



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**LL-37 PEPTİDİNİN LİGNİN
KAPROLAKTON POLİMERİNE
İMMOBİLİZASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

DEKA ABDULLAHİ FARAH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2015



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**LL-37 PEPTİDİNİN LİGNİN
KAPROLAKTON POLİMERİNE
İMMOBİLİZASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

DEKA ABDULLAHİ FARAH

(520612921)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2015

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

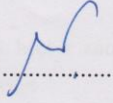
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi “Deka ABDULLAHİ FARAH’ın “LL-37 Peptidinin Lignin-Kaprolakton Polimerine İmmobilizasyonu ve Antimikrobiyal Özelliğinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışması, 17.03.2015 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe OGAN (Danışman)

Marmara Üniversitesi(İMZA) 

Prof. Dr. Meral BİRBİR (Üye)

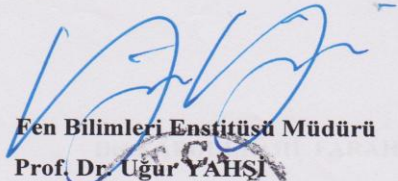
Marmara Üniversitesi(İMZA) 

Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN (Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA) 

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ~~23-03-2015~~ tarih ve ~~2015/07-02~~ sayılı kararı ile Deka ABDULLAHİ FARAH’ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Uğur YAHSI



TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışması, Marmara üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans çalışmam süresince, aktarmış olduğu birikimler, göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayıştan dolayı, tez danışmanım Prof. Dr. AYŞE OGAN’a, teorik bilgiler ve deneysel katkılar ile göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayış ile bu çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği olan ve her türlü bilgi ve yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Vezir KAHRAMAN ve Arş. Gör. Aslı BEYLER ÇİĞİL’e ve deneysel çalışmalarında bana çok yardımcı olan Dr. Başak YÜCE DURSUN’a, antimikrobiyal aktivite çalışmalarım sırasında büyük bir özveri ile testlerime yardımcı olan Prof. Dr. Meral BİRBİR ve Arş. Gör. Pınar ÇAĞLAYAN’a

Bölümün olanaklarını bana açan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ali Rıza ÖZKAYA’ya

Tüm eğitim ve özel yaşantım boyunca bana maddi ve manevi olarak hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok sevgili eşime ve aileme teşekkürü bir borç biliyorum.

Mart 2015

Deka ABDULLAHİ FARAH

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyopolimerler	2
1.1.1 Biyopolimerlerin biyomalzeme olarak kullanımı	3
1.1.2 Lignin	3
1.2 Yaralar.....	5
1.2.2. Yara İyileşme Süreci	6
1.2.3. Yara örtücü ürünler	7
1.3. Antimikrobiyal peptidler	9
1.3.1. AMP’lerin doğal dağılımı ve aktiviteleri	10
1.3.2 AMP’lerin antiviral aktivitesi	13
1.3.3 AMP’nin immobilizasyon yöntemleri.....	14
1.4. LL-37 Peptidi	15
1.5. İmmobilizasyonda matriks (taşıyıcı destek) materyalleri.....	17

1.5.1. İmmobilizasyon yöntemleri.....	18
1.6. ELISA	20
1.6.1. Sandviç ELISA metodu.....	21
1.6. İlgili Literatür Işığı Altında Çalışmanın Yeri.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM	24
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.2. Araştırma Araçları.....	25
2.3.Deneysel Yöntemler	26
2.3.1. Biyobozunur filmin hazırlanması.....	26
2.3.2. PAA/ Polikaprolakton triol'un aktivasyonu	26
2.3.3 Polimerik desteğin karakterizasyonu	27
2.3.4. Polimerik desteğe LL-37 Peptidinin immobilizasyonu.....	27
2.3.5. Polimerik destekteki ilaç miktarı ve bağlanma yüzdesi	27
2.3.6. ELISA metoduna göre LL-37 peptidinin tayini	27
2.3.7. Standart grafiğin hazırlanması	29
2.3.8. Antimikrobiyal aktivitenin tayini	30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
3.1. Polimerik Desteğin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	31
3.2. İmmobilize Olan LL-37 Miktarının Hesaplanması.....	32
3.3. İmmobilize LL-37'nin antimikrobiyal aktivitesi	33
4. SONUÇLAR.....	36
KAYNAKLAR.....	37

ÖZET

LL-37 Peptidinin Lignin Kaprolakton Polimerine İmmobilizasyonu ve Antimikrobiyal Özelliğinin İncelenmesi

Yara tedavisi ciddi bir sağlık problemidir ve sağlığa ayrılan kaynakların büyük bir kısmı yara tedavisine aktarılmaktadır. Alışlagelmiş yara tedavi edici ürünler ve antibiyotikler, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar ile enfekte olmuş kronik ülserleşmiş yaralara ve diyabetik ayak yaralarına karşı çok etkin değildir. Biyopolimerler, sentetik polimerlere göre daha etkili şekilde yara iyileşmesini hızlandırırlar. Biyopolimerlerin yapı düzenlenmeleri normal bir cildin yapısına benzer olduğundan biyopolimerler biyouyumlulukları, biyobozunurlukları, yara iyileştirici özelliklerinin yanı sıra kolay uygulanabildikleri için ideal materyaller olarak tanımlanırlar. Bu özelliklerden dolayı geçtiğimiz yıllarda biyopolimerlerin tedavi başarısını arttırdığı için yara örtücü olarak kullanımları doku mühendisliğinde ve biyoteknolojide öncelik kazanmıştır.

Proteaz inhibitörü veya antimikrobiyal maddeler içeren yara iyileştirici özelliğe sahip yeni biyopolimerlerin geliştirilmesine gereksinim vardır. LL-37 insan cildinde bulunan, bakterilere, mantarlara ve viral patojenlere karşı geniş spektrum sergileyen önemli bir antimikrobiyal peptiddir. Çalışmamızda yeni bir yara örtücü geliştirmek üzere lignin gibi doğada yaygın olarak bulunan bir biyopolimeri, kaprolakton ve poliakrilik asit ile plastikleştirerek film tabakaları hazırlanmış ve hazırlanan bu filmler aktifleştirilerek LL-37 peptidi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Daha sonra bu filmler karakterize edilmiş ve filme bağlanan peptid miktarı ELISA kiti kullanılarak tespit edilmiştir. LL-37'nin %97 gibi bir oranda polimere immobilize olduğu saptanmıştır. Filmlerden uygun miktarlarda alınan örnekler ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kantitatif olarak antimikrobiyal aktivite tayin metodu kullanılmıştır. Deneylerden elde ettiğimiz sonuçlara göre LL-37 immobilize edilmiş filmlerin test bakterileri Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram-negatif *Escherichia coli* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Mart 2015

Deka Abdullahi Farah

ABSTRACT

Covalent Immobilization of LL-37 onto Caprolactone based polymer and investigation of its antimicrobial activities

Wound healing is a serious health problem, and the management of chronic wounds places an enormous drain on healthcare resources. Conventional healing products and antibiotics are not very effective for chronic ulcerative lesions and diabetic foot wounds infected with antibiotic-resistant organisms. Biopolymers are more effective as a wound-healing accelerator than synthetic polymers. Because structural arrangement of biopolymers is similar to that of normal skin, biopolymers are easily applied and considered ideal materials for their biocompatibility, biodegradability, and wound healing properties. A lesion treated with biopolymers shows accelerated healing. Therefore, in recent years the use of biopolymers has gained priority in tissue engineering and biotechnology, both as dressing material and for enhancing treatment efficiency.

There is a demand for new biopolymers designed with protease inhibitors and antimicrobials. LL-37 is an important antimicrobial peptide in human skin and exhibits a broad spectrum of antimicrobial activity against bacteria, fungi, and viral pathogens. Using lignin which is an abundant carbohydrate polymer in nature and a polyacrylic acid, we prepared a polymer film by plastifying caprolactone and polyacrylic acid. Films were actified to immobilize LL-37. The structure was elucidated in terms of its functional groups by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and the morphology of the film was characterized by scanning electron microscopy (SEM) before and after the immobilization process. The amount of LL-37 immobilized was determined by ELISA method. Ninety seven per cent of LL-37 peptide was succesfully immobilized onto the films. Antimicrobial activity was determined in the film samples by quantitative antimicrobial activity method. According to the results, LL-37 immobilized film samples were effective on test organisms such as Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli*.

March 2015

Deka Abdullahi Farah

SEMBOLLER

%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
Å	: Angström
β	: Beta
γ	: Gama
g	: Gram
m	: Metre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
μM	: Mikromolar

KISALTMALAR

PBS	: poli bütlen süksinat
PHB	: poli hidroksi bütirat)
PCL	: polikaprolakton
PLA	: polilaktik asit
AMP	: Antimikrobiyal peptit
HSV	: Herpes simpleks virüsüne
PEG	: polietilenglikol
LPS	: Lipopolisakkaritler
LTA	:Lipoteikoik asidi
CDI	: Karbonildiimidazol
TEOS	:Tetraetoksisilan
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Enfrared Spektroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskop

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1.	Ligninde bulunan fenolik bileşikler	4
Şekil 1.2	2013 yılına ait yara bakım ürünleri pazarı	5
Şekil 1.3	fiziksel yara	6
Şekil 1.4	Katyonik anti-viral peptidler etki mekanizmaları	14
Şekil 1.5	LL37 / hCAP18 gen şematik yapısı ve LL37 peptide işlemesi	16
Şekil 1.6	İnsan cathelicidin LL-37 Protein yapısı	17
Şekil 1.7	a. Fiziksel Adsorpsiyon b. Kovalent Bağlanma	20
Şekil 1.8	Hapsetme Yöntemi	20
Şekil 1.9	Çapraz Bağlama ile Tutuklama	20
Şekil 1.10	Sandviç ELISA	22
Şekil 2.1	Kullanılan ELISA protokolünün akış şeması	29
Şekil 3.1	a) PAA/Polikaprolakton triol polimeri b) LL-37 immobilize edilmiş polimer	31
Şekil 3.2	İmmobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) PAA/ Polikaprolakton triol polimerinin SEM görüntüsü	32
Şekil 3.3	LL-37 standart grafiği	34

TABLO LİSTESİ

Table 1.1	Biyopolimerlerin sınıflandırılması	3
Table 1.2	Yara örtücü çeşitleri	8
Table 2.1	Film formülasyonu hazırlanması	26
Table 3.1	İmmobilizasyon Öncesi ve Sonrası LL-37 Miktarları	33
Tablo 3.2.	LL-37'nin Gram-pozitif Staphylococcus aureus ATCC 29213 ve Gram-negatif Escherichia coli ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisi	36

1. GİRİŞ

Biyopolimerler canlı organizmalar tarafından üretilen polimerlerdir. Selüloz, nişasta, kitin, proteinler, peptidler, DNA ve RNA gibi makro moleküller biyopolimerlere örnek olarak gösterilebilir. Sayılan bu biyopolimerler sırasıyla şeker, amino asit ve nükleotid adı verilen monomerlerden oluşmaktadır (Mohanty ve ark., 2005). Doğada bozunabildikleri için çevreyi daha az kirletmekte, atık sorununu azalttığı için tercih edilmektedirler. Son yıllarda nişasta ve türevleri, poli(bütillen süksinat) (PBS), poli(hidroksi bütirat) (PHB), polikaprolakton (PCL) ve polilaktik asit (PLA) gibi alifatik polimerler tıp uygulamalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Malzeme mühendisliğindeki ilerlemeler ve gelişen cerrahi teknikler ile yapay damar, yapay kalp kapakçıkları ve yapay kalça kemiklerinin ve yara örtücülerin üretilmesinde biyomalzemelerden oldukça yararlanılmağa başlanmıştır (Flieger ve ark.,2003- Chereddy ve ark., 2014).

Yara tedavisi ve yaranın tıbbi komplikasyonları gününüzde ciddi bir problemdir ve sağlık harcamalarında önemli bir kalemdir. Ciddi klinik durumlarda yaralar kronikleşir ve iyileşmeyen yaralara dönüşebilir, hastaneye yatan hastaların yaklaşık %10'u yara tedavisi gören hastalardır. Dünyada yıllık yara iyileştirici ürünlerin pazarı 2012-2021 yılları için 18.5 milyar \$ olarak bildirilmektedir (<http://blog.mediligence.com>). Kullanılan yara tedavi edici ürünler özellikle de antibiyotikler mikroorganizmaların direnç geliştirmesinden dolayı kronik ve ülserleşmiş yaralara karşı çok etkin değildir. Bilindiği gibi kronikleşmiş yaraların özellikle ülserleşmiş venöz, arteryal ve diyabet yaralarının iyileştirilmesi oldukça zordur. Bu yaraların iyileştirilmesi için ciddi sağlık harcamaları yapılmaktadır. Yara örtücü olarak biyo-polimerlerin kullanılmasıyla yara tedavileri daha kolay hale gelmeye başlamıştır. Proteaz inhibitörü ve/veya antimikrobiyal maddeler içeren yara iyileştirici özelliğe sahip yeni biyo-polimerlerin geliştirilmesine gereksinim vardır (Fernandes ve ark., 2013).

Çalışmamızda yeni bir yara örtücü geliştirmek üzere lignin gibi doğada yaygın olarak bulunan bir biyopolimeri, kaprolakton ve sorbitol ile plastikleşerek film tabakaları hazırlanmış ve hazırlanan bu lignin filmleri karakterize edilmiştir. Hazırlanan bu polimere antimikrobiyal peptit (AMP) olan LL-37 kovalent olarak immobilize edilmiş ve LL-37 nin polimere ne kadar bağlandığı ve immobilize olan peptidin antimikrobiyal aktivitesi test bakterilerine karşı incelenmiştir.

1.1. Biyopolimerler

Biyopolimerler canlı organizmalar tarafından üretilen polimerlerdir. Selüloz, nişasta, kitin, proteinler, peptidler, DNA ve RNA biyopolimerlere örnek olarak gösterilebilir. Sayılan bu biyopolimerler sırasıyla şeker, amino asit ve nükleotidlerden oluşmaktadır. Sentetik polimerlerin aksine mantar, alg, bakteri gibi mikroorganizmalarla biyolojik olarak çabuk yıkıma uğrayarak biyokütle, CO₂ ve su ya daha kısa sürede dönüşen, biyoyoumlu ve yenilenebilir özelliktedirler (Mohanty ve ark., 2005).

Biyopolimerler 4 kategoriye ayrılabilirler.

1. Nişasta, selüloz ve lignin gibi agro- polimer kaynaklı biyokütle ürünleri.
2. Polihidroksi alkonat gibi mikrobiyal olarak ele geçen polimerler.
3. Polilaktik asit gibi, tarımsal kaynaklı monomerlerden kimyasal olarak elde edilen polimerler.
4. Polikaprolakton gibi monomerleri ve polimerleri kimyasal sentez sonucu elde edilen polimerler.

Yukarıda sayılan bu polimerlerden sadece üç tanesi yenilenebilen kaynaklardan elde edilir. Doğada bozunabildikleri için çevreyi daha az kirletmekte ve atık sorununu azalttığı için tercih edilmektedir (Cascone ve ark., 2001-Flieger ve ark., 2003).

Tablo 1.1 Biyopolimerlerin sınıflandırılması (Çalgeriş ve ark., 2010).

BİYOPARÇALANIR POLİMERLER				
Biyokütle ürünleri (tarım kaynaklı agro-polymer)		Mikroorganizmalardan (Ekstraksiyon ile)	Biyoteknolojiden (biyo-türevli monomerlerden	petrokimyasal ürünler (sentetik monomerlerden
polisakkaritler	protein ve lipitler	polihidroksi alkonat (PHA)	polilaktid	polikaprolakton (PCL)
nişasta : buğday, patates , mısır	hayvansal: kazein , gelatin, peynir altı suyu			poliesteramid (PEA)
ligno-selülozik ürünler ağaç ve saman türü bitkiler	bitkilerde : soya , gluten , zein	polihidroksi bütirat (PHB)	polilaktik asit (PLA)	alifatik co-polyester örnek : PBSA
diğerleri : pektin , kitin , reçine				aromatik co-polyester örne c: PBAT

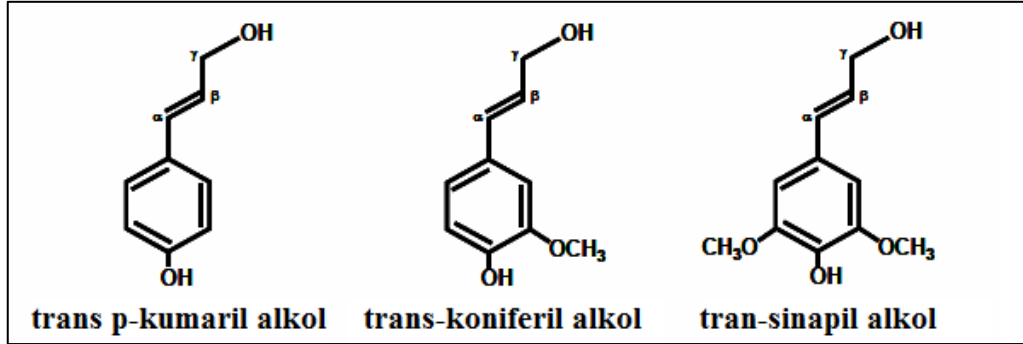
1.1.1 Biyopolimerlerin biyomalzeme olarak kullanımı

Biyo malzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla temas ederler. (Gümüşderelioğlu ve ark., 2002). Biyo uyumlu olan malzemeler biyomalzeme olarak adlandırılmış ve biyo uyumluluk, uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır. (Gupta ve ark., 2007).

1.1.2 Lignin

Bir biyopolimer olan lignin, bitki hücre duvarının bir parçasıdır, selülozdan sonra dünyada en yaygın bulunan ikinci polimerdir. Diğer hücre duvarı polimerlerinden farkı şeker içermeyip polifenolik gruplar içermesidir (Boerjan ve ark., 2003). Odunun mekanik özelliklerini büyük ölçüde amorf bir polimer olan lignin belirlemektedir. Lignin odunun kuru ağırlığının yaklaşık % 20-30'unu meydana getirir. Kimyasal bakımdan polifenolik olan bu madde odun hücrelerini birbirinden ayıran orta lamelde ve ayrıca sekonder çeperde yer alır. (Northey ve ark., 1992).

Bu nitelendirmeye göre lignin polimerik bir doğa ürünü olup üç *p*-hidroksitarçın asitin enzimatik dehidrasyonu ile oluşmaktadır. Bu öncüller; trans-koniferil alkol, transinapil alkol, trans *p*-kumaril alkoldür.



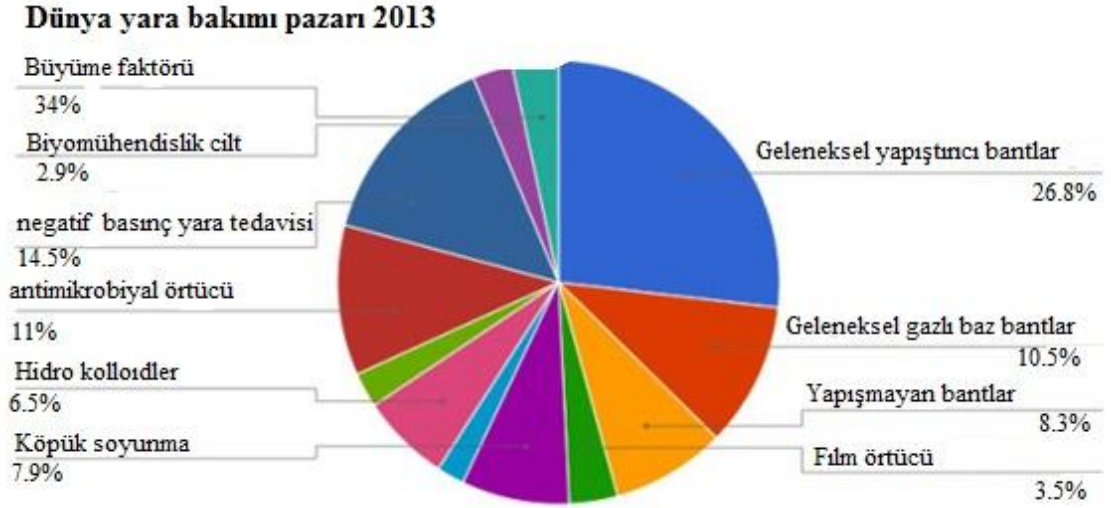
Şekil 1.1. Ligninde bulunan fenolik bileşikler (Calgaris ve ark., 2010).

Hücre çeperinde lignin daima hemiselülozla birlik içindedir. Bu birlik hem fiziksel hem de kovalent bağların olduğu kimyasal bir bağlılıktır. Birçok lignin esterleşmiş durumda aromatik karboksilli asitleri içermektedir (Lapierrea ve ark., 2001).

Lignin ucuz, yenilenebilir, çözünebilir ve zehirsiz olduğu için biyo-çözünür malzemelerin hazırlanmasında dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Lignin alifatik polyesterlere örneğin; polikaprolakton ve polilaktik aside dolgu olarak katılmakta ve polimerin direncini arttırmaktadır (Dongkuan ve ark., 2011). Alkali lignin selülozdan kuvvetli alkali ile uzun süre kaynatılarak ayrılmaktadır (Vengal ve ark., 2005). Alkali lignin yapay kemik ve doku mühendisliğinde kullanımı ile ilgili yayınlarda ligninin başarılı bir şekilde yara örtücü jellerde kullanıldığı görülmektedir. (Fernandes ve ark., 2013). Selülozla ilgili olarak biyomedikal alanda çok çalışma bulunmasına karşın lignin ile ilgili çok çalışmaya rastlanmamaktadır.

Selüloz bazlı materyallere göre ligninin biyomedikal alanda önemi tam olarak ortaya konulamamıştır. Yenilenebilir kaynaklarda çok yaygın olarak bulunmasından dolayı son yıllarda lignin üzerinde araştırmalar artmıştır. Bir çok kimyasal modifikasyonları yapılmış olmasına rağmen; (Keaveny ve ark., 2003-Heanch ve ark., 2003-Hofmann ve ark., 2008-Bessa ve ark., 2008-Shankar ve ark., 2012). çok azı biyomedikal alanda uygulanmıştır. Yapılan az sayıdaki çalışmalar kemik ve kırık protezlerinde uygulanabilirliği ile ilgilidir. Kraft lignin hidroksi apetit ve beta-trikalsiyum ile güçlendirildiğinde kemik dokusu mühendisliğinde kullanılabilecek kompozit yapıları elde

edilir (Mansur ve ark., 2005). Oluşan bu kompozit 900°C de sinterlendiğinde 50 ila 100 µm büyüklüğünde gözenekler oluşmuştur. Bu gözeneklerin lignin katılmasıyla oluştuğu saptanmıştır. İletken polimerler ile ligninin oluşturduğu polimerlerin antioksidan özellikte olduğu ve yara çevresindeki dokularda oksidatif baskıyı hafiflettiği saptanmıştır. Lignin hidrojellere katıldığında hidrojellerin termal kararlılığı, biyo-uyumluluğu ve biyobozunurluğu artar (Raschip ve ark., 2011). Tıpkı hemiselüloz gibi lignin bazlı moleküller yarı-nüfus eden ağılı hidrojellerde de kullanılabilir. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada farklı tiplerde lignin kullanılarak ksantum gum veya polietilen glikol diglisidil eter ile güçlendirilip epiklorhidrin ile çapraz bağlanarak sulu ortamda şişebilen süper emici hidrojeller yapılmıştır (Lix ve ark., 2010). Lignin kimyasal olarak modifikasyona uğratılıp her geçen gün yeni polimer karışımları yapılmaktadır.



Şekil 1.2. 2013 yılına ait yara bakım ürünleri pazarı (Lix ve ark., 2010)

1.2 Yaralar

Yaralar fiziksel veya aşırı ısı nedeniyle veya tıbbi ve fizyolojik şartlardan ötürü deride oluşan kesikler veya hasarlardır. Deride meydana gelen fiziksel hasardan dolayı yara alanı oldukça rahatsız edicidir ve normal vücut işlevleri aksayabilir. Dokuda oluşan hasarın, kaybın veya doku devamlılığındaki bozukluğun onarılması organizmanın en önemli işlevlerinden biridir (Boateng ve ark., 2008).



Şekil 1.3. Fiziksel bir yara (Waren ve ark., 2010)

1.2.1. Yaraların Sınıflandırılması

Yaraları sınıflandırmak için farklı kriterler kullanılır. Örneğin doku tabakalarına göre ve etkilenen deri alanına göre yaralar yüzeysel, orta kalınlıkta veya kalın olmak üzere sınıflandırılabilir. Yüzeysel yaralar sadece epidermis, orta kalınlıkta olanlar daha derin deri tabakalarını, kalın yaralar ise kan damarları, ter bezleri ve saç foliküllerini de kapsayan daha derin deri tabakalarını etkiler. Subkutan yağ veya daha derin dokuları etkileyen yaralanmalara kalın yaralar olarak adlandırılır. Diğer bir saflaştırma kriteri de iyileşme süreci ile yapılan bir sınıflandırmadır (Bolton ve ark., 1990- Krasner ve ark., 1993). Bu sınıflandırmaya göre, yaralar görünümüne göre de sınıflandırılabilirler. Nekrotik yaralar (dehidrasyondan ve hücre ölümünden ötürü siyah renkli yaralar), kabuklu yaralar (ince sarı veya gri renkli bir doku tarafından sarmalanmıştır), granüllü yaralar (koyu pembe veya kırmızı görünümlüdürler) ve tekrar epitelleşen yaralar (yüzeyde olan iyileşme sürecinin sonunda ortaya çıkan yaralar) (Moore ve ark.,2006).

1.2.2. Yara İyileşme Süreci

Normal bir doku yaralanmasında iyileşme; belirli bir süreyi kapsayan anatomik ve fonksiyonel bütünlüğün geri kazanılmasına yönelik sıralı olayların yer aldığı bir süreçtir. Normal iyileşme süreci art arda gelen pek çok hücre türünün birbirleri ile etkileştiği, çözünür faktörlerin ve hücre bileşenlerinin yer aldığı olaylar dizisidir (Abdelrahman ve ark., 2011-Schultz ve ark., 2000). Bu süreç hipostaz, enflasyon, göç etme, proliferasyon ve olgunlaşma olmak üzere 5 basamağa ayrılmıştır.

Hemostas: Kanama olduğuunda gerçekleşir. Pıhtılaşma faktörleri ile başlatılır, koagulasyon sonucu ortaya çıkan salgılar kuruyan bir pıhtı oluşturur ve bu pıhtı da hasar grmuş dokulara mekanik destek sağlar. Enflamasyon fazında yara bölgesine lökositleri, monositleri ve daha sonra da makrofajları takiben enflamasyon hücreleri de girerler.

G etme: Epitel hücreler ve fibroblastlar hasar grmuş veya kaybedilmiş dokuların yerini alırlar.

Proliferasyon: Bu fazda ise yaralar, açık yaraların yüzeyinde beliren hücreler tarafından yavaş yavaş doldurulurlar. Yeni deri dokusu açık yara bölgesini kaplar. Bu yeni hücreler granülasyon hücreleri olarak adlandırılırlar ve oldukça narindirler.

Olgunlaşma: En sonununcu fazdır aynı zamanda tekrar şekil alma fazı olarak da adlandırılır. Bu fazda hücresel yeni bağ dokusu oluşur ve yeni epitel kuvvetlendirilir (Schultz ve ark.,2000).

1.2.3. Yara rtc rnler

1.2.3.1 Yara rtclerin fonksiyonları

Yara örtücünün asıl görevi iyileştirmeye yardımcı olmak ve iyileştirme sürecini hızlandırmaktır. Hayati nemi olan sıvıların kaybını önlerler, kan, serum ve cerrahi akıntıların toplanmasını dolayısı ile de bakterilerin büyümesini ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonu da önlerler. Bazı durumlarda yara örtücülerin asıl görevi semptomların kontrolüne yardımcı olmak ve estetiği sağlamaktır. (Bolton ve ark.,1990). Geçmişte, bandajlar, pamuk, yn, pamuklu bez, gazlı bez v.b gibi geleneksel yara rtcler yarayı kuru tutmak ve akıntıların buharlaşmasını sağlamak ve mikroorganizmaların girmesini önlemek için kullanılırlardı. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda hafif nemli yara ortamlarında iyileşmenin daha çabuk olduğu saptandı. Aulton'a göre yara rtcler lökositlerin yara bölgesine g etmesine engel olmamalı, nemli bir yara çevresi oluşturmalı, kan ve yara akıntılarını ortamdaki uzaklaştırmalı ve gaz geçişini (su buharı ve hava) arttırmalıdır (Aulton ve ark., 2007). Termal bir inslasyon oluşturmalı, enfeksiyonu önlemeli ve yarayı çarpmalardan korumalıdır. Tüm bu özellikler tek bir yara örtücü tarafından karşılanamaz. Pek çok durumda farklı yara iyileşme fazlarında değişik özellikte olan yara rtcler kullanılır. Örneğin gazlı bez yaranın ilk evrelerinde kan ve akıntıları çekmek için işe yararken diğer yara rtcler farklı yara

iyileşme evrelerde etkindirler. Nemli ortam oluşturarak kurumayı durdurarak hücre ölümünü önlerler, epidermal göçü artırır, anjiyojenesis ve bağ dokusu sentezini arttırırlar.

1.2.3.2. Yara Örtücülerin Sınıflandırılması

Yara örtücülerin sınıflandırılması ile ilgili olarak literatürde birçok sınıflandırma vardır. Yara örtücüleri yara üzerindeki fonksiyonlarına göre; ölü dokuyu sökücü, antibakteriyel, örtücü, emici ve yapıştırıcı olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırmışlardır. Purna ve ark. ise yara örtücüleri fonksiyonlarına göre sınıflandırmışlardır merhem, film, köpük ve jel olmak üzere gruplandırmışlardır (Purna ve ark.,2000). Queen ve ark. ise yapımlarında kullanılan materyallere göre hidrokolloid, aljinat ve kollagen olmak üzere sınıflandırmışlardır (Queen ve ark., 2004). Araştırmacılar tarafından yapılan sınıflandırma Tablo 1.2 de gösterilmiştir (Abdelrahman ve ark., 2011- Falabella ve ark., 2006).

Tablo 1.2. Yara örtücü çeşitleri (Abdelrahman ve ark., 2011).

Örtücü tipi	Örnek
Yarı geçirgen film örtücü	Tutunma tabakası ile kaplanmış poliüretan tip film
Yapışmayan yüzeyi olan örtücü	Yara üzerine doğrudan uygulanarak, ikinci örtücü veya yara pedi arasında ara yüzey oluştururlar
Hidrokolloid örtücüler	Karboksimetil selüloz, jelatin, pektin gibi maddeler hidrokolloid bazı oluşturlar ve daha sonra poli uretan film veya köpük içersine hapsolunerler
Aljinat örtücüler	bir deniz oysunundan üretilen kalsiyum veya sodyum aljinat içerirler, yara içeriği ile karşılaştığında hidrofilik bir jel oluştutrlar.
Hidrofiber örtücüler	Sodyum karboksi metil selüloz içerirler. tekstil fiberleri ile birlikte
Köpük örtücüler	Poliureten veya siliikonden yapılırlar. Çok miktarda yara sıvısı tütabililer.

Hidrojel örtücüler	Su miktarı fazla olan çözünmeyen polimerlerdir. Nekroz ve yara sıvısı artıklarının giderilmesinde idealdirler.
Antimikrobiyal örtücüler	Yarada bulunan mikroorganizmaların büyümesini en az indirirler
Proteaz düzenleyici matriks	Liyofilze, oksitlenmiş, rejenere selüloz ve sığır kollajeni içerir

1.2.3.3 Yara örtücülerin yapımında kullanılan materyaller

Bandajlar gibi klasik yara örtücüler pamuklu, yün ve selüloz gibi doğal maddelerden veya sentetik maddelerden yapılırlar. Örneğin gazlı bezler dokunmuş veya dokunmamış koton iplik veya rayon polyesterden yapılmışlardır. Daha modern örtücüler ise hidrokolloidlerden, hidrojellerden, köpüklerden ve biyolojik materyallerden yapılır. Hidrokolloid örtücüler jel oluşturuşu ajanlardır örneğin karboksimetil selüloz (CMC), jelatin ve pektindir. İnce filmler veya tabakalar olarak hazırlanırlar. Ticari olarak piyasada satılan bir çok hidrokolloid örtücüler bulunmaktadır. Hidrojel örtücüler genellikle sentetik polimerlerden örneğin polimetakrilatlar ve polivinil piroolidinlerden yapılırlar. Hidrojeller amorf jel veya katı jel olarak uygulanırlar. Bu jeller yaklaşık % 70-90 gibi yüksek oranda su içerirler ve bundan dolayı da çok fazla yara akıntısı ememezler. Bazı hidrojeller, aljinat, kollagen veya nişasta kopolimerleri içerir ve bir kısım yara akıntısını emebilirler. Köpük örtücüler genellikle poliüretan köpük veya poliüretan filminden yapılır. Bu örtücüler, yaranın etrafında nemli bir ortam sağlarlar, termal yalıtım oluştururlar ve giyilebilmeye elverişlidirler. Biyolojik temelli örtücüler yara iyileşme sürecinde aktif rol oynayan biyomateryallerden yapılırlar. Bunlar doğal dokulardan veya nişasta, çitosan, kollagen, hiyaluronik asit ve aljinatlar gibi yapay kaynaklardan üretilen doku mühendisliği ürünleridir (Torres ve ark., 2013).

1.3. Antimikrobiyal peptidler

Pek çok organizma ilk savunma mekanizmalarının bir parçası olarak AMP'leri sentezler. Antimikrobiyal peptidler oldukça kısa (12-100 amino asit) ve pozitif yüklüdürler. Günümüze kadar yüzlerce bu tip peptidten tanımlanmış olması bu peptidlerin doğal savunma sisteminde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu

peptidlerin ifade edilmesi kendiliğinden olabildiği gibi enfeksiyon veya enflamasyon öncesi sitokinler, bakteriler veya doğal bağışıklığı uyaran liposakkaritler gibi bakteriden kaynaklanan moleküllerle de enflamasyon uyarısı olabilir (Cunliffe ve ark., 2004- Hancock ve ark., 2001). Bu peptidlerin bazıları güçlü antimikrobiyal ajanlardır, antimikrobiyal etki göstermeyenlerin antimikrobiyal etkisi seyreltilmiş ortamlarda oldukça belirgin olmasına rağmen mikrop öldürme etkileri tek değerlikli veya çift değerlikli katyonların konsantrasyonlarından, proteazların etkilerinden ve çok değerlikli anyonlardan örneğin heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlardan ve düşük lokal peptid konsantrasyonlarından etkilenir. Bu peptidler doğal bağışıklığın önemli efektör molekülleri olup (Bowdish ve ark., 2005- Brown ve ark., 2006) fagositozu arttırırlar, prostoglandin salınımını uyarırlar, LPS lerin septik etkilerini nötralize ederler, bağışıklık hücrelerinin enflamasyon alanında toplanmasını sağlarlar (Elsbach ve ark., 2003- Yang ve ark., 2002) ve anjiyojenezi uyarırlar ve yara iyileşme sürecini başlatırlar.

Memeli kaynaklı peptidler monositler ve T lenfositleri (Territo ve ark.,1989) kemotaktik olarak uyarırlar ve immün cevabın oluşmasında aktif rol oynarlar. Adjuvan ve polarlaştırıcı etki göstererek dendritik hücre gelişimini sağlarlar (Davidson ve ark., 2004). Bu peptidler bakteri, virüs veya mantarların membranlarını veya diğer hedefleri doğal yapılarını bozarak veya kararsız hale getirerek doğrudan etki göstermekle kalmayıp, doğal bağışıklığın ve enflamasyon cevabının düzenlenmesini de sağlarlar (Hancock ve ark., 2000). Bu yüzden AMP ler için savunma peptidleri terimi daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin bakteriyelit etki gösteren “defensin” olarak adlandırılan savunma peptidleri nötrofil granüllerinde mg/ml düzeyinde gibi yüksek derişimde bulunmakta ve muhtemelen immün düzenleyici olarak görev almaktadırlar. Benzer genel fiziksel özellikler göstermelerine rağmen, katyonik peptidlerin amino asit dizilimleri çok az birbirine benzerdir ve ikincil yapıları birbirlerinden farklıdır. 4 tip ikincil yapıları vardır, bunlar sırası ile iki veya dört β -tabakalı, amfipatik (hem hidrofilik ve hem de hidrofilik yapıların bir arada olması) sarmallı, çember ve uzamış yapılar olarak adlandırılırlar (Boman ve ark.,1995- Hancock ve ark., 1997).

1.3.1. AMP’lerin doğal dağılımı ve aktiviteleri

AMP’ler her çeşit hayat formunda savunma sisteminde bulunurlar. İlk yayınlanan ve karakterize edilen AMP’ler bakteriyel kaynaklı olanlardır (Mattick ve ark., 1947). Klasik anlamda enfeksiyona karşı korumazlar ancak bakterinin etrafında bulunan ve besin

kaynaklarını tüketen diğer bakterileri öldürerek kendilerinin hayatta kalmasını sağlarlar. Bakteriosin olarak da adlandırılan bakteriyel antimikrobial peptidlerin çoğu bakteriler tarafından sentezlenir (Klaenhammer ve ark.,1988-Riley ve ark.,1998) ve ökaryatlara göre çok daha fazla etkindirler. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir lantionin sınıfı antimikrobiyal peptid olan “nisin” 50 yıldan beri gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır ve bu peptide karşı bakterilerde kayda değer bir direnç gelişmemiştir. Nanomolar düzeyde bile gram-pozitif bakterilere karşı çok etkin antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Bitkilerde AMP’lerin bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı çok etkin bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bu tür peptidleri kodlayan çok sayıda genin bitkilerde bulunması, çok sayıda bitki türlerinin *in vitro* da bakteriyesit ve fungusit etkilerinin gösterilmesi ve bir patojen verildiğinde gen seviyesinde peptidlerin ifade edilmelerinin artması bu görüşü doğrulayan bulgulardır. Bitkilerde bulunan bu peptidler **tioninler** ve **defensinler** olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Tioninin fizyolojik olarak yeterli konsantrasyonlarının bakteri ve mantarlara karşı etkin olduğu ve transjenik bitkilere katıldığında bakterilere karşı savunma gücü verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Carmona ve ark., 1993- Eppe ve ark., 1997).

Omurgasızlar, omurgalılarda bulunan adapte olmuş doğal bağışıklık sistemine sahip değildirler sadece doğal savunma sistemleri ile patojenlere karşı koyarlar. Omurgasızlarda çok sayıda peptid tanımlanmış ve patojenik organizmalardan korunmada anahtar rol oynadıkları saptanmıştır. Örneğin yengeç, midye ve karidesin hemositlerinde peptidlerin varlıkları gösterilmiştir ve AMP’lerin bu canlıların doğal bağışıklık sisteminin çok önemli bir parçası oldukları anlaşılmıştır (Bachere ve ark., 2004-Iwanaga ve ark., 1998). Sirke sineği *Drosophila melanogaste* üzerinde yapılan yoğun araştırmalarda patojen tanıyıcı reseptörlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Memelilerde de böyle bir sistemin evrimsel olarak korunduğu saptanmıştır. Memelilerin, balıklar ve çok sayıda omurgalı türlerin adaptif bir bir bağışıklık sistemine sahip olmalarına rağmen AMP ler izole edilmiştir. Bu peptidler önemli bir savunma mekanizması oluştururlar ve savunma mekanizmasının ilk basamağında yer alırlar. Fagosit hücrelerin granüllerinde veya ince barsaklarda bir hayli yüksek miktarlarda bulunurlar (Bowdish ve ark.,2005- Scott ve ark.,2000-Yang ve ark.,2002). Doğrudan antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra bu küçük katyonik peptidler önemli bağışıklık sistemi düzenleyicisidirler ve enflamasyonun kontrol altına alınmasında görev aldıkları düşünülmektedir (Yang ve ark., 2004).

Antimikrobiyal savunma sisteminde dolaylı ya da dolaysız olarak etkileri ile uyumlu olarak bu peptidler omurgalıların patojenler ile sürekli karşılaştıkları mukozal yüzeyler veya deride olduğu kadar bağışıklık sistemi hücrelerinin granüllerinde bulunurlar. Deride bulunan bezler AMP'lerin yoğun olarak bulunduğu yerlerdir. Yaklaşık 500'e yakın peptidin bu bölgelerden kaynaklandığı bildirilmiştir (www.bbcm.univ.trieste.it/tossic/pag1.).

α -sarmal magaininler (Zasloff ve ark.,1987) gram-pozitif ve gram negatif bakteri, mantar, maya ve virüslerin membranlardan geçişi oldukça yüksek olan amfibiyan prototip peptidleridir. Magaininlerin yapı-fonksiyon ilişkisi ve etki mekanizması detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Bu peptidler denendikleri ilk klinik peptid tedavisinde çok başarısız olmuşlardır (MacDonald ve ark., 1999-Lamb ve ark., 1998). Güney Amerikada bulunan bir kurbağanın derisinden izole edilen “dermaseptinlerin” geniş kapsamlı antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri oldukça detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Amfibiyan AMP'lerinin derinin yanı sıra mide mukoza sıvılarında da yapılmaları mideye emilmiş olan patojenlerden korunmak amaçlı olabilir. En iyi karakterize edilen örnekler Asya Kurbağasından izole edilen, histon 2a'nın kırılması ile oluşan ve oldukça fazla çalışılmış olan “buforin I and buforin II” peptidleridir (Bulet ve ark., 2004-Rinaldi ve ark.,2002-Simmaco ve ark., 1998).

Katelisidinler de omurgalı AMP'lerini oluşturan büyük ve yaygın bir grubu oluştururlar. İyi korunmuş bir N-terminal (cathelin) ile karakterize edilirler N-terminal proteolitik olarak kırılarak olgun ve aktif bir peptidi verir. Katelisidinler çoğunlukla propeptid olarak genellikle dolaşımdaki granüllü bağışıklık hücrelerinde depolanırlar. Nötrofil salgı granülleri katelisidinlerin en önemli kaynağıdır ve herhangi bir enflamasyon olduğunda ağız, akciğer, genital ve idrar yollarında ve deri keratinositlerinde sentezlenirler. İnsan LL-37 (hCAP18) (Fromm ve ark.,1995) si bu gruba dahildir. Ortak N terminallerinin yanı sıra α -sarmal, saç tokası şeklinde, prolin ve arjinince zengin peptidlerdir. Yapısal farklılıklarının yanı sıra geniş bir spektrumu olan mikrop öldürücüdür ve bağışıklık sistemi düzenleyicisidir. Katelisidinler örneğin, fare, tavşan, koyun, at ve insanlar gibi pek çok pek çok memeli türünden izole edilmiştir. Bazı memelilerde örneğin büyük baş hayvanlarda katelisidinlerin birçok türevi bulunur bu da bu peptidlerin savunma sisteminde pek çok rolü olduğunu düşündürmektedir. İneklerde en iyi tanımlanmış peptid, *In vitro* ortamda az miktarlarda bile bakterilere ve mantarlara karşı geniş spektrumu olan katelisidin “BMAP-

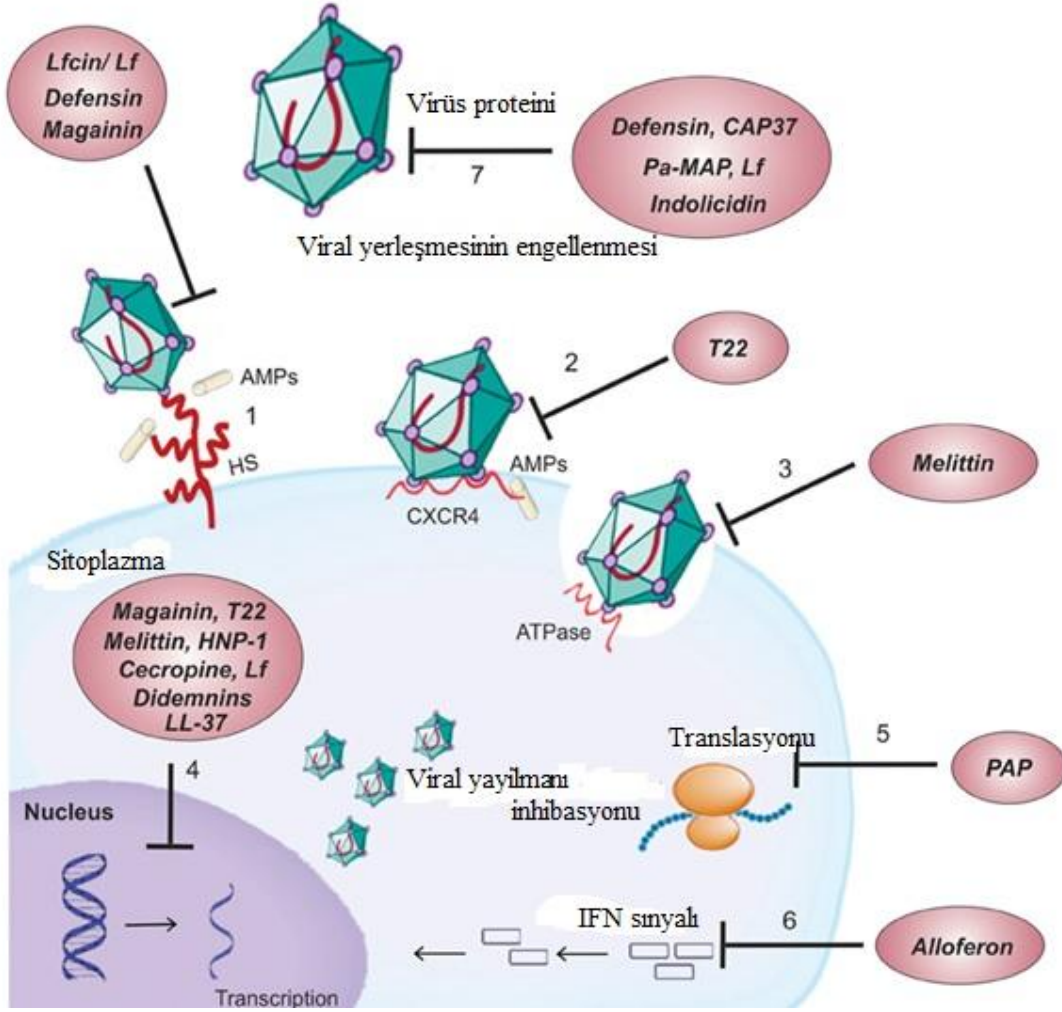
28'' peptididir (Skerlavaj ve ark.,1996). Diğer memelilerde çok farklı çeşitleri olmasına rağmen insanlarda tek bir katelisinin çeşidi olan LL-37 (hCAP18) sentezlenir. Enfeksiyon oluşumunda, erken savunma sisteminin bir parçası olarak gen ifadesi artar

İkinci önemli memeli AMP leri de defensinlerdir (Selsted ve ark., 2005-Ganz ve ark., 2003). Bu peptitler altı adet korumalı sistein kalıntıları arasında disülfid eşleşmeleriyle meydana gelen üç alt aileden oluşan siklik yapılardan oluşmuşlardır. Bu peptidler de tıpkı katelisininler gibi omurgalılarda propeptid olarak sentezlenirler ve aktif olabilmeleri için proteolitik yıkıma uğrarlar. Defensinlerin ekspresyonu bazen çoğu dokuda örneğin defensin-1 (hBD-1) gibi zaten var olabilirler veya hBD-2 de olduğu gibi bakteri veya LPS ile karşılaşıldığında uyarı ile oluşabilirler (Fang ve ark., 2003-Duits ve ark., 2002). Toplu olarak incelendiğinde defensinler bakteri, bazı virüs ve mantarlara karşı zayıf mikrop öldürücüdürler. Vücudun nispeten tuzlu bölgelerinde etkileri azalmakla birlikte fagositik hücrlerin granüllerinde ve barsak tübüllerinde oldukça yüksek miktarlarda bulunması bunların yeterli derecede öldürücü olduğunu göstermektedir.

Transjenik ve knock out farelerde defensinlerin oldukça önemli rolü olduğu bu modellerde gösterilmiştir. Tüm bu defensinlerin aktifleşebilmesi için gerekli proteazı (MMP-7) içermeyen farelerde *E. coli* nin daha yavaş ortadan kaldırıldığı ve *Salmonella enterica* serovar typhimurium' dan dolayı ölümlerin daha fazla olduğunun görülmesi bu peptidlerin barsak bağışıklığında çok önemli bir rol oynadıklarını düşündürmektedir.

1.3.2 AMP'lerin antiviral aktivitesi

Katyonik peptidlerin viral enfeksiyonları da engelleyebildiği gösterilmiştir. Zarfsız adenovirüs dışında zarflı RNA ve DNA virüsleride bu peptidlerden etkilenmektedir. AMP'lerin antiviral etkisi virüslerin tutunma ve vücuda giriş aşamasında etkilidir veya etki virüsün doğrudan zarfına yöneliktir (Bastain ve ark., 2001-Horne ve ark., 2005-Pietrantonio ve ark., 2006). Kekropinler, klavaninler gibi peptidler Herpes simpleks virüsüne (HSV) karşı az etkin iken maganinler, dermaseptin ve melittin oldukça güçlü etki gösterirler. Tabakalı yapıda olan AMP lerin örneğin; defensinlerin, laktoferrisinlerin oldukça güçlü anti viral etkisi olduğu gösterilmiştir. Alt gruplar arasında bile antiviral etkileri değişmektedir. (Andersen ve ark., 2001-Daher ve ark.,1986).



Şekil 1.4. Katyonik anti-viral peptidler etki mekanizmaları (Kelly ve ark., 2013).

1.3.3 AMP'nin immobilizasyon yöntemleri

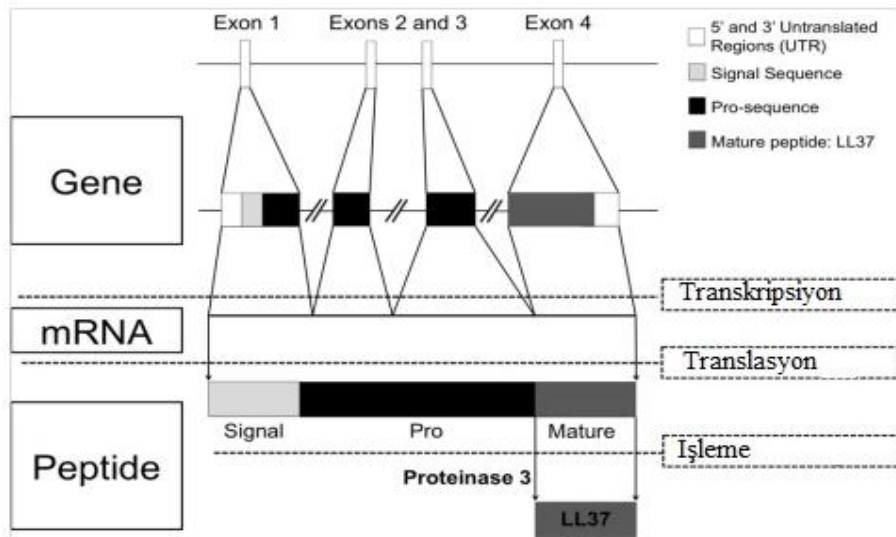
AMP'ler katı desteklere ya fiziksel olarak (örneğin adsorpsiyon veya tabaka tabaka yerleştirme yoluyla) ya da kimyasal olarak (kovalent bağlama ile) immobilize edilirler (Etienne ve ark., 2005-Etienne ve ark.,2004-Shukla ve ark., 2010). Fiziksel adsorpsiyon işlemleri arasında polimerik filmleri katı destek üzerine tabaka tabaka yerleştirme en yaygın olanıdır. AMP'ler iki poli-iyonik polimer arasında sandviçlenmiştir ve polimer tabakalarının sayısı esnektir. Bu özellik peptidin yüksek ve kontrollü miktarda yüklenmesine izin verir. Peptidin tabakalar arasında kalması ve yüzeyde bulunmamasından ötürü yara ile doğrudan teması yoktur ve ortama difüzyon yolu ile salınması bu metodun dezavantajını oluşturur. Ayrıca bakterilerin yüzeyi tıkayarak difüzyona izin vermemesi de metodun önemli diğer bir eksikliğidir. Tüm bu negatif etkenler oluşmamış olsa bile bu katmanların kararlılığının ne kadar olabileceği deneysel olarak gösterilmemiştir. AMP leri

immobilize etmek için sık kullanılan metodlardan biri de polietilenglikol (PEG) gibi fonksiyonel polimer reçineler veya reaktif grupları peptidin immobilizasyonu için yakınında tutan destekler kullanmaktır (Appendini ve ark.,2001). Bakteriler tutunamadığı, bakterilerin kolonileşmesini önlediği veya minimuma indirdiği için PEG en çok kullanılan destektir (Boulmedais ve ark., 2004). PEG gibi esnek polimer kolları, bağlı AMP'lerin implant yüzeylerine hızlı ve serbestçe yerleşmelerini sağlar bu da peptid bakteri etkileşimini arttırır ve implant yüzeyinde bağlanmış olan peptid tabakasının performansı yükselir. PEG'in suyla şişme özelliği ve diğer hidrofilik polimerlerin bağlanmış olan AMP'lerin aktivitesinin korunması açısından önemlidir. PEG gibi polimerik kolların kullanılmasının dezavantajlarından biri de polimerin bozunmasına bağlı olarak zincir kırılması ve bağlanmış olan AMP'lerin açığa çıkmasıdır (Cho ve ark., 2007). Kolun kırılması, içinde polimerin bozunmasını önleyen katkı maddeleri katılmış kararlı polimerler ile en aza indirilir ve böylelikle antimikrobiyal aktivitenin uzun süre korunması sağlanır. AMP'lerin yüzey konsantrasyonu, AMP ile kaplanmış yüzeylerin korunması için çok önemlidir. Bağlanan peptidlerin miktarlarını arttırıldığında bakteri ölümlerinin de arttığı saptanmıştır. Düşük AMP seviyeleri bağlandığında örneğin akrilik asit ile fonksiyon kazandırılmış nikel nanopartiküllerine az miktarda LL-37 bağlandığında antimikrobiyal aktivitenin baskılandığı saptanmıştır (Chen ve ark., 2009-Hilpert ve ark., 2009).

1.4. LL-37 Peptidi

hCAP-18/LL-37 bilinen tek insan katelisiidindir. hCAP-18, LL-37 peptidini oluşturmak için proteinaz 3 tarafından parçalanır. İki lősinden başlayarak 37 amino asit dizisine sahiptir ve LL-37 olarak adlandırılır. Bu peptid, 4.5 kDa ağırlığındadır. Fizyolojik pH'ta, pozitif bir net yüke sahiptir.

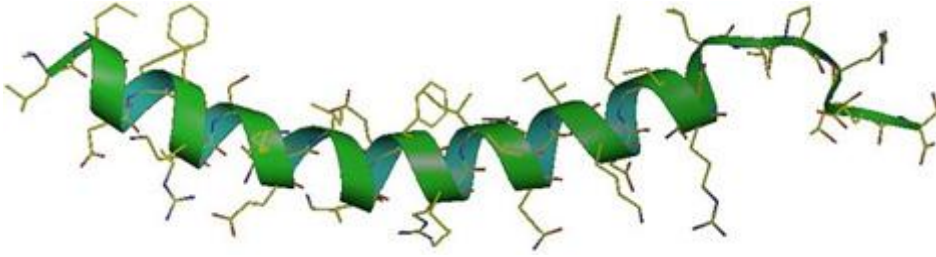
İnsan katelisiidin hCAP18 geni, kromozom 3 'te yer alan 1963 baz çifti içeren bir kompakt genidir ve dört eksondan oluşur. Eksonlar 1 sinyal sekansı ve katelin etki alanı için kod 3 iken, antimikrobiyal peptit için ekson 4 kodlar, Şekil 1.5de gösterildiği gibi. (Gudmundsson GH ve ark., 1996)



Şekil 1.5. LL37 / hCAP18 gen şematik yapısı ve LL-37 peptide işleme (Gudmundsson GH ve ark., 1996).

Katolisidin grubuna ait olan hCAP-18/LL-37 insanlarda tanımlanmış tek katolisidindir ve nötrofiller, monositler, mast hücreleri ve epitel hücreleri tarafından sentezlenir. Bu hücrelerde depolanır ve proteinaz 3 gibi ekstraselüler enzimler tarafından kırılarak LL-37 ve kahelin kısımları oluşur. LL-37 amfipatik, α -sarmal peptittir, hem planktonik ve hem de biyofilmler içerisinde kalan bakterilere, HIV gibi virüslere ve mantarlara karşı etkindir, lipopolisakkaritler (LPS) ve lipoteikoik asidi (LTA) nötralize eder. Mikroorganizmalar da LL-37 nin ifade edilmesini düzenlemektedir (Morimoto M ve ark., 1991). Sinüs epitel hücre kültüründe hem gram pozitif ve hem de gram negatif bakterilerin ürünlerinin LL-37 nin üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Murakami T ve ark., 1991). Barsakta bakteri mikroflorasının ürettiği burirat LL-37 nn üretimini arttırmaktadır LL-37, patojenleri ortadan kaldırarak enfeksiyonlara karşı savunma önemli rol oynamaktadır. Ayrıca IL-37, bir seri hücreler ile kemokin üretimini, sitokinleri kemoçekicilik ile immune efektör hücreleri ve meşensiyel kök hücreleri düzenleyerek doğal ve adaptif bağışıklığa katılır ve vitamin D ile birlikte otofajı düzenleyerek anjiyogenez ve yara iyileşmesini uyarır (Leung T ve ark., 2011). LL-37 sadece bakterileri öldürmekle kalmaz aynı zamanda bakteri enfeksiyonlarında nötrofil apoptozunu baskılar. Nötrofil apoptozunun engellenmesiyle yaşam ömürleri artar ve bakteri istilası sırasında savunmaya yardımcı olurlar (Gilliet M ve ark., 2008). Diyabet hastalarında genellikle ayaklarının alt kısımlarında, biyofilm tabakası oluşturabilecek bakteri jenerasyonları tarafından enfekte edilen ülserleşmiş yaralar oluşur. Bu biyofilm tabakasının giderilmesi hastalarda yaraların iyileştirilmesinde önemli olmaktadır. Yapılan çalışmalar AMPLerin

biyofilm oluşmasını engelleme potansiyeli olduğunu göstermiştir (Nell MJ ve ark., 2004). İnsan katelesidin LL-37 peptidinin pek çok gram pozitif ve gram negatif pataojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ve biyofilm oluşumunu engellediği ve yara iyileştirme özelliği olduğu gösterilmiştir. Topikal olarak uygulandığında biyofilm oluşumunu engelleme ve yara iyileştirmesi özelliklerinin birleşimi, LL-37'yi çoklu mikroorganizmalar tarafından enfekte olmuş yaraların iyileştirilmesinde oldukça etkin hale getirmiştir (Perandio ve ark., 2008).



Şekil 1.6. İnsan katelisin LL-37 Protein yapısı (Hermann Josef ve ark., 2012).

1.5. İmmobilizasyonda matriks (taşıyıcı destek) materyalleri

Taşıyıcı destek materyalinin şekli, yoğunluğu, porlu yapısı, por büyüklüğünün dağılımı, operasyonel kararlılığı immobilizasyonun sonucunu etkiler. İdeal destek materyali ucuz, reaksiyon vermez, fiziksel olarak sağlam ve stabil olmalı ve mikrobiyal çoğalmayı ve spesifik olmayan adsorpsiyonu önleyebilmelidir. Taşıyıcı materyaller başlıca organik ve inorganik olmak üzere iki sınıfa ayrılır:

- Organik taşıyıcı materyaller: polisakkaritler (selüloz, kitin, dekstran), karbon polimerleri, proteinler (kollajen, albümin), vinil ve allil polimerler, polistiren, poliakrilamid, poliakrilat, polimetakrilat poliamidler (kalsiyum aljinat, agar, K-carrageenin)
- İnorganikler: Aktif karbon, bentonit, silika, porlu seramikler, metaller, metal oksitler. Bu materyaller tanecikli, zar ve lifli yapıda olabilir.

1.5.1. İmmobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemleri başlıca bağlama ve tutuklama olarak iki sınıfa ayrılır. Bu iki sınıfta bulunan yöntemler fiziksel veya kimyasal bir özellik gösterir. Bir ligandı immobilize etmenin 4 farklı yolu vardır.

İmmobilizasyon Yöntemleri genel olarak ikiye ayrılır:

1. Bağlama

- Çapraz bağlama
- Enzim kopolimarizasyonu
- Taşıyıcı bağlama
 - ✓ Fiziksel adsorpsiyon
 - ✓ Adsorpsiyon ve çapraz bağlama
 - ✓ İyonik bağlama
 - ✓ Şelat bağlama
 - ✓ Kovalent bağlama
 - ✓ Biyospesifik bağlama

2. Tutuklama

- Jelde tutuklama
- Mikrokapsülleme
- Lipozom tekniği

İmmobilizasyon yöntemleri yukarıdaki gibi çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir fakat genel olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırmak mümkündür.

1. **Kimyasal yöntemler:** Kimyasal immobilizasyon yönteminde suda çözünmeyen polimer ile ligand arasında kovalent bağ oluşumu sağlanır ya da çok sayıda ligand molekülü arasında çapraz bağ oluşumu sağlanır. Kimyasal yöntemlerde serbest ligand geri kazanılmaz. Kimyasal yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

- **Kovalent bağlanma:** Kovalent bağlanma, geri dönüşümsüz bir immobilizasyon metodudur. İmmobilizasyon yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu metodun yaygınlığı bağların karalılığı ile ilişkilidir ve çevreye ligand salınımını önler. Kovalent bağlanma ligand ile destek materyali arasında gerçekleşir. Yöntemin

kullanılabilirliğini belirleyen en önemli faktör ligandın doğrudan destek materyaline bağlanmasıdır. Matrix tipine ve substrata bağlı olarak türetilmiş birçok yol mevcuttur.

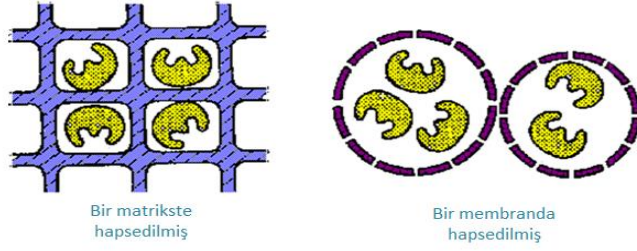
- **Çapraz bağlanma:** Küçük yapıdaki reaktifler herhangi bir katalizöre ya da destek materyaline ihtiyaç duymadan kendi aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen yapılar oluşturabilirler. Bu prensiple gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemine çapraz bağlanma metodu denir. Bağlanmalar molekül içi veya moleküller arası olabilir.

2. Fiziksel yöntemler: Fiziksel yöntemlerde ise ligandın belirli bir yere tutunması sağlanır. Bu fiziksel tutunma gerçekleştirilirken iyonik bağ oluşumu ve elektrostatik denge gibi çeşitli fiziksel etkileşimlerden yararlanılır. Ligandın tutunduğu yerler destek materyalinin içindeki mikro bölmeler veya gözenekli membranlardır. Fiziksel yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

- **Adsorbsiyon ile immobilizasyon:** Bu metot en basit ve en eski olan immobilizasyon metodudur. Bu metotla katı matriks üzerinde ligandın fiziksel adsorbsiyonu veya iyonik bağlanması gerçekleşir. Fiziksel adsorbsiyonu gerçekleştiren kuvvetler, hidrojen bağları Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma kısmında ise ligandın yüklü grupları ile destek materyalinin zıt yükleri arasında bir çekim gerçekleşir.
- **Hapsetme ile immobilizasyon:** Polimer maddelerde ya da yarı geçirgen membranlarda ligandın hapsolması yöntemidir. Ligandın sulu bir polimer çözeltisinde veya monomer çözeltisinde çözülmesi gerekir. Polimerin oluşturulması, UV radyasyonu, gama ışınları veya ısıyla başlatılır. Oluşturulan ve hidrofilik olan polimer içerisinde ligand hapsedildiğinden polimerin yeteri kadar sıkı olması gerekir. Bu metot kullanılarak, bütün hücreler, farklı büyüklükteki mikroorganizmalar ve diğer biyokatalizörler hapsedilebilir (Yener 2007; Malkoç 2011).



Şekil 1.7. a. Fiziksel Adsorpsiyon b. Kovalent Bağlanma



Şekil 1.8. Hapsetme Yöntemi



Şekil 1.9. Çapraz Bağlama ile Tutuklama

1.6. ELISA

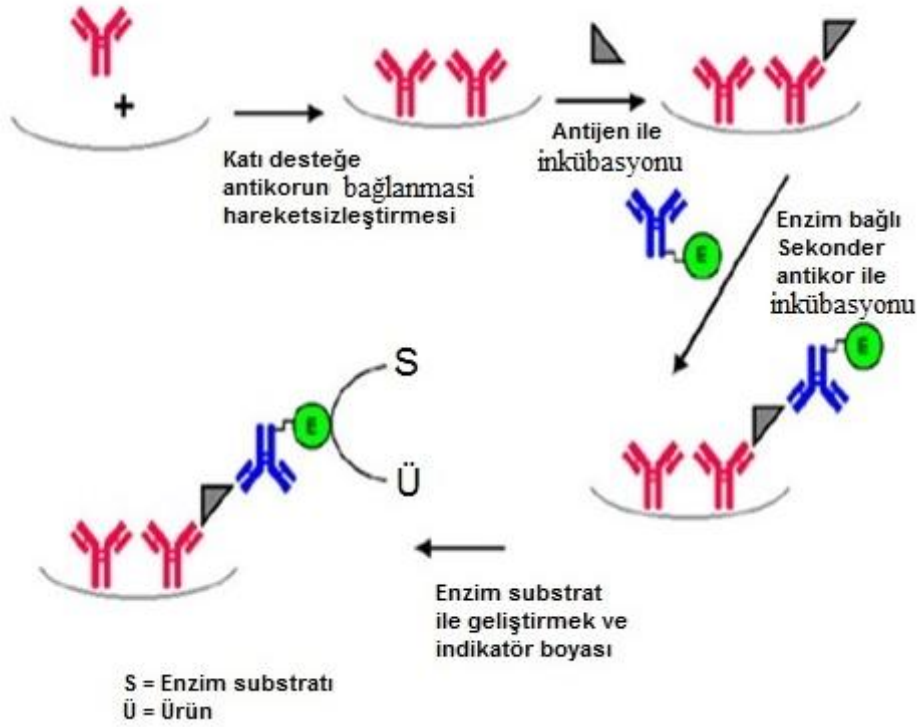
ELISA kompleks bir karışım içerisinde bulunan spesifik bir proteini tanımlamak ve miktarını belirlemek için kullanılan güçlü bir immünolojik yöntemdir. Spesifik antikor kullanarak protein örneklerinin saptanmasını mümkün kılar. ELISA teşhis amaçlı olarak tıpta hastalık belirteçlerini, alerjenleri ve hormon miktarlarını saptamak için yaygın bir

şekilde kullanılmaktadır. İki farklı ELISA yöntemi kullanılır. Birisi antijen belirlerken (Direk ELISA) diğeri ise antikor belirler (İndirek ELISA). Hormon, biyo-marker gibi protein yapılı maddelerin tayini için Direk ELISA metodu kullanılır. Daha önceden spesifik antikor ile kaplanmış mikro kuyulara serum, idrar vücut sıvıları vb. örnekler eklenir. Eğer örneğin içerisinde tayin etmek istediğimiz antijen varsa antikora bağlanacaktır. Bağlanmamış olan materyal yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Konjuge enzim içeren 2. Antikor ortama eklenir. 2. Antior da saptamak istediğimiz antijenin spesifik epitoplarına bağlanır. Yıkamayı takiben, enzimin substratı eklenir. Enzim substratının renkli bir ürüne dönüşmesini sağlar. Antijen miktarı ile oluşan rengin şiddeti orantılıdır. Çalışmamızda referans metod olarak kullanılacak olan Direk ELISA yöntemlerinden Sandviç ELISA metodu kullanılacaktır.

1.6.1. Sandviç ELISA metodu

Çalışmamızda kullanılacak olan Sandviç ELISA metodunda prensip, LL-37'yi tanıyacak olan spesifik antikor, polistiren mikrokuyucuklara kaplanmıştır. Örnek veya standart kuyulara uygulandıktan sonra bir süre beklenilir ve yıkama işleminin ardından Biotin ile işaretlenmiş 2. Antikor kuyucuklara konulur. Bu antikor LL-37'ye bağlanmış antikorları yakalayacaktır. Yıkama işlemlerinin ardından ortama eklenecek olan Streptavidin-peroksidaz konjugatı biotinlenmiş antikorları bağlayacaktır. Peroksidaz enzimi tetrametilbenzidin (TMB) substratı ile reaksiyona girerek 450 nm de absorbands veren renkli ürünler oluşturur. Her kuyuda var olan enzimin miktarına bağlı olarak renk şiddeti azalır veya artar. ELISA uygulamalarında en çok kullanılan enzim olan peroksidaz küçük molekül ağırlığına sahip olması ve daha çok bağlanma yüzeyinin olması gibi nedenlerden ötürü çok tercih edilen enzimdir.

SANDVIÇ ELISA



Şekil 1.10. Sandviç ELISA (Perry ve ark., 2002)

1.6. İlgili Literatür Işığı Altında Çalışmanın Yeri

AMP'ler ile ilgili çalışmalar bu epidlerin oldukça güçlü bakteriyosit olmalarından ötürü son yıllarda oldukça artmıştır (Narbat ve ark., 2010). AMP'nin polimerik yüzeylere kovalan bağlanarak immobilize edilmesi ile AMP'nin bozulmasının önüne geçilebilir ve fiziksel yöntemlere göre AMP'nin daha uzun süre saklanabilmesi mümkün olur (Bagheri ve ark., 2009-Ferreira ve ark., 2009). Kovalan eşleşmede AMP'ler kimyasal olarak yüzeye reaksiyona girer ve kararlı antimikrobiyal bir kaplama oluştururlar (Bagheri ve ark., 2009-Haynie ve ark., 1995). AMP'lere karşı reaktif olmayan yüzeyler farklı kolları olan reaktif gruplar ile aktif hale getirilerek peptidlerin yüzeye tutunması sağlanır (Humblot ve ark., 2009). Bu reaktif grupların uzunluğu bir ila birkaç karbon atomundan ibarettir. Bağlı AMP ler uygun kimyasal seçici eşleşme reaksiyonları kullanılarak kontrol altında tutulabilirler (Jonkheijm ve ark., 2008). İlaç salınım stratejileri daha uzatılmış bir aktivite potansiyeli sunmakla birlikte yeterli ve etkin dozaj sağlayan bir salınım sağlamak her zaman kolay olmamaktadır. Bu problemi aşmak için terapötiklerin bir yüzeye örneğin implantlara veya yara örtücü bir yüzeye kovalant olarak tutturulması önemli hale gelmiştir (Costa ve ark.,

2011). Salınım sistemlerine göre kovalant immobilizasyon biyomoleküllerin daha uzun süreli kararlılık ve düşük toksisite göstermelerini sağlamaktadır (Bagheri ve ark., 2009).

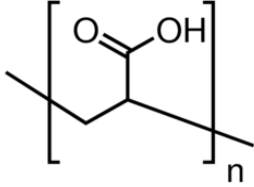
LL-37 bilinen tek insan katelisinidir (Gudmundsson ve ark., 1996). Yara ekstreleri incelendiğinde LL-37'nin de içlerinde olduğu birçok AMP bulunduğu saptanmıştır. Kronik iyileşmeyen yaralarda çok düşük miktarlarda hCAP18 dolayısı ile LL-37'nin bulunduğu saptanmıştır. LL-37'nin yaranın epitelleşmesi için oldukça önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Frohm ve ark., 1996). LL-37 nin mikropların membranında delikler açtığı ve bu şekilde öldürdüğü saptanmıştır (Gabriel ve ark., 2006). LL-37'nin titanyum yüzeylere tutturulduğu bir çalışmada yüzeyin oldukça iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

LL-37'nin de içinde olduğu AMP'ler antibiyotik direncinden ötürü antibiyotiklerin günümüzde etkisiz kalmasından dolayı oldukça önemli tedavi ajanları haline gelmişlerdir. Yapılarının çok sağlam ve bozunmaya karşı dirençli olmaları AMP'lerin gelecekte taşıyıcı sistemlerin ve yara tedavisinin vazgeçilemez ajanları olacağını düşündürmektedir.

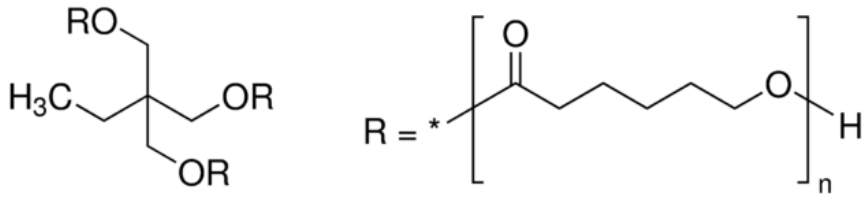
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

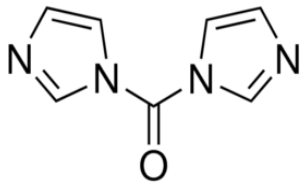
Poliakrilik Asit(PAA, karbomer): Beyaz, toz (Sigma-Aldrich; ortalama M_A 450.000)



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



Karbonildiimidazol (CDI): Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı. M_A :162.15g/mol, beyaz kristal yapılı (Sigma-Aldrich).



Tetraetoksisilan (TEOS): Merck firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

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

LL-37 peptidi: AnaSpec, Fremont, USA

LL-37 ELISA tayin kiti: Hycult Biotech Uden, Netherlands

2.2. Araştırma Araçları

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometre: Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FTIR Spektrometre

Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı: Philips XL30SEM FEG

Santrifüj: Sigma, 3K 30 Yüksek devirli, soğutmalı (A.B.D.)

Spektrofotometre: ThermoScientific, Helioszeta UV-VIS (A.B.D.)

Hassas Terazisi: Sartorius Analytic, A200S $\pm 0,0001$ (Almanya)

-80°C Derin Dondurucu: ThermoElectronCorp., Forma (A.B.D.)

Buzdolabı: Regal (Türkiye)

Su Banyosu: Wasserbad WB Serisi (Almanya)

Vorteks Karıştırıcı: Fisons, Whirlimixer (İngiltere)

Destile Su Cihazı: Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)

Manyetik Karıştırıcı: VelpScientifica, ARE (İtalya)

Etüv: Genlab, midi/2/AL (0-100)(İngiltere)

pH metre: Hanna, HI 9024 (Romanya)

Orbital Karıştırıcı: IKA-Werke, OS 10 B(Almanya)

2.3.Deneysel Yöntemler

2.3.1. Biyobozunur filmin hazırlanması

Film formülasyonu aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Tablo 2.1 Film formülasyonu hazırlanması

	% miktarı	G Miktarı
PAA (%10w/w)	30	1.5
Hidrolize TEOS	40	2
Polikaprolakton triol	30	1.5
Lignin	1	0.05

TEOS'un Hidrolizi: 2 mL etanol içerisinde 5 g (24 mmol) Tetraetoksisilan (TEOS), 1.3 g (72,2 mmol) su ve 0.05 g p-toluensülfonikası (katalizör) 20 °C'de tüm gece karıştırıldı.

Poliakrilik asitten (PAA) 1.5 g tartılarak 25 mL lik behere alındı. Üzerine 15 mL deiyonize su ilave edildi 4 saat oda sıcaklığında 500 rpm de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Hazırlanan PAA (%10w/w) çözeltisinden 1.5 g tartılarak 25 mL behere alındı. Üzerine 2 g hidrolize edilen TEOS, 1.5 g polikaprolakton triol ve 0.05 g lignin ilave edildi. Hazırlanan çözelti homojen oluncaya kadar 60 dk oda sıcaklığında ultrasonik banyoda bekletildi. Homojenliği sağlanan çözelti Teflon kalıba dökülerek, 1 saat 100 °C ve 1 saat 120 °C'de vakum etüvünde çapraz bağlanması sağlandı.

2.3.2. PAA/ Polikaprolakton triol'un aktivasyonu

PAA/Polikaprolakton triol'un polimerinin uçlarındaki OH grupları karbonildiimidazol (CDI) ile aktifleştirildi ve son ürün bir amin reaktif imidazolil-karbamat grubuna sahiptir. Çapraz bağlı PAA/ Polikaprolakton triol polimerinden 6.5 g CDI'den 10 g tartıldı ve üç boyunlu balona alındı. Üzerine 50 mL tetrahidrofuran (THF)

eklendi. Azot atmosferinde 24 saat 40°C’de manyetik karıştırıcıda 500 rpm de karıştırıldı. THF evaporatörde uzaklaştırıldı. Aktive edilmiş PAA/ Polikaprolakton triol kullanılabana kadar 4°C’de saklandı.

2.3.3 Polimerik desteğin karakterizasyonu

Hazırlanan polimerin peptid immobilizasyonu öncesi ve sonrası fonksiyonel grup analizleri Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak yapıldı. Spektrumlar Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FTIR Spektrometre cihaz ile 400-4000 cm⁻¹aralığında kaydedildi. Philips marka XL30SEM FEG model Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı kullanılarak polimerin peptid immobilizasyonu öncesi ve sonrası görüntüleri morfolojik olarak incelendi.

2.3.4. Polimerik desteğe LL-37 Peptidinin immobilizasyonu

1 mg LL-37 peptidi 1 mL steril distile suda çözüldü. 0.25 mg/mL olacak şekilde sulandırıldı. 0.25 mg/mL peptid çözeltisi 0.0149 g polimer ile vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı ve 24 saat 4°C’de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda polimer tüpten alındı, 100 µL immobilize olmayan peptid miktarını tayin etmek için ayrıldı. Polimer distile su ile yıkandı ve yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı ve daha sonra kurutulmak üzere filtre kağıdı üzerine alındı ve kullanılabana kadar oda sıcaklığında bir petri kutusunda saklandı.

2.3.5. Polimerik destekteki ilaç miktarı ve bağlanma yüzdesi

Çözeltide kalan immobilize olmamış peptid miktarı Hycult Biotech ELISA kiti kullanılarak tayin edildi.

2.3.6. ELISA metoduna göre LL-37 peptidinin tayini

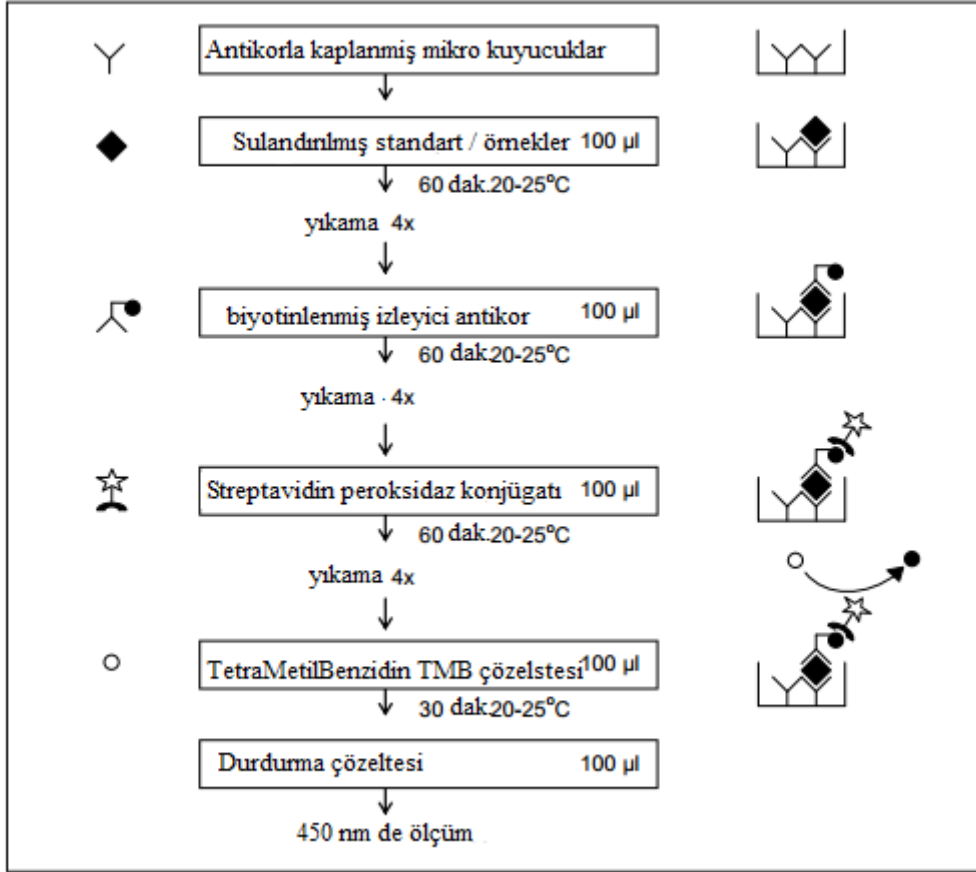
İmmobilize olmamış peptid miktarının tayini Hycult Biotech Sandviç ELISA kitinin kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde yapıldı. Kitin içerisinde bulunan reaktifler kit kılavuzunda belirtildiği şekilde sulandırıldı ve kitin protokolü uygulandı. Bu protokola göre;

- 1- Kullanımdan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

- 2- Gerekli test kuyu sayısını belirlendikten sonra yeterli miktarda test şeritleri kit ile verilen çerçevenin içine yerleştirildi.
- 3- 100 µl standart, örnekler ve kontroller kuyucuklara konuldu. Örnekler konulurken pipet ucunun kuyucukların diplerine ve yanlarına değmemesine dikkat edildi.
- 4- Plakanın üzeri örtüldü, hava kabarcığı kalmış ise plakaya hafifçe vurarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Kuyucuklardan sıvı sıçramamasına dikkat edildi.
- 5- Oda sıcaklığında 1 saat boyunca plaka inkübe edildi.
- 6- Yıkama tamponu ile plakalar 4 kez yıkandı.
 - Kapak dikkatlice çıkarıldı.
 - Lavabonun üzerinde içeriğini plakayı ters çevirerek boşaltıldı ve ters olarak kalın bir havlu kağıdın üzerine konuldu ve kuyucuklarda kalmış olabilecek sıvı bu şekilde emdirildi.
 - Her bir kuyunun içine 200 µl yıkama tamponu eklendi ve tekrar içindekiler lavaboya boşaltıldı ve yukarıdaki işlem tekrarlandı
 - Bu işlem 3 kez daha uygulandı
 - Kuyucuklar havlu kağıt üzerinde iyice hafifçe vurularak kurutuldu.
- 7- 2. Basamakta izlenen sıraya göre 100 µl sulandırılmış izleyici kuyucuklara konuldu.
- 8- Plakanın üzeri kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
- 9- Aşama 5'te tarif edilen yıkama işlemi tekrarlandı.
- 10- 2. Basamakta uygulanan aynı pipetleme sırası kullanılarak, her bir kuyucuğa 100 µl TMB substratı eklendi.
- 11- Plaka iyice örtüldü ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- 12- 100 µl durdurma çözeltisi ilave etmek suretiyle reaksiyonu durduruldu, hafif plakanın döndürülmesiyle kuyulardaki çözelti iyice karıştırıldı. Kuyularda sıkışmış hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için plakaya hafifçe vuruldu.

13- Durdurma çözeltisi (okzalik asit) eklendikten sonra 30 dakika içinde plaka,

ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda absorbanslar kaydedildi.



Şekil 2.1. Kullanılan ELISA protokolünün akış şeması

2.3.7. Standart grafiğın hazırlanması

Kitin çalışma kitapçığında verildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda LL-37 (25-250 ng/mL) çözeltileri hazırlandı ve örnekler ile aynı anda çalışıldı. LL-37 konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiğı çizildi. Bu eğrinin yardımıyla örneklerin içerdiği LL-37 miktarları tespit edildi. İmmobilize olmamış peptid miktarı başlangıçtaki peptid miktarından çıkartıldı ve böylelikle immobilize olmuş peptid miktarı saptandı.

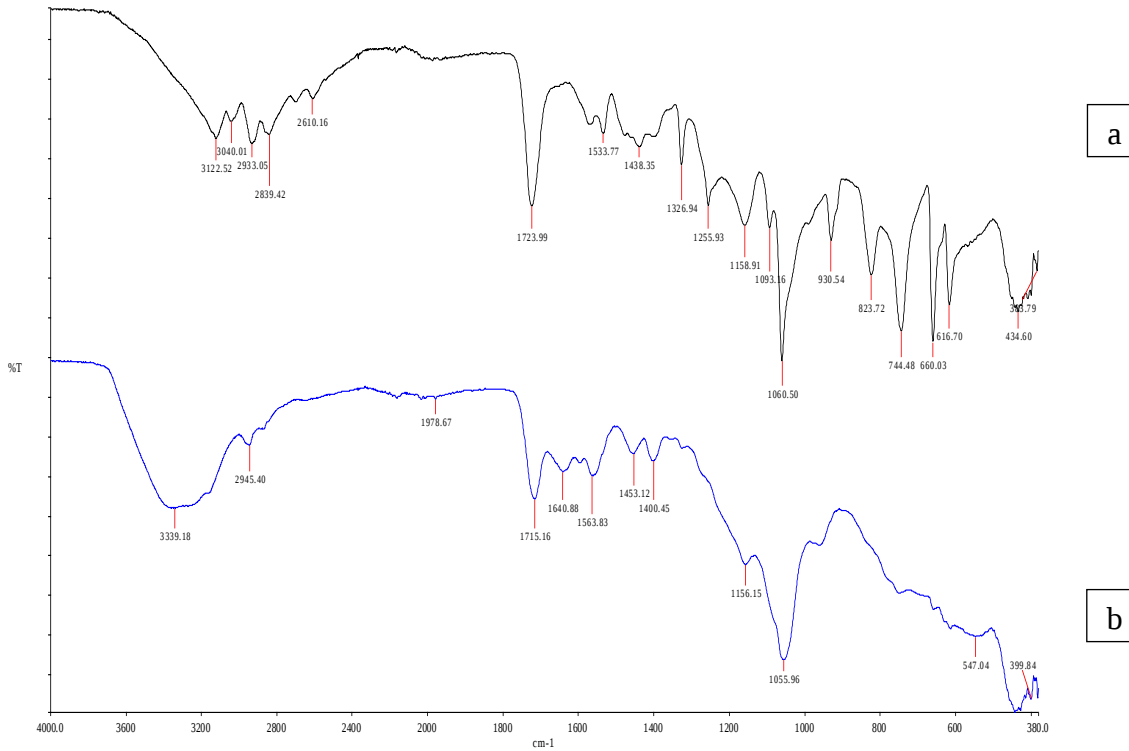
2.3.8. Antimikrobiyal aktivitenin tayini

İmmobilize olmuş LL-37 peptidinin antibakteriyel aktivitesi, kantitatif olarak antimikrobiyal aktivite tayin metodu ile araştırılmıştır. Bu deneyde Gram-pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve Gram-negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* ATCC 25922 test bakterileri olarak kullanılmıştır. Test bakterileri önce Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilerek etüvde 37°C’de 24 saat bekletilmiştir. Nutrient Agar besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinden alınarak Nutrient Broth (NB) besiyerine ekilmiş ve etüvde 37°C’de 24 saat bekletilmiştir. Hazırlanan kültürlerden, McFarland’ın 0.5’lik standardına göre fizyolojik tuzlu su ile 1 ml’ de 10^8 oranında canlı bakteri içerecek şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyonlardan 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ’lik s dilüsyonlar 100 µl alınmış ve ayrı ayrı NA plağa yayma yöntemiyle ekilmiştir. Ekim yapılan petripler 37°C’ de 24 saat bekletilmiştir ve inkübasyon sonrası petri kutusunda üreyen bakteri kolonileri sayılarak 1 ml’deki bakteri sayısı hesaplanmıştır. İki adet LL-37 örneği steril koşullar altında 100 mg olacak şekilde kesilerek ayrı ayrı steril ependorf içerisine yerleştirilmiştir. 1 ml’de 10^8 oranında canlı bakteri içeren iki bakteri süspansiyonlarından 1’er ml alınarak ayrı ayrı steril ependorf içerisindeki LL-37 örnekleri üzerine ayrı ayrı konulmuştur. Ependorf tüplerindeki LL-37 ve bakteri karışımı vortekslendikten sonra 37°C’ye ayarlanmış etüvde 24 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} ’lik dilüsyonlar hazırlanarak plağa yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 37°C’ de 24 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra petriplerdeki bakteri kolonileri sayılarak 1 ml’deki bakteri sayısı hesaplanmıştır ve immobilize olmuş LL-37 peptidinin antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Çalışmamızda açıklanan tüm testler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

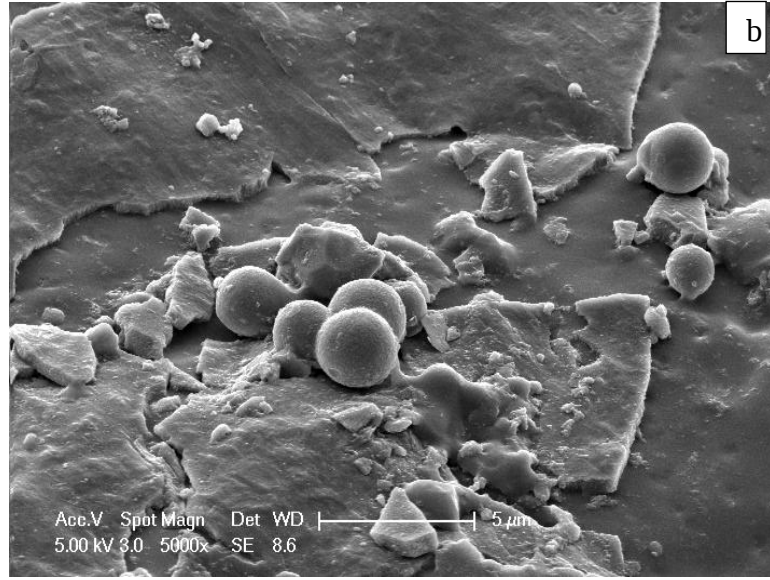
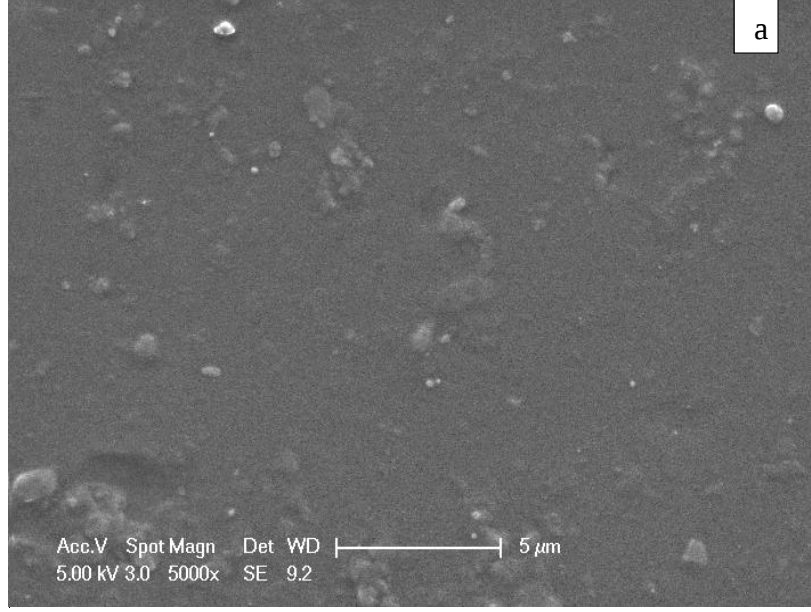
3.1. Polimerik Desteğin Sentezi ve Karakterizasyonu

Polimerik desteğin immobilizasyon öncesi çapraz bağlanmış PAA/ Polikaprolakton triol ve sonrası PAA/ Polikaprolakton triol polimerinin FTIR spektrumları Şekil 3.1 a ve b'de gösterilmiştir. İmmobilize polimerde 1640 cm^{-1} de bir absorpsiyon bandı gösterdiği görülmüştür, bu amit bağına karşılık gelmektedir. Genel olarak amit bağı C=O bağlarının gerilme titreşimiyle peptidin yapısındaki C-N gerilme ve N-H bükülme titreşimlerinin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.1. a) PAA/Polikaprolakton triol polimeri b) LL-37 immobilize edilmiş polimer

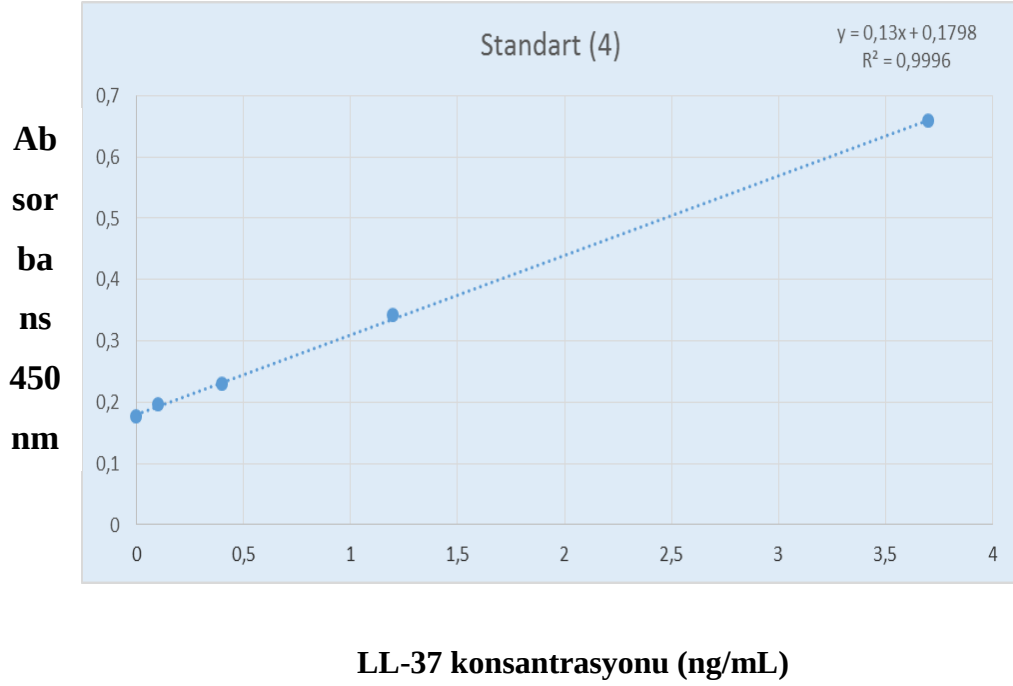
Polimerik desteğin kırık yüzey morfolojileri LL-37 ile immobilizasyon öncesi ve sonrası görüntüleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 3.1'de immobilizasyonu öncesi çapraz bağlanmış PAA/Sorbitol polimerinin kırık yüzey morfolojisi (birinci şekil) 10000 büyütme ve (ikinci şekil) 5000 büyütme ile verilmiştir.



Şekil 3.2. İmmobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) PAA/ Polikaprolakton triol polimerinin SEM görüntüsü

3.2. İmmobilize Olan LL-37 Miktarının Hesaplanması

İmmobilize olan LL-37 miktarı LL-37 standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Standart LL-37 grafiği aşağıda Şekil 3.3'te verilmiştir. Başlangıçta kullanılan peptid miktarından immobilizasyon sonunda bulunan peptid miktarı çıkarılarak bağlanan peptid miktarı bulunmuştur. Polimere yüklenen, bağlanmayan ve bağlanan peptid miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. LL-37 standart grafiği

Tablo 3.1. İmmobilizasyon Öncesi ve Sonrası LL-37 Miktarları

Başlangıçtaki LL-37 Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Bağlanmayan LL-37 Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Bağlanan LL-37 Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)
250	3,575	246.425

Bağlanan LL-37 peptidinin konsantrasyonun başlangıç konsantrasyonuna oranının % 97 olduğu saptanmıştır.

3.3. İmmobilize LL-37'nin antimikrobiyal aktivitesi

Kronikleşmiş yaraların özellikle ülserleşmiş venöz, arterial ve diyabet yaralarının iyileştirilmesi oldukça zordur. Bu yaraların iyileştirilmesi için ciddi sağlık harcamaları yapılmaktadır. Kullanılan yara tedavi edici ürünler özellikle de antibiyotikler mikroorganizmaların direnç geliştirmesinden dolayı kronik ve ülserleşmiş yaralara karşı

çok etkin değildir. Biyofilmler mikroorganizmaların yüksek yoğunluktaki popülasyonları tarafından meydana getirilen üç boyutlu ve iyi organize olmuş polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşmuş ekzopolimerik matrikslerdir. Bu biyofilm matriksi uv radyasyonu, pH değişimi, ozmotik şok gibi zorlu çevre koşullarına oldukça dayanıklıdır ve antibiyotikler ve bakterisitlerin içeriye girmesini engeller. Biyofilm yapısı sayesinde dirençli ve dirençsiz mikrobiyal suşları arasında yatay gen transferini de kolaylaştırılır. Sonuçta biyofilimde 10-1000 katı daha fazla antibiyotik direnci oluşur. Biyofilm oluşması ile mikrobiyal tutunma, koloni oluşumu ve proliferasyon kolaylaşır. Matriks oluşumu ve biyofilmin olgunlaşması sonucu meydana gelen hücre bozunması ile birlikte enfeksiyon oluşur. Oluştuktan sonra biyofilm standart klinik işlemler ile kolay kolay ortamdan uzaklaştırılmaz. Bakteri kolonileşmesini önleyici ve bakteri titrasyonlarını azaltan, biyofilm oluşumunu engelleyecek antimikrobiyal yüzey kaplamalar ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Böyle maddeler içeren yüzeyler yara ile temas ettirildiğinde lokal olarak etkileştiği için sistemik aşırı doz seviyesi aşılmamış olacaktır. Günümüzde kullanılan antimikrobiyal yüzeyler gümüş, salisik asit, kuaterner amonyum bileşikler, klor hekzidin ve nitrik oksit gibi maddeler içermektedir. Bu maddelerin aşırı miktarları anafilaksiye ve sitotoksositeye neden olmakta veya çok fazla etkin olamamaktadırlar. Tüm bu kısıtlayıcı etmenlerden ötürü antibiyotiklerin kullanımı daha çok tercih edilmektedir ama antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmesi de antibiyotiklerin kullanımında önemli bir engel oluşturmaktadır. Antibiyotiklerin piyasaya çıktığı geçmiş 50 yıla baktığımızda artık son yıllarda piyasaya çıkan yeni antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar 1-2 yıl içerisinde direnç geliştirmektedir. Hali hazırdaki tedavilerin etkinliğinin düşmesi yüzünden başka tedavi yolları araştırılmaya başlanmıştır. Bu yollardan bir tanesi de doğal immün sistemin bir parçası olan antimikrobiyal peptidlerin de yer aldığı yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesidir. AMP'ler ile ilgili çalışmalar bu peptidler oldukça güçlü bakterisit olmalarından ötürü son yıllarda oldukça artmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarda AMP lerin negatif yüklü bakteri membranlarına karşı ilgisi olduğu, bakteri membranının geçirgenliğini arttırmak yoluyla veya bakteri membranına yerleşerek sitoplazmadaki materyalleri kendine doğru çekerek AMP'nin pozitif yüküyle bakterinin dış yüzeyindeki eksi yük ile elektrostatik etkileşim meydana gelir. Bu etkileşim ile mikroplar kuvvetli bir şekilde yüzeyle etkileşirler ve bu da ölmelerini kolaylaştırır. Bundan dolayı AMP'nin yüksek miktarlardaki konsantrasyonu ile pozitif yüklü zıt iyonların bakteri dış yüzeyindeki iyonlar ile yer değiştirmesi gerçekleşir ve bakteri

yüzeyinin bu ani elektrostatik değişimi bakterinin ölümü ile sonuçlanır. AMP lerin immün düzenleyici etkilerinden dolayı örneğin anjiyojenez sitokin/kemokin ifadesini yara iyileşmesini ve TLP ile düzenlenen proenflamasyon cevabını azaltmak gibi etkilerinden ötürü düzenleyici aktiviteleri vardır. Bu benzersiz özelliklerinden ötürü katyonik AMP'ler antienflamatuar cevapların düzenlenmesinde çok önemli hale gelmişlerdir. Özellikle implantlarda kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda AMP ile yüklenen implantların antibiyotik direncine bağlı olarak gelişen yüzey kolonileşmelerini önlediği bildirilmiştir. Bu çalışmamızda kullandığımız LL-37 Peptidi lizince zengin bir peptiddir ve insan deri yüzeyinde bulunmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerin yeterli miktarda antimikrobiyal aktivite oluşturacak kadar AMP taşıması gerekmektedir. İlaç salınım stratejileri daha uzatılmış bir aktivite potansiyeli sunmakla birlikte yeterli ve etkin dozaj sağlayan bir salınım sağlamak her zaman kolay olmamaktadır. Bu problemi aşmak için terapötiklerin bir yüzeye örneğin implantlara veya yara örtücü bir yüzeye kovalent olarak tutturulması önemli hale gelmiştir. Çalışmamızda LL-37 peptidi başarılı bir şekilde polimerik film tabakasına kovalent olarak tuturulmuştur. İmmobilizasyonun başarılı olduğu FTIR spektrumlarında görülmektedir (Şekil 3.1 a ve b) immobilize polimerde 1640 cm^{-1} de bir absorpsiyon bandı amit bağına karşılık gelmektedir. Amid bağı polimer ile peptidin etkileştiğini göstermektedir. SEM görüntüleri (Şekil 3.2) de bu bulgumuzu desteklemektedir. Başlangıçtaki LL-37 konsantrasyonunun immobilizasyon süreci sonunda ELİSA yöntemi ile saptadığımız immobilizasyon işlemi ardından sıvıda kalan LL-37 miktarının çok düşük çıkması, peptidin % 97 sinin bağlanmış olduğunu göstermesi de peptidin polimere etkin bir şekilde bağlandığının işaretidir. Kantitatif antimikrobiyal aktivite tayini de polimerin antimikrobiyal aktivitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Polimerin yara örtücü bir film olarak ülseratif yaralarda, antibiyotik direncine gelişmiş yaralarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 3.2. LL-37'nin Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve Gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisi.

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Deney öncesi toplam sayı (kob/ml)	6.7×10^8 kob/ml	1.0×10^8 kob/ml
24 saat inkübasyondan sonra toplam sayı (kob/ml)	3.0×10^7 kob/ml	1.0×10^7 kob/ml

4. SONUÇLAR

Çalışmamızda katyonik bir AMP olan LL-37 başarılı bir şekilde kaprolakton poliakrilik asit polimer filmine kovalant olarak immobilize edilmiştir. Film tabakası LL-37 çözeltisi içerisine daldırılarak polimerde ve lizin amino asidince zengin olan peptidin NH_2 grupları ile kovalan bağ yaparak oldukça güçlü bir şekilde polimere tutunmuştur. Peptidin % 97'si polimere yüklenmiştir ve bu değer oldukça iyi bir değerdir. İmmobilize olmuş peptidin antimikrobiyal aktivitesinin olduğu, çok küçük miktarlardaki (100 mg) polimerik filmin bile seçilen Gram-pozitif bakteri sayısını 6.7×10^8 kob/ml den 3.0×10^7 kob/ml ye ve Gram-negatif bakteri sayısını 1.0×10^8 kob/ml den 1.0×10^7 'ye düşürdüğü saptanmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre LL-37 test bakterilerinin sayısını yaklaşık 10 katı oranında azaltığı tespit edilmiştir. Bu polimerik filmin mekanik özellikleri daha da iyileştirilerek antibiyotik direnci kazanmış bakteriler tarafından enfekte edilmiş ciddi ülseratif yaraların tedavisinde yara örtücü olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Abdelrahman, T., Newton, H. (2011) Wound dressing: principles and practice Surgery, 29, 491-495.

Appendini, P., Hotchkiss, J.H. (2001) Surface modification of poly (styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. Journal of Applied Polymer Science, 81, 609–16.

Aulton, M. E., M.E., (2007) Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 3rd edition, Churchill Living-Stone, London.

Averous L., Digabel F.L. (2006) Properties of biocomposites based on lignocellulosic fillers. Carbohydrate Polymers, 66, 480-493.

Bachere, E., Y. Gueguen., M. Gonzalez. , J. de Lorgeril., J. Garnier., B. Romestand. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunology Revisions, 198, 149–168.

Bagheri, M., Beyermann, M., Dathe, M. (2009) Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 53, 1132–41.

Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M. (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. Journal of Pharmaceutical Sciences: 97, 2892-2923.

Boerjan W., Ralph J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis: Annual Review of Plant Biology, 54 (1), 5 19–549.

Bolton, L.L., van Rijswijk, L. (1990), Wound dressings: meeting clinical and biological needs. Dermatology Nursery, 2, 146–161.

Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annual Revision of Immunology, 13, 61–92.

Bowdish, D. M., D. J. Davidson, and R. E. Hancock. 2005. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptides Science*, 6, 35–51.

Bowdish, D. M., D. J. Davidson., Y. E. Lau., K. Lee., M. G. Scott., R. E. Hancock. (2005) Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocytes Biology*, 77, 451–459.

Brown, K. L., Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18, 24–30.

Bulet, P., Stocklin, R.,. Menin. L (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198,169–184.

Carmona, M.J., Molina, A., Fernandez, J. A., Lopez-Fando J. J., Garcia-Olmedo, F. (1993) Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant Journal*, 3,457–462.

Cascone, M.G., Barbani, N., Cristallini, C., Giusti, P., Ciardelli, L.L. (2001) Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *Journal of Biomaterial Science Polymer*, 12 , 267– 281.

Cherreddy, K.K., Comune, M., Moia, C.I., Alessandra Lopes, A. I., Porporato, E.P., Vanacker, J., Lam, C.M., Steinstraesser, L., Sonveaux, P., Huijun Zhu, S., Ferreira, S.L., Vandermeulen, G., Véronique Prétat, V. (2014) PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL-37 promote wound healing. *Journal of Control Release*, 194, 138–147.

Cho, W.M., Joshi, B.P., Cho, H, LeeK. H . (2007) Design and synthesis of novel antibacterial peptide– resinconjugates. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, 17, 5772–5776.

Cunliffe, R.N., Mahida. Y.R. (2004) Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Journal of Leukocytes Biology*, 75,49–58.

Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E., Speert, D. P. (2004) The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cellinduced T cell polarization. *Journal of Immunology*, 172,1146–1156.

- Dongkuan. (2011). Structure and properties of alkaline lignin-filled poly(butylene succinate) plastics. *Iranian Polymer Journal*, 20 (1), 3-14 .
- Elsbach, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1643–1645.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 9, 509–52.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J. C., Aunis, D., Schaaf, P. (2005) Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*, 26, 6704–12.
- Etienne, O., Picart, C., Taddei, C., Haikel, Y., Dimarcq, J. L., Schaaf, P. (2004) Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization . *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48, 3662–9.
- Falabella, A. F. (2006) Debridement and wound bed preparation. *Dermatologic therapy*, 19, 317–325.
- Fernandes, M. E., Pires, A. R., Mano, F. J., Ries, L. R., (2013) Bionanocomposites from lignocellulosic resources: properties, applications and future trends for their use in the biomedical field. *Progress in Polymer Science*, 38, 1416-1435.
- Ferreira L., Zumbuehl, A. (2009) Non-leaching surfaces capable of killing microorganisms on contact lenses. *Journal Material Chemistry*, 19, 7796–806.
- Flieger, M., Kantorova, M., Prell, A., Rezanka, T., Votruba, J. (2003). Biodegradable Plastics from renewable sources. *Folia of Microbiology*, 48(1), 27–44.
- Fromm, J. R., R. E. Hileman., E. E. Caldwell., J. M. Weiler., R. J. Linhardt. (1995) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323, 279–287.
- Ge, Y., MacDonald, D. L., Holroyd, K. J., Thornsberry, C., Wexler, H., Zasloff, M. (1999) In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43, 782–788.

Gilliet ,M., Lande, R. (2008) Antimicrobil peptide and self –DNA in outoimmune skin inflammation. Current Opinion in Immunology, 20, 401-407.

Gupta, B., Revagade, N., Hilborn, J. (2007) Polylactic acid fiber: An overview. Progress in Polymer Science, 32, 455-482.

Gümüşderelioğlu, M. (2002). Biyo malzemeler: Bilim Teknik, Temmuz, 1-3.

Hancock, R. E. (1997) Peptide antibiotics. Lancet, 349,418–422.

Hancock, R. E. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infectious Diseases, 1,156–164.

Hancock, R. E., . Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in Microbiology, 8,402–410.

Haynie, S.L., Crum, G. A., Doele, B.A. (1995) Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to awater-insolubleresin. Antimicrob Agents Chemotherapy, 39, 301–307.

Hilpert, K., Elliott, M., Jenssen, H. (2009) Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. Chemistry and Biology, 16, 58–69.

Hofmann, A., Ritz,U., Verrier,S., Eglin, D. (2008) The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells co-culture on polyurethane scaffolds . Biomaterials, 29, 4217-4226.

<http://blog.mediligence.com>.[http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossic /pag1.html](http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossic/pag1.html)).

Humblot, V., Yala., J., Thebault, F. (2009) The antibacterial activity of magainin Immobilized on to mixed thiols self-assembled monolayers. Biomaterials, 30,3503–3512.

Iwanaga, S., Kawabata, S. (1998) Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. Frontiers in Bioscience, 3, 973–984.

İlker, Çalgeriş., (2010). Fındık Kabuğundan Lignin İzolasyonu ve Lignin / Nişasta Biyo-Çözünür Polimerlerin Elde Edilmesi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 12-14.

Jon kheijm., P, Wein rich. D., Schroder,H., Niemeyer, C.M. (2008) Chemical strategies for generating protein biochips . Angewandte Chemie International Edition, 47, 9618–47.

Keaveny, T.M., Morgan, E.F. (2003). Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design. Mc- Graw Hill, New York.

Klaenhammer, T. R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 337–349.

Kraaslan, M.A., Tshabalala, MA., Yelle,DJ. (2011) Nanoreinforced biocompatible hydrogels from wood hemicelluloses and cellulose whiskers, Carbohydrate Polymers. 86, 192-201.

Krasner, D., Kennedy, K., Rolstad, B., Roma, A. (1993) The ABCs of wound care dressings. Ostomy Wound Management, 39, 68-69.

Lamb, H. M., Wiseman. L. R. (1998) Pexiganan acetate. Drugs 56,1047–1054.

Lapierre C., Pollet B., Ralet M.C., Saulnier L. (2001) The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. Phytochemistry, 57, 765–772.

Leung, T., Ching , K., kong , A. (2011) Circulating LL-37 is biomarker of eczema severity in children. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 286, 34121–34130.

Lix, Pan X. (2010) Hydrogels based on hemicellulose and lignin from lignocellulose biorefinery : a miny review . Journal of Biobased Materials, 4, 289-97.

Mansur, Hs., Mansur, APP., Bicalho, S. (2005) Lignin –hydroxyapatite/ tricalcium phosphate biocomposites: SEM/EDX and FTIR characterization. Bioceramics, 17, 745-8.

Martin, E., T. Ganz., R, I. Lehrer. (1995). Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. Journal of Leukocytes Biology, 58, 128–136.

Mattick, A. T. R., and A. Hirsch. (1947) Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 260 (6462), 5–7.

Mohanty, A. K., Manjusri, M., Lawrence, T. D. (2005) *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, CRC Press, Taylor and Francis Group, London.

Moore, K., McCallion, R., Searle, R.J., Stacey, M.C., Harding, K.G. (2006) Prediction and monitoring the therapeutic response of chronic dermal wounds. *International Wound Journal*. 3, 89–96.

Morimoto, M., Mori, H., Murakami, T., Iwanaga, S. (1991) Inhibitory effect of tachyplesin I on proliferation of human immunodeficiency virus in vitro. *Chemotherapy*, 37, 206-211.

Murakami, T., Niwa, M., Miyata, T., Iwanaga, S. (1991) Inhibitory effect of tachyplesin I on horseshoe crab hemocytes. *Chemotherapy*, 37, 327-334.

Purna, K., Babu, M. (2000) Collagen based dressings - a review. *Burns*, 26, 54-62.

R. A. Northey. (1992) Low-cost uses of lignin, emerging technology of materials and chemicals from biomass, *ACS Symposium Series*. 476.

Rasch, I.E., Hitruc, E.G., Vasile, C. (2011) Semi interpenetrating polymer networks containing polysaccharides. II. xanthan/ lignin networks: a spectral and thermal characterization. *High Performance Polymers*, 23, 219-29.

Reinholz, M.D., Ruzicka, M.D., Schaubert, M.D. (2012) Cathelicidin LL-37: An antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Annals of Dermatology*, 24, 126-135.

Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Reviews of Genetics*, 32, 255-278.

Rinaldi, A. C. (2002) Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion of Chemical Biology*, 6, 799–804.

- Schultz, G.S., Phillips, P.L. (2000) In: Bryant, R.A. (Ed), Acute and chronic wounds: nursing management, 2nd edition, Mosby, St. Louis.
- Scott, M. G., and R. E. Hancock. 2000. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Critical Reviews in Immunology*. 20: 407–431
- Shankar, S. (2012) Laccase production and enzymatic modification of lignin by novel *peniophora* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1082-1094.
- Shukla, A., Fleming, K. E. (2010) Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*, 31,2348–57.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*, 47,435–450.
- Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A., Zanetti, M.(1996) Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 271,28375–28381.
- Territo, M. C., Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. (1989) Monocytechemotactic activity of defensins from human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*,. 84,2017–2020.
- Torres, G.F., Commeaux, S., Troncosso, P.O. (2013) Starch based biomaterial for wound dressing application. *Starch*, 65, 543-551.
- Vengal C.J., Srikumar M. (2005) Processing and study of novel lignin-starch and lignin-gelatin biodegradable polymeric films *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*,18 (2), 237-241.
- Wang, Z., Wang, G. (2004) APD: The Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, 32, 590–592.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., Oppenheim, J. J. (2004) Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology*, 22,181–215.

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L., Oppenheim, J. J. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology*, 23:291–296.

Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84,5449–5453.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Deka Abdullahi Farah
Doğum Yeri ve Tarihi :Mogadisho Somali 1988
Yabancı Dili :İngilizce Somalice Arabça
E-Posta : dekahaji@hotmail.com
Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise		Ahmed Gurey Secondry School	2007
Üniversite	Education of Biochemistry	Benadir University	2011