T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİM İÇEREN YARA ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Hatice DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI

Aralık, 2020

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİM İÇEREN YARA ÖRTÜ MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Hatice DEMİR tarafından hazırlanan tez çalışması 28.12.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat ÖZMEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Enzim İçeren Yara Örtü Malzemelerinin Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hatice DEMİR

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün TYL-2020-3869 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve Arkadaşlarıma

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda engin bilgi ve tecrübelerini, zaman ve mekan gözetmeden her koşulda paylaşan, yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI'na sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübelerini, değerli bilgi birikimlerini paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Dr. Yeliz BAŞARAN ELALMIŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a ve Bükre KIRAN'a antibakteriyel aktivite testlerindeki katkılarından ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarının imkanlarından faydalanmama olanak sağlayan Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e ve M.Sc. Songül ULAĞ'a teşekkür ederim.

Çalışmamın yönlendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ndeki değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yardımını hiç esirgemeyen ve ihtiyacım olan her anda desteğini hissettiğim değerli arkadaşılarım M.Sc. İlke ŞAHİN'e, M.Sc. Damla GÖKKAYA'ya ve güzel anılar biriktirdiğim YTÜ 306-307 Aşı ve Biyopolimer Laboratuvarı ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü çalışmalarımda beni her koşulda motive eden ve ihtiyacım olan her anda desteğini hissettiğim Adem ARAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, beni bu günlere getiren, sevgilerini ve desteklerini hayatımın her alanında hissettiğim Hediye DEMİR ile İhsan DEMİR'e ve kardeşlerim Muhsin DEMİR ile Nursena DEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt Içi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında TUBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hatice DEMİR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 4
2 GENEL BİLGİLER 5
2.1 Yara İyileşme Süreçleri 5
2.1.1 Hemostas 6
2.1.2 Enflamasyon 7
2.1.2.1 Enfeksiyon 9
2.1.3 Proliferasyon 10
2.1.4 Olgunlaşma ve Yeniden Yapılanma 12
2.2 Kronik Yaralar 13
2.3 Yara Örtü Malzemeleri 17
2.3.1 Hidrokolloidler 20
2.3.2 Köpükler 21
2.3.3 Aljinat Örtüler 21
2.3.4 İyot Preparatları 22
2.3.5 Gümüş İçerikli Örtüler 22
2.3.6 Hidrojeller 22
2.3.6.1 Dekstran Esaslı Hidrojeller 26
2.4 Enzim 30
2.4.1 Elde Edildikleri Kaynağa Göre Protezlar 31
2.4.1.1 Mikroorganizma Kaynaklı Proteazlar 31
2.4.1.2 Hayvan Kaynaklı Proteazlar 31
2.4.1.3 Bitki Kaynaklı Proteazlar 32
2.4.2 Etki Bölgelerine Göre Proteazlar 32

2.4.2.1 Ekzopeptidazlar 32
2.4.2.2 Endopeptidazlar 33
2.5 Bromelain 34
2.5.1 Bromelain Saflaştırma Yöntemleri 36
3 MATERYAL VE YÖNTEMLER **39**
3.1 Kimyasal Madde Listesi 39
3.2 Cihaz Listesi 40
3.3 Deneysel Yöntemler 41
3.3.1 Bromelain Enziminin Kısmi Saflaştırılması 41
3.3.1.1 Enzim Ekstraksiyonu 41
3.3.1.2 Kazein Sindirme Ünitesi Aktivite Tayin Yöntemi (CDU) 43
3.3.1.3 Protein Miktar Tayin Yöntemi (Brdaford Assay) 45
3.3.2 Desktran Esaslı Hidrojel Üretimi 46
3.3.2.1 Dekstran Aldehit Türevine Yükseltgenmesi 46
3.3.2.2 Dekstran Esaslı Hidrojelin Üretilmesi 47
3.3.3 Enzimin Hidrojele İmmobilizasyonu 48
3.4 Karakterizasyon 49
3.4.1 Şişme Kinetiği 49
3.4.2 Bozunma Testi 50
3.4.3 FTIR Spektroskopisi 50
3.4.4 Morfoloji Analizi 50
3.4.5 Antibakteriyel Aktivite Testi 51
3.4.6 Hidrojelden Enzim Salımı 52
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **53**
4.1 Bromelain Enziminin Saflaştırılması 53
4.2 Hidrojellerin Üretilmesi 54
4.2.1 NH_3OHCl Titrasyonu ile Aldehit Grupların Tayini 54
4.2.2 FTIR Spektroskopisi Analizi 54
4.2.3 Hidrojel Şişme Kinetiği 56
4.2.4 Morfoloji Analizi 57
4.2.5 Bozunma Testi 59
4.2.6 Enzimin Hidrojele İmmobilizasyonu 61
4.2.7 Antibakteriyel Aktivite Testi 62
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **64**
KAYNAKÇA **67**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **76**

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
N	Newton
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
U	Unit

KISALTMA LİSTESİ

α-SMA	Alfa düz kas aktini
ADP	Adenozin difosfat
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ATPS	Sulu iki faz sistemi
BSA	Albumin
CDU	Kazein sindirme ünitesi
D-CHO	Dekstran aldehit türevi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ECM	Hücre dışı matris
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GDU	Jelatin sindirme ünitesi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
IL	İnterlökin
KGF	Keranosit büyüme föktörü
MMP	Matriks metaloproteaz
MWCO	Moleküler ağırlık engelleme sınırı
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PDGF	Trombosit türevi büyüme faktörü
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TGF	Dönüştürücü büyüme föktörü
TIMP	Metloproteaz doku inhibitörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Deri katmanları. 5

Şekil 2.2 Yara iyileşme aşamaları 6

Şekil 2.3 Yara iyileşme aşamalarının şematik gösterimi. Enflamasyon aşaması (mavi), proliferasyon aşaması (yeşil), yeniden yapılanma aşaması (turuncu) ile gösterilmiştir. 9

Şekil 2.4 Yara iyileşmesinde görev alan çeşitli büyüme fakörleri 12

Şekil 2.5 Kronik yaraların biyolojisi 15

Şekil 2.6 Hidrokolloid yara örtüsünün yara üzerine uygulanışı 20

Şekil 2.7 Farklı çapraz bağlanma yöntemleri ile hidrojel oluşum şeması 24

Şekil 2.8 Hücre dışı matris yapısı 25

Şekil 2.9 Dekstranın biyomedikal uygulamaları 28

Şekil 2.10 Dektranın $NaIO_4$ ile oksidasyonu ve biyoaktif moleküllerin terminal NH_2 grupları üzerinden dekstranın aldehit gruplarıyla Schiff bazı oluşturması. 28

Şekil 2.11 Dekstranın Schiff bazı türevinin $NaBH_4$ yoluyla indirgenmesi 29

Şekil 2.12 Oksijen koşulları ile ilişkin, matris birikimi, IL-6 sentezi ve yumuşak doku iyileşmesi sırasında iyileşme eğilimi 36

Şekil 2.13 Bromelain saflaştırma işlemi prosesi. 37

Şekil 3.1 Ananastan ham ekstraktın eldesi aşamaları 42

Şekil 3.2 Ananas ekstraktının kısmi saflaştırma aşamaları 43

Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlardaki tirozin amino asitinin 280 nm'deki absorbans değerlerinin değişimi 44

Şekil 3.4 G-250 boyası içeren farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltilerinin 565 nm'deki absorbans değerlerindeki değişim 46

Şekil 3.5 Dekstranın $NaIO_4$ kullanılarak aldehit türevine yükseltgenmesi 47

Şekil 3.6 Dekstran aldehit türevinin NH_3OHCl ile titrasyonu 47

Şekil 3.7 Dekstran esaslı hidrojel üretim aşamaları 48

Şekil 3.8 Enzimin hidrojele immobilizasyonu 49

Şekil 4.1 Dektsran, dekstran aldehit türevi (DCHO), BSA ve kurutulmuş hidrojele ait FTIR spektrumları 55

Şekil 4.2 Su içerisinde bekletilen kurutulmuş hidrojelin zamana bağlı olarak ağırlık değişimi 57

Şekil 4.3 Üretilen hidrojelin farklı yakınlaştırmalarda elde edilen SEM görüntüleri: a) 200x, b)500x, c)1000x, d)2000x, e)2000x, f) 8000x 58
Şekil 4.4 pH 5 ve pH 7'de bekletilen hidrojellerin zamana bağlı olarak % ağırlık değişimleri 60
Şekil 4.5 Enzim yüklü olan ve olmayan hidrojellerin salım çözeltilerinin *E. Coli* ve *S. Aureus* bakteri sayıları üzerine etkisi 63

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Enflamasyon ile enfeksiyon arasındaki temel farklar. 10
Tablo 2.2 Yara iyileşmesinin 4 aşaması ve bu aşamaların özellikleri 13
Tablo 2.3 Çeşitli yara örtü malzemelerinin avantajları ve dezavantajları. 19
Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı) 39
Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan cihazların isim ve markaları (devamı) 40
Tablo 3.3 Kazein sindirme ünitesi aktivite tayin yöntemi 43
Tablo 3.4 Protein miktar tayin yöntemi 45
Tablo 4.1 Ham ananas ekstraktı ve enzim ekstrakt çözeltisinin aktivite ve protein konsantrasyon değerleri 54
Tablo 4.2 Hidrojellere enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrasında enzim ekstraktında bulunan ve enzim yüklü hidrojellerden salınan bromelain enziminin aktivite ve protein miktar değerleri 62

ÖZET

Enzim İçeren Yara Örtü Malzemelerinin Geliştirilmesi

Hatice DEMİR

Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI

Akut yaralardan farklı olarak kronik yaralarda, normal yara iyileşme sürecinin sağlanamaması ya da iyileşme sürecinin daha uzun sürmesinden dolayı doku bütünlüğü kesin olarak sağlanamamaktadır. Venöz, basınç ve nöropatik ülserler, en yaygın kronik yara türlerinin % 70'ini oluşturmaktadır. Hidrojel esaslı yara örtüleri, herhangi bir cerrahi operasyona ihtiyaç duyulmadan yara bölgesindeki nekrotik dokuları uzaklaştırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır.

Bu çalışmada, enzimin nekrotik dokuyu parçalaması ve hidrojelin absorbsiyonu ile nekrotik dokunun uzaklaştırılmasıyla kronik yaraların iyileşmesini hızlandıracak enzim içerikli hidrojel esaslı bir yara örtü malzemesinin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, dekstranın aldehit türevinin (D-CHO) albümin (BSA) ve etilendiamin kullanılarak Schiff baz oluşumu sayesinde çapraz bağlanmasıyla makrogözenekli bir hidrojel üretilmiştir. Hidrojel üretildikten sonra, ananastan kısmi saflaştırılarak elde edilen bromelain enzim ekstraktı hidrojele emdirilmiştir. Bromelain, yara iyileşmesinde nekrotik dokuyu parçalayabilmesi ve antiinflamatuar, anti-trombotik özellikleri nedeniyle tercih edilen bir proteazdır.

Tez çalışmasında, üretilen dekstran aldehit türevi FTIR spektroskopsi ve NH_3OHCl titrasyonu ile karakterize edilmiştir. Dekstran aldehit türevi, BSA ve etilendiamin kullanılarak kriyojelasyon yöntemi ile üretilen hidrojeller FTIR spektroskopisi, denge şişme testi, SEM, bozunma testi ile karakterize edilmiştir. Enzim yüklü hidrojelden enzim salım miktarı ve salınan enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Enzim yüklü olan ve olmayan hidrojellerin antibakteriyel etkileri incelenmiş ve enzim yüklü hidrojelin *S. Aureus* ve *E. Coli'ye* karşı enzim yüklü olmayan hidrojele kıyasla daha yüksek oranda antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Bu çalışmada antibakteriyel özelliğe sahip, pH'a duyarlı olarak bozunabilen, gözenekli, yüksek sıvı emme kabiliyetine sahip ve doğal polimerlerden oluşan bir yara örtü malzemesi üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bromelain, Dekstran, Enzim, Hidrojel, Yara İyileşmesi

ABSTRACT

Development of Enzyme-Loaded Wound Dressing Materials

Hatice DEMİR

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Asst. Prof. Murat TOPUZOĞULLARI

In chronic wounds, tissue integrity cannot be achieved definitely owing to the insufficiency of normal wound healing stages or much longer periods of healing stages. Venous, pressure and neuropathic ulcers contain 70% of all the most common types of chronic wounds. Hydrogel based wound dressings can accelerate wound healing by removing the necrotic tissues from wound area without any needing to surgical operations.

In this study, it is aimed to produce hydrogel based wound dressings that contain enzyme, in which the enzyme will disrupt the necrotic tissue and hydrogel will remove necrotic tissue via absorption and thus, accelerate the healing of chronic wounds. For this purpose, a hydrogel wound dressing was produced by crosslinking of aldehyde derivative of dextran with albumin (BSA) and ethylendimaine via Schiff base chemistry. During hydrogel formation, bromelain, which was partially isolated from pineapple, was entrapped in the hydrogel structure. Bromelain is a protease, which is preferred for its necrotic tissue disruption, anti-inflammatory, anti-thrombotic properties in wound healing.

The produced dextran aldehyde derivative was characterized by FTIR spectroscopy and NH_3OHCl titration. Hydrogels were produced by cryogelation method using

dextran aldehyde derivative, BSA and ethylenediamine and they were characterized by FTIR spectroscopy, equilibrium swelling test, SEM, degradation tests. Then, the bromelain enzyme extract was absorbed to hydrogel and the enzyme release amount and enzyme activity in hydrogel were determined. The antibacterial effects of hydrogels with and without enzymes were examined and it was found that the enzyme loaded hydrogel showed a higher rate of antibacterial activity against *S. Aureus* and *E. Coli* compared to the hydrogel without enzyme.

In this study, a wound dressing material consisting of natural polymers with antibacterial properties, pH sensitive degradation, porosity and high liquid absorption capacity was produced.

Key Words: Bromelain, Dextran, Enzyme, Hydrogel, Wound Healing

1
GİRİŞ

1.1. Literatür Özeti

Kronik yaralar, genellikle çeşitli hastalıklar gibi tetikleyici bir etkenin olduğu ve etiyolojik nedenlere bağlı olarak tekrar eden, iyileşmesinin uzun zaman aldığı veya iyileşme gösteremeyen yaralardır. Kronik yaralar genellikle yaşlılarda, kardiyovasküler hastalıklara ve çeşitli komorbidite durumlarına sahip hastalarda görülmektedir. En sık görülen kronik yara türleri ise venöz, basınç ve nöropatik ülserlerdir. Bu yara türleri kronik yaraların %70'ini kapsamaktadır. Gelişmiş ülkelerde hastaların %0,2-1 venöz ülser, %5'i basınç ülseri, %5-10'u ise diyabete bağlı nöropatik ülsere sahip olduğu rapor edilmiştir [1]. Kronik yaralarda en sık karşılaşılan basınç ülseri komplikasyonları genellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda oldukça sık görülmeketedir. Yoğun bakımda yatan hastaların tedavileri uzun süreli ve yatağa bağımlı bir şekilde seyreder. Diğer hasta grupları ile kıyaslandığında, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalarda basınç ülseri görülme olasılığı %56'ya kadar çıktığı rapor edilmiştir [2]. Diyabetik ülser ise periferik nöropati sonucunda derin dokularda meydana gelen bir kronik yara biçimidir. Diyabet hastalarında %10-25 oranında kronik yara oluşumları görülebilmektedir ve buna bağlı olarak yara bölgesi devamlı ampüte edilmektedir [3].

Kronik yaraların tedavi süreci birkaç ay boyunca sürmekte fakat tam bir iyileşme sağlanamamaktadır. Bu süreçte uygulanan mevcut tedavi yöntemleri; tekrarlı ilaç dozları, bandajlama, hastane görevlileri tarafından gözetim gibi etmenleri gerektirdiği için tedavinin yüksek maliyete ulaşmasına sebep olmakta ve aynı zamanda hastayı sınırlandırmaktadır. Ayrıca, bu durum hastaları ekonomik ve psikososyal açıdan olumsuz etkilemektedir [3].

Kronik yaraların tedavisinde en çok görülen komplikasyonlardan biri enfeksiyona bağlı nekrotik doku oluşumudur. Nekrotik dokunun yara yatağından

uzaklaştırılmasında cerrahi insizyon yöntemi uygulanır. Fakat bu uygulamanın en büyük dezavantajlardan biri sık sık yapılan pansuman değişikliğine ihtiyaç duyulmasından dolayı enfeksiyon riskinin daha çok artmasıdır [4].

Tüm bu sınırlamalar göze alınarak, kronik yaraların tedavisinin ilk basamağında enfeksiyonu önlemek ve yaranın ihtiyacı olan dengeli nem ortamını sağlamak amacıyla yaranın ölü dokulardan arındırılması ve aynı zamanda fazla olan eksüdanın yara bölgesinden uzaklaştırılarak yara bölgesine dengeli nemin sağlanacağı bir yara örtüsü ile tedavi yöntemleri incelenmiştir. Bu yara örtü malzemelerinin içeriğine enfeksiyonu engellemek, yaranın hızlı ve düzgün iyileşmesini sağlamak gibi sebeplerle çeşitli etken maddeler eklenebilmektedir. Bromelain enzimi de bu amaçla yara örtü malzemelerine eklenen malzemelerden birisidir.

Özellikle Avrupa'da cerrahi işlem gerektiren yaralarda, travma ve ameliyattan kaynaklanan iltihaplanma ve derin yanıklarda bromelain enziminin debridman olarak kullanımı onaylanmıştır [5]. Bromelain enzimi yaraların tedavi edilmesi üzerine çeşitli yara örtü çalışmalarında kullanılmıştır.

Tan ve ark. yaptığı çalışmada, kitosan nanopartiküllerine bromelain enzimi immobilize ederek bir ilaç taşıma sistemi geliştirmişlerdir. Farklı fizikokimyasal özelliklere sahip kitosan nanopartikülleri üretilmiş ve bromelain yüklü nanpopartiküllerde partikül boyutu ve zeta potansiyeli azalmış ve polidispersite indeksi arttığı belirtilmiştir [6].

Bernela ve ark. bromelain yüklü "katira gum" nanoparçacıkları üretmiş ve önemli bir anti-enflamatuar potansiyele sahip olduğunu bulmuşlardır. Ancak bu yöntemde kullanılan doğal polimerin yara iyileşmesi için hiçbir etkinliği yoktur [7].

Janaina ve ark. yaptığı çalışmada ise aljinat ve "arabic gum" esaslı bir hidrojel yara örtüsüne pasif difüzyon yöntemi uygulayarak bromelain enzimi immobilize etmişlerdir [8].

Fernanda ve ark. sıcaklığa duyarlı PNIPAAm-co-Aam esaslı hidrojele ananastan saflaştırılan bromelain enzim ekstraktını immobilize etmişlerdir ve yara örtü malzemesi olarak kullanma amacı ile incelemişlerdir [9].

Liu ve ark. hemostasın hızlı bir şekilde gerçekleşmesi ve kanamanın durdurulması amacı ile dekstranı yükseltgeyerek dekstran esaslı bir hidrojel üretmişlerdir. Dekstran esaslı hidrojelin yara yüzeyinde uygun absorbsiyon ve yapışma ile yara bölgesinde hemostasın hızlıca gerçekleşmesine olanak sağladığını bildirmişlerdir [10]. Ancak açık yaralarda enfeksiyon önemli bir risk faktörüdür ve sadece hemostası desteklemek uygun bir yara iyileşme sürecini destekleyememektedir.

Sun ve ark. derin yanıklarda neovaskülarizasyonun desteklenmesi amacıyla dekstran esaslı bir hidrojel üretmişlerdir. 3 hafta boyunca farelerde oluşturulan yanıklarda dekstran esaslı hidrojeller ile yanık deri bölgesi kaplandığı ve 3 haftanın sonunda yara bölgesinde iyileşme görüldüğü ve olgun bir endotel tabakanın oluştuğunu bildirmişlerdir [11].

Bromelain içerikli yara örtü malzemeleri incelendiğinde bugüne kadar dekstran esaslı bir hidrojel yapısına veya nanopartiküler bir sisteme bu enzimin yüklenmediği görülmüştür. Bu sebeple çalışmamızda bromelain enzimi yüklü dekstran esaslı hidrojeller üretilerek yara örtü malzemesi olarak uygulanması amacıyla araştırılması hedeflenmiştir. Yanıkların ve yaraların debridmanını destekleyen yeni ve daha etkin yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi büyük bir önem taşımakta ve bu malzemenin kullanımının umut verici bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda çalışmada üretilecek dekstran esaslı bromelain yüklü hidrojelin özgün bir malzeme olacağı ve litertüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

1.2. Tezin Amacı

Tez çalışmasında kronik yaraların iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyecek, biyouyumlu ve biyobozunur özellikte dekstran esaslı bir yara örtü malzemesi üretmek ve bu yara örtü malzemesine ananas meyvesinden kısmi saflaştırılan bromelain enziminin immobilize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşabilmek için;

- Dekstranın sodyum periyodat kullanılarak aldehit türevine yükseltgenmesi,

- Çapraz bağlayıcı olarak BSA ve etilendiamin kullanılması ile dekstran esaslı hidrojel üretilmesi,
- Ananas meyvesinden kısmi saflaştırılarak elde edilen bromleain enzim ekstraktının hidrojele immobilizasyonu ile yara örtü malzemesi üretilmesi,

hedeflenmektedir.

1.3. Hipotez

Kronik yaraların yaşlılarda, yatan hastalarda ve diyabet hastalarında oldukça sık görülmesi ve bu yaralarda enfeksiyona bağlı meydana gelen nekrotik dokularda geçici tedavi olarak cerrahi insizyon yöntemlerinin kullanılmasından dolayı bu yaralarda sağlıklı ve kalıcı bir tedavi yöntemi uygulanamamaktadır. Bu nedenle yara yatağındaki bu nekrotik dokunun uzaklaştırılması gerekmektedir.

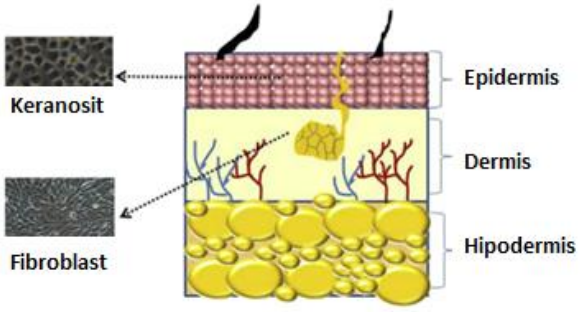
Bu çalışmada, dekstran esaslı hidrojele bromelain enzimi emdirilmesi ile üretilecek yara örtü malzemesi;

- İçerdiği proteaz sayesinde kronik yaraların iyileşmemesinin en büyük sorunlarından biri olan nekrotik dokuyu parçalayacağı öngörülmektedir.
- Bromelain enziminin antibakteriyel özelliği sayesinde yara dokusunda bakteriyel enfeksiyon oluşumunu azaltacağı düşünülmektedir.
- Hidrojelin yapısı sayesinde yüksek miktarda sıvı emme özelliği ile eksudayı yara yatağından uzaklaştırması ve cerrahi operasyona gerek kalmaksızın yarayı iltihaptan arındırması beklenmektedir.
- Sahip olduğu çapraz bağlı dekstran içeriğinden ötürü yara iyileşmesinde gerekli olan kolajen üretimini destekleyeceği ve endotel hücrelerini takviye edeceği düşünülmektedir. Ayrıca, hücreler arası matriks görevi de görerek yara dokusunun iyileşmesini hızlandıracağı öngörülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1. Yara İyileşme Süreçleri

Deri bedeni örten, dış dünya ile beden bir arasında sınır oluşturan ve dış dünyaya karşı fizyolojik açıdan önemli yanıtların meydana geldiği çok katmanlı bir organdır (Şekil 2.1). Yara ise fizyolojik veya anatomik olarak doku bütünlüğünün bozulması ile karakterize olan fizyolojik bir deformasyon halidir. Yara karşılığı olarak bazı durumlarda erozyon, ülser ve fissür gibi kelimeler de kullanılmaktadır [12]. Yaralar etyolojilerine göre iki sınıfta incelenir: Bunlar akut ve kronik yaralardır. Akut yara iyileşme süreci olarak adlandırılan bazı yaralanma durumlarında vücut yara iyileşme sürecini dışarıdan bir müdahale gerektirmeden gerçekleştirir ve bu yaralar belirli bir süre sonunda iyileşme gösterebilirken; kronik yaralar olarak adlandırılan yaralarda ise normal iyileşme evreleri gözlenmemekte ve bu durum iyileşme sürecinin uzamasına ve bazı durumlarda yaraların iyileşmemesine neden olmaktadır [13].



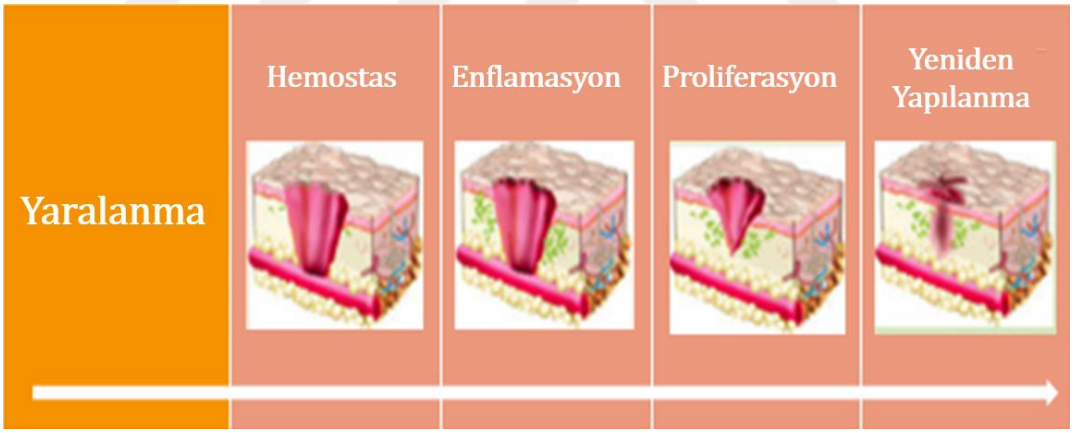
Şekil 2. 1 Deri katmanları [13]

Yara iyileşmesi karmaşık ve dinamik bir süreçten oluşmaktadır ve yaranın iyileşme süreci bireyin değişken sağlık durumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yara iyileşme süreçleri genel olarak hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ile olgunlaşma ve yeniden yapılanma aşamalarından oluşmaktadır. Yara iyileşmesini bu şekilde aşamalar ayrılmış olması bu sürecin temel prensiplerini anlamak için uygun bir çerçeve sağlar [14].

Doku hasarının altında yatan yaygın nedenler arasında ilk ve tekrarlı travmalar, termal ve kimyasal sonucu oluşan yanıklar, hayvan ısırıkları veya böcek sokmaları, arteriyel, venöz, lenfatik vasküler rahatsızlıklar, immün yetmezlik, malignite, bağ dokusu hastalıkları diyabet ve metabolik rahatsızlıklar, beslenme yetersizlikleri, psikososyal bozukluklar, ilaçların olumsuz etkileri gibi birçok faktör örnek olarak verilebilir [14].

Hayvan modellerinde gözlemlenen akut yaralarla ilgili yapılan araştırmalara göre, yaraların 4 aşamada iyileştiğini görülmektedir. Aynı şekilde kronik yaraların da 4 temel iyileşme aşamasına girdiğine inanılmaktadır [14]. Fakat kronik yaraların iyileşme süreçlerini tamamlayamamasının sebepleri olarak yara iyileşme aşamalarının olduğundan daha uzun sürmesi ya da yara iyileşme aşamalarının bir noktada durması olarak görülmektedir.

Yara iyileşme süreci bir travma ile başlayarak sistematik, hücresel ve biyokimyasal olaylar ile yeni doku oluşumu sağlamaktadır. Akut yara iyileşme aşamaları Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2. 2 Yara iyileşme aşamaları [14]

2.1.1. Hemostaz

Hemostaz, hastanın altta yatan pıhtılaşma bozuklukları yoksa ilk yaralanmadan saniyeler sonra gerçekleşir ve bu süreçte yara bölgesine göç eden trombositler genel olarak nötrofil ve makrofajları çekmek için büyüme faktörleri üretirler [10]. Trombositler, hasarlı kan damarlarından kan akmasını engellemek amacıyla yara

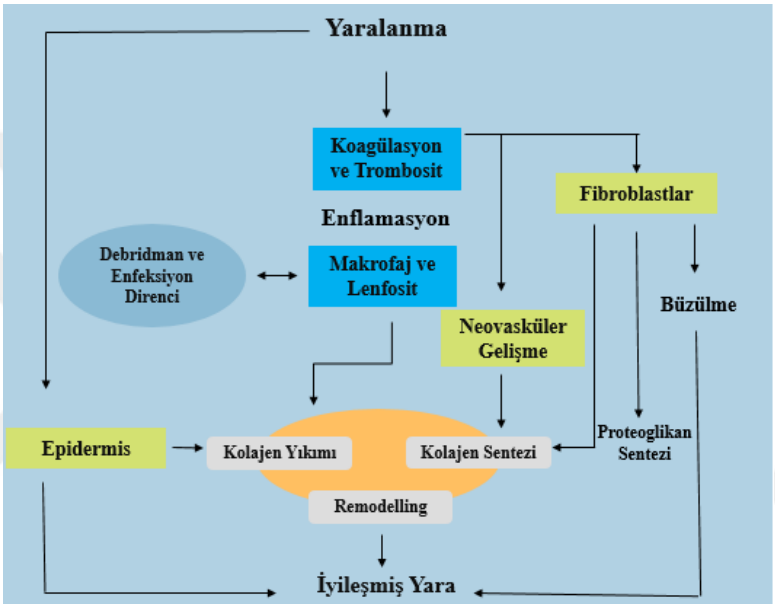
bölgesine ilk hareket eden hücrelerdir. Kan damarları trombositler aracılığı ile yaralanmaya yanıt olarak daralırlar. Trombositler bu sürece yardımcı olmak için vazokonstriktör maddeler salgılarlar, ancak asıl rolleri hasarlı bölgede stabil bir pıhtı oluşturmaktır. Hasarlı dokulardan sızan ADP'nin (adenosin difosfat) etkisi altında, trombositler yara bölgesinde açığa çıkan tip 1 kolajene tutunarak bir kompleks oluşturur ve böylece aktive olurlar, trombosit agregasyonuna yol açan yapışkan glikoproteinler böylelikle salgılanmış olur. Ayrıca, trombin üretimi yoluyla intrinsik pıhtılaşma kaskadı ile etkileşen ve uyaran faktörleri salgılarlar ve bu da fibrinojenden fibrin oluşumunu başlatır. Fibrin ağ, trombosit agregasının daha stabil bir hemostatik tıkaç olmasına olanak sağlar. Hemostaz evresinin son adımında, trombositler, sonraki iyileşme adımlarının başlatılmasındaki ilk faktörlerden biri olarak kabul edilen trombosit türevli büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerini de salgılar. Bu büyüme faktörleri nötrofillerin ve monositlerin yara bölgesine göç etmesini sağlayarak enflamasyon evresinin başlamasını sağlar. Nötrofiller yarayı mikroorganizmalara karşı korumaktan sorumludur. Makrofajlar ise yarada anjiyogenezi sağlamaktan sorumlu birincil immün sistem yapıtaşlarıdır. Büyüme faktörleri aynı zamanda epitel hücrelerini uyarmaktan ve fibroblastların diğer süreçlerde yenilenmesini sağlamaktan da sorumludurlar [15].

2.1.2. Enflamasyon

Enflamasyon aşaması, yaralanmadan sonraki 24 saat içinde gerçekleşir ve yaklaşık 4 gün boyunca sürer. Hemostaz tam anlamıyla sağlandıktan sonra hemostaz evresinden kalan çeşitli kemoatraktanlar enflamatuar hücrelerin yara bölgesine göç ederek yarayı bakteri, mantar gibi mikroorganizmalardan ve yabancı materyallerden korumak amacıyla yara iyileşme sürecinin ikinci aşamasını başlatır. Bu aşamada yara bölgesine ulaşan nötrofiller (polimorfonükleositler) yara bölgesindeki debrisi temizlerler. Bu sürecin klinik belirtileri olarak yarada ödem toplama, şişme, ısı artışı, yangı yani “rubor et tumor cum calore et dolore” gözlemlenebilir [16]. Enflamatuar yanıt, kan damarlarının sızmasına ve aynı zamanda plazma ve nötrofillerin çevresinde bulunan dokuya salınmasına sebep olur. Nötrofiller fagositoz debrisi mikroorganizmalar ile enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bu hücreler bakterileri ve debrisi sindirirken, nötrofiller

ölür ve çevre matrisine dokuları daha fazla sindirmeyi sağlayan hücre içi enzimlerini bırakır. Fibrin de bu temizliğin bir parçası olarak parçalandığından, bozunma ürünleri fibroblastlar ve epitel hücreleri gibi hücrelerin bu bölgeye göç etmesini sağlar. Aynı zamanda, enflamasyon aşaması koordineli hücre-hücre iletişimi ve hücre aktivitesi gerektirmektedir. Hücreler, sitokinler ve büyüme faktörleri olarak adlandırılan çeşitli çözünür proteinler aracılığıyla iletişim kurar. Bu sitokinler ve büyüme faktörleri yalnızca bir hücre tarafından salınır ve bir hedef hücre üzerindeki bir reseptöre bağlanır. Spesifik olarak bir sitokin bir hedef hücreye bağlandığında hücrenin göçünü uyarmaktadır. Büyüme faktörleri ise, hedef hücreyi, daha fazla hücre bölünmesi veya hücre dışı matrisi oluşturmak için gerekli olan kolajen gibi proteinlerin sentezleyip salgılaması için uyarır [17]. Hücre dışı matris ayrıca integrin adı verilen reseptörler aracılığıyla hücrelerle etkileşerek yara iyileşmesinde aktif bir rol oynar ve trombosit aktivasyonu, epitel hücre göçü ve fibroblast hareketine yol açar. Dolaşımdaki monositler, kan damarlarından çıktıktan ve hücre dışı matrisle temasından sonra makrofajlara farklılaşır. Makrofajlar bakterileri fagosite ederek ikinci bir savunma hattı oluşturur. Makrofajlar ayrıca yara bölgesindeki nekrotik dokuyu parçalanması için hücre dışı enzimler salgılar. Bu enzimler, matris metaloproteazlar (MMP) olarak adlandırılır. MMP'lerin aktive olması ve fonksiyonel bir form kazanabilmeleri için kalsiyum ve çinko gibi kofaktörlere ihtiyaç duyar. Yaklaşık 20 farklı MMP tipi, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) ve interlökin-1 ve 6 (IL-1, IL-6) gibi enflamatuar sitokinlerin etkisi altında nötrofiller, makrofajlar, epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi pek çok hücre tarafından salgılanmaktadır [17, 18]. MMP'ler, hücre dışı matrisin tüm bileşenleri üzerinde etki gösterir ve ölü dokunun yara bölgesinden uzaklaştırılmasından, hasarlı dokunun onarılmasından ve yeniden şekillenmesinden sorumludur. MMP'ler, hücreler tarafından lokal olarak salınan ve MMP'leri geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak inaktive eden metaloproteazların (TIMP'ler) doku inhibitörleri ile dengelenir. Kontrolsüz MMP'ler yeni oluşan dokuyu bozabilir veya büyüme faktörlerini yok edebilir. Makrofajlar çeşitli sitokinler ve fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) ve IL-1 gibi büyüme faktörleri salgılayarak yara iyileşme sürecinin bir sonraki aşamaya geçmesini tetiklemektedir [16]. Enflamasyon evresi vücudun travmaya

karşı bir yanıtı ve aynı zamanda yara iyileşme sürecinde var olması gereken bir aşamadır. Bununla birlikte artan bakteri ve mantar miktarına bağlı olarak yaranın mikroorganizmalar tarafından istila edilmesi ve azalan konakçı direnci ile enflamasyon sürecinde enfeksiyon da görülebilmektedir. Enflamasyonun klinik indikasyonlarına ek olarak enfeksiyon sırasında iltihaplanma (iris) oluşumu gözlemlenmektedir [4]. Yara iyileşme aşamalarında gerçekleşen temel olayların şematik gösterimi Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. 3 Yara iyileşme aşamalarının şematik gösterimi. Enflamasyon aşaması (mavi), proliferasyon aşaması (yeşil), yeniden yapılanma aşaması (turuncu) ile gösterilmiştir

2.1.2.1. Enfeksiyon

Enflamasyon sürecinde immün sistemin yeterli çalışmaması ve yüksek miktarda miroorganizma istilasından dolayı enflamasyon aşaması tam olarak gerçekleşmemekte ve enfeksiyona bağlı iltihaplanma oluşmaktadır. Enfeksiyon iltihaplanma ile karakterize olan ve istenmeyen bir durumken; enflamasyon ise yara iyileşme sürecinin olağan bir aşamasıdır. Enfeksiyon ve enflamasyonun farkları Tablo 2.1'de verilmektedir. Uzun süreli enflamasyon veya enfeksiyon ile nem ve yara sıvısının zararlı bileşimi, dengesiz iyileşmeye sebep olmaktadır. Bu durumun

sonucunda ise, kronik yaralar genellikle yara bölgesinde kangren ve nekroz (debris) ile kendini belli etmektedir. Yüksek bir proteolitik aktivite seviyesine bağlı olarak nötrofillerin yara bölgesinde kalıcı olarak sızması ve orantısız oksidan/antioksidan seviyeleri yarayı iyileştirmekten ziyade yara çevresinde bulunan sağlıklı dokuya zarar vermektedir. Etkili debridman sağlayabilmek için ise yara bölgesine dışarıdan bir müdahaleye gerek görülmektedir. Ek olarak, yara örtü malzemeleri, enflamatuar ve yara iyileşme süreçlerini etkileyerek optimal bir yara yatağı hazırlığı oluşturabilir [20, 21]

Tablo 2. 1 Enflamasyon ile enfeksiyon arasındaki temel farklar [16]

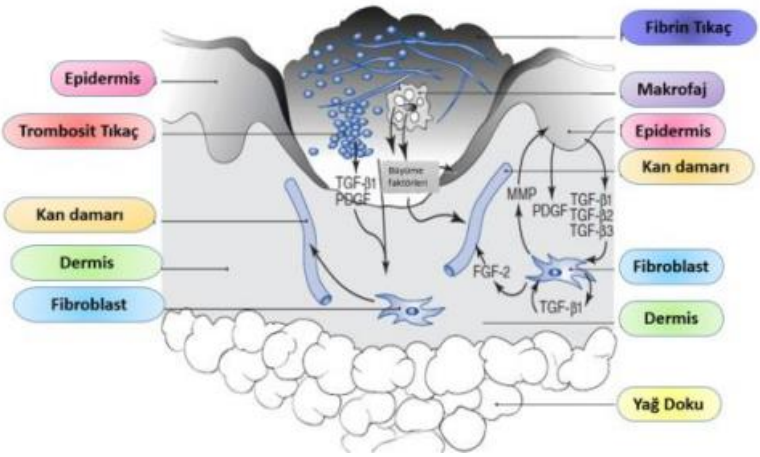
Enflamasyon	**Faktör**	**Enfeksiyon**
Sabit, başlangıçta görülür	Ağrı	Lezyonlarla artar
Çoklu bölgelerde ve simetrik	Lokasyon	Tek bölgede ve asimetrik
Belirgin bir purpura Fokal nekroz Çevlenmiş sınırlar	Morfoloji	Klasik veya ince iltihaplanma belirtileri
Bölgesel	Kızarıklık	İleri düzeyde
Normal ya da ılık	Deri sıcaklığı	Ilık ya da sıcak

2.1.3. Proliferasyon

Yara iyileşmesinin üçüncü adımında epitelizasyon, neovaskülarizasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve kolajen birikimi gerçekleşmektedir. Epitelizasyon yaranın onarımı sırasında ilk meydana gelen aşamadır. Yara bölgesinde bulunan temel zar bozulmaya uğramamışsa, epitel hücreleri düzenli bi şekilde yukarı doğru göç ederek düzenli bir yara epitel tabaka oluşumunu tetikler. Öncül epitel hücreleri yaranın altında bulunan cilt uzantılarında bozulmadan kalır ve normal epidermis katmanları 2 ila 3 gün içinde restore edilir. Ancak temel zar tahribata uğramışsa, cilt kenarında bulunan epitel hücreleri çoğalmaya ve koruyucu bir bariyeri yeniden oluşturmak için çıkıntı oluşturmaya başlarlar [21]. TNF-α ile uyarılan anjiyogenez, endotel hücre göçü ve kılcal oluşum ile karakterize olur.

Neovaskülarizasyon olarak adlandırılan kılcal damarların yara bölgesinde oluşumu, uygun yara iyileşmesi için hayati önem taşımaktadır. Granülasyon fazı ve doku kaplanması, kılcal damarlar tarafından sağlanan besin maddelerine ihtiyaç duyar ve bu durumun gerçekleşmemesi durumunda kronik olarak iyileşmemiş bir yara meydana gelir. Deri kenarında bulunan epitel hücreleri, sıvı kayıplarına ve daha fazla bakteri istilasına karşı koruyucu bir bariyer oluşturmak için çıkıntı oluşturarak çoğalmaya ve göç etmeye başlar. Epitel proliferasyonu ve kemotaksisi için uyarıcı, aktifleştirilmiş trombositler ve makrofajlar tarafından üretilen epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF-a)'dır [22]. Epitelizasyon yaralanmadan kısa bir süre sonra başlar ve önce enflamatuar sitokinler tarafından uyarılır. IL-1 ve TNF-a fibroblastlarda keratinosit büyüme faktörü (KGF) gen ekspresyonunu düzenler. Buna karşın, fibroblastlar, yara bölgesinde göç etmek, çoğalmak ve epidermiste farklılaşmak için komşu keratinositleri tetikleyen KGF-1, KGF-2 ve IL-6'yı salgılar. İnsanlar için, KGF-2'nin bu süreci yönlendirmek için en önemlisi olduğu belirtilmelidir [23]. Proliferasyon evresinde temel rol alan büyüme faktörleri Şekil 2.4'te verilmiştir.

Proliferatif fazın son kısmı granülasyon dokusu oluşumu ile başlar. Fibroblastlar, çevredeki dokulardan yara bölgesine doğru göç ederek aktive olur ve kolajeni sentezlemeye başlar ve aynı zamanda ise çoğalma gösterir. Trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF) ve EGF, trombositler ile makrofajlardan türetilen ve fibroblastların ana sinyallerini oluşturan stokinlerdir [25, 26]. Yara bölgesinde bulunan yara fibroblastları kolajeni sentezlemeye başlayarak ve yaranın kasılıp büzülmesi için miyofibroblastlara dönüşerek yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden yapılanma aşamasının başlamasını sağlar [26].



Şekil 2. 4 Yara iyileşmesinde görev alan çeşitli büyüme fakörleri [13]

2.1.4. Olgunlaşma ve Yeniden Yapılanma

Klinik olarak, olgunlaşma ve yeniden yapılanma aşaması yara iyileşmesinin en önemli adımıdır. Bu aşamanın temel prensibi, kollajenin organize ve düzgün bir şekilde örgütlenmesini sağlamaktdır. Diyet veya rahatsızlıklardan dolayı hastalar matris birikimi sıkıntılarına sahipse, yaranın iyileşme olasılığı yüksek oranda tehlikeye maruz kalır; aşırı kolajen sentezi varsa, hipertrofik skar veya keloid görülebilir. Net kollajen sentezi yaralanmadan sonra en az 4-5 hafta devam eder. Yara iyileşmesi sırasında artan kolajen sentezi oranı sadece fibroblast sayısındaki artıştan değil, aynı zamanda hücre başına kollajen üretiminde net bir artıştan kaynaklanmaktadır [28, 29]. Başlangıçta yarayı kaplayan kolajen, zarar görmemiş bir ciltte bulunan kolajenden daha ince yapıdadır ve cilde paralel yönünde yönlendirilir. Zamanla, ilk kolajen fibrilleri yeniden absorbe olur, daha kalın bir şekilde birikimi sağlanır ve gerilim hatları boyunca düzenlenir. Aynı zamanda, kollajen lif kalınlığı ve gerilme mukavemeti arasında pozitif bir korelasyon oluşur ve gerilme mukavemeti artmış yara meydana gelir. Granülasyon dokusunda bulunan kollajen, biyokimyasal olarak normal derideki kolajenden farklıdır. Granülasyon dokusu kolajeni, daha fazla hidroksillenmiş ve glikozillenmiş lizine sahiptir. Bu glikozillenme artışı, daha ince bir fiber boyutu ile karakterizedir [29]. Skardaki kollajen bir yıl olgunlaştıktan sonra dahi hiç zarar görmemiş ciltte bulunan kolajen özelliklerini gösteremez. Yara bölgesinin gerilme mukavemeti normal doku gibi

%100'e dönmez. Bir haftada yaranın toplam gücü sadece %3'e ulaşır; 3 haftada %30'a; ve 3 ayda ve sonrasında ise yaklaşık %80'e kadar ulaşır [30].

Yara iyileşme sürecinin aşamalarını ve bu aşamalarının özellikleri Tablo 2.2'de özetlenmektedir.

Tablo 2. 2 Yara iyileşmesinin 4 aşaması ve bu aşamaların özellikleri [20]

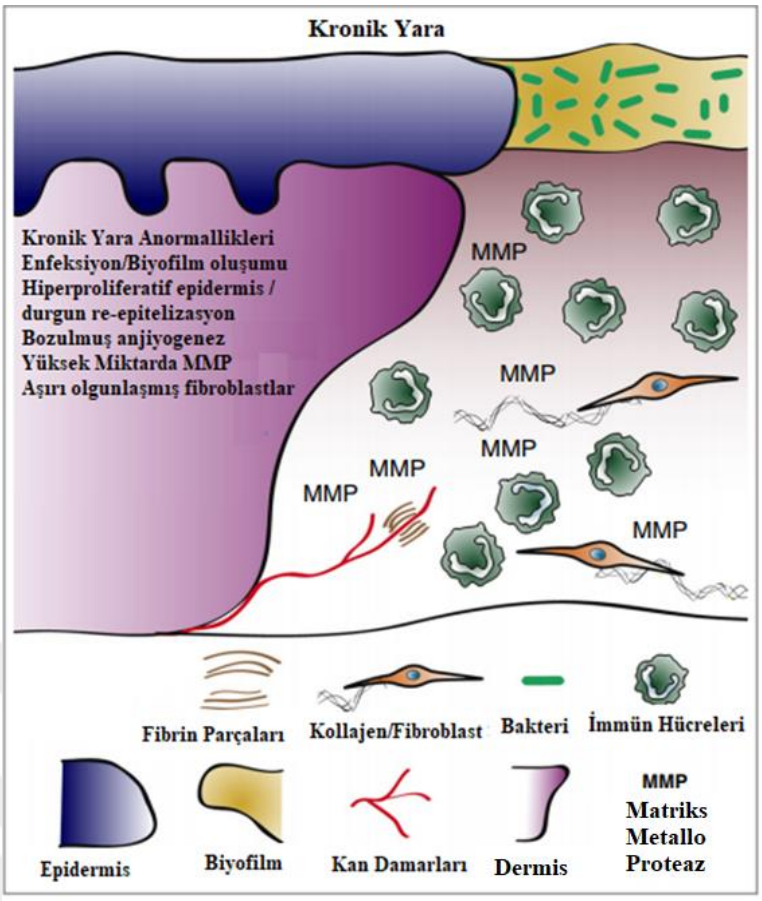
İyileşme Fazı	Yaralanma Sonrası Geçen Zaman	Fazda aktif Olan Hücreler	Fonksiyonu/Aktivitesi
Hemostaz	Saniyeler sonra	Platelet	Pıhtılaşma
Enflamasyon	1-4 Gün	Nötrofil Makrofaj	Fagositoz
Proliferasyon	4-21 Gün	Makrofaj Lenfosit Keranosit Fibroblast	Hasarlı bölgeleri doldurma Cilt fonksiyonunu yeniden kazandırma Kapanma
Olgunlaşma ve Yeniden Yapılanma	21 Gün-2 Yıl	Fibrosit	Gerilme mukavemetinin geliştirilmesi

2.2. Kronik Yaralar

İyileşmeyen yaralar olarak adlandırılan kronik yaraların iyileşmesini engelleyen birçok lokal ve sistemik faktörler bulunur. Bir yaranın iyileşmesi için yaranın dış etkenlere karşı korunması ve dokuların sürekliliğinin korunması gerekir. Kronik yaralar, hemostaz, enflamasyon, proliferasyon veya yeniden yapılanma aşamalarında bir veya daha fazla noktada normal iyileşme sürecinin sekteye uğradığı veya beklenen süreden daha fazla iyileşme süreci görülen yaralardır. Yaralanma sürecinde, fagositlerin yara bölgesine hızlı bir şekilde ulaşması ile meydana gelen bir dizi enflamatuar olay tetiklenmektedir. Fagosit infiltrasyonu ile oluşan koruyucu mekanizmalar ve aşırı infiltrasyona neden olan koşullar kalıcı bir denge oluşturarak anormal yara iyileşme sürecini tetiklemektedir. Bazı durumlarda,

yüksek lökosit infiltrasyonu sonucunda proteolitik enzimlerin, oksijensiz radikallerin ve pro-enflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınmasına ve periferik vasküler hastalık ve diyabette gözlendiği gibi kronik yaraların görülmesine neden olabilir [31]. Yara iyileşme sürecinde hayati önem taşıyan büyüme faktörleri, sitokinler, proteazlar ve hücresel ve hücre dışı elementlerin bir veya birkaçında oluşan değişiklikler iyileşme sürecinin dengesinin bozulmasına neden olabilir. Ayrıca diyabette nöropati; periferik vasküler hastalıkta iskemi duruma özgü faktörlere sahip hastalarda iyileşmeme görülebilmektedir. Genel olarak hücrelerin profilindeki ve aktivitesindeki değişiklikler, hücre dışı matrisin bileşimindeki değişiklikler, epitelizasyon sürecindeki başarısızlıklar, serbest radikallerin ve mikroorganizmaların varlığı gibi birçok etmen kronik yaraların oluşmasında etkili olan sebeplerdir [32].

Kronik yaralarda proteazlar çok yüksek miktarda üretilmesi yaranın iyileşmemesine ve kronikleşmesine neden olmaktadır. Kronik yaraların sıvısı içinde, tip-2 ve tip-9 dahil olmak üzere çeşitli tipte metaloproteazlar tanımlanmıştır fakat bu enzimler akut yaraların sıvısında bulunmamaktadır. Bu durum kronik yaralarda enzimlerin orantısız bir şekilde yara iyileşme sürecini yönettiğinin bir göstergesidir. Nötrofil elastaz gibi diğer proteazlar kronik yaralarda daha yüksek düzeyde bulunmaktadır. Ek olarak, kronik yaralarda MMP'lerin doku inhibitörlerinin aktivitesi azalmaktadır [17, 34].



Şekil 2. 5 Kronik yaraların biyolojisi [18]

Kronik yaralarda enfeksiyon sıklıkla görülen bir semptomdur ve anormal inflamatuar süreç gösterir. Granülasyon dokusu kusurludur, yüksek MMP aktivitesi ve zayıf fibroblast infiltrasyonu sebebiyle iyileşmeyi olumlu yönde etkilemez. Neoanjiyogenezin zayıf olması fibrin parçalarında mevcut damarları kısıtlar, yaranın oksijen difüzyonunu engelleyerek yarayı hipoksik bir duruma sokar [33]. Bu oluşum Şekil 2.5'te şematik olarak gösterilmektedir.

İnflamatuar yanıt, akut yaraların iyileşmesinde görülen enflamatuar cevap, kronik yaralarda önemli ölçüde farklılık gösterir. Kronik venöz ülserlerden türetilen yara sıvısı, TNF-α, IL-1β ve TGF-1β gibi pro-enflamatuar sitokinler bakımından zengin olmasına rağmen; bu sitokin seviyeleri, kronik yara iyileşmeye başladığında azalma göstererek iyileşmeyen yaralara ve artan pro-enflamatuar sitokin seviyeleri arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir [34].

Bazı durumlarda kronik yaralarda aşırı yara iyileşmesi görülmektedir. Hipertrofik yara izleri ve keloidler, fibroblastlar, kollajen, elastin ve proteoglikanlar dahil olmak üzere iyileşme sürecinin tüm bileşenlerinin aşırı sentezlenmesinden kaynaklanan aşırı iyileşme durumudur. Bu anormal durum sadece insanlara özgüdür ve beyaz ırktan olmayan kişilerde ve bu kişilerdeki yaralanma vakalarının %5-15'inde görüldüğü belirtilmektedir [35].

Hipertrofik skar dokuların insidansı oldukça yüksektir ve gerginlik çizgilerine sahip yara kesitlerinde, ciltte artan gerginlik ve hareket alanlarında, derin dermal yanıklarda ve 3 haftadan uzun süren ikincil iyileşmeye bırakılan yaralarda gözlemlenir. Ek olarak, kalıcı tahriş, hematom, enfeksiyon, yara ayrılması, yabancı cisimler gibi lokal enflamasyona neden olan faktörler yaraların hipertrofik skarlara daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır [4].

Kronik yara tipinde tedavi sıklıkla üç aydan fazla sürmekte ve genelde yara tedaviye olumlu bir yanıt vermemektedir. Bu durum hastaları hem maddi hem de psikososyal olarak olumsuz etkilemektedir. Bu bilgiler ışığında yara iyileşme süreci için maliyeti düşük, iyileşme sürecini hızlandıran ve skar doku oluşumunu azaltan yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır [13].

Genel olarak akut yara iyileşmesi, kemotaksi, hücre bölünmesi, neovaskülarizasyon, yeni hücre dışı matris sentezi ve skar dokusunun oluşumu ve yeniden modellenmesi olarak ilerleyen karmaşık bir dizi olayı kapsar [31]. Yara iyileşmesinin temel amacı; doku hasarını minimum miktarda tutmak, yeterli doku perfüzyon ve anjiyogenezi ile dokunun yeterli beslenmesini ve nemlenmesini sağlamaktır. Yarada meydana gelen nekrotik dokular yara bölgesinde kaldığında yara iyileşme sürecini uzatarak, topikal tedavinin ve sistemik antibiyotik tedavisinin yara üzerindeki etkisinin azalmasına sebep olmakta, lokal bakteriyel enfeksiyon ve sepsis için de ciddi bir risk oluşmaktadır. Bu nedenle, yara bölgesinden nekrotik dokunun, hücresel atığın ve zararlı eksüdanın uzaklaştırılması gerekmektedir [36].

Yara tedavisinin ilk basamağı, enfeksiyonu önlemek amacıyla yaranın ölü dokulardan giderilmesi ve fazla olan eksüdanın yara bölgesinden uzaklaştırılarak yaranın ihtiyacı olan nemin sağlanmasıdır. İyileşmeyen yaralar için büyüme faktörleri içeren yara örtü malzemeleri geliştirilmiştir fakat bu yara örtüleri malign

transformasyonu açısından risk taşımaktadır [13]. Bazı durumlarda nekrotik dokunun yaradan hızlıca uzaklaştırılması için çeşitli cerrahi operasyonlar uygulanmaktadır. Cerrahi insizyon yöntemi hasta için ağrılı bir yöntem olmakla birlikte aynı zamanda seçici değildir. Ek olarak, hastayı tekrarlı anestezilere ve belirgin kanama risklerine maruz bırakmaktadır [38, 39].

Son yıllarda kronik yara bakımında tıp dünyasının ana odağı, iyileşmeye yardımcı olmak ve aynı zamanda nemli bir ortam sağlayan yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi olmuştur. Yarayı tamamen kaplayan yara örtü malzemeleri, kronik yaralara sahip hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda ağrıyı azaltmaya yardımcı olması ve kullanım kolaylığı sağlaması ve daha düşük maliyetlere sahip olması açısından hastalara fayda sağlamaktadırlar [34].

2.3. Yara Örtü Malzemeleri

Yara iyileşme sürecinde iç içe geçmiş bir dizi biyokimyasal, hücresel ve dinamik süreçler söz konusudur. Yaranın iyileşmesi için gerekli olan en temel şey hücre çoğalmasının gerçekleştiği proliferasyon evresidir. Çoğalan hücreler dokuda hasarlı bölgeye göç ederek o bölgenin fonksiyonunu yeniden kazanmasını sağlar. Özellikle hücre proliferasyonunu destekleyen en iyi yara iyileştirme ürünü olarak son zamanlarda çeşitli yara örtüleri kullanılmaktadır. Bu yara örtülerinde esas olan yaranın doğru değerlendirilmesi, gereksiniminin belirlenmesi ve yaranın nemli tutulmasıdır. Aynı zamanda yaranın enfeksiyöz maddelerden korunması, fazla sızıntı oluşursa yaradan uzaklaştırılması, yara bölgesinde oksijen gibi gaz alış verişine izin verilmesi ve yara çevresinde bulunan sağlıklı dokulara zarar verilmemesi de ideal bir yara örtüsünden beklenen özellikler arasındadır. Buna bağlı olarak yara örtüsü yara yatağındaki olumsuz koşulları gidermek, canlı hücre ve dokular için uygun çevre koşullarını sağlamak için uygulanmalıdır [40, 41].

Genel olarak ideal bir yara örtüsü

- Yara iyileşmesini hızlandırmalı,
- Yara eksudasını emmeli,
- Yaraya nemli ortam sağlamalı,

- Yaranın kurumasına izin vermeksizin fazla eksüda ve toksik maddeleri ortamdan uzaklaştırmalı,
- Kokuyu önlemeli,
- Yara yüzeyinin sıcaklığını korumalı,
- Havadan yara yüzeyine mikroorganizma geçişine izin vermemeli,
- Oksijen alışverişine izin vererek hücre göçüne ve bölünmesine yardımcı olmalı,
- Hematom ya da hipertrofik skar oluşumunu önlemeli,
- Pansuman değişimi sırasında yaraya zarar vermemeli ve yara üzerine yapışmamalı,
- Uygun baskı ile ödemi azaltıp, ölü boşlukları azaltmalı,
- Yara kenarındaki ciltte travma ve doku hasarına neden olmamalı,
- Ağrıyı azaltmalı,
- Kolay bulunan, uygulanan ve pahalı olmayan bir ürün olmalıdır [40].

Yaranın durumuna ve öncelikli ihtiyacına göre en uygun yara örtüsü seçilmelidir [37, 42]. Yapılan çalışmalarda, yara iyileşmesinde belirlenen klasik anlayışın aksine, nemli bir ortamda daha hızlı gerçekleştiği belirtilmektedir. Nemli ortamda yara iyileşmesi sağlayan yara örtüleri, yara dehidrasyonunu önleyerek dokunun canlılığını ve hücrelerin çoğalma yeteneğini korur, anjiyogenezi hızlandırır ve yara iyileşmesinde aktif rolü olan büyüme faktörlerinin etkinliğini artırır. En önemli avantajları ise enfeksiyon sıklığını ve ağrıyı azaltmalarıdır [42].

Genel olarak yara örtülerinin amacı yara bölgesini kapatarak zarar görmüş bölgeyi dış etkenlerden korumak ve aynı zamanda hücre çoğalmasını destekleyerek dokunun yenilenmesini sağlamaktır. Yaralar akut, kronik, eksüdalı, kuru veya enfekte olabildiği gibi birkaç özelliği birlikte bulundurabilir ve aynı zamanda yara iyileşme sürecinde farklı aşamalara sahip olabilirler. Bundan dolayı yaraların bakımı için tek tip bir yara örtüsü en iyi seçenek olmaz. Etkili bir yara tedavisi için hem hastanın genel olarak sağlık durumu, fiziksel ve çevresel koşulları uygun bir şekilde gözetilmeli hem de kullanılacak olan yara örtüsünün fiziksel ve kimyasal özellikleri en iyi şekilde ayarlanmalıdır [43]. Yara örtüleri yara üstüne sadece bir defalığına uygulanmaz. Belirli periyodlarla uygulanması gerekmektedir. Bunun yanı

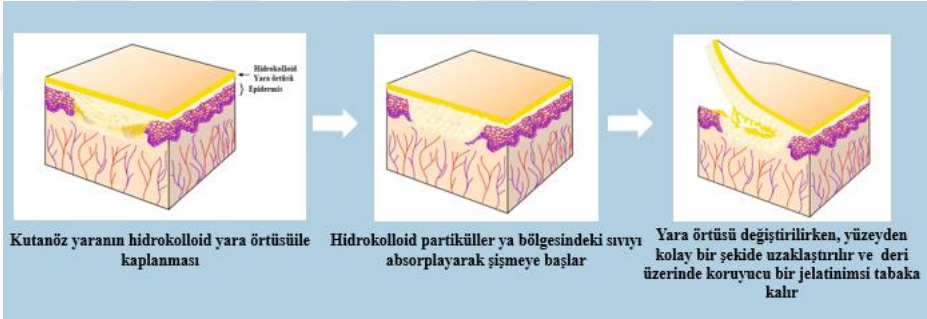
sıra, yara örtüsünde kullanılan malzemeye göre de yara örtüleri çeşitli kategorilere ayrılmıştır. Seçilen malzemeye göre yara tedavisi belirli özelliklere göre gerçekleştirilir [44]. Tablo 2.3 üretilen yara örtü malzemelerin avantajlarını ve dezavantajlarını sıralamaktadır.

Tablo 2. 3 Çeşitli yara örtü malzemelerinin avantajları ve dezavantajları [45]

Yara Örtüsü	Avantajı	Dezavantajı
Hidrokolloid	Absorbent özelliği Birkaç gün boyunca kullanılabilir Otolize yardımcı olur	Enfekte yaralar için uygun değildir Kötü bir kokusu vardır Maserasyona neden olabilir
Hidrojeller	Absorbent özellik Otolize yardımcı Sıvı aktarımı sağlar	Enfekte yaralar için uygun değildir Maserasyona neden olabilir
Köpükler	Termal yalıtımlı İyi bir absorbent Yara şeklini destekler	Nadiren iltihap oluşturabilir Yaraya yapışabilir
Aljinatlar	Yüksek derecede absorbent Bakteriostatik Hemostatik	Kullanılmadan önce ıslatmak gerekebilir
İyot Preparatları	Antiseptik Orta derecede absorbent özellik	İyot allerjisi Yara üzerinde renksizdir Tiroid ve hamilelik durumunda kullanılamaz
Gümüş İçerikli Yara Örtüleri	Antiseptik Absorbent	Pahalı

2.3.1. Hidrokolloidler

Jeli meydana getiren ajanlara ek olarak elastomer adezifler gibi çeşitli ürün bileşimine sahip ince bir tabakadan meydana gelir ve Şekil 2.6'da gösterildiği gibi yara üzerinde uygulanır. Yara eksüdası ile temasa geçtiği anda homojen olarak dağılım göstererek yara bölgesinde biriken sıvıyı çekerek zamanla jel kıvamını alır. Hidrokolloidlerde nem iletimi çok yavaş gerçekleştiğinden yara iyileşmesini olumlu yönde destekler. Bu polimerik doku iskelesi yara üstünü tamamen kaplamasından dolayı yarayı bakteri gibi dış etmenlere karşı koruyabilmektedir. Hafif veya orta eksüdalı yaralanmalar için uygundur. Travmatik yaralarda, yanıklarda ve diyabetik ayak ülserleri gibi yaralarda kullanılabilmektedir. Bu yara örtüleri anjiyogenezi destekler fakat enfeksiyonlu yaralarda kullanıldığı takdirde deriyi zayıflatabilir [47, 48]. Aynı zamanda enfeksiyöz madde içeren yaralarda tıkama etkisi oluşturduğu için ve aynı zamanda nem ortamı oluşturduğu için yarada maserasyon meydana getirme ihtimalinden dolayı sürekli olarak tercih edilmemektedir [48].



Şekil 2. 6 Hidrokolloid yara örtüsünün yara üzerine uygulanışı [49]

2.3.2. Köpükler

Köpükler esnek yapıya sahip, yumuşak ve yüksek absorplama kapasitesine sahip poliüretan veya silikon bazlı materyallerdir. Yüksek dayanıklılığa ve esnekliğe sahip poliüretan bazlı köpükler, yara ile temas halinde olan birincil veya ikincil yara örtüleri olarak kullanılabilmektedir. Hidrofilik veya hidrofobik yapılardan elde edilebilen poliüretan köpükler, farklı kapasitelerde gözeneklilik ve sıvı tutma kabiliyetine sahiplerdir. Islak bir yara yüzeyine uygulandığında yara yatağında

bulunan sıvıyı köpük absorbe edebilirken; kuru bir bölgeye uygulandığında ise yara yüzeyini nemli kalmasına olanak sağlayabilir. Bu örtüler termal izolasyon sağlayarak gaz geçişine izin verirler ve yara bölgesine yapışmadan yara bölgesinden kolaylıkla uzaklaştırılabilirler. Yara oyuğu içine konulduklarında tam uyum sağlarlar ve zamanla şişerek genişlerler. Oyuk içinde şişen köpük yara duvarlarına hafif bir basınç yaparak yara çevresindeki ödemi azaltır ve granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırırlar. Ancak, bakteriyel kontaminasyonu engellemede avantaj sağlayamazlar. Aynı zamanda kuru ve kabuklu yaralar için kullanımları uygun değildir [47, 51].

2.3.3. Aljinat Örtüler

Aljinatlar yüksek miktarda sıvı absorblama kapasitesine sahip hidrofilik jelledir. Oluşan jel lezyon üzerini kaplayarak dış etmenlere karşı korur ve termal stabilite sağlar [46]. Aljinat örtüler içeriğinde Ca^{+2} iyonları bulundurduğundan dolayı yara üzerinde farmakolojik etkiye de sahiptir. Bazı aljinat yapıları ise mast hücrelerini aktive ederek histamin salımına neden olur ve böylece yara iyileşme sürecini başlatabilir. Çinko iyonları içeren aljinatlar ise yara kanamasını engelleyebilmektedir [51]. Aljinat örtüler dondurularak ve sonrasında kurutulup poroz yapıda ve yaprak şeklinde tabakalar halinde hazırlanmaktadır. Ayrıca sızıntılı veya oyuk yaralar için uygun olan esnek fiberler olarak üretilebilmektedirler. Hidrokolloid ve aljinat örtüleri karşılaştıran bir çalışmada aljinatların yara yüzeyinde hidrokolloidlerden daha uzun süre kalabildiği gözlemlenmiştir [52]. Fiber formda olan aljinat örtüler yaraya uygulandıklarında kolayca parçalanır ve yaradan kolayca uzaklaştırılabilir. Bu sebeple yara iyileşirken oluşan granülasyon dokusuna hiç zarar vermeden değiştirilmeleri mümkün olur. Aljinatların dezavantajı olarak ise sıvı tutma kapasitesi maksimum seviyeye ulaştığı anda yara örtüsünün yaradan uzaklaştırılması gerekir. Aksi takdirde absorblayamadığı sıvılar yara kenarında bulunan diğer doku hücrelerinde maserasyona sebep olabilir. Aljinat örtüler kuru yaralara uygulanmamalıdır. Yaralar için ekstra nem dengesi sağlayamazlar [47, 54].

2.3.4. İyot Preparatları

Bu yara örtüleri genel olarak antibiyotikler ile kombine edilerek yara üzerine uygulanmaktadır. Bazı iyotlu pansumanlar yüksek oranda emici özellik göstermektedir ve bu nedenle orta derecede yaralanmalarda cilt soyulmasını önlemede fayda sağlar. Fazla kanıt olmamasına rağmen, bazı çalışmalarda, iyot preparatlarının, özellikle enfekte diyabetik ayak ülserleri için uygun yara örtüleri oldukları gösterilmiştir [54].

2.3.5. Gümüş İçerikli Örtüler

Akut ve kronik yaralar için kullanımı uygun olan gümüş içerikli yara örtüleri genel olarak gümüş nitrat veya gümüş sülfadiazin içeriklidir. Gümüş nitrat konak hücreler üzerinde sitotoksik bir etki oluşturarak hipergranulasyon tedavisinde kullanılmasına rağmen uygulama süreci kolay geçmemektedir. Antimikrobiyal etkilerine sahip olan gümüş sülfadiazin, yanıklarda ve kronik yaralarda kullanılır ve aynı zamanda uygulaması basittir. Elemental gümüş ile kaplı yara örtüleri, bakterileri öldürmede gümüş sülfadiazin veya gümüş nitrattan daha etkilidir [55].

2.3.6. Hidrojeller

Hidrojeller, sulu çözeltilerde çözünmeyen fakat büyük miktarda su veya biyolojik sıvıyı emebilecek kapasiteye sahip polimerik ağ yapılardır. Aynı zamanda uygulamalara bağlı olarak, hidrofilik ve amfifilik yapıda mikro ve nanopartiküller, kaplamalar veya membranlar gibi çeşitli fiziksel formlarda elde edilebilmektedir. Yüksek biyouyumlulukları ve yükleme kapasiteleri, çevresel faktörlere (pH, sıcaklık, ortamdaki iyon konsantrasyonu) duyarlılığı nedeniyle, hidrojeller ilaç taşıma sistemleri, yara örtüleri gibi birçok alanda kullanılabilmektedir (Şekil 2.7) [56].

Polimerik ağların birbirine dolaşması, iyonik bağ, Hidrojen bağı veya hidrofobik kuvvetler gibi ikincil bağların etkisi ile geri dönüşümlü olarak fiziksel jeller oluşturulabilir [57]. Fakat fiziksel hidrojeller ağların birbirine dolaşarak agrega olması veya hidrofobik/iyonik etkilerle birbirine tutunan kümelerden dolayı homojen bir dağılım gösteremezler [58].

Polimer zincirlerinin çapraz bağlayıcılar kullanılarak kovalent bağlarla birbirlerine düzenli veya rastgele bağlanmaları sonucu oluşturdukları hidrojeller “kimyasal” ya

da “kalıcı” hidrojeller olarak tanımlanır. Kimyasal hidrojeller de fiziksel hidrojeller gibi homojen olmayan bir yapı gösterirler. "Kümeler" olarak adlandırılan hidrojel yapısındaki homojen olmayan kısımlar, genel olarak yüksek şişme kapasitesi ve düşük çapraz bağ yoğunluğu bölgelerine dağılmış, düşük şişme kapasitesi ve yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip bölgeler olabilirler. Bunun nedeni, çapraz bağlama maddelerinin hidrofobik agregasyonundan kaynaklanabilir [59].

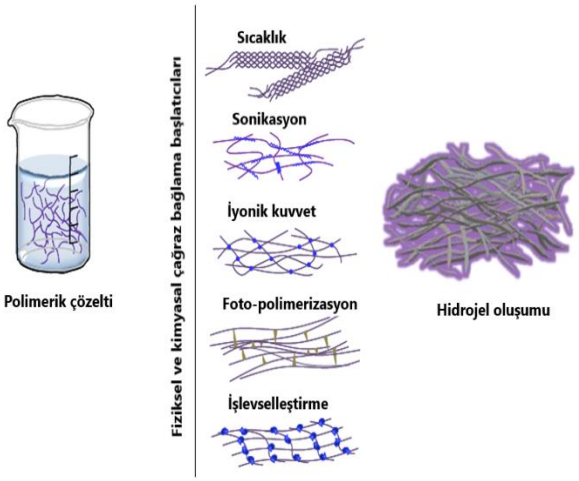
Hidrojelin içinde bulunduğu sıvının karakteri ve içerdiği besin maddeleri ile hücresel ürünler hidrojelin toplam geçirgenliğini belirleyen önemli faktörlerden birkaçıdır [60]. Bir hidrojelin sıvı emme mekanizması genel olarak şu şekilde açıklanabilir:

Kuru bir hidrojel sıvıyı absorbe etmeye başladığında, hidrojel ağına ilk giren su molekülleri en polar ve hidrofilik grupları hidratlayarak ‘birincil bağlı su’ oluşumuna yol açar. Polar gruplar hidratlandıkça, ağ yapısı şişmeye ve hidrofobik gruplar da su molekülleri ile etkileşime girerek "ikincil bağlı su" oluşumuna yol açar. Birincil ve ikincil bağlı suyun tamamına "toplam bağlı su" adı verilir. Polar ve hidrofobik bölgeler su molekülleri ile etkileşime girip ve bağlandıktan sonra, ozmotik basınç ağ yapısının ilave su absorbe etmesine yol açar. Bu ek şişmeye, hidrojel yapısındaki kovalent veya fiziksel bağlar elastik bir geri çekme kuvvetiyle karşı çıkar. Böylece, hidrojel denge şişme seviyesine ulaşır. İyonik, polar ve hidrofobik grupların bağlı suyla doygun hale gelmesinden sonra emilen ilave şişme suya 'serbest sıvı' veya 'bulk sıvı' denir ve ağ zincirlerin arasını doldurduğu varsayılır. Polimerik ağ şiştikçe, ağ zincirleri veya çapraz bağlar degrade olabilirse, jel, içeriğine bağlı olarak belli bir orana kadar parçalanmaya ve çözünmeye başlar [61].

Hidrojellerin uygulama alanlarına;

- Yumuşak kontakt lensler gibi katı kalıplanmış formlar,
- Oral yolla alınan haplar veya kapsüller için preslenmiş toz matrisler,
- Biyo-adhezif taşıyıcı veya yara tedavisinde kullanılan mikropartiküller,
- İmplantlar veya kateterler üzerinde, haplar veya kapsüller üzerinde kaplama malzemeleri,
- Transdermal ilaç taşıma sistemlerinde membranlar veya tabakalar,

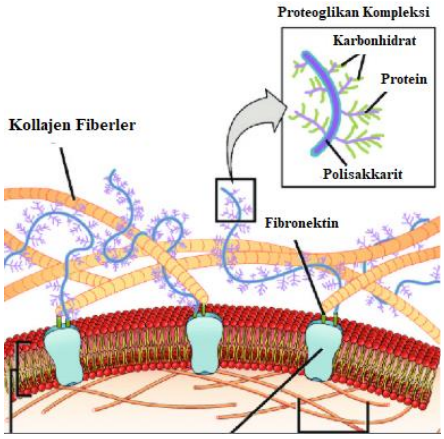
- Yara örtü malzemeleri ve doku iskeleleri,
- Ozmotik pompalarda kapsüllenmiş katılar gibi birçok örnek verilebilmektedir [61].



Şekil 2. 7 Farklı çapraz bağlanma yöntemleri ile hidrojel oluşum şeması [62]

Hidrojellerin doku iskelesi veya yara örtü malzemesi olarak kullanım amaçlarından birisi hücre dışı matris görevi görmeleridir. Bu amaçla kullanılan hidrojeller tek başlarına kullanıldıkları gibi etkinliklerini arttırmak üzere yapılarına büyüme faktörleri, hücreler veya enzimler gibi birçok biyomalzeme eklenerek kullanılabilirler [63].

Hücre dışı matris (ECM) temel olarak hücrelere fiziksel destek sağlayan ve dokuların sınırlarını belirleyen mukozal bir hücre dışı materyaldir. ECM üç boyutlu şekilde ve hücresiz olarak bulunan bir makromolekül ağıdır. Önemli özelliklerinden biri hücrelere destek ortamını sağlamak ve hücrenin farklılaşması, morfolojisi, proliferasyonu, göçü gibi fonksiyonların gerçekleşmesi için gerekli bir ortam sağlamasıdır. Hücre dışı matrisin ana bileşenleri Şekil 2.8'de görüldüğü üzere proteoglikan, glikozaminoglikan ve kolajendir [64].



Şekil 2. 8 Hücre dışı matris yapısı [64]

Yapısal olarak doğal hücre dışı matrise benzeyen hidrojeller, vasküler ağların üç boyutlu yapısı için uygun ortam sağlayacak tasarıma sahiptir. Hidrojel esaslı doku iskelelerine ait birçok çalışma, yara iyileşme uygulamalarına odaklanmıştır [61].

İdeal bir hidrojel yara örtüsü;

- Yara bölgesine oksijen gibi gazların ve su buharının giriş çıkışına olanak sağlamalıdır.
- Yara bölgesine nemli ortam sağlayarak ilgili bölgenin kurumasını engellemelidir. Kurumuş yara bölgesi canlılığını kaybederek, nekroz doku oluşumuna yol açar ve nekrotik dokuda bakteri üremesi gerçekleşerek yara enfekte olur.
- Yüksek sıvı emme kapasitesine sahip olmalıdır. Böylece yara yüzeyinde, boşluklarında ve doku aralarında bakteri üremesine olanak sağlayan besleyici sıvıların birikmesi önlenir. Aynı zamanda enfekte yarada, bakteri ürünü olan toksinleri yaradan uzaklaştırır.
- Isı kaybını engellemelidir. Optimum iyileşme sıcaklığı 37-39°C arasında gerçekleşir. Düşük sıcaklıklarda hücre proliferasyonu durur, damarlarda vazokontsrüksiyon gelişir, lokal direnç bozulur, bakteri faaliyeti artar ve son olarak enfeksiyon hızlanır.
- Lökositleri yara yüzeyine yakın şekilde konumlanmasını sağlamalıdır. Çünkü lökositler bakterilerle etkileşim halindedirler.
- Ölü dokuların yara bölgesinden uzaklaşmasını (debridmanı) hızlandırır.

- Yara bölgesinden uzaklaştırılırken ilgili doku ve hücrelere zarar vermemelidir [40].

Hidrojeller yüksek bir absorbent özelliğine sahiptir ve aynı zamanda yara üzerine yapışma göstermediğinden yara bölgesinde tahribata neden olmaz. Aynı zamanda yara yatağında ağırlık oluşturmaz ve içerisindeki su formu sayesinde yara üzerinde nem dengesi sağlar. Ancak hidrojeller, protein ve hücre gibi biyolojik bileşenleri zayıf absorbe etme eğilimi gösterdiğinden bakterilere karşı yetersiz bariyer oluşturur ve yara bölgesinde nekrotik dokuyu tam anlamıyla hapsedemez. Bunun için hidrojele destek sağlayacak ikinci bir örtüye ya da bakteriler direncini azaltacak enzim gibi çeşitli biyolojik materyallere ihtiyaç duyulur [37, 47].

Hem doğal hem sentetik polimerler hidrojel formuna getirilip bir çok biyomedikal uygulamada kullanılabilmektedir [61].

2.3.6.1. Dekstran Esaslı Hidrojeller

Doğal polimerler, doğada yaygın olarak bulunan ya da bitkilerden veya hayvanlardan elde edilen polimerlerdir. ECM yapısına benzer biyokimyasal özellikler sergileyen bu polimerler biyouyumlu olmaları sayesinde vücut tarafından kolayca kabul edilir ve biyobozunur olmalarından dolayı ise vücutta enzimatik veya hidrolitik degradasyona uğrarlar. Doğal polimerler, polisakkaritler (karbohidratlar) ve hayvandan elde edilen proteinlerden elde edilebilir [65].

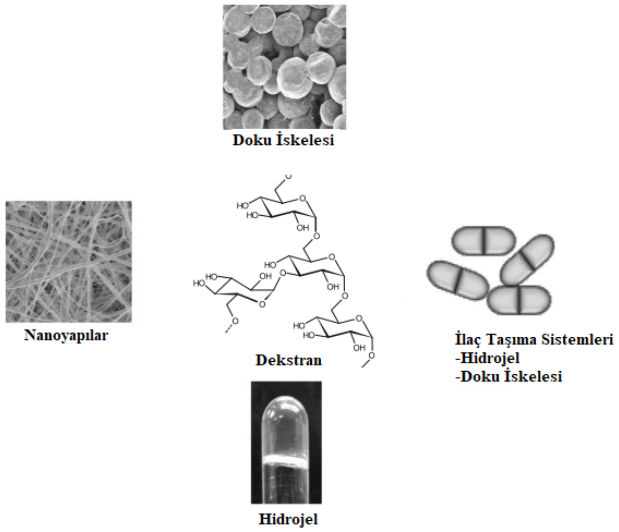
Polisakkaritler, yüksek biyouyumluluk ve biyoaktiviteleri sebebi ile çeşitli ilaç taşıma sistemlerinde ve doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilen bir biyopolimer sınıfıdır. Polisakkaritler genel olarak bitkiler, hayvanlar ve bakteri, mantar gibi mikroorganizmalardan izole edilerek ve saflaştırılarak elde edilir. Bu polimerler, ECM bileşenlerine benzer yapısal, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olmaları ve genellikle konakta yüksek biyouyumluluk göstererek toksik etki oluşturmamalarından dolayı klinik çalışmalarda tercih edilmektedir [66].

Polisakkarit zinciri oluşturmak için monosakkaritler arası O-glikosidik bağlar kurularak karbohidrat zincirleri meydana gelir. Zincire, bileşimine ve kaynağına bağlı olarak polisakkaritleri oluşturan monosakkaritler, bağlanma tipi/modeli, zincir şekli ve moleküler ağırlığı, çözünürlüğü, viskozitesi, jelleşme potansiyeli ve

yüzey ve ara yüzey özellikleri gibi birçok farklı fizikokimyasal özellikler sunar. Çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılan polisakkaritlere, dekstran, selüloz, kitosan, nişasta, aljinat vb. örnek olarak verilebilir [67]. Doğal polimerler biyouyumlu ve biyobozunur olmalarına rağmen; kaynağa, mikrobiyal kontaminasyona, kontrolsüz su alımına, yetersiz mekanik kuvvete ve beklenmedik degradasyon durumu gibi çeşitli dezavantajlara da sahiptir. Bu dezavantajlar biyopolimerlerin biyomedikal alanda kullanımlarını kısmen sınırlandırmaktadır.

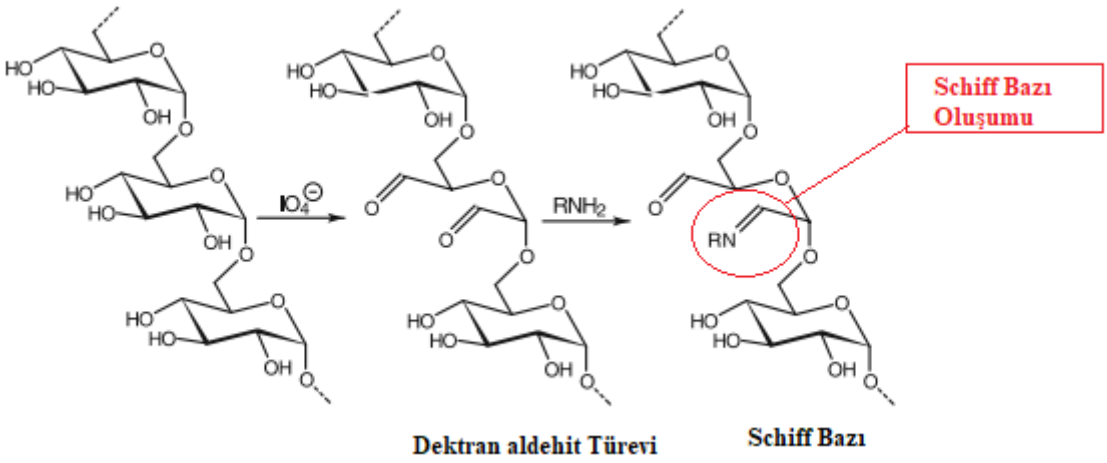
Doğal bir polimer olan dekstran bakteriyel suşlarda sentezlenen ve ilgili suşlardan izole edildikten sonra tıbbi ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilen bir polisakkarittir. Monomeri D-glikozdan oluşan ve α-(1-6) glikopiranoz bağları içeren, nötral bir polisakkarittir. Dekstrandaki α-(1-6) glikopiranoz bağları, toplam glikozidik bağların % 50-97'sini oluşturmaktadır [68]. Dallanma birimlerinin derecesi ise dekstran üreten bakteri suşuna bağlıdır. Farklı bakteri suşları kullanılarak elde edilen dekstran esas olarak sükrozdan sentezlenebilir [11].

Düşük toksisitesi ve suda yüksek çözünürlüğü nedeniyle dekstran, klinik çalışmalarda tercih edilen biyopolimerlerdir (Şekil 2.9). Dekstranın yüksek miktarda α-(1-6) glikozidik bağa sahip olması, insan kan dolaşımındaki biyolojik stabilitesini sağlayan önemli bir özelliktir. Klinik uygulamalarda dekstran, antitrombotik etki göstermekte, derin ven trombozu ile postoperatif pulmoner emboli için profilaktik bir tedavi sağlamaktadır [69].



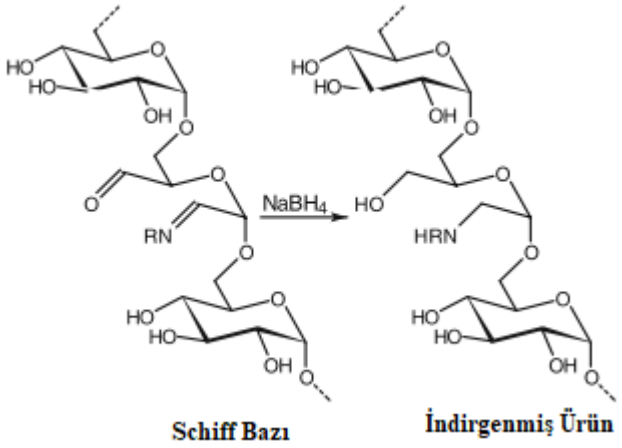
Şekil 2. 9 Dekstranın biyomedikal uygulamaları [70]

Enzimler, proteinler ve hormonlar gibi biyoaktif moleküller kullanılarak dekstran konjugatlarının hazırlanması veya floresan boyalarla modifiye edilmiş dekstranlar ile ilgili olarak son otuz yılda yüksek miktarda yayın bulunmaktadır. Kovalent bağlanma için bir dizi farklı yol bilinmektedir. Bu yollardan biri, dekstranın $NaIO_4$ gibi çeşitli yükseltgeyici kimyasallar ile yükseltgenerek aldehit gruplarının oluşturulması ve daha sonra aldehit gruplarının amin grupları ile etkileşime girerek Schiff Bazı oluşturmasıdır (Şekil 2.10) [69, 70].



Şekil 2. 10 Dektranın $NaIO_4$ ile oksidasyonu ve biyoaktif moleküllerin terminal NH_2 grupları üzerinden dekstranın aldehit gruplarıyla Schiff bazı oluşturması [70]

Protein ve enzimler gibi terminal NH_2 uç grubuna sahip biyoaktif moleküllerin konjuge edilmesi için kullanılan en etkili yöntemlerden bir tanesi Schiff bazıdır. Reaktif aldehid grupları elde edebilmek için ilk aşamada dekstran omurgasını çeşitli yükseltgeyici kimyasallar ile oksitlemek gerekmektedir. Biyoaktif molekülün amin grubu ile yükseltgenmiş dekstran arasında meydana gelen Schiff bazı ile polimer protein konjugatları oluşturulabilmektedir. Aldehit gruplarının toksik özellik göstermesinden dolayı ve daha stabil bir konjugat elde etmek amacıyla Schiff bazı oluşumundan sonra genellikle indirgeyici bir kimyasal kullanılarak indirgeme işlemi uygulanır (Şekil 2.11). Bu işlem sırasında enzim veya protein gibi biyoaktif moleküllerin aktivitesinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmez [72].



Şekil 2. 11 Dekstranın Schiff bazı türevinin $NaBH_4$ yoluyla indirgenmesi [70]

Schiff bazı oluşumu esas alınarak dekstran temelli birçok hidrojel üretim çalışması bulunmaktadır. Liu ve ark [73] etilendiamin modifiye edilmiş jelatin ile yükseltenmiş nişasta ya da dekstran ile Schiff bazı ile çapraz bağlayarak hidrojel üretebilmiştir. Jalalvandi ve ark [74] enjekte edilebilir bir hidrojel esaslı ilaç taşıma sistemi geliştirmek amacı ile yükseltgenmiş dekstran ve poliaspartamid arasında Schiff bazı oluşumunu kullanmışlardır. Su ve arkadaşları [75] ters mikroemülsiyon yöntemi ile yükseltgenmiş dekstran ve etilendiamin kullanarak mikrojel sentezlemişlerdir. Schiff bazı gruplarının hidrolizle kolayca bozunabilmeleri nedeniyle farklı pH değerlerinde kontrollü ilaç salımı gerçekleştirmişlerdir.

2.4. Enzim

Enzim, canlılarda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapılı biyolojik moleküllerdir. Enzim katalizli reaksiyonların reaktanları substrat olarak adlandırılır. Her enzim, spesifik bir ürünü üretmek için spesifik bir substrat üzerinde etki gösterir ve enzimlerin adları genellikle ilgili substratı belirtir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği, EC numaraları olarak adlandırılan, enzimler için bir adlandırma sistemi geliştirmiştir ve her enzime, noktalarla ayrılmış dört elementten oluşan bir kod numarası atanmıştır. Katalizlenen toplam reaksiyon temelinde, enzimler altı ana sınıfa ayrılır [76]. Bunlar genel olarak;

- **EC 1: Oksidoredüktazlar**: Yükseltgenme/indirgenme (redoks) tepkimelerini katalizler.
- **EC 2: Transferazlar:** Metil veya fosfat grubu gibi fonksiyonel grupların transferini katalizler.
- **EC 3: Hidrolazlar:** Hidrolitik reaksiyonlarda çeşitli bağların hidrolizini katalizler.
- **EC 4: Liyazlar:** Hidroliz ve yükseltgenme harici yollar ile çeşitli bağları kopmasını katalizler.
- **EC 5: İzomerazlar:** Tekli bir molekülde izomerizasyon değişikliklerini katalizler
- **EC 6**: **Ligazlar:** ATP gibi çeşitli fosfatları kullanarak iki molekül arasında kovalent bağ gibi yeni bağların oluşumunu katalizler [77].

Hidrolaz sınıfına ait olan proteazlar, proteinlerde bulunan peptid bağlarının hidroliz reaksiyonu ile yıkımını katalizleyen bir enzim grubudur. Bu enzimlere proteolitik enzimler veya proteazlar da denilmektedir. Doğada her yerde bulunan bu enzim grubu hem fizyolojik hem de endüstiryel alanlardaki uygulamaları açısından büyük bir öneme sahiptir [78].

Çeşitli birçok proteaz, tüm bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda sentezlenmektedir. Daha gelişmiş organizmalarda gen kodlarının yaklaşık %2'si bu enzimlerin sentezinden sorumludur. Protezlar, proteinli gıdaları parçalayıp küçük

peptitlere ve amino asitlere yıkarak vücudun ihtiyaç duyduğu molekülleri serbest bırakırlar. Bu şekilde hücresel protein döngüsüne katılırlar [79].

Proteazlar metabolizmanın düzenlenmesi, enzim modifikasyonu, kompleman sistemi, apoptoz yolakları gibi önemli biyolojik süreçleri katalizlerler. Bu enzimler çeşitli tıbbi terapilerde, laboratuvar, klinik ve endüstriyel proseslerde kullanımlarından dolayı büyük bir öneme sahiptir. Proteazlar, endüstriyel enzimlerin en büyük üç grubundan birini temsil eder. Proteazların geniş çeşitliliğe sahip olması, fizyolojik ve biyoteknolojik uygulamalarında kullanılması açısından dünya çapında dikkat çekmektedir [80].

Proteazlar üretildikleri kaynaklara ve etki ettikleri protein bölgesine göre sınıflandırılabilirler.

2.4.1. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Proteazlar

2.4.1.1. Mikroorganizma Kaynaklı Proteazlar

Geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyona yatkınlıklarından dolayı mikroorganizmalar güçlü bir enzim kaynağı olarak kabul edilirler. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar çeşitli bakteri, mantar ve virüslerden elde edilebilmektedir. Bakterilerden elde edilen çoğu ticari proteaz, nötr ve alkalin, *Bacillus* cinsine ait bakteri cinsi tarafından üretilir. Mantarlar ise, bakterilerden daha geniş bir enzim çeşitliliğine sahiptir ve mantar kaynaklı enzimler katı hal fermantasyon işlemi ile uygun şekilde üretilebilir. Son olarak viral proteazlar, Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu (AIDS) ve kanser gibi bazı ölümcül hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin sentezlenmesine katılımları nedeniyle büyük bir önem arz etmektedir. Serin, aspartik ve sistein peptidazlar çeşitli virüslerde bulunan proteazlardır [81].

2.4.1.2. Hayvan Kaynaklı Proteazlar

Hayvan hücreleri tarafından üretilen proteazlar, deselülerizasyon işlemine tabi tutulması sonucu saflaştırılarak elde edilir. Hayvansal kökenli en çok bilinen proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir. Tripsin, gıda proteinlerinin hidroliz ederek parçalanmasından sorumlu ana bağırsak sindirim

enzimidir. Serin proteaz ailesine aittir ve karboksil gruplarının lizin ve arginin kalıntıları ile katkıda bulunduğu peptit bağlarını hidrolize eder [82].

2.4.1.3. Bitki Kaynaklı Proteazlar

Bitki hücrelerinde üretilen proteazlar, çeşitli ekstraksiyon işlemleri ile saflaştırılarak elde edilir. Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımında, toprak yapısı ve iklim koşulları bitkilerin büyümesine ve buna bağlı olarak proteaz verimliliğine etki edebilir. Örneğin; Batı ve Orta Afrika veya Hindistan'ın subtropikal bölgelerinde yetişen Carica papaya meyve özütünden elde edilen papain çok kullanılan bir bitki proteazıdır. Bu enzim klinik çalışmalarda sindirim sürecine katkı sağlar ve aynı zamanda vücuttaki ödem, iltihap ve yaraların iyileşmesine de yardımcı olur [83]. Diğer bir bitki kaynaklı enzim olan bromelain ise, ananasın sapından ve suyundan elde edilen bir sistein proteazıdır ve pH 5 ile 9 arasında aktiftir. Bromelain inaktivasyon sıcaklığı papaininkinden daha düşüktür ve 70 °C'dir [84].

2.4.2. Etki Bölgelerine Göre Proteazlar

Proteazlar, etki bölgelerine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak iki ana başlıkta incelenirler [79].

2.4.2.1. Ekzopeptidazlar

Proteinin yalnızca amin veya karboksil terminalindeki yakın polipeptit zincirlerinin uçlarına etki ederler ve aminopeptidaz ile karboksipeptidaz olarak sınıflandırılırlar [78, 84].

Aminopeptidazlar

Polipeptit zincirinin serbest N terminaline etki ederek bir amino asit, bir dipeptit veya bir tripeptit kalıntısını serbest bırakır. Aminopeptidazlar, bakteri ve mantarlar dahil olmak üzere çok çeşitli mikrobiyal türlerde bulunan intrasellüler bir eksopeptidaz çeşitidir [86].

Karboksipeptidazlar

Polipeptit zincirinin C terminallerinde etki ederek tek bir amino asit veya bir dipeptid kalıntısını serbest bırakır. Enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarının yapısına bağlı olarak üç ana gruba ayrılır [81].

2.4.2.2. Endopeptidazlar

Polipeptit zincirinin iç bölgelerinde bulunan ve N ile C terminallerinden uzaktaki peptit bağlarının hidrolizini katalizlerler. Endopeptidazlarda serbest amino veya karboksil grubunun varlığı enzim aktivitesinde düşmeye sebep olur. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmalarına dayanarak dört alt gruba ayrılır [79].

Serin Proteazlar

Serin proteazlar, aktif bölgelerinde bir serin grubunun varlığı ile karakterize olan bir endopeptidazdır. Serin proteazlarının tümü aktif bölgelerinde bir serin, bir histidin ve bir aspartat olarak üç kalıntı içerir. Bu üçlü grup enzimin katalitik aktivitesini belirler. Virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bol miktarda bulunmasından dolayı hayati önem taşıyan bir enzimdir. Serin proteazların genel olarak optimum koşulları pH 7-11 arasıdır. Örnek olarak subtilizinler *Bacillus* kaynaklı olarak elde edilen ve serin proteazların en büyük ikinci ailesini temsil eder [87].

Aspartik Proteazlar

Genel olarak asidik proteazlar olarak da bilinirler. Katalitik aktiviteleri için yüksek oranda korunmuş iki aspartik asit kalıntısına bağlı bir endopeptidazlardır. Birçok aspartik proteaz, pH 3-4 gibi düşük pH değerlerinde maksimum aktivite gösterir ve pH 3-4.5 aralığında izoelektrik noktalara sahiptir [81].

Metalloproteazlar

Aktiviteleri için iki değerlikli bir metal iyonu gereksinimi ile karakterize edilen bir endopeptidazdır [86].

Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar hem prokaryotlar hem de ökaryotlar tarafından sentezlenen bir endopeptidazdır. Bu zamana kadar yaklaşık 20 çeşit sistein proteaz ailesi

tanınmıştır. Tüm sistein proteazlarının aktivitesi, sistein ve histidinden oluşan katalitik bir ikili amino asite bağlıdır. Sistein proteazlar nötr pH derecesinde optimum koşullara sahiptir, ancak lizozomal proteazlar gibi sistein proteazlar, asidik pH'ta maksimum aktivite gösterir. Sistein proteazları, karboksilik asit türevlerinin hidrolizini, genel asit-baz oluşumunu ve bir asil-tiol ara maddesinin hidrolizini içeren çift yer değiştirme yolu ile katalizler. Papain ve bromelain bugüne kadar üzerinde en çok çalışma yapılmış sistein proteazlardır [88].

2.5. Bromelain

Bromelain, Bromeliaceae türlerinde, özellikle ananasın (*Ananas comosus L.*) taç, kök, meyve ve yapraklarında bulunan sülfhidril proteolitik enzimler ve nonenzimatik maddelerin bir karışımından oluşur [89]. Kompleks bir tiyol proteaz ve proteaz olmayan bileşen karışımı içeren sulu bir ananas özütü olan bromelainin ana bileşeni proteazlardır. Proteaz olmayan bileşenler arasında fosfatazlar, glukozidazlar, peroksidazlar, selülazlar, glikoproteinler ve karbohidratlar bulunur [90].

Poligonal bir yapıya sahip olan ananas meyvesi, yaklaşık 1,2 metre boyunda, çekirdeksiz, otsu ve geniş bir bitki olarak tanımlanmaktadır. Meyve içeriğinde yüksek oranda su ve ek olarak şeker, asit, protein, az miktarda kalsiyum, katı yağlar ve lif bulunmaktadır. Vitamin olarak ise B_6, A, C vitaminleri ve ana karbohidrat bileşeni olarak ise sakkaroz, basit şeker olarak da glukoz ve fruktoz bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, ananas meyvesi içeriğinde yüksek oranda sitrik ve malik asit bulunmaktadır [91]. Olgunlaşmış meyvede yüksek miktarda glisin, alanin, metiyonin, ve lösin içermesine rağmen; lizin, prolin, histidin ve arginin gibi amino asitler diğerlerine oranla düşük miktarda bulunmaktadır. Ananas meyvesi içeriğinde asetik asit, 5-hidroksimetilfurfural, formaldehit, asetaldehit ve aseton gibi uçucu maddeler de yapılan çeşitli çalışmalarda saptanmıştır. Bromelain karşımı içeriğindeki proteaz, bu karışımın yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır ve karışımın en aktif grubudur [92]. Ananas özütünden elde edilen bromelain ana bileşenleri %80 kök bromelain, % 10 meyve bromelain ve %5 ananainden oluşmaktadır [93]. Bromelain, 4,5-9,5 arasındaki pH değerlerinde aktivite göstermektedir ve moleküler ağırlığı yaklaşık 20-38 kDa arasındadır [94].

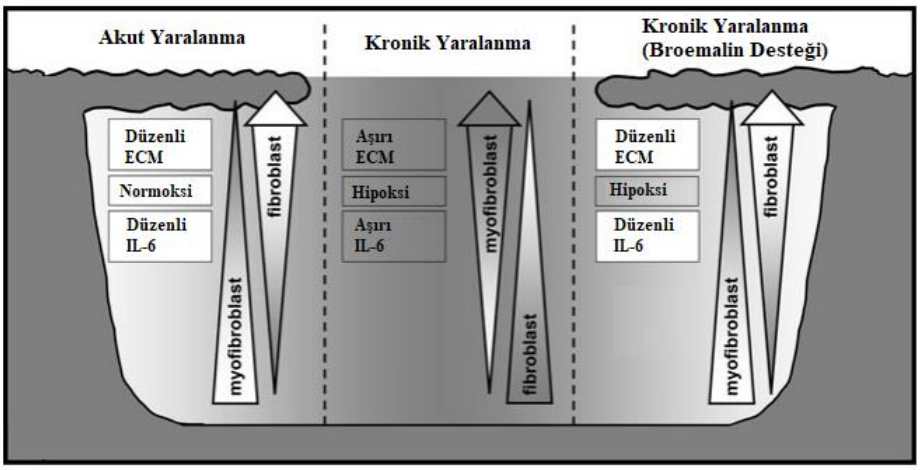
Bromelain, ananasın taç, kök ve kabuk kısmında kök bromelaini (EC. 3.4.22.32) olarak bulunurken; meyve kısmında ise meyve bromelaini (EC. 3.4.22.33) olarak adlandırılır. Kabuk, taç, yapraktan elde edilen bromelain enzimi ile meyveden elde edilen bromelain enzimi birbirinden farklı özellikler sergilemektedir [95].

Bromelain gıda, medikal, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Gıda endüstrisinde etlerin marine edilmesinde, tahıl protein çözünürlüğünün arttırılmasında, bira arıtmasında ve protein hidrolizat üretimi için kullanılır. Kozmetik endüstirisinde bromelain, hassas peeling etkileri sağlamak için yüz ve vücut bakım ürünlerinde aktif bir bileşen olarak kullanılır. Tıp ve ilaç endüstrilerinde ise bromelain, özellikle tümör büyümesinin modülasyonunu sağlayarak antikanser çalışmalarında, üçüncü derece yanıklar ve kronik yaralarda antimikrobiyal ve antioksidan etki göstererek yara iyileşme sürecini hızlandırmada, çeşitli antibiyotikler ile birlikte verilerek antibiyotiğin vücut içinde biyoyarlanımını arttırmakta, kan pıhtılaşmasında antikoagülant olarak kullanılmakta ve oral sistemik tedavilerde ameliyat sonrası gastrointensinal sistemlerde kullanılmaktadır [89, 90].

Bromelainin moleküler mekanizması henüz tam olarak tanımlanamamasına rağmen yan etkileri azdır. Bromelain antienflamatuar, antiödematojenik, antikanser ve antioksidan gibi birçok özelliğe sahiptir ve bundan dolayı klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Yara iyileşmesinde antienflamatuar, antitrombotik ve fibrinolitik etkiler, antikanser aktivitesi ve immüno-modülatör gibi özellikler gösteren bir fitoterapötik ajan olarak kabul edilmektedir [8].

Kronik yaralarda bromelain ile yapılan çeşitli kontrollü klinik çalışmalar bu enzimin etkinliğini göstermiştir. Genel olarak, insanlarda, kronik yaraların ve yanıkların tedavisi sırasında bromelain uygulandığında daha hızlı bir iyileşme gösterdiği gözlemlenmiştir. Antienflamatuar ve temizleme özelliklerine sahip olmasına karşın, bromelainin hücresel düzeyde doğrudan bir etkisi, bugüne kadar yumuşak doku rejenerasyonu ile ilgili olarak belirlenmemiştir. Bromelain, hipoksi durumu yarada devam ettiğinde, bu olumsuz durumları ortadan kaldırabilmektedir. Bundan dolayı, bromelainin yara iyileşme yapıtaşları endotel hücreleri, fibroblastlar ve miyofibloblast üzerindeki genel etkisi bulunmaktadır [95, 34]. Kronik yaralarda

miyofibroblastların aşırı üretilmesi sonucu yara iyileşmesinin proliferasyon evresi tamamlanamaz. Şekil 2.12'de bromelain yara bölgesinde miyofibroblastların dengeli bir şekilde üretimini desteklediği gösterilmektedir. Bromelain yara bölgesinde proliferasyon evresinin dengeli bir şekilde ilerlemesine yardımcı olmaktadır.



Şekil 2. 12 Oksijen koşulları ile ilişkin, matris birikimi, IL-6 sentezi ve yumuşak doku iyileşmesi sırasında iyileşme eğilimi [33]

Günümüzde %35 bromelain içeren lipit bazda kremler yara tedavisinde kullanılmaktadır [97]. Yapılan bir çalışmada yanık domuz derisi modeline uygulanan 4 saatlik bir topikal tedavi sonucu epidermiste bulunan nekrotik dokuyu temizlediği ve yanmamış bölgeleri koruduğu rapor edilmiştir. Topikal yollarla uygulanan bromelain kan perfüzyonunun geri kazanılmasını hızlandırmakta, TNF-α ekspresyonunu kontrol ederek TGF-α ekspresyonunu düzenlemektedir [98].

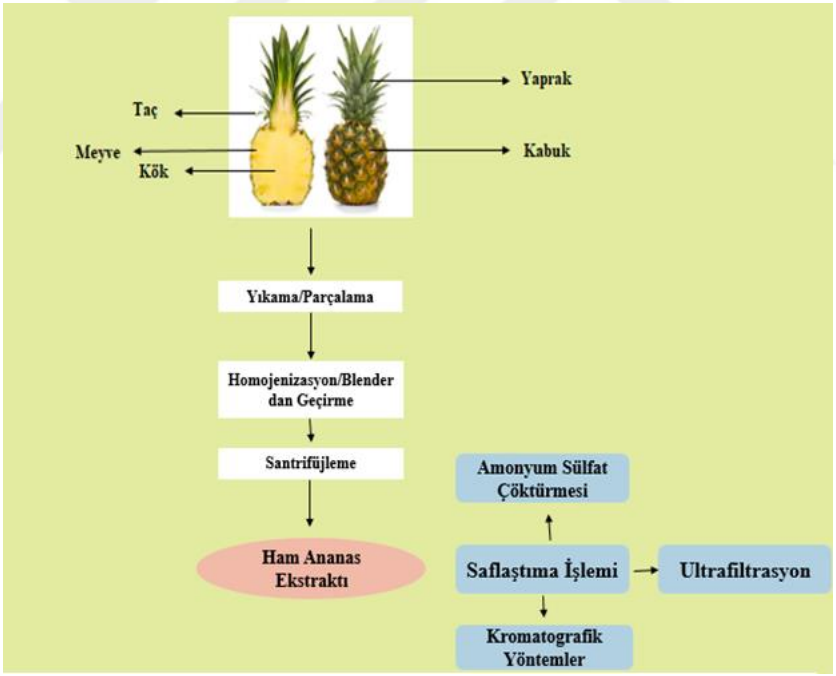
Yapılan çeşitli çalışmalar bromelain enziminin fırsatçı patojenler için uygun bir kültür ortamı olan nekrotik epidermis tabakasını uzaklaştırarak enzimin yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediğini göstermiştir [38, 95, 98]. Ayrıca, bromelainin lokal uygulanmasıyla, hızlı, etkili, noninvaziv, güvenli, yara bölgesinde minimum kan kaybı veya hiç kan kaybı olmadan kolayca kullanılabildiği ve doğal yara iyileşme sürecine önemli ölçüde yardımcı olduğu gösterilmiştir [5].

2.5.1. Bromelain Saflaştırma Yöntemleri

Soğutulmuş ananas suyundan bromelain ekstraksiyonu küçük parçalara ayırma, filtreleme ve santrifüjleme işlemlerinden geçer. Bu yöntem ile ham ananas suyu

ekstraktı elde edilir. Daha sonra ham ekstrakt süzülür ve kalıntıları gidermek için santrifüj edilir. İstenen bromelain diğer partikül kalıntılarından kurtulduktan sonra, saflaştırma, kullanımına bağlı olarak istenen bir saflık seviyesine ulaşılana kadar devam eder. Bromelain, santrifüjlemeden sonra ultrafiltrasyon, çöktürme, kromatografik yöntemler ile aktivitesini kaybetmeden saflaştırıldıktan sonra liyofilizasyon yoluyla ham bromelain enzim karışımı elde edilir (Şekil 2.13) [89].

Saflaştırma prosesi sırasında, enzim aktivitesi kazein sindirme ünitesi (CDU) veya jelatin sindirme ünitesi (GDU) ile enzim aktivitesi tayini yapılır [70, 99]. Ancak sulu çözeltide, bromelain bir proteaz olduğundan dolayı kendi kendine sindirimesinden dolayı hızla denatüre olarak bozulabilmeketdir. Çoğu zaman, doğal enzimler, genellikle stabilizatörler olarak kullanılan polioller ve şekerler gibi çeşitli katkı maddeleri ile birlikte ticari olarak temin edilmektedir [101]. Bu nedenle bromelain enzim ekstraktı içerisine glukoz ya da gliserol gibi çeşitli stabilizatörler eklenerek ekstraktın saklama süresi uzatılabilir [100, 101].



Şekil 2. 13 Bromelain saflaştırma işlemi prosesi

Kronik yaraların görülme oranı yaşlı nüfusun giderek artmasına bağlı olarak gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle bu yaş grubundaki bireyler için kronik yaralar

mortalite ve morbidite sebepleridir. Yara iyileşme sürecini her ne kadar hastanın hastalığı, bakım koşulları ve yaşı etkilese de yetersiz doku oksijenizasyonu, bakteriyel enfeksiyonlar ve doku hasarı bu süreci daha ciddi etkilemektedir [2]. Bu amaçla, tez çalışmasında yara iyileşme sürecinde nekrotik doku oluşumunu önleyerek yara iyileşme sürecini olumlu etkileyen, bromelain enzimi immobilize edilmiş polisakkarit esaslı biyouyumlu ve biyobozunur bir yara örtü malzemesi üretilmesi amaçlanmıştır. Yara örtü malzemesine immobilize edilecek bromelain enziminin oluşan nekrotik dokuyu parçaladığı ve yara bölgesinden uzaklaştırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte bromelain enzimi anti-bakteriyel, anti-inflamatuar ve anti-ödematojenik etkiye sahip olduğu için sistemik seviyede iyileşmeye yardımcı olabilmektedir. Dekstran esaslı yara örtüsü ise yaranın nemli tutulması ile oluşan eksüdanın uzaklaştırılmasını sağlayacak ve yeni doku oluşumu için uygun bir ortam sağlayacaktır.

3
MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Madde Listesi

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Kimyasal Adı	Alındığı Firma	Kullanım Amacı
Ananas	Yerel Market	Enzim ekstraksiyonu için kullanılan kaynak
Dekstran	Fluka	Hidrojel malzemesinin ana bileşeni
D-Glukoz	Sigma-Aldrich	Enzim stabilizatörü
Etilendiamin (EDA)	Sigma-Aldrich	Çapraz bağlayıcı
BSA	Sigma-Aldrich	Çapraz bağlayıcı
Amonyum Sülfat $(NH_4)_2SO_4$	Fluka	Enzim çöktürmek için kullanlılan tuz
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel-de Haën	Aldehit grupları saptanması
Trikloro Asetik Asit (TCA)	Carlo Elba Reagents	Çözünmüş proteinlerin agregasyonu
Sodyum Periyodat $(NaIO_4)$	Sigma Aldrich	Dekstran oksidasyonu
Hidroksilamin Hidroklorür (NH_3OHCl)	Acros Organics	Titrasyon
Metil Orange İndikatörü	Alfa-Aesar	Titrasyonda kullanılan renk belirteci
Coomassie G-250 Brilliant Blue Boyası	Sigma Aldrich	Protein miktar tayininde kullanılan renk belirteci

Fosforik Asit (H_3PO_4)	Sigma Aldrich	G-250 boyasını çözmek için kullanılan çözelti
Etil Alkol	Carlo Erba Reasgents	G-250 boyasını çözmek için kullanılan çözelti
L-Sistein	Sigma-Aldrich	Enzim aktivasyonu
Tirozin	Sigma-Aldrich	Aktivite tayini için kalibrasyon eğrisi oluştulması
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	Applichem	Enzim stabilizatörü
Kazein	Sigma Aldrich	Substrat
Disodyum Hidrojen Fosfat ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Fluka	Tampon çözelti maddesi
Sodyum Azid (NaN_3)	Applichem	Tampon çözelti maddesi

3.2. Cihaz Listesi

Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan cihazların isim ve markaları (devamı)

Cihaz Adı	**Marka/Model**
GPC	Viscotek TDA302
SEM (Taramalı Elektron Mikrokobu)	FEI QUANTA 450 FEG ESEM
FT-IR Spektroskopisi	Shimadzu IR-Prestige 21
UV-VIS Spektroskopisi	Shimadzu UV-1700
Liyofilizatör	Telstar Cryodos
Vorteks	Heidolph Reaxtop
Terazi	Presica
pH Metre	Wtw

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
Soğutmalı Santrifuj	Sigma
Çalkalamalı ve Sıcaklık Ayarlı Su Banyosu	N-Biotek NB-303
Vakumlu Etüv	Binder
Kumpas	Mituyoto
Çekme Cihazı	EZ-LX, Shimadzu

3.3. Deneysel Yöntemler

Bu çalışmada, kronik yaraların iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyen nekrotik doku oluşumunun ananas meyvesinden ekstrakte edilen bromelain enzim karışımının dektran esaslı hidrojele immobilize edilerek yara örtü malzemesi elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan işlemler 3 başlık altında toplanmıştır:

1. Bromelain Enziminin Kısmi Saflaştırılması

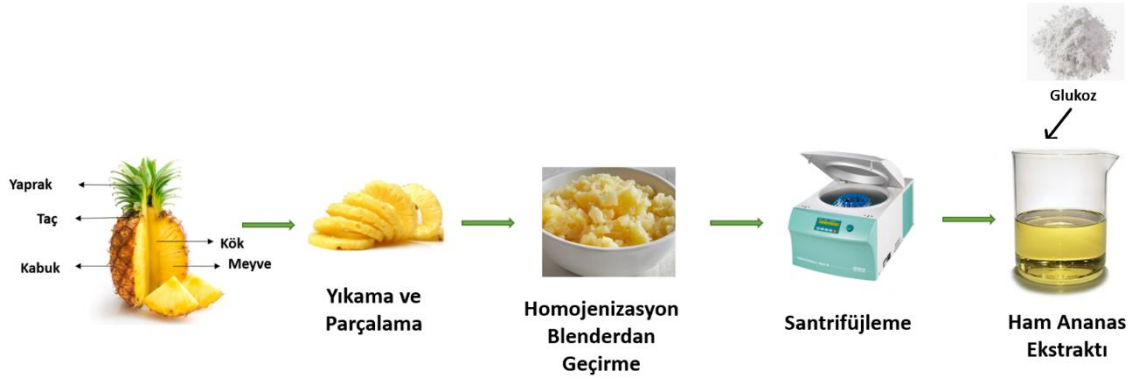
2. Dekstran Esaslı Hidrojel Üretimi

3. Hidrojele Enzim İmmobilizasyonu

3.3.1. Bromelain Enziminin Kısmi Saflaştırılması

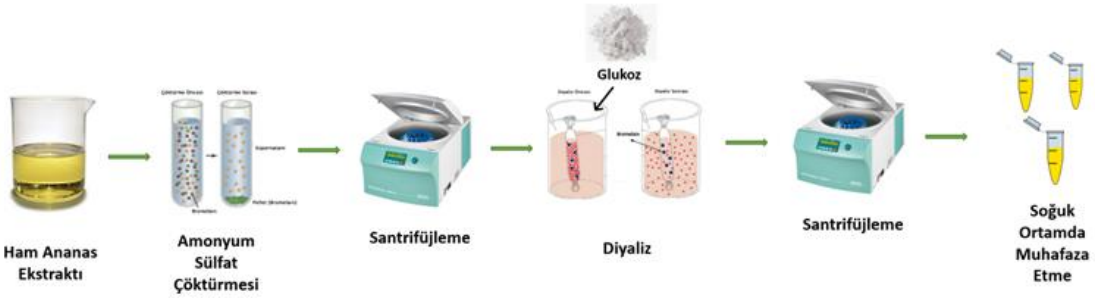
3.3.1.1. Enzim Ekstraksiyonu

Ananas meyvesinin 70 g taç, 37,5 g kök ve 142 g kabuk kısımları toplam 250 g olacak şekilde küçük parçalar halinde kesilip homojenizasyon için blender yardımıyla parçalanmıştır [103]. Elde edilen karışıma 1:1 oranında PBS (pH 7) çözeltisi eklenmiş, tülbent yardımı ile sıvı ve katı parçacıklar ayrılmıştır. Sıvı özüt 8500 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ve çökelti ayrılmıştır. Süpernatant ham ananas ekstraktı olarak saklanmış ve içerisindeki enzimin stabilizasyonunu sağlamak amacıyla özüte %10 (w/v) glukoz eklenmiştir [102]. Ananas ekstraksiyon aşamaları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Ananastan ham ekstraktın eldesi aşamaları

Ham ananas ekstraktından istenmeyen molekülleri uzaklaştırmak ve enzim ekstraktını elde edilebilmek için amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Bu yöntemde 100 ml ananas ekstraktı 4°C'de ve saturasyon aralığı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40 ve %40-50 olacak şekilde amonyum sülfat eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Saturasyon aralığına göre amonyum sülfat miktarları Englard ve ark yöntemine göre hesaplanmıştır [104]. Bulanık çözelti daha sonra 8500 rpm'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet 10 ml PBS (pH 7) tamponunda 4°C'de tekrar çözüldükten sonra ekstraktı fazla tuzdan arındırmak ve istenmeyen maddelerin uzaklaşmasını sağlamak için ekstrakt glukoz içeren PBS'e karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizden alınan enzim ekstraktı daha sonra konsantrasyonunu arttırmak amacıyla ultrafiltrasyon tüplerinde (MWCO:10 kDa) 8500 rpm'de 4°C'de 45 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlemden sonra elde edilen konsantre enzim ekstraktı 0,5 ml'lik kısımlar halinde -18°C'de muhafaza edilmiştir. Ananas ekstraktından enzim saflaştırma aşamaları Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Enzim ekstraksiyonun her aşamasında aktivite ve protein miktar tayinleri ile enzimin denatüre olup olmadığı saptanmıştır.



Şekil 3.2 Ananas ekstraktının kısmi saflaştırma aşamaları

3.3.1.2. Kazein Sindirme Ünitesi Aktivite Tayin Yöntemi (CDU)

Bu yöntemde enzimin etki edeceği substrat olarak kazein proteini kullanılmıştır. Kazeinin yapısında tirozin amino asiti bulunduğundan, bu protein enzim tarafından parçalandığında çözelti içerisine tirozin amino asitleri serbest bırakılır. Serbest tirozin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi saptanır [105].

Enzimin aktif hale gelip substrata etki etmesi için 30 mM sistein ve 6 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren aktivasyon tamponu hazırlanmıştır. Aktivasyon tamponu %0,6 (w/v) kazein çözeltisine eklendikten sonra test tüpüne bromelain ekstraktı eklenerek 10 dakika boyunca enzim ile substrat reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyonu durdurmak için ise %30 (w/v) trikloro asetik asit (TCA) eklenip 30 dakika beklenmiştir. TCA çözünmüş proteinin bir araya gelerek çökmesine neden olmakta ve buna bağlı olarak reaksiyonu durdurmaktadır. Aktivite çalışmasında kullanılan tüm çözelti miktarları Tablo 3.3'te verilmektedir.

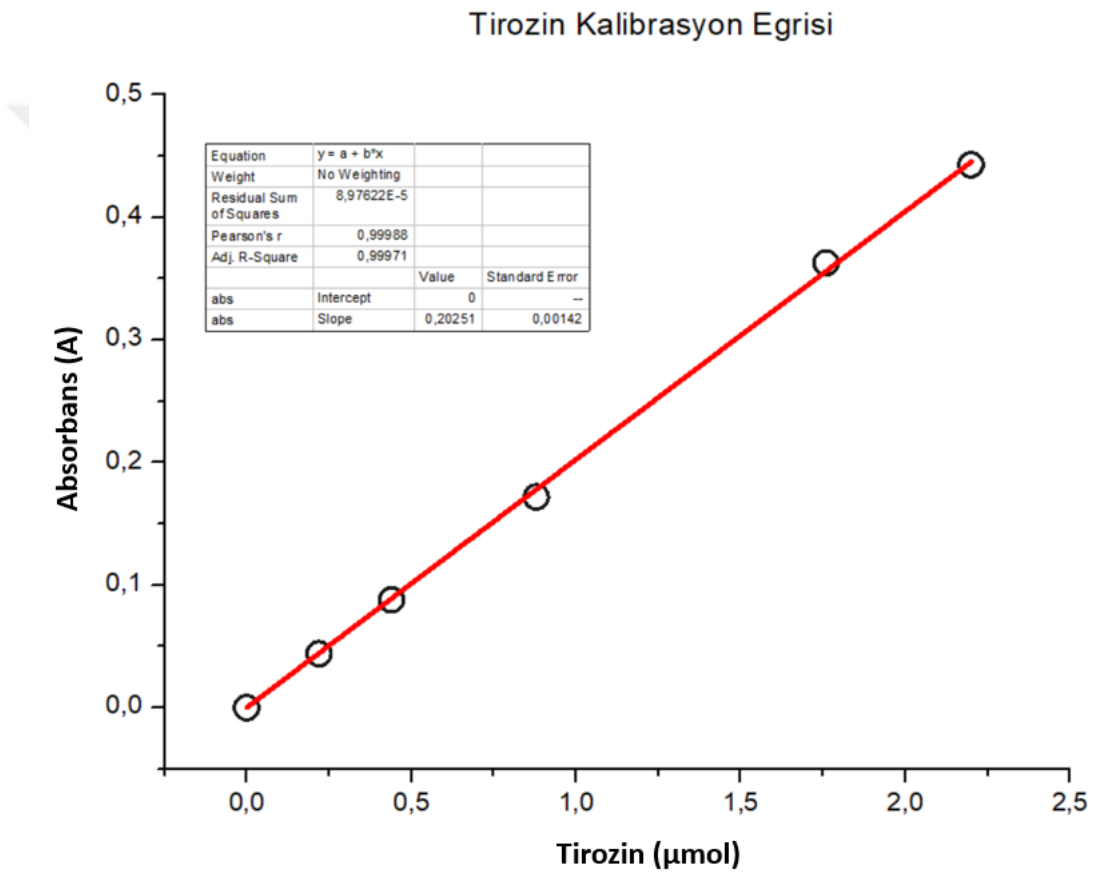
Oluşan çökeltileri çözeltiden uzaklaştırmak için 8500 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüjlenmiştir ve elde edilen süpernatantta tirozin varlığını saptamak için çözelti absorbansı ölçülmüştür. Tirozin amino asiti yapısında aromatik halka bulundurduğu için UV spektrofotometrede 280 nm de absorbans vermektedir.

Tablo 3.3 Kazein sindirme ünitesi aktivite tayin yöntemi

	Kazein (ml)	**Aktivasyon Tamponu (ml)**	**Enzim (ml)**	**TCA (ml)**	**Enzim (ml)**
Blank	2,5	0,5	-	2,5	0,5

Test	2,5	0,5	0,5	2,5	-

Kazeinden bırakılan tirozin miktarını belirlemek amacıyla saf tirozinin 280 nm'deki absorbansına ait kalibrasyon eğirişi oluşturulmuştur. Şekil 3.3'te görüldüğü üzere konsantrasyona bağlı olarak 280 nm'deki absorbans değeri lineer olarak değişmektedir. Aktivite testinde ölçülen absorbans değeri Şekil 3.3'teki kalibrasyon eğrisine uygulanarak serbest tirozin miktarı bulunmuştur.



Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlardaki tirozin amino asitinin 280 nm'deki absorbans değerlerinin değişimi

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak saptanan serbest tirozin miktarı 3.1 numaralı formüle yerleştirilerek enzim aktivitesi saptanmıştır.

$$\text{Aktivite (Unit/ml)}=\frac{Serbest\ bırakılan\ tirozin\ eşdeğerği\ (\mu mol)x\ (V_T)}{Aktivite\ tayin\ süresi\ (dakika)x\ (V_1\ )x\ (V_2\ )} \qquad (3.1)$$

V_T= Toplam Reaksiyon Hacmi (ml)

V_1= Reaksiyonda Kullanılan enzim Hacmi (ml)

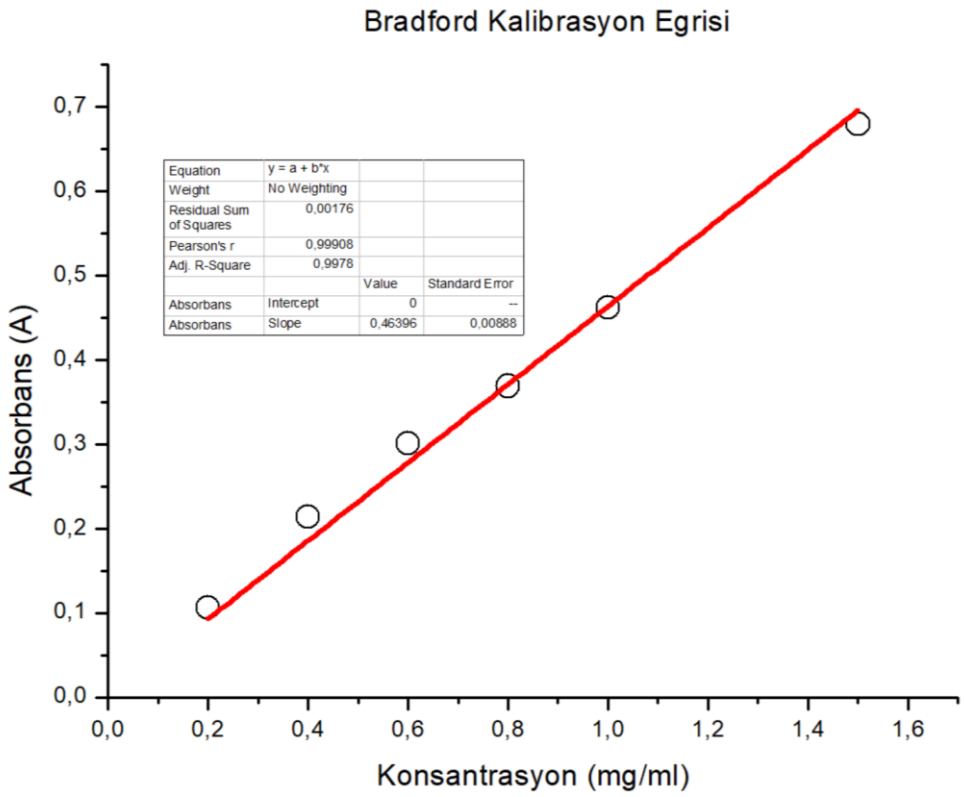
V_2= UV Ölçümleri için Kullanılan Numune Hacmi (ml)

3.3.1.3. Protein Miktar Tayin Yöntemi (Bradford Assay)

Bu yöntemde Coomaise Brilliant Blue G-250 boyası %80 (v/v) etil alkol ve %85 Fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisinde çözülmüştür. Blank tüpüne 100 µl PBS ve 3 ml Coomaise G-250 boya çözeltisi eklenmiştir. Test tüpüne ise 100 µl bromelain enzim ekstraktı üzerine 3 ml boya çözeltisi eklenmiş ve boyanın protein ile etkileşime girebilmesi için 30 saniye boyunca test tüpü vortekslenip ve 10 dakika boyunca da karıştırılmıştır. Kullanılan çözeltilerin miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir. Coomaise G-250 boyası proteinin NH_2 grupları ile elektrostatik etkileşime girerek rengin pembeden maviye dönmesine neden olur. UV spektrofotometrede 465 nm'de absorbans veren boya protein ile bağlandıktan sonra 565 nm'de absorbans vermektedir. Standart çözelti olarak BSA kullanılmış ve bu proteine karşı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Enzim için yapılan test sonucunda elde edilen 565 nm'deki absorbans değeri kalibrasyon eğrisine yerleştirilerek protein miktarı saptanmıştır.

Tablo 3.4 Protein miktar tayin yöntemi

	G-250 Boya Çözeltisi	***Protein Çözeltisi***	***PBS***
Blank	3 ml	-	100 ul
Test	3 ml	100 ul	-

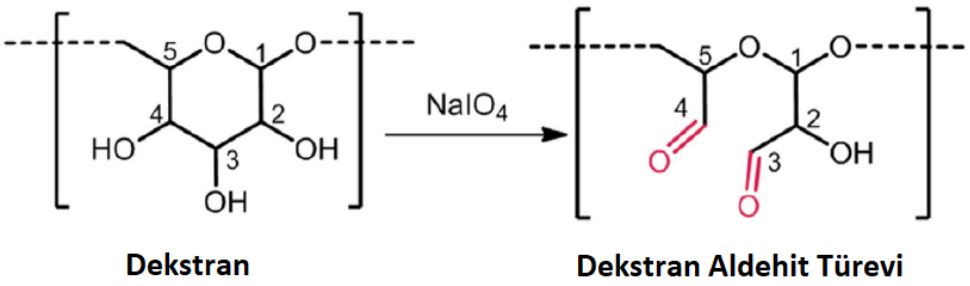


Şekil 3.4 G-250 boyası içeren farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltilerinin 565 nm'deki absorbans değerlerindeki değişim

3.3.2. Dekstran Esaslı Hidrojel Üretimi

3.3.2.1. Dekstranın Aldehit Türevine Yükseltgenmesi

0,33 g dekstran (75 kDa) 3 ml saf suda ve 0,8 g $NaIO_4$ 7 ml saf suda oda sıcaklığında çözülmüş ve ardından dekstran çözeltisine $NaIO_4$ çözeltisi karıştırılarak eklenmiştir. Dekstran aldehit türevini elde etmek ve reaksiyonun gerçekleşmesi için çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Dekstranın aldehit türevine yükseltgenme reaksiyon şeması Şekil 3.5'te verilmiştir. Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün, oda sıcaklığında 500 ml saf suya karşı 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Ardından çözelti -18°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutularak katı halde dekstranın aldehit türevi elde edilmiştir.



Şekil 3.5 Dekstranın $NaIO_4$ kullanılarak aldehit türevine yükseltgenmesi

Dekstran aldehit türevindeki aldehit gruplarının miktarını saptayabilmek için NH_3OHCl titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 20 mg dekstran aldehit türevi %0,05 (w/v) metil orange indikatörü içeren 0,25 M NH_3OHCl (5 ml) çözeltisi içerisinde çözülmüş ve ardından çözelti rengi kırmızıdan sarıya dönünceye kadar 0,5 M NaOH ile titre edilmiştir. Bu yöntemde, aldehit grupları ile NH_3OHCl moleküllerinin reaksiyon vermesi sonucunda HCl açığa çıkmaktadır (Şekil 3.6). Bu HCl'nin NaOH ile titre edilmesi sonucunda aldehit grupları ile reaksiyon veren aldehit grupları saptanmaktadır. Dekstran aldehit türevindeki aldehit gruplarının sayısı ve reaksiyon verimi 3.2 numaralı formül ile hesaplanmıştır.

$$\frac{V_{NaOH}\, x\, M_{NaOH} x 10^{-3}\, mol}{\text{Örnek Miktarı}(g) x\, Dekstran\ (MW)} = \frac{Mol_{CHO}}{Mol_{Dekstran}} \qquad (3.2)$$

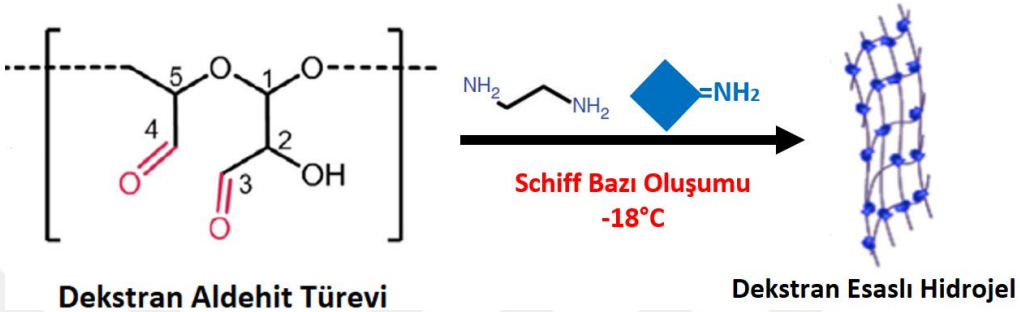
$$\text{Dekstran}\text{–}(\text{CHO})_n + \text{H}_2\text{N–OH} \cdot \text{HCl} =$$
$$\text{Dekstran-}(\text{CH}=\text{N–OH})_n + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$$
$$\text{HCl} + \text{NaOH} = \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$$

Şekil 3.6 Dekstran aldehit türevinin NH_3OHCl ile titrasyonu [106]

3.3.2.2. Dekstran Esaslı Hidrojelin Üretilmesi

Dekstran aldehit türevi (26 mg) ve dekstran (26 mg) 0,5 ml PBS (pH 8) içerisinde çözülmüştür. BSA (26 mg) 0,5 ml PBS (pH 8) içerisinde çözülmüştür ve çözeltiler 4°C'de bir süre muhafaza edilmiştir. Ardından, dekstran aldehit ve BSA çözeltileri karıştırılmış ve üzerine 4,17 µl etilendiamin eklenmiştir. Elde edilen çözelti hızlı bir şekilde 1 ml'lik enjektöre çekilmiş ve enjektör içerisindeki çözelti vorteksle

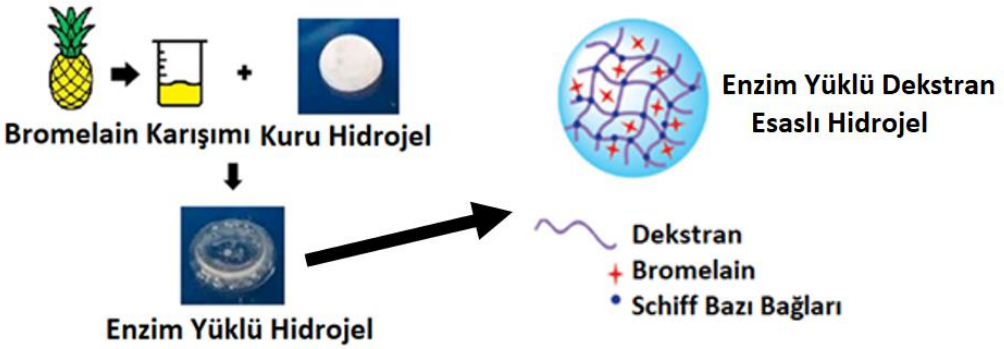
karıştırılmıştır. Çözelti 2 gün boyunca -18°C'de muhafaza edilmiştir. 2 gün sonunda enjektör kesilerek oluşan jel çıkartılmış, boyu, çapı ve ağırlığı belirlenmiştir. Ardından jel 100 ml saf su içinde bırakılmış ve 1 hafta boyunca bu su sıkça değiştirilmiştir. Jel vakumlu etüvde ve oda sıcaklığında ağırlığı sabitlenene kadar bekletilerek kurutulmuştur. Hidrojelin üretim aşamaları Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7 Dekstran esaslı hidrojel üretim aşamaları

3.3.3. Enzimin Hidrojele İmmobilizasyonu

Saflaştırıldıktan sonra muhafaza edilen 0,5 ml'lik enzim ekstraktı içerisine kurutulmuş ve 2 mg ağırlığında diskler şeklinde kesilmiş hidrojeller daldırılmış ve 4°C'de bekletilmiştir. Enzim çözeltisi içerisindeki hidrojellerin ağırlıkları sabitlenen kadar her saat başı tartılmıştır. 8. saat sonunda hidrojeller denge şişme ağırlığına ulaşmış (16 mg) ve enzim ekstraktının hidrojel tarafından emilimi sağlanmıştır. Enzim ekstraktı içerisinden alınan hidrojeller -18°C'de muhafaza edilmiş, daha sonra bu hidrojellerin bir kısmı liyofil kurutulmuş ve tekrar -18°C'de muhafaza edilmiştir. Son olarak geri kalan enzim ekstraktı aktivite ve protein miktar tayin yöntemlerinde kullanılmıştır. Doğru sonuçlara ulaşılabilmesi için her iki yöntem de üç kez tekrarlanmış ve verilerin ortalaması sonuç olarak alınmıştır. Enzim immobilizasyon aşamaları Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Enzimin hidrojele immobilizasyonu

3.4. Karakterizasyon

3.4.1. Şişme Kinetiği

Hidrojel yapısı içerisinde bulunan hidrofil gruplar su molekülleri ile etkileşime girerek hidrojen bağları oluşturur ve hidrojelin boşluk bölgelerine doğru absorbe olma eğilimi gösterirler. Su molekülleri bu boşluklara absorbe oldukça hidrojelin ağırlığı ve hacmi artış gösterek şişer ve bir süre sonra suyun hidrojel içerisine absorpsiyonu azalır ve hidrojel denge şişme kapasitesine ulaşır [61] .

Hidrojeller vakumlu etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları ölçülmüş sonrasında şişme testi için saf su içerisine daldırılmıştır. Daldırıldıktan hemen sonra 1 dakika aralıklarla 5. Dakikaya kadar ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Daha sonra 10. dakikada, 30. dakikada ve devamında bir saat aralıklarla ıslak ağırlıkları tartılmış ve kaydedilmiştir. 3 gün boyunca hidrojeller suda bekletilmiş ve 1. günden sonra 3. güne kadar her gün ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir. Doğru sonuçları elde etmek için, deney üç kez tekrarlanmış ve verilerin ortalama değerleri sonuç olarak alınmıştır. Hidrojellerin denge şişme kapasitesi 3.3 numaralı formülle hesaplanmıştır.

$$Denge\ Şişme\ Kapasitesi\ (\%) = \frac{W_t - W_0}{W_0} X100 \qquad (3.3)$$

W_t= t anındaki jel şişme ağırlığı

W_0=Başlangıç anındaki ağırlığı

3.4.2. Bozunma Testi

Hidrojeller sıcaklık, pH, çözücü bileşimi gibi çevresel koşullardaki değişikliklere cevap olarak degrade olma ya da şişme eğilimi gösterebilmektedir. Bu sebeple de hidrojelde ağırlık kaybı gözlemlenmektedir.

Bu testte, kurutulmuş hidrojellerden 2 mg ağırlığında 2 mm çapında parçalar kesilmiş ve bu parçalardan bir kısmı pH değerleri 5 ve7 olan tampon çözeltilerine ayrı ayrı daldırılmıştır. Daldırıldıktan hemen sonra ilk 5 dakika boyunca dakikada bir ağrlıkları ölçülmüştür. Sonra 10. Dakikada, 30. dakikada ve saatte bir, günde bir ve haftada bir olacak şekilde 4 hafta boyunca hidrojellerin ıslak ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. pH 5'teki hidrojeller 1. saate kadar, pH 7'deki hidrojeller ise 3. saate kadar denge şişme kapasitesine ulaştıktan sonra degrade olmaya başlamıştır. Bundan dolayı hesaplamalarda ilk ağırlık olarak denge şişme ağırlığı kullanılmıştır. Doğru sonuçlar elde edebilmek için, degradasyon testi pH 5'te ve pH 7'deki hidrojellerde üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalama değerleri kullanılmıştır. Hidrojellerin degradasyon oranı 3.4 formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Degradasyon\ Oranı\ (\%) = \frac{W_s}{W_t} x100 \qquad (3.4)$$

W_s= Son ağırlık

W_t= Denge şişme ağırlığı

3.4.3. FTIR Spektroskopisi ile Yapı Analizi

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) moleküllerin elektromanyetik spektrumun kızılötesi aralığında bulunan ışığı absorplayarak molekül yapısında bulunan bağlara spesifik olan farklı dalga boylarında absorpsiyon bantları oluşturarak molekül yapısını saptamayı sağlayan bir cihazdır. Bu cihazda, kurutulan hidrojel cihazın azaltılmış toplam yansıma (ATR) aparatı üzerine konulmuştur ve örneğin FTIR spektrumu 4000-650 cm^{-1} aralığında tespit edilmiştir.

3.4.4. Morfoloji Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemelerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan ve yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmeyi sağlayan

bir cihazdır. Bu amaçla, 1,83 mm çapında ve 2,04 mm kalınlığında kurutulmuş hidrojel 60 saniye boyunca Argon gazı altında altın-paladyum ile kaplanmıştır. Ardından alan emisyon tabancalı SEM ile görüntülenmiştir. Farklı büyütmelerde (200x, 500x, 1000x, 2000x, 4000x) ve elektron yavaşlatma özelliği kullanılarak yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmiştir. Elde edilen bu görüntülerden en az 10 tane gözeneğin çapları belirlenip ortalama değerleri hesaplanarak hidrojelin ortalama gözenek çapı belirlenmiştir. Gözenek çap değerleri SEM cihazı yazılımı üzerinden belirlenmiştir.

Hidrojel üretiminde kullanılan dekstran aldehit türevi ile etilendimain ve BSA'nın Schiff bazı oluşumu sağlanarak ile hidrojelin yapısında bulunan çapraz bağlanma oranı bulmak ve jel fraksiyon yüzdesini hesaplamak için 3.5 numaralı formül kullanılarak hesaplanmıştır [107].

$$Jel\ Fraksiyonu\ (\%) = \frac{m_d}{m} X100 \quad (3.5)$$

m_d=Hidrojelin kuru ağırlığı

m=Hidrojelin üretiminde kullanılan polimer ağırlığı

Hidrojelin yapısında bulunan por yüzdesi 3.6 numaralı formül kullanılarak hesaplanmıştır [108].

$$Porozite\ (\%) = \frac{W_t - W_0}{\rho\ X\ V_0} X100 \quad (3.6)$$

W_t= Denge şişme ağırlığı

W_0=Başlangıç (kuru) ağırlığı

V_0=Başlangıç (kuru) hacmi

ρ=Hidrojelin absorbe ettiği sıvının yoğunluğu

3.4.5. Antibakteriyel Aktivite Testi

Üretilmiş hidrojellerin antibakteriyel etkinliğini belirleyebilmek amacıyla enzim içeren ve enzim içermeyen PBS çözeltilerinin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı sıvı makrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir.

Sıvı makrodilüsyon cam tüpler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde ise gram-negatif ATCC 25922 *Escherichia coli* ve gram-pozitif ATCC 6538 *Staphylococcus aureus* bakterileri sıvı L. bertani besiyerinde pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Enzim ekstraktı çözeltisi ile enzim yüklü ve boş hidrojellerin bekletildiği PBS çözeltilerinden 500 µl ve sıvı L. bertani besiyerinden 500 µl cam tüplere eklenmiş ve $1x10^6$ kob/ml sayıda bakteri ekimi gerçekleştirilmiştir. Sadece besiyeri ve sadece bakteri ekimi yapılan iki kontrol grubu da ayrıca hazırlanmıştır. Doğru sonuca ulaşabilmek için cam tüpler 3 tekrarlı hazırlanmış ve 24 saat 37°C'de mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir.

24 saatin sonunda enzim ekstraktı çözeltisi ile hidrojellere ait çözeltileri içeren tüplerden katı besiyerine ekim yapılıp, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

Son olarak, her bir cam tüpten örnek alınarak 600 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilerek bakteri miktarları tayin edilmiştir.

3.4.6. Hidrojelden Enzim Salımı

İmmobilizasyon sonrası dondurulan ve liyofil kurutulduktan sonra -18°C'de muhafaza edilen hidrojeller enzim salımı için 500 µl PBS (pH 7) solüsyonu içerisine daldırılmış ve 8 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı su banyosunda enzim salımı gerçekleştirilmiştir. 8. saat sonunda hidrojeller PBS solüsyonu içerisinden alınmış ve -18°C'de muhafaza edilmiştir. Kalan PBS solüsyonlarında enzim aktivite ve protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Doğru sonuçlara ulaşılabilmesi için her iki yöntem de üç kez tekrarlanmış ve enzim aktivite ve protein konsantrasyonu sonuçlarının ortalaması alınmıştır.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, kronik yaralara karşı bromelain içeren dekstran esaslı yara örtüsü üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışma basamakları şunlardır:

- Bromelain enzim ekstraktının ananas özütünden kısmi saflaştırılması,
- Dekstranın $NaIO_4$ kullanılarak aldehit türevine yükseltgenmesi ve sonrasında dekstran, dekstran aldehit grubunun BSA ve etilendiamin çapraz bağlayıcı ile hidrojel üretilmesi,
- Bromelain enziminin hidrojele immobilize edilmesi

Belirtilen çalışma basamaklarında gerçekleştirilen karakterizasyon sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunulmaktadır.

4.1. Bromelain Enziminin Saflaştırılması

Ananas özütüne amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi kullanılarak bromelain enzim ekstraktı kısmi olarak saflaştırılmış, sonrasında ultrafiltrasyon tüplerinde santrifüjlenerek konsantrasyonu arttırılmıştır. Saflaştırma prosesinin her adımında enzim aktivite tayini ve protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ham ananas ektraktında bromelain haricinde diğer proteazların (meyve bromelain ve ananain) da bulunmasından dolayı spesifik aktivite oldukça yüksek bulunmuştur. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra bromelain aktivitesi ve konsantrasyonu artmıştır. Ham ananas ekstraktı saflaştıma işlemi sonucunda aktivitesi ve protein konsantrasyonu artmış, spesifik aktivite değeri saflaştırma işlemi sırasında belirgin bir şekilde değişmemişitir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Ham ananas ekstraktı ve enzim ekstrakt çözeltisinin aktivite ve protein konsantrasyon değerleri

	Ham ananas ekstraktı	*Bromelain enzim ekstraktı*
Aktivite (units/ml)	5,26	46,84
Protein Miktarı (mg/ml)	0,21	3,85
Spesifik Aktivite (units/mg)	25,04	24,32

4.2. Hidrojellerin Üretilmesi

Tez çalışmasında hedeflenen hidrojeller dekstranın $NaIO_4$ ile yükseltgenmesi ile oluşan aldehit türevinin etilendiamin ve BSA ile çapraz bağlanması ile üretilmiştir. Bu amaçla, öncelikle, dekstran molekülü aldehit türevine yükseltgenmiş ve oluşan yapı NH_3OHCl titrasyonu ve FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Ardından dekstran ve dekstran aldehit türevinin BSA ve etilendiamin ile çapraz bağlanması sonucunda üretilen hidrojellerin yapısı ve performansı FTIR spektroskopisi, SEM, çekme testi, denge şişme testi ve bozunma testi ile karakterize edilmiştir.

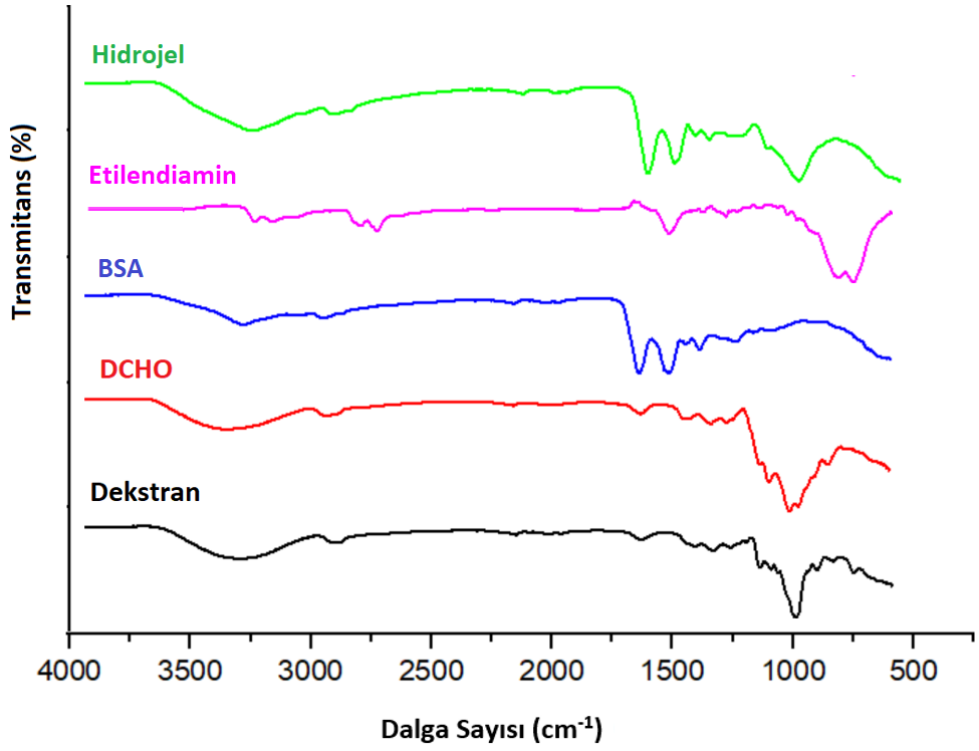
4.2.1. NH_3OHCl Titrasyonu ile Aldehit Grupların Tayini

Hidrojellerin üretiminde kullanılacak olan dekstran aldehit türevlerinin NH_3OHCl titrasyonu ile polimerin yapısındaki aldehit gruplarının sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla titrasyonda harcanan NaOH miktarı eşitlik 3.2'de kullanılmış ve sonuç olarak dekstran zincirindeki glukoz birimlerinin % 62'sinin aldehit grubuna yükseltgendiği saptanmıştır.

4.2.2. FTIR Spektroskopisi Analizi

Dekstran aldehit türevi kullanılarak üretilen hidrojelin kimyasal yapısının belirlenebilmesi amacıyla kurutulmuş hidrojel ve hidrojelin yapısında bulunan bileşenlerin her birinin FTIR spektrumu elde edilmiştir. Bu kapsamda dekstran,

dekstran aldehit türevi ve BSA'nın FTIR spektrumları alınmış ve hidrojel spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.1'de kurutulmuş hidrojel ve bileşenlerine ait tüm FTIR spektrumları verilmektedir. Spektrumda 3150-3650 cm^{-1} arasında bulunan bantlar bütün bileşenlerin yapısında bulunan -OH grubuna; 2900-3000 cm^{-1} aralığındaki bant ise alifatik C-H grubuna aittir. BSA ve hidrojel spektrumlarındaki 1515-1650 cm^{-1} aralığında mevcut bant ise Amit I ve Amit II bağlarının bulunduğunu göstermektedir. Dekstran aldehit türevinde ve dekstran spektrumundaki 1000 cm^{-1} bandı C-C halka bağlarına aittir. Dekstran aldehit türevi tam verimle (%100) yükseltgenmediği için bu bant dekstran aldehit türevinde de saptanmıştır. Dekstran aldehit türevinde ve hidrojel spektrumunda 1015 cm^{-1} bandı ise C-O grubuna aitttir. Etilendiamine ait spektrumda 760-860 cm^{-1} aralığındaki bandın NH_2 uç gruplarına aittir. Çapraz bağlanma sonrasında etilendiamine ait bantların hidrojel spektrumunda bulunmadığı görülmektedir ve hidrojelin yapısında serbest etilendiamin bulunmadığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak hidrojel spektrumunda makromoleküler bileşenlerin bantları net bir şekilde gözlemlenmiştir.

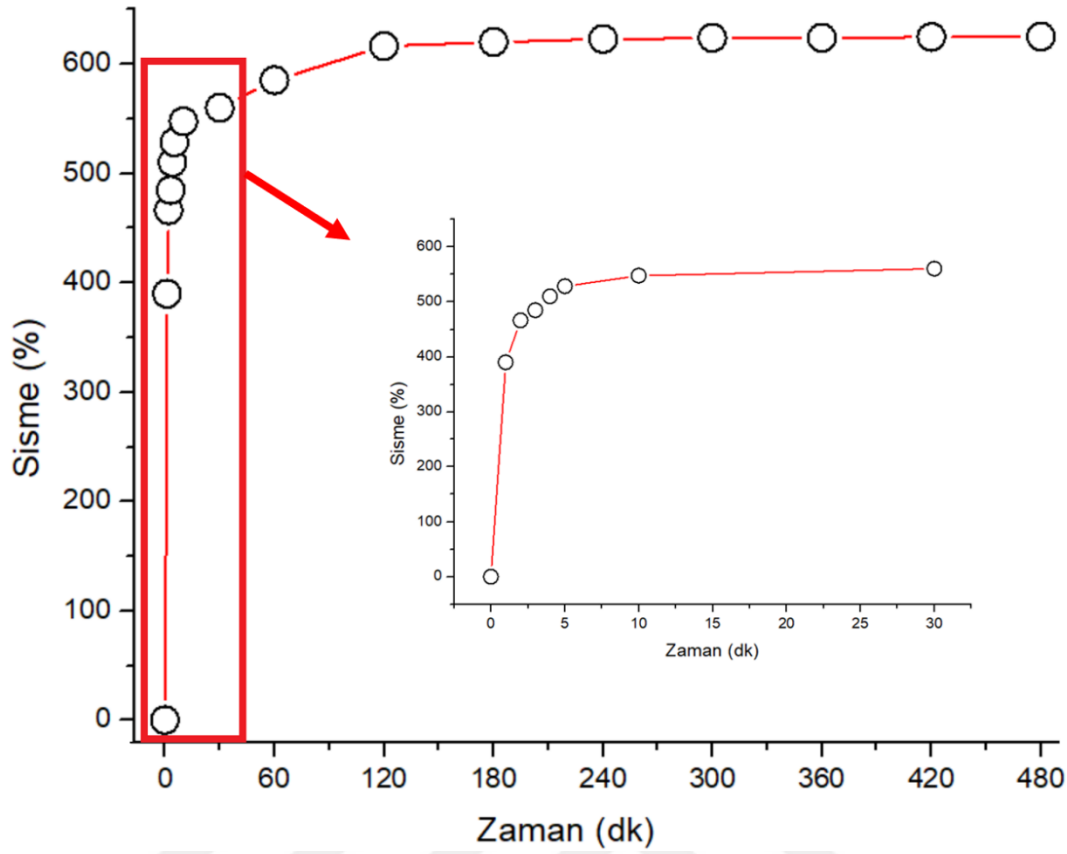


Şekil 4.1 Dektsran, dekstran aldehit türevi (DCHO), BSA ve kurutulmuş hidrojele ait FTIR spektrumları

4.2.3. Hidrojel Şişme Kinetiği

Hidrojeller üretildikten ve saf suda yıkandıktan sonra vakumlu etüvde kurutulmuştur. Kurutulan hidrojeller denge şişme testi için saf suya daldırılmış ve ağırlıkları belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. 3 paralel test gerçekleştirilmiştir ve bunların ortalama değerleri kullanılmıştır. Şekil 4.2 hidrojellerin zamana bağlı olarak ağırlıklarında meydana gelen değişimi göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere hidrojelin 5. dakikada kuru ağırlığının % 530'u kadar su absorbe ettiği saptanmıştır. Yaklaşık 3. saatten sonra ise hidrojelin %625'i kadar su absorbe ettiği görülmektedir. Hidrojellerin 5 dakika gibi kısa sürede su absorplamasının kriyojelasyon sonucunda meydana gelen büyük gözeneklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Pacelli ve ark [109] ürettiği dektran esaslı hidrojeller ile karşılaştırıldığında tez çalışmasında üretilen hidrojellerin daha kısa sürede denge şişme ağırlığına ulaştıkları fakat şişme oranının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Hwang ve ark ürettiği dektran esaslı hidrojellerin [110] tez çalışmasında üretilen hidrojellere göre denge şişme ağırlığında ağırlığının %375 daha az sıvı absorbe ettiği gözlemlenmiştir. Mollaie ve ark farklı çapraz bağlayıcılar kullanarak ürettiği dektran esaslı hidrojellerin ise [111] tez çalışmasında üretilen hidrojellere göre daha uzun bir zaman aralığında daha yüksek bir denge şişme kapasitesine (%1800) ulaştığı gözlemlenmiştir. Anlaşılacağı üzere, tez çalışmasında üretilen hidrojel literatürdeki benzer çalışmalara göre daha hızlı bir şekilde sıvıyı emmektedir ancak sıvı emme kapasitesi daha düşüktür. Hidrojelin kriyojelasyon yöntemi ile üretilmesinden dolayı sıvıları hızlı bir şekilde emebilmektedir. Hidrojelin üretiminde kullanılan çapraz bağlayıcı etilendiaminin alifatik gruplarının yapıya hidrofobik karakter katarak sıvı emme kapsitesini azalttığı düşünülmektedir.

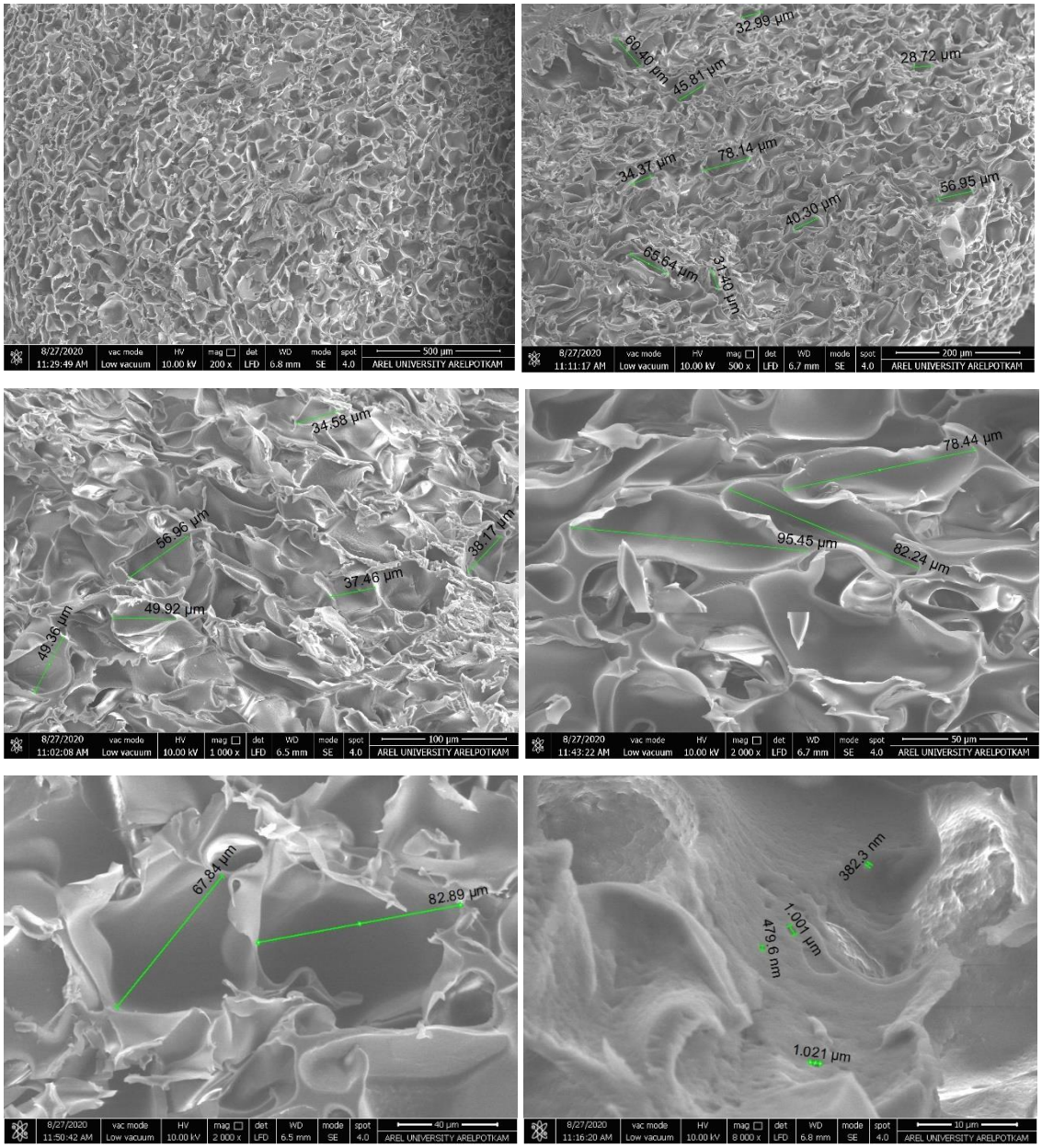


Şekil 4.2 Su içerisinde bekletilen kurutulmuş hidrojelin zamana bağlı olarak ağırlık değişimi

4.2.4. Morfoloji Analizi

Kriyojelasyon yöntemi kullanılarak üretilen hidrojellerin SEM cihazı kullanılarak elde edilen farklı yakınlaştırmalardaki görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Hidrojellerin jel fraksiyonu %62,61 olarak, porozite yüzdesi ise %80,21 olarak hesaplanmıştır. Kriyojellerin bir özelliği olan makro por yapısı hidrojelde SEM analizi ile gösterilmiştir. Hidrojelin ortalama por çapı 63±17 µm olarak hesaplanmıştır. Hidrojellerin geniş gözeneklere sahip olması yara iyileşmesi sırasında hücrelerin yerleşebilmesi için imkan sağlayacaktır. Ayrıca, büyük gözenekler yüksek miktarda su absorpsiyonu da sağlamıştır. Solomevich ve ark [112] ürettiği dekstran esaslı hidrojellerin ortalama por çapı 100 µm olduğu bildirilmiştir. Özmen ve ark. [113] ürettiği kitosan esaslı kriyojellerin ortalama por çapının 44 µm olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında üretilen kriyojellerin por çaplarının literatürdeki benzer kriyojellerin por çaplarına yakın bir aralıkta çıktığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, endotel hücrelerin çaplarının maksimum 20

µm olduğu göz önüne alındığında üretilen hidrojelin gözenek çapının bu hücrelerin yerleşimi için uygun olduğu görülmektedir [114].



Şekil 4.3 Üretilen hidrojelin farklı yakınlaştırmalarda elde edilen SEM görüntüleri: a) 200x, b)500x, c)1000x, d)2000x, e)2000x, f) 8000x

4.2.5. Bozunma Testi

Kurutulmuş hidrojeller pH 5 ve pH 7'de ayrı ayrı hazırlanmış tampon çözeltilerine ayrı ayrı daldırılarak zamana bağlı olarak ağırlık kayıpları tespit edilerek

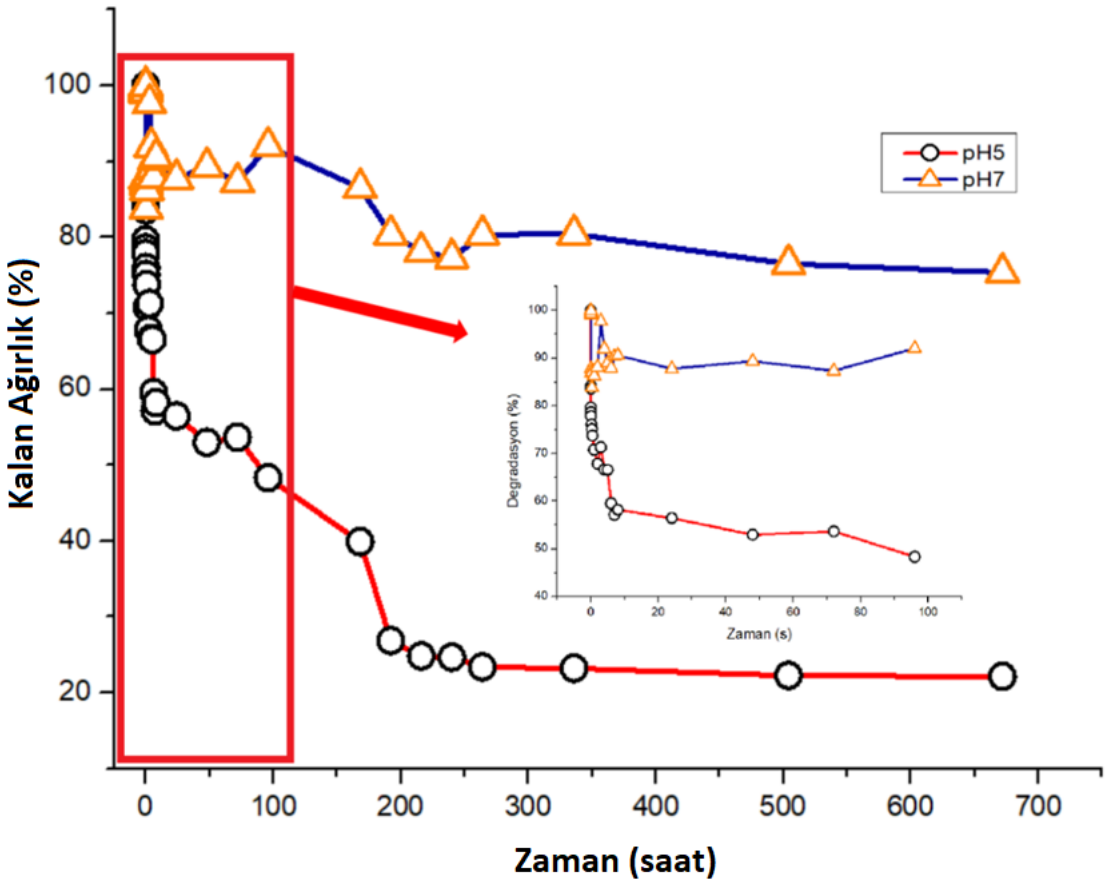
hidrojellerin bozunma özelliği incelenmiştir. Bu amaçla, hidrojeller 4 hafta boyunca ilgili çözeltiler içerisinde 4°C'de muhafaza edilmiş ve jellerin ağırlık kayıpları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmektedir. pH5'te bulunan hidrojeller denge şişme ağırlığına 1. saatte ulaşmış, pH 7'de bulunan hidrojeller ise 3. saatte denge şişme ağırlığına ulaşmıştır. Bundan dolayı, hidrojellerin ağırlık kayıpları hidrojeller denge şişme ağırlıklarına ulaştıktan sonra kaydedilmeye başlanmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere, pH5'te bulunan hidrojeller 8. saatin sonunda denge şişme ağırlıklarının % 41,8'ini, 4 haftanın sonunda ise ağırlıklarının % 77,84 ünü kaybetmiştir. pH 7 tampon çözeltisi içerisinde tutulan hidrojellerde ise 8. saatin sonunda denge şişme ağırlıklarının % 9,43'nü kaybetmiş ve 4. güne kadar yapılan ağırlık tartımlarında dalgalanmalar göstermiştir. 4. günden itibaren ise bozunmaya başlamıştır. 4 haftanın sonunda denge şişme ağırlığının %20,37'sini kaybetmiştir. Hidrojel yapısındaki Schiff bazının asidik pH değerinde (pH 5) hidroliz olması sebebi ile bu pH değerinde bulunan hidrojeller pH 7'ye göre daha hızlı bir şekilde bozunmuştur. Bu sonuç hidrojelin pH'a duyarlı olarak bozunma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Testin gerçekleştirildiği sıcaklık değeri 37°C'ye yükseltildiğinde bozunma hızının artacağı öngörülmektedir.

pH 5'te gerçekleştirilen bozunma çalışmasında ilk 8 saatteki bozunma hızıyla 8-100 saat arasındaki bozunma hızının birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Hidrojel suyu emdikten sonra su ile temas halindeki grupların hızlı bir şekilde bozunduğu, su ile doğrudan temas etmeyen ve daha hidrofobik bölgelerin ise su moleküllerinin bu bölgelere nüfuz etme hızına bağlı olarak daha yavaş bozunduğu düşünülmektedir.

Jalalnavandi ve ark [115] ürettiği dekstran esaslı hidrojller ile karşılaştırıldığında 37 °C'de pH 6,4'te gerçekleştirilen bozunma testi tez çalışmasındaki sonuçlara göre daha erken zamanda (10 gün içinde) hidrojelin tamamının bozunduğunu göstermektedir. Bu çalışmada asidik pH değerine yakın bir pH değerinde çalışılması ve sıcaklığın bu tez çalışmasından daha yüksek olması Jelalvandi ve ark. ürettiği hidrojelin daha kısa sürede bozunmasını açıklamaktadır.

Zhang ve ark. [116] dekstran esaslı nanojeller üretmiş ve bu çalışmada üretilen nanojeller ile tez çalışmasındaki hidrojeller karşılaştırıldığında Zhang ve ark.

ürettiği nanojeller pH 5'te daha kısa sürede (4 saat içinde) daha hızlı bozunma profili gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak, nanojellerin yüzey alanının daha yüksek olduğu göze alındığında tez çalışmasındaki hidrojelden daha kısa sürede bozunması beklenen bir durumdur.



Şekil 4.4 pH 5 ve pH 7'de bekletilen hidrojellerin zamana bağlı olarak % ağırlık değişimleri

4.2.6. Enzimin Hidrojele İmmobilizasyonu

Kurutulmuş hidrojeller kısmi saflaştırma sonrası elde edilen enzim ekstrakt çözeltisi içerisine daldırılmış ve 8 saat bekletilmiştir. Enzim yüklenmiş hidrojel enzim ekstraktından çıkartıldıktan sonra dondurularak saklanmıştır. Dondurulan enzim yüklü hidrojellerin bir kısmı liyofilizatörde kurutularak saklanmıştır. Hidrojel

çıkartıldıktan sonra enzim ekstraktı çözeltisinde kalan enzim miktarı ve aktivitesi ise ayrıca belirlenmiştir.

Dondurularak saklanan enzim yüklü hidrojel PBS içerisine daldırılarak 8 saat beklenmiştir. Çözelti içerisine salınan enzimin aktivitesi ve miktarı saptanmıştır. Liyofil kurutulmuş enzim yüklü hidrojeldend salınan enzim miktarı ve aktivitesi de aynı yöntemle belirlenmiştir. Tablo 4.2 enzim ekstraktında kalan ve hidrojellerden salınan enzimlerin miktar ve aktivite değerlerini vermektedir.

Tabloda verilen değerlere göre enzim ekstraktında hidrojel bekletildikten sonra çözelti içerisindeki enzim konsantrasyonunda yaklaşık %38'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum enzimin hidrojel tarafından absorbe edildiğini göstermektedir. Ardından enzim yüklü hidrojeller PBS'te bekletildiğinde salınan toplam enzim miktarının yüklenen enzimin yaklaşık %10'una denk geldiği hesaplanmıştır. Bu durum hem dondurarak hem liyofil saklanmış hidrojeller için geçerlidir. Hidrojeller ikinci bir kez daha PBS içerisinde bekletildiğinde çözelti içerisinde hiçbir enzim aktivitesi ve protein varlığı saptanmamıştır.

Salınan enzimin aktivite ve spesifik aktivite değerleri incelendiğinde ise, liyofil kurutulmuş hidrojelden salınan enzimin aktivite ve spesifik aktivite değerlerinin dondurarak saklanmış hidrojelden salınan enzime göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak dondurularak saklanmış hidrojelde enzimlerin bir kısmının denatüre olduğu düşünülmüştür. Liyofil kurutulan hidrojellerde ise enzimin stabilitesini daha uzun süre koruduğu anlaşılmaktadır [105].

Tablo 4.2 Hidrojellere enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrasında enzim ekstraktında bulunan ve enzim yüklü hidrojellerden salınan bromelain enziminin aktivite ve protein miktar değerleri

	Dondurularak saklanmış hidrojel			***Liyofil kurutulmuş hidrojel***		
	Enzim Ekstraktı[a]	***Enzim Ekstraktı[b]***	***Hidrojelden Salınan***	***Enzim Ekstraktı[a]***	***Enzim Ekstraktı[b]***	***Hidrojelden Salınan***
Aktivite (units/ml)	46,84	19,03	1,158	46,84	18,67	1,586

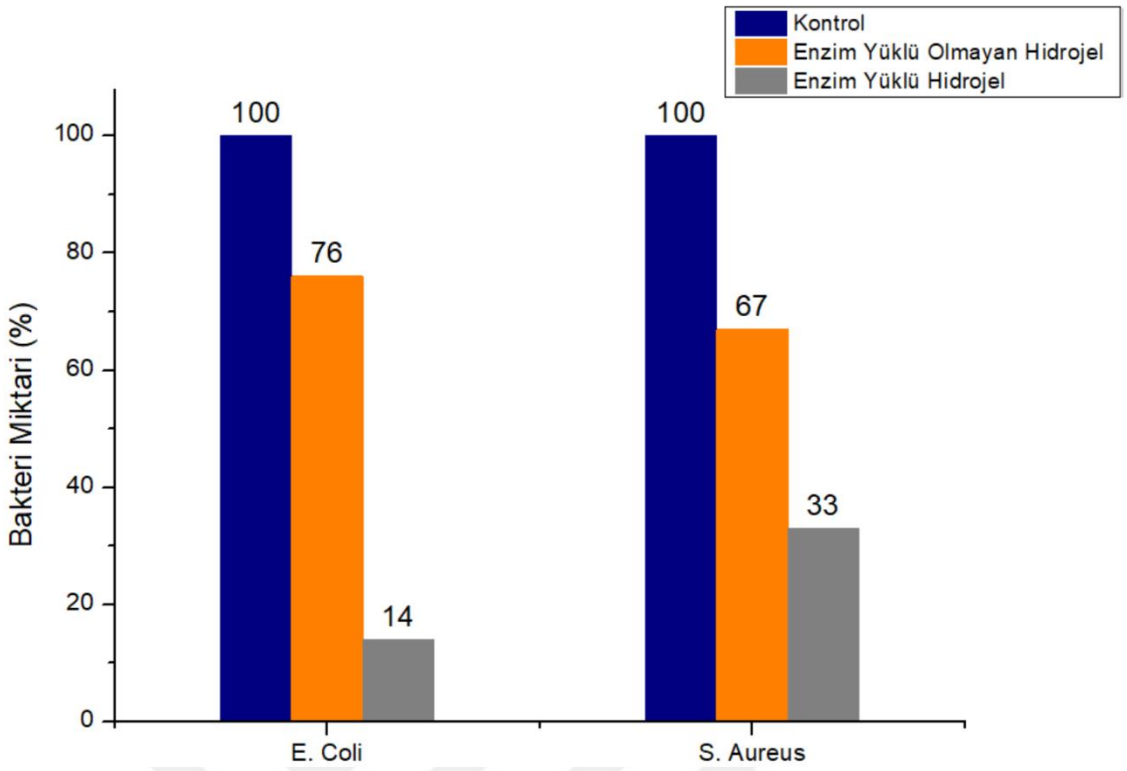
Protein Miktarı (mg/ml)	3,85	2,36	0,14	3,85	2,40	0,15
Spesifik Aktivite (units/mg)	24,32	8,06	8,27	24,32	7,77	10,56

[a]İmmobilizasyon öncesi,

[b]İmmobilizsyon sonrası

4.2.7. Antibakteriyel Aktivite Testi

Hidrojellerin *E. Coli* ve *S. Aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi sıvı makrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntemde, enzim yüklü olan ve olmayan hidrojeller ayrı ayrı PBS çözeltileri içinde 8 saat bekletilmiş ve ardından hidrojeller bu çözeltilerden uzaklaştırılarak kalan çözeltiler *E. Coli* ve *S. Aureus* bakteri süspansiyonlarına ekilmiştir. Şekil 4.5 eklenen PBS çözeltilerinden sonra kalan bakteri sayılarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre enzim yüklü hidrojelden salınanlar *E. Coli* ve *S. Aureus* bakterisinin bulunduğu besiyerleri içerisinde güçlü bir antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Enzim yüklü olmayan hidrojel ise yine her iki bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Ancak bu etki enzim yüklü hidrojelden çok daha azdır. Bu durum hidrojel yapısına yüklenen enzimin antibakteriyel etkinliğini net bir şekilde göstermektedir.



Şekil 4.5 Enzim yüklü olan ve olmayan hidrojellerin salım çözeltilerinin *E. Coli* ve *S. Aureus* bakteri sayıları üzerine etkisi

Sonuçlardan anlaşılacağı üzere enzim yüklü olmayan hidrojelin de antibakteriyel etkinliği bulunmaktadır. Hidrojelin yapısında bulunan dekstran aldehit gruplarının bu etkiye sebep olabileceği düşünülmüştür. Liu ve ark yaptığı çalışma incelendiğinde dekstran aldehit türevininin *E. Coli*'ye karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği görülmüştür [117].

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Kronik yaralar normal yara iyileşme süreçlerinin çok uzun sürmesi ya da enflamasyon evresinde fırsatçı patojenlerin yara bölgesini istila ederek enfeksiyona neden olması ile yara iyileşme sürecinin tamamlanamamasından kaynaklanan bir yara çeşitidir. Bu yara türünün tedavisi genellikle üç aydan fazla sürmektedir ve yara yatağından nekrotik dokunun uzaklaştırılması için kalıcı olmayan bir yöntem olan cerrahi operasyonlar uygulanmaktadır. Bu operasyonlar hastayı hem maddi açıdan hem de psikososyal açıdan olumsuz etkilemektir. Bu nedenle yara iyileşme sürecini hızlandıracak ve skar doku oluşumunu azaltacak yara örtü malzemelerine ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması ile kronik yaraların tedavisinde kullanılabilecek bir yara örtü malzemesi olarak literatürde ilk kez dekstran esaslı bir hidrojele bromelain enzimi immobilize edilmiştir. Üretilen enzim yüklü olan ve olmayan hidrojeller karakterize edilerek birbiri ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışması sonucunda aşağıda maddeler halinde verilen sonuçlar elde edilmiştir.

- Ham ananas ekstraktı farklı saturasyonlar uygulanarak amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile kısmi saflaştırılmış ve her adımda aktivite ve protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ham ananas ekstraktı ile karşılaştırıldığında protein miktarı 18 kat, enzim aktivitesi ise 9 kat yüksek bir enzim ekstraktı elde edilmiştir.
- Dekstran esaslı hidrojel üretmek için dekstran aldehit türevine yükseltgenmiş ve reaksiyon verimi NH_3OHCl titrasyonu ile hesaplanmıştır. Dekstran zinciri üzerindeki toplam aldehit miktarı %62 olarak bulunmuştur.
- FTIR spekstroskopisi kullanılarak kuru hidrojel ve içindeki bileşenler ayrı ayrı incelenmiş ve karşılaştırmalı olarak bakıldığında hidrojelin içindeki her bileşenin hidrojelin spektrumunda bulunduğu tespit edilmiştir.
- Kurutulmuş hidrojeller denge şişme ağırlığına ulaşıncaya kadar saf suda bekletilerek ağırlıkları ölçülmüş ve ilk 5 dakikada kuru ağırlığının 5 katı

kadar su absorbe ettiği gözlemlenmiştir. Denge şişme ağırlığına ise yaklaşık 3 saat sonra ulaştığı belirlenmiştir.

- Kuru hidrojellerin morfolojik özelliklerini belirlemek için SEM görüntüleri incelendiğinde ortalama por çapının 63 μm olduğu ve makrogözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.
- Üretilen hidrojel içine daldırıldığı enzim çözeltisindeki enzimin %38'ini absorbe etmiştir. Ancak, salım testi sonucunda hidrojelin yüklenen enzimin ancak %10'unu saldığı belirlenmiştir.
- Enzim yüklü hidrojel liyofil kurutularak saklandığında dondurularak saklanmış enzim yüklü hidrojele göre enzimin aktivitesini daha yüksek oranda koruduğu belirlenmiştir.
- Hidrojel bozunma testi sonuçlarına göre pH 5'te tutulan hidrojelin 8 saat sonunda ağırlığının %41,8'i, 4 hafta sonra ise %77,84'ünün bozunduğu tespit edilmiştir. pH 7'de bekletilen hidrojel ise 8 saat sonunda ağırlığının %9,43'ünü, 4 hafta sonunda ise denge şişme ağırlığının %20,37'sinin bozunduğu tespit edilmiştir. Hidrojelin pH'a duyarlı olarak bozunma gösterdiği gözlemlenmiştir.
- Enzim yüklü olan hidrojellerin antibakteriyel etkinlikleri incelendiğinde hem *E. Coli* hem *S. Aureus'a* karşı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.
- Enzim yüklü olmayan hidrojellerin antibakteriyel etkinlikleri incelendiğinde ise hem *E. Coli* hem *S. Aureus'a* karşı enzim yüklü hidrojellere göre daha az antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durumun hidrojel yapısındaki dekstranın serbest aldehit gruplarından kaynaklandığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, antibakteriyel özelliğe sahip, pH'a duyarlı olarak bozunabilen, gözenekli, yüksek sıvı emme kabiliyetine sahip ve doğal polimerlerden oluşan bir yara örtü malzemesi üretilmiştir. Üretilen bu malzemenin kronik yaraların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında üretilen hidrojellerin sitotoksisite testleri yapılarak biyouyumluluklarının gösterilmesi, bileşenlerin farklı oranlarında hidrojeller üretilerek malzemenin performansının incelenmesi, hidrojelin yapısında bulunan Schiff bazı formunu oluşturan çift bağların $NaBH_4$ kullanılarak indirgenmesi ile bozunma hızının yavaşlatılması ve hidrojelin yapısındaki serbest aldehit uçlarının hem antibakteriyel etkinliğine hem biyouyumluluğuna etkisinin daha ayrıntılı araştırılmasıyla yüksek etkinliğe sahip yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi planlanmaktadır.

Kaynakça

[1] J. A. D. Whitney, "Overview: Acute and chronic wounds," *Nurs. Clin. North Am.*, vol. 40, no. 2, pp. 191–205, 2005, doi: 10.1016/j.cnur.2004.09.002.

[2] N. Turgut *et al.*, "Incidence, Prevention and Treatment of Pressure Ulcers in Intensive Care Patients," *Türk Yoğun Bakım Derneği Derg.*, vol. 15, no. 2, pp. 72–76, 2017, doi: 10.4274/tybdd.84755.

[3] Ö. A. Çetinkaya, "The Incidence of Malignancy in the Pathology Materials of the Patients Underwent Amputation due to Diabetic Foot Ulcer and the Long-term Results of the Patients," *J. Ankara Univ. Fac. Med.*, vol. 72, no. 3, pp. 334–338, 2020, doi: 10.4274/atfm.galenos.2019.70894.

[4] M. A. Fonder, G. S. Lazarus, D. A. Cowan, B. Aronson-Cook, A. R. Kohli, and A. J. Mamelak, "Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 58, no. 2, pp. 185–206, 2008, doi: 10.1016/j.jaad.2007.08.048.

[5] Z. A. Muhammad and T. Ahmad, "Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care — a review," *J. Pak. Med. Assoc.*, vol. 67, no. 1, pp. 121–125, 2017.

[6] Y. L. Tan, C. G. Liu, L. J. Yu, and X. G. Chen, "Effect of linoleic-acid modified carboxymethyl chitosan on bromelain immobilization onto self-assembled nanoparticles," *Front. Mater. Sci. China*, vol. 2, no. 2, pp. 209–213, 2008, doi: 10.1007/s11706-008-0035-3.

[7] M. Bernela, M. Ahuja, and R. Thakur, "Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles," *Carbohydr. Polym.*, vol. 143, pp. 18–24, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.01.055.

[8] J. A. Ataide *et al.*, "Bromelain Loading and Release from a Hydrogel Formulated Using Alginate and Arabic Gum," *Planta Med.*, vol. 83, no. 10, pp. 870–876, 2017, doi: 10.1055/s-0043-102948.

[9] F. M. Croisfelt *et al.*, "Characterization of PNIPAAm-co-AAm hydrogels for modified release of bromelain," *Eur. Polym. J.*, vol. 105, pp. 48–54, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.05.016.

[10] C. Liu *et al.*, "A highly efficient, in situ wet-adhesive dextran derivative sponge for rapid hemostasis," *Biomaterials*, vol. 205, pp. 23–37, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.03.016.

[11] G. Sun *et al.*, "Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 52, pp. 20976–20981, 2011, doi: 10.1073/pnas.1115973108.

[12] Y. Doç and C. Kaan, "Yara İyileşmesi, Yara Bakımı ve Komplikasyonları," *Arşiv*

Kaynak Tarama Derg., vol. 16, no. 2, pp. 145–159, 2007, doi: 10.17827/aktd.64247.

[13] Ö. Coşkun, G. Uzun, D. Dal, Ş. Yıldız, and Y. A. Sönmez, "Kronik yarada tedavi yaklaşımları," *Gülhane Tıp Derg*, vol. 58, pp. 207–228, 2016, doi: 10.5455/gulhane.

[14] A. Turabelidze and L. A. Dipietro, "Inflammation and Wound Healing," *Oral Wound Heal. Cell Biol. Clin. Manag.*, pp. 39–56, 2013, doi: 10.1002/9781118704509.ch3.

[15] S. A. Eming, T. Krieg, and J. M. Davidson, "Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 3, pp. 514–525, 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700701.

[16] M. E. Puhaindran, "Principles of wound healing," *Diabet. Foot Probl.*, vol. 9, no. 2, pp. 395–402, 2008, doi: 10.1142/9789812791535_0028.

[17] P. Martin and R. Nunan, "Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing," *Br. J. Dermatol.*, vol. 173, no. 2, pp. 370–378, 2015, doi: 10.1111/bjd.13954.

[18] R. Mori, T. J. Shaw, and P. Martin, "Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: Knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 1, pp. 43–51, 2008, doi: 10.1084/jem.20071412.

[19] R. Riise *et al.*, "Bleomycin hydrolase regulates the release of chemokines important for inflammation and wound healing by keratinocytes," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-56667-6.

[20] G. Broughton, J. E. Janis, and C. E. Attinger, "Wound healing: An overview," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, no. 7 SUPPL., pp. 1–32, 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9.

[21] S. Dolati, M. Yousefi, A. Pishgahi, S. Nourbakhsh, B. Pourabbas, and S. K. Shakouri, "Prospects for the application of growth factors in wound healing," *Growth Factors*, vol. 38, no. 1, pp. 25–34, 2020, doi: 10.1080/08977194.2020.1820499.

[22] J. W. Park, S. R. Hwang, and I. S. Yoon, "Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration," *Molecules*, vol. 22, no. 8, pp. 1–20, 2017, doi: 10.3390/molecules22081259.

[23] H. Smola, G. Thiekotter, and N. E. Fusenig, "Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction," *J. Cell Biol.*, vol. 122, no. 2, pp. 417–429, 1993, doi: 10.1083/jcb.122.2.417.

[24] Y. P. Xia *et al.*, "Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation," *J. Pathol.*, vol. 188, no. 4, pp. 431–438, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199908)188:4<431::AID-PATH362>3.0.CO;2-B.

[25] H. P. Ehrlich and T. M. Krummel, "Regulation of wound healing from a connective tissue perspective," *Wound Repair Regen.*, vol. 4, no. 2, pp. 203–

210, 1996, doi: 10.1046/j.1524-475X.1996.40206.x.

[26] G. F. Pierce, T. A. Mustoe, B. W. Altrock, T. F. Deuel, and A. Thomason, "Role of platelet-derived growth factor in wound healing," *J. Cell. Biochem.*, vol. 45, no. 4, pp. 319–326, 1991, doi: 10.1002/jcb.240450403.

[27] H. N. Wilkinson and M. J. Hardman, "Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair," *Open Biol.*, vol. 10, no. 9, 2020, doi: 10.1098/rsob.200223.

[28] J. C. Forrester, "MECHANICAL, BIOCHEMICAL, AND ARCHITECTURAL FEATURES OF SURGICAL REPAIR," scotland.

[29] L. Forrest, "Current concepts in soft connective tissue wound healing," *Br. J. Surg.*, vol. 70, no. 3, pp. 133–140, 1983, doi: 10.1002/bjs.1800700302.

[30] D. Chouhan, P. Das, N. Thatikonda, S. K. Nandi, M. Hedhammar, and B. B. Mandal, "Silkworm Silk Matrices Coated with Functionalized Spider Silk Accelerate Healing of Diabetic Wounds," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 7, pp. 3537–3548, 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00514.

[31] R. Zhao, H. Liang, E. Clarke, C. Jackson, and M. Xue, "Inflammation in chronic wounds," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 12, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3390/ijms17122085.

[32] L. Gould *et al.*, "Chronic wound repair and healing in older adults: Current status and future research," *Wound Repair Regen.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1111/wrr.12245.

[33] K. Aichele, M. Bubel, G. Deubel, T. Pohlemann, and M. Oberringer, "Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay," *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, vol. 386, no. 10, pp. 853–863, 2013, doi: 10.1007/s00210-013-0890-z.

[34] K. G. Harding, H. L. Morris, and G. K. Patel, "Healing chronic wounds," *Bmj*, vol. 324, no. 7330, pp. 160–163, 2002, doi: 10.1136/bmj.324.7330.160.

[35] H. P. Lorenz and M. T. Longaker, "Wounds : Biology , Pathology , and Management," pp. 77–78.

[36] L. Rutter, "Obtaining the optimum moist wound healing environment," *Br. J. Community Nurs.*, vol. 22, no. December, pp. S36–S40, 2017, doi: 10.12968/bjcn.2017.22.Sup12.S36.

[37] R. L. Sheridan, R. G. Tompkins, and J. F. Burke, "Management of burn wounds with prompt excision and immediate closure," *J. Intensive Care Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 6–19, 1994, doi: 10.1177/088506669400900103.

[38] W. Hu *et al.*, "Debriding effect of bromelain on firearm wounds in pigs," *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care*, vol. 71, no. 4, pp. 966–972, 2011, doi: 10.1097/TA.0b013e3182028929.

[39] C. A. Fleck, "Wound assessment parameters and dressing selection.," *Adv. Skin Wound Care*, vol. 19, no. 7, pp. 364–370, 2006, doi: 10.1097/00129334-200609000-00011.

[40] N. Akyüz, *YARA BAKIMI ve TEDAVISI*. İstanbul: Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi, 2008.

[41] M. Dhayalan, S. U. M. Riyaz, P. Rajeshbabu, S. Parveen, and P. Pa, "Diabetic foot ulceration and Wound Healing Dressing materials," vol. 2, no. 1, 2020.

[42] Y. Liang, X. Zhao, T. Hu, Y. Han, and B. Guo, "Mussel-inspired, antibacterial, conductive, antioxidant, injectable composite hydrogel wound dressing to promote the regeneration of infected skin," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 556, pp. 514–528, 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2019.08.083.

[43] R. G. Frykberg and J. Banks, "Challenges in the Treatment of Chronic Wounds," *Adv. Wound Care*, vol. 4, no. 9, pp. 560–582, 2015, doi: 10.1089/wound.2015.0635.

[44] L. Jaffe and S. C. Wu, "Dressings, Topical Therapy, and Negative Pressure Wound Therapy," *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, vol. 36, no. 3, pp. 397–411, 2019, doi: 10.1016/j.cpm.2019.02.005.

[45] Ü. Türsen, "Ülser Tedavisinde Yara Örtüleri," *Turk Dermatoloji Derg.*, vol. 7, no. 2, pp. 61–71, 2013.

[46] J. Apelqvist, J. Larsson, and A. Stenstrom, "Topical treatment of necrotic foot ulcers in diabetic patients: A comparative trial of DuoDerm and MeZinc," *Br. J. Dermatol.*, vol. 123, no. 6, pp. 787–792, 1990, doi: 10.1111/j.1365-2133.1990.tb04198.x.

[47] E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely Neisiany, and S. Ramakrishna, "Wound dressings: Current advances and future directions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 27, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1002/app.47738.

[48] J. C. Dumville, S. Deshpande, S. O'Meara, and K. Speak, "Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers," *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2013, no. 8, 2013, doi: 10.1002/14651858.CD009099.pub3.

[49] U. Kumar and U. Kumar, "Dressing Materials," *Bedside Clin. Orthop. (Ward Round Tables)*, pp. 17–17, 2017, doi: 10.5005/jp/books/13025_3.

[50] K. Y. Woo and J. Heil, "A prospective evaluation of methylene blue and gentian violet dressing for management of chronic wounds with local infection," *Int. Wound J.*, vol. 14, no. 6, pp. 1029–1035, 2017, doi: 10.1111/iwj.12753.

[51] S. Wichai, P. Chuysinuan, S. Chaiarwut, P. Ekabutr, and P. Supaphol, "Development of bacterial cellulose/alginate/chitosan composites incorporating copper (II) sulfate as an antibacterial wound dressing," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 51, no. Ii, pp. 662–671, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.03.043.

[52] J. G. Powers, L. M. Morton, and T. J. Phillips, "Dressings for chronic wounds," *Dermatol. Ther.*, vol. 26, no. 3, pp. 197–206, 2013, doi: 10.1111/dth.12055.

[53] S. Ichioka, K. Harii, M. Nakahara, and Y. Sato, "An experimental comparison of hydrocolloid and alginate dressings, and the effect of calcium ions on the behaviour of alginate gel," *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, vol. 32, no. 3, pp. 311–316, 1998, doi: 10.1080/02844319850158660.

[54] G. S. Liu *et al.*, "In Situ Electrospinning Iodine-Based Fibrous Meshes for Antibacterial Wound Dressing," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 13, 2018, doi: 10.1186/s11671-018-2733-9.

[55] M. Konop, T. Damps, A. Misicka, and L. Rudnicka, "Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview," *J. Nanomater.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/7614753.

[56] G. Lokhande *et al.*, "Nanoengineered injectable hydrogels for wound healing application," *Acta Biomater.*, vol. 70, pp. 35–47, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.01.045.

[57] E. Su and O. Okay, "Polyampholyte hydrogels formed via electrostatic and hydrophobic interactions," *Eur. Polym. J.*, vol. 88, pp. 191–204, 2017, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.01.029.

[58] K. Pal, A. K. Banthia, and D. K. Majumdar, "Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications," *Des. Monomers Polym.*, vol. 12, no. 3, pp. 197–220, 2009, doi: 10.1163/156855509X436030.

[59] X. Hu, M. Vatankhah-Varnoosfaderani, J. Zhou, Q. Li, and S. S. Sheiko, "Weak Hydrogen Bonding Enables Hard, Strong, Tough, and Elastic Hydrogels," *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 43, pp. 6899–6905, 2015, doi: 10.1002/adma.201503724.

[60] S. S. Suner *et al.*, "Cryogel composites based on hyaluronic acid and halloysite nanotubes as scaffold for tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 627–635, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.025.

[61] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 18–23, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.

[62] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.

[63] M. T. Wolf *et al.*, "A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 33, no. 29, pp. 7028–7038, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.051.

[64] R. S. CENAN, E. ERGİN, Y. EKİCİ, and F. B. ATAÇ, "Structural and Functional Properties of the Extracellular Matrix," *J. Lit. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 251–260, 2018, doi: 10.5336/pharmsci.2018-60599.

[65] J. F. Mano *et al.*, "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends," *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, no. 17, pp. 999–1030, 2007, doi: 10.1098/rsif.2007.0220.

[66] G. G. D'Ayala, M. Malinconico, and P. Laurienzo, "Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches," *Molecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2069–2106, 2008, doi: 10.3390/molecules13092069.

[67] L. Klouda, "Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 97, pp. 338–349, 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.017.

[68] A. Aravamudhan, D. M. Ramos, A. A. Nada, and S. G. Kumbar, *Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications*. Elsevier Inc., 2014.

[69] Q. Wang *et al.*, "Quantitative analysis of straight-chain/branched-chain Ratio During Enzymatic Synthesis of Dextran Based on Periodate Oxidation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 523, no. 3, pp. 573–579, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.010.

[70] D. Klemm, T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, and S. Hornig, "Functional Polymers Based on Dextran BT - Polysaccharides II," *Polysaccharides II*, vol. 205, no. Chapter 100, pp. 199–291, 2006, [Online]. Available: http://link.springer.com/10.1007/12_100%0Apapers3://publication/doi/10.1007/12_100.

[71] J. Han *et al.*, "Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain," *Food Bioprod. Process.*, vol. 114, pp. 253–262, 2019, doi: 10.1016/j.fbp.2019.01.008.

[72] D. Berillo and N. Volkova, "Preparation and physicochemical characteristics of cryogel based on gelatin and oxidised dextran," *J. Mater. Sci.*, vol. 49, no. 14, pp. 4855–4868, 2014, doi: 10.1007/s10853-014-8186-3.

[73] Y. Liu and M. B. Chan-Park, "Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 2, pp. 196–207, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.041.

[74] E. Jalalvandi, L. R. Hanton, and S. C. Moratti, "Schiff-base based hydrogels as degradable platforms for hydrophobic drug delivery," *Eur. Polym. J.*, vol. 90, no. January, pp. 13–24, 2017, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.03.003.

[75] H. Su, Q. Jia, and S. Shan, "Synthesis and characterization of Schiff base contained dextran microgels in water-in-oil inverse microemulsion," *Carbohydr. Polym.*, vol. 152, pp. 156–162, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.06.091.

[76] T. Palmer and P. L. Bonner, *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry: Second Edition*. 2007.

[77] Z. Tao, B. Dong, Z. Teng, and Y. Zhao, "The Classification of Enzymes by Deep Learning," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 89802–89811, 2020, doi: 10.1109/ACCESS.2020.2992468.

[78] R. T. Mahajan and S. B. Badgujar, "Biological aspects of proteolytic enzymes : A Review," *J. Pharm. Res.*, vol. 3, no. 9, pp. 2048–2068, 2010.

[79] N. C. Gimenes, E. Silveira, and E. B. Tambourgi, "An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications," *Sep. Purif. Rev.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1080/15422119.2019.1677249.

[80] S. Tähkä *et al.*, "Immobilization of proteolytic enzymes on replica-molded thiol-ene micropillar reactors via thiol-gold interaction," *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 2339–2349, 2019, doi: 10.1007/s00216-019-01674-9.

[81] R. S. Singh, T. Singh, and A. Pandey, *Microbial enzymes-an overview*. Elsevier B.V., 2019.

[82] A. Razzaq *et al.*, "Microbial proteases applications," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–20, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00110.

[83] T. A. Semashko *et al.*, "Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures," *Anal. Biochem.*, vol. 449, no. 1, pp. 179–187, 2014, doi: 10.1016/j.ab.2013.12.032.

[84] I. R. A. P. Bresolin, I. T. L. Bresolin, E. Silveira, E. B. Tambourgi, and P. G. Mazzola, "Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 56, no. 6, pp. 971–979, 2013, doi: 10.1590/S1516-89132013000600012.

[85] A. O. Helbig and A. Tholey, "Exopeptidase Assisted N- And C-Terminal Proteome Sequencing," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 7, pp. 5023–5032, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05288.

[86] S. A. Amin, N. Adhikari, and T. Jha, "Design of Aminopeptidase N Inhibitors as Anti-cancer Agents," *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 15, pp. 6468–6490, 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00782.

[87] L. Hedstrom, "Serine protease mechanism and specificity," *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 12, pp. 4501–4523, 2002, doi: 10.1021/cr000033x.

[88] B. López-García, M. Hernández, and B. S. Segundo, "Bromelain, a cysteine protease from pineapple (Ananas comosus) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 62–67, 2012, doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x.

[89] H. R. Maurer, "Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 9, pp. 1234–1245, 2001, doi: 10.1007/PL00000936.

[90] V. Rathnavelu, N. B. Alitheen, S. Sohila, S. Kanagesan, and R. Ramesh, "Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications (Review)," *Biomed. Reports*, vol. 5, no. 3, pp. 283–288, 2016, doi: 10.3892/br.2016.720.

[91] Z. I. M. Arshad, A. Amid, F. Yusof, I. Jaswir, K. Ahmad, and S. P. Loke, "Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 17, pp. 7283–7297, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5889-y.

[92] B. Cassileth, "Bromelain," *Oncology*, vol. 25, no. 2, pp. 1–10, 2011, doi: 10.5336/pharmsci.2017-56115.

[93] K. Chobotova, A. B. Vernallis, and F. A. A. Majid, "Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives," *Cancer Lett.*, vol. 290, no. 2, pp. 148–156, 2010, doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.001.

[94] A. Amid, N. A. Ismail, F. Yusof, and H. M. Salleh, "Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from Ananas comosus," *Process Biochem.*, vol. 46, no. 12, pp. 2232–2239, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.08.018.

[95] S. Ketnawa, P. Chaiwut, and S. Rawdkuen, "Extraction of bromelain from

pineapple peels," *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 17, no. 4, pp. 395–402, 2011, doi: 10.1177/1082013210387817.

[96] F. Schwarz, M. Jennewein, M. Bubel, J. H. Holstein, T. Pohlemann, and M. Oberringer, "Soft tissue fibroblasts from well healing and chronic human wounds show different rates of myofibroblasts in vitro," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, no. 2, pp. 1721–1733, 2013, doi: 10.1007/s11033-012-2223-6.

[97] B. Kwatra, "a Review on Potential Properties and Therapeutic Applications of Lycopene," *Int. J. Med. Biomed. Stud.*, vol. 4, no. 4, pp. 488–500, 2020, doi: 10.32553/ijmbs.v4i4.1081.

[98] E. Shoba, R. Lakra, M. S. Kiran, and P. S. Korrapati, "Fabrication of core-shell nanofibers for controlled delivery of bromelain and salvianolic acid B for skin regeneration in wound therapeutics," *Biomed. Mater.*, vol. 12, no. 3, 2017, doi: 10.1088/1748-605X/aa6684.

[99] S. Bayat, N. Amiri, E. Pishavar, F. Kalalinia, J. Movaffagh, and M. Hahsemi, "Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models," *Life Sci.*, vol. 229, pp. 57–66, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.028.

[100] S. S. Gautam, S. Kumar, and M. Lambda, "Comparative study of extraction , purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant Abstract :," *Thai J. Pharm. Sci*, vol. 34, no. September, pp. 67–76, 2017.

[101] A. Rani and P. Venkatesu, "Insights into the interactions between enzyme and co-solvents: Stability and activity of stem bromelain," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 73, no. 1, pp. 189–201, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.068.

[102] P. A. G. Soares, A. F. M. Vaz, M. T. S. Correia, A. Pessoa, and M. G. Carneiro-Da-Cunha, "Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 98, pp. 389–395, 2012, doi: 10.1016/j.seppur.2012.06.042.

[103] M. Z. M. Nor, L. Ramchandran, M. Duke, and T. Vasiljevic, "Performance of a two-stage membrane system for bromelain separation from pineapple waste mixture as impacted by enzymatic pretreatment and diafiltration," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 56, no. 2, pp. 218–227, 2018, doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5478.

[104] S. Englard and S. Seifter, "Precipitation techniques," *Methods Enzymol.*, vol. 182, no. C, pp. 285–300, 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)82024-V.

[105] R. V. Devakate, V. V. Patil, S. S. Waje, and B. N. Thorat, "Purification and drying of bromelain," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 64, no. 3, pp. 259–264, 2009, doi: 10.1016/j.seppur.2008.09.012.

[106] H. Zhao and N. D. Heindel, "Determination of Degree of Substitution of Formyl Groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method," *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 8, no. 3. pp. 400–402, 1991, doi: 10.1023/A:1015866104055.

[107] W. Mozalewska, R. Czechowska-Biskup, A. K. Olejnik, R. A. Wach, P. Ulański, and J. M. Rosiak, "Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 134, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1016/j.radphyschem.2017.01.003.

[108] Y. Li *et al.*, "A tough chitosan-alginate porous hydrogel prepared by simple foaming method," *J. Solid State Chem.*, p. 121797, 2020, doi: 10.1016/j.jssc.2020.121797.

[109] S. Pacelli *et al.*, "Dextran-polyethylene glycol cryogels as spongy scaffolds for drug delivery," *Int. J. Biol. Macromol.*, pp. 1–26, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.273.

[110] M. R. Hwang *et al.*, "Gentamicin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol/dextran hydrogel: Gel characterization and in vivo healing evaluation," *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 3, pp. 1092–1103, 2010, doi: 10.1208/s12249-010-9474-0.

[111] H. Salimi-Kenari, F. Mollaie, E. Dashtimoghadam, M. Imani, and B. Nyström, "Effects of chain length of the cross-linking agent on rheological and swelling characteristics of dextran hydrogels," *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 141–149, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.10.056.

[112] S. O. Solomevich *et al.*, "Biodegradable pH-sensitive prospidine-loaded dextran phosphate based hydrogels for local tumor therapy," *Carbohydr. Polym.*, vol. 226, p. 115308, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115308.

[113] T. Sen, B. Ozcelik, and M. M. Ozmen, "Tough and hierarchical porous cryogel scaffolds preparation using n-butanol as a non-solvent," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 68, no. 7, pp. 411–416, 2019, doi: 10.1080/00914037.2018.1452225.

[114] K. Vocetkova *et al.*, "A comparison of high throughput core-shell 2D electrospinning and 3D centrifugal spinning techniques to produce platelet lyophilisate-loaded fibrous scaffolds and their effects on skin cells," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 85, pp. 53706–53719, 2017, doi: 10.1039/c7ra08728d.

[115] E. Jalalvandi, L. R. Hanton, and S. C. Moratti, "Preparation of a pH sensitive hydrogel based on dextran and polyhydrazide for release of 5-flurouracil, an anticancer drug," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 44, pp. 146–152, 2018, doi: 10.1016/j.jddst.2017.12.011.

[116] H. Su *et al.*, "Schiff base-containing dextran nanogel as pH-sensitive drug delivery system of doxorubicin: Synthesis and characterization," *J. Biomater. Appl.*, vol. 33, no. 2, pp. 170–181, 2018, doi: 10.1177/0885328218783969.

[117] C. Liu *et al.*, "Efficient antibacterial dextran-montmorillonite composite sponge for rapid hemostasis with wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 160, pp. 1130–1143, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.140.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: dhatice8@gmail.com

Uluslararası Bildiri

[1] Demir H., Başaran Elalmış Y., Topuzoğulları M., ‘‘Development of Bromelain Entrapped Dextran Hydrogels as Wound Dressing Materials’’ II. International Enzyme and Bioprocess Days, s. 36, 1-3 September 2020.