



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BİYOMEDİKAL KULLANIM İÇİN GÖZENEKLİ
BAKTERİYEL SELÜLOZ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Doruk Deniz İLMENÖZ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİYOMEDİKAL KULLANIM İÇİN GÖZENEKLİ
BAKTERİYEL SELÜLOZ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Doruk Deniz İLMENÖZ

Danışman : Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

Biyomedikal Teknolojiler A.B.D

İzmir
2020

Doruk Deniz İLMENÖZ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Biyomedikal kullanım için gözenekli bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisanüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.01.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

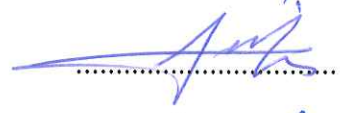
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA



Raportör Üye : Doç. Dr. Sait SARGIN



Üye : Dr.Öğr.Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Biyomedikal kullanım için gözenekli bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29 / 01 / 2020

Doruk Deniz İLMENÖZ

ÖZET**BİYOMEDİKAL KULLANIM İÇİN GÖZENEKLİ BAKTERİYEL
SELÜLOZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

İLMENÖZ, Doruk Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA

Ocak 2020, 52 sayfa

Biyouyumlu, üretimi kolay, yüksek çekme dayanımı gösteren, nanofibril ağ yapısı ile yüksek su tutma özelliğinde olan Bakteriyel selüloz (BS) bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal bir polimerdir. Medikal uygulamalar için iyi bir aday olan BS, membran yapısı nedeniyle deri ikamesi çalışmalarında da potansiyel taşımaktadır. Ancak, sıkı olan nanoselüloz fiberleri hücre tutunması ve göçüne imkân vermemektedir. Bu tez kapsamında deri ikamesi olarak kullanılabilen yeterli gözenek çapına sahip BS'nin *in situ* üretimi, keratin ile modifikasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Glucanoacetobacter xylinus ATCC 700178 suşu kullanılarak iki farklı yöntemle (agar parçalama ve agar damlatma) selüloz nanofibrilleri arasındaki gözenek çapı artırılarak üretilen BS daha sonra derinin önemli bir bileşeni olan keratin ile modifiye edilmiştir. Keratin kaynağı olarak atık insan saçları kullanılmış ve Shindai özütlemesi ile keratin elde edilmiştir. Keratin çözeltisi BS membranlarına emdirilerek malzemenin karakterizasyonu FTIR (Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi), SEM (Taramalı elektron mikroskobu) ve fiziksel dayanım testleri ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, yeterli gözenek çapına sahip (>100µm) yapısında keratin içeren ve 0,5- 1N dayanıma sahip, deri ikame adayı BS üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, keratin, deri, biyokompozit malzemeler



ABSTRACT

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POROUS
BACTERIAL CELLULOSE FOR BIOMEDICAL USE**

İLMENÖZ, Doruk Deniz

MSc Thesis, Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA

January 2020, 52 pages

Bacterial cellulose (BS), which is biocompatible, easy to produce, has high tensile strength, has high water retention with its nanofibrile network structure, is a natural polymer produced by some microorganisms. Being a good candidate for medical applications, BS also has potential in skin substitution studies due to its membrane structure. However, dense nanocellulose fibers do not allow cell attachment and migration. In this thesis, *in situ* production, modification and characterization of BS with adequate pore diameter that can be used as skin substitution is aimed.

BS was produced by using *Glucanoacetobacter xylinus* ATCC 700178 strain by two different methods (agar splitting and agar dropping) by increasing the pore diameter between cellulose nanofibrils and then modified with keratin, an important component of the skin. Waste human hair was used as the source of keratin and keratin was obtained by Shindai extraction. The characterization of the material by absorbing the keratin solution into BS membranes was carried out by FTIR (Fourier transform infrared spectrometer), SEM (Scanning electron microscope) and physical strength tests. As a result, BS was produced with a pore diameter ($> 100 \mu\text{m}$) containing keratin and a 0,1-1N strength.

Keyword: Bacterial Cellulose, keratin, skin, biocomposite materials

ÖNSÖZ

Biyomedikal ürünler, insan hayatına etkisi sebebiyle küresel olarak yoğun çalışılan ve son biyoteknolojik gelişmelerle çalışma hızı ivmelenmiş bir alandır. Bu alanda, özellikle ürünleşme ve ticari potansiyeli yüksek malzemelerin çalışılması da önem taşımaktadır.

Bakteriyel selüloz, potansiyelinin farkedildiği son yıllarda özellikle biyomedikal alanında çalışmaların yoğunlaştığı doğal bir polimerdir. Yüksek saflığı, biyouyumluluğu ve nanofiber ağ yapısı ile hidrojel özellik sergileyen bu malzeme doku iskelesi, ilaç taşıma, doku mühendisliği gibi birçok medikal uygulamada iyi bir aday olarak ön plana çıkmaktadır. Bakteriyel selülozun deri ikamesi alanında yapılan çalışmaları hem bu konudaki kısıtların üstesinden gelinmesi hem de ülkemiz için katma değeri yüksek biyoteknolojik ürünleri geliştirilmesinde bazı becerilerin kazanılması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada engin bilgisi, deneyimi ve doğru yönlendirmeleriyle çalışmalarımı bir üst seviyeye taşıyan danışmanım Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

İZMİR

29/01/2020

Doruk Deniz İLMENÖZ



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri	3
2.2 Bakteriyel Selüloz.....	5
2.3 Bakteriyel Selüloz Esaslı Kompozitler.....	9
2.4 Keratin	11
2.5 Deri İkameleri ve Bakteriyel Selülozun Deri İkamesi Olarak Kullanım Potansiyeli.....	13
2.6. Deri iyileşmesi ve Neovaskülerizasyon.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 <i>G. xylinus</i> Aktivasyonu ve Aşı Kültürü Hazırlanması.....	21
3.2. Agar Partiküllerinin Oluşturulması	22
3.3. Por çapı Arttırılmış BS üretimi.....	23
3.4 Bakteriyel selüloz membranlarının hasatı ve temizlenmesi	25
3.5 Shindai Özütlemesi ve Keratin Çözeltisi Hazırlanması.....	26
3.6 Keratin Yükleme.....	26
3.7 Mekanik Eğme ve Çekme Analizleri.....	27
3.8 SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi) Görüntüleme.....	27

3.9 FTIR (Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektrometresi) Analizi	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1 Agar Partikül Eldesi	28
4.2. Por Çapı Arttırılmış BS Üretimi	28
4.3. Shindai Özütlemesi ve keratin çözeltisinin hazırlanması	29
4.4 SEM Görüntüleme	29
4.5. Modifiye BS Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi	33
4.6. FTIR Analizi	35
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	39
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41
TEŞEKKÜR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: İnsan derisinin yapısı	4
Şekil 2: Selülozun moleküler yapısı	6
Şekil 3: Çalışma sırasında <i>G. xylinus</i> tarafından üretilen BS nanofibrilleri	6
Şekil 4: Dikdörtgen kapta statik kültürde sıvı besiyeri yüzeyinde üretilmiş dikdörtgen şekilde BS membran	8
Şekil 5: Intermediate filamentlerin yapısal organizasyonu.....	11
Şekil 6: Detroit hücrelerinin 5. gün SEM fotoğrafı a) BS kontrol, b) keratin ile modifiye edilmiş BS.....	17
Şekil 7: Neovaskularizasyonun başlama sürecinin şematik gösterimi	19
Şekil 8: Tez süresince izlenen çalışmalar	21
Şekil 9: Hazırlanan agar partikülleri.....	24
Şekil 10: Yöntem 1'e göre inokülasyon yapılan <i>G.xylinus</i> üretimi.....	25
Şekil 11: Hasat sonrası (a) ve yıkama sonrası (b) BS membranının görünümü	29
Şekil 12: Farklı büyütmelelerde doğal BS nanofibrilleri a) fibriller arasında üretici organizma, b) fibriller arası boşlukların boyutları	30
Şekil 13: Agar parçalama ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak üretilen BS membranın farklı büyütmelelerdeki görünümü	31
Şekil 14: Agar damlatma ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak üretilen BS membranın farklı büyütmelelerdeki görünümü	32-33

Şekil 15: Keratin içermeyen BS membranlarının fiziksel dayanım grafiği (CTRL: kontrol, AD:agar damlatma, AP: agar parçalama) 34

Şekil 16: Keratin ile modifiye edilmiş BS membranlarının fiziksel dayanım grafiği 35

Şekil 17: BS ve keratinin FTIR analizi ve aralarındaki korelasyon..... 36

Şekil 18: Agar parçalama ile modifiye edilen BS-keratin örneğinin sadece keratin ile karşılaştırılmalı FTIR analizi..... 37

Şekil 19: Agar damlatma ile modifiye edilen BS-keratin örneğinin sadece keratin ile karşılaştırılmalı FTIR analiz..... 38



TABLOLAR DİZİNİ

TabloSayfa

Tablo 1: 2008 yılından bu yana medikal amaçlı yapılan bakteriyel selüloz modifikasyonları	11
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikron
μm	Mikrometre (uzunluk birimi)
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	Gram (kütle birimi)
L	Litre (hacim birimi)
MPa	Mega Pascal (basınç birimi)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayır)
β	Beta
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BS	Bakteriyal Selüloz
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy
ECM	Ekstra sellüler matriks(Extra Cellular Matrix)
EGE-MATAL	Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectography
GO	Grafen Oksit
HS	Hestrin & Schramm sıvı besin ortamı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Mpa	Mega Pascal
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NaOH	Sodyum hidroksit
SEM	Scanned Electron Microscopy
VEGF	Damar Epiteli Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)



1.GİRİŞ

Dünyada canlılar tarafından en çok üretilen biyopolimer olan selülozun bakteriler tarafından üretilmesi çeşitli şekillerde geliştirilmesine ve modifikasyona ön ayak olmuştur. Son yıllarda hızlı bir şekilde artan biyomedikal malzeme çeşitliliği içerisinde bakteriyel selüloz (BS) önemli ürünlerden biri haline gelmiştir. Ancak, BS taşıdığı özelliklere rağmen farklı biyomedikal kullanımlar için geliştirilmesi gereken bir malzemedir.

Bu çalışma kapsamında BS-keratin biyokompozit yapısının içerdiği por çaplarının artırılması amaçlanmıştır. Bunun sebebi, özellikle deri ikamelerinde kullanılacak ürünlerin, yara iyileşme hızını ve kapasitesini arttıracak hücre tutunma ve göçüne izin verecek şekilde istenmesi nedeniyledir. Por çaplarının artırılması, yaraya uygulanma potansiyeli taşıyan biyokompozitin içine vücut hücrelerin nüfuz ve tutunmasını sağlamak için önemli bir özelliktir. Mevcut çalışmalarda ve biyomedikal ürünlerde BS yara örtüsü olarak kullanılmaktadır. Pek çok farklı biyomalzeme ile kompozit haline gelebilen BS'nin keratin ile oluşturduğu kompozitinin, deri ikamesi olarak daha önce bir kullanımına rastlanmamıştır. Bu konuda tezimi yürüttüğüm laboratuvarında ayrıntılı bir çalışma yapılmış ve yayınlanmıştır. Ancak kullanılan BS por çapı ile ilgili bir modifikasyon yapılmamıştır.

Deri iyileşmesinde en önemli unsurlardan biri, iyileşme esnasında yeniden oluşan damarlardır. Ancak açık veya kronik yaralara damarlanma için doğrudan uygulanan büyüme faktörleri kanser hücrelerinin oluşmasına ve/veya çoğalmasına yol açabilmektedir (Davidson ve ark., 2013). Keratinositlerin kendi ürettiği büyüme faktörlerinde ise böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Özellikle, kronik yaralardaki eksikliği bilinen büyüme faktörleri, yara dokusunun tamirinde görev

alacak hücrelerin göçünü sağladığı için iyileşme aşamasında önem taşıyan unsurlardan biridir. Yara dokusunda oluşan yeni damarlar ise göç eden hücrelerin oksijen ve besin açısından zenginleşmesini sağlayarak, yeni oluşacak dokuya kaynak taşıyacaktır.

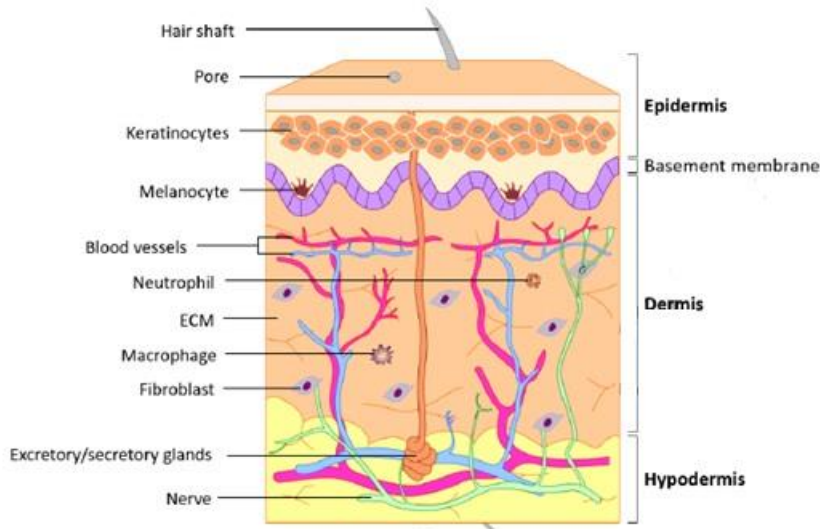
Bu tez çalışmasında BS'nin porlu yapısını arttırmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her iki yöntemde de por çapını arttırmak için ortamdan uzaklaştırılabilecek, BS üreten mikroorganizmaların üretim kapasitesini etkilemeyen, besin olarak kullanılmayan ve toksik etkisi olmayan agar kullanılmıştır. Agar, BS üretim besiyerine eklenmiş ve üretim sonrası BS membranları hasat edilerek ardından yüksek sıcaklıkta yıkama işlemleri ile yapıdan uzaklaştırılmış ve buldukları bölgeler yapıda porları oluşturmuştur. Daha sonra derinin önemli bir bileşeni olan ve keratinositlerin büyümesini teşvik eden keratin kullanılarak biyokompozit malzeme oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Epidermis, dermis ve deri altı dokusu olmak üzere 3 tabakadan oluşan deri, yerine getirdiği bariyer, homeostas ve duyu fonksiyonunun yanında dış görünüm için de önemli bir organdır (**Şekil 1**). Dış tabakada bulunan, ince yapıda ve damar içermeyen epidermis, çoğunlukla keratinosit hücrelerinden meydana gelir ve az miktarda melanosit Lagerhans ve Merkel hücreleri barındırır (Javier ve Ackerman, 2001). Ayrıca ince olduğu için derinin mekanik dayanımına ve davranışına etkisi çok düşüktür. Keratinositlerin yapısında bulunan keratin hücre içi dayanıklılığı artırır. Ayrıca bağlantı komplekslerinden olan dezmozomların (makula adherens) yapısına katılan keratin filamanları (tonofilamanlar) aracılığıyla keratinositler arası bağlantıyı sağlarlar. Böylece epidermis tabakası hem vücudu sararak fiziksel bütünlüğü sağlar hem de patojenlere karşı bariyer görevi görür. Diğer tabaka olan dermis ise, vücut bölgesine göre değişmekle birlikte 2 - 4 mm kalınlığındadır ve vasküler yapı gösterir. Dermiste hücreler arası destek dokusu ve fibroblast hücreleri, sinirler, damarlar, lenfatik yapılar, ter ve yağ bezleri, tırnak ve kıl folikülleri yer almaktadır. Dermisin yapısında birçok protein bulunur, bunların başında kolajen, elastin ve keratin gibi proteinler gelir. Bu proteinler, epidermiste olduğu gibi, dermise de fiziksel dayanım ve esneklik sağlarlar (Nyame ve ark. 2015). İnsan derisinin çekme dayanımı 17.9-36.5 Mpa, elastisite modülü ise 56.8-141.11 Mpa arasında değişmektedir (Gallagher ve ark. 2012).

Deri, insan hayatı boyunca pek çok kez hasar gören bir organdır. Yaralar, iyileşme dönemlerine göre akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır (Dreifke ve ark., 2015). Akut yaralar, sağlıklı bireylerde zamanla iyileşebileceği gibi geniş yüzeyi kaplayan yaraların iyileşme dönemi tıbbi müdahale ile hızlandırılabilir. Kronik yaralar ise derinin kendisini tam olarak tamir edemediği yaralardır. Bu durum genelde pek çok patolojik sorundan ötürü ortaya çıkabileceği gibi genelde, yanma, diyabet ve obezite gibi durumlarda görülmektedir (Guerra ve ark. 2018).



Şekil 1: İnsan derisinin yapısı (Guerra ve ark, 2018)

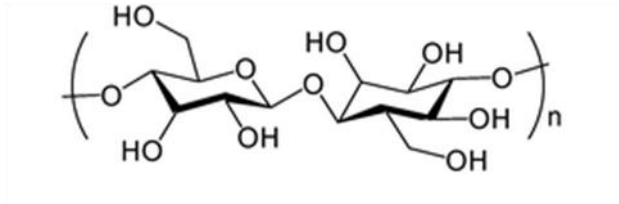
Deri hasarı oluştuğundan sonra yara iyileşme süreci başlar. Yara iyileşmesi genel olarak 4 ayrı safhada incelenir: hemostati, enflamasyon, proliferasyon ve doku modellemesi (Singer ve Clark, 1999). Hemostati, açık yara üzerinde platelet ve fibrin iplikçiklerin koagülasyon ile bir kabuk oluşturması ve kan kaybını azaltmasıdır. Koagülasyonun aksine, plateletler PDGF (platelet derived growth factor) salgılayarak kanamanın durması için hücrel aktiviteyi hızlandırır. Enflamasyon safhasında ise, yara bölgesi yabancı partiküller, bakteriler ve ölü dokulardan temizlenir. Yara bölgesine gelen nötrofiller önce patojenleri ortadan kaldırırlar. Ardından makrofajlar bölgeye göç ederek temizleme işlemine devam ederler. Nötrofil ve makrofajlar çeşitli kimyasal sinyaller salgılayarak diğer hücrelerin, yani keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerin, bölgeye göçünü başlatır (Tranquillo ve Lauffenburger, 1987). Proliferasyon safhasında doku oluşumu başlar, yeniden epitel hücrelerin çoğalması ve vaskülarizasyon gözlemlenir. Fibroblastlardan salgılanan büyüme faktörleri artarak kolajen ve ECM (ekstra sellüler matriks) oluşumu artar, bu yapılar da sağlıklı derinin yapıtaşlarını oluşturmaktadır (Chiquet ve ark., 2009). Fibroblastlardan salgılanan büyüme faktörleri ayrıca keratinositlerin de çoğalmasını hızlandırır, keratinositlerin çoğalması yeniden epitelizasyona ortam hazırlar. Epitel hücrelerin artması da neovaskülarizasyona, yani derideki kılcal damarların yeniden oluşumuna ortam hazırlar. Neovaskülarizasyon deri iyileşmesindeki önemli aşamalardan biri olup, yara bölgesinin ihtiyacı olan besin ve oksijeni yeniden

oluşan hücelere taşımakla görevli olan kılcal damarların yeniden oluşumu anlamına gelir (Du ve ark., 2005). Yara yüzeyi kapandıktan sonra doku oluşum safhası başlar. Bu dönemde ECM'nin bölgeye yeniden dağılımı ve düzenlenmesi meydana gelir. Bu düzenlenme sonucunda yara bölgesinin hacmi deri üzerinde küçülür. Ayrıca, kolajen III yapıları fibroblastlar tarafından hızlıca kolajen I yapılarına çevrilir, bu da derinin yara dokusu üstündeki dayanımını sağlar. Doku oluşum dönemi diğer safhalara göre çok daha uzun sürmekle beraber, yara bulunmayan deri bölgesine nazaran daha zayıf dayanıma sahip olmaktadır (Maurice ve ark, 2013).

Kronik yaralarda, yukarıda bahsedilen safhaların bir veya birkaçının gerçekleşmesinde aksamalar gözlemlenmiştir. Genelde, enflamasyon ve proliferasyon safhalarında oluşan bu aksamalar, yaraların tam olarak iyileşmesini engellemektedir (Enoch ve Leaper, 2008). Yara iyileşmesini etkileyen en büyük etmenlerin, sağlıklı oksijen iletimi, vasküler yapı ve difüzyon mesafesi olduğu bilinmektedir (Davidson ve ark., 2013).

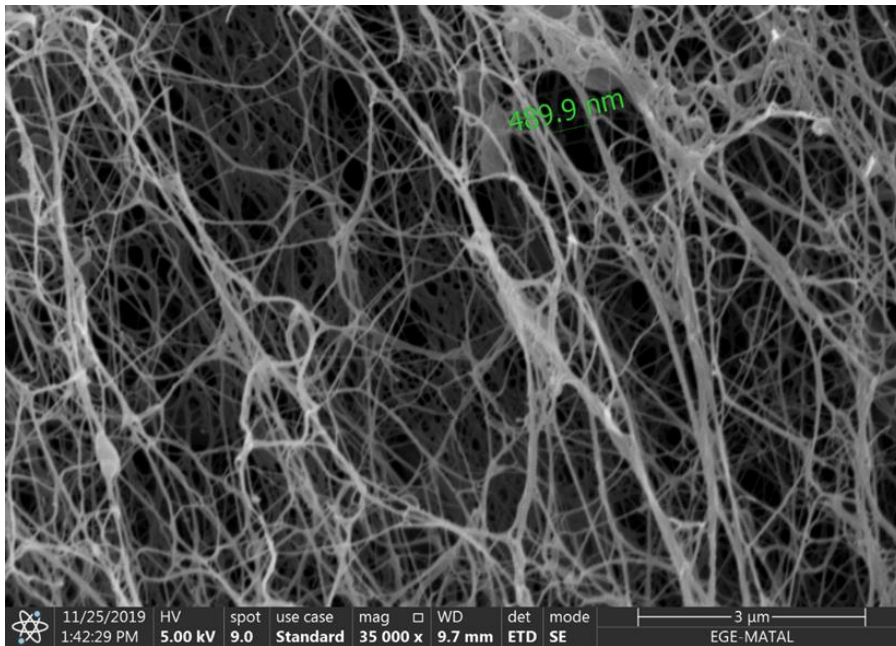
2.2 Bakteriyel Selüloz

Temel üreticileri bitkiler olan selülozun, mikroorganizmalar tarafından üretilen formu olan BS, bitkisel selülozla aynı kimyasal formüle sahip olmasına rağmen (**Şekil 2**), taşıdığı farklı fiziksel özellikleri ve saflığı ile son yıllarda biyomedikal ve hücre-doku kültürü tekniklerinin ilerlemesi sayesinde özellikle medikal alandaki potansiyeliyle ön plana çıkmaktadır (Hornung ve ark. 2006; Jozala ve ark. 2016). $\beta(1-4)$ bağları ile tekrarlı olarak birbirine bağlanan glukopiranoz şeker $(C_6H_{10}O_5)_n$ formülüne sahip BS, lineer bir yapı gösterir (Festucci-Buselli ve ark. 2007). BS'nin sahip olduğu fiziksel özellikler, yüksek ısı ve fiziksel dayanım, yüksek su tutma kapasitesi, bu lineer bağlanma yapısının bitkilerdeki gibi lignin ve pektin gibi yapılarla kesintiye uğramamasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında yaygın olarak *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) (**Şekil 3**) olmak üzere, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Sarcina* ve *Rhizobium* türleri tarafından sentezlenebilen BS, hücre dışı bir polimerdir (Cheng ve ark. 2011, Wei ve ark. 2011).



Şekil 2: Selülozun moleküler yapısı (Guerra ve ark, 2018)

BS, ekstra sellüler matrikse (ECM) benzemesi ve toksik olmayan yapısı sebebiyle yüksek biyoyumluluğa sahiptir. Protein yapıda değil karbohidrat yapıda olmasıyla büyük oranda non-immunojenik yapıdadır (Petersen ve Gatenholm, 2011). Biyoyumluluğu araştırmak için hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. *In vivo* çalışmalardan, NIH3T3 fibroblast hücrelerinin ekilen BS yüzeyinde 48 saat inkubasyonda tutulduktan sonra, hücrelerin sağlıklı bir tutunma ve çoğalma göstermesi biyoyumluluğa örnek gösterilebilir (Cheng ve ark, 2011). Bir başka çalışmada ise BS yapısında inkübe edilen insan damar endotel hücrelerinin hem yatay hem de dikey yönlerde büyüme gösterdiği ve naovaskülerizasyon için hücre göçü gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Ancak, oksijen dağılımındaki gradient farkından ötürü, 5 mm kalın BS membranlarında hücre penetrasyonunun ve adhezyonun zayıfladığı bulgular arasındadır (Jeong ve ark., 2010)



Şekil 3: Çalışma sırasında *G. xylinus* tarafından üretilen BS nanofibrilleri (Ilmenöz)

Çoklu tabaka fermentasyon yöntemiyle üretilen BS filmleri düşük sitotoksositeye ve hücreler için iyi bir proliferasyon ortamına sahiptir. BALB/c farelerin sırtında açılan tam deri yaralarında 7 gün boyunca hem ticari yara örtüleri hem de işlemde geçmemiş BS membranları yerleştirilerek iyileşme hızı takip edilmiştir. Sonuçlar, BS'nin ticari yara örtüleriyle aynı sonuçları verdiğini göstermiştir ve herhangi bir enfeksiyon veya kontaminasyona yol açtığı gözlemlenmemiştir (Mohd Amin ve ark., 2012).

BS hidrojel yapısında bir biyopolimer olduğu için antimikrobiyal özelliği sağlayan diğer bileşikler ile modifiye edilebilir bir yapıdadır. Bununla beraber BS antimikrobiyal özelliği bilinen gümüş elementiyle nanokompozit yapı oluşturabilmektedir. Bu nanokompozit yapı yüksek oranlarda antimikrobiyal ve antifungal yapıdadır (Rai ve ark., 2009). BS fibrilleri üzerine hücre tutunmasını arttırmak için yapının ıslaklık, gözeneklilik ve yüzey modifikasyonları üzerine çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri plazma tekniği ile hücrenin vücutta bulunduğu ECM ortamını BS üzerinde taklit etmektedir. Mevcut biyoyumluluğu arttırarak yapılan çalışmalarda, BS'nin temel özelliklerini kaybetmeden yapılan modifikasyonlar hücre tutunmasını ve biyofonksiyonu arttırmıştır (Chu ve ark., 2002). BS biyoyumluluğunu arttırmak için yapılan çalışmalardan biri de BS yüzeyine ECM bileşenlerinden olan hyaluronon eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda fibroblast, epitel ve keratinosit sayısında artış gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2014).

BS ilaç salım sistemi çalışmalarında da kullanılan bir biyopolimerdir. Lidocaine ve ibuprofen ile iki ayrı çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmalarda BS, jel ve sıvı ortamlarla karşılaştırılmıştır. BS, ibuprofen çalışmasında toplam ilacın %90'ını 20 dakikada ortama salmıştır. Lidocaine ile yapılan çalışmalarda ise diğer kontrol ortamlarına kıyasla dikkat çekecek bir yavaşlıkta ilaç salınımını gerçekleştirmiştir (Trovatti ve ark., 2011). Bir başka denemede ise parasetamol model tabletin üstünde kaplama olarak BS kullanılmıştır. BS'nin sahip olduğu fizyokimyasal, morfolojik ve termal özelliklerin kontrolü sonucu BS'nin parasetamol taşınmasında çok iyi bir aday olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca BS'nin yumuşak esnek ve katlanabilir olması ve herhangi bir başka katkı maddesine de ihtiyaç duymaması önemli özelliklerindedir (Mohd Amin ve ark., 2012).

G. xylinus ile yüksek verimli ve üretimi göreceli olarak kolay BS üretimi yapılabilmektedir. Organizmanın patojen olmaması, meyve ve meyve ürünlerinde bulunması ve Doğu Asya ülkelerinde gıda ürünlerinde kullanılması, *Gluconacetobacter* suşlarını (*Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter swingsii* ve *Gluconacetobacter rhaeticus*) özellikle medikal amaçlı üretimlerde ön plana çıkarmaktadır (Klemm ve ark. 2006).

BS, statik kültürde besin ortamı içerisinde sıvı-hava yüzeyinde üretilir ve kültür kabının yüzey alanı büyüklüğünde ve şeklinde (kare, daire, dikdörtgen) BS membranı elde edilir (Brown 2004). Uygun bir kültürasyon kabı kullanılarak kolaylıkla istenen şekilde BS membranları elde edilebildiği gibi (Şekil 4) inkübasyon süresinin değiştirilmesi ile de kalınlığı ayarlanabilir veya besin ortamı bileşenlerinin kompozisyonunun değiştirilmesiyle kompaktlığı bir miktar değiştirilebilir. Farklı amaçlara yönelik olarak yapılan çalkalamalı kültürasyon şartlarında ise BS, membran şeklinde değil pellet şeklinde de üretilebilmektedir (Tanskul ve ark. 2013).



Şekil 4: Dikdörtgen kapta statik kültürde sıvı besiyeri yüzeyinde üretilmiş dikdörtgen şekilde BS membran (İlmenöz tarafından laboratuvarda çekilmiştir 2019)

2.3 Bakteriyel Selüloz Esash Kompozitler

Bakteriyel selüloz:

- Yüksek saflıkta nanofibril ağ yapısı (<120nm), (Yamanaka ve ark.1989; Cannon & Anderson 1991),
- Yüksek kristalinite (%70-80) ve polimerizasyon derecesi,
- Yüksek su emme ve tutma kapasitesi (>%99),
- Çok fazla sayıda molekül içi ve arası hidrojen bağı ile kararlı yapısı,
- Yüksek çekme kuvveti (138 gpa elastisite modülü 2 gpa çekme dayanımı) ve biyoyumluluğu

başta olmak üzere katlandığında şeklini koruyabilen, esnek ve gerek üretim esnasında gerekse üretim sonrasında modifikasyonlara uygun bir polimerdir (**Tablo 1**) (Jonas & Farah 1998, Iguchi ve ark. 2000, Klemm ve ark. 2001, Hong ve Qiu 2008). Bu modifikasyonlar sayesinde BS'nin mevcut özellikleri istenen amaca göre iyileştirilme potansiyelindedir (Czaja ve ark. 2006).

Berberin hidroklorid ve berberin sülfatın kontrollü taşınmasında da BS kullanılmıştır. Salınma denemeleri ve transdermal deneyler sonucunda BS'nin ilaç taşımalarını mevcut ticari ürünlere kıyasla çok daha uzun sürede gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Dondurulan ve kurutulan 10 mm kalınlığında BS membranlarında yapılan DOSY (diffusion-ordered spectroscopy) analizlerinde BS ve ilaçlar arasında bir etkileşim görülmüştür. BS'nin yapısı, sıvı ortam ve ilacın çözünebilirliği BS'nin ilaç salınım hızını etkilemekte ve kontrollü hale getirmektedir. Bu sayede kontrollü ilaç salınımında oral veya transdermal yollarla BS kullanılabilir bir aday durumundadır (Huang et al, 2011).

Doku mühendisliğinde kullanılan üç boyutlu doku iskelesi sistemlerinde BS nanoyapıları da kullanılmaktadır. Saf nanoselüloz fibril ağ sistemi

mikromimarisi bakterinin fermentasyon prosesi esnasında kontrol edilebilir durumdadır (Backdahl ve ark., 2008). Bu kontrolü sağlamak için parafin mumu ve nişasta partikülleri kullanılmıştır. Üretimden sonra bu partiküller ortamdan uzaklaştırılarak BS doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen doku iskeleleri düz kaslara eklenerek, potansiyel kan damarı oluşumları için incelenmiştir. Ancak paraffin ve nişastanın yapıdan tamamen uzaklaştırılması agar gibi kolay olmamaktadır.

BS'nin dayanımını ve oluşan fibröz yapının düzenliliğini arttırmak için BS oluşumu esnasında ortama grafen oksit (GO) eklenerek GO/BS kompoziti üretilmiştir. Bu denemede GO süspansiyonu BS kültür ortamına homojen bir şekilde eklenmiş ve BS'nin üç boyutlu yapısı korunmuştur. Böylece BS yapısı GO ile desteklenmiş ve BS'nin fiziksel dayanımında %20'lik bir artış gözlemlenmiştir. Bu dayanım, doku mühendisliği çalışmaları ve doku iskeleleri için önem taşımaktadır (Nandgaonkar ve ark., 2018)

Tablo 1: Medikal amaçlı yapılan BS modifikasyonları Keskin 2015'den modifiye edilmiştir.

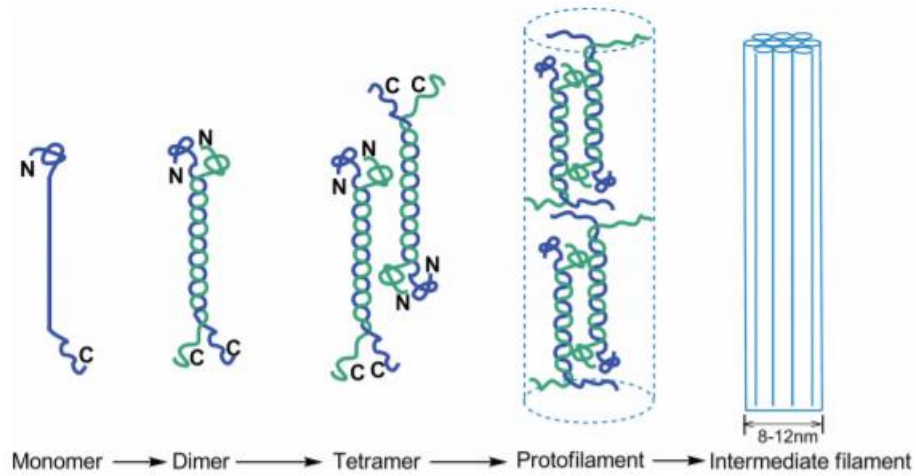
Modifikasyon bileşeni	Uygulama	Kaynak
Hidroksiapatit ve jelatin	Mekanik sağlamlığın artması ve sus tutma kapasitesinin düşmesi	Jing ve ark. 2013
Altın nanopartiküller	Enzim immobilizasyonu ve biyosensör üretimi	Wang ve ark. 2011
Nikel Nanopartiküller	Manyetik doku iskelesi geliştirilmesi	Thiruvengadam & Vitta, 2013
Gümüş Nanopartikül	Antimikrobiyal yara örtüsü geliştirilmesi	Ifuku, ve ark. 2009; Barud ve ark. 2011
Karboksümetil selüloz	Mekanik özelliklerin değiştirilmesi	Cheng ve ark. 2011; Huang ve ark. 2010
Hidroksiapatit	Doku iskelesi geliştirilmesi	Grande ve ark. 2009; Jing ve ark. 2013
Hyaluronan	Yara örtüsü geliştirilmesi, termal ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi	Li ve ark. 2014; Lopes ve ark. 2014
Grafen oksit	Biyomedikal kullanım alanında iyileştirme	Nandgaonkar ve ark. 2014
Poli-vinil-alkol, Kitosan	İlaç taşıma ve salınım sistemlerinde	Pavaloiu ve ark., 2014
Poly-l-lizin	CHO hücreleri tutunmasının ve	Culebras ve ark. 2015

Kolajen	canlılık oranlarının artırılması	
Polietilenamin - Gliserol diglisid eter	Atık su arıtımı için optimizasyon	Wang ve ark. 2015
xGnP – NC Nanopartikülleri	Nanomateriyal üretimi	Erbas ve ark. 2015

Bakteriyel selülozun, biyoyuymululuk, yüksek mekanik dayanım ve tübüler formda üretilebilme özellikleri ile yapay damar, üreter, üretra, mesane veya miyelin kılıf (Helenius ve ark. 2006; Scionti 2010); biyoyuymululuk, membran şeklinde üretilebilme ve yüksek mekanik dayanım özellikleri ile doku kültürü iskelesi, yara örtüsü veya yapay deri olarak kullanımı üzerine birçok araştırma yürütülmüştür (Czaja ve ark. 2006; Backdahl ve ark. 2008; Putra ve ark. 2010).

2.4 Keratin

Keratin, pek çok farklı hayvan türünde üretilen, genelde suda çözünmeyen, yüksek kükürt içerikli ve filament yapıdaki proteinlerden (**Şekil 5**) oluşan, epitel dokunun ağırlıklı yapıtaşlarını oluşturduğu saç, tırnak, pençe, boynuz, gaga ve tüy gibi organ ve dokuların temel bileşenidir. Sayılan organ ve dokulardan da anlaşılacağı gibi keratin, biyolojik sistemlerde üretilen en sağlam ve dayanıklı materyallerden biridir (Javier ve Ackerman, 2001).



Şekil 5: İntermediate filamentlerin yapısal organizasyonu (Guharoy et al., 2013)

Keratinler alfa, beta ve amorf olarak sınıflandırılabilir. Alfa ve beta yapılar karakteristik filament yapıya sahiptirler. Filamentlerin çapı alfa keratinde 7, beta keratinde 3 nm boyutundadır. Bu filamentler amorf keratin matriksinin içindedir. Alfa keratin yapıları kendi içlerinde sarmallar oluştururken, beta keratinler düz yüzey şeklindedir (Javier ve Ackerman, 2001).

Hayvanlarda bahsedilen keratin yapıları, epitel hücrelerin yapıtaşlarını oluştururlar. Yüksek oranda keratin içeren epitel hücreler de hayvan doku ve organlarındaki polimerik kompozitleri oluşturur. Keratin vücutta üretilirken, orta filament olarak adlandırılan bir birim yapı üzerinden çoğaltılır. Orta filament oluşumunda önce tip I keratin başka bir tip II keratin ile heterodimer oluşturur. Heterodimerler, ters yönde olacak şekilde tetramerlere etkileşime girerler. Polar olmayan önfilamentler, tetramerlerin uzamasından sorumludur. Önfilamentlerin bir araya gelmesiyle birim filament oluşur. Tip I ve tip II keratinlerin bu yapılardaki oranı bulunduğu dokuyla alakalıdır. Bu oranların değişmesiyle, basit keratin yapılar (iç organların zarları), tabakalı keratin yapılar (epidermis) ve yapısal keratinler (saç ve tırnak) gibi yapılar meydana gelebilmektedir. Keratinler, çoğu proteolitik enzime dayanıklıdır ve suda, seyrek asit ve bazlarda çözünmezler. Bu sebeple hayvan sindirimine de katılmazlar (Verma ve ark., 2008).

İnsan saçı, hayvan kürkü gibi yapıları oluşturan keratin alfa tipi keratindir. Alfa keratinin moleküler yapısı sarmallanan yapılardan meydana gelir ve bu yapıya alfa heliks adı verilmektedir. Doğada oluşan tüm alfa heliks proteinleri sağ eli bir yapı sergilemektedir. Heliks zincirlerini stabilize eden kuvvet ise hidrojen bağlarıdır (Magin ve ark., 2007).

2.5 Deri İkameleri ve Bakteriyel Selülozun Deri İkamesi Olarak Kullanım Potansiyeli

Amerika'da yılda yaklaşık 2.4 milyon yanık yaralanmasının ~75.000 vakası hastaneye yatırılmakta ve bunların da 20.000 kadarı vücut yüzeyinin en az %25'ini içeren yanıklara sahip olmaktadır. Derinin yaklaşık %60'nın yandığı durumlarda iyileşme tam olarak gerçekleşmediği için hastaların hayatını yüksek oranlarda kaybettiği görülmüştür (Beele, 2002; Jones ve Rehg 2002; Schulz ve ark. 2000). Yanık vakalarında, en sık tedavi biçimi hastanın kendisinden alınan deri tabakasının hasarlanmış bölgeye yama olarak uygulanmasıdır. Ancak hastadan her zaman yeterli kalite ve büyüklükte deri elde edilemediğinde, bu tedavi uygun olmamaktadır. Bu durumda uygulanacak yöntem yapay deri ikamelerinin kullanımınıdır.

Yanık yaralarında kullanılacak deri ikamelerinin;

- Enfeksiyona direnç
- Su kaybını engelleme
- Kaydırıcı kuvvetlere karşı koyabilme
- Düşük maliyet
- Yaygın olarak bulunabilme
- Yüksek raf ömrü ve depolama kolaylığı
- Antijen bulundurmaması
- Kalınlığının ayarlanabilmesi
- Uzun süre yaranın üstünde kalabilme
- Düzensiz yüzeylere de uygulanabilme
- Kolay kullanım

gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir (Sheridan ve Tompkins 1999, Haddad ve ark. 2017).

Ancak yukarıda sayılan özelliklerin bir kısmını taşıyan ticarileşmiş yapay deri ikamelerinin çoğunluğu, canlı hücrelerle (hastanın deri hücreleri veya fare hücreleri) birlikte kullanılması gereken ürünlerdir. Bu sebeple üretim ve bakım maliyetleri geleneksel tedavilere göre yüksektir. Ayrıca mevcut yapay deri ikameleri sığır ve domuz kolajeni (Integra, TransCyte™), fare hücreleri (Epicel™), naylon nanofiberler (BioBrane™) gibi alerjik reaksiyona yol açabilecek bileşenler içermektedir. Hücrelerinden arındırılmış kadavra derisi (GammaGraft™, GraftJacket™) içeren bir diğer ürün grubu ise her zaman patojen riski taşımaktadır. Kolajen içeren yapay deri ikameleri hariç diğer ticarileşmiş ürünler neovaskülarizasyonu (yeni damar oluşumu) desteklememektedir. Geleneksel deri nakli tedavisine göre yüksek maliyet, alerjen içerik, neovaskülarizasyonun desteklenmemesi ve patojen taşıma riski, piyasadaki deri ikamelerinin kullanımını sınırlamaktadır (Nyame ve ark., 2015).

BS sahip olduğu biyouyumluluk ve yüksek su tutma kapasitesi nedeni ile plastik cerrahi ve özellikle de yanık tedavisinde araştırılan bir malzemedir (Czaja ve ark. 2006). Statik kültürden elde edilen BS membranı steril edilebilir, biyolojik olarak uyumlu, elastik, kullanımı ve saklanması kolay, salgıları emebilen ve gerekli nemi sağlayabilen yapıdadır. Ayrıca üretimi düşük maliyetli, nanofiber ağ yapısına sahip ve kalınlığı kültür koşulları ile ayarlanabilir özellikte bir malzemedir (Bilgi ve ark. 2016). Yara üzerine örtü olarak kullanıldığında dokuyu ikincil enfeksiyonlardan ve mekanik yaralanmalardan korumasının yanında klinik denemelerle de iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir (Czaja ve ark. 2006; Czaja ve ark. 2006; Portal ve ark. 2009). Özellikle yanık yaralarında, su kaybı ve mikrobiyal kontaminasyon önlenmesi gerek en önemli sorunlardandır. Ön tedavi olarak eksizyon (yarayı kesip çıkarmak) ve devamında cerrahi olarak

graft eklenmesindeki temel amaç enfeksiyon riskidir (Rowan ve ark. 2015). BS, membran yapısı sayesinde o bölgeyi izole etme ve yüksek su tutma kapasitesi sonucu hidrojel yapısı ile gerekli nemi sağlama özelliğindedir. İstenen temel özellikleri taşıyan BS'nin yapay deri ikamesi çalışmalarına bir diğer uygunluğu da, çok yavaş bozunmasıdır. Farelerde yapılan denemelerde, ilk 3 ay boyunca herhangi bir bozunmaya rastlanmamıştır (Backdahl ve ark. 2006; Mendes ve ark. 2009; Ávila ve ark. 2014). Tavşanlarda yapılan 6 aylık bir başka denemede ise, BS'nin enflamasyona yol açmadan çok az miktarlarda parçalandığı görülmüştür (Amorim ve ark. 2009). Yüksek biyoyumluluğa sahip BS, uzun süre vücutta kalabilme kapasitesi sayesinde yara iyileşmesi tamamlanana kadar istenen fonksiyonlarını koruyabilmektedir.

Bakteriyel selülozun vücut ile yüksek biyoyumluluğu ve ince bir membran (film) şeklinde üretilebilir olması biyoyapay deri ikamesi olarak kullanımında önemli bir avantaj sağlamaktadır. Literatürde BS üzerinde tutunma afinitelerinin zayıf olduğu bildirilen deri fibroblastları (Detroit hücre hattı) geliştirilen keratin içeren BS esaslı yeni kompozit biyomalzeme üzerinde iyi bir tutunma profili sergileyerek kendi morfolojilerinde gelişme göstermişlerdir (Keskin ve ark. 2017). Keratin ile yapılan çalışmalar hem alternatif diğer malzemeler (aljinat ve hidrokolloid) (Davidson ve ark. 2013) hem de geleneksel yanık tedavilerine göre daha olumlu sonuçlar vermiştir. Keratinin yara üzerindeki etkilerinin incelendiği klinik çalışmalarda (yanık), keratin içeren jel ve merhemlerle uygulanan tedaviler hastaların ortalama iyileşme süresini yarıya düşürmüştür (Loan ve ark. 2016). Farelerde yapılan deneylerde ise keratinin, derideki yaraların iyileşmesini hızlandırdığı ve neovaskülarizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı denemede, keratin tedavisi uygulanan deneklerde, bir hafta sonunda yüzeysel yaralarda deri iyileşmeye başlamış ve eski damar ağlarını tekrar oluşturmuştur, kontrol grubunda ise dokular hemen iyileşmeye

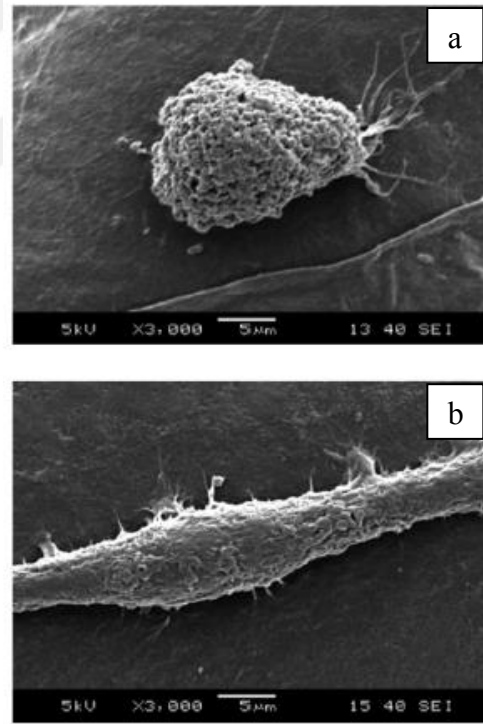
başlayamamıştır (Wang ve ark. 2017). Büyük ve iyileşmeyen yaralarda keratin içeren BS esaslı deri ikamesinin iyileşmeyi hızlandırma potansiyeli yüksektir.

2.6. Deri iyileşmesi ve Neovaskülerizasyon

Yapay deri çalışmalarında asıl amaç, hastanın kendisinden graft almadan, deri üzerindeki iyileşmeyi sağlayabilmektir. Bu sebeple kronik ya da akut yaralarda, biyouyumlu, alerjik olmayan, iyileşmeyi hızlandırıcı, derinin işlevini koruyucu ve yara sonrası doku kaybını en aza indirecek yapay deri ikamesi olabilecek ürünler araştırılmaktadır. Yakın zamanda adipoz doku kaynaklı kök hücre ve fibrin kaplanmış keratinositlerden oluşan doku iskelesinin deri dokusu oluşturulması ve hayvan denemeleri ile test edilmesini araştıran bir çalışma da ülkemizde gerçekleştirilmiştir (Ozpur ve ark. 2016). Yapay deri ürünleri, üretim çeşitlerine göre, hücreli ve hücre barındırmayan olmak üzere ikiye ayrılırlar. Hücre bulundurmayan yapılar, hücrelerinden arındırılmış deri veya moleküler bir iskele içinde tutulan hyaluronik asit, kolajen ve fibronektin gibi iyileşmeyi hızlandırıcı bileşenler içeren yapılarıdır. Hücreli ürünler ise doğrudan hastadan alınan keratinosit ve fibroblastların doku iskelesi içinde üretilmesiyle oluşturulur. Yapay deri ikamelerinin bir diğer sınıflandırmasında ise dermal ürünler, epidermal ürünler ve dermal/epidermal ürünler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Derinin hangi bölgesinde kullanılacağına göre yapılan bu sınıflandırmada dermal/epidermal ürünler tüm deri tabakasının kaybolduğu durumlarda kullanılır (Haddad ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında hedeflenen ürün, bu sınıflandırmalar kapsamında “hücre bulundurmayan iyileşmeyi hızlandırıcı bileşenler (keratin) içeren deri ikamesi” veya “dermal/epidermal deri ikamesi” olarak değerlendirilebilir.

İnsan deri dokusu keratinositlere ve fibroblastik hücrelere sahiptir. BS üzerinde üreyen ancak yayılma göstermeyen fibroblastların (Sanchavanakit ve

ark. 2006) daha önce çalışmamı yürüttüğüm Medikal Biyoteknoloji laboratuvarında tamamlanan bir TUBITAK projesi kapsamında BS/keratin biyomalzeme üzerinde orjinal morfolojilerinde kümelenmeden gelişmeleri sağlanmıştır (Şekil 6) (Keskin ve ark., 2017). Burada keratin, hücre penetrasyonu, bağlanma ve yayılmasına ortam sağlayan, uygun üç boyutlu bir matris oluşturarak (Magin ve ark. 2007; Izawa ve ark. 2006) BS'nin deri ikamesinde kullanılabilirliğini arttırmıştır. Keratin kaynağı olarak insan saçı kullanılmış ve çözünür peptit formuna getirilen keratinin yün ve insan saçından elde edilen keratinde bulunan lösin-aspartik asit-valin ve glutamik asit-aspartik asit-serin moleküllerinin hücre bağlanmasını destekleme yeteneğinde olduğu rapor edilmiştir (Verma ve ark. 2008).

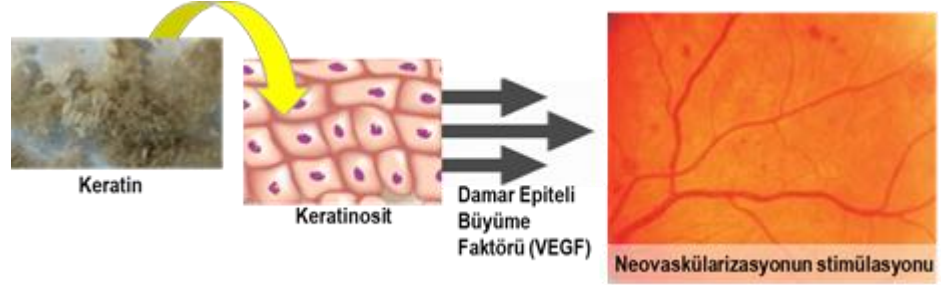


Şekil 6: Detroit hücrelerinin 5. gün SEM fotoğrafı a) BS kontrol, b) keratin ile modifiye edilmiş BS (Keskin ve ark., 2017)

Hücre çoğalması (proliferasyon), yara iyileşmesinin önemli basamaklarından biridir. Bu basamakta, yara dokusunda bir kaç değişim birden görülür, bunlar; neovaskülarizasyon, kolajen miktarının artması, granüler doku oluşumu, epitel doku oluşumu ve yara dokusunun küçülmesidir. Yara oluştuktan yaklaşık 3 gün sonra fibroblastlar dokuların arasından sızarak, hücre göçünü başlatır (Midwood ve ark. 2004). Yara iyileşmesinin en önemli bileşenlerinden biri hücrelere oksijen ve besin maddeleri tedarik eden ve atık ürünleri çıkaran fonksiyonel kan damarlarının varlığıdır (Jain ve ark. 2005). Neovaskülarizasyon oluşmadığı durumlarda deride tahrip gören damarların etrafındaki dokular oksijen ve besin transferini düzgün gerçekleştiremediklerinden etkin iyileşme sağlanamaz. BS membranlarına tedavi için kullanılacak çeşitli etken maddelerin yüklemesi yapılabilir ve böylece yara iyileşme süreci hızlandırılabilir. Tez çalışmasında BS'nin deri ikamesi olarak kullanılabilen ileri çalışmaları planlanırken geliştirilen BS/keratin kompozit biyomalzemenin neovaskülarizasyonu destekleyecek ilave bir bileşenle yüklenmesine gerek yoktur. Yara dokusunda neovaskülarizasyonu tetiklemede hücreler bazı biyolojik sinyaller salgılar. (Martin, 1997). Keratinositlerin yara dokusunun etrafında yeniden yer alabilmesi için kendi iskeletlerinde bulunan keratinle hücreler arası bir bağ oluşturması gerekmektedir. Bu yapıyı hızlandırmak için yara dokusuna keratin uygulamak dolaylı olarak yara iyileşmesini hızlandıracaktır (Davidson ve ark. 2013).

Bu bilgiler ışığında por çapı arttırılmış keratin içeren BS esaslı yeni kompozit biyomalzeme keratinosit hücrelerinin tutunma ve çoğalmasını teşvik edecek ve bu hücrelerden VEGF (Damar Epiteli Büyüme Faktörü-Vascular Endothelial Growth Factor) salgılanmasına yol açarak neovaskülarizasyonu destekleyecektir (**Şekil 7**). Diğer yandan, yara dokusuna doğrudan VEGF verilmesinin damarlaşmayı tetiklediği böylece, kanser dokusunun yayılmasını hızlandırarak kanser oluşumuna yardımcı olduğu görülmüştür (Cheng ve ark.

2011). Bu durumun ortaya çıkmaması için yaraya doğrudan VEGF uygulamak yerine bu büyüme faktörünü salgılayan keratinositler stimüle edilerek tümör oluşum riski olmadan damar üretimini sağlanabilir.



Şekil 7: Neovaskularizasyonun başlama sürecinin şematik gösterimi

Günümüze kadar, nanofiberlerin arasına giren, üretimden sonra kolaylıkla çıkarılacak tuz, buz, şeker ve jelatin gibi gözenek oluşturan malzemeler araştırmacılar tarafından özellikle doku iskelesi çalışmalarında gözenek boyutunu arttırmak için kullanılmıştır (Petersen & Gatenholm 2011; Ikada 2011). Ancak bu malzemeler sıvı besiyerinde BS üretimine uygun olmadığından bu proje önerisinde değerlendirilmesi mümkün olmamıştır. BS'nin gözenek boyutunu arttırmak için parafin ve nişasta kullanılan bir çalışmada parafin ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak mumsu yapıda olan parafinin BS'den uzaklaştırılması için etanol ile yüksek sıcaklıklarda işlem gerekmektedir (Bäckdahl ve ark. 2008). Lazer tekniği ise (Xiong ve ark. 2013; Xiong ve ark. 2015), homojen makrogözenek ve yeterli arabağlantı eksikliğine neden olmaktadır. İleri modifikasyonunu hedeflediğimiz keratin içeren BS esaslı kompozit biyomalzemenin gözenekli hale getirilmesinde literatürde ilk defa laboratuvarımızda uygulanan (Bayır ve ark. 2019) agar partikül kullanımı planlanmıştır. Agar, kullanımı kolay, mikroorganizmalar için olumsuz etkisi

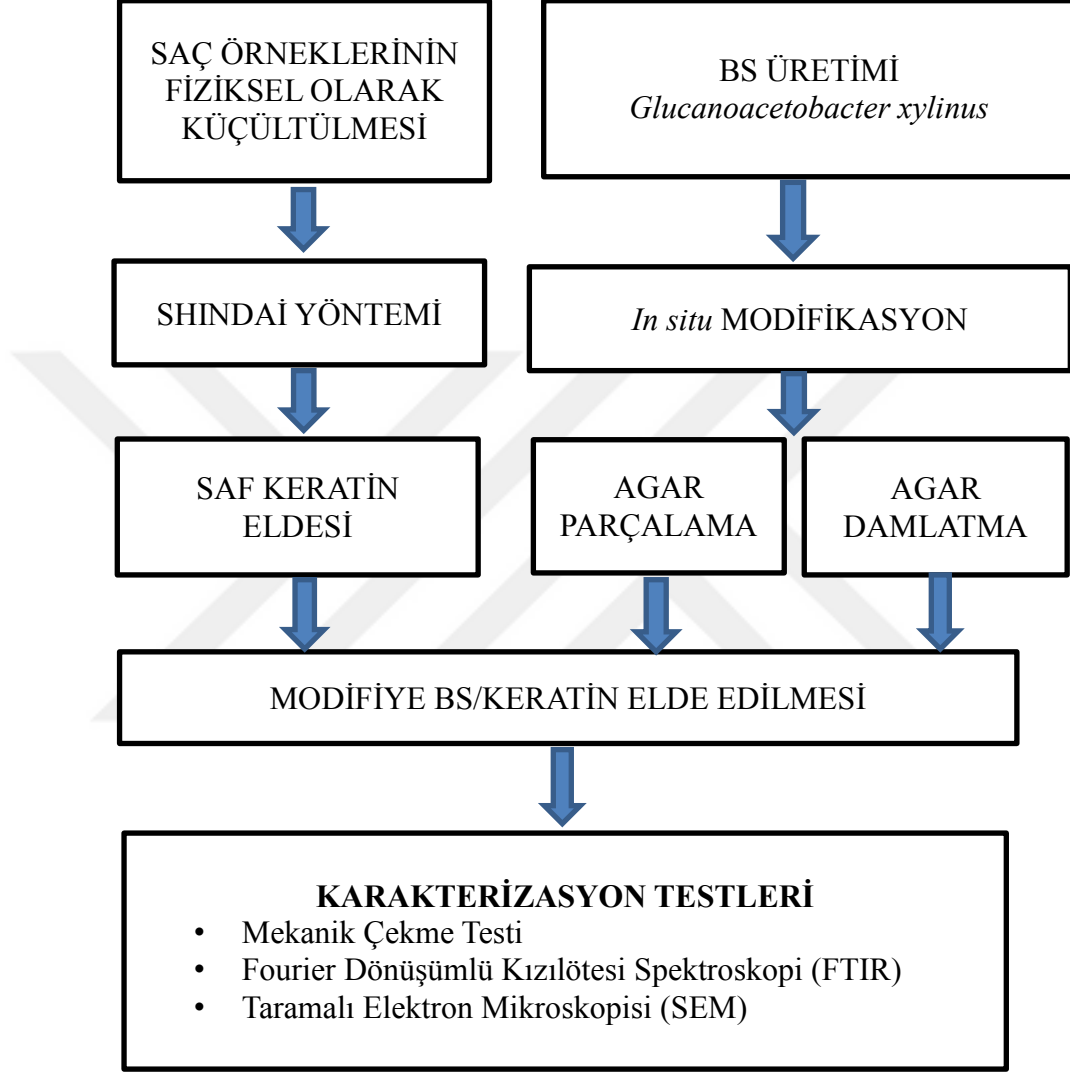
olmayan ve nihai üründen sadece kaynatılarak uzaklaştırılabilecek ideal bir malzemedir.

Özetle bu çalışmada istenilen büyüklük ve şekilde hazırlanabilen, biyouyumlu, deri gibi bariyer işlevi gören bir organ için gerekli mekanik dayanıma ve esnekliğe sahip, içerdığı keratin sayesinde deri fibroblast hücrelerini destekleme potansiyelinde, neovaskülarizasyon ve migrasyona uygun gözenek yapısında BS üretimi hedeflenmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez dönemi boyunca yöntem akışı aşağıda belirtildiği gibi ilerlemiştir.



Şekil 8: Tez süresince izlenen çalışmalar

3.1 *G. xylinus* Aktivasyonu ve Aşı Kültürü Hazırlanması

BS üretiminde mikroorganizma olarak *Glucanoacetobacter xylinus* ATCC 700178 suşu ve Hestrin & Schramn besiyeri kullanılmıştır.

Hestrin & Schramn besiyeri (pH 5,0): (Hestrin ve Schramn, 1954)

Glukoz	20 gr
Na ₂ HPO ₄	2,7 gr
Bakto Pepton	5 gr
Maya Ekstraktı	5 gr
Sitrik Asit	1,15 gr
Distile Su	1000 ml

G. xylinus suşu -20 °C'de bulunan stok çözültiden alınıp önce oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Ardından, 10 ml Hestrin&Schramn ortamı bulunan tüplerde üretilmeye başlanmıştır. Bu tüpler, 5 gün boyunca 30⁰ C'de kültüvasyona bırakılmıştır. Kültüvasyona bırakılan tüpler BS üretimi gerçekleştiğinden ve ışık mikroskopunda kontaminasyon kontrol edildiğinden sonra, 100 ml Hestrin&Schramn ortamı içeren 250 ml hacmindeki erlenlere eklenmişlerdir. Erlenler 30°C'de 24-36 saat boyunca 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Bu teknik ile pellet şeklinde BS oluşumu sağlanmış ve aşılama (%2 v/v) için kullanılmıştır(**Şekil 8**).

3.2. Agar Partiküllerinin Oluşturulması

Agar partiküllerinin oluşturulmasında agar parçalama ve agar damlatma yöntemleri uygulanmıştır.

Agar parçalama: Yüzde 2 w/v oranında agar Hestrin&Schramm besiyeri içerisinde hazırlanmış ve otoklavda steril hale getirilmiştir. Ardından yaklaşık 50-60⁰ C'ye soğuduğunda içerisine katılacağı kadar steril hava basılmıştır. Burada amaç katılacak olan agarın içerisine havanın hapsedilmesini sağlamak ve dolayısı ile daha sonra parçalanarak partikül haline getirilen agar içerisine hapsedilmiş hava kabarcıkları nedeniyle bu partiküllerin sıvı besiyerinde yüzeyde kalması sağlanmaya çalışılmıştır. Agarın soğuyarak tamamen katılmasının ardından steril blender ile parçalanmış ve üretim yapılacak erlenlere ilave edilmiştir.

Agar damlatma: Yüzde 2 w/v oranında agar Hestrin&Schramm besiyeri içinde hazırlanmış ve otoklavda steril hale getirilmiştir. Ardından sıcak agar çözeltisi (80 °C) şırıngaya alınarak soğuk steril Hestrin&Schramm besiyerine aseptik koşullarda damlatılarak agar partikülleri oluşturularak ve üretim yapılacak erlenlere ilave edilmiştir

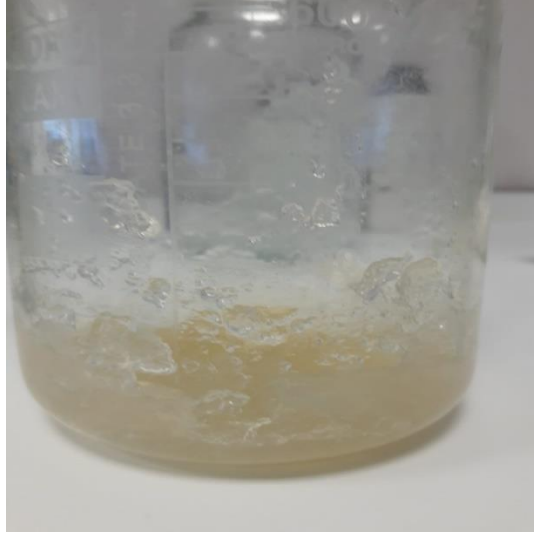
3.3. Por çapı arttırılmış BS üretimi

Bakteriyel selüloz statik kültürde uygun besin ve sıcaklık şartlarında mikroorganizma tarafından besiyerinin sıvı-hava ara yüzeyinde üretilmektedir. Her bir mikroorganizma tarafından hücre dışına salgılanan çok ince selüloz nanofiberleri dışarıda sıkı bir ağ yapısı oluşturmaktadır. **Şekil 3**'te bakteriyel selüloz fibrilleri görülmektedir. Çalışmada, organizma selüloz fibrillerini üretirken yani BS membranı daha oluşturulurken gözenekli şekilde oluşturulması (*in situ*) sağlanacaktır. Bunun için daha önce uygulanan agar partikül yöntemi (Bayır ve ark. 2019) modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bu aşamada iki farklı deney ve bir kontrol deney düzeneği kurulmuştur.

Yöntem I:

250 ml'lik erlenlerde 100 ml çalışma hacminde Hestrin & Schramn besiyeri hazırlanmış ve önceden hazırlanmış steril agar partikülleri (**Şekil 9**) besiyerine ilave edilerek (5w/v) 3.1. başlığında anlatıldığı şekilde hazırlanan aşı kültürü ile %2 v/v oranında inoküle edilerek statik kültürde 30°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir (**Şekil 10**).



Şekil 9: Hazırlanan agar partikülleri

Yöntem II:

250 ml'lik erlenlerde 100 ml çalışma hacminde Hestrin & Schramn besiyeri hazırlanırken besiyerine %0,1-0,3 w/v agar ilave edilerek besiyerinin vizkozitesi arttırılmıştır (Tez kapsamında yapılan daha önceki çalışmada %0,3 w/v üzeri agar varlığı üretimi olumsuz etkilediğinden üst limit burada tutulmuştur). Ardından Yöntem I'deki gibi agar partikülleri besiyerine ilave edilecek (%5 w/v) ve daha önceden 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-36 saat Hestrin & Schramn besiyerinde inkübe edilerek aktif hale getirilmiş *G. xylinus* %2 v/v oranında inoküle edilerek statik kültürde 30°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir.

Hedeflenen BS membran kalınlığına (4-4,5 mm) ulaşıldığında inkübasyon sonlandırılmıştır. İnkübasyon sırasında bakteriyel selüloz üretilirken agar partiküllerinin selüloz içerisine hapsolmesi sağlanmıştır. Üretim tamamlandıktan sonra BS membranlar yüksek ısıda hücresel artıklarından temizlenme aşamasında yapıya hapsolmuş agarın da eriyerek uzaklaştırılması ve BS fibrilleri içerisinde boşlukların oluşturulması sağlanmıştır.

Daha sonra uygun gözenek yapısını ve çekme dayanımını sağlayan şartlarda hayvan denemelerinde kullanılmak üzere çelik tepsilerde (24x30 cm) büyük ölçekli üretimler gerçekleştirilmiştir

Kontrol:

250 ml'lik erlenlerde 100 ml çalışma hacminde Hestrin & Schramn besiyeri hazırlanarak steril edilmiştir. Ardından daha önceden 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-36 saat Hestrin & Schramn besiyerinde aktif hale getirilmiş *G. xylinus* kültüründen %2 v/v oranında inoküle edilerek statik kültürde 30°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 10: Yöntem 1'e göre inokülasyon yapılan *G.xylinus* üretimi

3.4 Bakteriyel selüloz membranlarının hasatı ve temizlenmesi

Bakteriyel selülozun, agar partiküllerinden, besin ortamı artıklarından ve mikrobiyal hücre kalıntılarında uzaklaştırılması için destile su içinde kaynatılarak arındırılması gerekmektedir. Hasat sırasında BS üretim ortamından uzaklaştırıldığında, besin ortamıyla aynı renktedir. BS için yaygın olarak kullanılan saflaştırma yöntemi seyreltilmiş NaOH alkali çözeltisi ile kaynatma ve destile su ile durulama prensibine dayanmaktadır. BS saflaştırmak için genel olarak 0,1 M NaOH alkali çözeltisi ile 60-90 °C arasında 20 dk – 4 saate kadar bekletmenin ardından destile su ile kaynatılarak durulama işlemi gerçekleştirilmiştir (Keskin ve ark. 2017). Yıkama işlemi ile selüloz fibrilleri tamamen hücresel artıklardan ve içerdiği agar partiküllerinden arındırılmıştır.

3.5 Shindai Özütlemesi ve Keratin Çözeltisi Hazırlanması

İzmir’de kuaförlerden boyasız ve ağarmamış saçlar etik kurul onayı ile [Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul (13-12.1/12)] toplanmış ve % 0,5 sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yıkanarak destile su içerisinde bekletilmiştir. Ardından geriye kalan tüm kirliliği uzaklaştırmak için saçlar n-hegzan içerisinde 12 saat boyunca çeker ocak içerisinde bekletilmiştir. n-Hegzan içinden alınan örnekler bir süre çeker ocakta bekletilip kurutulduktan sonra, önce makasla küçük parçalara ayrılmış ardından değirmen kullanılarak öğütülmüş ve toz haline getirilmiştir.

Toz halindeki 20 g saç; 25 mM tris (pH: 8,5), 2,6 M tiyoüre, 5M üre ve %5 v/v oranında 2-β- merkaptoetanol içeren 400 ml özütleme çözeltisi içerisinde alınarak, 50 °C’de 72 saat bekletilmiştir. Ardından 4500 rpm’de 15 dakika santrifüjlenecek ve üst sıvı por çapı 2,5 µm olan filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir (Nakamura ve ark., 2002).

Elde edilen keratin çözeltisi 1:50 oranında destile su ile MWCO (Molecular Weight Cut Off) 6-8 kDa olan diyaliz membran kullanılarak 10 gün ~25 °C’de diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyu her 12 saatte bir değiştirilerek pH kontrolü ile keratin çözeltisinde hiçbir tuz kalmayınca kadar tekrarlanmıştır. Ardından liyofilize edilerek kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.6 Keratin Yükleme

Saflaştırıldıktan sonra kesilen (1-2 cm²) ve 121°C’de 15 dakika boyunca steril edilen ıslak BS membranları laminar akışlı kabinde aseptik şartlar altında absorbladığı suyun bir kısmı filtre kağıdı yardımıyla alınmış ve keratin çözeltisi 6 farklı noktadan 1 ml hacimde BS membranlarının üzerine damlatılarak emdirilmiştir (Keskin ve ark. 2017)

3.7 Mekanik Eğme ve Çekme Analizleri

Mekanik analizler Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde TA Instruments Q800 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 37°C'de gerçekleştirilen analizlerde, malzemenin çekme dayanımı ölçülmüştür. BS yapısını değiştiren iki parametre olan keratin modifikasyonu ve gözeneklilik için ayrı ayrı denemeler yapılmıştır. Denemeler birim kalınlık üzerinden yapıldığı için BS'nin kalınlığı göz önünde bulundurulmamıştır.

3.8 SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi) Görüntüleme

Denemeler Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Preparat hazırlığı esnasında, BS membranlarından numuneler alınmış liyofilizasyon ile kurutulmuştur. Ardından, örnekler Leica EM ACE600 Kaplama Cihazı ile %80 altın ve %20 palladyum ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra Taramalı Elektron Mikroskopu ile görüntü ve ölçümler alınmıştır.

3.9 FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi) Analizi

FTIR analizi Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilen örneklerde amid gruplarının varlığı incelenmiş ve kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır.

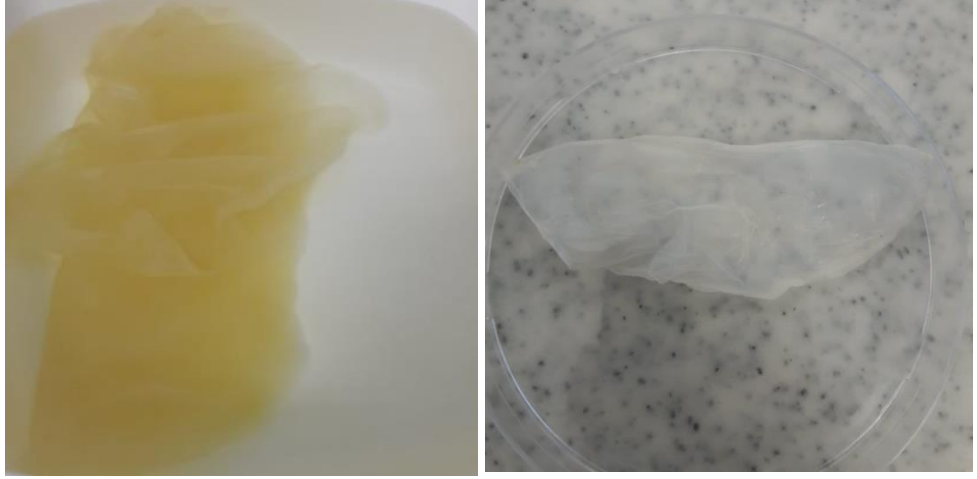
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Agar Partikül Eldesi

Agar partikül elde edilmesinde iki farklı yöntem izlenmiştir. Uygulama olarak bu iki yöntemin uygulama açısından birbirine herhangi bir üstünlüğü yoktur. Agar partikül eldesinde uygulanan damlatma yönteminde önce şırınga pompası ile denemeler yapılmıştır. Ancak şırınga pompası istenilen hızda çalıştırılmamış ve şırınganın haznesinde soğumaya başlayan agar, şırınga iğnesini tıkayıp istenilen agar akışına engel olmuştur. Bu sebeple damlatma yönteminde şırıngadan doğrudan el ile agar H&S ortamına damlatılmıştır. Damlatma yönteminde daha küresel ve boyutları birbirine yakın agar partikülleri elde edilmiştir.

4.2. Por Çapı Arttırılmış BS Üretimi

Agar parçalama ve agar damlatma yöntemi ile elde edilen agar partikülleri hem 1 hem de 2. Yöntemdeki şekilde besiyerine eklenerek BS membranları üretilmiştir. Besiyerinin vizkozitesinin arttırıldığı ikinci yöntem agar partiküllerinin sıvı besiyerinin sıvı-hava ara yüzeyinde toplanması konusunda daha başarılı sonuç verdiği için %0,3 oranında agar besiyeri hazırlanırken içerisine ilave edilerek besiyerinin vizkozitesinin arttırılarak kullanılmasına karar verilmiştir. Üretim sonrası BS membranları hasat edilerek yıkanmıştır (**Şekil 11**). Agar parçalama ve agar damlatma ile elde edilen agar partikülleri ile yapılan BS üretim sonucunda aynı sürede eşit kalınlıkta BS membranları elde edilmiştir.



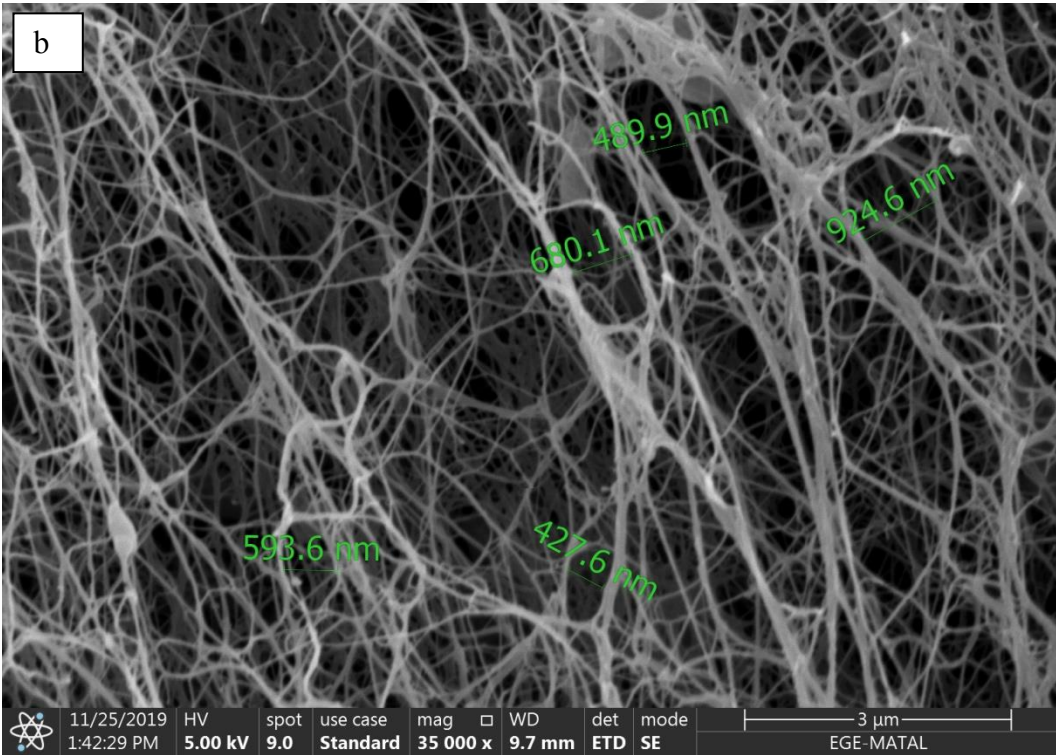
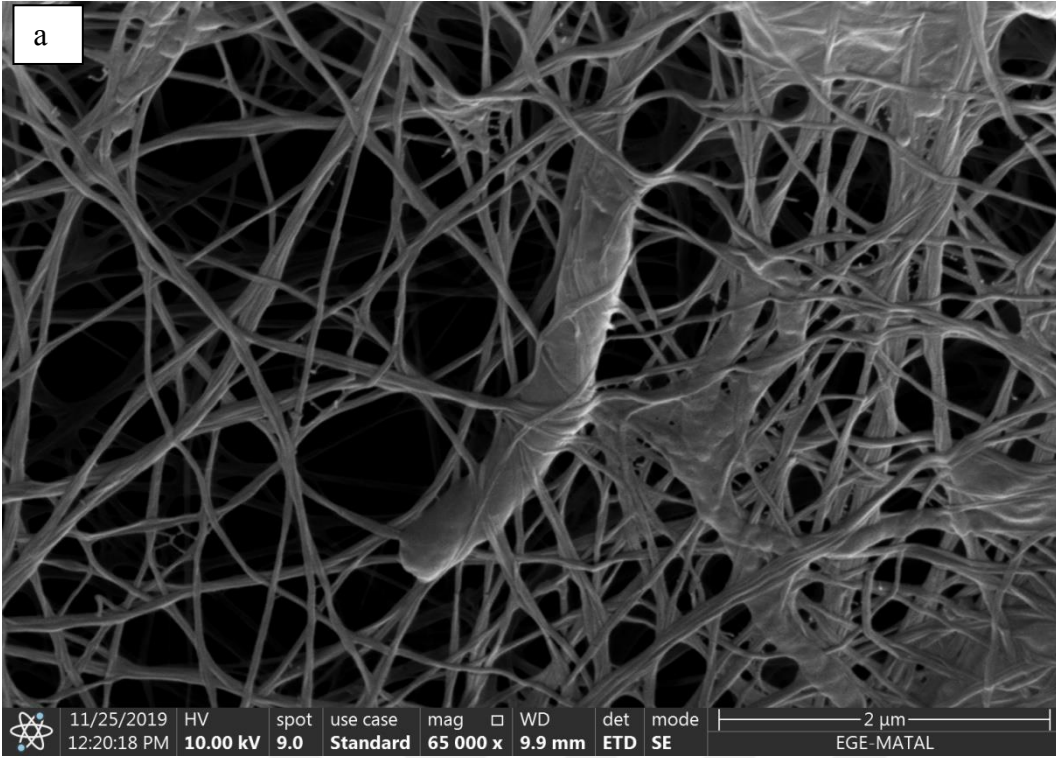
Şekil 11: Hasat sonrası (a) ve yıkama sonrası (b) BS membranının görünümü

4.3. Shindai Özütlemesi ve keratin çözeltisinin hazırlanması

Shindai özütlemesinde amaç saçın içerdiği keratin proteinini çözümlü halde elde etmektir. Bu aşamada saç içerisindeki keratin elde edilmiş ve çözeltinin ml başına 0,3mg keratin içerdiği tespit edilmiştir.

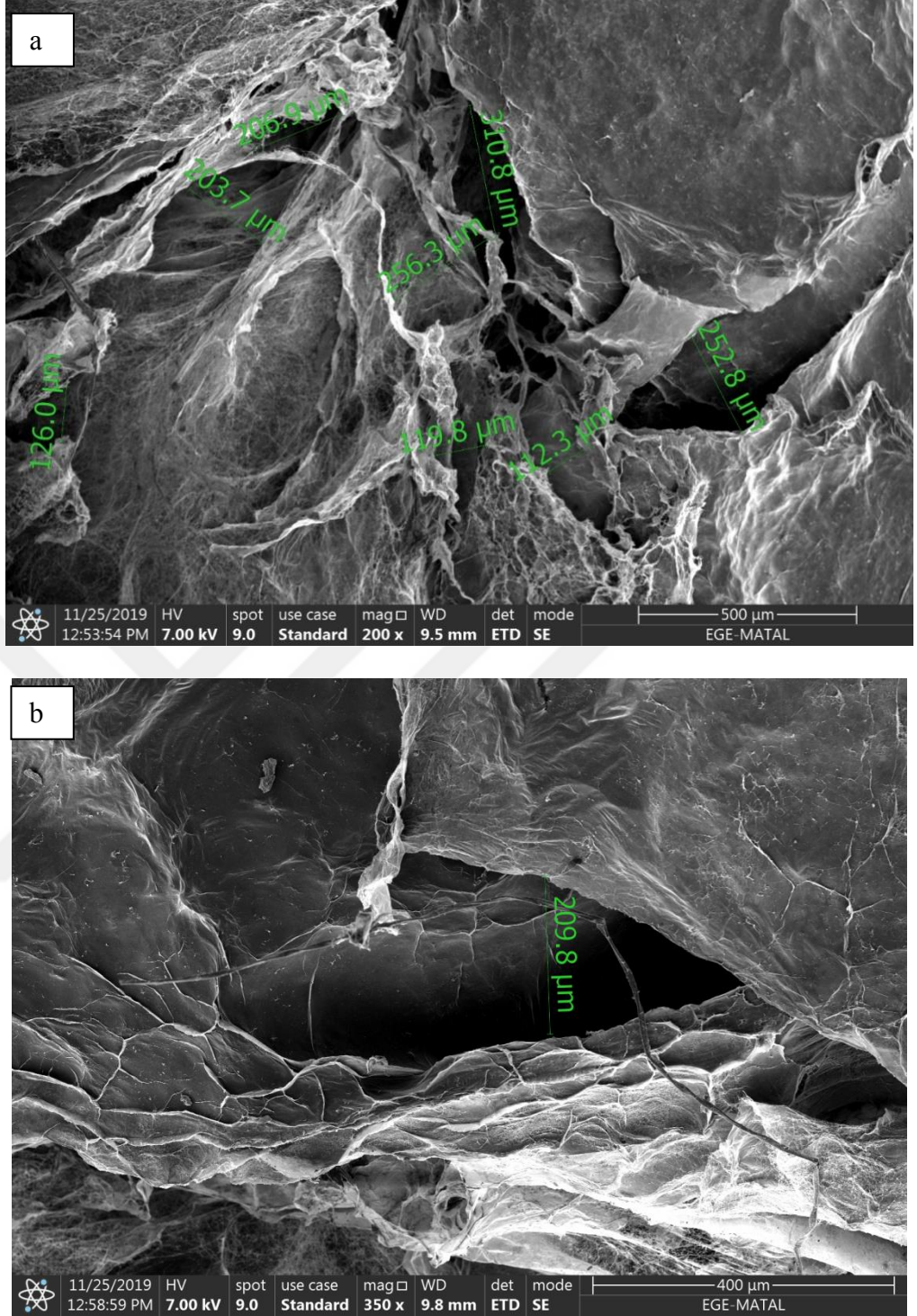
4.4 SEM Görüntüleme

Elde edilen BS membranları gözenek yapılarının incelenmesi için SEM görüntülemesi yapılmıştır. **Şekil 12'**de kontrol BS örneğinde nanoselüloz fibrilleri üretici organizmanın (a) görüntüsü ve fibriller arası yaklaşık por büyüklükleri (b) sunulmuştur. Fotoğraflardan da görüldüğü üzere selüloz fibrilleri arasındaki boşluklar yaklaşık nanometre büyüklüğündedir ve hayvan hücrelerinin geçmesine izin verecek özellikte değildir. Tez çalışmasında agar partiküllerinin üretim sırasında yapıya katılması ve üretim tamamlandıktan sonra yapıdan uzaklaştırılması sonrası istenen por büyüklüğüne erişilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 12: Farklı büyütmelerde doğal BS nanofibrilleri a) fibriller arasında üretici organizma, b) fibriller arası boşlukların boyutları

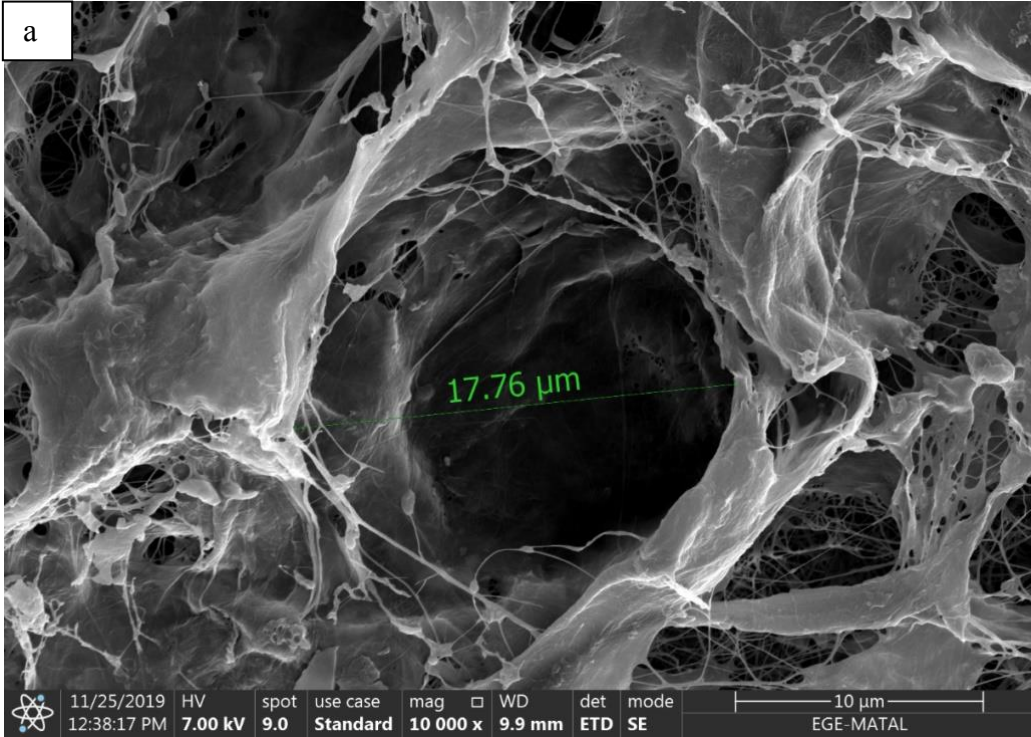
Agar parçalama ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak *in situ* BS membran üretimi sonrası istenen büyüklüklerde porların oluşturulduğu SEM görüntülerinde gözlemlenmiştir.

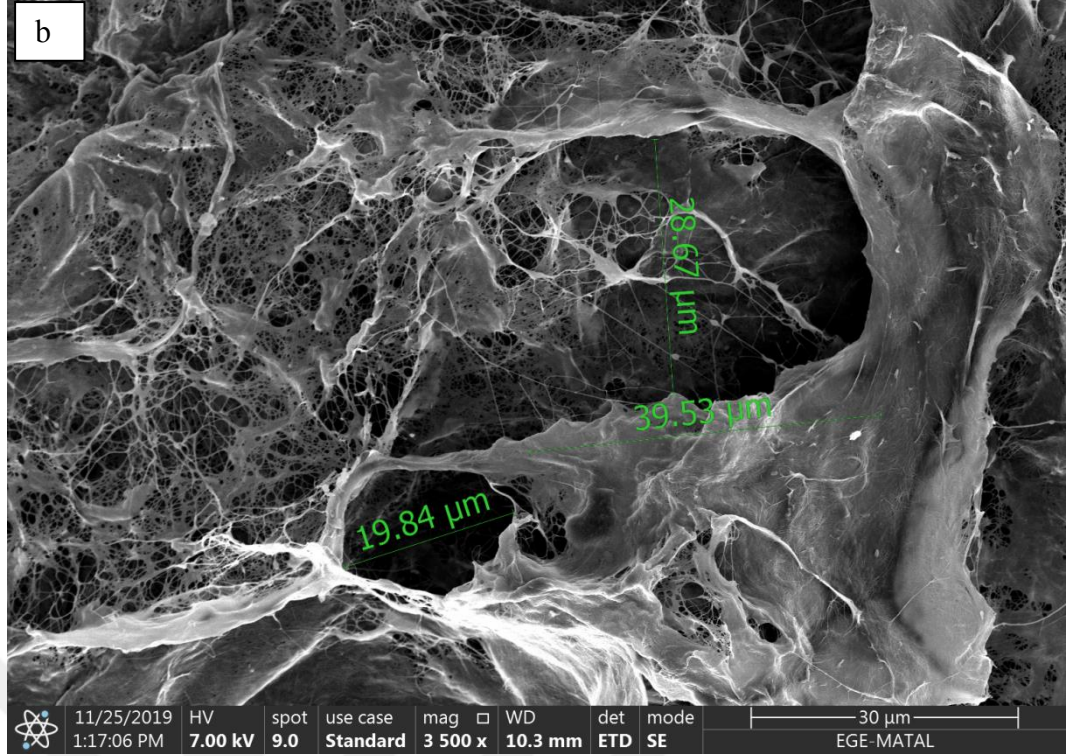


Şekil 13: Agar parçalama ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak üretilen BS membranın farklı büyütmelelerdeki görünümü

Epitel hücreleri için 100μm den daha büyük gözeneklerin varlığı hücre göçüne izin verdiğiinden bu yöntem ile başarılı şekilde BS membranında gözenekler oluşturulmuştur (Şekil 13).

Agar damlatma ile por boyutları artırılan BS membranındaki gözenekler 80 mikrometreye varan boşluklar oluşturmuştur. **Şekil 14** a ve b’de agar damlatma ile oluşan ancak istenenden daha küçük olan bir por görüntüsü verilmiştir. Bu porlar epitel hücrelerin yerleşmesi için uygun boyuta sahip olmadıklarından agar parçalama ile elde edilen 100 μ m üzerindeki porlar ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.





Şekil 14: Agar damlatma ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak üretilen BS membranın farklı büyütmelelerdeki görünümü

Genel olarak;

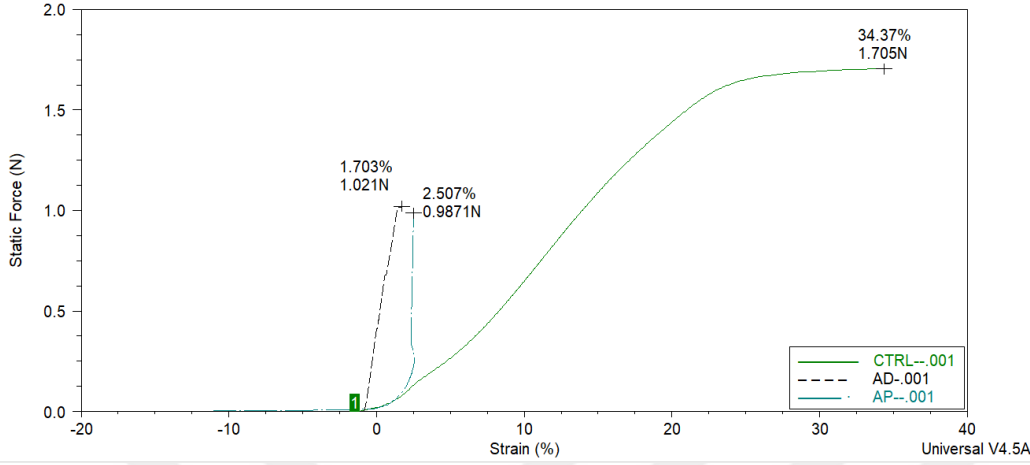
Kontrol grubu, yani herhangi bir şekilde modifiye edilmemiş BS membranının yapısı, beklenildiği gibi sıkı yapıda selüloz fibrillerinden oluşmaktadır. Bu görüntüler literatür ile uyumludur (Reddy ve Narendra, 2014). Özellikle fiberler arası mesafe önceki literatür çalışmalarıyla örtüşmektedir (Keskin, 2015).

Agar parçalama ile üretilen BS yapısında düzensiz ve 300 mikrometreye varan boşluklar gözlemlenmiştir. Bu boşluklar, epitel hücrelerin yerleşebileceği boyutlardadır. Keratin ile modifikasyondan sonra fibril kalınlıkları keratin kaplanması nedeniyle nanoboyutta kalınlaşmış olsa da mevcut gözeneklerin boyutlarında önemli bir değişime neden olmamıştır.

4.5. Modifiye BS Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Por büyüklükleri ve sayısı artırılan ve ayrıca keratin yüklenen örneklerin mekanik testleri Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı

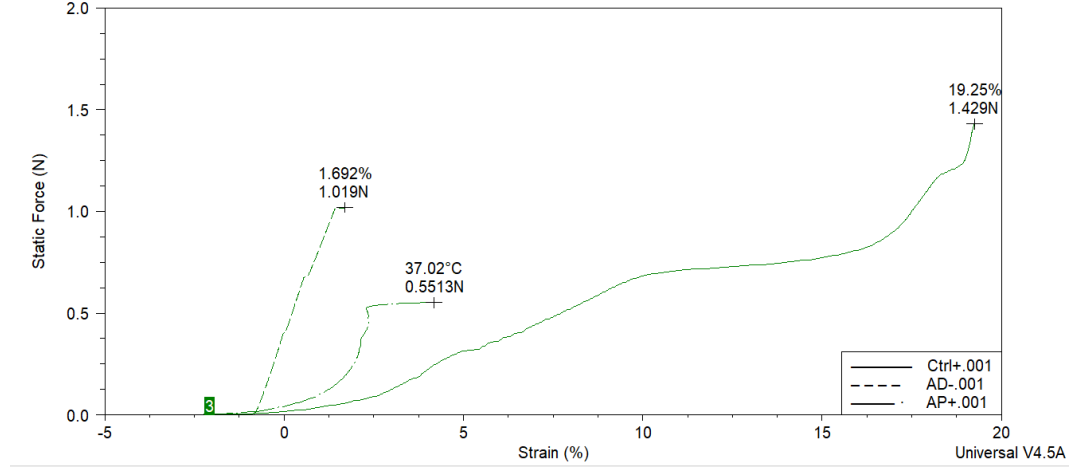
Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde TA Instruments Q800 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 15: Keratin içermeyen BS membranlarının fiziksel dayanım grafiği (CTRL: kontrol, AD:agar damlatma, AP: agar parçalama)

Herhangi bir işlem görmemiş BS'nin çekme dayanımı 1.705 N olarak ölçülmüştür. Gözenek yapısı arttırılan BS örneklerinde ise agar parçalama yönteminde 0,987 N ve agar damlatma yönteminde 1,021 N çekme dayanımı ölçülmüştür (**Şekil 15**). Yüzey modifikasyonları malzeme dayanımlarını düşürmektedir ancak, agar parçalama yöntemi damlatmaya göre daha büyük porlar oluşturduğundan BS yapısını daha çok zayıflatmıştır. Beklendiği şekilde gözenek yapısının artması malzemenin çekme dayanımını düşürmekle birlikte elde edilen değer hala malzemenin deri ikamesi olabileceği sınırlardadır. (Gallagher ve ark. 2012) (Nyame ve ark., 2015; Keskin ve ark, 2017).

Keskin ve ark. (2017) ile Scionti (2010) yaptıkları çalışmalarda çekme dayanımını 1,7 mm kalınlıktaki BS için 18 Newton olarak belirlenmiştir. Ancak, birim kalınlıkta yürütülen analizde, elde edilen sonuçlar bahsedilen sonuçlarla uyumlu olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 16: Keratin ile modifiye edilmiş BS membranlarının fiziksel dayanım grafiği

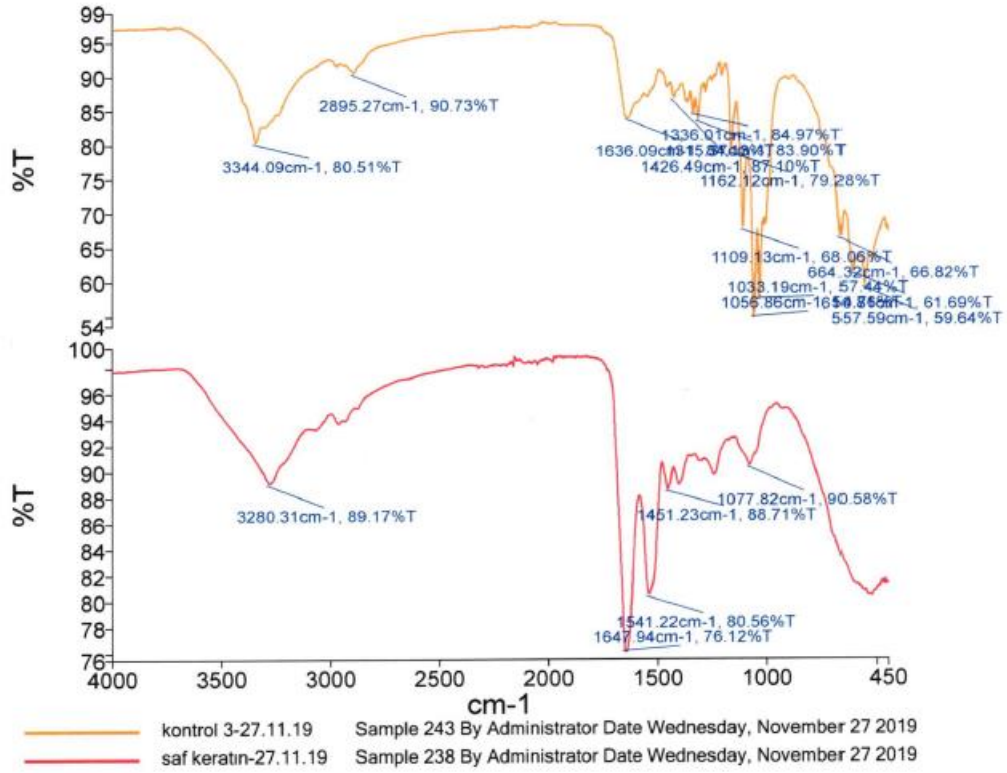
Gözenek yapısı kazandırılmış örneklerin keratin yüklemesinden sonraki mekanik dayanımları ise agar damlatma örneği için 1,019N, agar parçalama örneği için ise 0,5513N olarak ölçülmüştür (Şekil 16).

Keratin yüklenmemiş örneklerde fiziksel dayanım daha yüksek gözlemlenmiştir. Keratin ile modifiye olan BS membranlarının %30 ila %40 aralığında dayanımının azalması da literatüre uygun olarak gözlemlenmiştir. (Nyame ve ark., 2015; Keskin ve ark, 2017).

4.6. FTIR Analizi

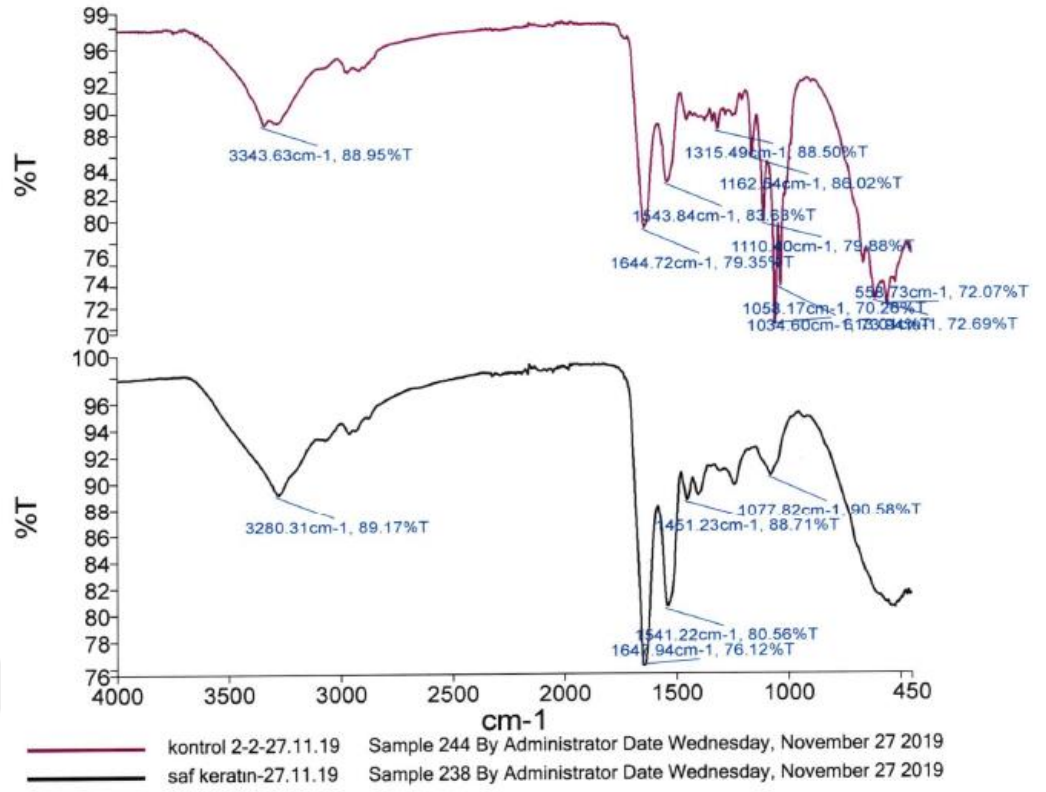
Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR) analizi Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Keratin ve iki farklı yöntemle modifiye edilmiş BS kullanılan analizlerde, 1650 cm^{-1} ve 1300 cm^{-1} değerlerindeki amid grubuna rastlanmıştır. Amid grupları incelenen numunelerde keratin bulunduğunu göstermektedir.



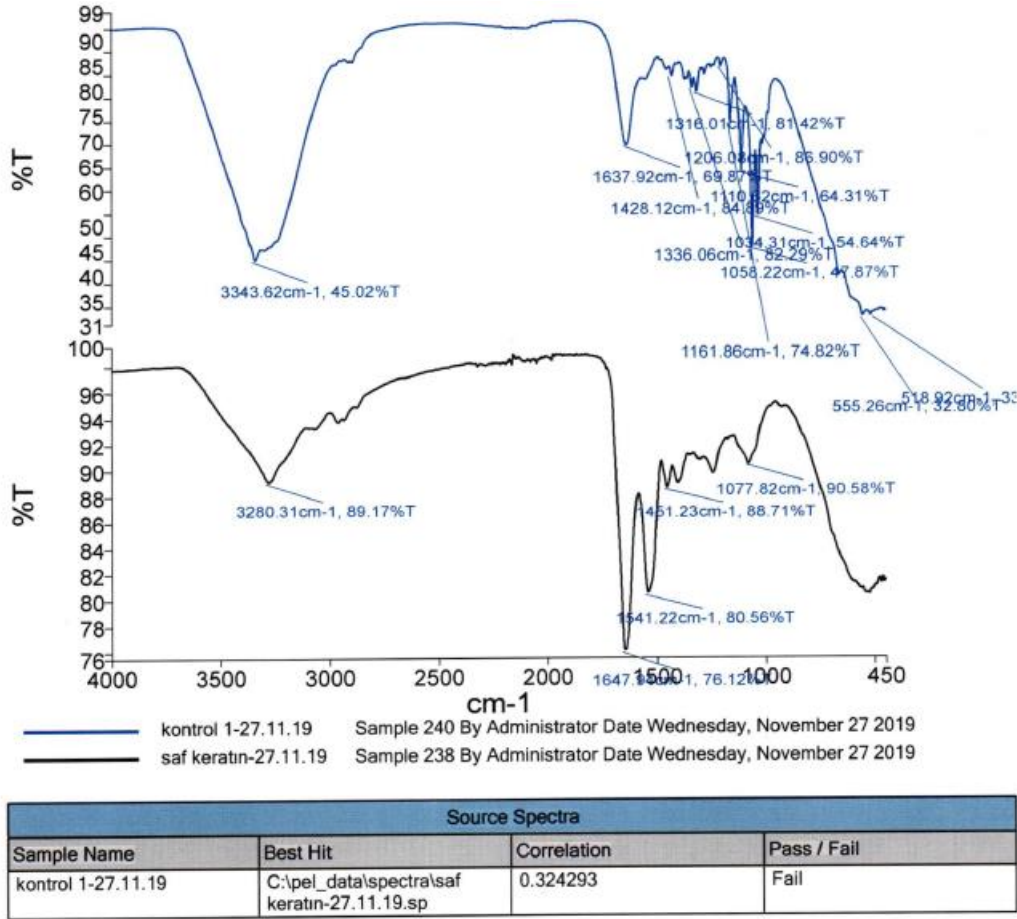
Source Spectra			
Sample Name	Best Hit	Correlation	Pass / Fail
kontrol 3-27.11.19	C:\pel_data\spectra\saf keratin-27.11.19.sp	0.209287	Fail

Şekil 17: BS ve keratinin FTIR analizi ve aralarındaki korelasyon



Source Spectra			
Sample Name	Best Hit	Correlation	Pass / Fail
kontrol 2-2-27.11.19	C:\pel_data\spectra\saf keratin-27.11.19.sp	0.635323	Fail

Şekil 18: Agar parçalama ile modifiye edilen BS-keratin örneğinin sadece keratin ile karşılaştırılmalı FTIR analizi



Şekil 19: Agar damlatma ile modifiye edilen BS-keratin örneğinin sadece keratin ile karşılaştırılmalı FTIR analizi

Elde edilen bu sonuçlara göre agar parçalama ile elde edilen keratin yüklenen BS membranının keratin ile benzerliği 0,635 (Şekil 18) olarak belirlenirken agar damlatma ile bu değer 0,324 (Şekil 19) olarak belirlenmiştir. Saf BS ve keratinin benzerliği 0,209 (Şekil 17) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar agar damlatma ile daha fazla gözenek oluştuğundan keratin çözeltisinin bu örneklerde yapı içerisinde daha fazla yer aldığı doğrulamaktadır.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

BS yüzey modifikasyonu iki farklı yöntemle başarıyla denenmiştir. Bu yüzey modifikasyonları, hem BS genel yapısına zarar vermeyecek hem de modifikasyon sonrası BS yapısından uzaklaştırılacak şekilde seçilmiştir.

BS'nin gözenekliliğini arttırmak için bir çok çalışma yapılmış ve çeşitli yöntemler denenmiştir (Petersen ve Gatenholm 2011; Ikada 2011; Backdahl ve ark., 2008; Xiong ve ark., 2015). Ancak, agar parçalama yöntemi diğer yöntemlere nazaran uygulaması daha kolay, istenilen gözenek çapını veren ve yapının istenilen özelliklerini koruyan bir modifikasyon şeklidir.

BS modifikasyonlar sonrası genel özelliklerini korumakla beraber yapısındaki gözenekler sebebiyle fiziksel dayanımı, hipotezi destekleyecek biçimde düşmüştür. Özellikle, agar parçalama yönteminde por yapısı daha geniş olduğundan fiziksel dayanım buna orantılı olarak daha düşük olarak ölçülmüştür.

Fibroblastların yerleşebileceği ve tutunacağı boşluklar yaratmak amacıyla oluşturulan bu porlar, agar damlatma yöntemiyle yeteri büyüklüğe sahip olarak üretilmemişlerdir. Agar parçalama yönteminde ise gerekli büyüklükte gözlemlenen por oluşumu, hem miktar hem de geometri olarak uygun düzeyde gözlemlenmiştir.

Literatürde daha önce gözenek yapısı artırılarak keratinle modifiye edilmiş BS yara ikamesine rastlanılmamıştır. Keratin ile modifikasyon ilk defa çalışmalarımı yürüttüğüm laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve uygunluğu *in vitro* hücre kültürü ile doğrulanmıştır (Keskin ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında da malzeme gözenek yapısı modifiye edilerek geliştirilmiştir. BS özellikle 2013'ten beri biyomedikal çalışmalarda popüler bir biyomalzemedir. Bu çalışma, özellikle ticari ürün değeri taşıyan bir deri ikamesi geliştirme araştırmalarında da bir

basamaktadır. Ucuz ve kolay üretim, yüksek saflık, modifikasyona açık bir biyomalzeme olan BS, biyomedikal pazarında yer almaya aday bir polimerdir.

Mevcut çalışmanın devamı niteliğinde olacak *in vivo* denemelerin yapılması halinde gözenekliliğin arttırılmasının, keratinle modifiye edilmiş BS'nin yara ikamesine olan etkisi kesin olarak ispatlanacaktır. Canlı üzerinde yapılacak olan çalışmalar, ayrıca, keratinle modifiye edilmiş BS'nin yara örtüsü olarak kullanım kolaylığını, canlı dokuların iyileşme oranını vb. gibi parametrelerin ölçülmesini de sağlayacaktır.



6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ávila Ramírez, J. A., Suriano, C. J., Cerrutti, P., & Foresti, M. L. (2014). Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology. *Carbohydrate Polymers*, 114, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.020>
- Backdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2008). Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(6), 320–330. <https://doi.org/10.1002/term.97>
- Barud, H. S., Regiani, T., Marques, R. F. C., Lustrì, W. R., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L., 2011, Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. *Journal of Nanomaterials*.
- Beele, H. (2002). Artificial skin: Past, present and future. *International Journal of Artificial Organs*, 25(3), 163–173.
- Belgacem, M. N., Czeremuszkín, G., Sapiéha, S., & Gandini, A. (1995). Surface characterization of cellulose fibres by XPS and inverse gas chromatography. *Cellulose*, 2(3). <https://doi.org/10.1007/BF00813015>
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., & Hames, E. E. (2016). Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.052>
- Maurice, P., Blaise, S., Gayral, S., Debelle, L., Laffargue, M., Hornebeck, W., & Duca, L. (2013). Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: The elastokine concept. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(6), 211–221. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2012.12.004>
- Brown, R. M. (2004). Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century? In *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* (Vol. 42, pp. 487–495). <https://doi.org/10.1002/pola.10877>

- Cannon, R. E., & Anderson, S. M. (1991). Biogenesis of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Microbiology*, 17(6), 435–447. <https://doi.org/10.3109/10408419109115207>
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2011). Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules*, 12(3), 730–736. <https://doi.org/10.1021/bm101363t>
- Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., Maier, S., 2009. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1793, 911-20, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.012
- Chu, P. ., Chen, J. ., Wang, L. ., & Huang, N. (2002). Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 36(5–6), 143–206. [https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(02\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(02)00004-9)
- Culebras, M., Grande, C. J., Torres, F. G., Troncoso, O. P., Gomez, C. M., & Bañó, M. C., 2015, Optimization of Cell Growth on Bacterial Cellulose by Adsorption of Collagen and Poly-L-Lysine. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(8), 411–415 pp
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- Davidson, A., Jina, N. H., Marsh, C., Than, M., & Simcock, J. W. (2013). Do functional keratin dressings accelerate epithelialization in human partial thickness wounds? A randomized controlled trial on skin graft donor sites. *Eplasty*, 13: 375–381
- Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A., Jayasuriya, A. C., 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C* 48, 651-662, doi:http://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068.
- Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical

applications. *Carbohydrate Polymers*, 209(November 2018), 130–144.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.020>

Enoch S, Leaper D J, Basic science of wound healing, Surgery (Oxford), Volume 26, Issue 2, 2008, Pages 31-37, ISSN 0263-9319, <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005>.

Erbas Kiziltas, E., Kiziltas, A., Blumentritt, M., & Gardner, D. J., 2015, Biosynthesis of bacterial cellulose in the presence of different nanoparticles to create novel hybrid materials. *Carbohydrate Polymers*, 129, 148–155 pp.

Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>

Gallagher, A. J., Ni Anniadh, A., Kruyere, K., Ottenio, M., Xie, H., & Gilchrist, M. D. (2012). Dynamic tensile properties of human skin. *2012 IRCOBI Conference*, 494–502. <https://doi.org/Irc-12-59>

Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., & Carmen Bañó, M., 2009, Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 5(5), 1605–1615 pp.

Guerra, A., Belinha, J., & Jorge, R. N. (2018). Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *Journal of Theoretical Biology*, 459, 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.09.020>

Haddad, A. G., Giatsidis, G., Orgill, D. P., & Halvorson, E. G. (2017). Skin Substitutes and Bioscaffolds. *Clinics in Plastic Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2017.02.019>

Helenius, G., Bäckdahl, H., Bodin, A., Nannmark, U., Gatenholm, P., & Risberg, B. (2006). In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 76(2), 431–438.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30570>

- Hong, F., & Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.015>
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. P. (2006). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537–545. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>
- Huang, H. C., Chen, L. C., Lin, S. Bin, Hsu, C. P., & Chen, H. H., 2010, *In situ* modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. *Bioresource Technology*, 101(15), 6084–6091 pp.
- Ifuku, S., Tsuji, M., Morimoto, M., Saimoto, H., & Yano, H., 2009, Synthesis of silver nanoparticles templated by TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose nanofibers. *Biomacromolecules*, 10(9), 2714–2717 pp.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270. <https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>
- Ikada, Y. (2011). Biodegradable Polymers as Scaffolds for Tissue Engineering. In *Handbook of Biodegradable Polymers* (pp. 341–362). <https://doi.org/10.1002/9783527635818.ch14>
- Izawa, I., & Inagaki, M. (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00161.x>
- Jain, R. K. (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*, 307(5706), 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1104819>

- Javier, B., Ackerman, A. B. (2001). Keratinocyte? *Dermatopathol Practical Conceptual* 7(3), 175–178.
- Jeong, S. Il, Lee, S. E., Yang, H., Jin, Y. H., Park, C. S., & Park, Y. S. (2010). Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. *Molecular and Cellular Toxicology*, 6(4), 373–380.
<https://doi.org/10.1007/s13273-010-0049-7>
- Jing, W., Chunxi, Y., Yizao, W., Honglin, L., Fang, H., Kerong, D., & Yuan, H., 2013, Laser Patterning of Bacterial Cellulose Hydrogel and its Modification With Gelatin and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Soft Materials*, 11(2), 173–180 pp
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 101–106.
[https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00197-3)
- Jones, M. J., & Rehg, J. M. (2002). Statistical color models with application to skin detection. *International Journal of Computer Vision*, 46(1), 81–96.
<https://doi.org/10.1023/A:1013200319198>
- Jozala, A. F., de Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., ... Chaud, M. V. (2016). Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>
- Keskin Z. (2015) Keratin İçeren Bakteriyel Selüloz Tabanlı Kompozit Biyomalze Üretimi, Karakterizasyon ve Biyoyapay Deri Geliştirilmesinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik, Türkiye.
- Keskin, Z., Sendemir Urkmez, A., & Hames, E. E. (2017). Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 75, 1144–1153.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.035>

- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H. P., & Marsch, S. (2006). Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Advances in Polymer Science*. https://doi.org/10.1007/12_097
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- Li, Y., Qing, S., Zhou, J., & Yang, G., 2014, Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 496–501 pp.
- Loan, F., Cassidy, S., Marsh, C., & Simcock, J. (2016). Keratin-based products for effective wound care management in superficial and partial thickness burns injuries. *Burns*, 42(3), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.10.024>
- Lopes, T. D., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A., & Faria-Tischer, P. C. D. S., 2014, Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 401–8 pp.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P., & Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.005>
- Martin, P. (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276(5309), 75–81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>
- Mendes, P. N., Rahal, S. C., Pereira-Junior, O. C. M., Fabris, V. E., Lenharo, S. L. R., de Lima-Neto, J. F., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2009). In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 12. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-12>

- Midwood, K. S., Williams, L. V., & Schwarzbauer, J. E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.003>
- Mohd Amin, M. C. I., Ahmad, N., Halib, N., & Ahmad, I. (2012). Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, *88*(2), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.022>
- Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., Fujii, T., Fuhii, T., & Fujii, T. (2002). A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. *Biol. Pharm. Bull*, *25*(5), 569–572. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.569>
- Nandgaonkar, A. G., Wang, Q., Fu, K., Krause, W. E., Wei, Q., Gorga, R., & A. Lucia, L., 2014, A one-pot biosynthesis of reduced graphene oxide (RGO)/bacterial cellulose (BC) nanocomposites. *Green Chemistry*, *16*(6), 3195–3201 pp.
- Nyame, T. T., Chiang, H. A., Leavitt, T., Ozambela, M., & Orgill, D. P. (2015). Tissue-Engineered Skin Substitutes. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *136*(6), 1379–1388. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001748>
- Pavaloiu, R.-D., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jinga, S. I., & Dobre, T. 2014, Composite films of poly(vinyl alcohol)–chitosan–bacterial cellulose for drug controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*, *68*, 117–124 pp.
- Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y>
- Portal, O., Clark, W. A., & Levinson, D. J. (2009). Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, *21*(1), 1–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25904579>

- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.09.002>
- Reddy N., Yang Y. (2015) Bacterial Cellulose Fibers. In: Innovative Biofibers from Renewable Resources. Springer, Berlin, Heidelberg pp 307-32
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. a, Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., Chung, K. K. (2015). Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care (London, England)*, 19(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>
- Sanchavanakit, N., Sangrungraungroj, W., Kaomongkolgit, R., Banaprasert, T., Pavasant, P., & Phisalaphong, M. (2006). Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnology Progress*, 22(4), 1194–1199. <https://doi.org/10.1021/bp060035o>
- Scionti, G, Mechanical properties of bacterial cellulose implant, 2010 Yüksek lisans Tezi, Chalmers University of Technology, İsveç.
- Sheridan, R. L., & Tompkins, R. G. (1999). Skin substitutes in burns. *Burns*, 25(2), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00176-4)
- Singer, A. J., Clark, R. A., 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-46, doi:10.1056/nejm199909023411006.
- Tanskul, S., Amornthatree, K., & Jaturonlak, N. (2013). A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.017>
- Thiruvengadam, V., & Vitta, S. (2013). Ni–bacterial cellulose nanocomposite; a magnetically active inorganic–organic hybrid gel. *RSC Advances*, 3(31), 12765. <https://doi.org/10.1039/c3ra40944a>

- Tranquillo, R. T., Lauffenburger, D. A., 1987. Stochastic model of leukocyte chemosensory movement. *Journal of Mathematical Biology* 25, 229-262, doi:10.1007/bf00276435.
- Trovatti E, Serafim L S, Freire C S R, Silvestre A J D, Neto C P, *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory, *Carbohydrate Polymers*, Volume 86, Issue 3, 2011, Pages 1417-1420, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.046>.
- Verma, V., Verma, P., Ray, P., & Ray, A. R. (2008). Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. *Biomed. Mater*, 3, 25007–25012. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/2/025007>
- Wang, J., Hao, S., Luo, T., Cheng, Z., Li, W., Gao, F., ... Wang, B. (2017). Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>
- Wang, J., Lu, X., Ng, P. F., Lee, K. I., Fei, B., Xin, J. H., & Wu, J., 2015, Polyethylenimine coated bacterial cellulose nanofiber membrane and application as adsorbent and catalyst. *Journal of Colloid and Interface Science*, 440, 32–38 pp.
- Wang, W., Zhang, T. J., Zhang, D. W., Li, H. Y., Ma, Y. R., Qi, L. M., ... Zhang, X. X., 2011, Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of heme proteins on gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite. *Talanta*, 84(1), 71–77 pp.
- Wei, B., Yang, G., & Hong, F. (2011). Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.017>
- Xiong, G., Luo, H., & Gu, F. (2013). A Novel in Vitro Three-Dimensional Macroporous Scaffolds from Bacterial Cellulose for Culture of Breast Cancer Cells. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(October), 316–326. <https://doi.org/10.4236/jbmb.2013.44040>

Xiong, G., Luo, H., Zhang, C., Zhu, Y., & Wan, Y. (2015). Enhanced biological behavior of bacterial cellulose scaffold by creation of macropores and surface immobilization of collagen. *Macromolecular Research*, 23(8), 734–740. <https://doi.org/10.1007/s13233-015-3099-9>

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141–3145. <https://doi.org/10.1007/BF01139032>



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana tüm ilgisi ve hoşgörüsüyle bilgi birikimini ve tecrübelerini aktaran, tez danışmanım Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA'ya

Analizler ve testler esnasında yardımları için Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) çalışanlarına,

İş hayatım boyunca, lisansüstü eğitimimi destekleyen Ege Teknopark TGB A.Ş. eski Genel Müdürü Yener MERCANKÖŞK'e

Benimle aynı çalışma ortamında tecrübe ve bilgilerini paylaşan tüm Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma,

Sonsuz sabırları ve inançları sayesinde bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan Anneme ve Babama,

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini asla esirgemeyen Beyza YAĞCI'ya

Ne yazık ki artık aramızda olmayan, çıktığım bu bilim yolculuğunda kendimi bilmemi sağlayan merhum Dr. Serkan SAYGAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri FYL-2018-20231 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Doruk Deniz İLMENÖZ

Proje Uzmanı, Ege Teknopark Teknoloji Geliştirme Bölgesi Anonim Şirketi

E-posta: doruk.deniz.ilmenez@gmail.com

Telefon: 0537 662 91 58

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans, Ocak 2016 - Ocak 2019 Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Teknolojiler Anabilimdalı

Lisans, Eylül 2009 - Aralık 2015, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Ortaöğretim, Eylül 2005 – Haziran 2009, Bornova Anadolu Lisesi

İlköğretim Eylül 1997 – Haziran 2005, Agah Efendi İlköğretim Okulu