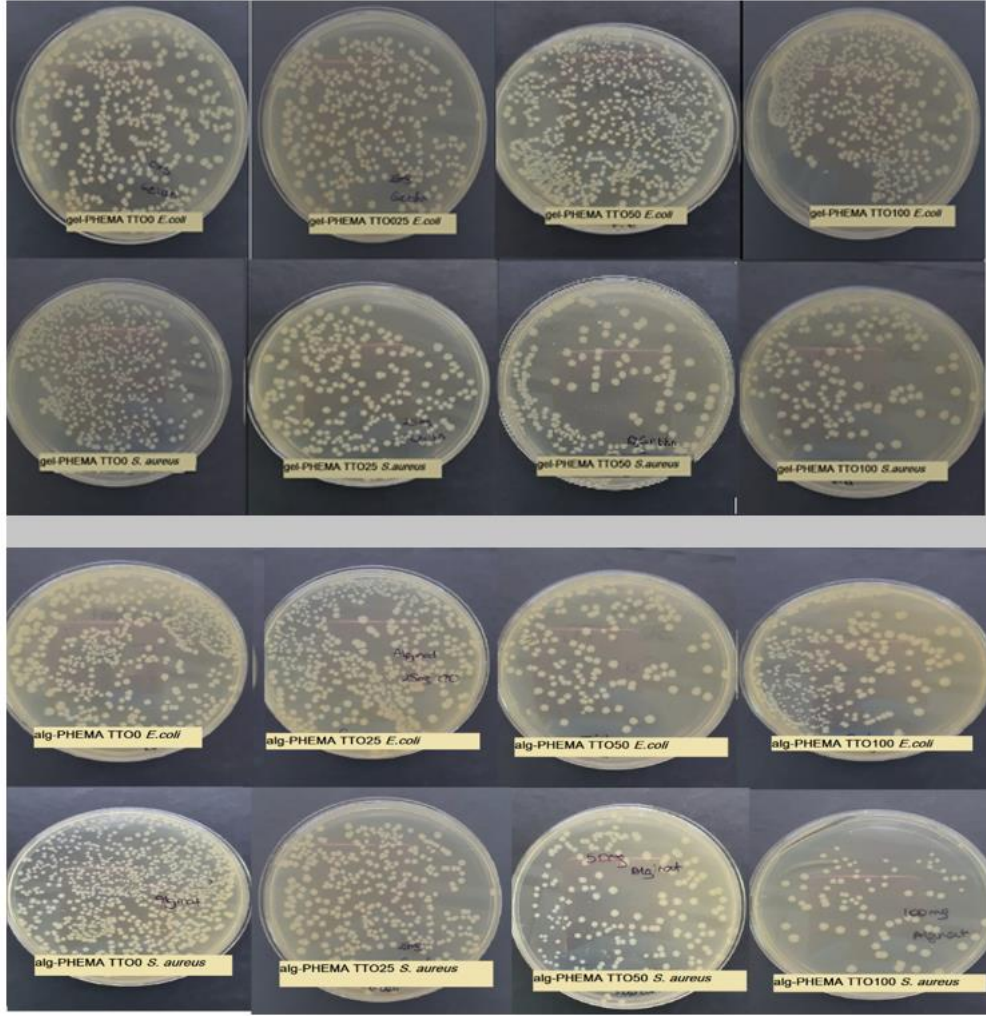
4.5. Antibakteriyel Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Antibakteriyel çalışmalarda, seri seyreltme ile besiyerine ekimi ile elde edilen sonuca göre tüm grupların sonuçları gözlemlendi. Çay ağacı yağının her iki bakteri grubuna doğrudan ekildiği durumda herhangi bir koloni oluşumu görülmedi (Şekil 4.27). Plak besiyerine, kriyojel örneğinde bulunan TTO miktarı kadar ekim yapıldı ((5µl/900µl).



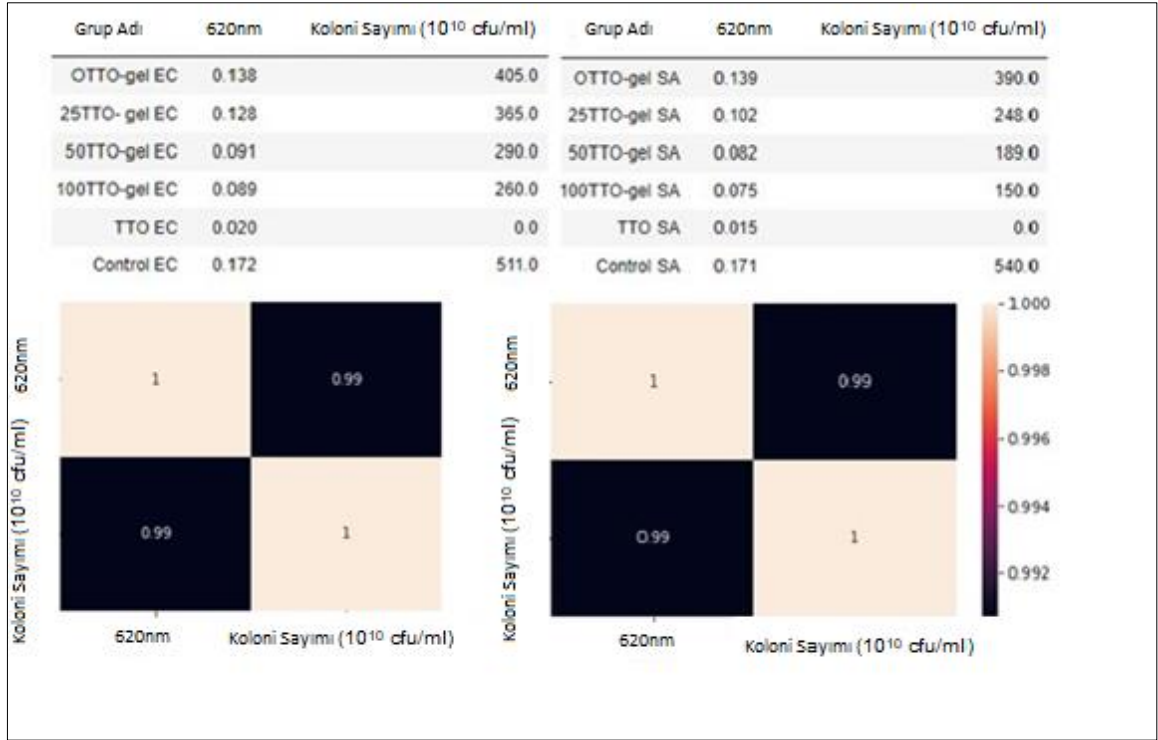
Şekil 4.27. Seri seyreltme metodu ile elde edilen bakteri (*E.coli*-EC ve *S. aureus*-SA) içeren agar plak örneklerinde (10^{-9}) çay ağacı yağının (TTO) kontrol grubuna kıyasla antibakteriyel etkisi (5µl/900µl)

Kriyojel grupları numunelerinin agar plak sonuçları kontrol grubu ile kıyaslandığında, TTO miktarı arttıkça koloni sayısında azalma gözlemlendi. TTO'nun kriyojel ile uygulanması daha kontrollü bir salım etkisi yaratacağından, %100 antibakteriyel etkinlik sağlamayacağı beklenen bir durum olarak görüldü (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Seri seyreltme metodu ile elde edilen bakteri grupları(*E.coli* ve *S.aureus*) ve kriyojel grupları koloni oluşumu, agar plak örnekleri

Tüm gruplardaki sayımlar tamamlandıktan sonra, 620 nm'deki absorbans değerleri ve hesaplanan koloni sayıları arasındaki korelasyon matrisi sonucuna göre, iki ölçüm değeri arasında 0.99-1 arasında değişen yüksek doğrusal pozitif ilişki olduğu görüldü. (Şekil 4.29-30, Python 3.0, $p \leq 0.05$). Bu verilere göre tüm TTO-GCry ve TTO-ACry gruplarının *E.coli* ve *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisi (%), Çizelge 4.7'da gösterilmiştir. En düşük antibakteriyel etkinlik çay ağacı yağı eklenmemiş kriyojellerde görülmekteyken (TTO0 GCry-Ec ve TTO0 GCry-Sa) en yüksek antibakteriyel etkinlik 100 µl çay ağacı yağı ilave edilmiş kriyojellerde görülmüştür. TTO100 GCry'in *E.coli* üzerinde %50, *S.aureus* üzerinde %72 antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görülmüştür.

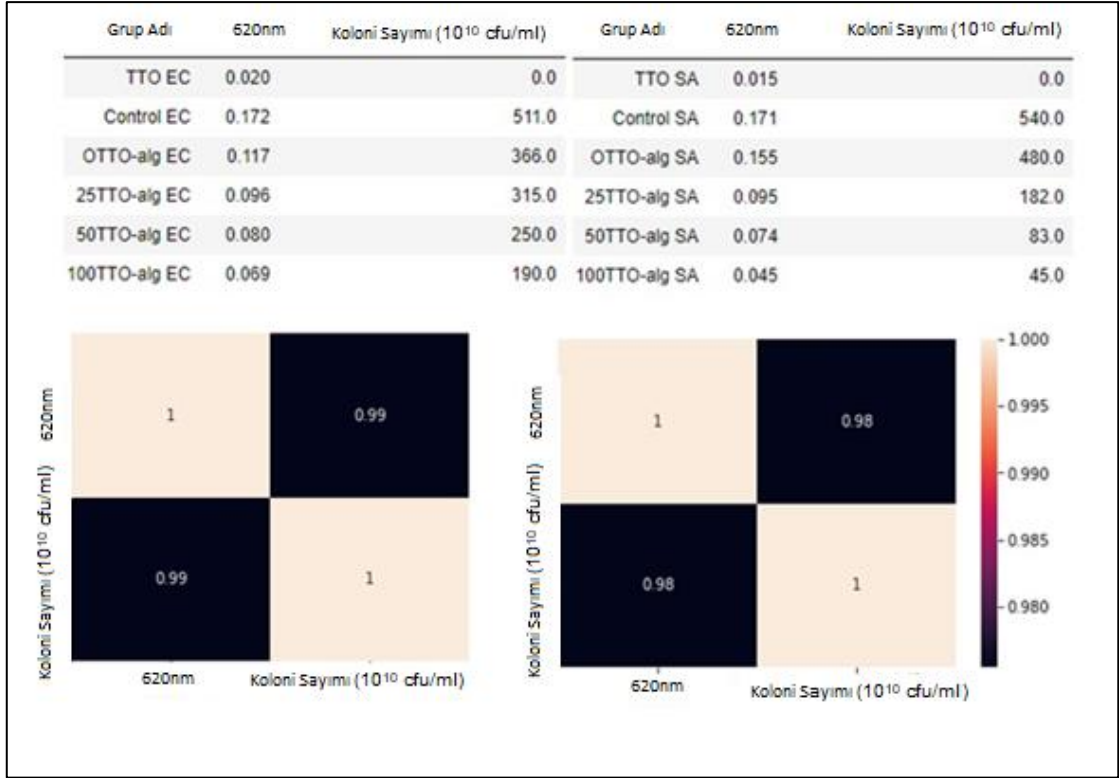


Şekil 4.29. TTO-GCry grupları EC(*E.coli*) ve SA(*S.aureus*) koloni sayımı (10^{10} cfu/ml) ve 620 nm absorbans değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi

Benzer şekilde TTO100-ACry'i *E.coli* üzerinde %63, *S.aureus* üzerinde %92 antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Çay ağacı yağının miktarı arttıkça antibakteriyel etkinliğin arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Tüm gruplarının *E .coli* ve *S. aureus* suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği(%)

Antibakteriyel etkinlik %	TTO0 GCry	TTO0 ACry	TTO25 GCry	TTO25 ACry	TTO50 GCry	TTO50 ACry	TTO100 GCry	TTO100 ACry	TTO
<i>E.coli</i>	21	28	29	38	43	51	50	63	100
<i>S. aureus</i>	28	15	54	67	65	85	72	92	100



Şekil 4.30. TTO ACry grupları EC(*E.coli*) ve SA(*S.aureus*) koloni sayımı (10^{10} cfu/ml) ve 620 nm absorbans değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi

Tüm gruplar kıyaslandığında en yüksek antibakteriyel etkinliğin TTO100-ACry grubunun *S.aureus* üzerinde göstermiş olduğu %92 antibakteriyel etki olduğu söylenebilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, TTO'nun MIC değerleri Broth mikrodilüsyon yöntemiyle hesaplanmış olup *E. coli* için %0.25 (v/v) ve *S. aureus* için %0.5 (v/v) olarak bulunmuştur (D'Arrigo ve ark., 2010). Çalışmamızda ise pozitif kontrol olarak kullandığımız agar plak kültürasyonunda TTO kontrol grubunun % 0.5 (v/v) değeri ile her iki bakteri grubu için de %100 antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sentezlediğimiz kriyojel içerisine 100 μ l üzerinde TTO eklediğimizde maksimum TTO antibakteriyel aktivitesi %0.13 (v/v) ile değerlendirilmiştir. Daha yüksek TTO ilavesinde jel yapısı stabilitesini kaybettiğinden maksimum antibakteriyel aktivite bu değer üzerinden belirlenmiştir.

Çay ağacı yağının antibakteriyel etkinliği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda bile geniş bir mikroorganizma grubu üzerinde etkili olduğu söylenebilir (Oliva ve ark., 2003; Lee ve ark., 2013b). Çay ağacı yağının antibakteriyel

etkinliği özellikle nispeten zor tedavi edilen *S. aureus* üzerinde gör÷lmektedir (Halcon ve Milkus, 2004).

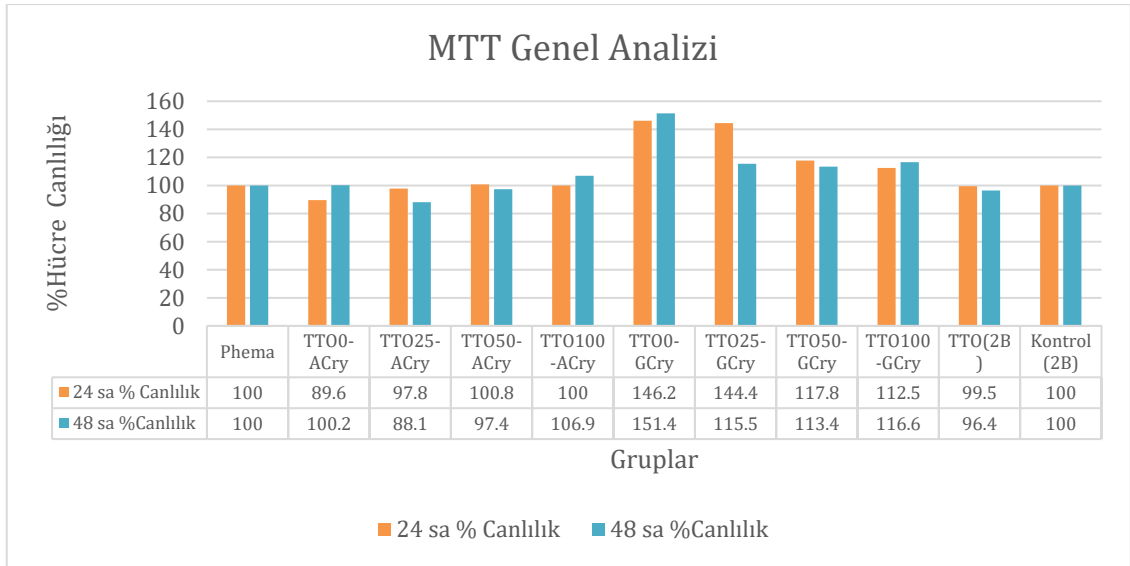
Yaklaşık olarak insan normal florasının %30'unda bulunabilen ve dirençli bir patojen olabilen *S. aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının önde gelen nedeni olarak kabul edilir (de Barros ve ark., 2021). Bir çalışmada, *S. aureus* 'un zorlu deri ve doku enfeksiyonlarına neden olabilme yeteneğinin olduğu ve çay ağacı yağının böyle cilt yaralanmalarında oluşabilecek enfeksiyonları tedavi edebileceği gösterilmiştir (Halcon ve Milkus, 2004). Bu nedenle, çay ağacı yağı katkılı olarak geliştirilen kriyojelin, *S. aureus* üzerinde daha güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olabileceği düşün÷lmektedir. Çalışmamızda da tüm gruplarda *E. coli* ile kıyaslandığında *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkinlik daha yüksektir (Çizelge 4.7).

TTO'nun ana metaboliti olan terpinen-4-ol, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve koag÷laz negatif stafilokoklara (CoNS) karşı güçlü bir etkiye sahip bir bileşendir. Bir araştırmaya göre, %10 konsantrasyonda kullanılan çay ağacı yağının *S. aureus* bakterisine karşı topikal mupirosinle benzer etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu konsantrasyonda direnç tespit edilmemiştir, ancak daha düşük konsantrasyonlarda direnç gelişebilir (Thompson ve ark., 2008). Ayrıca, %5 TTO ile yapılan yıkama, MRSA'nın ciltten uzaklaştırılmasında etkilidir. Çay ağacı yağı içeren bir sisteme çözünür bir katkı maddesi eklenmesi, çay ağacı yağının bakteriyostatik aktivitesini önemli ölçüde artırır. %0,5 çay ağacı yağı, %5 çözünürleştirici ve %0,3 sentetik koruyucu kombinasyonu, yumuşak vücut balminin mikrobiyolojik stabilitesini Amerikan Avrupa Farmakopesi (AEP) kriterlerine uygun hale getirir (Soukoulis ve Hirsch, 2004; Pazyar ve ark., 2013). Bu çalışmalar, çalışmamızdaki *S. aureus* üzerindeki yüksek antibakteriyel etkinlik başta olmak üzere *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkinlik ile de uyum göstermektedir.

4.6. In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

4.6.1. MTT Hücre Testi Değerlendirmesi

MTT analizinde, MTT reaktifinin indirgenmesiyle canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondrial dehidrogenaz enziminin mor renkli formazan kristalleri oluşturması esastır. Canlı hücreler mitokondriyel aktivite göstereceğinden formazan kristallerinin miktarının hücre sayısıyla doğru orantı göstermesi beklenmektedir. Bu test ile sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin hücre canlılığına olan etkisine ve bu kriyojellerin yara iyileşmesinde kullanılabilirliklerine bakılmıştır (Ghasemi ve ark. 2021).



Şekil 4.31. MTT Genel Analizi 3B tüm kriyojel grupları ve 2B saf çay ağacı yağı ile HaCaT hücre hattı kontrol grubu için % hücre canlılığı karşılaştırması

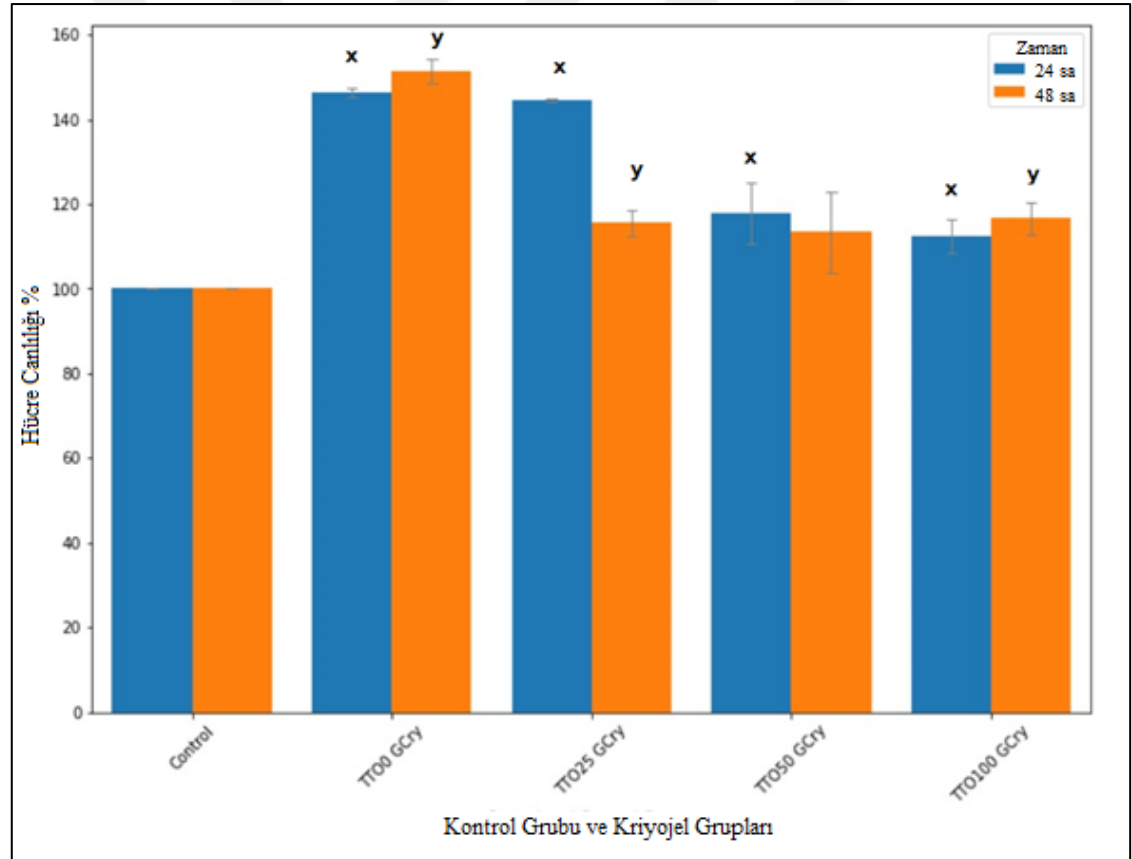
Genel değerlendirme 3B kriyojel üzerine yapılan ekim ve geleneksel 2B hücre kültürü plakaları üzerine doğrudan ekilen HaCaT hücreleri ve saf çay ağacı yağının yüzde (%) hücre canlılığı sonuçlarını içermektedir (Şekil 4.31). İki boyutlu ekim yapılan hücreler ve saf çay ağacı karşılaştırıldığında, çay ağacı yağının 24 sa için hücre canlılığına etkisi %99,5 iken bu oran 48 sa için %96,4'e düşmüştür. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, saf çay ağacı yağının doğrudan uygulamada hücre canlılığını belirli oranda azaltacağı bilinmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda az miktarda da olsa sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür (Hayes ve ark., 1997). Yapılan çalışmalar toksik etkiye en dayanıklı hücrelerin epitel hücreleri olduğunu doğrulamaktadır. Bu nedenle topikal uygulamalarda kullanımı desteklenmektedir (Söderberg ve ark., 1996; Halcon ve Milkus, 2004). Çalışmamızda kullanılan maksimum konsantrasyonda bile toksik bir etkiye rastlanmamıştır.

MTT analiz sonuçları değerlendirmesinde, student t-testi ile elde edilen çiftli karşılaştırma verilerine göre, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, %95 güven düzeyinde 24 sa için anlamlı veriler "x" ve 48 sa için anlamlı veriler "y" olarak ifade edildi ($p < 0.05$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.32). Bu sonuçlara göre, hücre canlılığının kontrol grubuna göre 24 ve 48 sa için arttığı gözlemlendi. TTO-GCry kriyojeller için 24 ve 48 sa sonuçları karşılaştırıldığında, TTO0-GCry kriyojel'in hücre canlılığı yüzdesinin %146,2'dan %151,4'e ve TTO100-GCry kriyojel'in hücre canlılığı yüzdesinin %112,5'den %116,6'ya yükseldiği görüldü. TTO25 ve TTO50-GCry kriyojellerinde hücre canlılığı 48 sa süresince hafifçe azaldıysa da, her ikisinin de kontrol grubundan daha yüksek canlılığa

sahip oldukları gözlemlendi (24 sa ve 48 sa için sırasıyla, TTO25-GCry %144,4 ve %115,5; TTO50 GCry %117,8 ve %113,4).

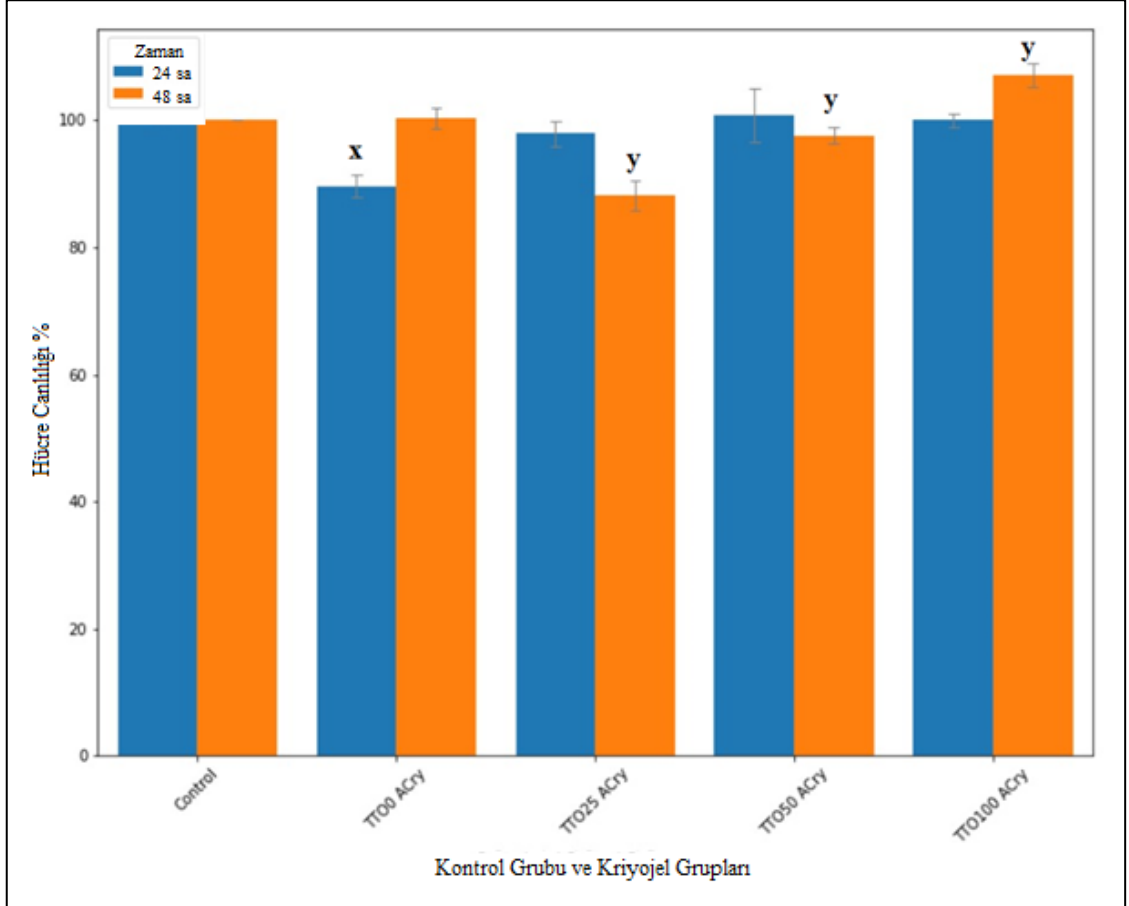
Çizelge 4.8. Kriyojel Grupları 24 sa ve 48 sa için Hücre Canlılığı Yüzde Değerleri (%)

Kriyojel adı	24 sa, % Canlılık	48 sa, % Canlılık
PHEMA-kontrol (jelatin, aljinat veya TTO içermeyen)	100,0	100,0
TTO0-GCry	146,2	151,4
TTO25-GCry	144,4	115,5
TTO50-GCry	117,8	113,4
TTO100-GCry	112,5	116,6
TTO0-ACry	89,6	100,2
TTO25-ACry	97,8	88,1
TTO50-ACry	100,8	97,4
TTO100-ACry	100,0	106,9



Şekil 4.32. MTT testi sonuçlarına göre 24 ve 48 sa için jelatin veya TTO içermeyen PHEMA kriyojel kontrol grubu ile TTO GCry kriyojellerinin hücre canlılığı karşılaştırması (%; sırasıyla kontrol, 0, 25, 50, 100 µl içeren kriyojeller, %95 güven düzeyinde $p < 0,05$ değerinde, 24 sa "x" ve 48 sa "y" olarak anlamlı kabul edilmiştir)

TTO-ACry kriyojeller için 24 ve 48 sa sonuçları karşılaştırıldığında, TTO0-ACry kriyojelin hücre canlılığı yüzdesinin 24 sa için % 89,6'dan 48 sa için % 100,2'e yükselme eğilimi gösterdi (Çizelge 4.8, Şekil 4.33). TTO25-ACry %97,8'den % 88,1'e düşmüş, TTO50 için %100,8'den %97,4'e düşüş gözlemlendi. TTO100 ACry kriyojelin hücre canlılığı yüzdesinin %100,0'den %106,9'a yükseldiği görüldü.



Şekil 4.33. MTT testi sonuçlarına göre 24 ve 48 sa için jelatin veya TTO içermeyen PHEMA kriyojel kontrol grubu ile TTO ACry kriyojellerinin hücre canlılığı karşılaştırması (% , sırasıyla kontrol, 0, 25, 50, 100 µl içeren kriyojeller, %95 güven düzeyinde $p < 0,05$ değerinde, 24 sa "x" ve 48 sa "y" olarak anlamlı kabul edilmiştir)

Bu sonuçlara göre, 24 sa ve 48 sa için tüm kriyojellerin biyouyumlu olduğu, hücre toksisitesine neden olmadığı söylenebilir.

Jelatinli grupların ilk 24 sa için daha yüksek biyouyumluluk gösterdiği ve hücre sayısı artışını teşvik ettiği söylenebilir. Bu yüksek hücre artışından sonra 48 sa değerleri 24 sa ile kıyaslandığında düşüş göstermişken, aljinatlı gruplarda hücre artışı jelatinli gruplar kadar yüksek olmasa da, 48 sa sonrası artma eğilimi göstermektedir.

48 sa sonuçlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TTO100-GCry kriyojeldeki canlılık düzeyinin %112,5'den %116,6'ya, ACry kriyojeldeki canlılık düzeyinin %100,0'den %106,9'a yükseldiği görüldü. Her iki grupta da kontrol grubuna göre hücre canlılığında artış olduğu görüldü.

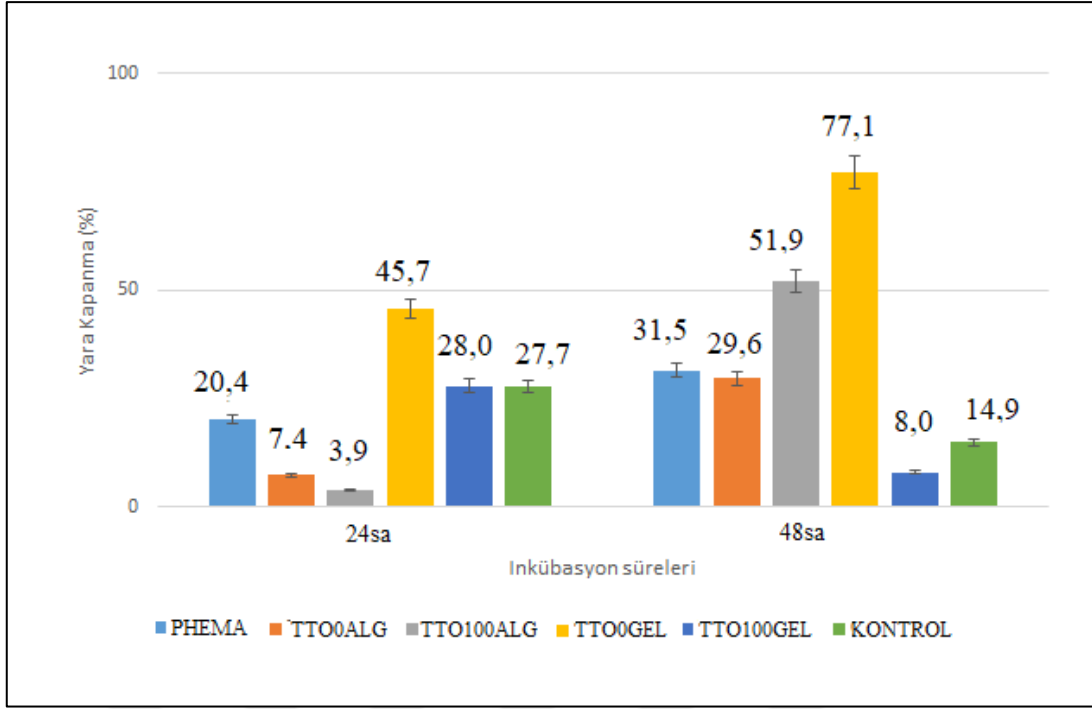
Bu durumda çay ağacı yağının, jelatinin, jelatin-çay ağacı yağı birleşiminin, aljinat-çay ağacı yağı birleşiminin keratinosit hücre canlılığını teşvik ettiği söylenebilir. Çay ağacı yağının aljinat ile birlikte daha yüksek etkiye sahip olduğu yorumu yapılabilir.

4.6.2. In vitro Çizik Testi Değerlendirmesi

Kriyojellerin yara iyileştirici etkisini değerlendirebilmek için uygulanan *in vitro* çizik testi sonuçları değerlendirildi. Bu çalışmada ara gruplar çıkartıldı (TTO25, TTO50 GCry ve ACry kriyojeller). TTO0, TTO100 GCry ve ACry kriyojeller ve PHEMA kriyojel ile çalışıldı. Şekil 4.35'te belirtilen çizik modellerinin her biri kendi grubu içinde değerlendirilmiştir.

Hücrelerin adherent olup uygulamaya hazır hale geldiklerindeki başlangıç değerine göre (0.sa) kapanma oranları kıyaslandığında, PHEMA kriyojel için yara kapanması 24. sa için %20,4 iken 48. sa için % 31,5 olduğu görüldü. TTO0-GCry kriyojel 24. sa için % 45,7, 48. sa için %77,1 yara kapanması gösterdi. TTO100-GCry için 24. sa süresince %28,0 kapanma gösterirken, 48. sa süresince %8,0 kapanma gösterdi.

TTO0-ACry için yara kapanması 24.sa %7,4 iken 48. sa %29,6 oldu. TTO100-ACry için yara kapanması 24. sa %3,9'dan, 48. sa %51,9'a yükseldiği görüldü (Şekil 4.34-35).



Şekil 4.34. Kriyojel grupları ve kontrol grubu için inkübasyon sürelerine göre (24 sa ve 48 sa) Yara kapanma yüzdesi (%) karşılaştırması

Sonuç olarak gruplar 48 sa sonu ölçümlerine göre çizik testi ve MTT analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, PHEMA kriyojelde yara kapanmasının yaklaşık %10 olduğu görüldü. MTT analizinde PHEMA diğer kriyojeller için kontrol grubu olarak kabul edildiği için yüzde canlılık değeri %100 idi. TTO0-ACry için canlılığın %100'ün üzerinde olduğu (%11 artış), yara kapanmasının da %22 artış gösterdiği görüldü. TTO100-ACry için canlılığın %100'ün üzerinde olduğu (%7 artış) ve yara kapanmanın %48 artış gösterdiği görüldü. TTO0-GCry için canlılığın %100'ün üzerinde olduğu (%5), yara kapanmanın %32 olduğu görüldü. TTO100-GCry için canlılığın %100'ün üzerinde olduğu (%5 artış), yara kapanmanın %20 oranında azaldığı görüldü. Kriyojelsiz kontrol grubuna bakıldığında ise 48 sa için yara kapanmasının % 13 azaldığı görüldü.

Buna göre tüm değerler incelendiğinde, kriyojelli grupların tümünün kontrol grubuna göre yara kapanmasını olumlu yönde etkilediği görüldü (Şekil 4.33). 24 sa-48 sa süresince en yüksek artış oranının TTO100-ACry 'da olduğu görüldü. Bunu TTO0-GCry takip etti (Çizelge 4.9).

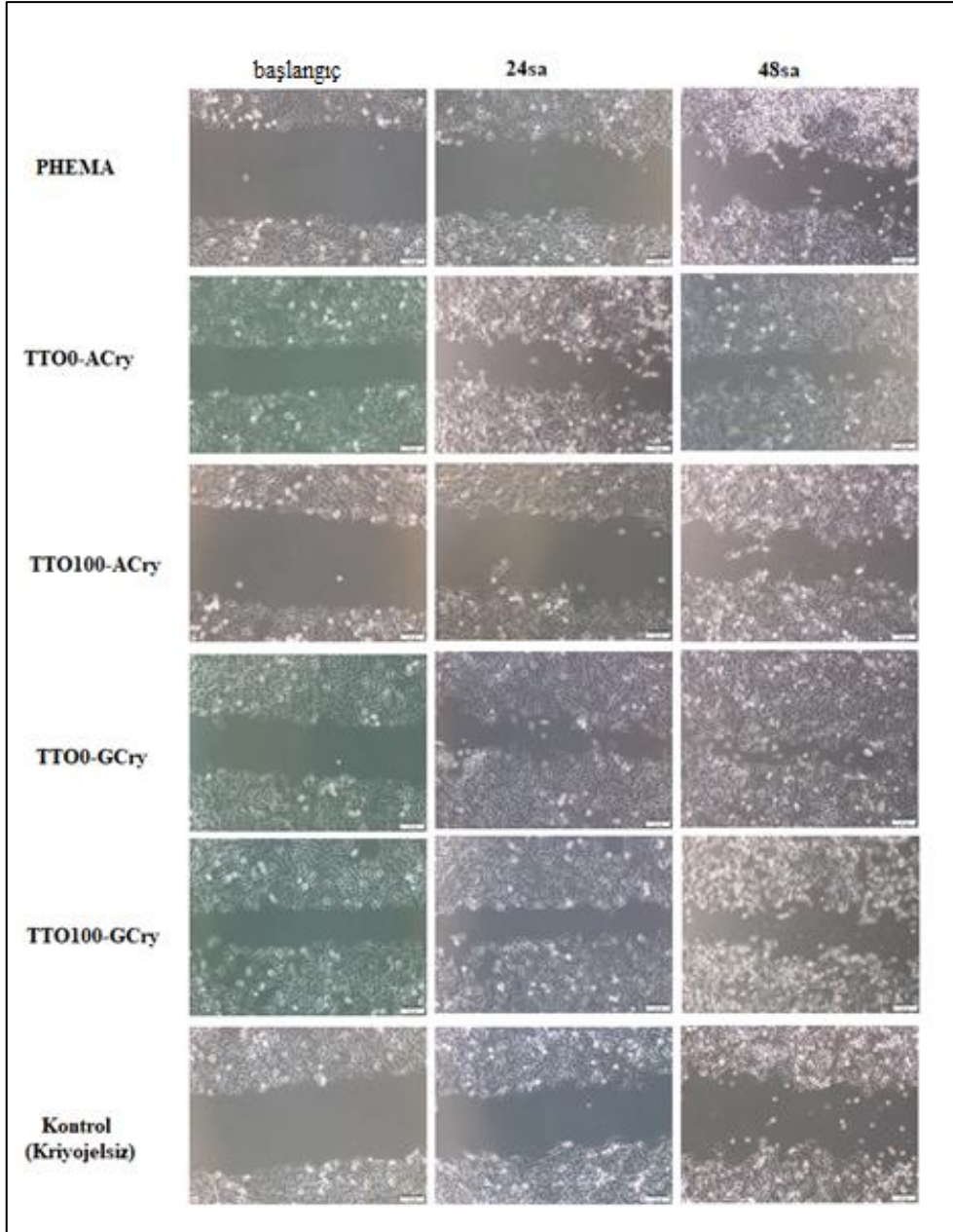
Jelatin varlığının akut yaralanmalarda hücre yenilenmesini olumlu etkilediği bilinmektedir (Mohammadinejad ve ark.,2019; Yıldırım ve Küçük, 2020). Benzer şekilde çay ağacı yağının antibakteriyel etkinliği ile yarada meydana gelebilecek enfeksiyonu önleme özelliği ile yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir (Pazyar

ve ark., 2013). Aljinatın yara iyileşmesinde kullanımı ise tümör nekroz faktörü (TNF- α) üretimi ile yara makrofajlarını aktive etmesi ile olmuştur. Makrofajların 24-48 sa sonra yarada aktif olduğu bilinmektedir. Bu sayede yara iyileşmesini hızlandırarak enflamatuvar sinyalleri başlattığı ifade edilmiştir (Thomas ve ark., 2000). Bu nedenle TTO100-ACry'dan 48. sa için en yüksek yara iyileşmesi beklenmektedir.

Benzer şekilde TTO100-GCry grubundan da yüksek yara kapanma beklenmekteyken, canlılıkta 48 sa sonunda % 4 artış olmasına rağmen, yara iyileşmede %20 gerileme olmuştur. Bu durumun çeşitli sebepleri olabilir. Jelatin ve çay ağacı yağı arasında meydana gelen etkileşim jelatinin yapı özelliklerini değiştirmiş ve yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemiş olabilir. İlave edilen çay ağacı yağının bu etkileşimi keratinosit hücrelerinin migrasyonunu engellemiş olabilir. Aynı durum aljinatlı grupta görülmediği için jelatin- TTO etkileşiminden kaynaklanan bir durum söz konusu olabilir. Literatürde, TTO ve jelatinin olumsuz etkileşimi ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.9. Kriyojellerin 24-48 sa aralığı için canlılık ve yara kapanma değişim değerleri (%)

PHEMA	Canlılık %100, yara kapanma %10 artış
TTO0-GCry	Canlılık %100 üzerinde (%5 artış), yara kapanma %32 artış
TTO100-GCry	Canlılık %100 üzerinde (%4 artış), yara kapanma %20 düşüş
TTO0-ACry	Canlılık %100 üzerinde (%11 artış), yara kapanma % 22 artış
TTO100-ACry	Canlılık %100 üzerinde (%7 artış), yara kapanma %48 artış
Kontrol(kriyojelsiz)	Yara kapanma %13 azalma



Şekil 4.35. Kriyojel grupları ve kontrol grubu yara (çizik) modelleri ışık mikroskopunda, başlangıç, 24, 48 sa için HaCaT hücreleri yara kapanma görüntüsü

4.7. Hemostatik Aktivite ve Kan Absorbsiyon Deneyleri Değerlendirmesi

Kriyojellerin ve hemostatik jelatin bazlı ticari ürünün kan absorpsiyon analizi değerlendirmesinde tüm numunelerin UV-spektrofotometrede optik dansite (OD, 540 nm) değerleri ve standart değer belirlendi ve absorbans yüzdeleri (%) değerleri karşılaştırıldı. Farklı zaman aralıklarında kriyojel modelleri ve ticari ürünün kanı tutabilme kapasitesi değerlendirildi (Çizelge 4.10).

Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan jelatin temelli ticari ürün, piyasada Kanama Durdurucu Sünger (spongostan) olarak yer almaktadır. Hemostatik etkiye sahip ve steril olduğu, yeniden emilebilir bir jelatin sünger özelliğinde olduğu belirtilmiştir.

Buna göre, PHEMA kriyojel için kan absorpsiyon değerleri 1. dk için % 90,56, 15. dk için %83,61, 30. dk için %78,06, 45. dk için %73,82 olarak belirlendi.

TTO0-GCry kriyojel için kan absorpsiyon değerleri 1. dk için %96,52, 15. dk için %88,47, 30. dk için %81,53, 45. dk için %79,79 oldu. TTO100-GCry için 1. dk için %98,26, 15. dk için %92,01, 30. dk için %89,10, 45. dk için %82,78 olarak belirlendi.

TTO0-ACry kriyojel için kan absorpsiyon değeri 1. dk için % 100, 15. dk için %78,75, 30. dk için %63,61, 45. dk için %48,40 oldu. TTO100-ACry için değerler, 1. dk için %100, 15. dk için %94,10, 30. dk için %85,13 ve 45. dk için %78,82 oldu.

Son olarak kan durdurucu amaçla kullanılan ticari ürün için kan absorpsiyon değerleri, 1. dk için %69,65, 15. dk için %44,02, 30. dk için %22,50, 45. dk için %7,71 oldu.

Sonuç olarak tüm kriyojeller tüm zaman aralıklarında ticari üründen daha yüksek kan absorpsiyon performansı gösterdi. İlk dk için en fazla kan absorpsiyonu sırasıyla aljinat içeren kriyojel grupları(TTO0 ve TTO100-ACry), TTO100-GCry, TTO0-GCry, PHEMA ve ticari ürün) şeklinde gerçekleşti. 15. dk için TTO100-ACry (%94,10) ve TTO100-GCry (%92,01) kanı yüksek oranda en fazla absorbe edebilen gruplar oldu. Çay ağacı içeren bu grupların 15 dk boyunca yüksek oranda kanı tutabilmesi, daha yakın boyutta ve nispeten homojen gözenek oluşturabilmeleri ve bu gözeneklerde daha kolay pıhtılaşabilmeleri ve ayrışmalarının zor olması şeklinde açıklanabilir. Diğer gruplarda gözenekler daha heterojen dağılımlı olduğundan, çok büyük gözeneklerden kanın sızmasının daha kolay olabileceği düşünülebilir. 30.dk için TTO100-GCry (%89,10) ve TTO100-ACry (%85,13) absorpsiyon gösterdi. 45. dk da en fazla kan absorbe edebilen gruplar, TTO100GCry (82,78), TTO0-GCry(%79,79) ve TTO100-ACry (%78,82) oldu. 45. dk sonunda en düşük performansı ticari ürün (%7,71) gösterdi. Daha önceki çalışmalara bakıldığında, 45 dk boyunca hemostatik analizi yapılan bir çalışma dışında herhangi bir çalışmayla karşılaşılmadı (Kılıç Süloğlu ve ark., 2022). Kılıç Süloğlu ve ark. (2022) tarafından yapılan bu çalışmada, dental uygulamalar için kappa karaginan (κ -kar) ve jelatin (jel) temelli hemostatik süngerler için 45 dk süreyle hemostatik analizler değerlendirildi. Mevcut çalışmamızda sentezlenen kriyojel gruplarının uzun süreli

hemostatik değerlendirmesinin literatür açısından sayılı çalışmalardan biri olduğu görüldü.

Yapılan bir çalışmada hemostatik amaçla geliştirilen poliakrilik asit/kitosan (PAA/CS) bazlı kriyojellerin karşılaştırılmasında *in vitro* kan pıhtılaşma analizi yapılmış ve kan pıhtılaşma indeksine 300 sn boyunca bakılmıştır (Shi ve ark.,2022). Başka bir çalışmada yara örtüsü olarak geliştirilen çok fonksiyonlu kriyojel örnekleri için kan absorpsiyon indeksi 150 s boyunca değerlendirilmiştir (Li ve ark., 2020b).

Çizelge 4.10. Kriyojel grupları ve ticari ürüne bağlı kan absorpsiyon yüzde oranları (% , UV-Spektrofotometre, 540 nm)

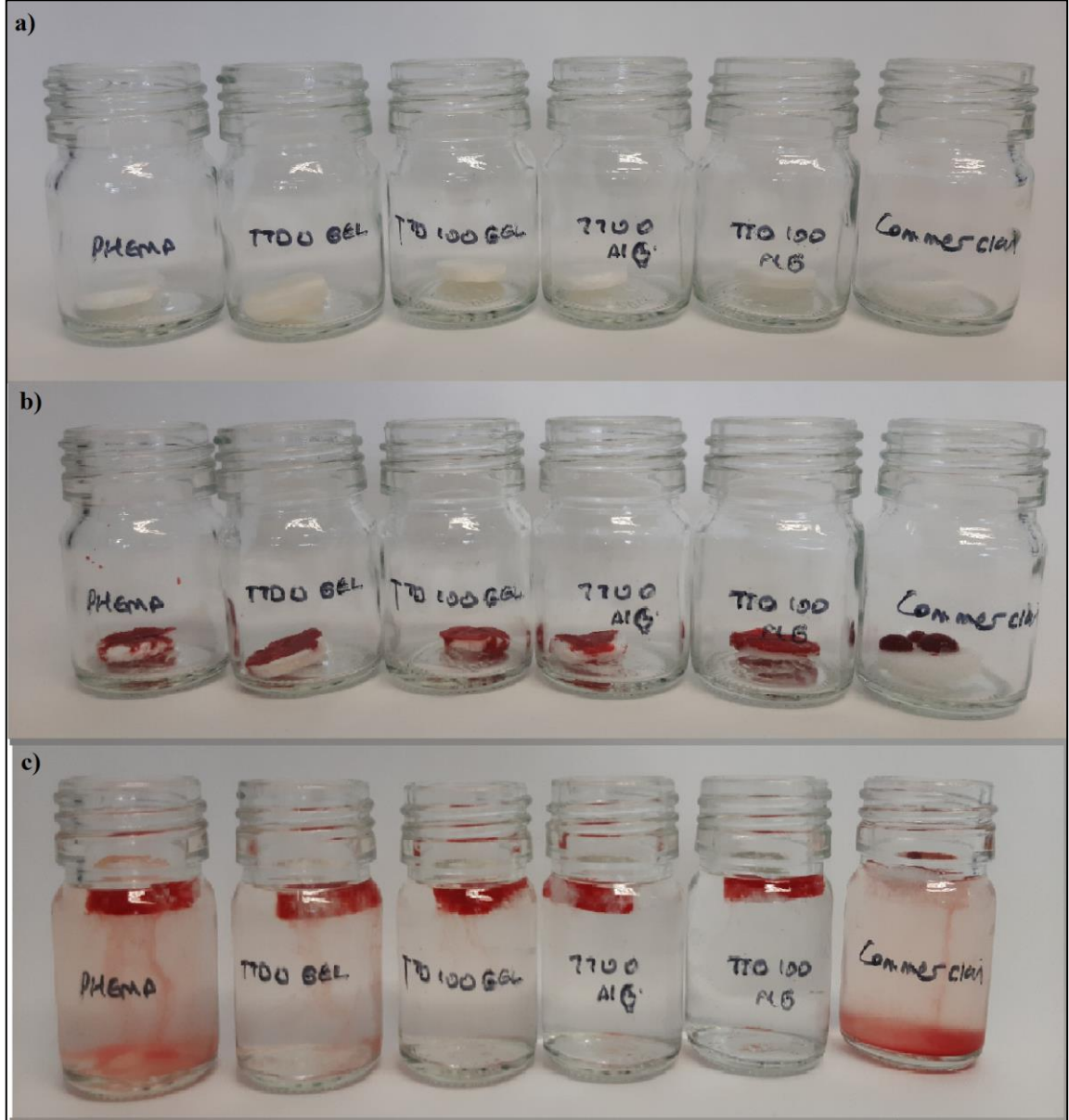
Numune adı	1dk	15dk	30dk	45dk
PHEMA	%90,56	%83,61	%78,06	%73,82
TTO0-GCry	%96,52	%88,47	%81,53	%79,79
TTO100-GCry	%98,26	%92,01	%89,10	%82,78
TTO0-ACry	%100	%78,75	%63,61	%48,40
TTO100-ACry	%100	%94,10	%85,13	%78,82
Ticari rn	%69,65	% 44,02	%22,50	%7,71

Kriyojel gruplarının pıhtılaşma analizinin fotoğraflaması yapıldı. Bunun için 18 mm çapında kesit alınmış her bir kriyojel ve ticari ürün kan absorpsiyon deneyinde olduğu gibi ayrı cam şişelere yerleştirildi (şekil 4.36.(a)). Kriyojellerin zerine 250 l tam insan kanı ilave edildi (şekil 4.36.(b)). Daha sonra 20 ml %0,9 salin solüsyonu şişenin dibinden mikropipet ile yavaşça ilave edildi. Yaklaşık 5 dk’lık bir bekleme süresi sonrasında fotoğraflama yapıldı (şekil 4.36.(c)).

Buna göre, ticari ürünün, kanı en az tutabilen malzeme olduğu gözlemlendi. Kriyojel grupları değerlendirildiğinde en az kanı tutabilen, PHEMA kriyojel oldu. TTO0-GCry ve TTO-100-GCry yaklaşık aynı görüntüyü verirken, TTO0-ACry ve TTO100-ACry jeller kanı en iyi tutabilen gruplar oldu.

Bu çalışmanın sonucunda TTO100-ACry kriyojelin kan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma deneyinde ilk 15 dk için en iyi performansı gösterdiği görüldü. Aljinatın yapısal özellikleri dikkate alındığında, aljinat yara örtüleri; yaradan kaynaklanan kan ve sıvıyı absorblayabilen lifli bir yapıya sahiptir (Dumville ve ark., 2013). Aljinatlar aljinik asit, mannuronik asit ve guluronik asit açısından zengindir. Her birinin miktarı emilen sıvı miktarını ve pansuman şeklini etkiler. Yara sıvısı ve kan ile temasında aljinik asit sodyum

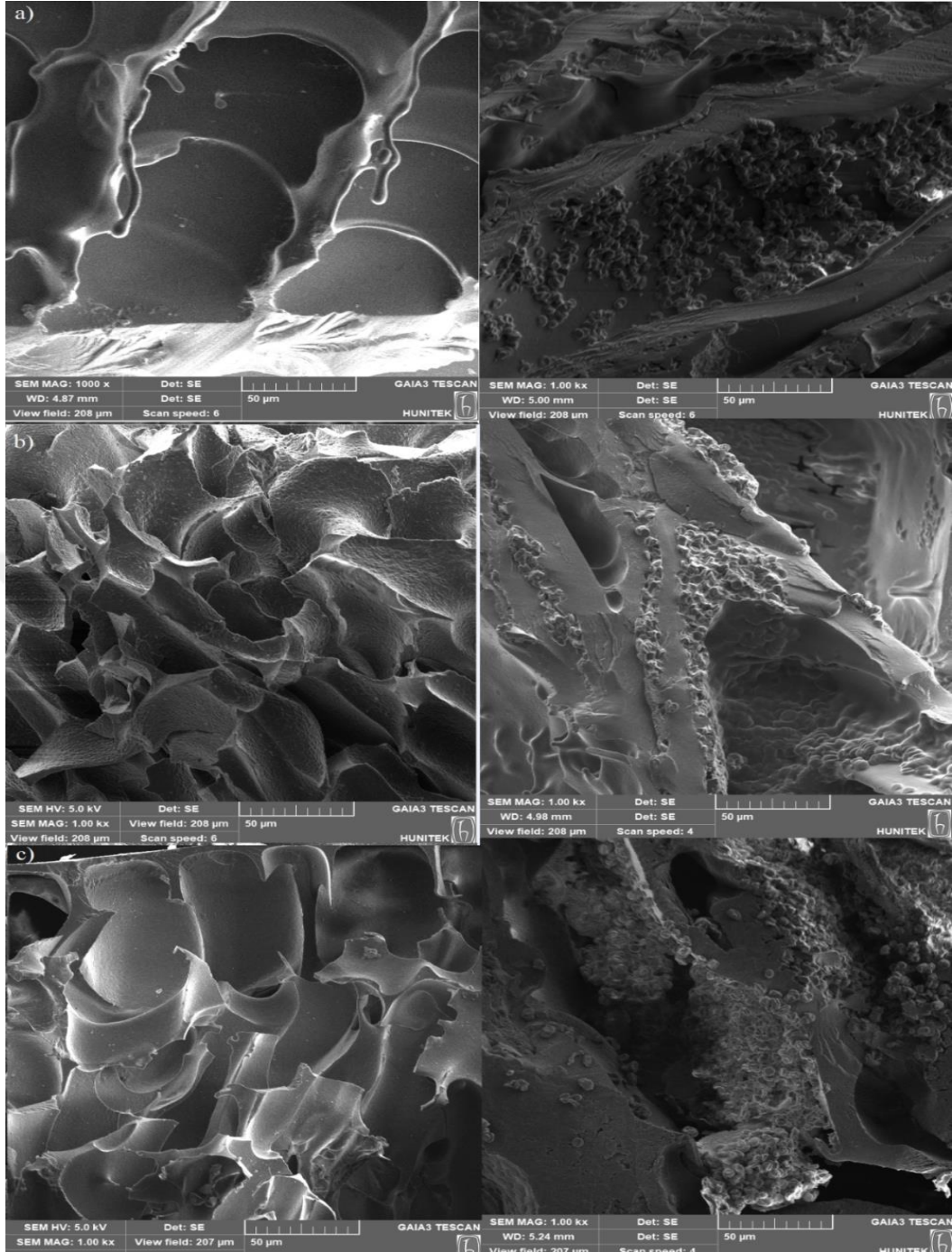
tuzları, hidrofilik bir jel özelliğine sahip olabilir. Makrogözenekler ve jelleşebilme kapasitesi aljinat yara örtülerinin akut yaralanmalarda salınan kanı absorblamasını sağlar (Jones ve ark., 2006). Bu bilgiler ve deneysel sonuçlar esas alındığında, hızlı müdahale gerektiren acil durumlarda, kanamayı durdurucu etkisi bakımından tercih edilebileceği değerlendirilebilir.



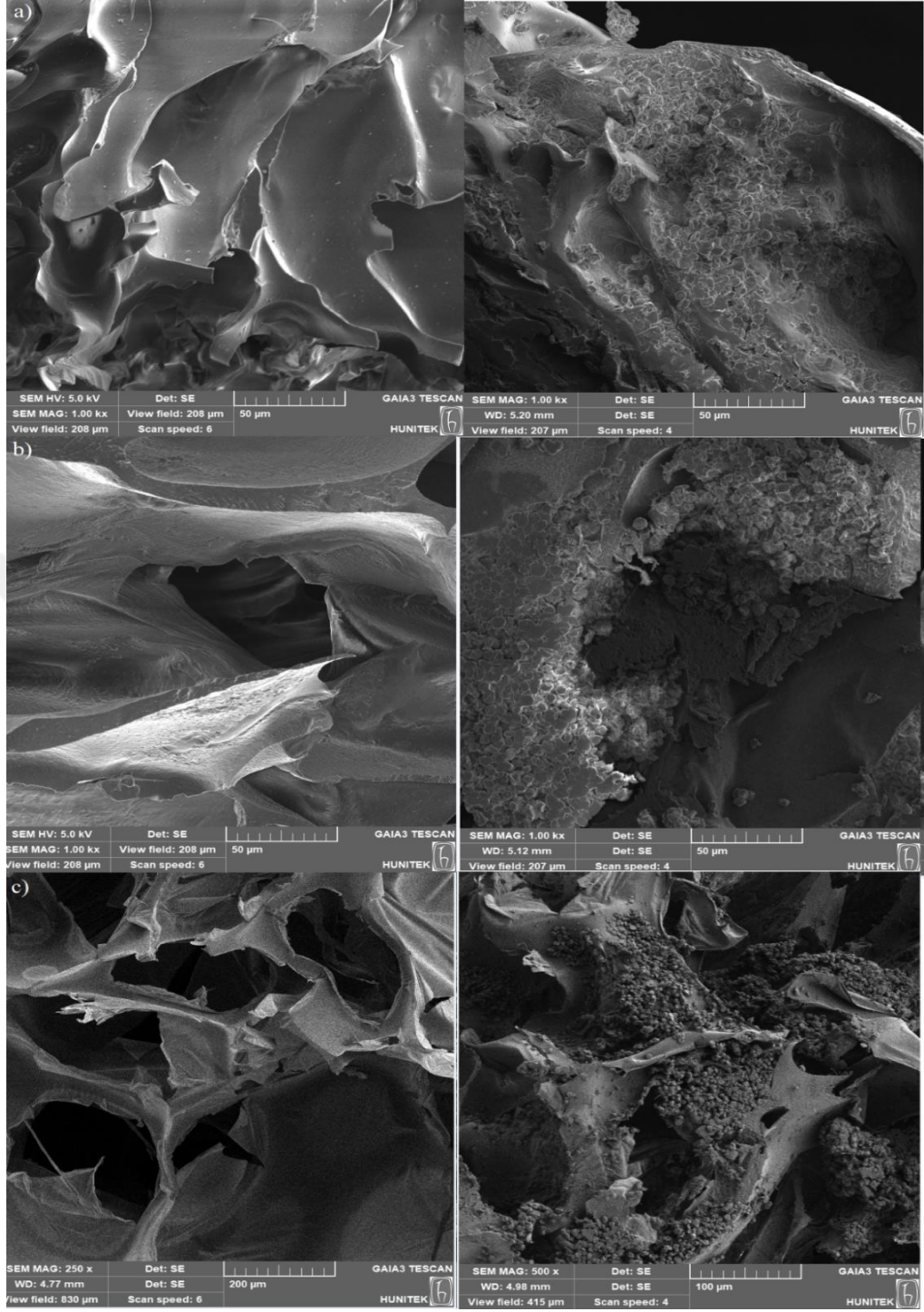
Şekil 4.36. Kriyojel grupları ve ticari ürün için 20 ml %0,9 salin solüsyonu içinde kan örnekleri pıhtılaşma analizi (sırasıyla PHEMA, TTO0-GCry, TTO100-GCry, TTO0-ACry, TTO100-ACry, ticari ürün, her biri için 250 µl insan kanı)

Tam insan kanı ile muamele edilmiş kriyojel gruplarının ve ticari ürünün SEM mikroskobu ile görüntüsü değerlendirildi ve boş kriyojel grupları ve boş ticari ürün ile karşılaştırıldı (Şekil 4.37- 4.38). Buna göre tüm gruplarda eritrosit hücrelerinin yapı malzemesine tutunduğunu görüldü. Ancak, genel değerlendirmeye göre, yapılan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma analizleri ve görsel analizleri karşılaştırıldığında, eritrosit hücrelerinin kriyojeller grupları üzerinde ticari ürüne göre daha iyi tutunma sağladığı, kriyojel gruplarından da aljinat gruplarının kriyojelin makrogözeneklerine iyi bir şekilde yerleştiği gözlemlendi.





Şekil 4.37. Boş ve insan kanı emdirilmiş, eritrosit hücreleri fikse edilmiş PHEMA, TTO0 GCry ve TTO100 GCry kriyojellerin SEM görüntüleri karşılaştırması, a) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş PHEMA kriyojel (1000 X, bar 50 µm), b) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 GCry kriyojel (1000 X, bar 50 µm), c) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO100 GCry kriyojel (1000 X, bar 50 µm)



Şekil 4.38. Boş ve insan kanı emdirilmiş, eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 ACry ve TTO100 ACry kriyojellerin ve ticari ürünün SEM görüntüleri karşılaştırması, a) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO0 ACry kriyojel (1000 X, bar 50 μ m), b) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş TTO100 ACry kriyojel (1000 X, bar 50 μ m), c) boş ve eritrosit hücreleri fikse edilmiş kan durdurucu ticari ürün (sırasıyla, boş,250x, bar 200 μ m,eritrosit fikse edilmiş, 500x, bar 100 μ m)

Özellikle eritrosit yoğunluğunun daha fazla olduğu bölgelerde SEM görüntüsü yığılma ve bu yığılma sonucu ezilme şeklindeyken, daha az olduğu yerlerde daha iyi ayırt edilebilir bölgesel toplanma şeklinde olduğu görüldü. Eritrosit ile fiks edilmiş ticari ürün boş hali ile karşılaştırıldığında daha iyi ayırt edilebilmekte iken, özellikle TTO-GCry ve TTO-ACry gruplarında kanalların neredeyse tamamen dolduğu gözlemlendi. PHEMA kriyojelde kanallar kısmen ayırt edilebilmekte idi. Sem görüntülerinin daha önce yapılan kan analizleri ile uyumlu bir sonuç verdiği değerlendirildi.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışması üç temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda

- i) kriyojellerin tanımsal karşılığı, elde edilme yöntemleri, sınıflandırmaları ve uygulama alanları hakkında genel bilgi verilip, bitki bazlı hidrojel ve kriyojel çalışmaları değerlendirilmiş,
- ii) TTO-GCry ve TTO-ACry olmak üzere jelatin ve aljinat içeren kriyojel gruplarına farklı miktarlarda TTO ilave edilip, bu kriyojellerin karakterizasyonu, antibakteriyel özellikleri, hücre kültürü çalışmaları, yara iyileştirme özelliği ve kan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma analizi için materyal ve metodlar belirlenmiş,
- iii) son olarak bu bitki bazlı kriyojellerin karakterizasyonu, antibakteriyel özellikleri, hücre kültürü çalışmaları, yara iyileştirme özelliği ve kan absorpsiyon ve kan durdurucu etkisinin sonuçları incelenmiştir.

5. YORUM

- *M. alternatifolia* (ay ağacı bitkisi) metabolitlerinin teröpotik etkilerinden faydalanmak amacıyla çay ağacı yağının kriyojel sentezinde kullanılması ve sentezlenen bu kriyojelin akut deri yaralarında deri örtüsü olarak kullanımı ve hızlı müdahale gerektiren acil durumlarda kullanılmak üzere kanama durdurucu etkisinin değerlendirilmesi ile iyileştirme potansiyellerinin analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.
- En yüksek şişme oranının en yüksek çay ağacı yağı yüklenen kriyojeller olduğu (TTO100-GCry, TTO100-ACry) görüldü. ay ağacı yağı ilavesinin şişme oranını arttırabileceği düşünölebilir. Bunun yanında çay ağacı yağı miktarı arttıkça şişme oranının artması, daha fazla gözenek oluşturu sonucunu doğurmuş olabilir.
- En yüksek jelleşme veriminin TTO-GCry grubuna kıyasla TTO-ACry grubunda olduğu görüldü. Aljinatın jelleşme verimini arttırabileceği görüldü.
- TTO-ACry kriyojel gruplarının makrogözenek derecesinin TTO-GCry kriyojel gruplarına göre daha yüksek olduğu görölmektedir. Bu durumda, aljinatın jelatine göre makrogözenek derecesini arttırıcı etkisi olduğu görüldü.
- Salım analizlerine bakıldığında, 2 sa ile yapısındaki TTO’u en büyük oranda salan gruplar TTO25-ACry (%52), TTO50-ACry (%60) olmuştur. Düşük konsantrasyonlarda aljinatın yapısal stabilitesini geliştirme yolları araştırılabilir.
- Salım kinetik modelleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda en yüksek R2 değerinin Korsmeyer-Peppas salım modelinde olduğu görüldü. Gruplar değerlendirildiğinde, TTO miktarı arttıkça tüm kinetik modellerde (Zero-order, First-order, Higuchi ve Korsmeyer Peppas modeli) R2 değerinin arttığı görüldü. Daha yüksek miktarlarda TTO’nun daha doğru bir kontrollü salım profili oluşturuğu söylenebilir.
- Tüm grupların genel olarak 48 sa sonunda yapılarındaki TTO’nun tamamını salabildiği görüldü. Deney sonunda görölen bir miktar TTO kaybının buharlaşma sonucu olabileceği değerlendirildi.
- TGA analizine göre, jelatin bazlı kriyojel ağırlılığının %5’ini 165 °C’de aljinat bazlı kriyojel ağırlılığının %5’ini 155 °C’de kaybetmiştir. Aljinatın yüksek sıcaklarda jelatine oranla daha hızlı ayrışma göstermesi, yapının stabilitesini ters orantılı olarak etkilemesi ve dolayısıyla

gözeneklerinde tuttuğu TTO'nun daha hızlı salınmasına sebep olabileceği yorumu yapılabilir.

- Degredasyon analizi sonuçları, 7, 14, 21, 28. günler için değerlendirildiğinde, TTO içermeyen jelatin bazlı grubun (TTO0-GCry) aynı özellikteki aljinat grubuna göre (TTO0-ACry) daha yavaş bozunduğu görüldü. Bu durum jelatinin TTO içermeyen gruplarda TTO varlığından bağımsız olarak 37 °C'de aljinatın jelatine göre daha biyobozunur özellikte olduğunu gösterdi. Bu durum TTO-25 GCry ve TTO25-ACry grupları için de geçerli idi. Ancak TTO50 gruplarında ve TTO100 gruplarında bu durum görülmedi. TTO100-GCry ve TTO100-ACry eşit bozunma derecesine sahip idi.
- Degradasyon analizinde çay ağacı yağı ilavesinin 14. günde hızlı bir biyobozunmaya neden olduğu görüldü. Yağının hidrofobik etkisinin, kriyojel matrisindeki konsantrasyonunun artmasıyla birlikte bozunma hızını arttırabileceği yorumu yapıldı. Yağın varlığı polimer moleküllerinin etkileşimini azaltabilir.
- Yara örtüsü olarak kullanım amacına göre kriyojeller farklı metodlarla sentezlenebilir, daha yavaş veya hızlı salım yöntemleri araştırılabilir.
- En iyi antibakteriyel özelliği gösteren grubun TTO100-ACry olduğu gözlenmiştir. Çay ağacı yağının aljinat ile birlikte antibakteriyel etkinliği arttırabileceği söylenebilir.
- En yüksek biyoyumluluk gösteren grupların TTO0-GCry ve TTO100-ACry olduğu görülmüştür. Gelecek çalışmalarda 48 sa boyunca yapılan MTT değerlendirilmesinden daha uzun sürelerdeki biyoyumluluk değerlendirmesi değerlendirilebilir.
- Buna göre tüm değerler incelendiğinde, kriyojelli grupların tümünün kontrol grubuna göre yara kapanmasını olumlu yönde etkilediği görüldü. 48 sa sonuçlarına göre en yüksek yara kapanma oranının TTO100-ACry 'da olduğu, ikinci olarak TTO0-GCry olduğu görüldü. Aljinat ve çay ağacı yağının yara kapanma üzerinde olumlu etkiyi arttırabileceği söylenebilir. Bunun dışında TTO100-GCry'da meydana gelen yara kapanma oranındaki düşüşün yağın varlığının hücre göçüne engel olabileceği yorumu yapılabilir. TTO100-GCry'ın MTT analizinde 48 sa için hücre canlılığını %116'ya yükselttiği görülmüştür. Buna paralel olarak yara kapanması üzerinde olumlu etkisi olması beklenebilir. Bu nedenle tekrarlanan deneylerle bu sonuç incelenebilir.
- Kan absorpsiyon ve kan pıhtılaşma analizlerinde tüm grupların hemostatik jelatin bazlı ticari ürüne kıyasla çok daha kan absorbe edici özellikte olduğu görüldü. TTO100-ACry kriyojelin

ilk 15 dk için en iyi performansı gösterdiği görüldü. Hızlı müdahale gerektiren acil durumlarda, kanı pıhtılaştırıcı ve kanamayı durdurucu etkisi bakımından tercih edilebileceği yorumu yapılabilir.

- Genel olarak TTO100-ACry kriyojelin çok amaçlı kullanıma uygun olarak öncelikli tercih edilebileceği, ardından TTO-GCry kriyojel gruplarının farklı amaçlarda kullanımının tercih edilebileceği yorumu yapılabilir.
- Çalışmanın sonucunda bu özelliklerdeki kriyojellerin biyouyumlu, antibakteriyel özelliğe sahip, kanama durdurucu bir yara örtüsü olarak başarıyla sentezlendiği ve bu amaçla kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı.
- Bu tez çalışmasında uygulanan yöntem, kullanılan materyal de dahil olmak üzere tez konusu literatür için özgün değer taşıdığı sonucuna ulaşıldı.
- Literatüre bakıldığında, daha önce bu özelliklerde hazırlanan herhangi bir yara örtüsü ile karşılaşılmadığı ve gelecek çalışmalarda hem aljinat ve jelatin hem de çay ağacı yağı ilavesi ile birleşik bir kriyojelin geliştirilebileceği değerlendirildi.
- Gelecek çalışmalarda antibakteriyel etkinliği ve salım başarısını arttırmak için daha yüksek oranda çay ağacı yağı ilavesi için polimer solüsyonun reçetesinin geliştirilebileceği değerlendirildi.
- Gelecek çalışmalarda daha yüksek oranlarda aljinat ve jelatin ilave edildiğinde ve daha uzun sürelerde biyouyumluluğun ve yara kapanma sürecinin etkilerinin araştırılabileceği değerlendirildi.
- Gelecek çalışmalarda yara iyileşme değerlendirmesinde farklı hücre hatları ile değerlendirme yapılabileceği sonucuna varıldı.
- Jelatin ve aljinat içeren hibrit kriyojellerin sentezlenebileceği maksimum etkinliklerinin belirlenebileceği sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

- Ahmed, L., Atif, R., Eldeen, T. S., Yahya, I., Omara, A., & Eltayeb, M., *Int. J. Eng. Technol*, 8 (2019) 52-56.
- Antunes, J.C., Domingues, J., Miranda, C.S., Silva, A.F.G., Homem, N.C., Amorim, M.T.P., Felgueiras, H.P., *Marine Drugs*, 19 (2021) 359.
- Ajdary, R., Tardy, B.L., Mattos, B.D., Bai, L., Rojas, O.J., *Advanced Materials*, (2020) 2001085. <https://doi.org/10.1002/adma.202001085>
- Aprilliza, M., *IOP Conference Series, Materials Science And Engineering*, 188 (2017) 012019.
- Avonto, C., Chittiboyina, A.G., Wang, M., Vasquez, Y., Rua, D., Khan, I.A., *Chemical Research in Toxicology*, 29 (2016) 1108-1117.
- Bal-Öztürk, A., Torkay, G., İdil, N., Özkahraman, B., Özbaş, Z., *Polymer Bulletin*, (2023)1-18.
- Bai, X., Chang, J., Chen, Y., Fan, H., Shi, B., *Journal of the American Leather Chemists Association*, 108(2013) 404-410.
- Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., & Denizli, A., *Applied Sciences*, 9 (2019), 553.
- Banerjee, S., Siddiqui, L., Bhattacharya, S.S., Kaity, S., Ghosh, A., Chattopadhyay, P., Pandey, A., Singh, L., *International Journal of Biological Macromolecules*, 50 (2012) 198-206.
- Bayrak, G., Perçin, I., Süloğlu, A. K., Denizli, A., *Process Biochemistry*, 110 (2021) 100-109.
- Bennett, N. T., Schultz, G. S., *The American Journal of Surgery*, 166 (1993) 74-81.
- Beyranvand, F., Gharzi, A., Abbaszadeh, A. et al., *Inflamm Regener*, 39, 2 (2019).
- Bölgen, N., Demir, D., Yalçın, M.S., Özdemir, S., *International Journal of Biological Macromolecules*, 161 (2020) 1581-1590.
- Cappuccio, F.E., Suri, J. T., Cordes, D. B., Wessling, R. A., Singaram, B., *Journal of Fluorescence*, 14 (2004) 521-533.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (2006) 50–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>
- Catanzano, O., Straccia, M.C., Miro, A., Ungaro, F., Romano, I., Mazzearella, G., Santagata, G., Quaglia, F., Laurienzo, P., Malinconico, M., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66 (2015) 20-28.
- Catoira, M.C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., Boccafroschi, F., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30 (2019) 1-10.
- Çetin, K., Denizli, A., *Colloids and surfaces: B, Biointerfaces*, 126 (2015) 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.038>
- Chang, S.J., Huang, Y.T., Yang, S.C., Kuo, S.M., Lee, M.W., *Carbohydrate polymers*, 88 (2012) 684-689.

- Chang, I., Prasidhi, A.K., Im, J., Cho, G.C., *Construction and Building Materials*, 77 **(2015)** 430-438.
- Chelu, M., Musuc, A.M., *Gels*, 9 **(2023)** 161.
- Chen, J., Park, K., *Journal of Controlled Release*, 65 **(2000)** 73-82.
- Chen, Q., Chen, H., Zhu, L., Zheng, J., *Journal of Materials Chemistry B*, 3 **(2015)** 3654-3676.
- Chin, K. B., Cordell, B., *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 19 **(2013)** 942-945.
- Chirani, N., Yahia, L.H., Gritsch L., Motta, F.L., Chirani, S., Fare S., *J Biomedical Sci.*, 4 **(2016)**.
- Chaterji, S., Kwon, I.K., Park, K., *Progress in Polymer Science*, 32 **(2007)** 1083–1122.
- Cox, S. D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. *Molecules*, 6 **(2001)** 87-91.
- D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P. M., Bisignano, G., *Phytomedicine*, 17 **(2010)** 317-322.
- Das, D., Pham, T.T.H., Noh, I., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170 **(2018)** 64-75.
- de Barros, D.P., Reed, P., Alves, M., Santos, R., Oliva, A., *Pharmaceutics*, 13**(2021)** 1950.
- Delgado-Charro, M.B., Guy, R.H., *Drug Delivery Reviews*, 73 **(2014)** 63–82.
doi:10.1016/j.addr.2013.11.014
- Deligkaris, K., Tadele, T.S., Olthuis, W., Van den Berg, A., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147 **(2010)** 765-774.
- Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211 **(2010)** 657-668.
- Dodane, V., Vilivalam, V.D., *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1 **(1998)** 246-253.
- Du, F., Qiao, B., Nguyen, T.D., Vincent, M.P., Bobbala, S., Yi, S., Lescott, C., Dravid, V.P., De La Cruz, M.O., Scott, E.A., *Nature communications*, 11 **(2020)** 1-9.
- Dumville, J. C., O'Meara, S., Deshpande, S., Speak, K., *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7 **(2013)**.
- Edwards-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S.G., Dawson, M.M., Dunn, K. , Burns, 30 **(2004)** 772-777.
- Ehrburger-Dolle, F., Morfin, I., Bley, F., Aguilar, M. R., Gallardo, A., Perez, P., ... & Mikhlovsky, S., *In AIP Conference Proceedings*, January, 1092 **(2009)** 141-144.
- Elzey, B., Norman, V., Stephenson, J., Pollard, D., Fakayode, S.O., *Spectroscopy*, 31 **(2016)** 26-37.
- Elzoghby, A.O., *J. Control. Release*, 172 **(2013)** 1075–1091.
- Fan, L., Du, Y., Huang, R., Wang, Q., Wang, X., Zhang, L., *Journal of Applied Polymer Science*, 96 **(2005)** 1625-1629.

- Fatoni, A., Dwiasi, D. W., Hermawan, D., IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 107 **(2016)** 012010.
- Farag, R.S., Shalaby, A.S., El-Baroty, G.A., Ibrahim, N.A., Ali, M. A., Hassan, E.M., *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18 **(2004)** 30-35.
- Fekete, T., Borsa, J., Takács, E., Wojnárovits, L., *Radiation Physics and Chemistry*, 118 **(2016)** 114-119.
- Feng, L., Jia, S.S., Chen, Y., Liu, Y., *Chemistry—A European Journal*, 26 **(2020)** 14080-14084.
- Frent, O.D., Vicas, L.G., Duteanu, N., Morgovan, C.M., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M.E., Filip, S.M., Lucaciu, R.-L., Marian, *Int. J. Mol. Sci.*, 23 **(2022)** 12108.
- Flood, P., Page, H., Reynaud, E.G., *Micron*, 84 **(2016)** 7–16. doi:10.1016/j.micron.2016.02.002
- Flores, F.C., De Lima, J.A., Da Silva, C.R., Benvegnú, D., Ferreira, J., Burger, M.E., ... & Da Silva, C.D.B., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15 **(2015)** 800-809.
- Fu, X., Hosta-Rigau, L., Chandrawati, R., Cui, J., *Chem*, 4 **(2018)** 2084-2107.
- Gaharwar, A.K., Peppas, N.A., Khademhosseini, A., *Biotechnology and Bioengineering*, 111 **(2014)** 441-453.
- Ganji, F., Vasheghani, F.S., Vasheghani, F.E., *Iranian Polymer Journal* **(2010)**.
<https://www.sid.ir/paper/561994/en>
- Garnica-Palafox, I.M., Sánchez-Arévalo, F.M., *Carbohydrate Polymers*, 151 **(2016)** 1073–1081. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.036.
- Ge, Y., Tang, J., Fu, H., Fu, Y., Wu, Y., *Fibers and Polymers*, 20 **(2019)** 698-708.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I., *International Journal of Molecular Sciences*, 22 **(2021)** 12827.
- Gudeman, L.F., Peppas, N.A., *Journal of Applied Polymer Science*, 55 **(1995)** 919–928. doi:10.1002/app.1995.070550610
- Gun'ko, V.M., Savina, I. N., Mikhalovsky, S.V., *Advances in colloid and interface science*, 187 **(2013)** 1-46.
- Guo, M., Pitet, L.M., Wyss, H.M., Vos, M., Dankers, P.Y., Meijer, E.W., *Journal of the American Chemical Society*, 136 **(2014)** 6969-6977.
- Gyles, D. A., Castro, L.D., Silva Jr, J. O. C., Ribeiro-Costa, R.M., *European Polymer Journal*, 88 **(2017)** 373-392.
- Hadi, M.Y., Mohammed, G.J., Hameed, I.H., *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8 **(2016)** 8-24.
- Halcon, L., Milkus, K., *American journal of infection control*, 32 **(2004)** 402-408.
- Han, L., Li, P., Tang, P., Wang, X., Zhou, T., Wang, K., ... & Lu, X., *Nanoscale*, 11 **(2019)** 15846-15861.

- Hasnain, M. S., Jameel, E., Mohanta, B., Dhara, A. K., Alkahtani, S., Nayak, A. K. , Alginates in Drug Delivery, in Alginates: sources, structure, and properties. Academic Press, Chapter 1, **2020**.
- Hayes, A.J., Leach, D.N., Markham, J.L., Markovic, B., Journal of Essential Oil Research, 9 **(1997)** 575-582.
- He, Y., Wang, C., Wang, C., Xiao, Y., Lin, W., Polymers, 13**(2021)** 2299.
- Henderson, T.M., Ladewig, K., Haylock, D.N., McLean, K.M., O'Connor, A.J., J. Mater. Chem. B, 1 **(2013)** 2682–2695.
- Hiramure, Y., Suga, K., Umakoshi, H., Matsumoto, J., Shiomori, K., Solvent Extraction Research and Development, Japan, 25 **(2018)** 37-46.
- Hoffman, A.S., Advanced Drug Delivery Reviews, 64 **(2012)** 18–23.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F., Industrial Crops and Products, 67 **(2015)** 403-413.
- Huang, W., Wang, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Zhang, Q., Zheng, X., ... & Zhang, L., Advanced Healthcare Materials, 5 **(2016)** 2813-2822.
- Ilyas, R.A., Sapuan, S.M., Kadier, A., Kalil, M S., Ibrahim, R., Atikah, M.S.N., ... Ibrahim, M.I.J., Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-Based Polymers, **(2020)** 111–138. doi:10.1016/b978-0-12-819661-8.00008-1
- ISO 4730:2004. (2004). Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). In International Organisation for Standardisation, <https://www.iso.org/standard/37033.html> **(Erişim tarihi: 25 Aralık 2022)**.
- Ito, K., Polymer Journal, 39 **(2007)** 489-499.
- Ivanov, R.V., Lozinsky, V.I., Noh, S.K., Han, S.S., Lyoo, W.S., Journal of Applied Polymer Science, 106 **(2007)** 1470-1475.
- Jagur-Grodzinski, J., Polymers for Advanced Technologies, **(2009)**.
- Jain, E., Srivastava, A., Kumar, A., Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20 **(2009)** 173-179.
- Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E. J., Zhong, Z., Biomaterials, 35 **(2014)** 4969-4985.
- Jones, V., Grey, J. E., Harding, K. G., Bmj, 332 **(2006)** 777-780.
- Jones, D.S., Andrews, G.P., Caldwell, D.L., Lorimer, C., Gorman, S.P., McCoy, C.P., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 82 **(2012)** 563-571.
- Kamoun, E.A., Kenawy, E.R.S., Chen, X., Journal of Advanced Research, 8 **(2017)** 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>
- Kang, P.L., Chang, S.J., Manousakas, I., Lee, C.W., Yao, C.H., Lin, F.H., Kuo, S.M., Carbohydrate Polymers, 85 **(2011)** 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.015>

- Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K.K., Kumar, A., *Acta Biomaterialia*, 5 **(2009)** 406–418.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.009>
- Karacan, P., Okay, O., *Reactive and Functional Polymers*, 73**(2013)** 442–450.
doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.11.014
- Keenan, T.R., Gelatin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **2000**.
- Kılıç Suloğlu, A., Özkahraman, B., Özbaş, Z., Bayrak, G., Perçin, I., Kanca, Y., Boran, F., Tamahkar, E., *Chemical Papers*, 76 **(2022)** 4005-4015.
- Kim, B., La Flamme, K., Peppas, N.A., *Journal of Applied Polymer Science*, 89**(2003)** 1606–1613. doi:10.1002/app.12337
- Kim, Y.W., Kim, J.E., Jung, Y., Sun, J.Y., *Materials Science and Engineering: C*, 95 **(2019)** 86-94.
- Kirsebom, H., Rata, G., Topgaard, D., Mattiasson, B., & Galaev, I. Y., *Macromolecules*, 42 **(2009a)** 5208-5214.
- Kirsebom, H., Mattiasson, B., & Galaev, I. Y., *Langmuir*, 25 **(2009b)** 8462-8465.
- Koetting, M.C., Peters, J.T., Steichen, S.D., Peppas, N.A., *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93 **(2015)** 1–49. doi:10.1016/j.mser.2015.04.001
- Kopecek J., *Biomaterials*, 28 **(2007)** 5185–5192.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.044>
- Koyutürk, A., Soyaslan, D.D., Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7 **(2016)** 58-65.
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., Berthiaume, F., *Frontiers in Physiology*, 9 **(2018)** 419.
- Kuang, J., Yuk, K.Y., Huh, K.M., *Carbohydrate Polymers*, 83 **(2011)** 284-290.
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., Martino, M.M., *Advances in Wound Care*, 7 **(2018)** 209-231.
- Lawrence, R., Consolacion, F., Jelen, P., *Food Technology*, 40 **(1986)** 77.
- Lawrence, W. T., & Diegelmann, R. F. (1994) *Clinics in Dermatology*, 12 **(1994)** 157-169.
- Lee, C. H., Singla, A., Lee, Y., *International Journal of Pharmaceutics*, 221**(2001)** 1-22.
- Lee, K. Y., Mooney, D. J., *Progress in Polymer Science*, 37**(2012)** 106–126.
- Lee, S. C., Kwon, I. K., & Park, K., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 **(2013a)** 17–20.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.015>
- Lee, C. J., Chen, L. W., Chen, L. G., Chang, T. L., Huang, C. W., Huang, M. C., Wang, C. C., *Journal of Food and Drug Analysis*, 21 **(2013b)** 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.007>.
- Li, Y., McClements, D. J., *Food Hydrocolloids*, 25 **(2011)** 1025-1033.
- Li, Y., Xu, T., Tu, Z., Dai, W., Xue, Y., Tang, C., Gao, W., Mao, C., Lei, B., Lin, C., *Theranostics*, 10 **(2020a)** 4929-4943. <https://doi.org/10.7150/thno.41839>.

- Li, M., Zhang, Z., Liang, Y., He, J., & Guo, B., *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12 **(2020b)** 35856-35872.
- Liang, K., Bae, K. H., & Kurisawa, M., *Journal of Materials Chemistry B*, 7**(2019)** 3775–3791. doi:10.1039/c9tb00485h
- Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., He, N., *Bone Research*, 5 **(2017)** 17014. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>
- Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., Korotaeva, G. F., & Rogozhin, S. V., *Colloid and Polymer Science*, 262**(1984)** 617-622.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., & Mattiasson, B., *Trends in Biotechnology*, 21**(2003)** 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002>
- Lozinsky, V. I., *Polymeric cryogels: macroporous gels with remarkable properties*, 1-48 **(2014)**.
- Lozinsky, V. I., *Gels*, 4**(2018)** 77.
- Luo, R., Wu, J., Dinh, N. D., Chen, C. H., *Adv. Funct. Mater.*, 25**(2015)** 7272–7279.
- Madduma-Bandarage, U. S., & Madihally, S. V., *Journal of Applied Polymer Science*, 138**(2021)** 50376.
- Madsen, J., Armes, S. P., Bertal, K., Lomas, H., MacNeil, S., Lewis, A. L., *Biomacromolecules*, 9 **(2008)** 2265-2275.
- Mahdavinia, G. R., Zohuriaan-Mehr, M. J., & Pourjavadi, A., *Polymers for Advanced Technologies*, 15 **(2004)** 173-180.
- Mahmood, H., Khan, I. U., Asif, M., Khan, R. U., Asghar, S., Khalid, I., ... & Asim, M., *International Journal of Biological Macromolecules*, 166 **(2021)** 483-495.
- Manjula, B. P., Joshi, V. G., Setty, R. S. S., Geetha, M., *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 55**(2021)** S285-S292.
- Martin, P., Nunan, R., *British Journal of Dermatology*, 173**(2015)** 370-378.
- Mbese, Z., Alven, S., Aderibigbe, B.A., *Polymers*, 13 **(2021)** 4368.
- Memic, A., Colombani, T., Eggermont, L. J., Rezaeeyazdi, M., Steingold, J., Rogers, Z. J., Navare, K. J., Mohammed, H. S., Bencherif, S. A., *Advanced Therapeutics*, 2 **(2019)**.
- Memic, A., Rezaeeyazdi, M., Villard, P., Rogers, Z. J., Abudula, T., Colombani, T., Bencherif, S. A., *Macromolecular Materials and Engineering*, 305 **(2020)** 1900824.
- Meza-Valle, K. Z., Saucedo-Acuña, R. A., Tovar-Carrillo, K. L., Cuevas-González, J. C., Zaragoza-Contreras, E. A., Melgoza-Lozano, *Polymers*, 13 **(2021)** 3958.
- Moghaddam, R. H., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., Moghaddam, Z. H., Tavakol, M., *Materials Science and Engineering: C*, 102 **(2019)** 391-404.
- Mohammadinejad, R., Maleki, H., Larraneta, E., Fajardo, A. R., Nik, A. B., Shavandi, A., ... & Thakur, V. K., *Applied Materials Today*, 16 **(2019)** 213-246.
- Murray, R. Z., West, Z. E., Cowin, A. J., Farrugia, B. L., *Burns & Trauma*, 7**(2019)** .

- NIST Mass Spectrometry Data Center, Terpinen 4-ol mass spectrum, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C562743&Mask=200> (**Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2022**)
- Nagura, M., Ishikawa, H., Polymer Communications, Guildford, 25(**1984**) 313-314.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, Pharmaceuticals, 6 (**2013**) 1451-1474.
- Nenoff, P., Haustein, U. F., Brandt, W., Skin Pharmacology and Physiology, 9 (**1996**) 388-394.
- Nguyen, Q. V., Huynh, D. P., Park, J. H., Lee, D. S., European Polymer Journal, 72 (**2015**) 602-619.
- O'hara, T., Dunne, A., Butler, J., Devane, J., & IVIVR Cooperative Working Group, Pharmaceutical Science & Technology Today, 1 (**1998**) 214-223.
- Okay, O., Hydrogel Sensors and Actuators, (**2009**) 1–14. doi:10.1007/978-3-540-75645-3_1
- Okay, O., Lozinsky, V. I., Advances in Polymer Science, (**2014**) 103–157. doi:10.1007/978-3-319-05846-7_3
- Oliva, B., Piccirilli, E., Ceddia, T., Pontieri, E., Aureli, P., Ferrini, A. M., Letters in Applied Microbiology, 37 (**2003**) 185-187.
- Omidian, H., & Park, K., Biomedical applications of hydrogels handbook, Springer, New York (**2010**) 1-16.
- Öncel, P., Çetin, K., Topçu, A. A., Yavuz, H., Denizli, A., Journal of biomaterials science. Polymer edition, 28 (**2017**) 519–531. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1282772>
- Pancur, S., Bilensoy, E., Çaliş, S., FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 47 (**2022**) 419-442.
- Parhi, R., Advanced Pharmaceutical Bulletin, 7 (2017) 515–530. doi:10.15171/apb.2017.064
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Bagherani, N., Kazerouni, A., International Journal of Dermatology, 52 (**2013**) 784-790.
- Patenaude, M., Smeets, N. M., Hoare, T., Macromolecular rapid communications, 35 (**2014**) 598–617. <https://doi.org/10.1002/marc.201300818>
- Peng, C. W., Lin, H. Y., Wang, H. W., Wu, W. W., Materials Science and Engineering: C, 32 (**2012**) 2491-2500.
- Peppas, N., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50 (**2000**) 27–46. doi:10.1016/s0939-6411(00)00090-4
- Peppas, N. A., Hoffman, A. S., Hydrogels. Biomaterials science, Academic Press., 153-166, **2020**.
- Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Journal of Chromatography B, 807 (**2004**) 129-137.
- Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Trends in Microbiology, 16 (**2008**) 543-551.

- Plieva, F. M., Kirsebom, H., & Mattiasson, B., *Journal of separation science*, 34 **(2011)** 2164-2172.
- Poppe, J., *Thickening and Gelling Agents for Food* **(1992)** 98-123.
- Pourshahrestani, S., Zeimaran, E., Kadri, N. A., Mutlu, N., Boccaccini, A. R., *Advanced Healthcare Materials* 9 **(2020)**. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000905>
- Raut, S., Bhadoriya, S. S., Uplanchiwar, V., Mishra, V., Gahane, A., Jain, S. K., *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2 **(2012)** 8–15. doi:10.1016/j.apsb.2011.12.005
- Razyieva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A. (2021). *Biomolecules*, 11 **(2021)** 700.
- Riley, L., Schirmer, L., Segura, T.Í., *Current Opinion in Biotechnology*, 60 **(2019)** 1-8.
- Robson, M. C., *Curr Problems Surg*, 38 **(2001)** 61-140.
- Rodriguez, J., Martinez, M., *Polymer Reviews*, 51**(2011)** 598-620.
- Rogovina, L. Z., Vasil'ev, V. G., Braudo, E. E., *Polymer Science Series C*, 50 **(2008)** 85–92. doi:10.1134/s1811238208010050
- Saha, R., Tayalia, P. (2022) *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8 (2022), 3557-3567.
- Saini, K., *PharmaTutor*, 5 **(2017)** 27-36.
- Sánchez-Cid, P., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., Pérez-Puyana, V., *Polymers*, 14 **(2022)** 3023. <https://doi.org/10.3390/polym14153023>
- Saylan, Y., Denizli, A., *Gels*, 5 **(2019)** 20.
- Shaghaleh, H., Hamoud, Y. A., Xu, X., Wang, S., Liu, H., *Journal of Cleaner Production*, 368 **(2022)**133098.
- Sharma, A., Bhat, S., Vishnoi, T., Nayak, V., Kumar, A., *BioMed Research International*, **(2013)**.
- Sharma, S., Tiwari, S., *International Journal of Biological Macromolecules*, 162 **(2020)** 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.110>
- Shi, M., Jiang, L., Yu, C., Dong, X., Yu, Q., Yao, M., ... & Li, J., *Science China Technological Sciences*, 65 **(2022)** 1029-1042.
- Shinde, V. V., Dalavi, D. S., Mali, S. S., Hong, C. K., Kim, J. H., Patil, P. S., *Applied Surface Science*, 307 **(2014)** 495-502.
- Schulze, W.E., Yu, D.T., Macmasters, M.M., *Starch-Stärke*, 16 **(1964)** 41-44.
- Sikdar, P., Uddin, M. M., Dip, T. M., Islam, S., Hoque, M. S., Dhar, A. K., Wu, S., *Materials Advances*, 2 **(2021)** 4532–4573.
- Silva, C. J., Barbosa, L. C., Maltha, C. R., Pinheiro, A. L., Ismail, F. M., *Flavour and fragrance journal*, 22 **(2007)** 474-478.
- Singhal, R., Gupta, K., *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55 **(2015)** 54–70. doi:10.1080/03602559.2015.1050520

- Sivakumaran, D., Maitland, D., Oszustowicz, T., Hoare, T., Journal of Colloid and Interface Science, 392 **(2013)** 422-430.
- Soukoulis, S., and Hirsch, R., Australian Dental Journal, 49 **(2004)** 78-83.
- Söderberg, T. A., Johansson, A., Gref, R., Toxicology, 107 **(1996)** 99-109.
- Strecker-McGraw, M. K., Jones, T. R., Baer, D. G., Emergency Medicine Clinics of North America, 25 **(2007)** 1-22.
- Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C., PloS one, 15 **(2020)** e0232565.
- Sun, J., Tan, H., Materials (Basel), 6**(2013)**1285-1309.
- Suvarna, K., Munira, M., Pharm Res, 2 **(2013)** 6-12.
- Suzuki, M., Hirasa, O., An approach to artificial muscle using polymer gels formed by micro-phase separation. In: Dušek, K. (Eds.) Responsive Gels: Volume Transitions II. Advances in Polymer Science, Springer, Berlin, Heidelberg, 110, **1993**.
<https://doi.org/10.1007/BFb0021135>
- Tabatabaee, S., Baheiraei, N., Salehnia, M., J Orthop Surg Res, 17 **(2022)** 216.
- Takei, T., Yoshihara, R., Danjo, S., Fukuhara, Y., Evans, C., Tomimatsu, R., ... & Yoshida, M., International Journal of Biological Macromolecules, 149 **(2020)** 140-147.
- Tang, L., Wang, L., Yang, X., Feng, Y., Li, Y., Feng, W., Progress in Materials Science, 115 **(2021)** 100702.
- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Ferreira, F., Felgueiras, H. P., Biomolecules, 10 **(2020)** 148.
- Teissedre, P. L., Waterhouse, A. L., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 **(2000)** 3801-3805.
- Teixeira, L. S. M., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., Karperien, M., Biomaterials, 33 **(2012)** 1281-1290.
- Thankam, F. G., Muthu, J., Carbohydrate polymers, 112 **(2014)** 235-244.
- Thakur, S., Thakur, V. K., Arotiba, O. A., Hydrogels **(2018)** 29–50. doi:10.1007/978-981-10-6077-9_2
- Thiagarajan, P., Banerjee, K., Saha, G., Sahoo, P., & Chattaraj, S., Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences **(2021)** 44-52.
- Thomas, A., Harding, K. G., Moore, K., Biomaterials, 21**(2000)** 1797-1802.
- Thompson, G., Blackwood, B., McMullan, R., Alderdice, F. A., Trinder, T. J., Lavery, G. G., & McAuley, D. F., BMC Infectious Diseases, 8 **(2008)** 1-9.
- Tripathi, A., Kumar, A., Macromolecular Bioscience, 11 **(2011)** 22-35.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... & Bisignano, G., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 **(2005)** 2474-2478.

- Qi, X., Su, T., Zhang, M., Tong, X., Pan, W., Zeng, Q., ... & Shen, J., *ACS applied materials & interfaces*, 12 **(2020)** 13256-13264.
- Varlık, S., Bayrak, G., Perçin, I., İsbir Turan, A., *Hittite Journal of Science and Engineering*, 9 **(2022)** 37-44.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., *Journal of International Medical Research*, 37 **(2009)** 1528-1542.
- Vol'khin V.V., Ponomarev E.I., Zolotavin V.L., *Kolloidn Zhurn* 35 **(1973)** 144.
- Wahid, F., Bai, H., Wang, F. P., Xie, Y. Y., Zhang, Y. W., Chu, L. Q., ... & Zhong, C., *Cellulose*, 27 **(2020)** 369-383.
- Wang, N. X., Von Recum, H. A., *Macromolecular Bioscience*, 11 **(2011)** 321–332.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201000206>
- Wang, J., Wang, L., Yu, H., Chen, Y., Chen, Q., Zhou, W., ... & Chen, X., *International Journal of Biological Macromolecules*, 88 **(2016)** 333-344.
- Watase M, Nishinari K, Nambu M., *Polymer Communications*, 24 **(1983)** 52.
- Wichterle, O., Lim, D., *Nature*, 185**(1960)** 117–118. doi:10.1038/185117a0
- Xu, Q., Guo, L., Sigen, A., Gao, Y., Zhou, D., Greiser, U., ... & Wang, W., *Chemical Science*, 9**(2018)** 2179-2187.
- Yavaşer, R., Karagözler, A.A., *Process Biochemistry*, 101 **(2021)** 137–146.
doi:10.1016/j.procbio.2020.11.021
- Yigit, S., Sanyal, R., Sanyal, A., *Chemistry–An Asian Journal*, 6 **(2011)** 2648-2659.
- Yildirim, N., Küçük, İ., *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 35 **(2020)**.
- Yu, Y., Li, P., Zhu, C., Ning, N., Zhang, S., Vancso, G. J., *Advanced Functional Materials*, 29 **(2019)** 1904402.
- Zahid, M., Lodhi, M., Afzal, A., Rehan, Z. A., Mehmood, M., Javed, T., Shabbir, R., Siuta, D., Althobaiti, F., Dessok, E.S., *Gels*, 7**(2021)** 107.
- Zhai, M., Yoshii, F., Kume, T., Hashim, K., *Carbohydrate Polymers*, 50 **(2002)** 295.
- Zhang, H., Zhang, F., Wu, J., *Reactive and Functional Polymers*, 73 **(2013)** 923-928.
- Zhao, Q., Sun, J., Wu, X., Lin, Y., *Soft Matter*, 7 **(2011)** 4284-4293.
- Zhao, X., Guo, B., Wu, H., Liang Y., Ma, P.X., *Nature Communications*, 9 **(2018)** 2784.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04998-9>
- Zheng, S., Wang, T., Liu, D., Liu, X., Wang, C., Tong, Z., *Polymer*, 54 **(2013)** 1846-1852.
- Zhou, L., Tan, G., Tan, Y., Wang, H., Liao, J., Ning, C., *Rsc Advances*, 4 **(2014)** 21997-22008.
- Zou, C. Y., Lei, X. X., Hu, J. J., Jiang, Y. L., Li, Q. J., Song, Y. T., ... & Xie, H. Q., *Bioactive Materials*, 16 **(2022)** 388-402.

EKLER

EK 1 – TTO100-GCry ve TTO100-ACry için Termogravimetrik Analiz (TGA) Grafiği, ağırlık kaybı (%) ve sıcaklık (°C) karşılaştırması

