



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİYOBÖZÜNÜR BAKTERİYEL SELÜLOZ-
HYALÜRONİK ASİT DOKU
İSKELELERİNİN ÇIT-ÇIT
REAKSİYONLARI İLE SENTEZİ VE
UYGULAMALARI**

ŞEYMA TURAN OKULMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Polimer Bilimi ve
Teknolojisi Anabilim Dalı
Polimer Bilimi ve Teknolojisi Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Dilek KAZAN

İSTANBUL, 2022



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



SYNTHESIS OF BIODEGRADABLE BACTERIAL CELLULOSE-HYALURONIC ACID TISSUE SCAFFOLDS VIA CLICK REACTIONS AND THEIR APPLICATIONS

ŞEYMA TURAN OKULMUŞ

MASTER THESIS

Department of Polymer Science and Technology
Polymer Science and Technology Program

Thesis Supervisor

Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

Thesis CO- Supervisor

Prof. Dr. Dilek KAZAN

ISTANBUL, 2022

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması BAPKO FEN-C-YLP-130319-0041 numaralı proje kapsamında, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerilerini esirgemeyerek bana gerek tez ile ilgili gerek tez dışı her konuda yardımcı olan karşılaştığım problemler esnasında desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen çok değerli tez danışmanlarım sayın Prof. Dr. Nilhan Kayaman Apohan ve sayın Prof.Dr. Dilek Kazan'a,

Laboratuvar ortamında her türlü yardım ve desteği sağlayan sayın Doç. Dr. Burcu OKTAY ve Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI' ya,

Her zaman dostluklarıyla ve destekleriyle yanımda olduklarını bildiğim sevgili arkadaşlarım Berken Açıkgüz Bulut ve Sabır Duman'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca bana verdikleri büyük destekten dolayı babama, ablama ve eşime,

İçtenlikle teşekkür eder saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Amaç.....	2
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Biyopolimerler.....	3
2.2 Mikrobiyal Kaynaklı Biyopolimerler.....	6
2.2.1 Bakteriyel Selüloz	6
2.2.2 Bakteriyel Hyalüronik Asit.....	8
2.2.3 Biyopolimerlerin Medikal Uygulamaları	9
2.3 DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	10
2.4 HİDROJEL.....	11
2.5 KLİK KİMYASI.....	13
2.5.1 Bakır Katalizli Klık Kimyası.....	14
2.6 Biyobozunur Bakteriyel Selüloz-Hyalüronik Asit Doku İskelelerinin Uygulamaları.....	16
3 MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	20
3.1.1 Hyalüronik Asit Azidlenmesi için Kimyasallar	20
3.2 KULLANILAN CİHAZLAR VE ALETLER.....	24
3.3 DENEYSEL YÖNTEM.....	24
3.3.1 Hyalüronik Asit'in Azidlenmesi.....	24
3.3.2 Bakteriyel Selülozun Alkinlenmesi	26
3.3.3 Hidroksipropil Metil Selüloz'un Alkinlenmesi	29
3.3.4 CuAAC ile klık denemesi.....	30
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	33

4.1	Hidrojellerin Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR) Analizi.....	33
4.1.1	Hyalüronik Asit- Azido Polimerinin Karakterizasyonu	33
4.1.2	Bakteriyel Selüloz Sentez ve BC-Alkin Karakterizasyonu	36
4.1.3	Hidroksipropil Metil Selüloz ve HPMC-Alkin Sentez Karakterizasyonu	39
4.1.4	Cuaac Klik Reaksiyonu ile Oluşan Jellerin Karakterizasyonu	41
4.2	Hidrojellerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	41
4.3	Hidrojellerin Şişme Davranışları.....	43
4.4	Hidrojellerin Gözenek Yapıları.....	45
4.5	Hidrojellerin Gözenekliliği.....	50
5	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	52
6	KAYNAKLAR.....	54
7	ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

BIYOBOZUNUR BAKTERİYEL SELÜLOZ-HYALÜRONİK ASİT DOKU İSKELELERİNİN ÇIT-ÇIT REAKSİYONLARI İLE SENTEZİ VE UYGULAMALARI

Günümüzde, biyouyumlu ve biyobozunur polimerler kullanılarak hazırlanan hidrojeller, benzersiz biyouyumlulukları, esnek sentez yöntemleri, istenilen fiziksel özellikleri oluşturmadaki proses kolaylığı nedeniyle birçok biyolojik uygulama için tercih edilen malzemelerdir. Pek çok uygulama alanları arasında, hidrojellerin en önemli kullanım alanı, yara örtüsü olarak kullanılmasıdır. Hidrojel yara örtüleri, nemli bir yara iyileştirme ortamı oluşturabilirken, hava akışını sağlar, yara eksudasını emebilir ve yaraya zarar vermeden kolayca çıkarılabilir.

Bu açıklamalar ışığında, bu çalışmada, Hyalüronik asit (HA) ve bakteriyel selüloz (BC) içeren hidrojellerin çit-çit kimyası ile hazırlanması hedeflenmiştir. Çit-çit kimyası, iki moleküler yapı bloğunun, az veya hiç yan ürün içermeyen hafif reaksiyon koşullarında kolay, seçici, yüksek verimli reaksiyona girmesine izin veren organik reaksiyonların kullanımını teşvik eder. Çit-çit kimyası iki bileşenin çapraz bağlanması için çok güçlü bir araçtır ve bir azid ve bir alkin arasındaki 1, 3 dipolar sikloza dayanmaktadır. Çit-çit reaksiyonu ile çapraz bağlanan HA-BC hidrojelleriyle, hızlı biyobozunan Hyalüronik asitin, tedavi süresi boyunca mekanik kararlılığının korunması hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında kullanılan BC, *Komagataeibacter oboediens* kullanılarak, mikrobiyal proses ile üretilmiş ve sonrasında alkinlenmiştir. HA, streptococcus equi bakteri kaynaklı olarak alınmış ve sonraki azidlenmiştir.

Elde edilen hidrojellerin yapı karakterizasyonu Infrared spektroskopisi ile yapıldı. Morfolojik yapısına SEM analizi ile bakıldı. Camsı geçiş sıcaklığı DSC ile incelendi ve şişme davranışı takip edildi.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF BIODEGRADABLE BACTERIAL CELLULOSE-HYALURONIC ACID TISSUE SCAFFOLDS VIA CLICK REACTIONS AND THEIR APPLICATIONS

Nowadays, hydrogels prepared using biocompatible and biodegradable polymers have been used in different biological applications due to their unique biocompatibilities, flexible synthesis methods, and ease of processing in creating desired physical properties. Among these application fields, the most important area in which the hydrogels are used is the utilization of them as wound patches. A wound patch prepared by hydrogels creates a moist wound healing environment, ensures airflow, absorbs wound exudate and be easily removed without harming the wound.

In the light of these explanations, within the scope of this work, hydrogels including Hyaluronic acid (HA) and bacterial cellulose (BC) were prepared by click chemistry. Click chemistry promotes the usage of organic reactions that allow reacting of two molecular building blocks easily, selectively, and efficiently under mild reaction conditions without producing byproducts. The click chemistry is a very powerful tool for cross-linking two components and is based on 1, 3 dipolar cycloaddition between an azide and an alkyn group. It is aimed to maintain the mechanical stability of the fast biodegradable hyaluronic acid by preparation of HA-BC hydrogels through crosslinking HA and BC by click reaction.

The BC used in the study was produced by the microbial process using *Komagataeibacter oboediens* and then alkyn modified. HA was supplied from *Streptococcus equi* bacterial origin, and subsequently azidated.

The structural characterization of the obtained hydrogels was done by Infrared spectroscopy. Its morphological structure was analyzed by SEM analysis. The glass transition temperature was examined by DSC and the swelling behavior was followed.

SEMBOLLER

°C	: Derece Celsius
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
gr	: Gram
Kv	: Kilovolt
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
T :	Sıcaklık
Tg	: Camı geçiş sıcaklığı
%	:Yüzde

KISALTMALAR

BC	: Bakteriyel Selüloz
CuACC	: Bakır katalizli azid- alkin siklo katılma
DSC	: Diferansiyel Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı
ECM	: Ektra selüler matriks
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HA	: Hyalüronik Asit
HPMC	: Hidroksipropil Metil Selüloz
IPA	: İzopropanol
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Biyo polimerler ve uygulamalarla ilgili yayın atıflarının yıllara göre sayısı	4
Şekil 2.2. Biyopolimerlerin sınıflandırılması	6
Şekil 2.3 Biyopolimerlerin medikal alanda uygulamaları	10
Şekil 2.4 Bakır katalizli azid alkin katılması	13
Şekil 2.5. CuAAC reaksiyonu mekanizması	15
Şekil 3.1 NACl ilavesi sonrası organik ve su fazının ayrılması	25
Şekil 3.2 1-azido-3-kloro-propanol sentezi	25
Şekil 3.3 Sentezlenen HA-Azido aseton içerisinde çöktürülmesi	26
Şekil 3.4 A) 1-azido-2,3-epoksipropanın hazırlanması, B) HA azid grupları ile modifiye edilmesi	26
Şekil 3.5 Kurutulmuş BC	28
Şekil 3.6 BC ve modifiye edilmiş BC su içerisinde şişmesi	29
Şekil 3.7 Bakteriyel selüloz yapısı ve BC-alkin sentezi	29
Şekil 3.8 HPMC'un yapısı ve HPMC-Alkin sentezi	30
Şekil 3.9 HPMC-alkin vakum etüvünde kurutulmuş hali	30
Şekil 3.10 HA-azido,BC-alkin ve HPMC-alkin klik reaksiyonu ile hidrojel sentezi	32
Şekil 3.11 Hazırlanan hidrojeller	32
Şekil 4.1 1-azido-3-kloro-propanol FTIR spektrumu	33
Şekil 4.2 Hyalüronik Asit spektrumu	34
Şekil 4.3 HA-azido spektrumu	35
Şekil 4.4 HA ve HA-azido ¹ H NMR spektrumu	36
Şekil 4.5 Bakteriyel selülozün FTIR spektrumu	37
Şekil 4.6 Bakteriyel selüloz- alkin FTIR spektrumu	38
Şekil 4.7 Hidroksipropil Metil selüloz'un FTIR spektrumu	39
Şekil 4.8 Hidroksipropil Metil selüloz-Alkin FTIR spektrumu	39
Şekil 4.9 HPMC ve HPMC-alkin ¹ H NMR spektrumu	40
Şekil 4.10 Sentezlenen hidrojellerin FTIR spektrumu	41
Şekil 4.11 HA-HPMC DSC eğrisi	42
Şekil 4.12 HA-HPMC-25BC DSC eğrisi	43
Şekil 4.13 Hazırlanan hidrojellerin PBS içerisinde şişme öncesi	45
Şekil 4.14 Hazırlanan hidrojellerin PBS içerisinde şişme sonrası	45
Şekil 4.15 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x250büyüme ile)	46
Şekil 4.16 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x500 büyüme ile)	46
Şekil 4.17 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x1000 büyüme ile)	47
Şekil 4.18 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x5000 büyüme ile)	47
Şekil 4.19 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x250 büyüme ile)	48
Şekil 4.20 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x500 büyüme ile)	48
Şekil 4.21 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x1000 büyüme ile)	49
Şekil 4.22 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x2000 büyüme ile)	49
Şekil 4.23 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x5000 büyüme ile)	50
Şekil 4.24 Gözeneklilik hesabı	50
Şekil 4.25 Hazırlanan hidrojellerin su içerisinde şişme öncesi ve sonrası	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 YPM besi yeri içeriği.....	27
Tablo 3.2 HS besi yeri içeriği	27
Tablo 3.3 Hazırlanan hidrojellerin içerikleri	31
Tablo 4.1 Saf BC, HPMC ve hazırlanan hidrojellerin Tg değerleri	42
Tablo 4.2 Hazırlanan hidrojellerin dengede şişme oranları (%).....	44
Tablo 4.3 Hidrojellerin gözenekliliği ve ortalama gözenek çapları.....	51



1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Bu tez çalışmasında diyabetik ve şiddetli yanık yaralarında kullanılabilecek biyo malzeme geliştirilmesi hedeflenmektedir. Günümüzdeki mevcut tedavilerin bazı sınırlamaları vardır. Mevcut tedavide kullanılan pansumanlar yara üzerine yapışmakta, gaz akışına engel olmakta, yara ekstüdasını emmemektedir. Bu sorunlardan yola çıkarak ideal pansuman malzemesi elde etmek için Bakteriyel selüloz- Hyalüronik asit esaslı polimerik hidrojel sentezlenmesi hedeflenmektedir. Literatür taraması yapıldığında doku mühendisliği alanında bakteriyel selüloz- hyalüronik asit esaslı klik reaksiyonu ile ilde edilmiş hidrojel sentezi çalışması olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmada iki doğal biyopolimerin kendine özgü özelliklerinin çapraz bağlanarak birleştirilmesi ile biyouyumlu, nefes alabilen, şişebilen bir hidrojel yara örtüsü geliştirilerek literatüre katkı sağlanmak amaçlanmaktadır.

Hyalüronik asit (HA) yara iyileştirme özelliği ile bilinmektedir. Hyalüronik asit hücre dışı matrisin (ECM) hidratlı ortamını daha iyi taklit edebilirler fakat hızlı bozunurlar. Bu nedenle, HA'lerin kararlı hala getirilmesi ve mekanik sağlamlık kazandırmak için başka polimerle çapraz bağlanması alternatif bir yoldur. HA, hücrelerin hareketine ve çoğalmasına katkıda bulunur ve çok sayıda hücre yüzeyi etkileşimlerine katılır. Yüksek hidrofilikliğe sahiptir, ortamı nemli tutabilmektedir. Zararlı salgıyı emebilmektedir. HA ilaç taşıma sistemlerinde de kullanılır. Özel yaralarda ilaç yüklemesiyle kullanılabilir. Bu tez çalışmasındaki geliştirilen yapılar ileride çalışmaların temelini oluşturabilir.

HA'e mekanik sağlamlık kazandırmak için bakteriyel selüloz (BC) mükemmel bir adaydır. Selüloz hücre dışı polisakkaritlerin homopolisakkaritleri grubunda bulunur ve dünyada yaygın olarak kullanılan bir biyopolimerdir. Selülozun ana kaynakları bitki iken, bakteriler de selüloz üretebilir. Bu tez çalışmasında bitki kaynaklı yerine, bakteri kaynaklı selüloz seçildi. Bitki kaynaklı selüloz lignin ve hemiselüloz da içerir. Kimyasal maddeler ile lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılması gerekir. Öte yandan bakteriyel olarak üretilen selüloz da lignin ve hemiselüloz bulunmaz. Kimyasal malzeme kullanılmadığı için ve su ile de saflaştırılabilir olduğundan BC uygun biyo uyumlu bir malzeme adaydır. Bakteriyel selüloz eldesi biyouyumlu olduğu kadar da sürdürülebilir ve çevre dostudur. Ortamdaki glikoz eldesiyle kolaylıkla bakteriyel selüloz elde edilebilir. Gıda firmalarının

glikoz atıkları (meyve suyu fabrikaların meyve kabukları) ile de üretilmesi mümkündür ve atığın önüne geçilebilir.

Bu proje de BC-HA hidrojel eldesi çıt-çıt reaksiyon ile üretilmesi hedeflenmektedir. Işıkla hidrojel elde etmenin birtakım avantajları vardır. Bu avantajlardan bazıları çözücü kullanılmadığı için çevre dostudur. Oda sıcaklığında da üretilmesi mümkündür. Sıcaklık ihtiyacı olmadığı için ekonomiktir. Hızlı gerçekleşmektedir.

1.2 Amaç

Bu çalışmada deri üzerinde oluşan yaraları tedavi edebilecek ve derin deri kayıplarının yerini doldurabilecek deri eşdeğerleri oluşturulabilecek potansiyele sahip doğal polimerlerden elde edilen biyoyumlu ve biyobozunur hidrojel yara örtülerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla hidrojel sentezi için bakteriyel selüloz ve hyalüronik asit kullanılacaktır. Hyalüronik asit yara iyileştirme özelliği ile bilinmektedir. Hyalüronik asit hücre dışı matrisin (ECM) hidratlı ortamını daha iyi taklit edebilirler fakat hızlı bozunurlar. Bu nedenle, HA'lerin kararlı hala getirilmesi ve mekanik sağlamlık kazandırmak için başka polimerle çapraz bağlanması alternatif bir yoldur. Bu çalışmada mekanik olarak daha güçlü bir hidrojel elde etmek için hyalüronik asit, bakteriyel selüloz ile çapraz bağlanacaktır. BC, *Komagataeibacter oboediens* 'den üretilcektir. Bitkiden farklı olarak direk selüloz elde edilmektedir. Böylece ağır kimyasallar kullanılarak lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılmamaktadır. İki hidrojel öncüsünün özelliklerini kaybetmeden çapraz bağlanması için Azid-Alkin siklo katılması reaksiyonu kullanılacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

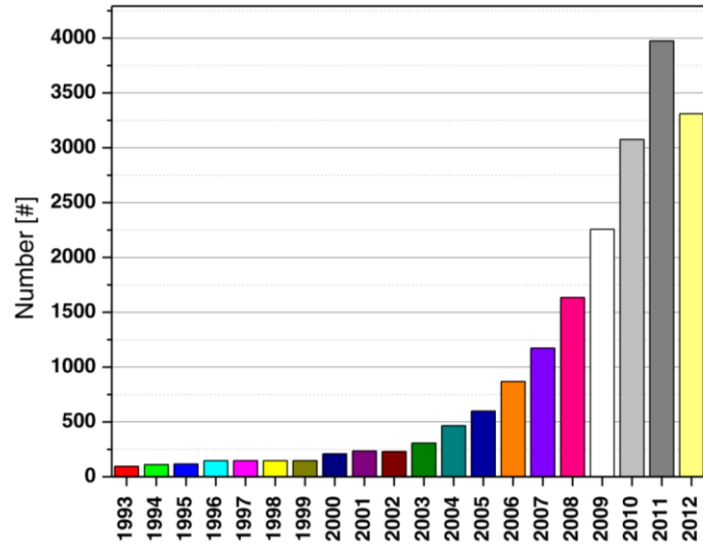
2.1 Biyopolimerler

Doğal biyopolimerler, canlı organizmalar tarafından üretilen polimerlerdir. Polimerik biyomoleküllerdir. Biyobozunur kimyasal bileşiklerdir ve ekosferdeki en organik bileşiktir. Biyopolimerler monomer birimlerinden oluşur; bu birimler kovalent bağlarla daha büyük yapılar oluşturur. Biyopolimerler, canlı organizmanın büyümesi sırasında sentezlendiklerinden doğal polimerler olarak da adlandırılırlar [1]. Biyopolimerlerin bazı örnekleri proteinler, karbonhidratlar, DNA, RNA, lipidler, nükleik asitler, peptitler ve polisakkaritlerdir. (glikojen, nişasta ve selüloz gibi). Biyopolimerler genel olarak doğal ve sentetik biyopolimerler olarak sınıflandırılabilir. Sentetik biyopolimerler iki tiptir: bozunamaz ve bozunabilir.

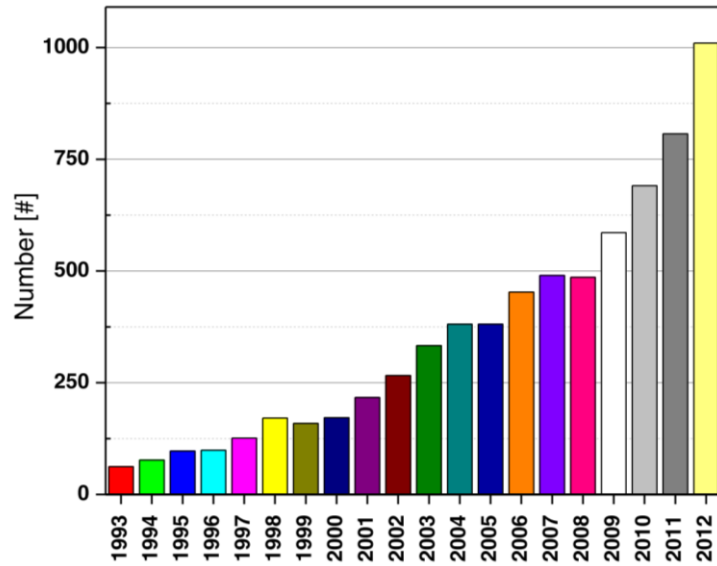
Dünyada her yıl yaklaşık 140 milyon ton sentetik polimer sentezlenmektedir. Atık plastikler gibi sentetik polimerler ve kanalizasyondaki suda çözünür sentetik polimerler çevre kirliliğine neden olur. Biyosferdeki polimerlerin bozunma döngüleri, son derece kararlı oldukları için sınırsızdır [2]. Plastikler ve polimerler günlük hayatımızın ayrılmaz bir parçası haline geldi. Bununla birlikte, stabilitesi ve bozulmaya karşı direnci nedeniyle, çevrede plastikler ve polimerler, çöp sahalarının ağırlıkça yaklaşık %8'i ve hacimce %20'si oranında birikmektedir [3].

Biyo-bazlı polimerlere dünya çapında ilgi, fosil yakıt bazlı olmayan polimerlerin bulunmasına duyulan istek ve ihtiyaç nedeniyle son yıllarda hız kazanmıştır. ISI Web of Sciences ve Thomas Innovations tarafından belirtildiği gibi, Şekil 2.1 'de gösterildiği gibi, son yıllarda biyo-tabanlı polimerler ve uygulamalarla ilgili yayın atıflarının sayısında muazzam bir artış vardır [4].

Biyo bazlı polimerler, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltarak ve azaltılmış karbondioksit emisyonları gibi ilgili olumlu çevresel etkiler yoluyla önemli katkılar sunar. Lead Market Initiative (Avrupa Birliği) ve BioPreferred (ABD) gibi girişimler yoluyla biyo-bazlı ürünlerin tercih edildiği yerlerde yasal çerçeve de değişiyor. Sonuç olarak, polimer üretimi için petrol türevi hammaddelerin yenilenebilir kaynak bazlı hammaddelerle değiştirilmesine yönelik dünya çapında bir talep vardır [5].



a: (Source: ISI web of sciences)



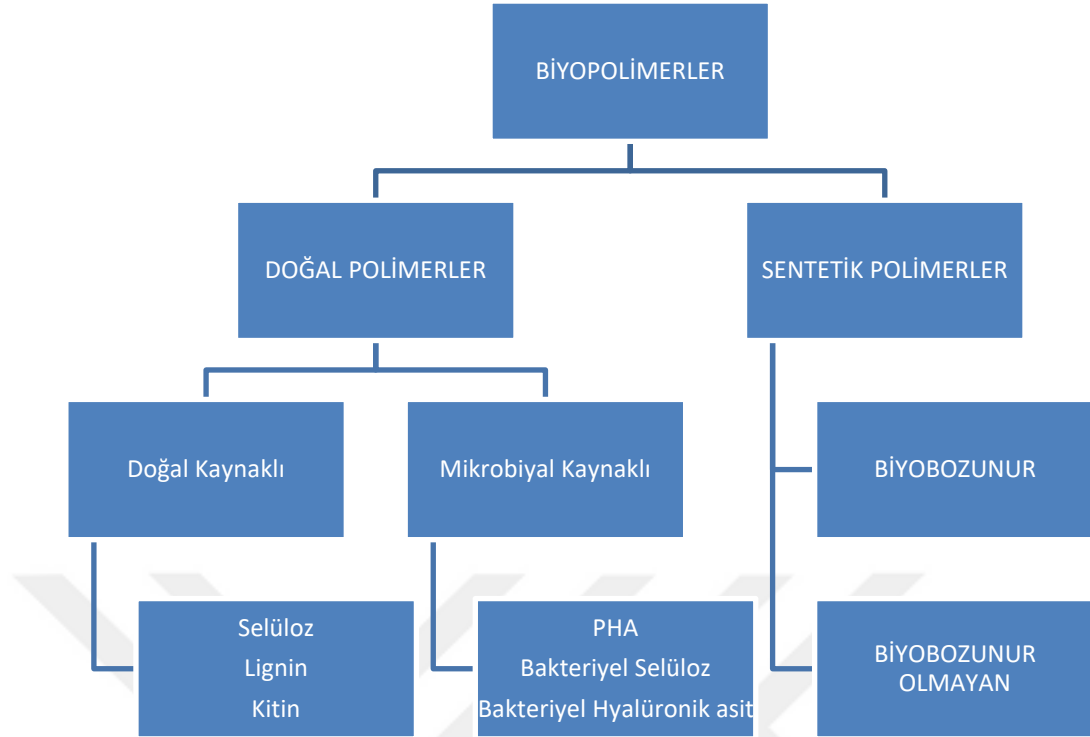
b:(Source: Thomas Innovations)

Şekil2.1 Biyo polimerler ve uygulamalarla ilgili yayın atıflarının yıllara göre sayısı [177]

Biyo-bazlı polimerler, yenilenebilir kaynaklardan üretilen malzemelerdir. Biyo-bazlı polimerler ve biyolojik olarak bozunabilir polimerler terimleri literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak iki tip polimer arasında önemli bir fark vardır. Biyobozunur polimerler, mikroorganizmalara, karbondioksit (aerobik) işlemlere, metan (anaerobik işlemler) ve suya (aerobik ve anaerobik işlemler) maruz kaldığında fiziksel ve kimyasal özellikleri bozulan ve tamamen bozulan malzemeler olarak tanımlanır. Biyo-bazlı

polimerler biyolojik olarak parçalanabilir (örneğin, polilaktik asit) veya parçalanamaz (örneğin, biyo-polietilen) olabilir. Benzer şekilde, birçok biyolojik bazlı polimer biyolojik olarak parçalanabilirken (örneğin, nişasta ve polihidroksialkanoatlar), biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin tümü biyolojik bazlı değildir (örneğin, polikaprolakton) [6].

Biyo-bazlı polimerler, biyolojik, fiziksel veya kimyasal yöntemler kullanılarak biyokütle kaynaklarından üretilir. Biyolojik olarak parçalanabilirliklerine göre, biyolojik bazlı polimerler, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak parçalanamayan polimerler olmak üzere iki geniş kategoriye ayrılabilir [7]. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, selüloz, lignin ve kitin dahil olmak üzere biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, fiziksel veya kimyasal yöntemler kullanılarak doğrudan bitki ve hayvanlardan üretilebilir. Alternatif olarak, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler biyolojik fermentasyon [8] (PHA, bakteriyel selüloz) veya kimyasal sentez (poli(laktik asit) gibi) ile de elde edilebilir. Kısmen biyokütleden sentezlenen biyobozunur olmayan polimerler arasında poliüretan, polyester, poliamid 56, poliolefin, epoksi ve fenolik reçine bulunur. Yenilenebilirlik ve biyoyumluluk biyo-tabanlı polimerleri yeşil malzemeler olarak çekici kılar ve bu polimerlerin biyomedikal alanda da potansiyel uygulamaları vardır [9-11].



Şekil 2.2. Biyopolimerlerin sınıflandırılması

2.2 Mikrobiyal Kaynaklı Biyopolimerler

2.2.1 Bakteriyel Selüloz

Yeryüzünde en bol bulunan polimer olan selüloz, bitkiler, mantarlar, algler ve bakteriler tarafından üretilir. Tek başına selüloz hamurunun yıllık üretimi 1014 tona ulaşabilir [12,13]. Bakteriler tarafından üretilen selüloz, 1886 yılında İngiliz bilim adamı A.J. Brown tarafından keşfedilmiştir. [14]. Bitki kaynaklı selülozdan ayırt etmek için mikrobiyal selüloz veya bakteriyel selüloz olarak adlandırılır.

Asetobacter, BC'yi sentezlemek için kullanılan en eski türdür. Daha sonra BC'nin *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Escherichia* gibi bakterilerde de üretilbildiği bulunmuştur [15]. Bunlar arasında, *Acetobacter xylinus* (Eşanamlıları *Gluconacetobacter xylinus*, *Komagataeibacter xylinus*) şu anda selüloz sentezlemede en güçlü yeteneğe sahip suş olarak kabul edilmektedir. Bakteriyel selülozun biyosentezi, çeşitli enzimlerin [16] etkileşimi ile UDP-glukozun α -1, 4-glukan zincirlerine polimerizasyonudur ve daha sonra bakteri hücrelerinin gözeneklerinin bir şerit halinde soyulmasıyla mikrofiberler oluşturulur. BC'de her bir glukosil halkasında üç hidroksil grubu vardır, bu nedenle mikrolifler, çok sayıda hidrojen bağı nedeniyle 10-100 nm çapında bir lif demeti halinde kendiliğinden birleşir [17] ve daha sonra doğal bir BC elde

etmek için çok sayıda gözenekli ağ üç boyutlu bir nanolif oluşturur. [18].

BC kültürünün yöntemleri kabaca statik kültür, çalkalama/sallama kültürü ve biyoreaktöre ayrılabilir [19]. BC filmi, aerobik bakteriler tarafından üretilen BC nedeniyle statik kültürde ortam ve hava arasındaki gaz-sıvı arayüzünde üretilir. Bu nedenle, statik kültürde BC filminin toplam verimi, gaz-sıvı ara yüzünün yüzey alanı ile doğrudan ilişkilidir [20]. Statik kültürün hazırlama ve saflaştırma yöntemleri basittir, yani gaz-sıvı ara yüzeyinde toplanan BC jel tabakaları, sıcak su ve sodyum hidroksit ile saflaştırılır ve daha sonra saf BC filmi elde etmek için nötr bir pH'a ulaşmak için büyük miktarda su ile yıkanır. Ancak yüksek maliyet ve düşük verimlilik, sınırlı hava temas alanı nedeniyle statik kültürde iki ana sorundur [21]. Üretkenliği artırmak için, ortamdaki oksijen taşıma oranını artırmak için Ajitasyon/sallama kültürü geliştirilmiştir [22]. Bununla birlikte, çalkalama kültürü tarafından üretilen BC'nin, statik kültüre kıyasla daha düşük bir polimerizasyon, kristallik ve mekanik özelliklere sahip olduğu [23] ve selüloz negatif mutantının (CEI) üretilmesinin kolay olduğu ve bunun sonucunda verimin azalmasına neden olduğu bulunmuştur [24]. Bu nedenle, ajitasyon kültürünün, BC'nin üretkenliğini önemli ölçüde artırmadığı rapor edildi [24,25]. Statik ve ajite kültürlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek ve BC'nin endüstriyel üretimini sağlamak amacıyla, BC'nin verimini artırmak için biyoreaktör kültürü çalışılmıştır. Biyoreaktör kültürü, BC'nin verimini bir dereceye kadar artırmış olsa da yüksek verim ve BC'nin iyi performansını aynı anda karşılayabilen bir biyoreaktör kültür yöntemi ortaya çıkmamıştır [19]. Bu nedenle, statik kültür zamanı, uzun ve verimi düşük olsa da iyi özellikte BC üretebildiğinden, laboratuvar ölçeğinde BC hazırlamak için hala en yaygın tekniktir.

Ayrıca, BC verimi üzerinde suşların ve kültür koşullarının önemi nedeniyle, genetik tekniklerle bulunan yüksek verimli mutantlar ve optimize edilmiş kültür koşulları, BC verimini artırmak için ana araştırma yönleridir [20]. Üretim maliyetlerini azaltmak için, bazı raporlar, tütün atığı özütü [26], tarımsal yan ürünler [27], toksik aromatik hidrokarbonlar [28], şeker pancarı gibi düşük maliyetli endüstriyel yan ürünlerin veya endüstriyel atıkların [29] melas ve peynir altı suyu [30] vb., BC üretimi için iyi beklentilere sahip olan karbon veya azot kaynakları olarak kullanılabilir. Ayrıca, bazı çalışmalar, etanol [31], agar [32], sodyum aljinat [33] gibi fermantasyon ortamına belirli katkı maddelerinin eklenmesinin sadece BC üretimini artırmakla kalmayıp aynı zamanda BC kristalinitesinde de bazı değişiklikler olduğunu göstermiştir. Mekanik mukavemet,

parçacık boyutu vb. Buna rağmen, BC'nin üretim maliyetleri ve üretkenliğinin üstesinden gelmek hala zor. Bitki selülozu ile karşılaştırıldığında, bakteri selülozu daha mükemmel özelliklere sahiptir. Örneğin, bakteriyel selüloz yüksek saflığa sahiptir.

BC, lignin, hemiselüloz ve diğer safsızlıklar içermediğinden saflaştırma işlemi basittir. Ayrıca, neredeyse hiç reddetme ve inflamatuvar reaksiyona sahip değildir ve biyotıp araştırmaları için mükemmel biyoyumluluğa sahiptir [34]. BC yüksek derecede polimerizasyona sahiptir, örneğin *Acetobacter xylinus* selülozun polimerizasyon derecesi 16.000'e kadar çıkabilir. Ek olarak, BC'nin kristallliği %95'e kadar yüksektir ve Young'ın BC monofilament modülünün 114 GPa'ya kadar çıkabileceği bildirilmiştir [18]. Böylece, mükemmel mekanik özelliklerine dayanarak, ses hoparlörü diyaframı [35], gıda ambalaj filmi [36], koruyucu film [37] ve kulak zarı perforasyonunu tedavi etme [38,39] vb. için geliştirilmiştir. Yüksek gözenekliliği ve üç boyutlu yapısı BC'nin en büyük üstünlüğü; bu nedenle, yüksek gözenekliliği ve geniş özgül yüzey alanı nedeniyle algılama malzemeleri [40] ve fotokatalistler [41] alanlarında kullanılmaktadır. Bu arada, uygun geçirgenliği, higroskopikliği, su tutma kapasitesi ve esnekliği nedeniyle hücre kültüründe [42] ve yara pansumanında [43] yaygın olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, BC, sentez sırasında iyi kontrol edilebilirliğe ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahiptir, bu da onu tıp alanında tercih edilmesini ve doku mühendisliği yapı iskelelerinde [44], kontrollü salınımlı ilaçlarda [45] ve diğer araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlar. Bu özelliklerinden dolayı BC, gıda, kozmetik [46], kapasitörler [47], biyomedikal ve doku mühendisliği, fonksiyonel malzemeler ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılabilir.

2.2.2 Bakteriyel Hyalüronik Asit

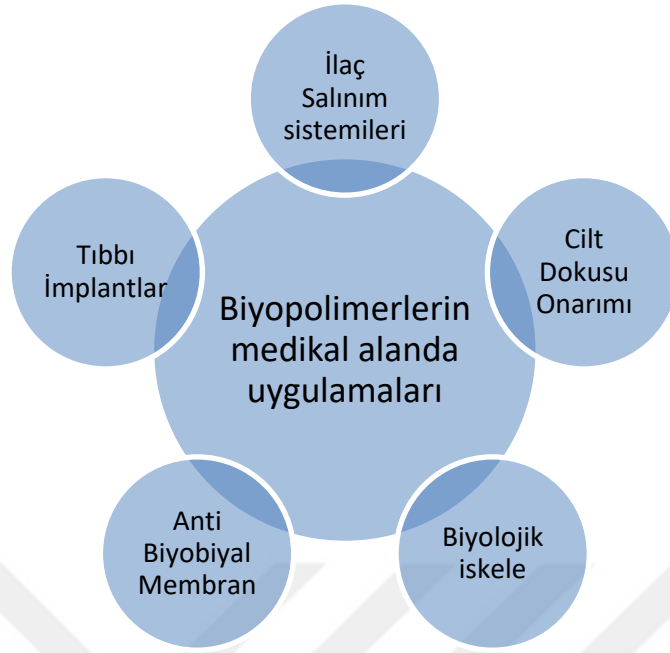
Hyaluronan olarak da bilinen hyalüronik asit (HA), b4-glukuronik asit (GlcUA)-b3-N-acetylglucosamine (GlcNAc)'nin tekrarlayan disakkaritlerinden oluşan lineer bir glikozaminoglikandır (GAG). HA ilk olarak sığır gözünün vitreus gövdesinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır [48]. Sonunda bu polisakkaritin, omurgalı dokularının (beyin, göbek kordonu, eklemler arasındaki sinovyal sıvı, deri, horoz tırağı, nöral dokular ve epitel) birçok yerinde farklı konsantrasyonlarda ve moleküler ağırlıklarda her yerde ve her yerde dağıldığı bulundu [49].

Hyalüronik asit, doğal olarak negatif yüklüdür (karboksilat grupları nedeniyle) ve bu, yüksek oranda viskoz bir jel oluşturan büyük miktarda suya bağlanmasına izin verir. Bu

anyonik jel benzeri polimer sadece eklemler için kayganlık sağlamakla kalmaz, aynı zamanda çevre dokular için bir şok emici görevi görür [49]. Ayrıca insanlarda ve diğer omurgasızlarda immün yanıtı başlatmadığından immünojenik değildir [50]. Eşsiz biyoyumluluğu ve viskoelastik özelliklerinden dolayı ilaç dağıtımı, oftalmik cerrahi, osteoartrit tedavisi ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalara uygundur [51]. Ayrıca kozmetik uygulamalarında, özellikle dermal dolgu maddeleri ve nemlendiriciler olarak kullanılmaktadır [52]. HA, birçok memeli biyolojik sürecinde yer alan bir sinyal molekülü olarak kabul edilir ve iltihaplanma, tümörijeniz ve anormal bağışıklık fonksiyonu gibi çeşitli hastalıklara neden olan olaylarda kritik roller oynar [53-55]. HA bir bağışıklık tepkisi başlatmadığından, *Streptococcus zooepidemicus* gibi bakteriler, hücrelerini kapsüllemek ve konakçının bağışıklık sisteminden tespit edilmekten kaçmak için moleküler taklit sergilemek için bir araç olarak HA'yı sentezler [56-57]. HA ayrıca *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Pasteurellamultocida* ve *Cryptococcus neoformans* dahil olmak üzere diğer patojenik bakteriler tarafından da doğal olarak üretilir [58-60].

2.2.3 Biyopolimerlerin Medikal Uygulamaları

Biyopolimerler tıbbi cihazlarda, su arıtmada, paketlemede, gıda katkı maddelerinde, kozmetikte, giysi kumaşlarında, emicilerde, endüstriyel plastiklerde, biyosensörlerde ve hatta veri depolama elemanlarında kullanım potansiyeline sahiptir. Biyopolimerler, kayda değer biyoyumlulukları ve biyobozunurlukları nedeniyle, biyomedikal uygulamalarda, özellikle de ilaç dağıtım sistemleri, doku mühendisliği, yara tedavisi, diyaliz membranı ve insan sağlığının iyileştirilmesinde alanında önemli bir role sahiptir [61].



Şekil 2.3 Biyopolimerlerin medikal alanda uygulamaları

2.3 DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği, doku fonksiyonunu iyileştiren veya iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır [62,63]. Doku mühendisliğinde hücreler, üç boyutlu dokunun yapısını taklit etmek için destekleyici bir sisteme gömülür. Üç boyutlu yapı iskeleleri, hedef dokunun özel biyolojik, mekanik ve fiziksel özelliklerini özetleyerek bu tür destek sistemleri oluşturabilir. Deri, iki tipik dermis ve epidermis tabakasına sahip bir dokudur. Daha yüksek esneklik ve gözenekliliğe sahip daha kalın bir alt tabaka olan dermis, gevşek bağ dokusu içerir ve epidermisi besler. Epidermis, çevresel patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir bariyer oluşturmak için skuamöz yapılı ve alt gözenekli keratinositleri içeren cildin ince üst tabakasıdır [64-66].

Epidermis, dermis ve deri altı dokudan oluşan cilt, iyi esneklik ve rejeneratif kapasiteye sahip vücudun en büyük bariyer organıdır. Ancak cilt bütünlüğü ameliyat, yanıklar, diyabet, tümörler ve diğer nedenlerle tehlikeye girebilir. Cilt hasar gördüğünde, vücut daha fazla hasarı önlemek için hasarlı cildi onarmak için karmaşık reaksiyonlar veya cildin koruyucu işlevini geri yüklemek için enfeksiyon başlatır [67].

Akut yaraları tedavi etmek için suni deri ve pansuman gereklidir. Bununla birlikte, mevcut ticari yara örtüleri, cilt yenilenmesi için ideal bir örtü malzemesinin özelliklerini

karşılamamaktadır [68]. İdeal bir pansuman için iki ana gereksinim, iyileşme sürecinde yara eksüdalarını emme yeteneği ve tam iyileşmeden sonra kolayca çıkarılmasına yol açan yaraya yapışmamasıdır. Pamuklu gazlı bez, geçirgen ve emici olan en ünlü pansuman malzemesidir; ancak yaraya yapışarak pansuman değişimi ve tam iyileşmeden sonra çıkarılması sırasında ikincil yaralanmalara yol açar, bu da iyileşme sürecini uzatır [68]. Yukarıda bahsedilen eksikliklerin üstesinden gelmek için, doku mühendisliği ile ilgili doku materyallerini kusurlu doku rejenerasyonu oluşturmak için kullanmak için bir yöntem geliştirilmiştir [69-71]. Doku mühendisliğinin anahtarlarından biri, biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilir ve emilebilir hücre iskeleleri hazırlamaktır [72-74].

Doku mühendisliği yapı iskelelerini inşa etmenin özü, hücre dışı matris (ECM) ortamını simüle etmek için çeşitli materyaller kullanmaktır [75,76]. Hidrojel, malzemelerin taşınmasını kolaylaştırmak için yüksek bir su içeriğine sahip olduğundan, zengin gözenek yapısı spesifikliği arttırır. Yüzey alanı ve bu özellikler hücre dışı matrise benzer [77]. Bu nedenle, hücre dışı matrisi simüle etmek ve doku mühendisliği yapı iskelesi oluşturmak için hidrojel kullanmak yaygın bir yöntemdir [78,79].

2.4 HİDROJEL

Hidrojeller, benzersiz biyoyumlulukları, esnek sentez yöntemleri, bileşen çeşitliliği ve arzu edilen fiziksel özellikleri nedeniyle birçok biyolojik uygulama için tercih edilen malzeme olmuştur [80]. Hidrojeller, ağırlıkça ≥ 90 su içeriğine sahip bir hidratlı polimerik malzeme sınıfıdır [81-83]. Yabancı cisim yanıtının olmaması ve yüksek oksijen geçirgenliği nedeniyle kontakt lensler ve göz içi lensler gibi uygulamalar için 1960'lı yıllardan beri kullanılmaktadırlar [83]. Bununla birlikte, silikon hidrojel kontakt lenslerle bazı kişilerde inflamatuvar yanıtlara neden olan çeşitli biyoyumluluk sorunları vardır [84]. Hidrojeller insan vücudunda kullanılmak üzere geliştirilen ilk polimer türleriydi [85,86]. Doku mühendisliği alanı ivme kazanmadan önce bile, 1980'lerde hücreleri kapsüllemek için hidrojeller zaten kullanılıyordu [87]. Günümüzde hidrojeller, yara iyileşmesi gibi klinik uygulamalar için kullanılmaktadır [83] Daha yakın zamanlarda, hidrojeller hücrelerin büyümesi için biyomimetik 3D mikro-ortam sağlamak için yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır [85,88,89]. Hidrojellere kökenlerine, dayanıklılıklarına, çevresel uyaranlara tepkilerine, yüklerine, yapılarına veya bileşimlerine göre çok sayıda sınıflandırma uygulanmıştır [90].

Ek olarak, hidrojel, doğal ECM'ye yapısal ve bileşimsel benzerliklerinden dolayı ilgi çekerler. Bu malzemeler, hücresel bağlanmayı, moleküler tepkileri, yapısal bütünlüğü, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve biyouyumluluğu kontrol etmek için kolaylıkla tasarlanabilir [80]. İdeal hidrojel iskelesi, doğal ECM'nin özelliklerini taklit edebilir ve ayrıca hücre bağlanmasına ve göçüne izin verir [91,92], hücreleri ve biyokimyasal faktörleri iletir ve tutar [91], difüzyonu mümkün kılar. [80] ve son olarak hücrenin davranışını değiştirmek için mekanik ve biyolojik etkiler uygular [93, 94]. Böyle bir yapı iskelesi oluşturmak için mühendisler, doğal gözenek boyutunu, mekanik mukavemeti, hücresel bağlanmayı, moleküler yanıtı, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve çözünen taşınımını yakından taklit eden yüksek bir yüzey alanı/hacim oranı oluşturabilen doğal ve/veya sentetik hidrojel kullanırlar. [91, 80].

Polisakkaritler, biyolojik olarak parçalanabildikleri ve doğada bol oldukları için doku mühendisliği ve taşıyıcılar için yapı iskelesi olarak potansiyel adaylardır [95]. Bunlar arasında Hyalüronik asit (HA), doğal hidrofilikliği, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve uyumluluğu nedeniyle bu hidrojel için değerli bir başlangıç malzemesidir [96]. Bununla birlikte, HA çözeltileri kısa bir yarı ömre sahiptir, bu nedenle, daha uzun kalma süresi ve mekanik sağlamlığa sahip hidrojel elde etmek için HA tercihen kimyasal modifikasyon ile stabilize edilir [97].

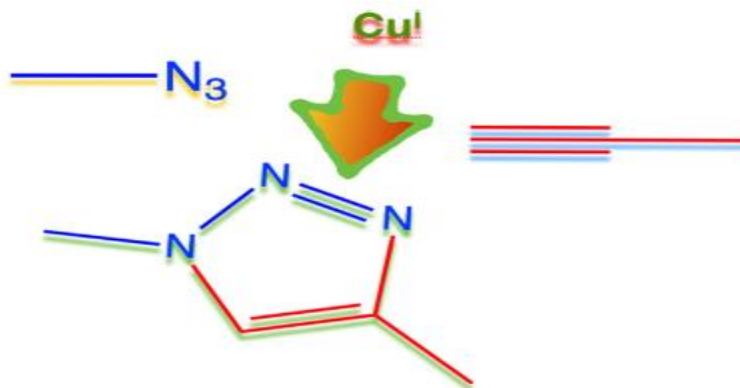
Selüloz türevlerine dayalı hidrojel, genellikle hem geleneksel hem de yenilikçi hidrojel özelliklerini ilişkilendirdikleri için merhem bazları olarak özellikle çekicidir. Ayrıca, selüloz türevlerinin doğadaki büyük bulunabilirliği, toksik olmaması ve düşük maliyeti, bu polimerleri farmasötik hidrojel hazırlanması için ilk tercih hammaddeler olarak öneren diğer önemli özellikleri temsil eder [98].

Hidrojel genellikle ağ oluşumundan sorumlu jelleştirici ajan ve sulu bir sıvı araç olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Farmasötik birleştirilmiş ve endüstriyelendirilmiş topikal hidrojel formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan jelleştirici maddeler arasında, metilselüloz, karboksimetil-selüloz ve hidroksipropilmetilselüloz (HPMC) gibi selüloz türevleri (selülozikler olarak da anılır) bulunur. Selüloz türevlerine dayalı hidrojel, genellikle hem geleneksel hem de yenilikçi hidrojel özelliklerini ilişkilendirdikleri için merhem bazları olarak özellikle çekicidir. Ayrıca, selüloz türevlerinin doğadaki büyük bulunabilirliği, toksik olmaması ve düşük maliyeti, bu polimerleri farmasötik

hidrojellerin hazırlanması için ilk tercih hammaddeler olarak öneren diğer önemli özellikleri temsil eder [98].

2.5 KLİK KİMYASI

“Çıt-Çıt kimyası” terimi ilk olarak 2001 yılında Sharpless tarafından tanıtıldı [99] ve yaygın olarak kullanılan, parçaları çok verimli ve güvenilir bir şekilde birbirine bağlayabilen bir dizi reaksiyonu ifade eder. Bu tip reaksiyonlar arasında siklo eklemeler [100,101], nükleofilik halka açılıkları [102], aldol olmayan tipte karbonil kimyası [99] ve karbon-karbon ilaveleri [103] yer alır. Bakır katalizli azid-alkin 1,3-dipolar siklo ilavesi (CuAAC), bu gruptan en iyi bilinen reaksiyondur ve genellikle "klik kimyası" olarak adlandırılır. Klik reaksiyonu, 1963'te Huisgen tarafından rapor edilen, azidlerin dipolarofillerle 1,3-dipolar siklo ilavesinden kaynaklanır [104]. Bağımsız çalışmalarda, Sharpless [99] ve Meldal [105] araştırma grupları, azidlerin terminal alkinlerle 1,3-dipolar siklo ilavesinin bakır(I) kompleksleri tarafından katalize edildiğinde daha da geliştirilebileceğini kanıtladı. CuAAC reaksiyonları yüksek verimlidir ve basit saflaştırma yöntemleri sunar. Ayrıca, ılımlı koşullar altında gerçekleştirilebilir, minimum yan ürünler üretebilir, stereospesifik ve kemoselektif olabilirler. Bir bakır kompleksinin varlığında, bir azid ve bir terminal alkin grubu arasındaki siklo ilavesi gerçekleşir ve 1,2,3-triazol halkası ile sonuçlanır (şekil 2.4). Siklo ilavesinin ürünü (triazol) büyük bir potansiyel ile oluşur ($G^\circ > -60 \text{ kcal mol}^{-1}$) [106] ve bakır ligand türlerinin kullanımı, triazolün oluşumunun yanı sıra 1,4-regioizomer için yüksek bölgesel seçicilik sağlamaktadır [107-110].

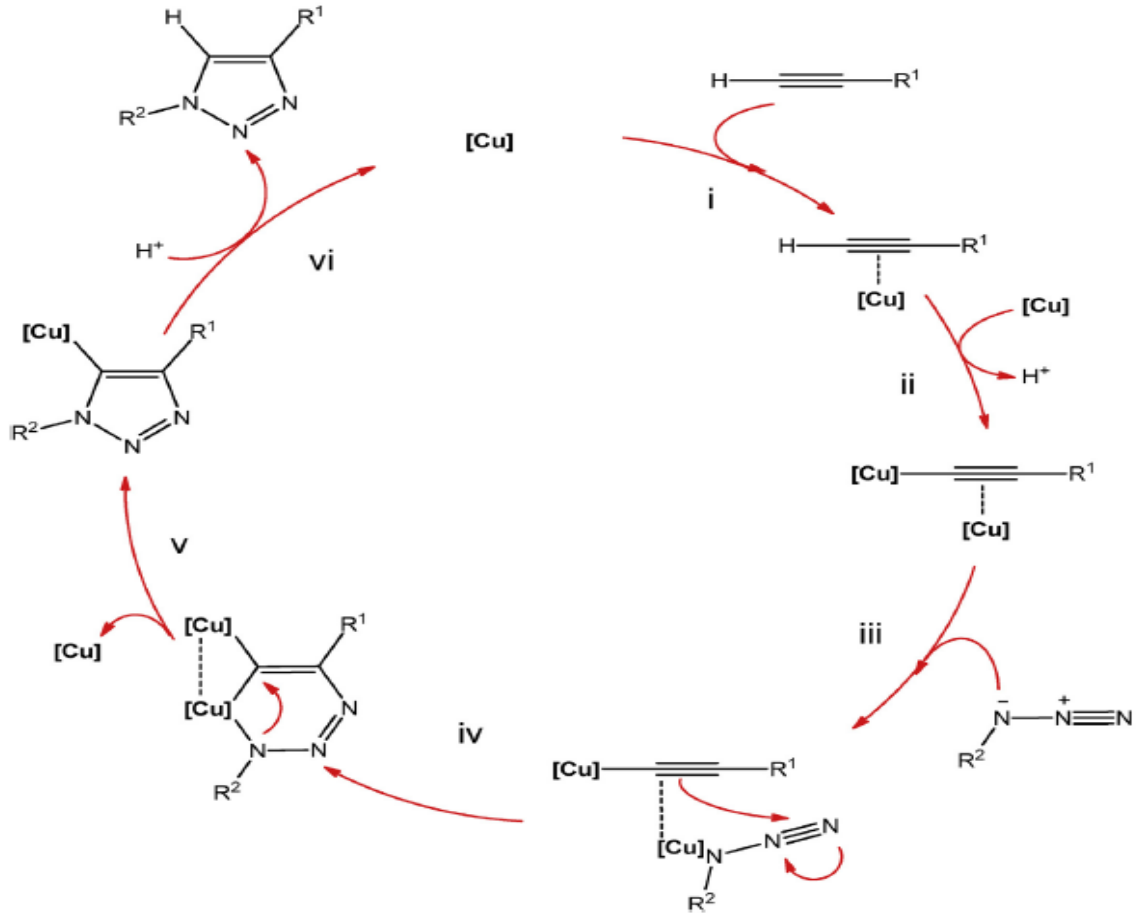


Şekil 2.4 Bakır katalizli azid alkin katılması [111]

2.5.1 Bakır Katalizli Klık Kimyası

Fokin ve çalışma arkadaşları [108,109] Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) hesaplamaları ve kinetik çalışmaları (şekil 2.5) kullanarak bir CuAAC reaksiyonu mekanizması önerdiler. Reaksiyonun ilk adımında, alkinil mekanizması, bakır asetilid türlerini oluşturan bir bakırla koordine edilir. Daha sonra azid ikinci bir bakır atomu koordinasyonu ile aktive edilir. Bir sonraki adımda, ilk C-N bağı oluşturulur. Siklizasyon gerçekleşir ve triazol halkasının oluşumu için Cu(I) hariç tutulur. Daha ayrıntılı olarak, reaksiyon mekanizması, katalitik döngünün ilk adımının (i), bir alkinin bir Cu(I) türü ile π -koordinasyonu ile elde edilen bir bakır (I) asetilid kompleksinin oluşumu olduğu yerde tarif edilir. Bu, alkinin hidrojen asitliğini artırır ve halihazırda aktif hale getirilmiş alkin ile bakır asetilid oluşumuna izin verir. Bir sonraki (ii) adımında, bakır asetilid, bir amin bazı ilave edilmeden bile sulu çözücülerde oluşan σ -koordineli bir komplekstir. Ancak sulu olmayan çözeltilerde, reaksiyonun tamamlanması için bir amin bazının eklenmesi zorunludur [106]. Bir sonraki adımda (iii) π koordineli bakır merkezinde bir azidin koordinasyonu gerçekleşir. Bu koordinasyon ya azidin terminal nitrojeni ya da ikame edilmiş nitrojen aracılığıyla gerçekleşir. İkame edilmiş nitrojen, π -kabul eden terminal nitrojenin aksine π -vericidir. İkame edilmiş nitrojenden (iv) gelen koordinasyon, metal merkezindeki elektron yoğunluğunu artırır [112], bu da oksidatif eşleşme ile sonuçlanır [113]. Asetilidin α -karbonunda oluşan bakır kompleksinin π koordinasyonu, β -karbonun nükleofilik saldırısını yönlendirir ve 1,4-bölgesel izomer seçiciliğine yol açan başlıca gerçektir [114]. Bu nükleofilik saldırı, terminal elektrofilik nitrojende meydana gelir ve oksidatif eşleşme üzerine altı üyeli bir halka oluşur [115]. Katalitik döngünün son adımları (v ve vi), triazolidin oluşumu için indirgeyici eliminasyon yoluyla Cu (I)'nin çıkarılmasıdır [116] veya katalitik döngüye devam etmek için, triazolidin oluşumu ve fotolizden sonra triazol halkasının bileşimidir. Çözücünün başarılı seçimi, çit-çit reaksiyonundaki en önemli özelliklerden biridir. Seçilen çözücüler ligand değişimini iletir ve reaksiyon için olumsuz sonuçlara yol açabilecek polinükleer bakır asetilidin oluşmasını önler. Ayrıca, reaktiviteyi artıran monometalik ve bimetalik Cu(I) komplekslerinin sayısız örneği vardır ve CuAAC reaksiyonu oldukça verimlidir [108,117,118]. Cu(I) kompleksinin doğasının, katalitik döngü doruk noktasının yanı sıra CuAAC reaksiyon mekanizmasını destekleyen ligandların kullanımı için gerekli olduğunu belirtmekte fayda vardır [119]. Son olarak, köprüleyici ligandlar, katalitik

döngüde triazol oluşumu için gerekli olmasa da bakır kompleksini oksidasyondan koruyarak reaksiyon hızını artırma ve polimerik komplekslerin oluşumunu önleme eğilimindedir [120-122].



Şekil 2.5. CuAAC reaksiyonu mekanizması

CuAAC reaksiyonunun temel yönlerinden biri, bileşik sentezi basitleştiren ve çok çeşitli alanlarda "klik kimyası"nın kullanılmasını sağlayan sağlam ve basit sentetik prosedürüdür [123]. Ayrıca çeşitli biyolojik ve kimyasal uygulamalar tıklama reaksiyonlarına dayanmaktadır [124]. Bu nedenle CuAAC, araştırma topluluğu arasında en umut verici sentetik yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir. Biyolojik araştırmalarda klik reaksiyonu, ilaç keşfi [125,126], tıbbi uygulamalar [127] (örneğin protein etiketleme) ve biyokimyasal çalışmalar [128] için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, "klik kimyasının" malzeme biliminde büyük etkisi olduğu düşünülmektedir. [129-131], özellikle polimerlerin [132,133] ve dendrimerlerin [134,135] yeni yapılarının yapımında. Cu(I)-katalizli reaksiyonun sahip olduğu seçicilik, biyokonjugasyon alanında

önemli bir avantaj içerir.

Bu tez çalışmada, klik kimyası ile HA ve BC hidrojel­leri hazırlanmıştır. HA 1-azido-2,3 propan ile modifiye edilir ve BC propargil bromür ile modifiye edildi. Bu moleküllerin ve katalizör olarak Cu (I)'nin bir karışımı, oda sıcaklığında kısa sürede hidrojel­ler üretildi.

2.6 Biyobozunur Bakteriyel Selüloz-Hyalüronik Asit Doku İskelelerinin Uygulamaları

BC'nin benzersiz yapısal ve mekanik özellikleri, onu gıda, elektronik ve tıp gibi çeşitli uygulamalarda kullanıma uygun hale getirir [136-138]. Bununla birlikte, tüm uygulamalar arasında BC, yara iyileştirme ve yara bakım ürünlerinde olağanüstü bir potansiyel ortaya koymuştur. Enfeksiyon ve iyileşme sürelerini ele alan gelişmiş yara bakım ürünleri ve hizmetlerinin faydası sağlık sektöründe devrim yaratacak, etkisi insan nüfusunun tamamı için dikkate değer olacaktır. Daha önce bahsedildiği gibi BC, yüksek kristallik, su tutma ve emme kapasitesi, çözücülerde düşük çözünürlük ve yüksek gerilme mukavemeti gibi değerli özelliklere sahiptir. Bu özelliklerin tümü cilt onarım malzemeleri için faydalıdır.

İyi bir yara onarım materyali, uygulama ve çıkarma sırasında ve sonrasında eksüdayı absorbe edebilme gibi önemli bir özelliğe sahiptir. Halihazırda mevcut yara bakım malzemeleri, kurumuş yara yüzeylerine yapışan gazlı bezler gibi geleneksel olarak iyi absorbans ve geçirgenlik göstermiştir, ancak çıkarıldığında travmaya ve yara bölgesinde hasara neden olabilir [139]. BC'nin mevcut yara bakım malzemelerine göre özellikleri göz önüne alındığında, BC, mevcut pansumanlarla ilişkili düşüşlerin üstesinden gelme konusunda inanılmaz bir umut vaat ediyor. Sonuç olarak, BC membranları ya yara örtüleri ya da deri ikameleri olarak kullanılmıştır. Bakteriler tarafından üretilen zar, pelikülü suyla yıkayarak kültürden doğrudan kullanılabilir. BC, gerektiğinde tam yara iyileştirme uygulamasına uyması için daha fazla işlenebilir.

20. yüzyılın sonlarında, BC ilk olarak şimdi Dermafill™ olarak bilinen BioFill® ticari adı altında geçici bir cilt ikamesi ve biyolojik pansuman olarak kullanıldı [136]. Ürün, yanıklar, dermabrazyon, kesikler ve ülserler sonucu çeşitli cilt yaralarından mustarip hastaları tedavi etmeye yönelikti. O zamandan beri, yara iyileşmesi için topolojik uygulama için birçok BC bazlı ürün ticari olarak mevcuttur. Çalışmalar, BC membran bazlı pansumanların kullanımının yara ağrısını azaltmada, eksüdayı tutmada, yeniden

epitelizasyonu hızlandırmada ve kolaylaştırmada, toplam iyileşme sürelerini kısaltmada, enfeksiyon oranlarını azaltmada ve görünür yara izini azaltmada geleneksel malzemelere üstünlük sağladığını göstermektedir [140,141,136]. Ayrıca, BC sargısının yarı saydamlığı nedeniyle, membranın hastadan çıkarılması veya müdahalesi olmadan yarayı incelemek son derece basit ve kolaydır.

Yara iyileşme sürecinde, verimli iyileşme süreleri için doğru nem seviyelerinin korunması gerekir. Yüksek su tutma özelliğine sahip olan BC, yara bölgesinin ideal nem koşullarına sahip olmasını sağlar. Ayrıca, nanofiber ağı sayesinde membran, yara bölgesine bakterilerin sızmasını önleyebilecek fiziksel bir bariyer oluşturarak enfeksiyon riskini önleyerek enfeksiyonu önleyecektir [142,143]. Yanık kurbanlarında cildin ısınması, cildin en dış tabakasındaki (stratum corneum) lipoprotein tabakasıyla ilişkili yarı geçirgen zarın parçalanmasına neden olur [144]. Stratum corneum yok edildiğinde, yanık hastalarında hipermetabolizmaya yol açabilen büyük derecede ısı kaybıyla ilişkili önemli buharlaşarak su kaybı olur [145]. BC'nin yüksek su emiciliği, su tutma ve buhar iletim özellikleri, yara eksüdasının pansuman içine kilitlendiği ve aynı zamanda iyileşme sırasında uygun yara nemini koruduğu bir ortam yaratır.

Çok sayıda hidroksil grubu sayesinde, havayla kurutulmuş BC, yara pansumanlarında son derece faydalı olabilen olağanüstü su buharı geçirgenliğine izin verir [146]. Hava ile kurutulmuş membranların kullanılması, su buharının materyalden geçişine izin veren nefes alabilen pansumanlara izin verir. Çalışmalar, yara ortamının ideal nem içeriğinin başarılı yara iyileşmesinin en önemli faktörlerinden biri olduğunu göstermektedir [147].

BC membran için %32'lik kopma uzaması, yüksek derecede tokluk ortaya koymaktadır. Bu özellikler, BC'nin farklı yara bölgeleri için çok çeşitli yara örtülerinde son derece uygun olmasını sağlar. Örneğin, BC hem mekanik olarak güçlü hem de esnektir ve bu nedenle hareketlerinin kısıtlanmadığı ve pansumanın bozulmadığı diz yaraları olan hastalara üretilebilir ve verilebilir.

BC membranları üzerindeki sitotoksikite ve hücre tutunma testleri, hücre toksisitesi açık bir yara ile temas eden herhangi bir materyal için büyük bir endişe olacağından, BC'nin bir pansuman materyalinde oldukça istenen yüksek fibroblast canlılığını koruduğunu göstermiştir [148]. BC ayrıca ultra ince nanofiber ağı nedeniyle yüksek düzeyde hücre

tutunmasını da barındırır, bu özellik özellikle gelişmiş hücre bağlantısının iyileşmeyi hızlandırmada rol oynayacağı yara iyileşmesinin ilerlemesinde faydalıdır [149].

Hyalüronik asit, deride bulunan bir glikozaminoglikandır. Değişen β -1,4 ve β -1,3 glikosidik bağlarla bağlanan tekrarlayan D- glukuronik asit ve N- asetil- D- glukozamin birimlerinden oluşan evrimsel olarak korunmuş bir memeli biyopolimeridir. Hyalüronik asit, yüksek molekül ağırlıklı bir bileşiğin 5×10^6 Da olarak bulunmuştur. Yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronan, anti-inflamatuar özelliklere sahipken, fragmanlar/düşük moleküler ağırlıklı hyaluronan, pro-inflamatuar aktivitelere sahiptir [150]. Fibroblast proliferasyonunu, ECM'nin yeniden şekillenmesini ve keratinosit göçünü uyararak yara iyileşmesinde hayati bir rol oynar. Hyaluronik asidin bozunma ürününün pro-anjiyogenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [151]. Farklılaşmayı kolaylaştıran keratinositler üzerinde bulunan CD44 reseptörlerine bağlanarak bir dizi kaskadları aktive eder [152].

Hyalüronik asit doğal bir biyopolimer olmasına rağmen, yaralanma sonrası eksojen Hyalüronik asit takviyesinin, yara izini ve kollajen sentezini azaltarak iyileşme modelini değiştirdiğini göstermiştir [153, 154]. Bu faydalı yön, hyaluronan'ı doku onarımı için önemli bir terapötik haline getirmiştir. Li ve ark. Pullulan ile aşılınmış Hyalüronik asit ile geliştirilmiş anti-enzimatik bozunma gösterdi. Ayrıca hemostatik yeteneği ile hızlandırılmış iyileşme gösterdi [155]. Benzer şekilde, PLGA mikroküreleri içeren vankomisin içeren kitosan/hyaluronat hidrojelleri, endotel hücrelerinin artan proliferasyonu ile birlikte yara bölgesinde mikrobiyal yükün azaldığını göstermiştir [156]. Benzer etkiler, aminoetil metakrilat Hyalüronik asit ve metakrilatlanmış metoksi polietilen glikol içeren hibrit bir nano-hidrojel tarafından ve ayrıca elektrospun çift katmanlı kitosan/polikaprolakton ve Hyalüronik asit iskelesi [157] kullanılarak görülmüştür. Epoksi ve diğer katmanlarla çapraz bağlanan hyaluronan, diyabetik ülserlerde güçlü anjiyogenez ve dermisin restorasyonu gösterdi [158]. Hyalüronik asit-jelatin-kondroitin sülfat bazının tohumlanmış keratinositler ve fibroblastlar ile birleştirilmesiyle hazırlanan bir deri ikamesi, hücre göçünü arttırdı, oksidatif hasarı azalttı ve enfekte yaralar üzerinde bakterisidal aktivitelere sahiptir [159]. Fotopolimerizasyon ile oluşturulan glisidil metakrilat Hyalüronik asit konjugatı, geliştirilmiş hidrojel özellikleri göstermiştir [160]. Hu ve diğerleri tarafından geliştirilen üç boyutlu Hyalüronik asit iskelesi TGF- β 1 ekspresyonunu azaltarak yara iyileşmesi için cenin benzeri bir ortam gösterdi [161]. Randomize kontrollü bir klinik çalışmada, dişeti

cerrahisi hastalarında hyalüronatın topikal uygulaması, palatal yara iyileşmesinin hızlandığını göstermiştir [162, 163]. Hyalüronik asit, bifosfonat ve gümüşün birleştirilmesiyle oluşturulan kalıplanabilir hidrojel, sıçanlarda antimikrobiyal, kendi kendini iyileştirdiğini gösterdi [164]. Kitosan/hyaluronat ve edaravon konjugatı daha yüksek kan uyumluluğu gösterdi [165].

Hyalüronik asitten elde edilen en yaygın kullanılan yara bakımı ticari ürünlerinden birkaçı; Dermaplex, Regenecare, Hyalomatrix, Hyalofill vb. Çoğu diyabetik hastalarda kronik yaraların tedavisinde kullanılır. Hyalüronik asit ayrıca kozmetik sonuçları olan cilt bakımı koruyucu ürünlerin bir bileşenidir. [166]

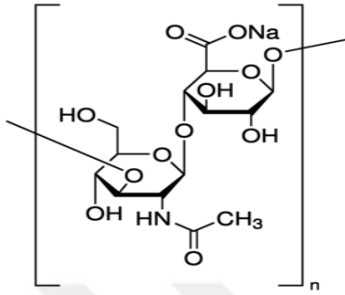


3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

3.1.1 Hyalüronik Asit Azidlenmesi için Kimyasallar

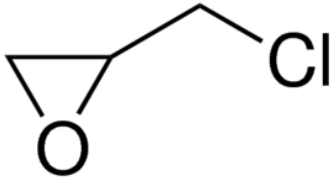
Hyaluronik asit Sodyum Tuzu (Streptococcus equi)



Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.
Molekül ağırlığı: 1500-1800 kDa

Çözünürlük: Suda; 5mg/ml

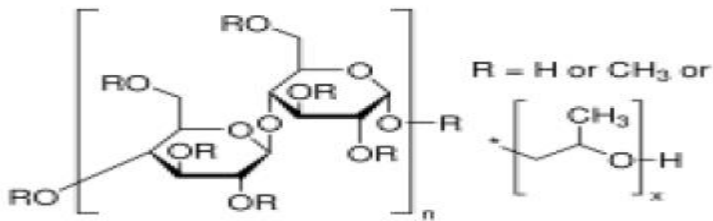
Epiklorohidrin



Fluka Chemika firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.
Molekül ağırlığı: 92,52g/mol

Kapalı Formülü: C₃H₅ClO

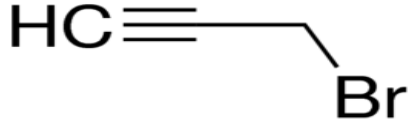
Hidroksipropil metil selüloz (HPMC)



Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül ağırlığı: 86, 000/mol
% hidroksil: 9,4

Propargil bromür



Ciba Speciality Chemicals firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül ağırlığı: 118,96 g/mol
Yoğunluk: 1.335g/ml

Sodyum Azit

Aldrich Chemical firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

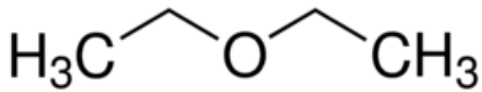
Molekül Ağırlığı: 65.01 g/mol
Kapalı Formülü: NaN₃

Nitrik Asit

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: HNO₃
Molekül Ağırlığı: 63.01 g/mol

Di Etil Eter



Fluka Chemika firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: 74.12g/mol
Kaynama Noktası: 34-36 °C

Asetik Asit

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: CH₃COOH

Sodyum Klorür

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 58,44 g/mol

Kapalı Formülü: NaCl

Sodyum Nitrit

Emboy firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 68,9953 g/mol

Kapalı Formülü: NaNO₂

Sodyum Hidroksit

Tekkim firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 39,997 g/mol

Kapalı Formülü: NaOH

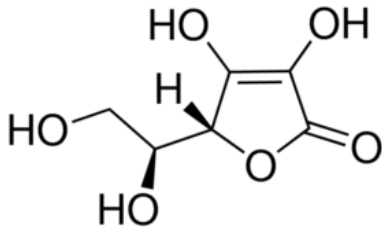
Bakır sülfat pentahidrat

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: CuSO₄.5H₂O

Molekül Ağırlığı: 159,61g/mol

Askorbik Asit



Alrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 176.12g/mol

Kapalı Formülü:

Glikoz

Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $C_6H_{12}O_6$

Molekül Ağırlığı: 180.16 g mol

Maya Özü

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Pepton

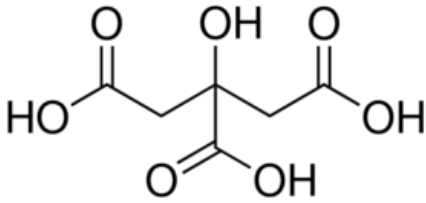
Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Disodyum Hidrojen Fosfat

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 141.96 g/mol

Sitrik Asit



Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Molekül Ağırlığı: 192.12 g/mol

Mannitol

Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $C_6H_{14}O_6$

Molekül Ağırlığı: 182.17 g mol

Kullanılan Çözücüler:

Deneysel çalışmalarda değişik amaçlarla teknik saflıkta Metanol, Aseton ve Etanol gibi çözücüler hiçbir işlem uygulanmadan kullanıldı.

3.2 KULLANILAN CİHAZLAR VE ALETLER

FTIR spektrofotometre

Perkin–Elmer 100 FT-IR spektrofotometre cihazı kullanıldı. Alınan spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedildi.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

NMR spektrumları Bruker AvanceCore NMR cihazı ile alındı.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Hidrojellerin camsı geçiş sıcaklıklarını belirlemek amacıyla Perkin Elmer Pyris Diamond markalı DSC cihazı kullanıldı.

Taramalı Elektron Mikrokobu (SEM)

Bakır katalizle klik yöntemi ile hazırlanmış hidrojellerin yüzey özellikleri Phillips XL 30 ESEM-FEG cihazı kullanılarak belirlendi. İşlem öncesinde hidrojeller altın ile kaplandı ve SEM ile yüzey incelenmesi gerçekleştirildi.

Liyofilizatör

Laboratuvar tipi Alpha 1-2 LD markalı liyofilizatör, hidrojellerin kurutulması amacıyla kullanıldı.

3.3 DENEYSEL YÖNTEM

3.3.1 Hyalüronik Asit'in Azidlenmesi

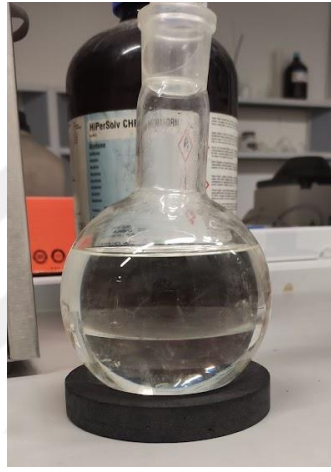
3.3.1.1 Hyalüronik asitin 1-azido-2,3-epoksipropan ile azidlenmesi

İlk olarak 1-azido-3-kloro-propanol sentezlendi. Sentezleneden malzeme kullanım öncesi NaOH ile halka kapatılması yapıldı. Çözünmüş Hyalüronik asit çözeltisine eklendi.

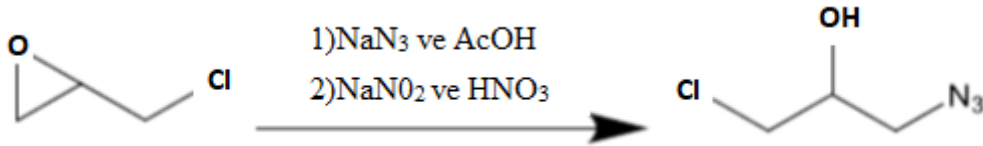
1-azido-3-kloro-propanolün hazırlanması

1-azido-3-kloropropanol sentezi epiklorohidridinden başlanarak yapıldı. Epoksitin azit iyonu ile halka açma reaksiyonu modifiye edilmiş bir metoda göre yapılmıştır [167]. İzopropanol (109.0 mL) ve asetik asit (7.2 mL, 125.8 mmol) karışımı üzerine 74.0 mL su içinde çözünmüş NaN₃ (8.177 g, 125.8 mmol) çözeltisi eklendi. Daha sonra karıştırma altında epiklorohidrin (6.6 mL, 84.2 mmol) azar azar ilave edildi. Reaksiyon oda şartları

altında 24 saat sürdürüldü. Daha sonra NaNO_2 'nin (14.4 mL, 41.6 mmol) karışımın içine ilave edildi. Ardından herhangi bir fazla azid iyonunu ortadan kaldırmak için damla damla HNO_3 (5.76 mL, 83.8 mmol) ilave edildi. Karıştırma, oda sıcaklığında 24 saat sürdürüldü, bu sırada nitroz oksitlerin oluşumu durdu. Çözeltiyi konsantre etmek için 12 g NaCl ilave edildi ve ayrılan propanol fazı toplandı. Sulu faz, 50 mL dietil eter ile ekstrakte edildi ve organik fazlar birleştirildi. Bu, atılan suyun ilave faz ayrımı ile sonuçlanmıştır. Organik faz, döner buharlaştırma ile dietil eterin çıkarılmasıyla daha da konsantre edildi. 1-azido-3 kloropropanolün elde edilen propanol çözeltisi (40ml) FTIR çekilerek karakterize edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı ve daha fazla saflaştırılmadan kullanıldı.



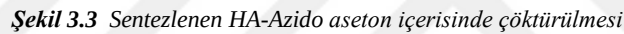
Şekil 3.1 NaCl ilavesi sonrası organik ve su fazının ayrılması



Şekil 3.2 1-azido-3-kloro-propanol sentezi

Hyalüronik asitin, 1-azido-2,3-epoksipropan ile modifiye edilmesi

Hyalüronik asitin azid işlevselleştirilmesi, modifiye edilmiş bir yöntem izlenerek yapıldı [167]. Hyalüronik asit (50.0 mL su içinde 0.500 g) sulu çözeltisi hazırlandı. Eterleştirme için gerekli olan 1-azido-2,3-epoksipropan, kullanımdan hemen önce, 2.18 mL 5M NaOH çözeltisinin 5.60 mL (7.5 mmol) 1-azido-3kloropropanole eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika karıştırılmasıyla hazırlandı. Elde edilen epoksi çözeltisi, Hyalüronik asit çözeltisi ile birleştirildi ve reaksiyon, 55 °C'de 6 saat sürdürüldü, Çözelti 60 mL aseton içinde

$$\text{Verim} = (\text{ürün/ giren}) * 100 = (1,12/1) * 100 = \%112$$


Şekil 3.4 A) 1-azido-2,3-epoksipropanın hazırlanması, **B)** HA azid grupları ile modifiye edilmesi

Üretim 28 °C sıcaklıkta 4 günde gerçekleştirilmiştir.

Üretim sonrası oluşan BC peliklleri, üretim ortamından ayrılarak, bakteri hücrelerini elimine etmek için 0,1 N NaOH ile inkübe edilmiştir. Sonrasında, NaOH'i uzaklaştırmak için, yıkama suyu pH değeri nötr olana kadar BC membranları deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından BC peliklleri oda sıcaklığında kurutulmuştur.

YPM ortamı	
Kimyasal malzeme	Konsantrasyon % (w/v)
Pepton	0.3
Maya z	5
Mannitol	2,5

Tablo 3.1 YPM besi yeri içeriği

Hestrin and Schramm Ortamı (HS)	
Kimyasal malzeme	Konsantrasyon % (w/v)
Glikoz	2
Maya z	0.5
Pepton	0.5
Na ₂ HPO ₄	0.27
Sitrik asit	0.11

Tablo 3.2 HS besi yeri içeriği



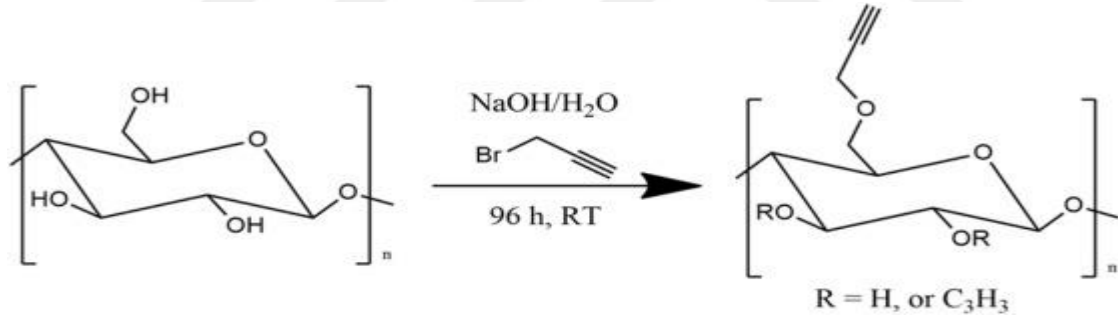
Şekil 3.5 Kurutulmuş BC

3.3.2.2 Bakteriyel selülozun alkinlenmesi

Bakteriyel selülozun kısmen çözünmesi, modifiye edilmiş bir yöntem izlenerek yapıldı. [169] %8'lik NaOH (2.5gram /26,9ml su) çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti içerisine 1 gram Bakteriyel selüloz ilave edildi ve buzdolabının dondurucu bölümünde (-18°C)' de bir gece bırakıldı. Daha sonra, ağırlıkça %5 olacak şekilde 20 mL su ilave edildi. 1 saat karışmaya bırakıldı. BC alkinlenmesi, modifiye edilmiş bir yöntem izlenerek yapıldı [170]. Daha sonra 4mL propargil bromür ilave edildi. 4 gün oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. 4. Günün sonunda metanolde çöktürüldü. 55°C de vakum etüvünde bir gece kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş olan BC ve BC-alkin, bir miktar suda şişmeye bırakıldı (*şekil 3.6*), BC şişerken, BC-alkin'de şişme gözlemlenmedi. BC bol hidrosil grubuna sahip olması nedeniyle şişme gözlemlenmiştir.



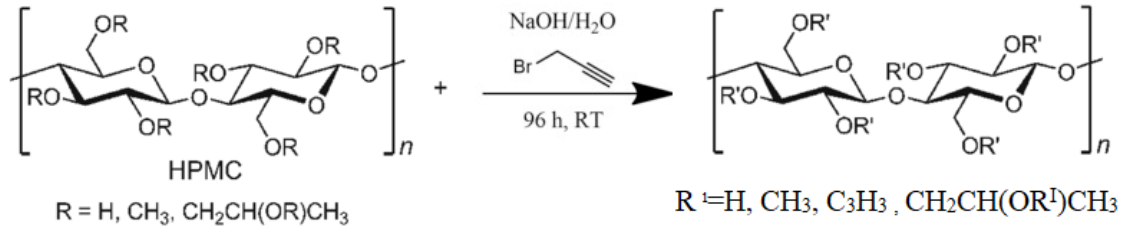
Şekil 3.6 BC ve modifiye edilmiş BC su içerisinde şişmesi



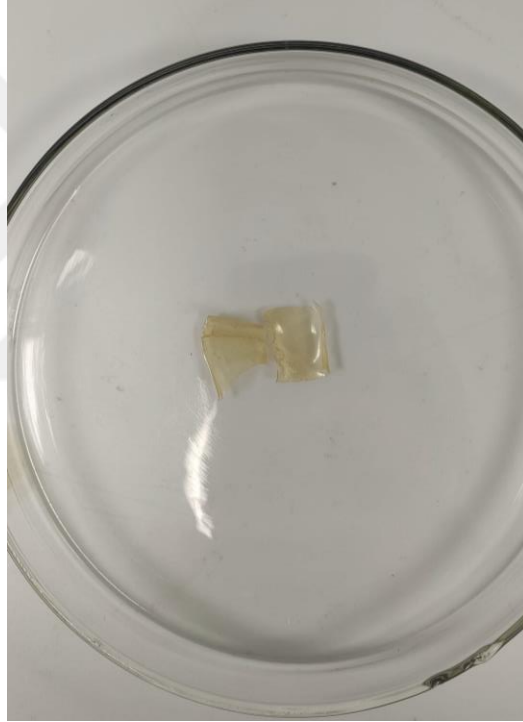
Şekil 3.7 Bakteriyel selüloz yapısı ve BC-alkin sentezi [169]

3.3.3 Hidroksipropil Metil Selüloz'un Alkinlenmesi

HPMC, modifiye edilmiş bir yöntem izlenerek yapıldı [169]. HPMC (2g) 200 mL bazik sulu solüsyonda (ağırlıkça %3 NaOH) 1 saat boyunca oda sıcaklığında süspanse edilerek şişirdi. Daha sonra propargil bromür (8.7 g, Toluen içinde ağırlıkça %80, 58.4 mmol) hızla ilave edildi. Oda sıcaklığında 4 gün karışmaya bırakıldı. Daha sonra Metanol içerisinde çöktürüldü. 55°C de vakum etüvünde bir gece kurumaya bırakıldı. 2,5 gram HPMC-alkin elde edildi.



Şekil 3.8 HPMC'un yapısı ve HPMC-Alkin sentezi



Şekil 3.9 HPMC-alkin vakum etüvünde kurutulmuş hali

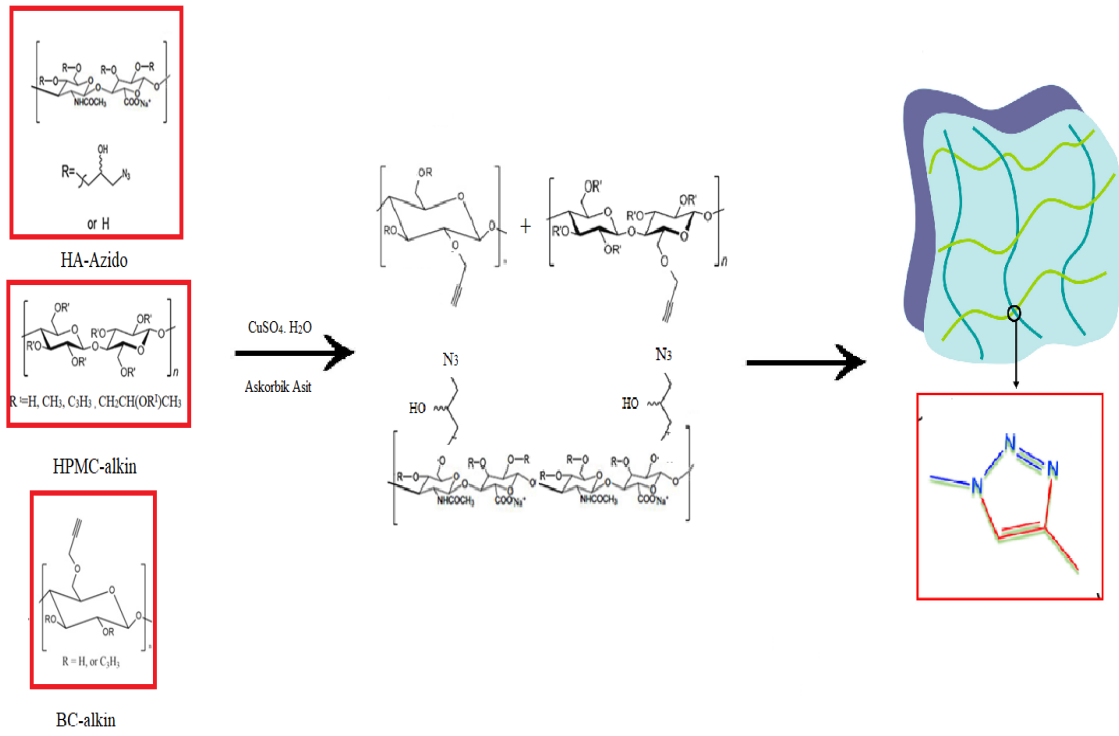
3.3.4 CuAAC ile klik denemesi

Hidrojeller aşağıdaki gibi hazırlandı: 0.100 g azid modifiyeli HA (Tablo 1, 1 numaralı örnek) 5.00 ml su içinde çözüldü. 0.100 g alkin modifiyeli HPMC 5ml su içerisinde çözüldü. Daha sonra çözünmüş olan HA ve HPMC birleştirildi. Homojen olana kadar karıştırıldı. Taze hazırlanmış CuSO₄. H₂O (2,5 mL, 0,04 mol/L) ve askorbik asit (2,5 mL,

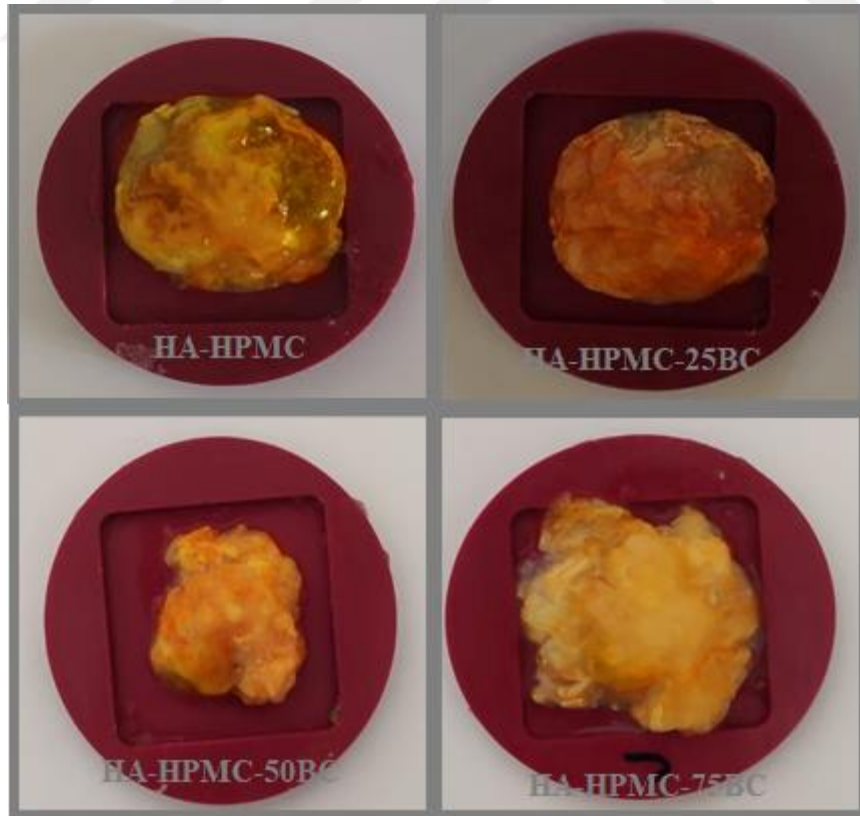
1 mol/L) karışıma ilave edildi ve çözeltiler hızlıca karıştırılarak homojen hale getirildi. Bakır iyonlarını kompleksleştirmek için 7°C'de 48 saat 0.05 M EDTA çözeltisine daldırıldı. Çözelti damıtılmış su ile değiştirildi ve en az bir hafta süreyle günlük olarak değiştirildi. Diğer örnekler tablo 1'deki gibi hazırlandı. Tablo 3.3'teki gibi hazırlanan örneklerde jelleşme gözlemlenmiştir. Şekil 3.11 incelendiğinde HA-HPMC ve HA-HPMC-25BC kodlu hidrojellerin şeklini koruduğu, diğer hidrojellerde şeklini korumadığı görülmüştür.

KOD	HA-azido (gr)	HPMC-alkin (gr)	BC-alkin (gr)
HA-HPMC	0,100	0,100	-
HA-HPMC-25BC	0,100	0,100	0,025
HA-HPMC-50BC	0,100	0,100	0,050
HA-HPMC-75BC	0,100	0,100	0,075

Tablo 3.3 Hazırlanan hidrojellerin içerikleri



Şekil 3.10 HA-azido,BC-alkin ve HPMC-alkin klik reaksiyonu ile hidrojel sentezi



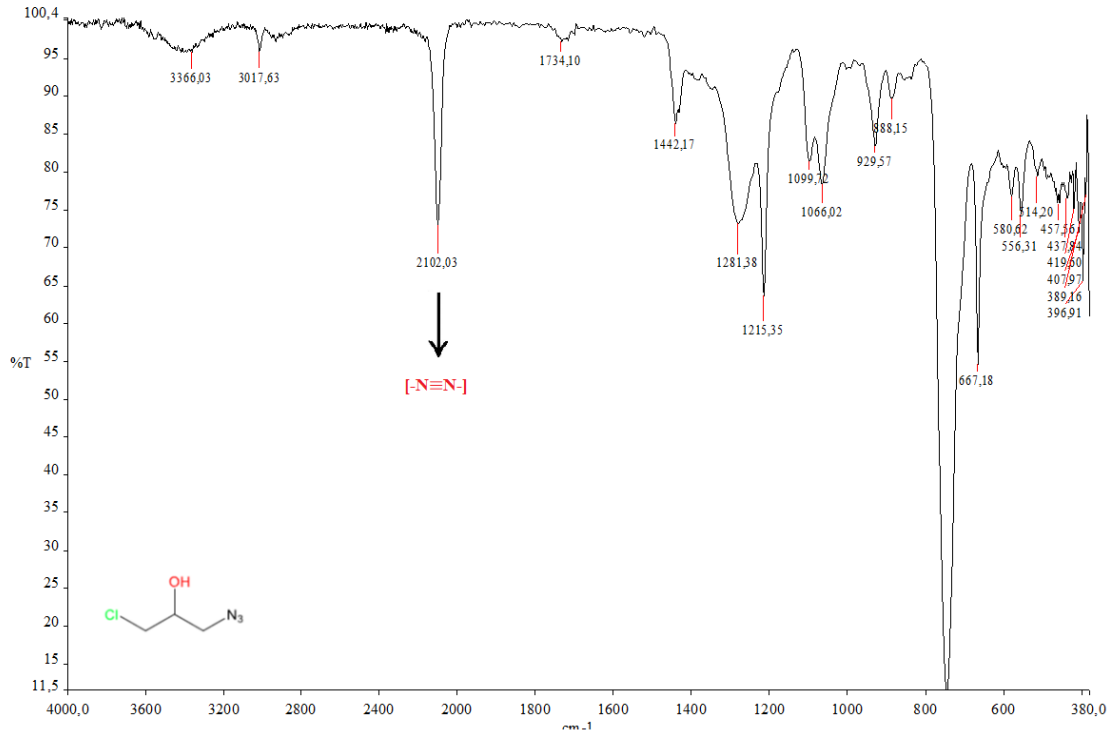
Şekil 3.11 Hazırlanan hidrojeller

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hidrojellerin Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR) Analizi

4.1.1 Hyalüronik Asit- Azido Polimerinin Karakterizasyonu

4.1.1.1 1-azido-3-kloro-propanol sentez karakterizasyonu



Şekil 4.1 1-azido-3-kloro-propanol FTIR spektrumu

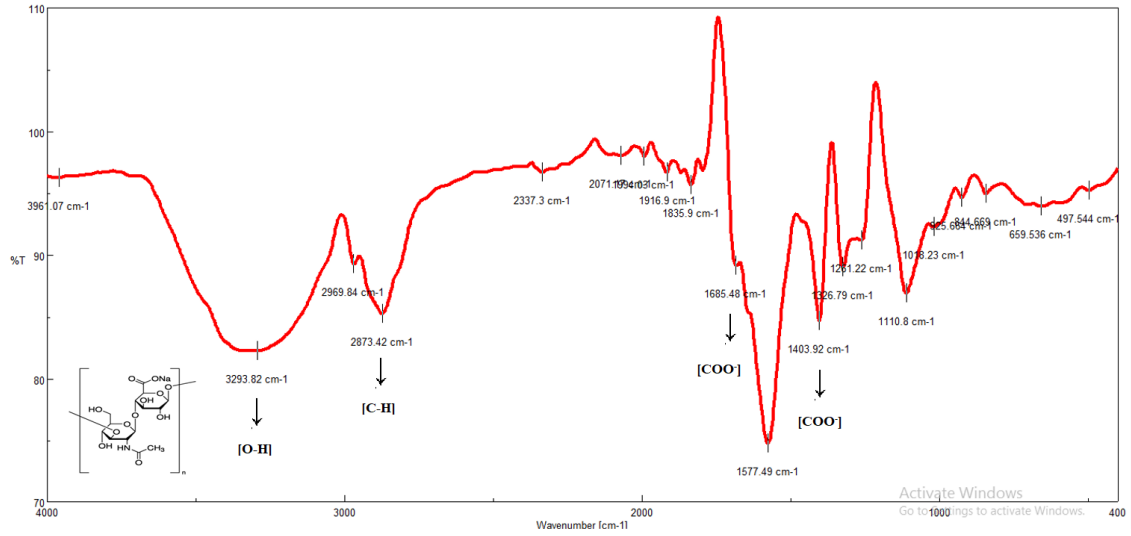
Şekil 4.1'deki FTIR spektrumu incelendiğinde; 2102 cm^{-1} 'de ki azid piki bize 1-azido-3-kloro-propanol başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca 1442 cm^{-1} de C-H piki, 1281-1218-1099-1066 cm^{-1} C-N ve C-O pikleri, 750 cm^{-1} C-Cl piki yapının elde edildiğini desteklemektedir.

4.1.1.2 Hyalüronik Asit ve HA-Azido Karakterizasyonu

Hyalüronik asit'in hidroksil grupları modifiye edilmiştir. Oluşan azid modifiyeli Hyalüronik asit'in karakterizasyonu FTIR ve ^1H -NMR spektroskopi teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

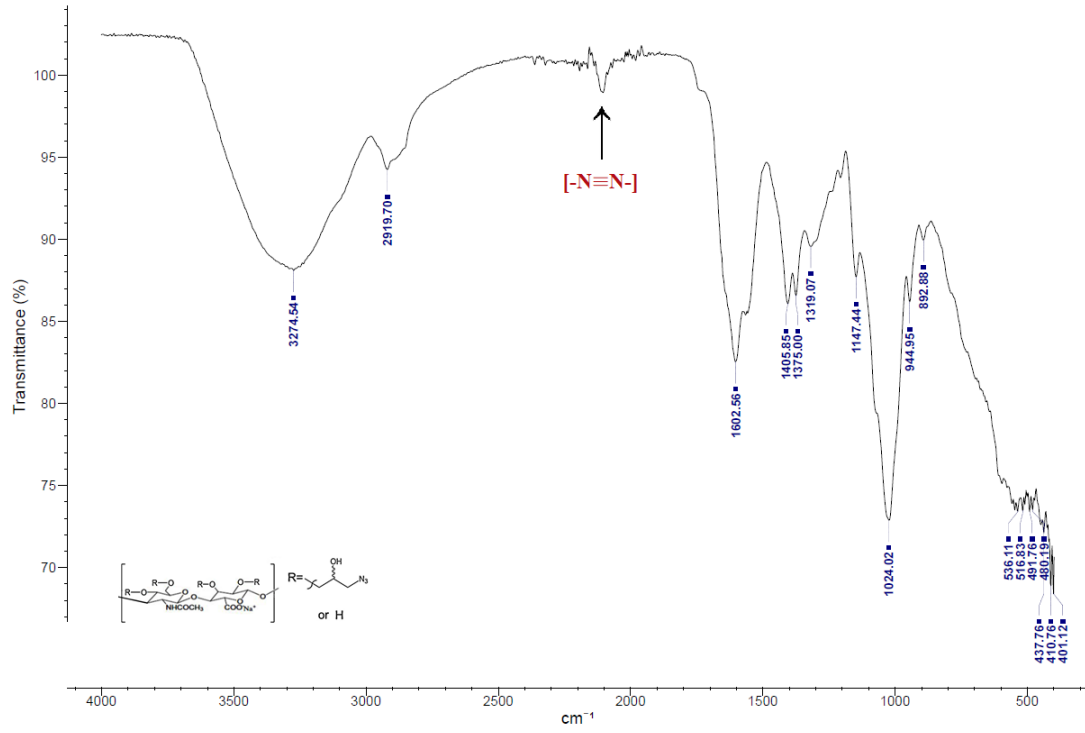
Elde edilen 1-azido-3-propanol, Hyalüronik asit azido reaksiyonu öncesinde epoksi halkanın kısa süreli stabilitesi nedeniyle hızlıca 1-azido-2,3 epoksi propana dönüştürüldü

ve Hyalüronik asite eklendi. Hyaluronik azide ait FTIR spekturumu şekil 4-2’de verilmiştir.



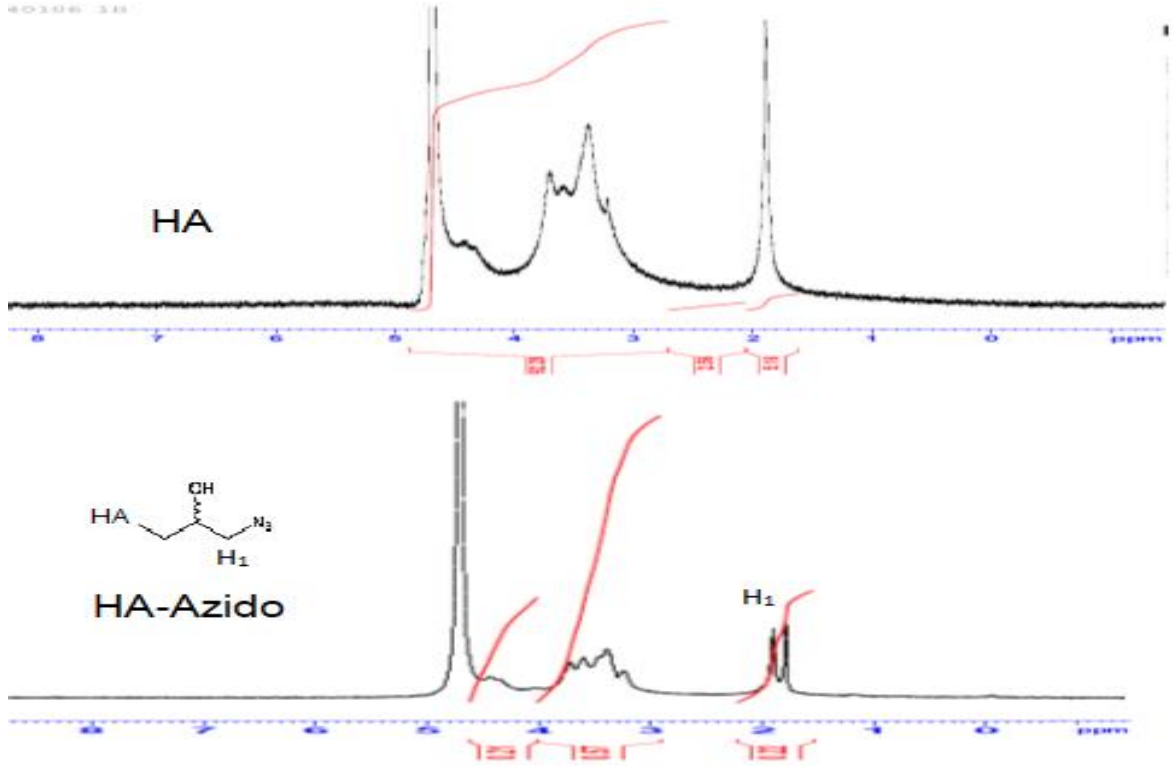
Şekil 4.2 Hyalüronik Asit spekturumu

Şekil 4.2’deki FTIR spekturumu incelendiğinde; Hyalüronik asit’e ait karakteristik pikler görülmektedir. 3300 cm^{-1} bölgesinde gelen O-H ve N-H gerilme titreşimini, 2800 cm^{-1} bölgesinde gelen C-H gerilme titreşimini, 1685 cm^{-1} ve 1403 cm^{-1} bölgesinde görülen COO⁻ gerilme bandı karakteristik piklerdir. 1-azido-2,3 epoksi propanın hyaluronik aside eklenmesiyle elde edilen HA-Azido polimeyi FTIR spekturumu şekil 4.3’te verildi.



Şekil 4.3 HA-azido spektrumu

Şekil 4.2 ve 4.3'teki FTIR spektrumları kıyaslandığında; Şekil 4.2'deki Hyalüronik Asit'e ait olan karakteristik pikler Şekil 4.3'teki spektrumda da gözlemlenmektedir. Şekil 4.3'deki spektrumda farklı olarak 2100 cm⁻¹'de gelen (-N≡N-) piki gözlemlenmektedir. Azid pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

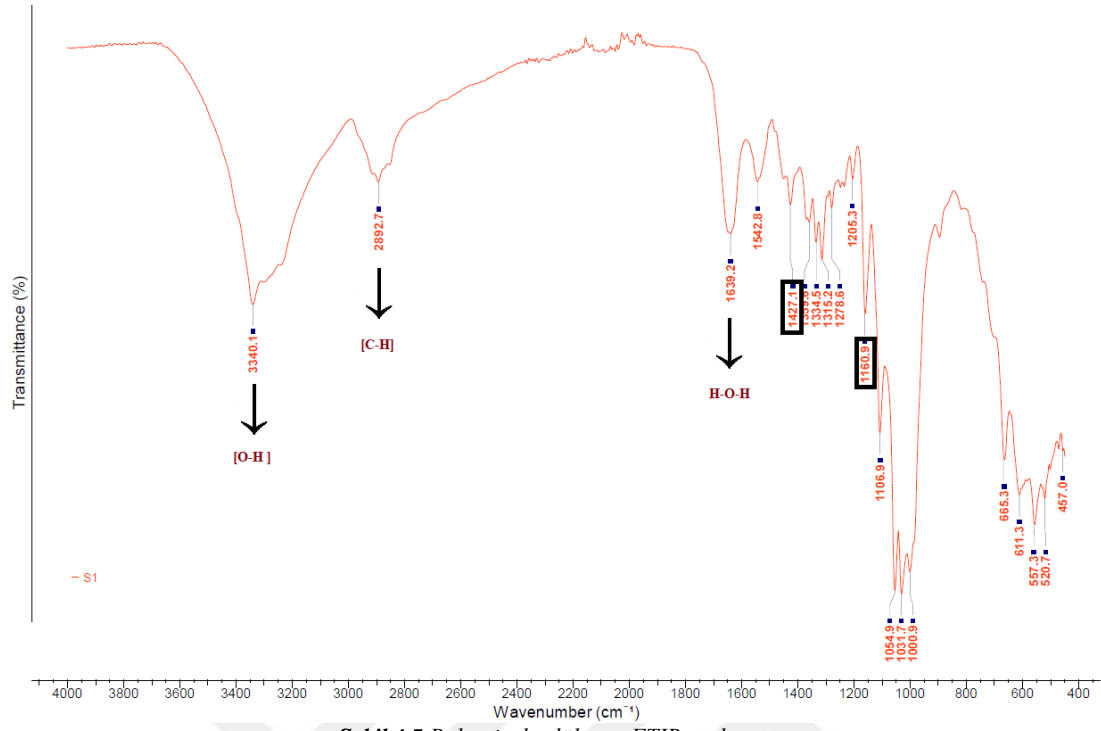


Şekil 4.4 HA ve HA-azido ^1H NMR spektrumu

Şekil 4.4'te gösterilen HA ve HA-azido'a ait ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde farklı olarak 1,9 ppm' de azide bağlı karbon protonuna ait proton piki görülmektedir.

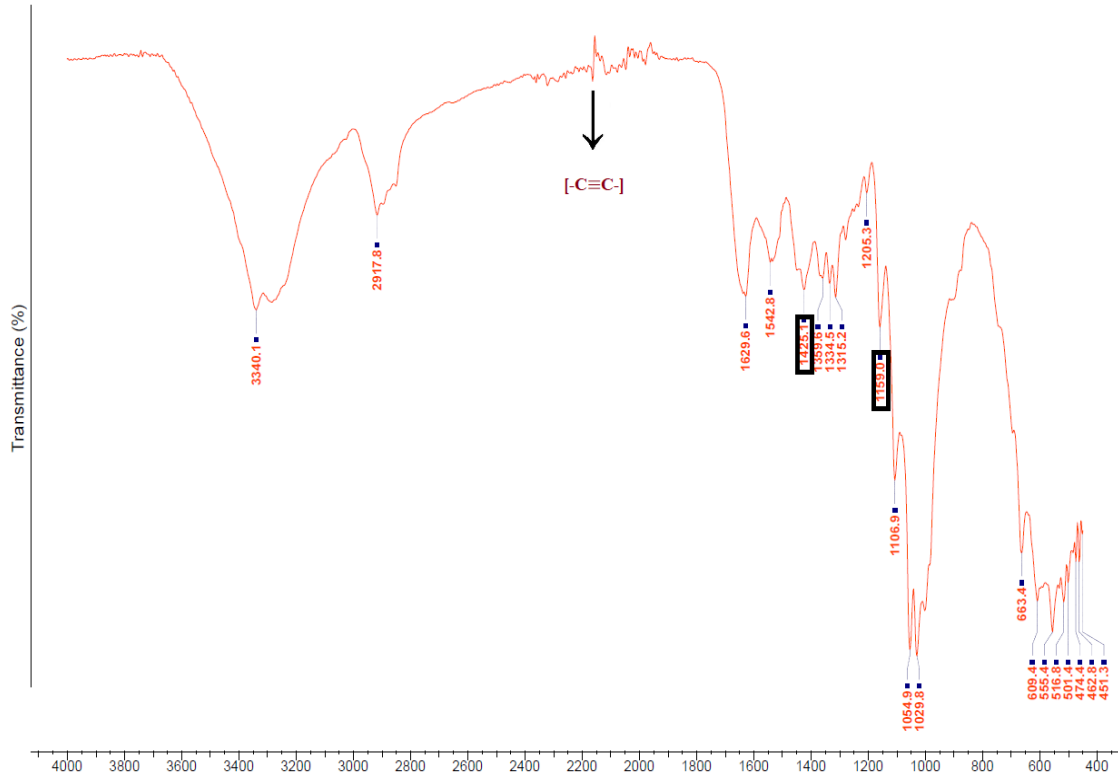
4.1.2 Bakteriyel Selüloz Sentez ve BC-Alkin Karakterizasyonu

Bakteriyel selülozun alkinlenmesi propargil bromürün sekonder hidroksiller üzerinden reaksiyonu ile elde edildi. Yapısal karakterizasyon FTIR ile yapıldı (şekil 4.5)



Şekil 4.5 Bakteriyel selülozun FTIR spektrumu

Şekil 4.5'teki Bakteriyel selülozun FTIR spektrumu incelendiğinde; Bakteriyel selüloza ait karakteristik pikler görülmektedir. 3340 cm⁻¹ bölgesinde gelen OH gerilme piki, 2892 cm⁻¹ bölgesinde gelen CH gerilme piki, 1639 cm⁻¹ bölgesinde gelen H-O-H su moleküllerinin gerilme titreşimi gözlenmektedir. Bakteriyel selülozun üretimi başarı ile gerçekleşmiştir.

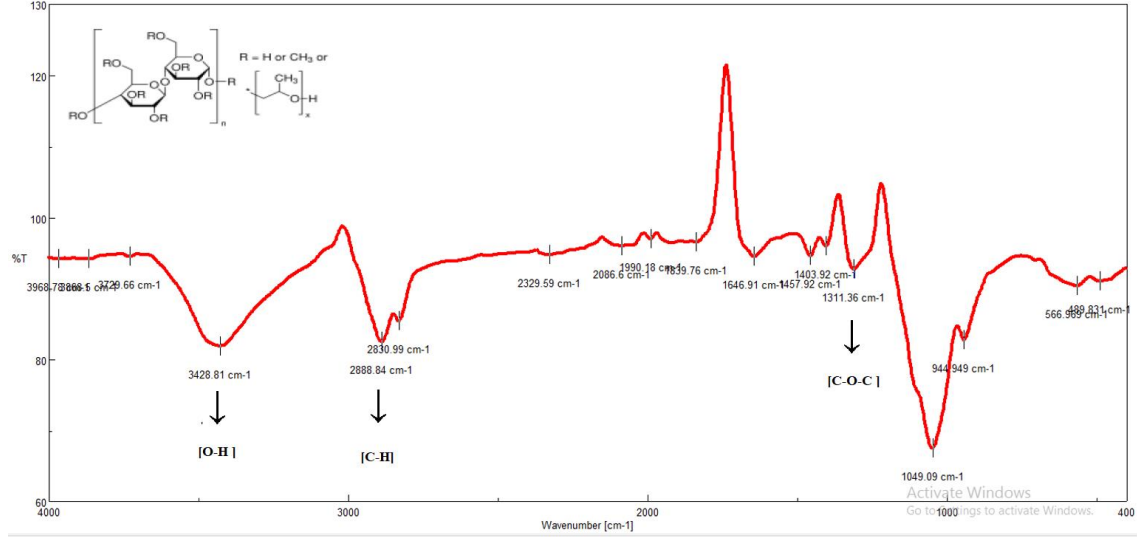


Şekil 4.6 Bakteriyel selüloz- alkin FTIR spektrumu

Şekil 4.5 ve 4.6'teki FTIR spektrumlarını kıyaslandığında; Şekil 4.4'teki Bakteriyel selüloza ait olan karakteristik pikler şekil 4.6'teki spektrumda da gözlemlenmektedir. Şekil 4.6'teki spektrumda farklı olarak 2100 cm^{-1} 'de gelen zayıf alkin ($-\text{C}\equiv\text{C}-$) piki gözlemlenmektedir. Alkin pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca 1159 cm^{-1} 'deki BC'a ait primer alkol pikinin şiddetinin azalması ve 1427 cm^{-1} 'deki metilen ait C-H pik şiddetinin artışı da bu gözlemi desteklemektedir.

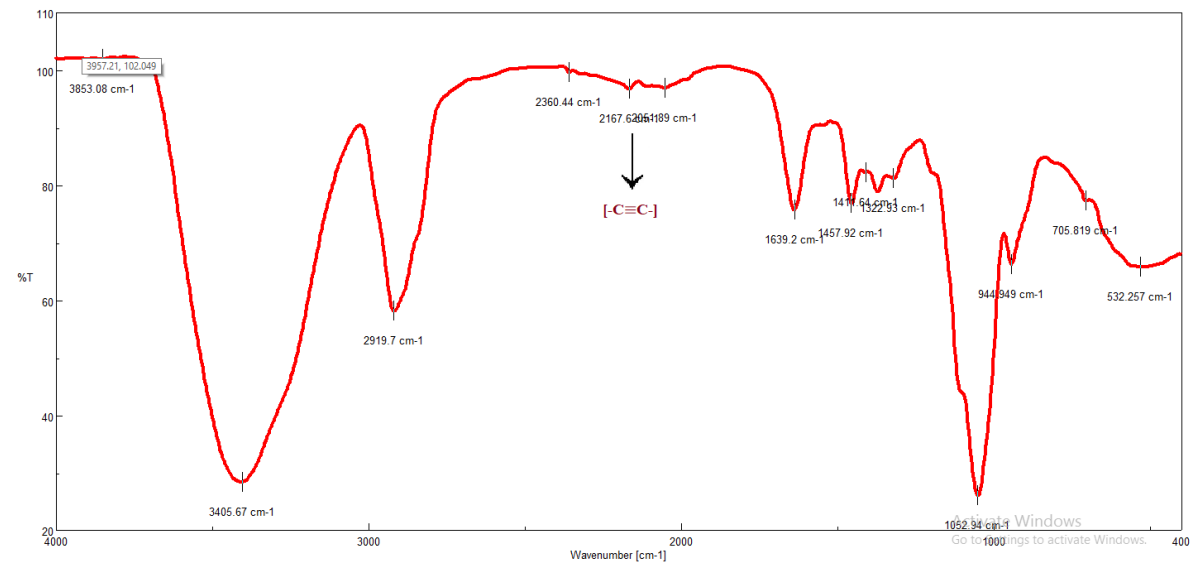
4.1.3 Hidroksipropil Metil Selüloz ve HPMC-Alkin Sentez Karakterizasyonu

Bakteriyel selüloz veriminin az olması ve çözünmemesi HPMC, modifiye edilmiştir. Yüzeysel modifikasyon bakteriyel selüloz ile sağlanırken, içsel modifikasyon HPMC ile sağlanmıştır.



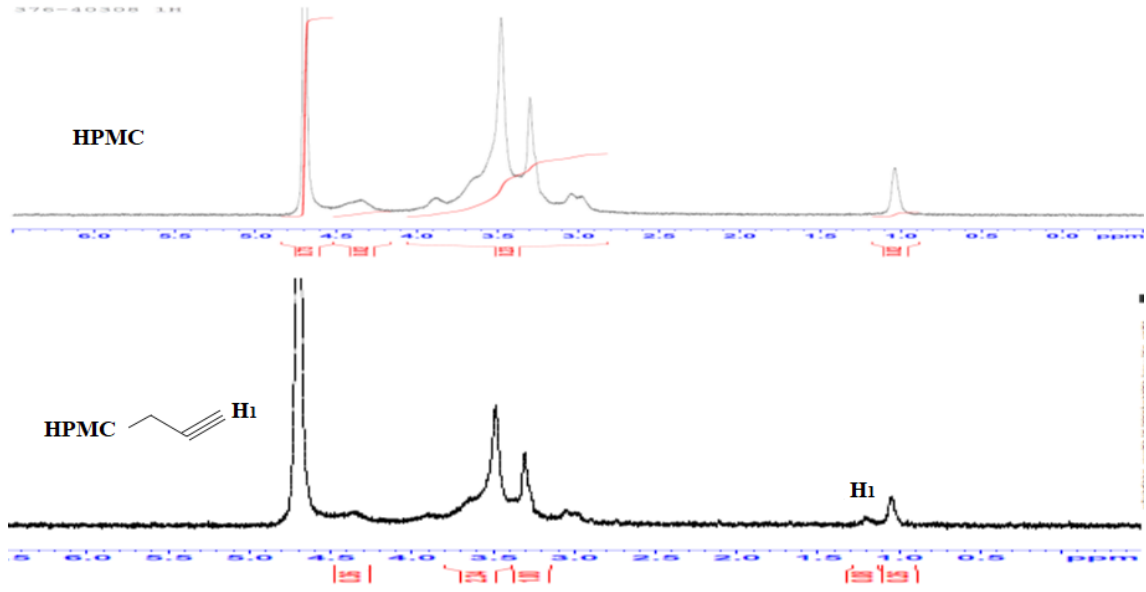
Şekil 4.7 Hidroksipropil Metil selüloz'un FTIR spektrumu

Şekil 4.7'teki FTIR spektrumu incelendiğinde; Hidroksipropil metil selüloz ait karakteristik pikleri görmekteyiz. 3428 cm⁻¹ bölgesinde gelen OH gerilme piki, 2920 cm⁻¹ bölgesinde gelen CH gerilme piki, 1646 cm⁻¹ bölgesinde gelen OH gerilme titreşimi, 1311 cm⁻¹ bölgesinde gelen C-O-C gerilmesi gözlenmektedir.



Şekil 4.8 Hidroksipropil Metil selüloz-Alkin FTIR spektrumu

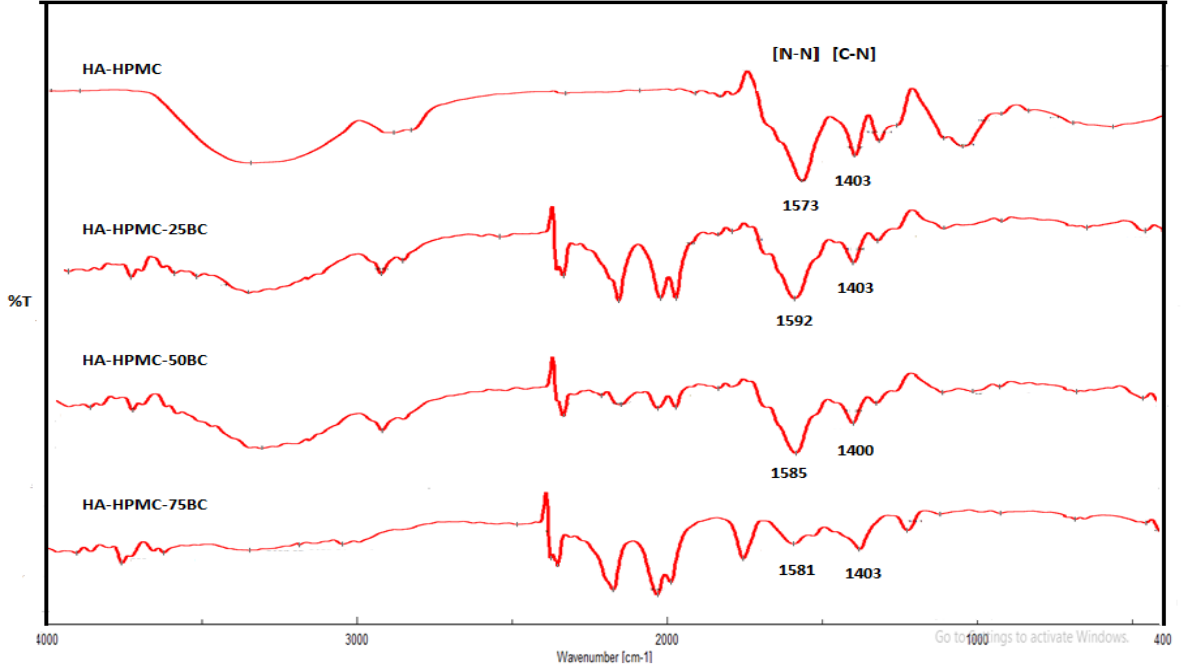
Şekil 4.7 ve 4.8'teki FTIR spektrumlarını incelendiğinde; Şekil 4.7'teki HPMC'a ait olan karakteristik pikler şekil 4.8'teki spektrumda da gözlemlenmektedir. Şekil 4.8'teki spektrumda farklı olarak 2167 cm^{-1} 'de gelen zayıf alkin ($-\text{C}\equiv\text{C}-$) piki gözlemlenmektedir. Alkin pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.9 HPMC ve HPMC-alkin ^1H NMR spekturumu

Şekil 4.9'de gösterilen HPMC ve HPMC-alkin'e ait ^1H -NMR spekturumu incelendiğinde farklı olarak 1,4ppm' de propargly'e ait proton piki görülmektedir.

4.1.4 Cuaac Klik Reaksiyonu ile Oluşan Jellerin Karakterizasyonu



Şekil 4.10 Sentezlenen hidrojellerin FTIR spekturumu

Şekil 4.10’de görülen çakışık IR spekturumu incelendiğinde; HA-HPMC ftr spekturumuna bakıldığında azid ve alkin piklerinin kaybolması triazol halkasının oluşumunun çok iyi bir kanıtıdır. Bu gözleme ek olarak 4 ftr spekturumunda görüldüğü üzere 1573 cm⁻¹ (N=N) ve 1400 cm⁻¹ (C-N) bölgesinde yeni piklerin oluşumunu bunu desteklemektedir.

4.2 Hidrojellerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Sentezlenen hidrojellerin DSC analizi yapılırken öncelikle 30°C’den 150°C’ye 10°C/dk hızla bir ısıtma işlemi uygulandı. 1 dakika 150°C’de beklenildi. Hızlı bir şekilde 50°C/dk hızla soğutma yapıldı ve ardından soğutulan materyal 250°C’ye 10°C/dk hız ile ısıtma, bu sıcaklıkta 1 dakika bekletme, ardından soğumasına izin verildi. Azot atmosferi altında yapıldı.

Amorf bir polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g), sert camsı formdan kauçuk benzeri plastik yapıya veya viskoz akışkana bir değişimin meydana geldiği sıcaklıktır [171]. Camsı geçiş, malzemenin fiziksel ve mekanik özelliklerinde meydana gelen bir değişiklik olarak makroskopik olarak gözlemlenir [172]. Biyopolimerlerin termal özellikleri, özelliklerinin belirlenmesi ve uygulama uygulamaları için çok önemlidir [173]. Camsı geçiş sıcaklığı

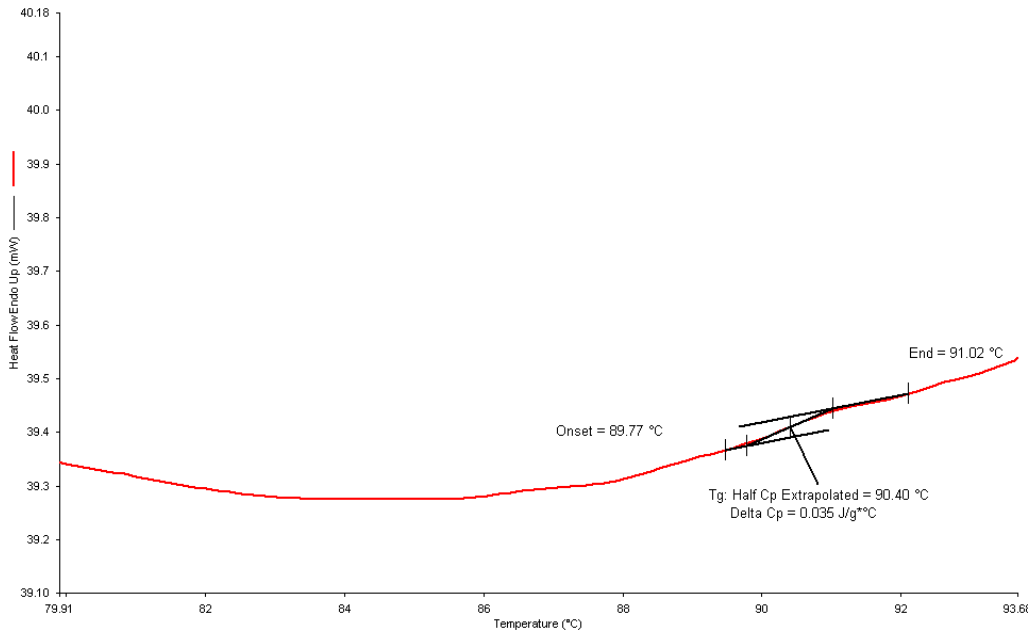
(T_g) bir polimerin camsı, katı hali ile polimerin yumuşak, esnek hali arasındaki sınırı belirler [174]. Camsı geçiş sıcaklığı, moleküler ağırlık, moleküler yapı, su veya nem içeriği ve kimyasal çapraz bağlanma gibi bazı parametrelerden etkilenebilir [175]. Bu nedenle HA-HPMC ve HA-HPMC-25BC ile karşılaştırıldı. Numunelerin DSC eğrileri şekil 4-9 ve 4-10’da verilmiştir.

Literatür incelendiğinde saf HPMC’nin T_g değeri geniş aralığa sahip olduğu bulunmuştur. T_g değeri 163-191 °C arasında değişim gösterdiği görülmektedir. [176] Hyalüronik asit ile azid-alkin katılmasıyla çapraz bağlanan örneklerde (HA-HPMC) T_g değerinde azalma görülmüştür. (Şekil 4.11) Bu düşüşün nedeni HA’in hydroxyl gruplarının fazlalığı nedeniyle propil ve metil gruplarına sahip HPMC ile karşılaştırıldığında genel yapıya esneklik kazandırmaktadır ve T_g değerinde bir düşüş olması beklenmiştir. T_g deki azalma hazırlanan hidrojelın kırılğan olmamasını ve daha esnek olmasını sağlamaktadır.

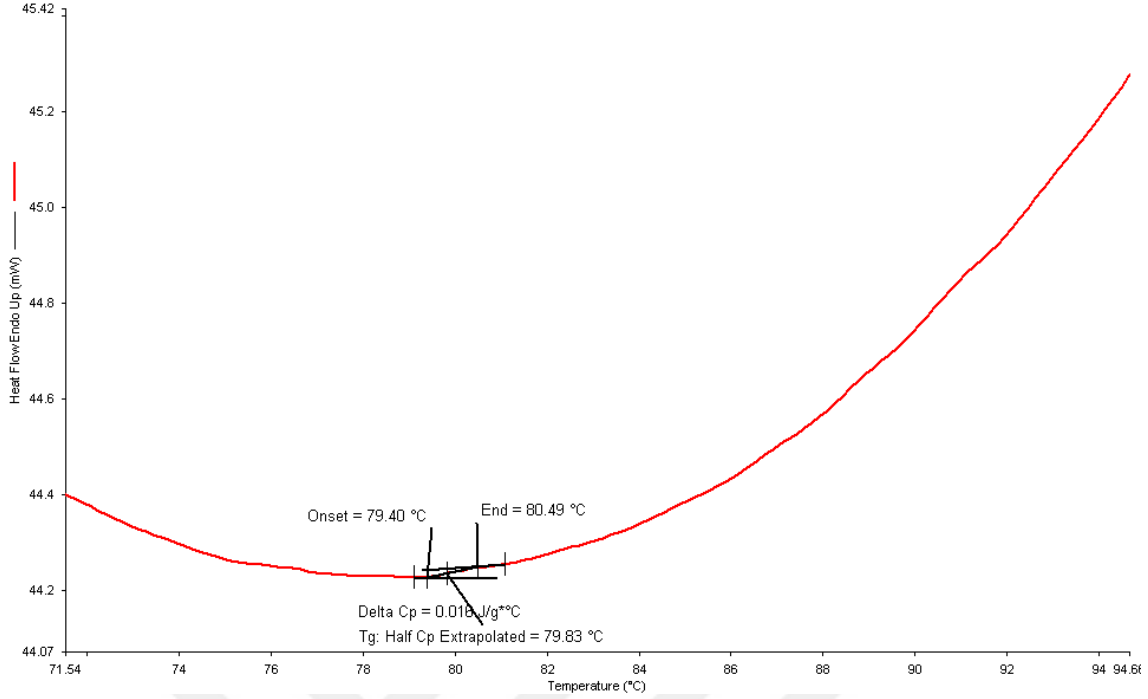
Bakteriyel selülozun YPM besiyer ortamında büyütülmesinde T_g değeri 10,63 °C olduğu rapor edilmiştir [168]. HA-HPMC’ye BC eklenmesi ile T_g değerinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.12). T_g değerleri tabloda özetlenmiştir.

KOD	BC	HPMC	HA-HPMC	HA-HPMC-25BC
T _g (°C)	10,63	191-163	90,40	79,83

Tablo 4.1 Saf BC, HPMC ve hazırlanan hidrojellerin T_g değerleri



Şekil 4.11 HA-HPMC DSC eğrisi



Şekil 4.12 HA-HPMC-25BC DSC eğrisi

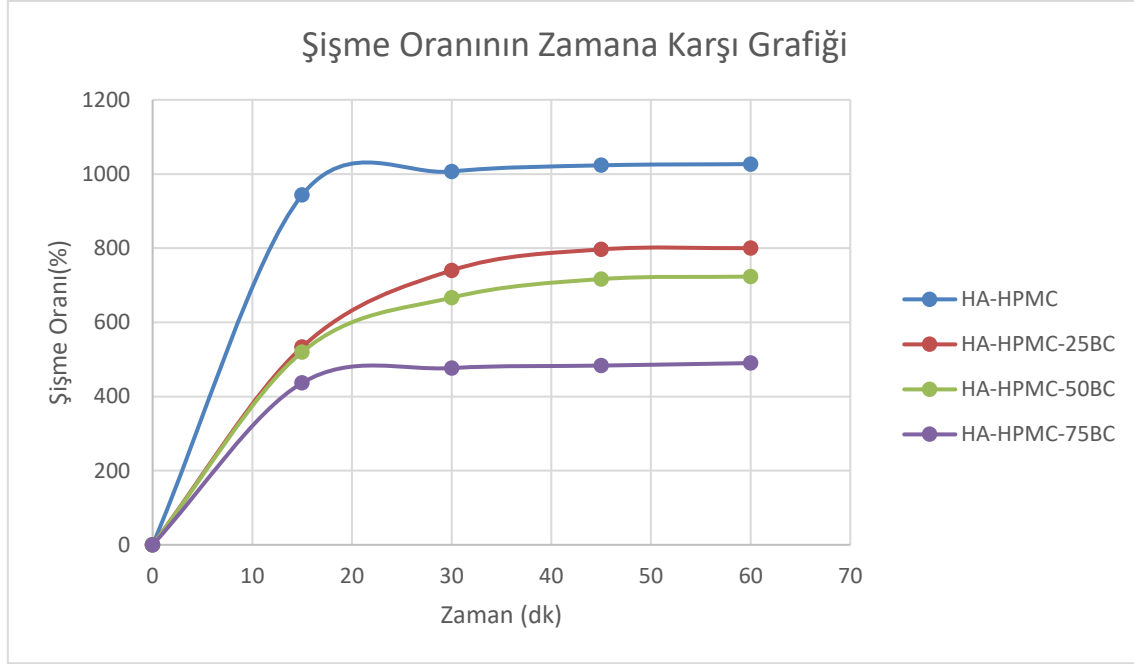
4.3 Hidrojellerin Şişme Davranışları

Çalışmamızda Hyalüronik asit, hidroksi propil metil selüloz ve bakteriyel selüloz ile hidrojeller sentezlenmiştir. Sentezlenen hidrojeller 40 °C vakum etüvünde bir gece kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş hidrojeller belirli ağırlıklarda tartım alınarak her biri ayrı şişelere koyulup üzerine daha önceden hazırlanmış olan PBS (ph: 7.4) çözelti eklenmiştir. Daha sonra 15 dk aralıklarla tartımı alınarak alınıp farklı kompozisyonların şişme oranları karşılaştırılmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%)}: [(W_s - W_k) / W_k \times 100]$$

(W_s : şişmiş hidrojinin ağırlığı, W_k : kuru hidrojinin ağırlığı)

Yukarıda verilen eşitliğe göre hidrojellerin şişme oranları hesaplanmıştır.



Sentezlenen hidrojeller Hyalüronik asit ve hidrokshipropil metil selüloza yüksek miktarda su tutma kapasitesine sahiptirler. Hyalüronik asitin yapısında amin ve hidroksil grupları bulunmaktadır. HPMC yapısında hidroksil grupları bulunmaktadır. Bu gruplar yüksek kabiliyette hidrojen bağı yapma özelliğine sahiptirler. Bunun bir sonucu olarak da su tutma kabiliyetleri yüksektir. HA-HPMC hidrojelinde yaklaşık 20 dakika içinde %1000 civarında şişme gerçekleştirilerek maksimum şişme derecesine ulaşmış ve denge durumuna gelmiştir.

Bakteriyel selüloz ilavesiyle beraber hidrojellerin şişme oranında azalma meydana gelmiştir. Bakteriyel selülozun modifikasyonu ile hidroksil gruplarında azalma meydana geldiği ve çözünmediği için hidrojin gözenek boyutunu küçülttüğü için şişme oranında azalma gözlemlenmiştir. Denge durumunda HA-HPMC ve HA-HPMC-25BC şeklini koruduğu, diğer hidrojellerin şeklini koruyamadığı gözlemlenmiştir. Denge durumundaki şişme oranları tabloda özetlenmiştir.

KOD	HA-HPMC	HA-HPMC-25BC	HA-HPMC-50BC	HA-HPMC-75BC
Dengede şişme oranı (%)	1000	800	723	490

Tablo 4.2 Hazırlanan hidrojellerin dengede şişme oranları (%)



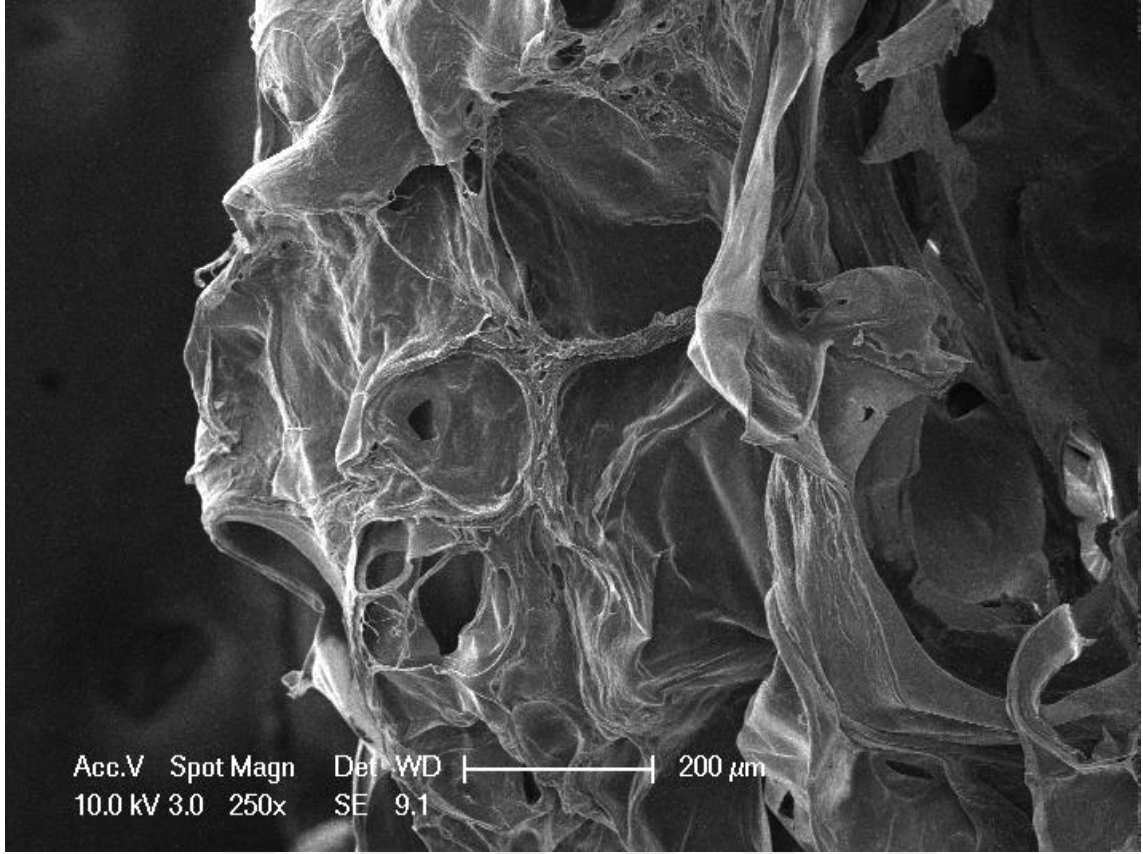
Şekil 4.13 Hazırlanan hidrojellerin PBS içerisinde şişme öncesi



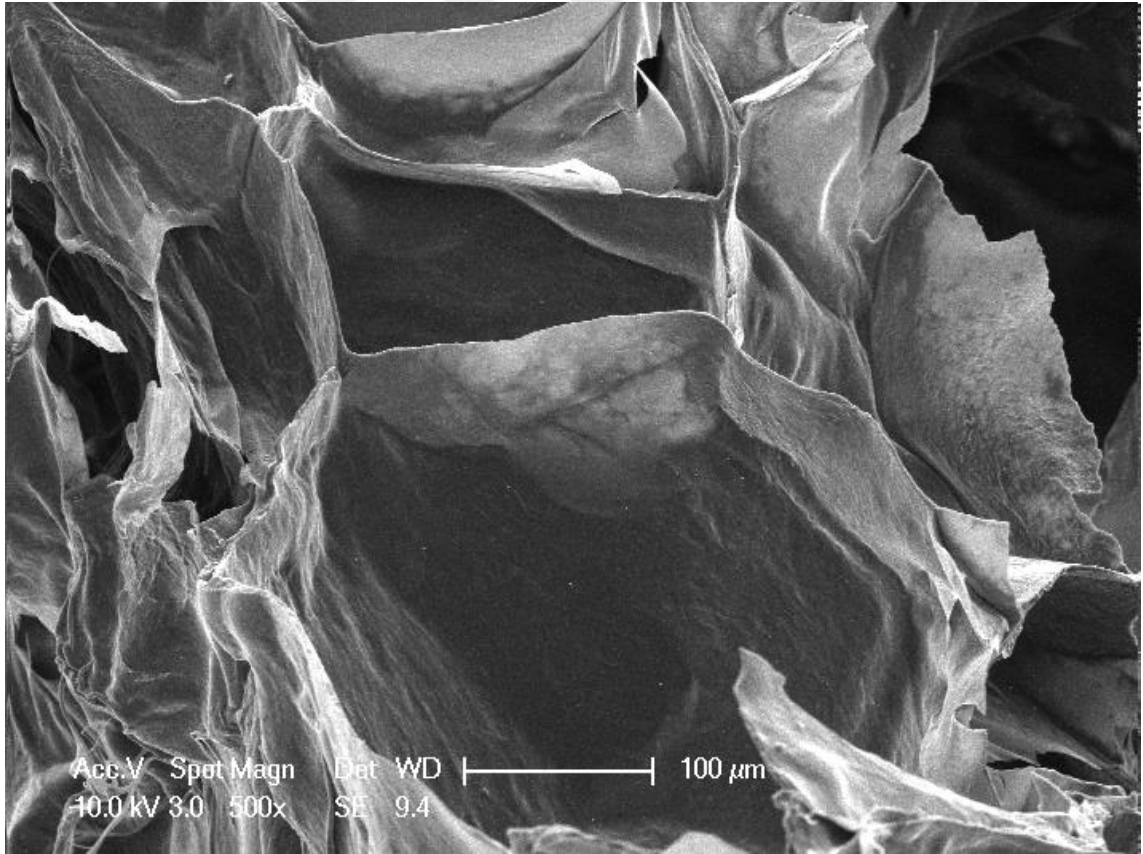
Şekil 4.14 Hazırlanan hidrojellerin PBS içerisinde şişme sonrası

4.4 Hidrojellerin Gözenek Yapıları

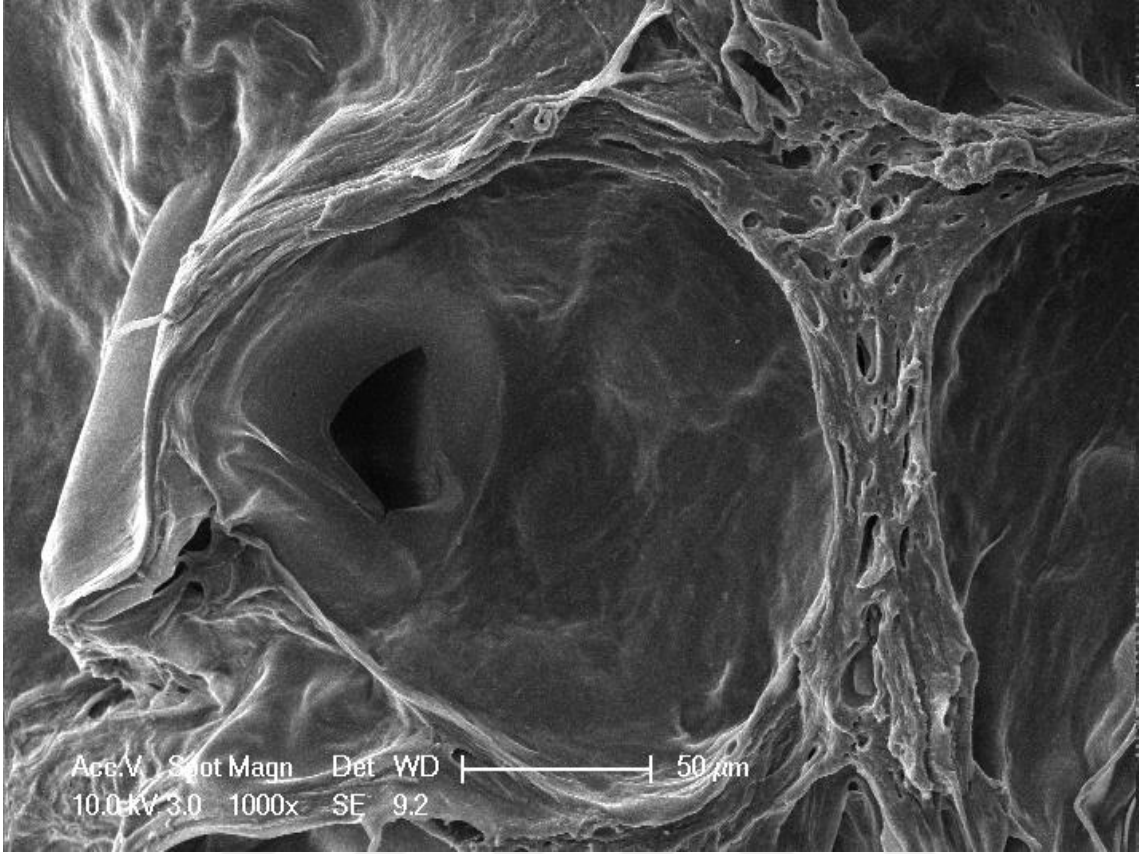
Sentezlediğimiz HA-HPMC ve HA-HPMC-25BC hidrojelleri şişme testi sonrası şeklini koruyabildiği için, SEM analiziyle gözenekliliği ve gözenek boyutları gibi morfolojik özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.15-4.23'te Sem mikrogramları görülmektedir. SEM analizi öncesinde tüm hidrojeller -76°C ' de liyofilize edilmiş ardından altın kaplama yapılarak 20 kV ile çalışılarak çeşitli büyütme oranlarındaki mikroskop görüntüleri incelenmiştir.



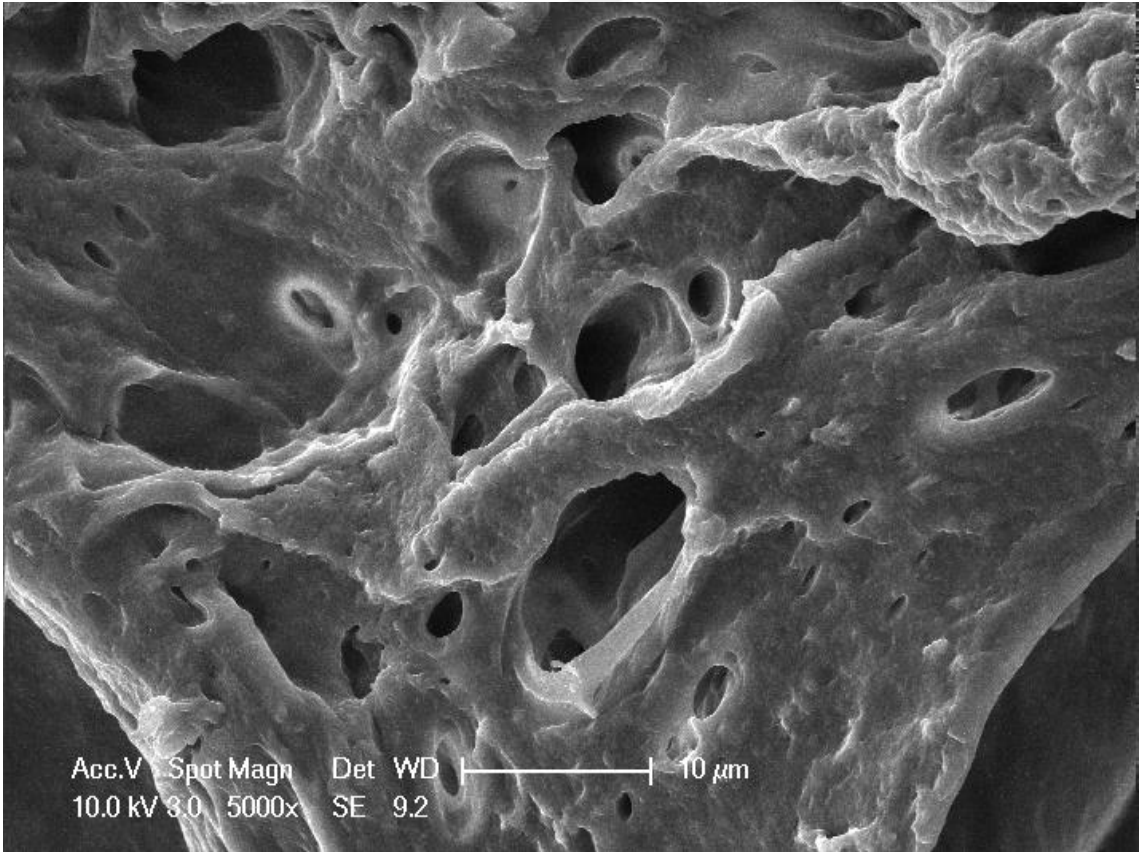
Şekil 4.15 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x250büyüme ile)



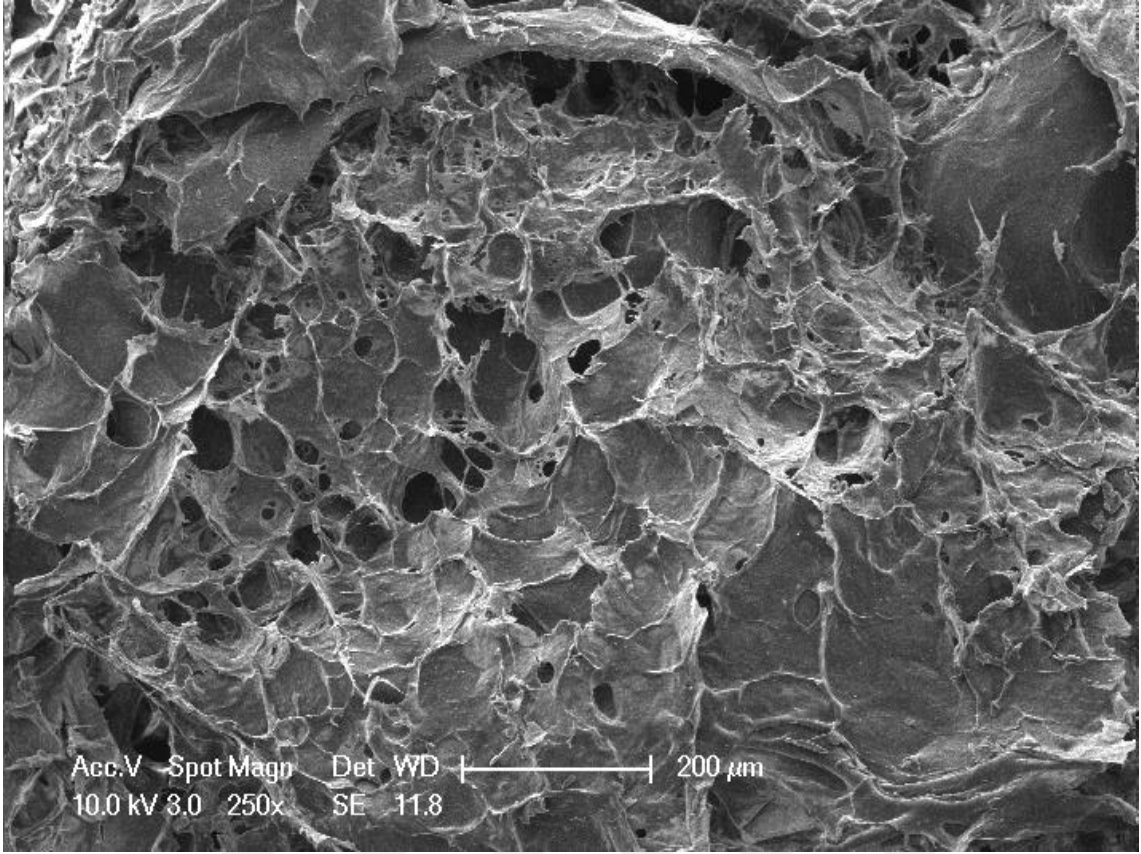
Şekil 4.16 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x500 büyüme ile)



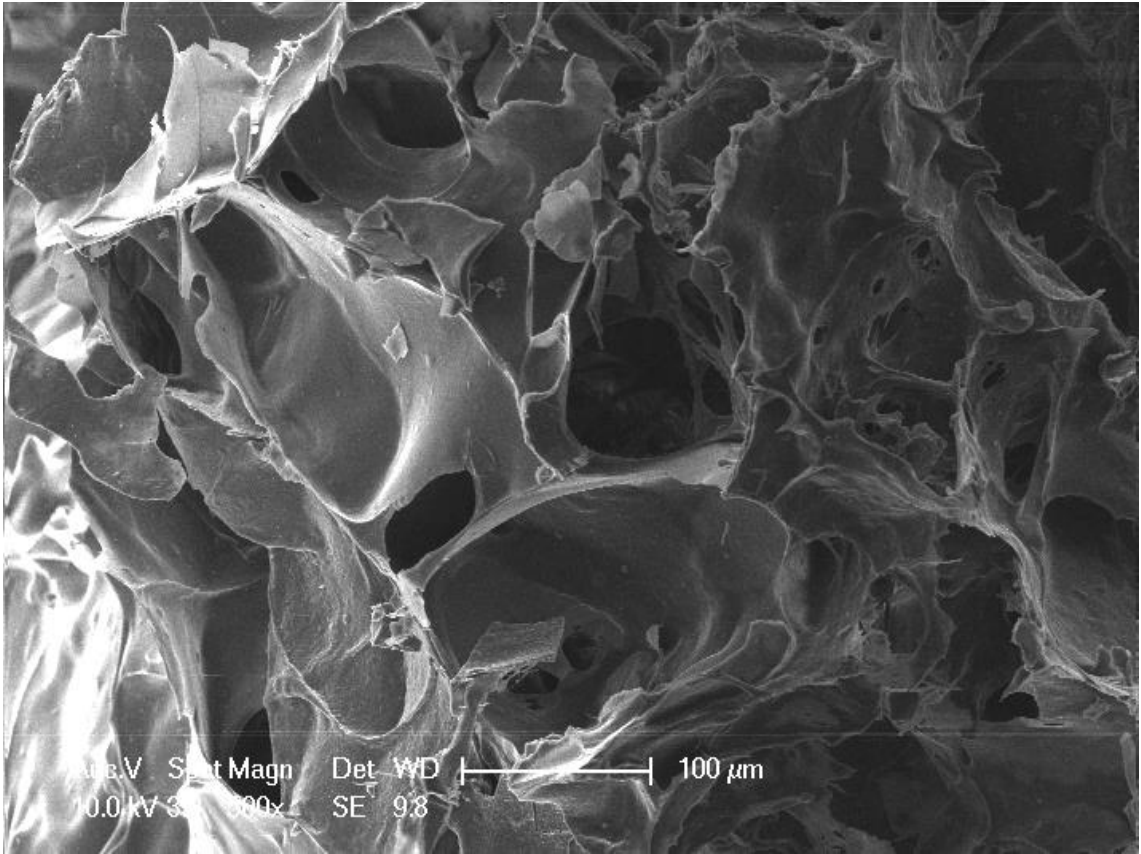
Şekil 4.17 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x1000 büyüme ile)



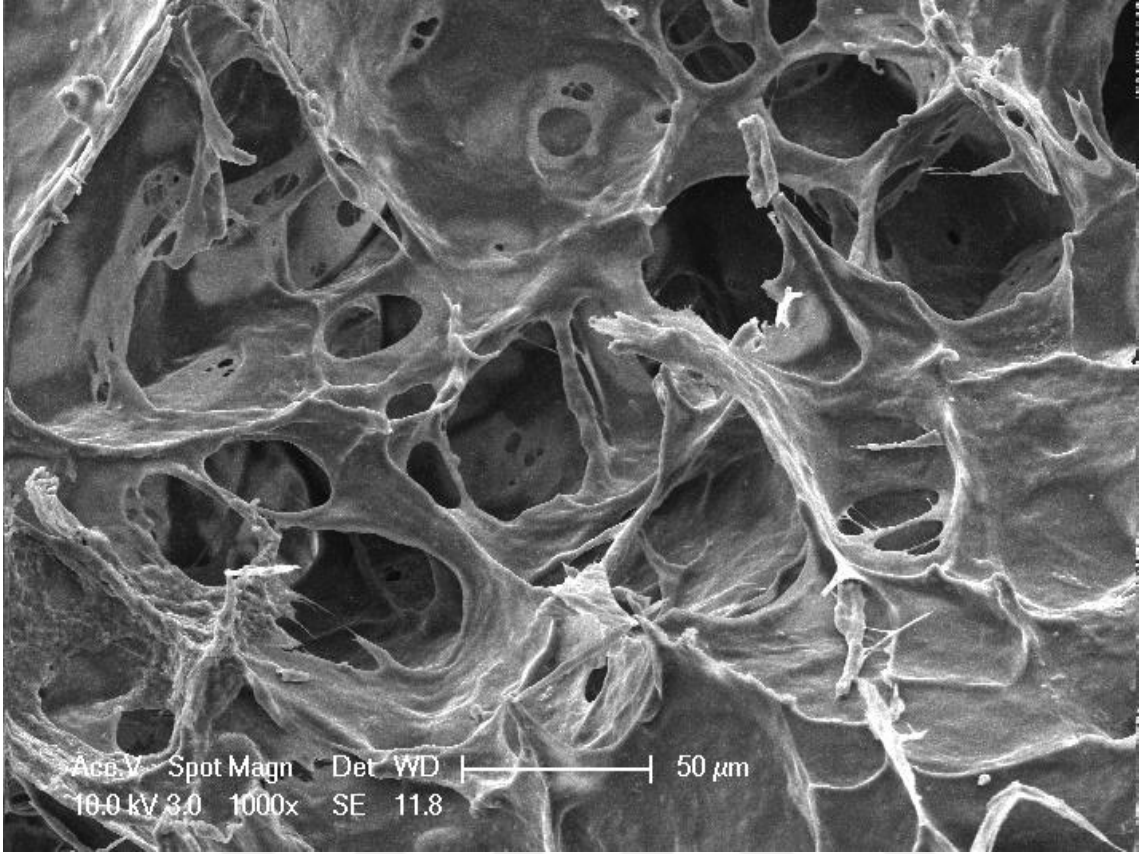
Şekil 4.18 HA-HPMC nolu hidrojin sem görüntüsü (x5000 büyüme ile)



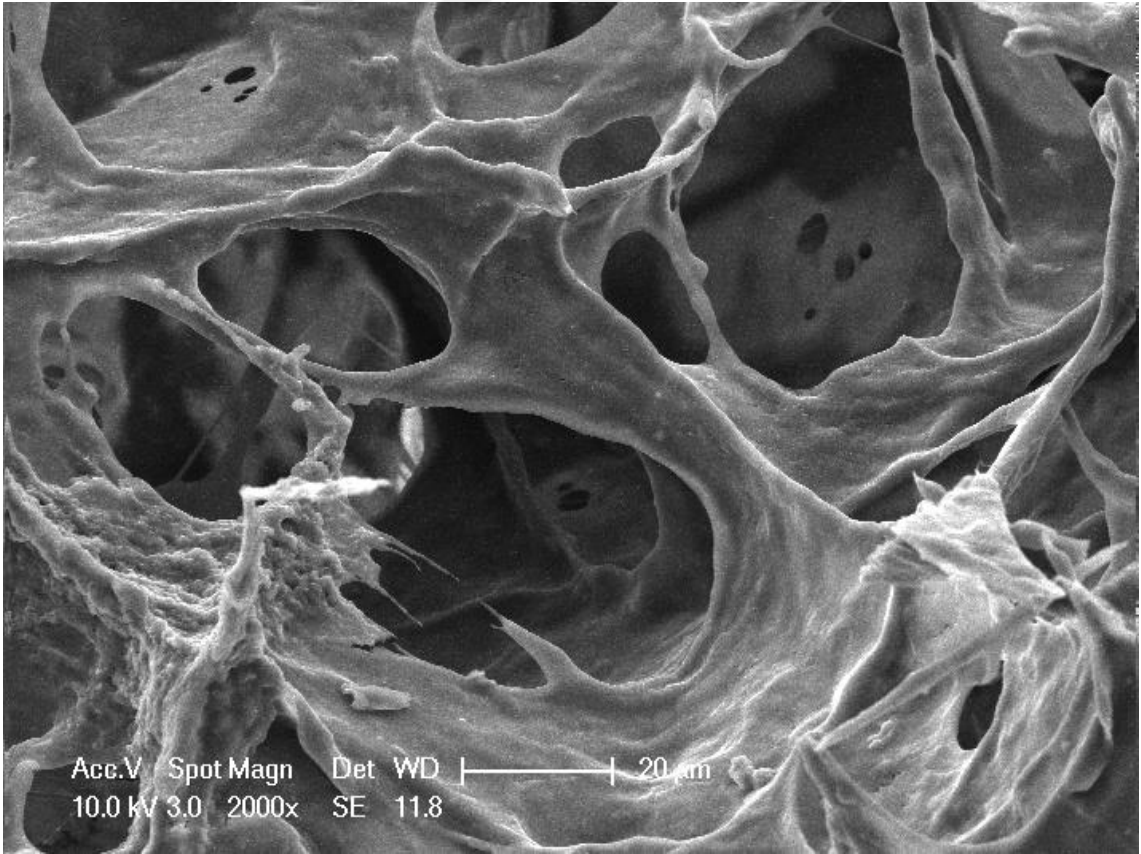
Şekil 4.19 HA-HPMC-25BC nolu hidrojinin sem görüntüsü (x250 büyüme ile)



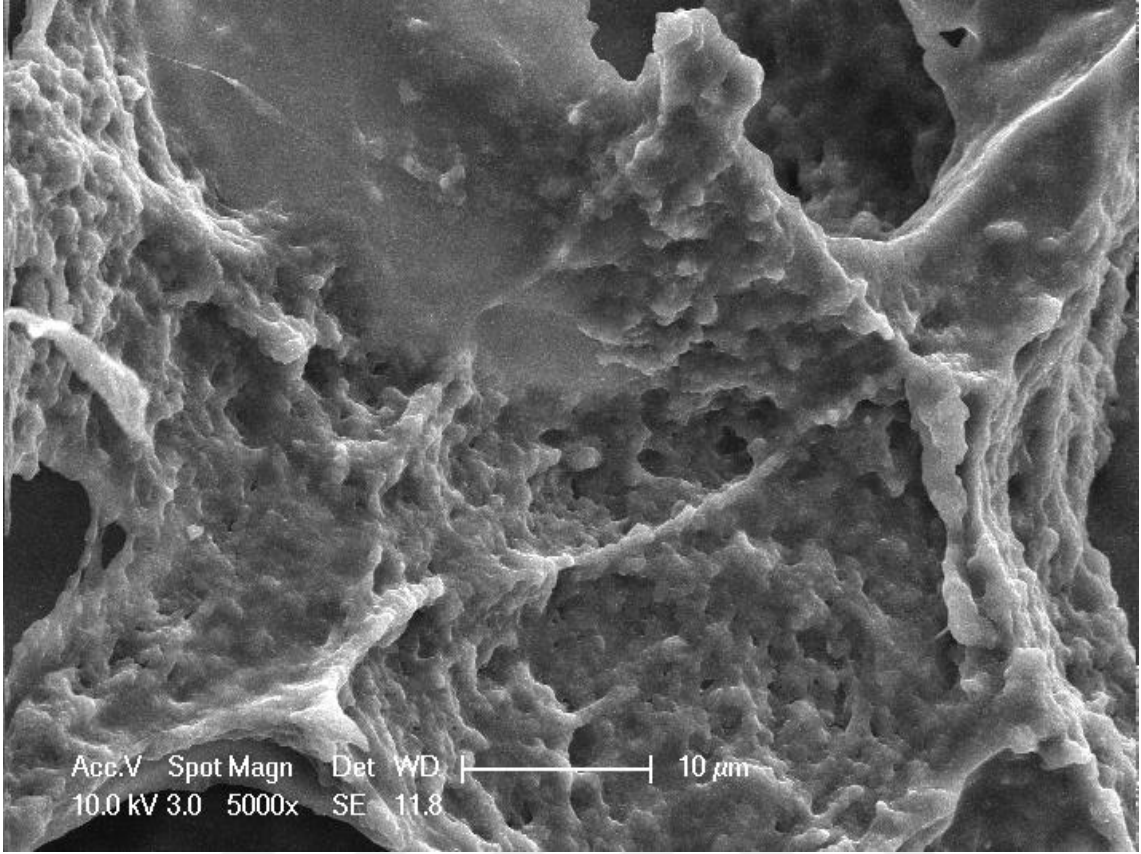
Şekil 4.20 HA-HPMC-25BC nolu hidrojinin sem görüntüsü (x500 büyüme ile)



Şekil 4.21 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x1000 büyüme ile)



Şekil 4.22 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x2000 büyüme ile)



Şekil 4.23 HA-HPMC-25BC nolu hidrojin sem görüntüsü (x5000 büyüme ile)

HA-HPMC kodlu hidrojele ait SEM görüntüleri incelendiğinde yüksek gözenekliliğe sahip olduğu görülmektedir. HA-HPMC-25BC kodlu hidrojele ait SEM görüntüsü ile karşılaştırıldığında, gözenek boyutunun küçüldüğü görülmektedir. Şişme oranları karşılaştırıldığında da elde edilen sonuçlar gibi burada da bakteriyel selüloz gözenek çaplarında da küçülme gözlemlenmiştir.

4.5 Hidrojellerin Gözenekliliği

Hidrojellerin gözeneklilik yüzdesini bulmak için Arşimet prensibine dayanan testi uygulanır.

$$\text{GÖZENEKLİLİK (\%)} = \frac{W_1 - W_3}{W_2 - W_3} \times 100$$

Şekil 4.24 Gözeneklilik hesabı

W1 : Su Dolu Şişenin Ağırlığı

W2 : İçerisinde Su Ve Hidrojel Olan Şişenin Ağırlığı

W3 : Su İle Doyurulmuş Hidrojelin Alındıktan Sonra Suyun Ağırlığı

Bu eşitlik le gözeneklilik yüzdeleri hesaplanmıştır.

Hidrojel Kodu	Gözeneklilik (%)	Gözenek Çapı (µm)
HA-HPMC	96	200-10
HA-HPMC-25BC	93	100-10

Tablo 4.3 Hidrojellerin gözenekliliği ve ortalama gözenek çapları

Tablo 4.3 de verilen gözenek özellikleri incelendiğinde çapraz bağ yoğunluğu çok olan yapılarda gözenek çapları daha dar ve gözenekliliğin yüksek olduğu görüldü. Hyalüronik asitin yapıya eklenmesiyle artan zincirler arası mesafe ile gözeneklilikte düşme gözlenip gözenek çaplarında ise büyüme gözlemlenmiştir. %90 ve üzerinde bulunan gözeneklilik literatürde daha önce sentezlenen hidrojeller ile benzerlik göstermektedir. Bu yüksek oran hidrojen özelliğine uygun olup doku mühendisliği alanında iskele kullanımı için uygun olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25 Hazırlanan hidrojellerin su içerisinde şişme öncesi ve sonrası

5 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında diyabetik ve şiddetli yanık yaralarında kullanılabilecek malzeme üretimi hedeflenmektedir. Günümüzdeki tedavilerin bazı sınırlamaları vardır. Mevcut tedavide kullanılan pansumanlar yara üzerine yapışmakta, gaz akışına engel olmakta, yara ekstüdasını emmemektedir. Bu sorunlardan yola çıkarak ideal pansuman malzemesi elde etmek için Bakteriyel selüloz- Hyalüronik asit esaslı polimerik hidrojellerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. İdeal pansuman özelliği azid-alkin klik reaksiyonu ile sağlanmıştır. BC ve HA'ın klik reaksiyonu ile çapraz bağlanması amacıyla, azid içeren ve alkin içeren HA ve BC sentezlenmiştir. Bunun için ilk önce hyalüronik asit- azid bölüm 3.3.1'de anlatıldığı gibi sentezlenmiştir. İlk olarak epiklorohidrin malzemesine halka açılması ile azid bağlanmış ve bu malzeme ile HA-azido sentezlenmiştir. Karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. Sentez sonucu 2100 cm^{-1} 'de gelen $\text{-N}\equiv\text{N-}$ piki gözlemlenmektedir. Azid pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Alkin içeren Bakteriyel selüloz bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi sentezlenmiştir. İlk aşama olarak Bakteriyel selülozun üretimi yapılmıştır. Karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. FTIR sonucu olarak Bakteriyel selüloza ait karakteristik pikleri 3340 cm^{-1} , 2892 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} bölgesinde gözlenmektedir. Bakteriyel selülozun üretimi başarı ile gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. İkinci aşama olarak Alkin içeren bakteriyel selülozun sentezi sonrası karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. Alkin pikine ait 2100 cm^{-1} 'de gelen $\text{-C}\equiv\text{C-}$ piki gözlemlenmektedir. Alkin pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Bakteriyel selülozun jelleşmesini arttırmak için Hidroksipropil Metil selüloz kullanılmıştır. Alkin içeren HPMC bölüm 3.3.3'de anlatıldığı gibi sentezlenmiştir ve karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. FTIR spektrumu incelediğinde, Alkin pikine ait 2167 cm^{-1} 'de gelen $\text{-C}\equiv\text{C-}$ piki gözlemlenmektedir. Alkin pikinin gözlemlenmesi reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Azid-alkin bakır katalizli klik denemeleri bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. HPMC ve HA oranı sabit tutulup değişen oranlarda BC ilavesiyle hidrojel sentezlenmiştir. Yapısal karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. FTIR spektrumuna incelendiğinde azid ve alkin piklerinin kaybolması triazol halkasının oluşumunun çok iyi

bir kanıttır. Bu gözleme ek olarak 4 FTIR spektrumunda görüldüğü üzere 1573 cm⁻¹ (N=N) ve 1400 cm⁻¹ (C-N) bölgesinde yeni piklerin oluşumunu bunu desteklemektedir. Camsı geçiş sıcaklığı DSC ile belirlenmiştir. Bakteriyel selüloz ilavesiyle T_g değeri düşmüştür. Şişme davranışları incelendiğinde HA ve HPMC e ait olan jel en yüksek şişme oranını göstermiştir. BC ilave edilmesi ile beraber şişme oranı düşmüştür. Yapılan tüm hidrojellerde birkaç saniyede şişme gerçekleşmiş ve 30 dk içerisinde dengeye ulaşmıştır. Sem görüntüleri incelendiğinde, HA ve HPMC oranı sabit tutulup BC oranı arttırıldığında daha dar gözenekler oluşmuştur. Gözenek yapısına bakıldığında HA-HPMC kodlu hidrojelin 200-10 µm arasında değişmekteyken, HA-HPMC-25BC 100-10 µm arasında olduğu gözlenmiştir. Hidrojellerin gözenekliliğine bakıldığında %90 üzeri olduğu gözlemlenmiştir. Bu elde edilen sonuçlar doğrultusunda sentezlenen hidrojeller doku mühendisliği alanında kullanım için uygun kriterlere sahiptir.

- [1] Vijayendra, S.V.N., Shamala, T.R., 2013. Film forming microbial biopolymers for commercial applications-a review. *Critical Reviews in Biotechnology*.
- [2] Gopalrao, M., Bharathi, P., Akila, R.M., 2014. A comprehensive review on biopolymers. *Scientific Reviews And. Chemical Communications* 4 (2), 61e68.
- [3] Yates, M.R., Barlow, C.Y., 2013. Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers. A critical review, *Resources, Conservation and Recycling* 78, 54e66.
- [4] Chen GQ, Martin KP (2012) Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. *Chem Rev* 112:2082–2099
- [5] Babu, R. P., O'connor, K., & Seeram, R. (2013). Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Progress in biomaterials*, 2(1), 1-16.
- [6] Smock, D. A. (2010). Bioplastics: technologies and global markets. *BCC Research, September..*
- [7] Wilbon, P.A.; Chu, F.; Tang, C. Progress in renewable polymers from natural terpenes, terpenoids, and rosin. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, 34, 8–37.
- [8] Meier, M.A.R.; Metzger, J.O.; Schubert, U.S. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1788–1802
- [9] Petersen, K.; Væggemose Nielsen, P.; Bertelsen, G.; Lawther, M.; Olsen, M.B.; Nilsson, N.H.; Mortensen, G. Potential of biobased materials for food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, 10, 52–68.
- [10] John, M. J., & Thomas, S. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate polymers*, 71(3), 343-364.
- [11] Manavitehrani, I.; Fathi, A.; Badr, H.; Daly, S.; Shirazi, A.N.; Dehghani, F. Biomedical applications of biodegradable polyesters. *Polymers* **2016**, 8, 20
- [12] D. Klemm, et al., Nanocelluloses: a new family of nature-based materials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (24) (2011) 5438–5466.
- [13] D.R. Ruka, G.P. Simon, K.M. Dean, Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose, *Carbohydr. Polym.* 89 (2) (2012) 613–622.

- [14] A.J. Brown, XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc. Trans.* 49 (1886) 432–439.
- [15] M. Shoda, Y. Sugano, Recent advances in bacterial cellulose production, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10 (1) (2005) 1.
- [16] P. Ross, R. Mayer, M. Benziman, Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 55 (1) (1991) 35–58.
- [17] M. Koyama, et al., Parallel-up structure evidences the molecular directionality M. Pang, during biosynthesis of bacterial cellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (17) (1997) 9091–9095.
- [18] C.J. Grande, et al., Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites, *Mater. Sci. Eng., C* 29 (4) (2009) 1098–1104.
- [19] J. Wang, J. Tavakoli, Y. Tang, Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review, *Carbohydr. Polym.* (2019).
- [20] M.U. Islam, et al., Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 1166–1173. [11] B.V. Mohite, B.K. Salunke, S.V. Patil, Enhanced production of bacterial cellulose by using *gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (5) (2013) 1497–1511.
- [21] B.V. Mohite, B.K. Salunke, S.V. Patil, Enhanced production of bacterial cellulose by using *gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (5) (2013) 1497–1511.
- [22] H. Son, et al., Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions, *Bioresour. Technol.* 86 (3) (2003) 215–219.
- [23] W. Czaja, D. Romanovicz, R.M. Brown, Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, *Cellulose* 11 (3) (2004) 403–411.
- [24] A.F. Jozala, et al., Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (5) (2016) 2063–2072.
- [25] A.C. Rodrigues, et al., Response surface statistical optimization of bacterial nanocellulose fermentation in static culture using a low-cost medium, *New Biotechnol.* 49 (2019) 19–27.
- [26] Z. Hussain, et al., Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review,

Cellulose 26 (5) (2019) 2895–2911.

[27] J. Ye, et al., Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium, *Bioresour. Technol.* 274 (2019) 518–524.

[28] W. Voon, et al., Bio-cellulose Production by *Beijerinckia fluminensis* WAUPM53 and *Gluconacetobacter xylinus* 0416 in Sago By-product Medium, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187 (1) (2019) 211–220.

[29] P. Marín, et al., Bacterial nanocellulose production from naphthalene, *Microb. Biotechnol.* (2019).

[30] M. Salari, et al., Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media, *Int. J. Biol. Macromol.* 122 (2019) 280–288.

[31] J.K. Park, J.Y. Jung, Y.H. Park, Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol, *Biotechnol. Lett.* 25 (24) (2003) 2055–2059.

[32] S. Bae, Y. Sugano, M. Shoda, Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor, *J. Biosci. Bioeng.* 97 (1) (2004) 33–38. [23] L.L. Zhou, et al., Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (7) (2007) 483.

[33] L.L. Zhou, et al., Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (7) (2007) 483

[34] G.F. Picheth, et al., Bacterial cellulose in biomedical applications: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 97–106.

[35] M. Uryu, N. Kurihara, Acoustic diaphragm and method for producing same, 1993, Google Patents.

[36] H.M. Azeredo, M.F. Rosa, L.H.C. Mattoso, Nanocellulose in bio-based food packaging applications, *Ind. Crops Prod.* 97 (2017) 664–671.

[37] N. Lang, et al., Bacterial nanocellulose as a new patch material for closure of ventricular septal defects in a pig model, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 47 (6) (2014) 1013–1021.

[38] Z. Lou, A better design is needed for clinical studies of chronic tympanic membrane perforations using biological materials, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 273 (11) (2016) 4045–4046.

- [39] S. Biskin, et al., A new graft material for myringoplasty: bacterial cellulose, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 273 (11) (2016) 3561–3565.
- [40] E. Morales-Narváez, et al., Nanopaper as an optical sensing platform, *ACS Nano* 9 (7) (2015) 7296–7305.
- [41] J. Yang, et al., Biotemplated preparation of CdS nanoparticles/bacterial cellulose hybrid nanofibers for photocatalysis application, *J. Hazard. Mater.* 189 (1–2) (2011) 377–383.
- [42] G. Feil, et al., Bacterial cellulose shifts transcriptome and proteome of cultured endothelial cells towards native differentiation, *Mol. Cell. Proteomics* 16 (9) (2017) 1563–1577.
- [43] W. Chang, H. Chen, Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings, *Food Hydrocolloids* 53 (2016) 75–83.
- [44] A. Svensson, et al., Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials* 26 (4) (2005) 419–431.
- [45] Y. Pötzinger, D. Kralisch, D. Fischer, Bacterial nanocellulose: the future of controlled drug delivery? *Therapeutic Delivery* 8 (9) (2017) 753–761.
- [46] H. Ullah, H.A. Santos, T. Khan, Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery, *Cellulose* 23 (4) (2016) 2291–2314.
- [47] X. Chen, et al., Recent approaches and future prospects of bacterial cellulose-based electroconductive materials, *J. Mater. Sci.* 51 (12) (2016) 5573–5588.
- [48] Meyer K, Palmer JW (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 107:629–634
- [49] Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 242:27–33
- [50] Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M (2010) Understanding and using hyaluronan. *Biopolymers* 20:387–412
- [51] Deangelis PL (2012) Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:295–305
- [52] Fagien S, Cassuto D (2012) Reconstituted injectable hyaluronic acid: expanded applications in facial aesthetics and additional thoughts on the mechanism of action in cosmetic medicine. *Plast Reconstr Surg* 130:208–217
- [53] Cooper CA, Brown KK, Meletis CD, Zabriskie N (2008) Inflammation and

hyaluronic acid. *Altern Complement Ther* 14:78–84

[54] Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85:699–715

[55] Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI (2008) Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* 18:288–295

[56] Boyce JD, Chung JY, Adler B (2000) *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol* 83:153–160

[57] Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, Dicesare TJ (1991) Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci* 88:8317–8321

[58] Blank LM, Hugenholtz P, Nielsen LK (2008) Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic *Streptococci*. *J Mol Evo* 67:13–22

[59] Deangelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH (1993) Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J Biol Chem* 268:14568–14571

[60] Jong A, Wu CH, Chen HM, Luo F, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Lamunyon CW, Plaas A, Huang SH (2007) Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *E C* 6:1486–1496

[61] Augustine, R., Rajakumari, R., Cvelbar, U., Mozeti9c, M., George, A., 2013. Biopolymers for health, food, and cosmetic applications. In: Thomas, S., Durand, D., Chassenieux, C., Jyotishkumar, P. (Eds.), *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 801e851.

[62] R. Langer, J.P. Vacanti, R TIC L E, *Tissue engineering*, Science 260 (1993) 920–926.

[63] J. Huang, K. Huang, X. You, G. Liu, G. Hollett, Y. Kang, Z. Gu, J. Wu, Evaluation of tofu as a potential tissue engineering scaffold, *J. Mater. Chem. B* 6 (9) (2018) 1328–1334.

[64] T.J. Levingstone, A. Matsiko, G.R. Dickson, F.J. O'Brien, J.P. Gleeson, A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair, *Acta*

Biomater. 10 (5) (2014) 1996–2004.

[65] K. Huang, J. Wu, Z. Gu, Black phosphorus hydrogel scaffolds enhance bone regeneration via a sustained supply of calcium-free phosphorus, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (3) (2018) 2908–2916.

[66] D. Algul, H. Sipahi, A. Aydin, F. Kelleci, S. Ozdatli, F.G. Yener, Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate–chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 363–369.

[67] H. Sorg, et al., Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts, *Eur. Surg. Res.* 58 (1–2) (2017) 81–94.

[68] S. MacNeil, Progress and opportunities for tissue-engineered skin, *Nature* 445 (7130) (2007) 874–880.

[69] I. Siró, D. Plackett, Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review, *Cellulose* 17 (3) (2010) 459–494.

[70] I.A. Siqueira, et al., In vitro and in vivo studies of novel poly(D,L-lactic acid), superhydrophilic carbon nanotubes, and nanohydroxyapatite scaffolds for bone regeneration, *7* (18) (2015) 9385–9398.

[71] L.J. Currie, J.R. Sharpe, R. Martin, The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements, *Plast. Reconstr. Surg.* 108 (2001) 1713–1726.

[72] G. Chen, T. Ushida, T.J.M.B. Tateishi, Scaffold design for tissue engineering, *2* (2) (2002) 67–77.

[73] J.L. Drury, D.J.J.B. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables

and applications, *24* (24) (2003) 4337–4351. [13] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat. Mater.* 4 (7) (2005) 518.

[74] A.A. Mahmoud, A.H. Salama, Norfloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin

reconstruction: preparation, evaluation and in-vivo wound healing assessment, *Eur.*

J. Pharm. Sci. 83 (2016) 155–165.

[75] S.C. Heilshorn, et al., Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins, *24* (23) (2003) 4245–4252.

[76] S. Naahidi, et al., Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications, *35* (5) (2017) 530–544.

- [77] Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, Advances in engineering hydrogels, *Science* 356 (6337) (2017) 3627.
- [78] Junmin Zhu, E.M. Roger, Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert Rev. Med. Devices* 8 (5) (2011) 607–626.
- [79] S. Stratton, et al., Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, 1 (2) (2016) 93–108.
- [80] Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., & Peppas, N. A. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 21(32-33), 3307–3329.
- [81] Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337–4351.
- [82] Lakes, R. S., & Park, J. (1992). *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media.
- [83] Singh, S.R., 2009. Principles of regenerative medicine. *Ann. Biomed. Eng*
- [84] Hall, B.J., Jones, L.W., Dixon, B., 2014. Silicone allergies and the eye: fact or fiction? *Eye Contact Lens* 40, 51–57
- [85] Blackshaw, S.E., Arkison, S., Cameron, C., Davies, J.A., 1997. Promotion of regeneration and axon growth following injury in an invertebrate nervous system by the use of three-dimensional collagen gels. *Proc. Biol. Sci.* 264, 657–661
- [86] Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 185, 117–118
- [87] Lim, F., Sun, A.M., 1980. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210, 908–910.
- [88] Dillon, G.P., Yu, X., Sridharan, A., Ranieri, J.P., Bellamkonda, R.V., 1998. The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9, 1049–1069
- [89] Kopeček, J., 2007. Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials* 28, 5185–5192
- [90] El-Sherbiny, I., Yacoub, M., 2013. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: progress and challenges. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013, 316–342.
- [91] Chan, B.P., Leong, K.W., 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine J.* 17, S467–S479

- [92] Schwarzbauer, J., 1999. Basement membranes: putting up the barriers. *Curr. Biol.* 9,R242–R244.
- [93] Anderson, J.M., 2001. Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 31,81–110.
- [94] Kim, B.S., Mooney, D.J., 1998. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 16, 224–229.
- [95] Malafaya, P. c., Silva, B., & Reis, G. A. R. L. (2007). Natural origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(45), 207–233.
- [96] Mortisen, D., Peroglio, M., Alini, M., & Eglin, D. (2011). Tailoring thermoreversible hyaluronan hydrogels by click chemistry and RAFT polymerization for cell and drug therapy. *Biomacromolecules*, 11(5), 1261–1272.
- [97] Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2007). Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(5), 3183–3191.
- [98] Vlaia, L., Coneac, G., Olariu, I., Vlaia, V., & Lupuleasa, D. (2016). Cellulose-derivatives-based hydrogels as vehicles for dermal and transdermal drug delivery. *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*, 2, 64
- [99] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001)2004–2021.
- [100] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*41 (2002) 2596–2599.
- [101] B. Gacal, H. Durmaz, M.A. Tasdelen, G. Hizal, U. Tunca, Y. Yagci, A.L. Demirel, *Macromolecules* 39 (2006) 5330–5336.
- [102] T. Siu, A.K. Yudin, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 530–531.
- [103] I.M. Pastor, M. Yus, *Curr. Org. Chem.* 9 (2005) 1–29.
- [104] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2 (1963) 565–598.
- [105] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 3057–3064.
- [106] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 210–216.
- [107] V.O. Rodionov, S.I. Presolski, D.D. Diaz, V.V. Fokin, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*129 (2007) 12705–12712.
- [108] J.E. Hein, V.V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1302–1315.

- [109] M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2952–3015.
- [110] V.D. Bock, H. Hiemstra, J.H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* (2006) 51–68.
- [111] Ladomenou, K., Nikolaou, V., Charalambidis, G., & Coutsolelos, A. G. (2016). “Click”-reaction: An alternative tool for new architectures of porphyrin based derivatives. *Coordination Chemistry Reviews*, 306, 1-42.
- [112] H.V.R. Dias, S.A. Polach, S.K. Goh, E.F. Archibong, D.S. Marynick, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 3894–3901.
- [113] J.P. Selegue, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 1543–1563.
- [114] M. Ahlquist, V.V. Fokin, *Organometallics* 26 (2007) 4389–4391.
- [115] B.F. Straub, *Chem. Commun.* (2007) 3868–3870.
- [116] C. Nolte, P. Mayer, B.F. Straub, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 2101–2103.
- [117] S.I. Presolski, V. Hong, S.H. Cho, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 14570–14576.
- [118] V.O. Rodionov, S.I. Presolski, S. Gardinier, Y.H. Lim, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12696–12704.
- [119] C.H. Chu, R.H. Liu, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2177–2188.
- [120] W.G. Lewis, F.G. Magallon, V.V. Fokin, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9152–9153.
- [121] T.R. Chan, R. Hilgraf, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *Org. Lett.* 6 (2004) 2853–2855.
- [122] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3192–3193.
- [123] J.E. Moses, A.D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 1249–1262.
- [124] P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* 113 (2013) 4905–4979.
- [125] A. Brik, C.Y. Wu, C.H. Wong, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 1446–1457.
- [126] T. Groth, M. Renil, E. Meinjohanns, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6 (2003) 589–610.
- [127] K.E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D.A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14150–14151.
- [128] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discovery Today* 8 (2003) 1128–1137.
- [129] M.V. Gil, M.J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis Stuttgart* (2007) 1589–1620.
- [130] W.H. Binder, C. Kluger, *Curr. Org. Chem.* 10 (2006) 1791–1815.
- [131] J.F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 1018–1025.

- [132] W.H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* 28 (2007) 15–54.
- [133] C.J. Hawker, K.L. Wooley, *Science* 309 (2005) 1200–1205.
- [134] P. Wu, A.K. Feldman, A.K. Nugent, C.J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J.M.J. Frechet, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 3928–3932.
- [135] E.S. Read, S.P. Armes, *Chem. Commun.* (2007) 3021–3035.
- [136] J.D., De Souza, A.M., Fontana, C.K., Torriani, I.L., Moreschi, J.C., Gallotti, B.J., De Souza, S.J., Narcisco, G.P., Bichara, J.A., Farah, L.F.X., 1990. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. Appl. Biochem. Biotechnol.* 24 (1), 253–264
- [137] Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S.S., Raju, P.S., Bawa, A.S., 2008. The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (11), 2593.
- [138] Shibazaki, H., Kuga, S., Onabe, F., Usuda, M., 1993. Bacterial cellulose membrane as separation medium. *J. Appl. Polym. Sci.* 50 (6), 965–969.
- [139] Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M., 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Sci.* 97 (8), 2892–2923.
- [140] Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown Jr., R.M., 2006. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27 (2), 145–151.
- [141] Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M., Brown Jr., R.M., 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 8 (1), 1–12.
- [142] Kaewnopparat, S., Sansernluk, K., Faroongsarng, D., 2008. Behavior of freezable bound water in the bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum*: an approach using thermoporosimetry. *AAPS PharmSciTech* 9 (2), 701–707.
- [143] Shezad, O., Khan, S., Khan, T., Park, J.K., 2010. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydr. Polym.* 82 (1), 173–180.
- [144] Jelenko, C.r., Smulyan, W.I., Wheeler, M.L., 1968. Studies in burns: the role of lipids in the transmissivity of membranes. *Ann. Surg.* 167 (4), 521–532.
- [145] L.O., Nilsson, G.E., Reithner, H.L., 1977. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns* 3 (3), 159–165.

- [146] Fu, L., Zhang, J., Yang, G., 2013. Present status and applications of bacterial cellulosebased materials for skin tissue repair. *Carbohydr. Polym.* 92 (2), 1432–1442.
- [147] C.A., Simman, R., 2010. Modern collagen wound dressings: function and purpose. *J. Am. Coll. Certif. Wound Spec.* 2 (3), 50–54.
- [148] S., Silva, N.B., Almeida-Lima, J., Rocha, H.A., Medeiros, S.R., Alves Jr., C., Gama, F.M., 2009. BC nanofibres: in vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol. Lett.* 189 (3), 235–241.
- [149] Diegelmann, R.F., Evans, M.C., 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 9, 283–289.
- [150] Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T (2016) Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds* 28:78–88
- [151] Trabucchi E, Pallotta S, Morini M, Corsi F, Franceschini R, Casiraghi A, Pravettoni A, Foschi D, Minghetti P (2002) Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *Int J Tissue React* 24:65–71
- [152] Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA (2005) The role of hyaluronic acid in wound healing. *Am J Clin Dermatol* 6:393–402
- [153] Prosdocimi M, Bevilacqua C (2012) Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Med* 54:129–135
- [154] Lu L, Leng Y, Cnen Y (2000) An experiment study on wound healing with exogenous hyaluronic acid. *Chin J Plast Surg* 16:30–33
- [155] Li H, Xue Y, Jia B, Bai Y, Zuo Y, Wang S, Zhao Y, Yang W, Tang H (2018) The preparation of hyaluronic acid grafted pullulan polymers and their use in the formation of novel biocompatible wound healing film. *Carbohydr Polym* 188:92–100
- [156] Huang J, Ren J, Chen G, Li Z, Liu Y, Wang G, Wu X (2018) Tunable sequential drug delivery system based on chitosan/hyaluronic acid hydrogels and PLGA microspheres for management of non-healing infected wounds. *Mater Sci Eng C* 89:213–222
- [157] Chanda A, Adhikari J, Ghosh A, Chowdhury SR, Thomas S, Datta P, Saha P (2018) Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. *Int J Biol Macromol* 116:774–785

- [158] Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF (2011) Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr Polym* 85:469–489
- [159] Wang TW, Sun JS, Wu HC, Tsuang YH, Wang WH, Lin FH (2006) The effect of gelatin–chondroitin sulfate–hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice. *Biomaterials* 27:5689–5697
- [160] Zhu J, Li F, Wang X, Yu J, Wu D (2018) Hyaluronic acid and polyethylene glycol hybrid hydrogel encapsulating nanogel with hemostasis and sustainable antibacterial property for wound heal-ing. *ACS Appl Mater Interfaces* 10:13304–13316
- [161] Hu M, Sabelman EE, Cao Y, Chang J, Hentz VR (2003) Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds. *J Biomed Mater Res B* 67:586–592
- [162] Yıldırım S, Özener H, Doğan B, Kuru B (2018) Effect of topically applied hyaluronic acid on pain and palatal epithelial wound healing: an examiner-masked, randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 89:36–45
- [163] Roehrs H, Stocco JG, Pott F, Blanc G, Crozeta K, Meier MJ, Dias FA (2016) Dressings and topical agents containing hyaluronic acid for chronic wound healing. *The Cochrane Library*
- [164] Shi L, Zhao Y, Xie Q, Fan C, Hilborn J, Dai J, Ossipov DA (2018) Moldable hyaluronan hydrogel enabled by dynamic metal–bisphosphonate coordination chemistry for wound heal-ing. *Adv Healthc Mater* 7:1700973
- [165] Tamer TM, Valachová K, Hassan MA, Omer AM, El-Shafeey M, Eldin MM, Šoltés L (2018) Chitosan/hyaluronan/edaravone membranes for anti-inflammatory wound dressing: in vitro and in vivo evaluation studies. *Mater Sci Eng C* 90:227–235
- [166] Sahana, T. G., & Rekha, P. D. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular biology reports*, 45(6), 2857-2867.
- [167] Pahimanolis, N., Sorvari, A., Luong, N. D., & Seppälä, J. (2014). Thermoresponsive xylan hydrogels via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Carbohydrate polymers*, 102, 637-644.
- [168] Pinar, O., Bozdağ, G., Yemişer, İ., Büyük, E., & Kazan, D. (2020). Complete genome sequence of a cellulose-producing bacteria *Komagataeibacter oboediens* BPZTR01. *Genetics & Applications*, 4(1), 38-40.
- [169] Łaskiewicz, B. (1998). Solubility of bacterial cellulose and its structural

- properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 67(11), 1871-1876.
- [170] Lepetit, A., Drolet, R., Tolnai, B., Montplaisir, D., & Zerrouki, R. (2017). Alkylation of microfibrillated cellulose—A green and efficient method for use in fiber-reinforced composites. *Polymer*, 126, 48-55.
- [171] Salmen, N. L., & Back, G. L. (1977). The influence of water on the glass transition temperature of cellulose. *Tappi*, 60(12), 137-140.
- [172] Okhamafe, A. O., & York, P. (1988). Studies of interaction phenomena in aqueous-based film coatings containing soluble additives using thermal analysis techniques. *Journal of pharmaceutical sciences*, 77(5), 438-443.
- [173] Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of biotechnology*, 132(3), 251-258.
- [174] Hale, H. (2002) Chapter 9 Thermosets. *Handbook of Thermal Analysis and Colorimetry* 3.
- [175] Jadhav, N. R., Gaikwad, V. L., Nair, K. J., & Kadam, H. M. (2014). Glass transition temperature: Basics and application in pharmaceutical sector. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 3(2).
- [176] Nyamweya, N., & Hoag, S. W. (2000). Assessment of polymer-polymer interactions in blends of HPMC and film forming polymers by modulated temperature differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Research*, 17(5), 625-631.
- [177]

7 ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Şeyma Turan Okulmuş

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans Marmara Üniversitesi – Polimer Bilimi ve Teknolojileri (2017-2021)

Lisans Marmara Üniversitesi – Kimya Bölümü (2012-2017)

Recep Güngör Lisesi

Sunum

Şeyma Turan Okulmuş, Nilhan Kayaman Apohan, Dilek Kazan

Synthesis of Biodegradable Bacterial Cellulose-Hyaluronic Acid Tissue Scaffolds via click reactions and Their Applications

İSPEC 7th International Conference on Engineering & Natural Sciences May 8-10,2020
İZMİR/TURKEY

