



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KERATİN İÇEREN BAKTERİYEL SELÜLOZ  
TABANLI YENİ BİR KOMPOZİT BİYOMALZEME  
ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOYAPAY  
DERİ GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANIM  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zalike KESKİN**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 06.08.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**

**EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**KERATİN İÇEREN BAKTERİYEL SELÜLOZ TABANLI YENİ**  
**BİR KOMPOZİT BİYOMALZEME ÜRETİMİ,**  
**KARAKTERİZASYONU VE BİYOYAPAY DERİ**  
**GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Zalike KESKİN**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 06.08.2015**

**Bornova- İZMİR**  
**2015**



Zalike KESKİN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “ Keratin İçeren Bakteriyel Selüloz Tabanlı Kompozit Biyomalze Üretimi, Karakterizasyon ve Biyoyapay Deri Geliştirilmesinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06.08.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

**Raportör Üye** : Yrd. Doç. Dr Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

**Üye** : Prof. Dr. Seda VATANSEVER



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Keratin İçeren Bakteriye Selüloz Tabanlı Yeni Bir Kompozit Biyomalzeme Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoyapay Deri Geliştirilmesinden Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” 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.

06 /08/ 2015

Zalike KESKİN





**ÖZET****KERATİN İÇEREN BAKTERİYEL SELÜLOZ TABANLI  
KOMPOZİT BİYOMALZEME ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU  
VE BİYOPYAPAY DERİ GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANIM  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

KESKİN, Zalıke

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Ağustos 2015, 81 sayfa

Bu tezde *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen bakteriyel selüloz (BS), insan keratin proteini ile birleştirilerek yeni bir doğal kompozit biyomalzeme üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada üretimle eş zamanlı (*in situ*) ve üretim sonrasında (post) olmak üzere iki farklı yaklaşım kullanılarak BS tabanlı keratin içeren yeni bir nanokompozit malzeme üretilmiştir. Atık insan saçından keratin izolasyonu Shindai yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

BS'ye *in situ* olarak %1, 2, 3 w/v, üretim sonrası (post) 0,1 ml/cm<sup>2</sup> keratin çözeltisi (3,66 mg/ml) kullanılarak modifikasyonlar uygulanmıştır. Üretimler sonrası %3 keratin ile *in situ* BS/keratin kompoziti ve post modifiye BS/keratin kompozitlerinin SEM, EDX, FTIR, XRD, sitotoksosite ve endotoksosite analizleri ile ileri karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üretilen yeni BS/keratin kompozitinin biyopyapay deri geliştirmede kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla *in vitro* hayvan hücre kültürü teknikleri ile insan deri fibroblast ve keratinosit hücreleri ile olan ko-kültür etkileşimlerine bakılmıştır.

BS'nin keratin ile birleştirilmesi deri hücreleri ile etkileşimi destekleyici özellikte, biyopyapay deri malzemesi geliştirmede yüksek potansiyele sahip olabilecek yeni bir kompozit biyomalzeme üretimi ile sonuçlandırılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Bakteriyel selüloz, keratin, deri, kompozit biyomalzemeler



**ABSTRACT****A NEW COMPOSITE BIOMATERIAL PRODUCTION BASED ON  
BACTERIAL CELLULOSE CONTAINING KERATIN, ITS  
CHARACTERIZATION AND RESEARCH OF APPLICATION  
POTENTIAL FOR USING BIOARTIFICIAL SKIN  
DEVELOPMENT**

KESKIN, Zalike

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. E.Esin HAMES

August 2015, 81 pages

In this thesis, a new natural biocomposite production has been done by combining bacterial cellulose (BC) produced by *Acetobacter xylinum* with keratin protein isolated from human hair. Two different composite production approaches have been used named as *in situ* production and post modification. Both two methods have yielded successful results for production of BC based nanocomposite-containing keratin. Keratin isolation from human hair has been performed with Shindai method. BC modifications have been made using 1, 2, 3 % w/v keratin for *in situ* production and 0,1 ml/cm<sup>2</sup> keratin (3,66 mg/ml) for post modification. A new biocomposite materials have been investigated for surface properties, appearance, elemental analysis, chemical bond structure, cytotoxicity and endotoxicity.

Human skin fibroblast and keratinocyte cells coculture interaction have been investigated by using *in vitro* animal cell culture techniques for the assessment of application potential of the new BC/keratin composites as bioartificial skin.

Combining of BC with keratin have been provided a new composite biomaterial production which could have high potential for bioartificial skin by supporting skin cells.

**Keywords:** Bacterial cellulose, keratin, hair, skin, composite biomaterials



## TEŞEKKÜR

Lisans bitirme ve hemen ardından gelen yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü destek bilgi birikim ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocalarım Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ ve Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e,

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse sosyal hayatımda yanımda olan ve yardıma koşan tüm resmi ve fahri EgeREACT üyesi hocalarım ve arkadaşlarıma,

İnşaat Mühendisliği Malzeme Laboratuvarı cihazlarından Bilyalı değirmeni kullanmamı sağlayan Doç. Dr. Özge ANDIÇ ÇAKIR'a ve cihazı kullanmamda bana yardımcı olan Onur ÜZÜM'e

SDS-PAGE denemelerinde tecrübelerini ve laboratuvar imkanlarını esirgemeyen E.Ü. Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na

Mekanik çekme testlerini gerçekleştirmemiz için Makine Mühendisliği Biyomekanik Laboratuvarı çekme cihazını kullanmamızı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARIKANAT, Zafer YENİER ve Sezgin BEDİR'e

Yardımları için Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvar grubu arkadaşlarıma,

İçten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK 114M082 nolu proje kapsamında ve EBİLTEM Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Maddi manevi destek ve sevgileri hep benimle olan Annem, Babam ve kardeşlerime ve beni hep destekleyip güç veren, her zaman kalbimde olan can dostlarıma en sevdiklerime de teşekkür ederek tezimi onlara ithaf ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGE DİZİNİ .....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	3
2.1. Bakteriyel Selüloz (BS) .....	3
2.2. BS'nin Biyoyumluluğu Ve Medikal Uygulamaları .....	5
2.3. BS Kompozit Üretim Çalışmaları .....	7
2.4. Keratin .....	12
2.5. Deri .....	15
3. MATERYAL VE METOT .....	18
3.1. Öğütme .....	19
3.2. Shindai Özütlemesi .....	20
3.3. Oksidasyon Yöntemi .....	21
3.4. Keratin Stoklama, Protein Tayini .....	22
3.5. Keratin Karakterizasyonu .....	23
3.6. Keratin Modifikasyonu ile BS Kompozit Üretimi .....	25
3.7. BS/keratin Kompozitlerinin Karakterizasyonu .....	28

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.8. <i>In vitro</i> Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri.....	36
4. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	39
4.1. Saç Örneklerinin BS Üretiminde Substrat Olarak Kullanımı .....	39
4.2. Keratin Ön İşlemleri.....	40
4.3. Keratin Karakterizasyonu.....	41
4.4. BS/keratin Kompoziti Üretimleri.....	47
4.5. Mekanik Dayanım.....	55
4.6. Sitotoksosite .....	57
4.7. Endotoksosite Testi .....	61
4.8. Biyodegradasyon Testi.....	63
4.9. <i>In vitro</i> Hayvan Hücre Kültürü .....	65
5. GENEL SONUÇLAR.....	69
6. ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	79



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Bakteriyel selülozun moleküler yapısı .....	3
2. Bakteriyel selülozun moleküler zincir yapısı ve hidrojen bağları .....	4
3. Laboratuvarımızda <i>A. xylinum</i> tarafından üretilen BS'nin SEM görüntüsü .....	4
4. Laboratuvarımızda üretilen bakteriyel selülozun ultra ince fiber ağ yapısının SEM görüntüsü.....	5
5. Keratinin moleküler yapısı .....	12
6. Saç fiberinin hiyerarşik yapısı.....	13
7. Tam bir fonksiyonel deri replasmanı için gereken hücresel yapılar .....	16
8. Materyal- metot genel şeması .....	18
9. Sanayi tipi bıçaklı öğütücü .....	19
10. a) Bilyalı değirmene girmeden önce saç örneklerinin görünümü b) Kullanılan bilyalı değirmen c) Öğütme sonrası toz haline gelen saçların görünümü.....	22
11. Shindai özütlemesi filtrasyon ve diyaliz basamakları .....	23
12. Aktifleştirilen <i>A. xylinum</i> kültürü .....	25
13. -80 °C'den alınıp çözdürülmüş keratin ve HS besin ortamı içerisindeki görünümü... ..	28
14. Saflaştırma öncesi BS'nin makro ve SEM görünümü .....	29
15. BS saflaştırma işlemi.....	29
16. Öğütülmüş saçın substrat olarak kullanımının incelendiği üretim denemeleri.....	41
17. Keratin SDS-PAGE protein profili .....	45
18. Keratin Zeta sizer boyut dağılımı.....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
19. BC por boyutları .....	47
20. Shindai özürlemesi sonrası liyofilize edilen keratinin makro ve SEM görüntüsü ... ..	47
21. Liyofilize keratin EDX analizi .....	48
22. Keratin XRD paterni.....	49
23. Farklı kaynaklardan farklı yöntemlerle izole edilen keratin proteinlerinin XRD paternleri.....	49
24. 5 günlük inkübasyon sonrası <i>in situ</i> modifikasyon denemesi üretimleri ve sırasıyla üretilen BS örnekleri kontrol, %1 w/v, %2 w/v, %3 w/v, saflaştırma öncesi görünüşleri .....	51
25. a) Kontrol BS ve b) <i>in situ</i> BS/keratin kompoziti SEM görüntüsü .....	51
26. <i>In situ</i> BS/keratin kompoziti FTIR analizi .....	52
27. Amid bağları FTIR spektrumu .....	53
28. <i>In situ</i> üretilen BS/keratin kompozitinin XRD analizi .....	54
29. Emdirme-liyofilizasyon post modifikasyonu sonrası elde edilen BS/keratin kompoziti.....	55
30. Post modifiye BS/keratin kompozitinin SEM görüntüsü .....	55
31. Post modifiye BS/keratin kompozitinin SEM görüntüsü .....	56
32. Post modifiye BS/keratin EDX analizi .....	57
33. Post modifiye BS/keratin kompoziti FTIR analizi .....	58
34. Kontrol BS çekme testi.....	58
35. <i>In situ</i> BS/keratin kompoziti çekme testi.....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
36. L929 hücre hattı indirekt sitotoksisite.....	63
37. HS2 hücre hattı için indirekt sitotoksisite .....	66
38. PBS - % degradasyon.....	66
39. SBF - % degradasyon.....	68
40. HS2 hücrelerinin materyal üzerinde T0 ve T2 de ışık mikroskobu görüntüleri.....	69
41. BS kontrol üzerinde a) T3 – HS2 ve b) T7 – Detroit SEM görüntüleri .....	69
42. <i>In situ</i> BS/keratin kompoziti üzerinde a) T3 HS2 ve b) T7 – Detroit SEM görüntüleri .....	69
42. Post BS/keratin kompoziti üzerinde a) T3 – HS2 ve T7 – b) Detroit SEM görüntüleri.. .....	69
43. Post modifiye BS/keratin üzerinde HS2 hücrelerinin tutunma - SEM görüntüsü.....	70



**ÇİZELGE DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. 2008'den bu yana medikal amaçlı yapılan BS modifikasyonları.....	11
2. %12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.....	26
3. Hestrin & Schramm besin ortamı.....	27
4. SBF İçeriği.....	33
5. Kuru ağırlık ölçüm sonuçları.....	43
6. Keratin EDX analizi .....	48
7. Post modifikasyonla üretilen BS/keratin kompozitinin EDX analizi.....	56
8. Endotoksisite sonuçları.....	64



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrad derece (sıcaklık birimi)
$\beta$	B e t a
$\approx$	Yaklaşık değer
$\mu$	Mikron
<u>Kısaltmalar</u>	
BS	Bakteriyel Selüloz
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
HS	Hestrin&Schramm
FTIR	Fourier Transform – Infrared Spectroscopy
EDX	Energy Dispersive X-Ray
XRD	X-Ray Diffraction
SEM	Scannig Electron Microscopy
HS2	İnsan Deri Keratinosit Hücre Hattı
Detroit	İnsan Deri Fibroblast Hücre Hattı





## 1.GİRİŞ

Günümüzde mikroorganizmalar sahip oldukları geniş metabolik çeşitlilikleri nedeniyle birçok araştırmada kullanılmaktadır. Polimerler bu metabolik çeşitliliğin önemli ürün gruplarından birini oluşturmaktadır. Bitkiler dışında bazı mikroorganizmalar tarafından da üretilen bakteriyel selüloz (BS), biyomalzeme olarak doku mühendisliğinin pek çok alanında çeşitli çalışmalara konu olmuş bir polimerdir. BS üretim prosesi kimyasal yapısı ve eşsiz özellikleri sayesinde kompozit oluşturma modifikasyonlarına müsait bir malzemedir. Literatürde BS kullanılarak üretilen pek çok kompozit çalışmaları yer almaktadır. BS'nin araştırma çalışmaları ve endüstriyel kullanım alanları yaygın olarak deri doku mühendisliğinde yoğunlaşmıştır. Bu alanda BS menşei pek çok patent ve ticari ürün bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında BS'nin modifikasyonunda kullanılan doğal malzeme insan saçından izole edilen keratin proteinidir. Protein içeren makromoleküller çeşitli fizikokimyasal özellikleri, biyolojik aktiviteleri ve biyouyumlu yapıları ile biyomedikal uygulamalar için ilgi çekici malzemelerdir. Bir çok biyomateryalin geliştirilmesinde kollajen, albümin, jelatin, fibroin ve keratin de dahil olmak üzere çeşitli proteinler kullanılmıştır (Jillian vd. 2010). BS ve keratinin ayrı ayrı pek çok materyal ile kompozitleri çalışılmıştır. Fakat bu iki materyalin birlikte kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Vücudun en büyük organlarından biri olan deri sahip olduğu keratin ve lipid tabakası ile mikroorganizmaların ve zararlı maddelerin vücuda girişini engellemektedir. Vücutta sıvı kaybını önleyerek ve dermis ile mekanik esneklik sağlayarak alttaki dokuları travmalardan korumaktadır. Derimizde yanık, damar ve diyabetik ülser veya akut yaralanma gibi durumlarda meydana gelen hasar

bazen yaşamı tehdit eden boyutlara ulaşabilmektedir. Derinin önemli bir kısmının hasar gördüğü derin yanık yaraları vakalarında istenilen deri dokusu üretilmemekte ve deri nakli veya yapay deri kullanımı gerekmektedir. Bu gibi durumlarda insan deri keratinositleri normal şekilde üremeleri için deri fibroblast hücreleri tarafından üretilen kollajenden oluşmuş hücre dışı matris yapısına ihtiyaç duyarlar (Rostislav et al., 2010; Anthony et al., 2007). Deri naklinde doku hastanın kendi derisinden alındığından hem hastanın genel sağlık durumu hem de ihtiyaç duyulan derinin büyüklüğü önemli kısıtlar oluşturmaktadır. Bu gibi durumlarda ya sentetik/yarı-sentetik malzeme kullanılmakta ya da hastaya ait keratinosit hücrelerin *in vitro* çoğaltımı ile oluşturulan epidermis tabakası, hayvansal kaynaklı kollajen dermal tabaka ile biraraya getirilerek yapay deri olarak kullanılmaktadır. Her iki uygulamada da deri katmanları arasında istenilen düzeyde bağlanma sağlanamamaktadır. Hastadan alınan (otolog) keratinosit hücrelerden *in vitro* kültür ile elde edilen epidermis tabakası halen yanık tedavilerinde en etkili yöntem olarak kullanılıyor olsa da özellikle yeterli kalitede ve büyüklükte yapay deri elde edilememesi ve bağlanma sorunlarının giderilememesi bu alandaki önemli kısıtları oluşturmaktadır.

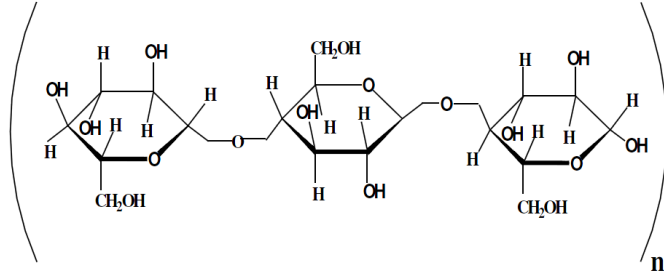
Bu tez çalışması istenilen büyüklük ve şekilde üretilebilen, biyouyumlu, içerdiği keratin sayesinde deri fibroblast ve keratinosit hücreleri için üreme ve gelişmeyi destekleyici, fibroblastların ürettiği kollajeni selülozun gözenekli ağ yapısı ile tutabilen ve böylece keratinosit hücreleri için hücre dışı matrisi sağlayan, biyoyapay deri geliştirmede kullanım potansiyeline sahip olabilecek BS tabanlı yeni bir kompozit biyomalzeme üretimini ve karakterizasyonunu konu almaktadır.

## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bakteriyel Selüloz (BS)

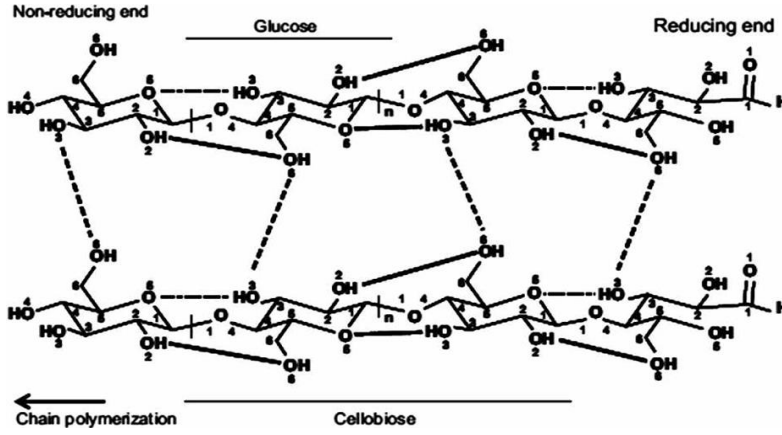
Yerkürede temel üreticisi bitkiler ( $10^{12}$  ton/yıl) olan selüloz aynı zamanda mikroorganizmalar (bakteriler, algler ve küfler) tarafından da üretilen doğal bir polimerdir (Klemm et al., 2006). Günümüzde gıda, tekstil, kâğıt endüstrisi gibi alanlarda kullanım potansiyelinin yanında biyomedikal alanda da giderek önem kazanan bakteriyel selüloz, temelde bitkisel selüloz ile aynı molekül formülüne sahip olmasına rağmen bitkisel selüloza göre taşıdığı bazı fiziksel karakteristikler ve saf olarak üretilmesi ile ön plana çıkmaktadır.

BS, glukopiranoz şeker monomerlerinin tekrarlanan  $\beta(1\rightarrow4)$  bağlanmasıyla oluşan  $(C_6H_{10}O_5)_n$  formülüne sahiptir (Bkz. Şekil 1).

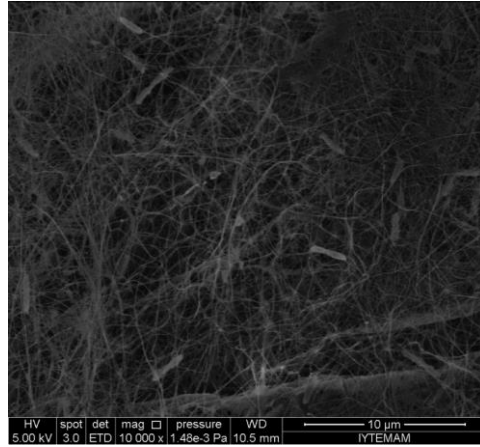


Şekil.1 Bakteriyel selülozun moleküler yapısı

$\beta(1\rightarrow4)$  bağları moleküle lineer bir yapı verir ve sıralanmış her glukoz birimi birbirine hidrojen bağları ile bağlıdır (Bkz. Şekil 2). ( $O_{(6)}\rightarrow O_{(2)}H$  ve  $O_{(3)}H\rightarrow O_{(5)}$ ). BS; yaygın olarak *Gluconacetobacter xylinus* olmak üzere *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Sarcina* türleri tarafından sentezlenebilen hücre dışı bir polimerdir (Czaja, Krystynowicz, Bielecki, & Brown, 2006; Lin et al., 2013).



**Şekil.2** Bakteriyel selülozun moleküler zincir yapısı ve hidrojen bağları (düz çizgi molekül içi H bağı; kesikli çizgi moleküller arası H bağı) (Martins, Prado, & Leite, 2011)



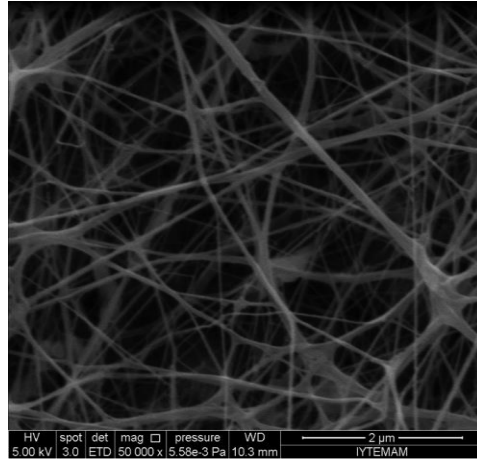
**Şekil.3** Laboratuvarımızda *A. xylinum* tarafından üretilen BS'nin SEM görüntüsü

*Gluconacetobacter* suşları (*Acetobacter*) patojen olmaması, meyve ve meyve ürünlerinde sıklıkla bulunması, laboratuvar ortamında kolaylıkla kültive edilebilmesi, görece yüksek verimde ve kararlı bakteriyel selüloz üretme kabiliyeti nedeniyle en çok kullanılan BS üreticileridir (Klemm et al., 2006). Şekil 3'te *A. xylinum* tarafından üretilen selüloz fiberleri ve bakterilerin basil görünüşleri verilmiştir.

BS besi ortamında sıvı-hava ara yüzeyinde üretildiğinden kullanılan kültür kabının yüzey alanı büyüklüğünde ve şeklinde üretilebilmektedir (Brown, 2004). Statik kültür ile bakteriler tarafından üretilen selüloza tıp ve kozmetik

uygulamalarındaki potansiyeli sebebiyle son zamanlarda ilgi giderek artmıştır (Hornung et al., 2006). BS yüksek saflıkta nanofibril ağ yapısı, yüksek kristalinite ve polimerizasyon derecesi, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek çekme dayanımı ve biyoyumluluk başta olmak üzere fiziksel ve mekanik olarak ayırt edilebilir özelliklere sahip olmasının yanında katlandığında şeklini koruyabilen, esnek, üretim sırasında çeşitli modifikasyonlara uygun bir polimerdir (Iguchi et al. 2000; Jonas & Farah, 1998).

BS makromoleküler yapı ve özellikleri bakımından bitkisel selülozdan farklılık göstermektedir. Bakteriyel selülozun olgunlaşmamış zincirleri, öncül fibril yapısındadır. Yaklaşık olarak 1,5 nm genişliğindedir. BS öncül fibrilleri birikerek mikrofibrillere kristalize olur. Bunlar ise yığın oluşturarak şerit halini alır (Czaja et al., 2006) Şekil 4'te bakteriyel selülozun 50000 kat büyütme ile alınan elektron mikroskobu görüntüsünde nanofiber ağ yapısı görülmektedir.



**Şekil.4** Laboratuvarımızda üretilen bakteriyel selülozun fiber ağ yapısı SEM görüntüsü

## 2.2. BS'nin Biyoyumluluğu Ve Medikal Uygulamaları

BS'nin biyoyumluluğu doku mühendisliği açısından belirgin bir avantajdır. Bakteriyel selülozun vücut ile yüksek biyoyumluluğu ve ince bir tabaka halinde üretilebilmesi nedeniyle yara örtüsü veya yapay deri olarak kullanım kapasitesini

arttırmaktadır (Fu et al., 2013). Ayrıca BS'nin modifikasyonlara uygun özellikler taşıması (Klemm et al., 2006) ve biyobozunurluğunun modifikasyonlarla artırılma potansiyeli nedeniyle birçok özelliği geliştirilmeye açık olan bir polimerdir (Luo et al., 2014; Pandey et al., 2005). Fibroblastlar ve kondrositler ile yapılan ko-kültür uygulamasının ardından farelere implante edilen BS'nin farenin derisine oldukça iyi bir şekilde entegre olduğu bildirilen çalışmada BS'nin hücre bağlanması ve çoğalması için uygun olduğu gösterilmiştir (Fu et al., 2013; Jacquel et al., 2008).

Literatürde BS'nin degradasyonu ile ilgili kesin sonuçlar veren yeterince çalışma bulunmamaktadır. Genelde pek çok araştırma malzemenin yavaş bir degradasyona sahip olduğundan bahsetmektedir. Park ve arkadaşları (2014) bir *Gluconacetobacter* suşu kullanılarak üretilen ve temizlendikten sonra steril hale getirilmiş selüloz tabakalarını (0.8-1 mm kalınlığında, 1cm<sup>2</sup>) ratların subkütanöz dokusuna implante etmişler ve 28 gün sonra parçalanarak ortadan kaybolduğu, doku çevresinde de herhangi bir enflamasyona rastlanmadığı rapor etmişlerdir.

Bakteriyel selülozun biyoyumluluk ve yüksek su tutma kapasitesinden dolayı plastik cerrahide, özellikle de yanıkların tedavisinde kullanılması üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır (Krystynowicz et al., 2002).

Klinik denemeler de göstermiştir ki bakteriyel selülozun yara örtüsü olarak kullanımı iyileşmeyi olumlu yönde etkilemektedir. Yanık ciltlerde ve iyileşmeyen alt ekstremitte ülserlerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Czaja et al., 2006).

### 2.3. BS Kompozit Üretim Çalışmaları

BS'nin özellikleri ve morfolojisi bakteri büyümesi için zaruri olmayan farklı katkı maddelerinin sıvı üretim ortamına eklenmesiyle değiştirilebilmektedir (Ruka et al., 2013). BS'nin keratin ile kompozit hale getirilmesinde iki yaklaşım kullanılabilir. Bunlardan biri BS'nin üretimi sırasında (*in situ*) yapıya keratinin eklenmesidir. İkinci yaklaşımda ise üretilen bakteriyel selülozun üretimden sonra keratin ile birleştirilmesidir (post modifikasyon).

Literatürde ve laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalarda bakteriyel selüloz baz alınarak çeşitli modifikasyonlar yapılmış ve farklı amaçlara yönelik farklı yeni malzemelerin elde edilebildiği görülmüştür.

*In situ* BS modifikasyonunda üretim ortamına suda çözünebilir bileşiklerin eklenmesi selüloz zincirlerinin biyosentezini ve polimer yapısını etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada N-asetil glukozamin (GlcNAc) varlığında bakteriyel selüloz kültürasyonu sonucunda GlcNAc birimlerinin polimer yapısına eklenerek varyasyonlar meydana getirdiği ve bu sayede çok ince nanoselüloz-kitin melez membran formlarının üretiminin mümkün olduğu görülmüştür (Klemm et al., 2006). Bir diğer modifikasyon çalışmasında ise nalidiksik asit kloramfenikol (antibiyotikleri) ve dithiotreitol gibi biyoaktif organik ajanların bakteriyel selüloz kültür ortamına eklenmesi çalışılmıştır. Bunun sonucunda selüloz fiberlerin kristalizasyonu ve materyalin özellikleri değişmiştir (Yamanaka & Sugiyama, 2000). Bu çalışmalar *in situ* modifikasyon ile suda çözünebilir maddelerin selüloz üretimi esnasında selüloz zincir yapısına katılabildiğini ve üretim ile eşzamanlı biyolojik bir kompozit malzeme oluşturmanın mümkün olduğunu göstermektedir.

Dubey ve arkadaşları (2005) bakteriyel selüloz yüzeyine kitosan emdirerek

post modifikasyon yapmışlar ve ağırlıkça %2-8 arasında kitosan içeren kompozitler elde etmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen modifiye malzemenin EtOH/H<sub>2</sub>O azeotrop karışımlarının pervaporatif ayırımında kullanılabileceğini de göstermişlerdir. Ayrıca bu yeni kompozit malzemenin biyolojik olarak parçalanabilir, alkol, keton, aldehit, hidrokarbon, eter gibi çözeltilere karşı en az, seyreltik asit/baz çözeltilerine olduğu kadar dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise iki doğal polimer olarak bakteriyel selüloz ve jelatin kullanarak yüksek mekanik dayanıma sahip çift ağ yapılı (DN:Double Network) hidrojel oluşturulmuştur (Nakayama et al., 2004). Üretim sonrası yapılan modifikasyonlarla BS'nin bazı uygulamalar için istenen biyobozunurluğa getirildiği de rapor edilmiştir (Klemm vd. 2006). Bakteriyel selülozun bir başka bileşik ile post modifikasyonunda; jelatin gibi albuminoitler, farklı monomer ve sentetik polimerler, metaller, metal oksitler ve inorganik liflerin kullanımı üzerine çalışmalar yapılmıştır (Bkz. Tablo 1). Bu bileşiklerin bakteriyel selüloz ile modifikasyonu sonucunda sıradan fiber bazlı ürünlerle karşılaştırıldığında farklı özelliklere sahip yeni biyomalzemeler elde edilebilmiştir.

Kızıldaş ve arkadaşları (2015) BS üretiminde *in situ* modifikasyon yaklaşımı ile pullu grafit nanoplateletler (xGnP) ve nanokil (Nc) nanopartiküllerini BS ile birleştirerek yeni bir nanomateryal üretimi ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Nanopartiküller BS matriksi içerisinde gömülü olarak iyi bir dağılım sergilemiş ve malzemenin termal stabilitesini arttırmıştır.

Wang ve arkadaşları (2015) BS nanofiber membranlarını kaplama, yıkama ve çapraz bağlama yöntemleri ile polietilenamin (PEI) ve gliserol diglisid eter solüsyonu ile modifiye etmişlerdir. Modifiye BS/PEI kompoziti Cu<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+2</sup> iyonları için mükemmel bir absorpsiyon kapasitesi göstermiştir. Bu çalışma ile



modifiye BS'nin atık su arıtma uygulamasında kullanılması için potansiyel bir aday olduğunu göstermişlerdir.

Culebras ve arkadaşları (2015) poly-L-lizin ve kollajen ile yaptıkları çalışmada bu iki malzemeyi BS nanofiberlerine ayrı ayrı eklemişlerdir. Yapılan yüzey modifikasyonundan sonra Çin hamsterı yumurta hücreleri ile yaptıkları *in vitro* çalışmalarda BS yüzeyinde hücre canlılığının ve yaşayabilirliğinin standart polisitren kaplı hücre kültür kapları ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Nandgaonkar ve arkadaşları (2014) *in situ* biyosentez metodu ile indirgenmiş grafen oksit ve BS'den oluşan kontrol edilebilir kompozitler oluşturmuşlardır. Yapının basitliği ve toksik olmaması bu kompoziti biyomedikal ve biyoelektronik uygulamalarında yeni bir biyouyumlu malzeme olarak sunmaktadır.

Blaker ve arkadaşları (2014) polilaktik asidin (PLA) özelliklerini geliştirmek için eriyik-eğirme (melt spinning) teknikleri ile PLA/nanoselüloz kompozit fiberlerini geliştirmişlerdir. BS polimerin viskozitesini arttırmıştır ve BS'nin varlığı polilaktik asit kristallerinin büyümesini arttırmıştır.

Lopes ve arkadaşları (2014) sabit koşullar altında BS hibrit membranlarının oluşumu açısından hyaluronik asitin BS üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Hyaluronik asit fermentasyon prosesine ilk gün (BC-T0), üçüncü gün (BC-T3) ve altıncı gün (BC-T6) olmak üzere 3 farklı zamanda eklenmiştir. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ve NMR (Nuclear Magnetic Resonance) analizleri ile BS membranlarında hyaluronik asit varlığı tespit edilmiştir. BS/hyaluronik asit membranlarının yüzey enerjisi hesaplanarak üçüncü ve altıncı günlerde hyaluronik asit eklenmesi sonucunda daha hidrofilik ve termal yönden daha kararlı materyallerin üretimi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar

BS/hyaluronik asit hibrit membranlarının *in situ* üretilebilirliğini kanıtlamaktadır.

Pavaloiu ve arkadaşları (2014) kontrollü ilaç salımı için poli vinil alkol – kitosan ve bakteriyel selülozdan oluşan bir kompozit film üretmişlerdir. Tek ve çok katmanlı bu kompozit filmler model ilaç olarak ibuprofen sodyum tuzu kullanılarak denenmiştir. Sonuçlar bu kompozitlerin biyopolimerik taşıyıcı olarak ilaç salım uygulamalarında kullanılabilirliğini göstermiştir.

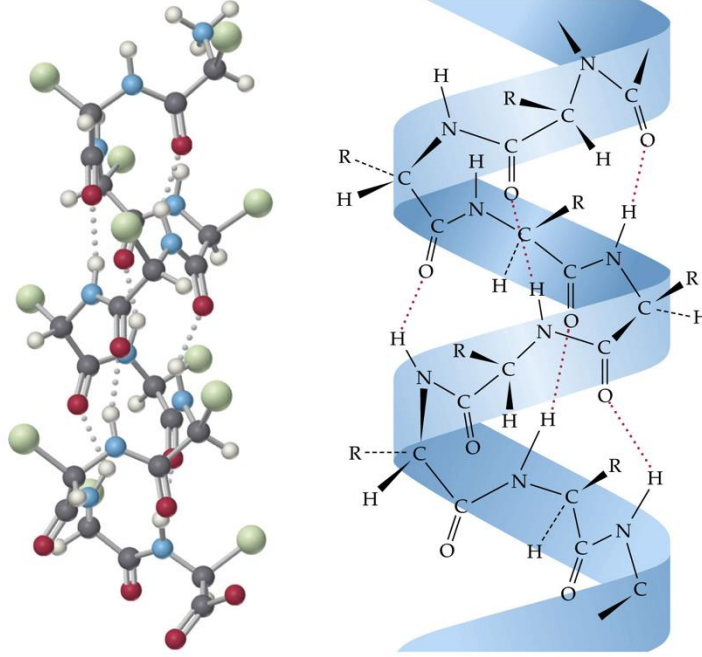
Li ve arkadaşları (2014) BS/hyaluronan nanokompozit biyomalzemesi üzerine yaptıkları çalışmada birleştirme yöntemi olarak emdirme (impregnasyon) kullanarak 3 boyutlu BS/hyaluronan üretmişlerdir. BS yapısına hyaluronan eklemeye bu yöntem başarılı olmuş ve kontrol BS ile karşılaştırıldığında kompozit biyomalzemenin termogravimetrik analizleri daha iyi sonuçlar vermiştir. Hyaluronanın iyileştirmeye olan olumlu etkisi de düşünüldüğünde bu kompozitin yara kaplama malzemesi olarak deri doku mühendisliğinde kullanım potansiyelini vurgulamışlardır.

**Tablo1:** 2008 yılından bu yana medikal amaçlı yapılan bakteriyel selüloz modifikasyonları (Lin et al., (2013)'den modifiye edilmiştir).

<b>Modifikasyon bileşeni</b>	<b>Uygulama</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Hidroksiapatit ve jelatin</b>	Su tutma kapasitesinde azalma ve yüzey özellikleri ile mekanik dayanımında artma	(Jing et al., 2013)
<b>Altın nanopartiküller</b>	Biyosensör üretimi ve enzim immobilizasyonunda kalıp olarak kullanımı	(W. Wang et al., 2011)
<b>Nikel Nanopartiküller</b>	Manyetografik baskıda özelliklerinin geliştirilmesi manyetik doku iskelesi yapımı	(Thiruvengadam & Vitta, 2013)
<b>Gümüş Nanopartiküller</b>	Antimikrobiyal özelliği ile yara örtüsü olarak BS modifikasyonu	(Ifuku, et al., 2009), (Barud et al., 2011)
<b>Karboksimetil selüloz</b>	BS'nin malzeme özelliklerinin modifikasyonu	(Cheng, Catchmark, & Demirci, 2011; Huang, Chen, Lin, Hsu, & Chen, 2010)
<b>Protein - peptid</b>	Selülaz ile modifikasyon ve biyobozunurluğun pH değişikliği ile kontrolü. Antimikrobiyal film geliştirilmesi	Shi et al. (2012), Saska et al.(2012).
<b>Poli-laktik asit</b>	Malzemenin mekanik özelliklerinin geliştirilmesi	Quero et al. (2010)
<b>Kitosan</b>	BS'a hücrelerin adezyonunun artırılması ve doku iskelelerinde hücre immobilizasyonunun geliştirilmesi	Kingkaew et al. (2010)
<b>Hidroksiapatit</b>	Hücre çoğalmasını destekleyen potansiyel doku iskelelerinin geliştirilmesi	(Grande, Torres, Gomez, & Carmen Bañó, 2009; Jing et al., 2013)
<b>İlaçlar</b>	BS'ye ilaç yüklemesi ile ilaç taşıyıcı özellikte yara örtü materyali geliştirilmesi	(Nguyen et al. 2008)
<b>Hyaluronan</b>	Daha hidrofilik ve termal yönden daha stabil materyallerin üretimi Yara kaplamam malzemesi olarak deri doku mühendisliğinde	(Li, Qing, Zhou, & Yang, 2014; Lopes, Riegel-Vidotti, Grein, Tischer, & Faria-Tischer, 2014)
<b>Grafen oksit</b>	Biyomedikal ve biyoelektronik uygulamalarında	(Nandgaonkar et al., 2014)
<b>Poli-vinil-alkol, Kitosan</b>	Biyopolimerik taşıyıcı olarak ilaç salım uygulamalarında	(Pavaloiu, Stoica-Guzun, Stroescu, Jinga, & Dobre, 2014)
<b>Poly-l-lizin Kolajen</b>	CHO hücreleri canlılık ve adezyonunun artırılması	(Culebras et al., 2015)
<b>Polietilenamin - Gliserol diglisid eter</b>	Cu <sup>+2</sup> ve Pb <sup>+2</sup> iyonları için absorpsiyon kapasitesi artırma Atık su arıtma uygulaması	(J. Wang et al., 2015)
<b>xGnP – NC Nanopartikülleri</b>	Yeni nanomateryal üretimi	(Erbaş Kızıltas, Kızıltas, Blumentritt, & Gardner, 2015)

## 2.4. Keratin

İnsan keratini epitelyumun tipik ara filament fibröz proteinidir. Keratin filamentleri yapısal olarak çok sağlamdırlar ve suda çözünmezler (Moll et al., 2008).



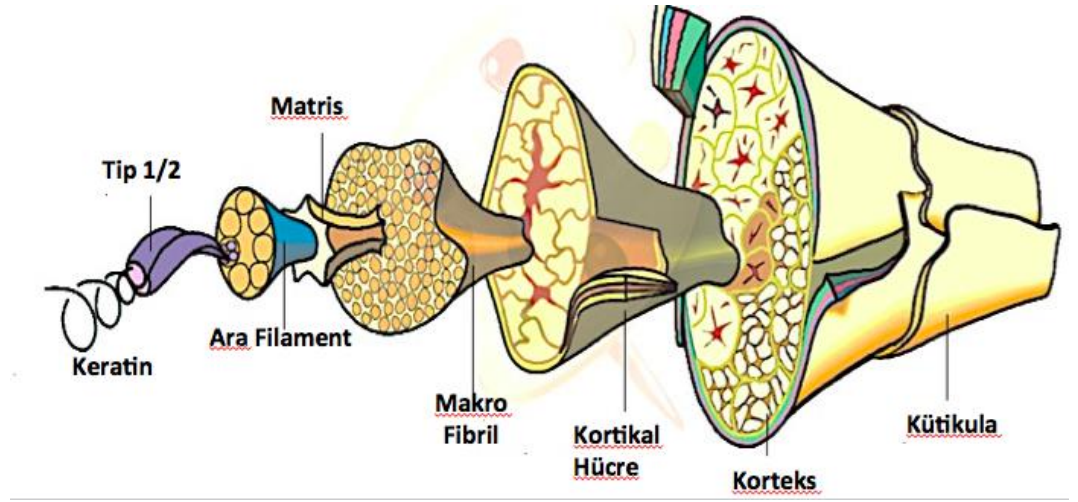
**Şekil.5** Keratinin moleküler yapısı “The Role of Chemistry in History” (Dickinson University)

Tez kapsamında kullanılan keratin, çeşitli dokulardan izole edilebilen yapısal bir proteindir. “Yumuşak” keratinler epitelyal dokularda bulunan hücre iskelet bileşeni iken “sert” keratinler saç, tırnak ve tüy gibi koruyucu dokularda bulunurlar. Sert keratin 30 yıldan fazladır biyomalzeme araştırmalarının konusu olmuştur (Hill et al., 2010).

Keratin çok fazla sistein aminoasidi disülfid bağlarını içermektedir. Disülfid bağları yapısal proteinlerin en önemli elemanlarıdır çünkü güçlü kovalent bağ oluştururlar. İnsan saçı % 65-95 oranında keratin içerir ve bunun %14’ü sistein

aminoasitidir. Aynı zamanda keratin gibi fibröz (ipliksi) proteinler disülfid bağları ve molekül içi hidrojen bağları sebebiyle çözünmezliğe sahiptir (Rouse & Van Dyke, 2010).

Saç fiberleri sert keratinlerin çapraz bağlanmasıyla uzayarak oluşmuş keratinize yapılardır. Her fiber üç temel tabakadan oluşmaktadır: Kütikula, korteks ve medulla. Kütikula tabakası birincil olarak, saç fiberini kimyasal ve fiziksel hasardan koruma fonksiyonu olan beta-keratin içerir. Saç fiberinin temel maddesi keratin filamentlerini içeren pek çok uzayan şekilli hücrelerden oluşan korteks olarak adlandırılır. Saç fiberinin tam ortasında gevşek bağlı keratinize hücrelerden oluşan ve medulla (öz bölge) olarak adlandırılan bir bölge vardır (Karthikeyan et al., 2007) (Bkz. Şekil. 6).



Şekil.6 Saç fiberinin hiyerarşik yapısı (Hill et al., 2010)

Saç fiber korteksinin içerisinde iki temel protein grubu vardır: (1) Düşük sülfür içerikli “alfa” keratinler ( MA: 40 – 60 kDa) , (2) yüksek sülfürlü matriks proteinleri (MA: 10-25 kDa). Toplamda saç fiberi % 50 - 60 oranında alfa keratin ve %20 – 30 matriks proteinlerinde oluşur. Alfa keratinlerin bir araya gelmesiyle, saç fiberine sertlik veren ve keratin ara filamentleri (KIFs) olarak bilinen

mikrofibröz yapıları oluşturur (Yu et al., 1993).

#### **2.4.1. Keratin içeren biyomalzemelerin biyomedikal uygulamaları**

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca saç ve yün liflerinden keratin proteininin özütlenmesi saflaştırılması ve karakterizasyonundaki gelişmeler keratin temelli biyomalzemelerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Pek çok doğal olarak üretilmiş biyomolekül gibi keratin de biyolojik aktivite ve biyobozunurluk gibi yapısal özelliklere sahiptir. Aynı zamanda özütlenen keratin, hücresel tanıma ve davranışları düzenleyebilen kendiliğinden yapılar oluşturabilme yeteneğine sahiptir (self assembly). Keratin gibi substratlar tanımlı üç boyutlu mikro yapıları ile hücre çoğalmasını ve doku oluşumunu destekleme gibi doku iskelesi biyomalzemeleri için önemli özelliklere sahiptir (Rouse & Van Dyke, 2010).

Özütlenen yün keratin proteinlerinin gözenekli ve lifli doku iskelelerinin içinde kendiliğinden polimerizasyonunda içsel bir yeteneği vardır. Ayrıca yapılan bir çalışmada yün ve insan saçından elde edilmiş keratinin lösin-aspartik asit-valin (LDV) ve glutamik asit-aspartik asit-serin (EDS) molekülleri gibi hücre bağlanmasını destekleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Tanabe et al., 2002).

Keratin; hücrenin penetrasyonu, bağlanması ve yayılmasına ortam sağlayan, uygun üç boyutlu bir matris oluşturduğu ve diğer ara filamentler gibi, keratinin de hücresel davranış düzenleme işlevlerine katıldığı düşünülmektedir (Izawa & Inagaki, 2006; Magin et al., 2007).

Biyomalzeme olarak keratin temelli hidrojellerin fare periferik sinir yaralanma modelinde rejenerasyonu kolaylaştıran nöroindüktif etkisi olduğu çalışılmış ve biyomedikal alandaki uygulama potansiyeli gösterilmiştir (Sierpinski

et al., 2008).

İnsan saç keratini hücre proliferasyonunu ve Schwann hücrelerinin önemli nöronal işlevleri için gerekli olan özel genlerin ifadesini arttırmıştır (Apel et al., 2008).

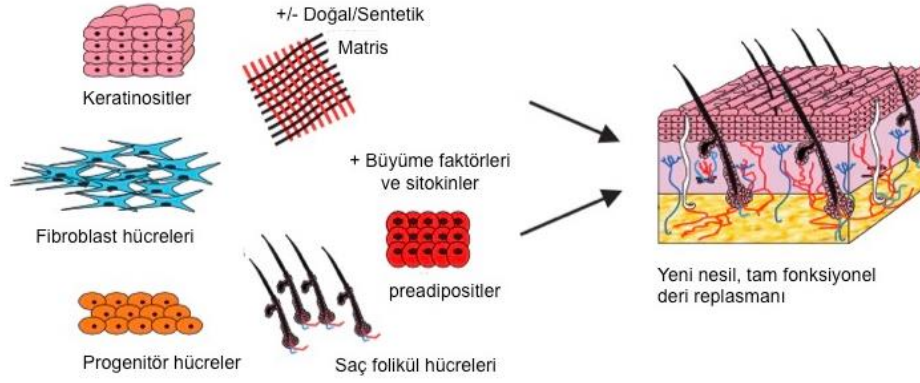
İnsan saçı kaynaklı keratinden elde ettikleri biyomalzemeyi farelere enjekte etmişler yaptıkları degradasyon testinde keratinin biyodegradasyon profilini çıkararak keratininin bir ayda yaklaşık %50 oranında bozunduğunu rapor etmişlerdir (Shen et al., 2011).

## **2.5. Deri**

Deri, vücudu travma ve patojenlere karşı koruyan en büyük organımızdır. Deri epidermis, dermis ve deri altı dokusu-pannikulus olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır (Bkz Şekil.7)

Epidermis; derinin en dış tabakasıdır ve çoğunlukla keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Damarsal yapılar içermez. Ayrıca epidermisin su içeriği deri kalınlığını değiştiren bir faktördür. Bu durum BS'nin su tutma kapasitesi ve su içeriğine göre kalınlığının değişmesiyle paralellik göstermektedir.

Dermis; epidermal tabakanın altında, derinin ikinci tabakasıdır. Dermis vücut bölgesine göre değişmekle birlikte 2-4 mm kalınlığındadır. Dermiste hücre arası destek dokusu ve fibroblast hücreleri, sinirler, damarlar, lenfatik yapılar, ter ve yağ bezleri, tırnak ve kıl folikülleri yer almaktadır. Dermiste ana hücreler fibroblastlardır.



**Şekil.7** Tam bir fonksiyonel deri replasmanı için gereken hücresel yapılar (Metcalf & Ferguson, 2007)

Deri kaybı; sağlık problemlerinin en eskisi, en maliyetlisi ve en sık rastlanılanıdır. Derin ve büyük yaralarda yara örtüsü gibi malzemeler yeterli gelmemekte deri nakli veya yapay deri kullanımı gerekmektedir. Amerika’da yılda yaklaşık 2,4 milyon yanık yaralanması raporlanmıştır. Bunların yaklaşık 650.000’i ayakta tedavi edilmekte, 75.000 tanesi ise hastaneye yatırılmaktadır. Hastaneye yatırılan yanık vakalarının yaklaşık 20.000 tanesi vücut yüzeyinin en az %25’ini içeren yanıklara sahiptir. Yanık vakalarında 8.000-12.000 arasında kişi ölürken yaklaşık 1 milyon kişi kalıcı deri hasarı ve sakatlıkla hayatlarına devam etmektedirler. Derinin yaklaşık %60’nın yandığı durumlarda kalıcı olarak yenilenme mümkün olmadığı için sıklıkla hastanın yaşamadığı görülmektedir (Beele et al. 2002 ; Schultz & Champoux, 2008). Mevcut bu istatistikler deri yerine geçebilecek, derinin kendini tamir etmesine olanak sağlayacak bir malzemeye olan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Özellikle yanık yaralarında su kaybı ve mikrobiyal kontaminasyon aşılması gereken en önemli iki parametreyi oluşturmaktadır. BS, membran yapısı sayesinde o bölgeyi izole etme ve yüksek su



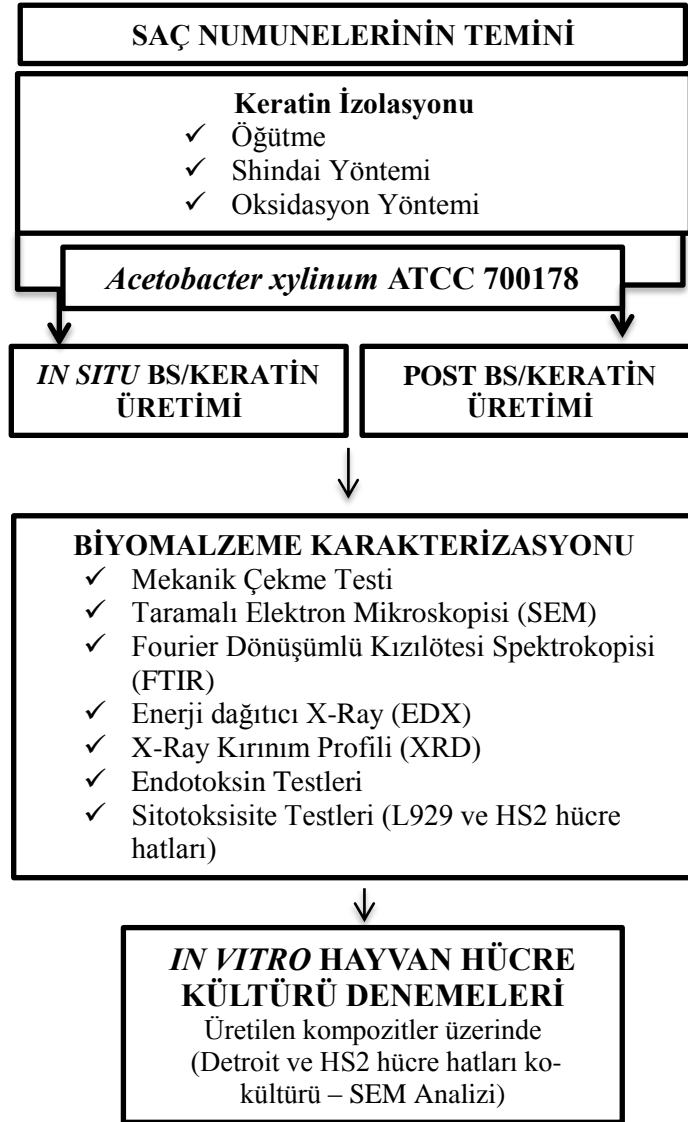
tutma kapasitesi ile gerekli nemi sağlama özelliğindedir

İnsan keratinosit ve fibroblast hücrelerinin bakteriyel selüloz film üzerinde tutunma ve büyümesi üzerine yapılan bir çalışmada, tutunmanın ardından bu hücrelerin bakteriyel selüloz film üzerinde yaşama yüzdeleri polisitren kültür yüzeyi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta sadece keratinositlerin BS film üzerinde yayılma gösterdiği belirlenmiştir. Üreme kabiliyetleri olan fibroblastlar ise sadece birbirleri ile kümelenme göstermiş ancak selüloz yüzeyine yayılmamışlardır (Sanchavanakit et al., 2006).

Bu tez kapsamında fibroblastların BS yüzeyine adhezyonunun düşük olmasından kaynaklanan eksikliğin hücre bağlanması ve yayılmasına olanak sağlayan keratin ile geliştirilmesi amaçlanmıştır. İnsan deri dokusu keratinositlere ve fibroblastik hücrelere sahiptir. Yapay deri olarak kullanılacak bir biyomalzemenin bu iki hücre tipi için de uygun olması gerektiğinden keratin içeren BS kompozitinin kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

Tez süresince izlenen yöntem akışı Şekil 8'deki şemada özetlenmiştir.



Şekil.8 Materyal- metot genel şeması

İzmir yerel kuaförlerinden boyasız ve beyaz olmayan sağlıklı atık saçlar toplandı. Bu saçlar insan kaynaklı olduğu için çalışma öncesinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (13-12.1/12) izin alındı.

Keratin izolasyonu için uygulanacak üç farklı yöntem öncesinde temin edilen tüm saç örnekleri % 0,5 sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yıkanarak

temizlendikten sonra destile su ile durulanıp kurutuldu.

### 3.1. Öğütme

Bu yöntemde kurumuş olan saç örnekleri laboratuvarımızdaki sanayi tipi bıçaklı öğütücü kullanılarak 5 dakika öğütüldü (Bkz. Şekil.9). Bu yöntem ile herhangi bir kimyasal süreç olmadan sadece fiziksel olarak saçın boyutu küçültüldü.



Şekil.9 Sanayi tipi bıçaklı öğütücü

#### 3.1.1. *A. xylinum* için keratin kullanım denemesi

Çalışmada kullanacağımız *A. xylinum*'un keratin proteinini besin maddesi olarak kullanıp kullanmadığını göstermek amacıyla içeriğinde sadece öğütülmüş saç (5 g/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2.75 g/l) ve sitrik asit (1.15 g/l) (pH: 5.00) içeren ortamda üretim denemesi gerçekleştirildi.

Denemede keratini parçalayarak besin olarak kullandığı bilinen pozitif kontrol olarak *Streptomyces* sp. 2M21 suşu kullanıldı. İçeriğinde (5 g/l)  $\text{CaCO}_3$ , (3 g/l)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , (0,2 g/l)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (5g/l) NaCl ve keratin kaynağı olarak ise 5g/l saç içeren besin ortamı bu deneme için kullanıldı (Demir et al., 2015).

### 3.2. Shindai Özütlemesi

Bu izolasyon yönteminde sırasıyla, ön işlemden geçmiş olan saç örnekleri; saçın içerdiği dış lipitleri uzaklaştırmak amacıyla 12 saat boyunca çeker ocak içerisinde oda sıcaklığında n-hegzan (Sigma) içinde bekletildi. Bu işlemin ardından fazla hegzanın uzaklaşması için saç örnekleri buharlaşmaya bırakıldı. Hegzanı uzaklaşan ve kuruyan saçlar makas yardımıyla daha küçük parçalara kesilerek ve sanayi tipi öğütücü ile 1 dakika kadar öğütüldü. Elde edilen 400 gr saç örneği Ege Üniversitesi İnşaat Mühendisliği bünyesinde bulunan bilyalı değirmen kullanılarak (1devir/sn) hızında 26000 devirde öğütüldü. Bu işlemin ardından saçlar kabaca %90 oranında toz haline getirildi (Bkz. Şekil.10).



**Şekil.10** a) Bilyalı değirmene girmeden önceki saç örneklerinin görünümü b) Kullanılan bilyalı değirmen c) Öğütme sonrası toz haline gelen saçların görünümü

Toz haline getirilen saç numunesinden 20 g saç için; 25 mM tris (pH: 8,5),

2,6 M tiyoüre, 5M üre ve %5 v/v oranında 2- $\beta$ - merkaptoetanol içeren 400 ml özütleme çözeltisi içerisine eklendi. Saçlar bu çözelti içerisinde 50 °C'de 72 saat boyunca özütlendi. Özütleme bittiğinde karışım 4500 g'de 15 dakika santrifüjlenerek ve üst sıvı por çapı 2,5  $\mu$ m olan filtre kâğıdı kullanılarak filtre edildi. Elde edilen özüte Shindai özütü denilmektedir (Nakamura et al., 2002). Bu özüt 100 ml özüt / 5000 ml destile su oranında MWCO (Molecular Weight Cut Off) 6-8 kDa olan diyaliz membran kullanılarak 10 gün boyunca 20 - 25 °C'de diyaliz edildi (Bkz. Şekil 11). Diyaliz suyu her 12 saatte bir değiştirilerek pH kontrolü ile keratin özütünde hiçbir tuz ya da 2- $\beta$ - merkaptoetanol kalmayınca kadar tekrarlandı. 2- $\beta$ - merkaptoetanol kontrolü Ellman's ajanı kullanılarak kalorimetrik olarak da kontrol edildi. Son olarak keratin diyalizatından kaba partiküllerinin uzaklaştırılması amacıyla örnekler 9000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve keratin proteini kullanıma hazır hale getirildi (pH: 6.96 – 7.00).



**Şekil.11** Shindai özütlemesi sonrası filtrasyon ve diyaliz basamakları

### 3.3. Oksidasyon Yöntemi

Patentlenmiş olan bu yöntemde keratinin içerdiği sülfid bağları kırılarak peptid grupları oluşturulmaktadır. Destile su, asetik asit ve hidrojen peroksit (1:1:1) karışımı ile elde edilen %4'lük 500 ml perasetik asit solüsyonunda, 30 g

öğütülmüş saç 2 saat kaynatıldı. Okside olan saçlar vakumlu filtrasyon sistemi kullanılarak ayrıldı ve süzülen kısım alındı.

Süzüntü 40 °C’de ve 5-10 mm Hg basınçta vakum distilasyonu ile viskoz bir şurup haline getirilerek 0,1 ml 3-4 N amonyum hidroksit ile nötralize edildi (pH: 7,0 ) (Van Dyke et al. 2001).

### **3.4. Keratin Stoklama, Protein Tayini**

#### **3.4.1. Keratin proteinin saklanması**

Shindai ekstraksiyonundan elde edilen tüm keratin diyalizatı öncelikle laminar hava akışlı kabin içerisinde 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edildi. Steril Eppendorflara 2’şer ml olarak porsiyonlanarak -80 °C’de kullanımına kadar stoklandı.

#### **3.4.2. Keratin protein tayini**

Shindai ekstraksiyonundan elde edilen keratin diyalizatının protein tayini için kuru ağırlık ölçümü ve Bradford analizi yöntemleri kullanıldı.

##### **3.4.2.1. Kuru ağırlık ölçümü**

Shindai özütünün mililitresinde kaç gram keratin olduğunun tespiti için öncelikle kuru ağırlık ölçümü yapıldı. Önceden darası alınmış üç farklı kaba 1’er ml shindai özütü eklendi ve 50°C’de 1 gece kurutuldu. Hassas terazi ile ağırlık ölçümleri yapıldı.

##### **3.4.2.2. Bradford protein analizi**

Bu analiz Bradford protein kiti (MERCK) ile gerçekleştirildi. Test 0,1 – 1,4

mg/ml derişim aralığında gerçekleştirildi. Öncelikle sığır serum albumini (BSA) ile standart protein çözelti hazırlandı ve kalibrasyon eğrisi çıkarıldı.

Standart özelti için 100 mg BSA tartılarak 10 ml ultra saf su içinde çözdürüldü ve ana protein stoğu oluşturuldu. Bu stoktan 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 mg/ml derişimlerinde seri seyreltmeler yapıldı. Standart ölçüm için her bir stoktan 0,05 ml alınıp 2,5 ml Bradford özeltisi ile karıştırlarak spektrofotometrik ölçüm küvetlerinde oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek 595 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Kör olarak 50µl ultra saf su eklenen 2,5 ml Bradford ajanı kullanıldı.

Shindai ve oksidasyon yöntemleri ile elde edilen keratin örnekleri seyreltilerek, yukarıda belirtilen basamaklar ile protein tayini gerçekleştirildi.

### **3.5. Keratin Karakterizasyonu**

#### **3.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS – PAGE)**

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), özütleme ile elde edilen keratin proteininin saflık kontrolü ve moleköl kütesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SDS-PAGE metodu; Laemmli metoduna göre gerçekleştirildi (Laemmli, 1996). SDS-PAGE için mini jel sistemi kullanıldı (Biorad, Amerika). SDS- PAGE % 10 oranında akrilamid kullanılarak hazırlanıp döküldü. Protein moleköler ağırlık standardı olarak PageRuler markörü (Thermo) (10-250 kDa) kullanıldı.

**Tablo 2.** %12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

	Ayrırma-Jeli (%12)	Düzenleyici Jel (%4)
Destile su	3,4	6,1
Akrilamid/Bisakrilamid (ml)	4	1,3
Jel Tamponu (ml)	2,5	2,5
%10 SDS (ml)	0,1	0,1
%10 APS ( $\mu$ l)	50	50
TEMED ( $\mu$ l)	5	5

Protein derişimi 1 mg/ml olarak ayarlanan Shindai özütü Laemmli tamponu ile seyreltildi. Bu tampon %4 SDS, %20 gliserol, %10 2- $\beta$ - merkaptoetanol, %0.004 bromofenol mavisi ve 0.125M Tris-HCl ile hazırlandı. Örnekler akrilamid jel üzerinde önce 80 V, 30 dk ardından 100 Volt (V) 100 dk yürütüldü.

### 3.5.2. Zeta-Sizer parçacık boyut ölçümü

İnsan saçından izole edilen keratin protein fraksiyonu için gerçekleştirilen bir diğer karakterizasyon ise parçacık boyut ölçümü olmuştur. Bu analiz için bölümümüz bünyesinde süperkritik akışkan laboratuvarında yer alan Zetasizer Nano ZS (Malvern) cihazı kullanıldı.

### 3.5.3. Keratin yapısal ve elementel özelliklerinin belirlenmesi

Shindai özütlemesi ile elde edilen keratin diyalizati dondurularak kurutuldu. Ardından bölüm bünyesinde algal biyoyakıt laboratuvarında bulunan FTIR cihazı ile kimyasal bağ analizi gerçekleştirildi. SEM (Scanning Electron Microscopy), EDX (Energy Dispersive X-Ray) ve XRD (X-Ray Diffraction) için İYTE MAM'dan (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü- Malzeme Araştırma Merkezi hizmet alımı gerçekleştirildi.



### 3.6. Keratin Modifikasyonu ile BS Kompozit Üretimi

#### 3.6.1. Mikroorganizma ve besin ortamı

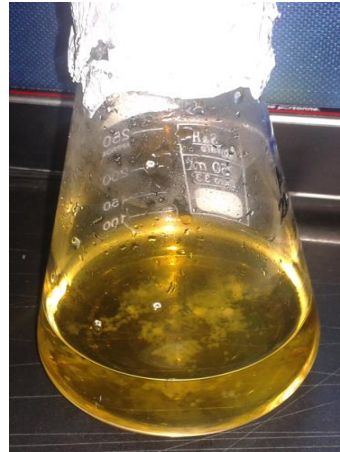
Bakteriyel selüloz üretiminde mikroorganizma olarak Endüstriyel Mikrobiyoloji laboratuvarımızın hücre stoklarından *Acetobacter xylinum* ATCC 700178 suşu ve optimize edilmiş Hestrin & Schramm (HS) besin ortamı kullanıldı.

**Tablo 3.** HS besin ortamı (pH: 5) (Hestrin ve Schramm, 1954)

Bileşen	Miktar (g/l)
Glukoz	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.7
Pepton	5
Maya özütü	5
Sitrik Asit	1.15

#### 3.6.2. Organizma aktifleştirme

Stoktan (-20 °C) çıkartılan *A. xylinum*, HS besin ortamı ile 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızında 24-36 saat inkübe edilerek inokulasyon için aşı kültürü elde edildi (Bkz. Şekil 12).

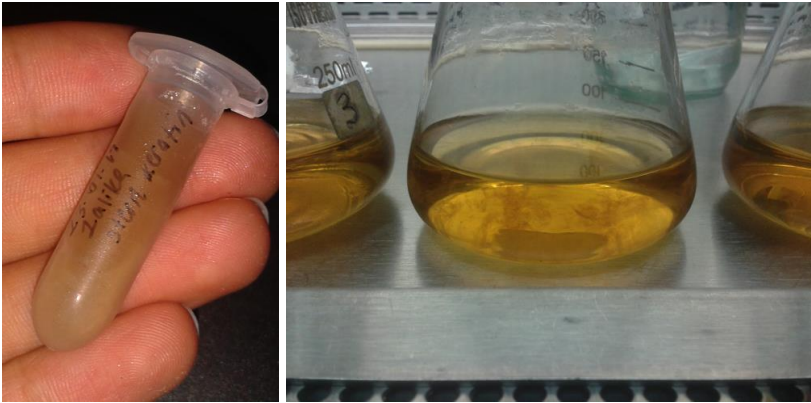


**Şekil.12** Aktifleştirilen *A. xylinum* kültürü

#### 3.6.3. *In situ* Keratin – BS modifikasyonu

Keratin içeren kompozit BS ve kontrol BS üretimleri için 250 ml’lik

erlenlerde 100 ml çalışma hacmi kullanıldı. Aktifleştirilen aşı kültürlerinden %2 v/v inokulasyon oranında üretim erlenlerine ekim yapıldı. Deney planı çerçevesinde farklı derişimlerde keratin içeren HS besin ortamı kullanılarak üretim başlatıldı. Statik kültürde 5 gün inkübasyon sonrası BS membranları kültürün sıvı-hava ara yüzeyinde üretildi. Yapılan denemelerde 3 erlen keratin içermeyen HS besin ortamı kontrol olarak kullanıldı. Üçer kontrollü 5 farklı derişimde keratin içeren erlenlerde üretim yapıldı. Keratin içeriği Shindai özütlemesi ile elde edilen protein fraksiyonundan Bradford ile belirlenen mililitredeki protein derişimine göre %1, %2, %3 w/v oranlarında hesaplanarak belirlendi. Keratin HS besin ortamına, ortam otoklavlandıktan sonra laminar hava akışlı kabinde sonradan eklendi. Farklı derişimlerde eklenen keratin solüsyonları HS besin ortamı içerisinde çökelmeden askıda kaldı (Bkz. Şekil 13).

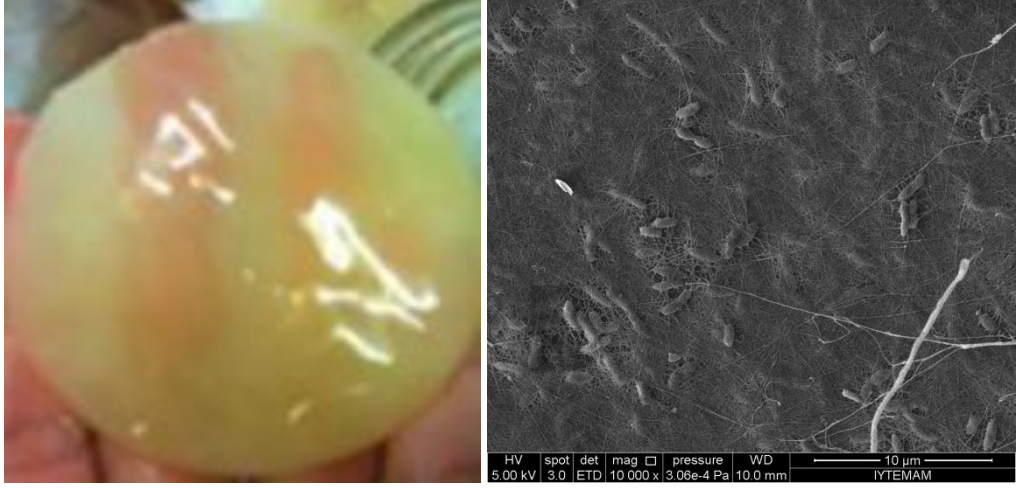


**Şekil.13** -80 °C'den çözdürülmüş keratin ve HS besin ortamı içerisindeki görünümü

#### **3.6.4. BS/keratin ürün saflaştırma**

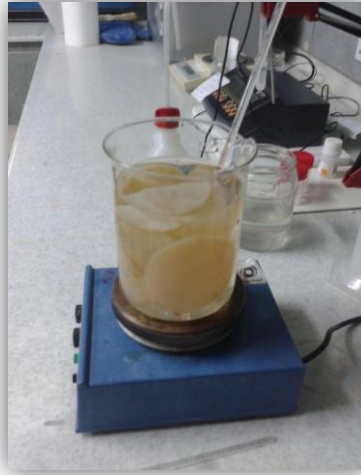
Bakteriyel selülozun besin ortamı artıklarından ve mikrobiyal hücre kalıntılarında uzaklaştırılması için temizlenmesi gerekmektedir.

Hasat sırasında BS üretim ortamından alındığında içerdiği safsızlıklar nedeniyle sarımsı bir renktedir (Bkz. Şekil. 14).



**Şekil.14** Saflaştırma öncesi BS'nin makro ve SEM görünümü

BS için yaygın olarak kullanılan saflaştırma yöntemi seyreltilmiş NaOH alkali çözeltisi ile kaynatma ve destile su ile durulama prensibine dayanır. Çalışmada hasat edilen BS örnekleri öncelikle akan çeşme suyu altında ardından 2-3 kez destile su ile kaba besin ortamı artıklarından arınması için yıkandı. Ardından hazırlanan 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde 70-90 °C' de 2 saat kaynatıldı (Bkz. Şekil. 15).



**Şekil.15** BS saflaştırma işlemi

Bu yıkamada süre BS'nin sarımsı görünümünün şeffaf beyaz görünüme ulaşması durumuna göre belirlendi. Alkali yıkamanın ardından BS örneklerinin

pH değeri nötr olana kadar destile su ile durulama amaçlı seri yıkamalara devam edildi

### **3.6.5. BS sterilizasyonu**

İleri deneme ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere yıkanan BS membranları, 1,5 x 1,5 cm boyutlarında bistüri yardımı ile kesildi. Örnekler destile su içerisinde 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Tüm örnekler liyofilize edilmiş ve kullanıma hazır hale getirildi.

### **3.6.6. Post modifikasyon ile BS/keratin kompozit üretimi**

Keratin içeren bakteriyel selüloz tabanlı kompozit biyomalzeme üretimi için düşünülen bir diğer modifikasyon yöntemi ise BS membranların üretim sonrası keratin ile birleştirilmesi olmuştur. Bu yöntem için saflaştırıldıktan sonra kesilen ve steril edilen ıslak BS örneklerinin laminar akışlı kabinde steril şartlar altında absorbladığı suyun bir kısmı filtre kağıdı yardımıyla alındı. Ardından Shindai özütlemesi ile elde edilen keratin diyalizati 0,1 ml /cm<sup>2</sup> (0,366 mg / cm<sup>2</sup>) olacak şekilde BS örneklerinin bir yüzeyine emdirmek suretiyle yüklendi. Bu şekilde keratin yüklemesi yapılan örnekler fazla bekletilmeden -80°C'de donduruldu ve liyofilizasyon yapılarak post modifikasyon tamamlandı.

## **3.7. BS/keratin Kompozitinin Karakterizasyonu**

BS kontrol, *in situ* modifikasyon ile üretilen BS/keratin kompozit ve post modifikasyon ile üretilen BS/keratin örneklerinin hepsi için Fourier kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), X- Işınları kırınımı (XRD) ve enerji ayırıcı X- ışınları (EDX) analizleri ile yapısal karakterizasyonları

gerçekleştirildi. Tüm karakterizasyon işlemlerinde önceden liyofilize edilen örnekler kullanıldı.

### **3.7.1. BS ve BS/keratin kompozitleri için endotoksisite testi**

Limulus amebosit lisat (LAL), Food and Drug Administration (FDA), yönergelerine uygun olarak kullanıldığında “insanlara enjekte edilebilen ilaçlar (biyolojik ürünler dahil), hayvanlara enjekte edilebilen ilaçlar ve tıbbi cihazlar”ın son ürün testinin yapılması için kullanılan Pirojen Testi’nin (tavşan ateş testi) yerine geçebilmektedir. Bu test için LAL endotoksin test kitleri kullanılarak, BS ve BS/keratin kompozitlerinin endotoksin içerip içermediği; 37 °C’de 60 dakika inkübasyon sonrası endotoksinlerin varlığında lisat pıhtılaşmasına dayanan jel-pıhtı yöntemi ile analiz edildi.

Kullanılan test malzemeleri; ES-F /HS-F Limulus Amebocyte Lysate (LAL) liyofilize biçimde 5.2 mL/şişe ve LAL Miyar Su (LRW)’dur.

Standart endotoksin ya da diğer adıyla kontrol standart endotoksin (CSE) lisat duyarlılığını doğrulamak ve pozitif kontrolleri hazırlamak için kullanıldı.

Örnekler aseptik yöntemle pirojenik olmayan tüplerin içinde muhafaza edildi ve tüm pipetlemeler pirojensiz pipet uçları ile gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımının pH’si (Lizata örnek eklenmiş) 6 ile 8 arasına ayarlandı. Örnekler hazırlandıktan sonra test mümkün olduğu kadar hızlı gerçekleştirildi.

#### **3.7.1.1. Test prosedürü**

##### **- Endotoksin kontrolleri**

a) Endotoksin standart serisi: Stok endotoksin çözeltisinden taze bir seyreltme seti hazırlandı. Seyreltmeler iki katlı seyreltmenin son serisi Pyrotell

duyarlılığını ( $\lambda$ ) içine alacak şekilde hazırlandı.  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0.5\lambda$  ve  $0.25\lambda$  derişimleri Lizat duyarlılığını doğrulamak için önerilen seyreltmelerdir.

b) Pozitif kontroller: Belirli koşullar altında standart derişim serilerinin yokluğunda kullanılan pozitif kontrol derişimi  $2\lambda$  olmalıdır.

c) Pozitif ürün kontrolleri (SPK-Spike) inhibisyon kontrolleridir ve örnekten ya da standart endotoksin eklenen seyreltme örneğinden meydana gelirler. Test örneğine eklenmiş endotoksinin final derişimi  $2\lambda$  olarak ayarlandı.

#### **- Negatif kontroller**

Lal Reagent Water (LRW) negatif kontrol, test edilmiş örneklerin her bir grubuna dahil edildi. Ürünün onaylanması ya da inhibisyon/artma testi sırasında, standart endotoksini seyreltmek için kullanılan örnek ayrıca negatif kontrol olarak da kullanıldı.

#### **- Testin Gerçekleştirilmesi**

1. 0.1 mL test örneği ya da kontrol içeren her bir reaksiyon tüpüne 0.1 mL sulandırılmış Lizat eklendi. Tamamen karışmasını sağlamak için tüpler 20-30 sn vortexle karıştırıldı.

2. Reaksiyon tüpleri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda (etüve) 60 dakika süre ile bekletildi. İnkübasyon periyodu sırasında reaksiyon tüplerini sarsacak herhangi bir işlem yapılmadı. Jel oluşum reaksiyonu hassas olduğundan ani hareketlerden kaçınıldı.

3. Süre sonunda reaksiyon tüpleri bir kerede çıkarıldı ve her bir tüp değerlendirildi. Bunun için tüp tek bir düzgün hareketle ters çevrilip incelendi. Jelin oluşumu açık şekilde görülmediği sürece çevirme sırasında hareket duraklatılmadı. Tüp ters çevrildiğinde düşmeyen jel oluşumu pozitif, diğerleri ise negatif olarak değerlendirildi.

### 3.7.2. BS ve BS/keratin kompozitleri için biyodegradasyon testleri

Üretilen farklı kompozitler yapay (simüle edilmiş) vücut sıvısı (SBF, pH=7,4), ve Fosfat tampon tuzu (PBS) içinde 37°C’de çalkalayıcı etüvde bozunmaya bırakıldı. Kompozitler iki haftalık aralıklarla bozunma ortamından çıkartılarak ağırlık kaybı ile bozunma miktarları belirlendi.

**Tablo.4** SBF İçeriği (Kokubo et al., 1990)

Kimyasal adı	Miktar (g/l)
NaCl	8,035
NaHCO <sub>3</sub>	0,355
KCl	0,225
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,231
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,311
CaCl <sub>2</sub>	0,292
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072
Tris	6,118
1 Molar HCl	39 ml

Kompozit biyomalzemenin degradasyon testlerinde kullanılan simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) şu şekilde hazırlandı: İnsan kan plazması ile neredeyse eşit iyon derişimine sahip pH değeri 7,40 olan, 50 mM trishidroksi metil amino grup metan ve 45 mM HCl içeren SBF çözeltisi 36,5°C sıcaklıkta kullanıldı. Kullanılacak tüm malzemeler 1 N HCl çözeltisi, nötral deterjan ve ultra saf su ile yıkandı ve kurutuldu. 500 ml ultra saf su içeren polietilen kap içinde Tablo 4’teki reaktifler manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü. Bileşenler sırayla suya eklendi ve bu işlemde bir önceki tamamen çözüldükten sonra diğeri eklenerek işlem tamamlandı. Çözeltinin sıcaklığı su banyosu yardımı ile 36,5°C’ye pH’sı 1N HCl ile titre edilerek 7,40’a ayarlandı. Solüsyon kullanıma kadar polipropilen bir

kap içerisinde +4°C’de buzdolabında saklandı.

Literatür bilgileri çerçevesinde bozunma testi için SBF solüsyonu 36,5°C’ye ısıtıldı ve BS/keratin kompozitleri steril şartlar altında solüsyon içerisine yerleştirildi. Kontrol dahil tüm örnekler 3 tekrarlı çalışıldı ve deneme öncesi hepsinin kuru ağırlıkları ölçüldü. Ardından SBF içerisinde 4 hafta süresince 10 rpm çalkalamalı ortamda 37°C’de degradasyona bırakıldı. Her hafta örneklerin SBF sıvısından ( ≈ 3 ml) örnek alınarak, alınan kadar taze SBF çözeltisi pleylere ilave edildi. İki ve 4. haftalarda kontrol BS ve BS/keratin kompozitleri için degradasyon testi sonlandırılarak liyofilizasyon yöntemiyle kurutma yapıldı ve kuru ağırlık ölçümü alındı.

### **3.7.2.1. Degradasyon sonrası kuru ağırlık ölçümü**

SBF içerisinden 2. ve 4. haftalarda çıkartılan BS ve BS/keratin kompozit örnekleri 37°C’de 12 saat ağırlıkları sabitlenene kadar kurutuldu ve tartıldı. Ağırlık kaybı yüzdeleri;

$$w = (w_0 - w_t) / w_0 \times 100\%$$

hesabı ile belirlendi (w<sub>0</sub>: ilk kuru ağırlık, w<sub>t</sub>: t. gün kuru ağırlık) (Li et al., 2014)

### **3.7.3. Mekanik dayanım testi**

BS kontrol örnekleri ve *in situ* BS/keratin kompozit örneklerinin aynı batch üretimlerinden çekme testi için 2 x 6 cm boyutlarında örnekler kesildi. Keratin eklemesinin malzemenin mekanik dayanımı üzerindeki etkisi incelendi. Bu test için Ege Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü Mekanik Laboratuvarı bünyesinde bulunan Shimadzu marka çekme cihazı kullanıldı.



### 3.7.4. Sitotoksisite testleri

BS kontrol ve BS/keratin kompozit materyallerinin sitotoksik davranışları *in vitro* koşullarda, materyal ekstraktları kullanılarak yapılan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) ve dolaylı temas testleri ile değerlendirildi.

Tez süresince yapılan sitotoksisite testleri için, yapay deri uygulama alanları ve materyalin vücutta etkileşimde bulunacağı dokular göz önüne alınarak, *in vitro* koşullarda HS2 (insan epitel) ve L929 (fare fibroblast) hücre hatlarıyla çalışıldı.

*In vitro* sitotoksisite testleri için kullanılan HS2 ve L929 hücreleri, bölümümüz Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edildi. Bu çalışmada öncelikle HS2 ve L929 hücrelerinin çoğaltılması, *in vitro* hayvan hücre kültürü tekniklerine uygun şekilde yapıldı. HS2 ve L929 hücreleri için hücre kültür besin ortamı olarak, DMEM: HAM's F12 (Biochrom, Almanya), % 10 fetal sığır serumu (FBS; Biochrom, Almanya), % 1 L-Glutamin (Biochrom, Almanya), %0,1 penisilin/streptomisin (Biochrom, Almanya) kullanıldı.

#### 3.7.4.1. Stok hücrelerin çözündürülmesi

-196°C (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L)'de stoklanmış olan kriyo tüp çıkartılarak 37°C' deki su banyosunda çözündürüldü. Tüp içeriği besin ortamı ile santrifüj tüpüne toplanıp hücreler 1000 rpm' de 4°C' de 5 dakika santrifüjlendi. (Eppendorf, 5810 R). Ardından üst sıvı döküldü, hücre pelleti hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besin ortamı ile süspanse edildi. Süspanse haldeki hücreler flaska (Greiner, Almanya) alınıp 37°C' de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Heraeus, Heracell, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

Hücre kültürlerinin canlılıkları düzenli olarak ters faz mikroskopta (Olympus, Japonya) incelenerek takip edildi.

#### **3.7.4.2. Hücrelerin pasajlanması**

Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besin ortamı çekildikten sonra hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> içermeyen PBS ile yıkandı ve % 0,05'lik tripsin-EDTA (HyClone, USA) eklenerek 3-4 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözleendiğinde serumlu besin ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı. Ardından 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı döküldü ve santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı, besin ortamı ile süspanse edildi. Hücre süspanasyonu 1:4 oranında yeni bir flaska alınıp, üzerine taze besin ortamı koyularak kültüre devam edildi.

#### **3.7.4.3. Ekstraksiyon yöntemi**

BS kontrol Ekstraktı kalınlıkları ortalama 0,5 mm olan materyaller için 6cm<sup>2</sup>/ml oranında hazırlandı. Tüm materyallerin her iki yüzeyi de 30'ar dakika ultraviyole ışın ile sterilize edildi.

Tüm test materyalleri serum içermeyen hücre kültürü ortamında (DMEM F12), steril koşullarda 24 saat süresince 37°C'deki inkübatörde inkübasyona bırakılarak ekstrakte edildi. 24 saat sonunda elde edilen ekstraktlar 1/1 (seyreltilmemiş) ekstrakt olarak kullanıldı. Test edilen dilüsyonlar; elde edilen 1/1 ekstrakttan 1/2, 1/4, 1/8 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Test için kültüre edilen HS2 ve L929 hücreleri tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek üretildikleri flask yüzeyinden kaldırılarak hücre yoğunluğu 10<sup>5</sup> hücre/ml

olacak şekilde 96 gözlü hücre kültür kaplarında 24 saat süresince 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonunda, hazırlanan 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 oranındaki ekstraktlar, 96 gözlü hücre kültür kaplarındaki besin ortamı boşaltılarak, her bir ekstrakttan 6 tekrar olacak şekilde dilüsyonlar 100'er µl besin ortamına eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler morfolojik olarak ters faz mikroskopta incelendi.

Hücrelerin kontrolünün ardından, MTT (Sigma-Aldrich, USA) testine geçildi ve canlı hücre sayısı tespit edilerek hücre ekstraktlarının sitotoksisiteyi belirledi. Hücreler fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı ve MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) çözeltisi ile inkübe edilerek boyandı. Üst sıvı da DMSO kullanılarak formazan kristallerinin çözdürülmesi ile oluşan mor renk spektrofotometrede (SpectraMax 190, Molecular Devices), 570 nm ve 690 nm' de kalorimetrik olarak ölçüldü. Değerler hücre kontrolü ile karşılaştırılarak canlılık değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

#### **3.7.4.4. İndirekt (Dolaylı) sitotoksisite yöntemi**

Dolaylı temas testleri ISO 10993-5 (2009) standartlarına uygun şekilde yapıldı. Kültüre edilen HS2 ve L929 hücreleri tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek üretildikleri flask yüzeyinden kaldırıldı, 6 gözlü hücre kültürü kaplarına ekilmiş ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücreler %85-90 konfluensiye ulaştığında üzerindeki besin ortamı çekilerek yerine 1:1 oranında agarlı besin ortamı koyuldu. Agar katılaştıktan sonra, sterilize edilmiş örnekler agar üzerine koyularak 72 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. 72 saat sonunda hücrelere üzerindeki materyaller ve agar uzaklaştırılarak hücreler giemsa ile boyandı. Boyanan hücreler mikroskop altında incelenerek varsa

materyalin oluşturduğu sitotoksik etki gözlemlendi.

### **3.8. *In vitro* Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri**

Tez kapsamında üretilen BS/keratin kompozit biyomalzemelerinin biyoyapay deri geliştirmede kullanım potansiyelinin araştırılması için *in vitro* hayvan hücre kültürü çalışmalarında insan deri hücreleri olan HS2 keratinosit hücre hattı ve Detroit deri fibroblast hücre hattı kullanıldı.

HS2 hücre hattı için hücre çözdürme ve alt kültürlenme yöntemlerinin detayları sitotoksikite denemeleri içerisinde verildi. Detroit hücre hattı için ise farklı olarak besin ortamı hazırlanırken %1 oranında Na-Piruvat eklendi.

#### **3.8.1. BS/keratin kompozitleri üzerine hücre ekim yöntemi**

##### **3.8.1.1. Malzemelerin ekime hazırlanması**

Üretilen BS kontrol ve BS/keratin kompozit malzemeleri 1.5 cm – 1.5 cm boyutlarında kesildikten sonra liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası alüminyum folyo ile sarılıp tekrar otoklavlanarak (121°C – 15 dk) steril edildi. Ardından laminar hava akışlı kabin içerisinde yüzeyleri agar kaplı pleytlere yerleştirildi. Malzemeler kültür süresince kullanılan hazır besin ortamı (DMEM F12, %10 FBS, %0.1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %1 Na-Piruvat ) ile 2 saat süresince 37 °C’de şartlandırıldı.

##### **3.8.1.2. Malzeme Yüzeyine Hücre Ekimi**

Şartlandırılması yapılan malzemelerin (kontrol BS, %3 keratin içeren *in situ* modifiye BS/keratin kompoziti ve post modifiye BS/keratin kompozit malzemeleri) kabin içerisinde steril gazlı bez ve steril pens yardımıyla

absorbladıkları fazla sıvı emdirilerek alındı. Örneklerin bir yüzeylerine tripsinizasyon ile kaldırılan HS2 deri keratinosit hücreleri hemasitometri ile sayılarak  $10^5$  hücre/ml konsanstrasyonunda ekildi. İki saat süreyle %5 CO<sub>2</sub> li etüvde 37 °C’de inkübe edilerek tutunmaları beklenen hücrelerin üzerine ardından 2’şer ml taze DMEM (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Na-Piruvat) besin ortamı ilave edildi. Yapılan ekimin ardında 1. ve 3. günlerde HS2 hücresi ekilmiş malzemeler için SEM fiksasyonu yapıldı. Kültüre devam eden malzemelerin diğer yüzeylerine 4. günde  $5 \times 10^5$  hücre /ml konsantrasyonda Detroit insan deri fibroblast hücreleri ekildi. İki tip hücre hattının da olduğu bu ko-kültürlere ise 5. ve 7. günlerde SEM görüntülemesi için fiksasyon yapıldı.

### 3.8.2. SEM fiksasyonu

SEM fiksasyonu 1. basamaktan 4. basamağa kadar +4 °C’de (buz üstünde) yapıldı.

1. Örnekler serum fizyolojik ile yıkandı.
2. 30 dk tampon A’da (0,1 M sodyumkakodilat içinde %5 gluteraldehit (% 25’lik pH: 7.2) bekletildi.
3. Ardından örnekler tampon B’ye (0,1 M sodyumkakodilat içinde %7 sükroz 7g/100ml) alınarak 30 dk bekletildi.
4. Daha sonra örnekler tampon C’ye (0,1 M sodyum kakodilat içinde %2 ozmiyum tetraoksit) alınarak 30 dk bekletildi.
5. Süre sonunda örnekler tampon C’den alınarak iki kez 5’er dk destile su ile yıkandı.
6. Yıkama sonrası örnekler artan derecelerdeki etanol serilerinde (sırasıyla %35,%50, %70, %85, %95 ve %96, %96’lık) 5’er dk bekletilerek

susuzlaştırıldı.

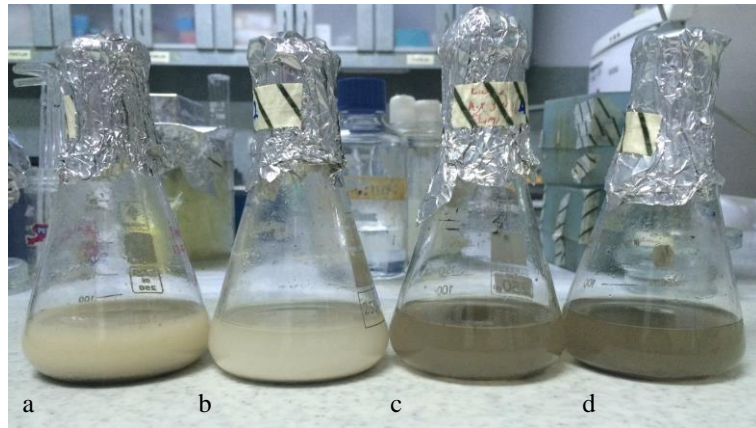
7. Alkol serileri tamamlandıktan sonra örnekler Hekzametildisilan (HMDS) solüsyonunda 5 dk bekletildi.
8. Ardından HMDS çekildikten sonra örnekler kuruması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
9. Kuruma tamamlandıktan sonra örnekler SEM görüntülemesine kadar desikatörde bekletildi.
10. SEM görüntüleme öncesi örneklere altın kaplama uygulandı.

## 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Tez süresince elde edilen tüm bulgular saçtan keratin izolasyonu, BS/keratin üretimi (*in situ* ve post modifikasyon), karakterizasyonu ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları şeklinde bölümlere ayrılarak bu bölümde verilmiş ve tartışılmıştır.

### 4.1. Saç Örneklerinin BS Üretiminde Substrat Olarak Kullanımı

Saç örneklerinden elde edilen keratinin BS üretim ortamına eklenerek üretilen BS yapısına katılması işlemi gerçekleştirilmeden önce BS üreten *A. xylinum*'un keratini besin olarak kullanıp kullanmadığının test edilmesi gerekmektedir. Çünkü organizma bu proteini besin olarak kullanırsa keratin ortamdan uzaklaşacağından üretilen BS yapısı içerisine etkili şekilde dahil olması mümkün olmayacaktır. Saç gibi sert ve yapıtaşlarına parçalanması zor materyalleri kullanabilen sınırlı sayıda mikroorganizma türü bulunmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada pozitif kontrol olarak fibröz substratları kullandığı bilinen ve keratinaz üretiminde kullanılmakta olan Endüstriyel Mikrobiyoloji laboratuvarımız stoklarında bulunan *Streptomyces* spp. 2M21 suşu kullanılmıştır.



**Şekil.16** Öğütülmüş saçın substrat olarak kullanımının incelendiği üretim denemesi

Şekil 16'da soldan ilk erlen (a) *Streptomyces*'in insan saçı kullanılarak

yapılan kültivasyon denemesidir. Şekil 16a'daki görüntü aynı besin ortamının inokulasyonsuz görüntüsü (Bkz. Şekil 16b) ile karşılaştırıldığında organizmanın remesinden kaynaklanan ortam bulanıklığı net olarak görülmektedir. Bu deneme de *Streptomyces* saçı besin kaynağı olarak kullanarak üremiŐtir. Çalışma süresince BS retimi için kullanılan besin ortamı içerisine karbon ve azot kaynağı olarak sadece sa eklenerek hazırlanan besin ortamında ise *A. xylinum* rememiŐ ve BS retmemiŐ (Bkz. Şekil 16c) inoklasyonsuz besin ortamı (Bkz. Şekil 16d) ile karşılaştırıldığında görünüm deđiŐmemiŐtir.

Yapılan bu deneme *A. xylinum* organizmasının keratini besin maddesi olarak kullanmadığını dođrulamıŐtır.

## **4.2. Keratin n işlemleri**

### **4.2.1. Öğütme**

Öğütme iŐleminde kullanılan bıçaklı öğütücü, saçı yeterince ğtemeyip gözle görülür küçük kıl parçacıkları haline getirdiğinden ilerleyen çalışmalarda bu yöntem kullanılmamıŐtır.

### **4.2.2. Oksidasyon yöntemi**

Bu yöntem diğer iki yönteme göre uygulaması zor ve keratin eldesi düşük bir yöntem olmuştur. Kullanılan 20 g saçtan toz olarak 0,4 - 0,5 gr keratin izole edilebilmiştir. Van Dyke ve arkadaşlarının (2001) patentlediği yönteme göre 30 g saçtan 3 g keratin elde edilmiş, son ürün olarak sarımsı beyaz bir toz olduğu bildirilmiştir ancak bu yöntemle elde ettiğimiz son ürün kahverengi toz halinde bir keratin olmuştur. Bunun sebebi patentte yapılan tüm basamakların detaylı verilmeyiŐi veya bazı kimyasal ve cihaz farklılıkları olabilir. Bu sebeple saçtan



keratin izolasyonuna bu yöntemle devam edilmemiştir.

### 4.2.3. Shindai özütlemesi

Bu yöntem literatüre bakıldığında insan saçından keratin izolasyonunda en yaygın kullanılan yöntemdir. Hızlı ve nispeten kolay bir yöntem oluşunun yanında izole edilen keratin diyalizatının BS'nin *in situ* ve post modifikasyonunda kullanımına daha uygun olması sebebiyle çalışmaya bu yöntem seçilerek devam edilmiştir. Tuzların uzaklaştırılması için yapılan diyaliz sonrası protein fraksiyonunda tuz kalıp kalmadığının kontrolü Ellman's reaktifi (Sigma D8130) kullanılarak yapılmıştır. Genellikle bu tarz izolasyonlarda kullanılan DTT (Dithiothreitol) ve 2-  $\beta$ -merkaptoetanol gibi kimyasalların uzaklaştırılması önemlidir.

## 4.3. Keratin Karakterizasyonu

### 4.3.1. Kuru ağırlık ölçümü

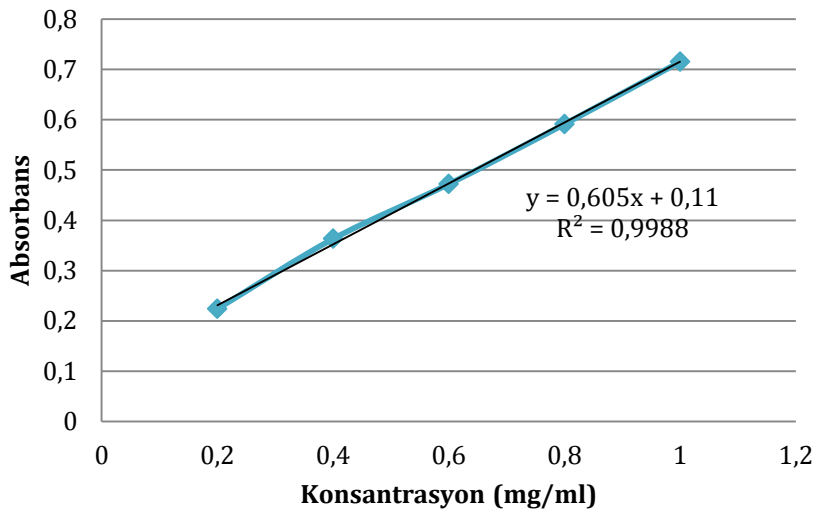
Kuru ağırlık ölçüm sonuçlarına göre shindai özütünün protein miktarı ortalama 8,5 mg/ml olarak belirlenmiştir. Karakterizasyonu tamamlamak amacıyla protein tayini Bradford yöntemi ile tekrarlanmıştır.

**Tablo 5:** Kuru ağırlık ölçüm sonuçları

Dara (mg)	Ölçüm (mg)	Net (mg)
345,5	354,2	8,3
356,9	365,9	9
350,1	358,3	8,2

### 4.3.2. Bradford kiti ile protein tayini

BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılarak oluşturulan Bradford protein standardının formülü ile keratin çözeltisinin ana stoğundaki protein miktarı 3.66 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu oran kuru ağırlık ölçümü ile karşılaştırıldığında daha düşük bir değerdir fakat kalorimetrik ölçüm daha güvenilir olduğundan yapılan modifikasyon çalışmalarında Bradford analizinin sonuçları kullanılmıştır.

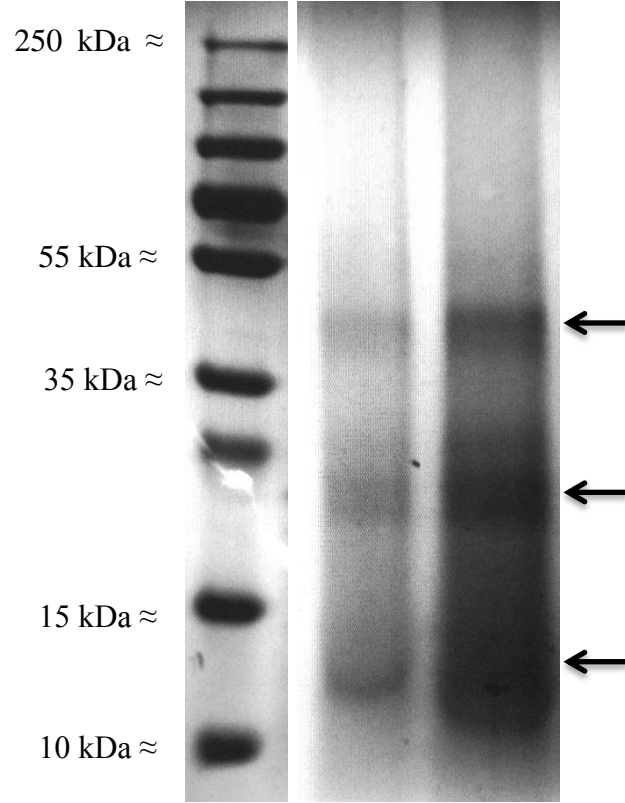


**Grafik 1:** Bradford standart eğrisi

### 4.3.3. SDS-PAGE elektrofezi

Keratin proteininin literatürde belirtilen ortalama moleküler ağırlığı 44 – 66 kDa olarak bildirilmiştir (Moll et al., 2008). Shindai ekstraksiyonu sonrası elde edilen protein fraksiyonunun SDS-PAGE sonucunda logMA-RF grafiği kullanılarak yaklaşık rölatif moleküler kütlesi sırası ile 44 – 31 – 13 kDa olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil.17). Bu veriler literatür ile örtüşmektedir. Literatürde keratin proteini için 44-66 kDa aralığındaki bantlar alfa keratin, 20-30 kDa aralığındaki bantlar KAPs (Keratin Associated Proteins)olarak adlandırılan keratin ilişkili proteinleri ve 10-22 kDa aralığındaki bantlar ise beta keratinler olarak

bildirilmiştir (Fujii et al., 2013; Hill et al., 2010; Nakamura et al., 2002). Keratin için alınan bant profilinde 13 kDa boyutunda tam ayrılma vermeyen bant ise keratinin yapısındaki sülfür içeriği yüksek gama keratin grubunun karakteristiğidir (Hill et al., 2010).



**Şekil.17** Keratin SDS-PAGE protein profili

Ayrıca bu veriler keratin proteininin kesin tespiti için sadece önveri niteliğinde olup kesin karakterizasyon için dizi analizi (Sekanslama), Western Blot, saf keratin izomeri ile karşılaştırma vb. ileri teknikler kullanılarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### **4.3.4. Zeta-sizer parçacık boyut analizi**

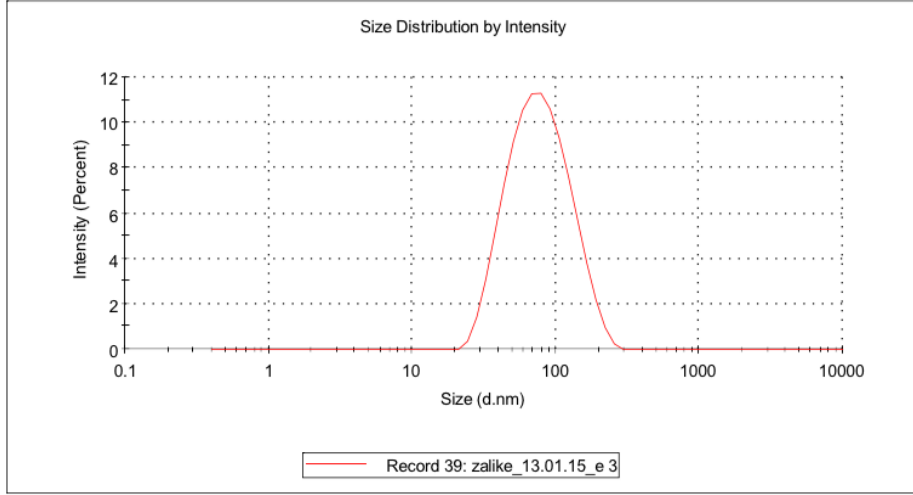
Shindai ekstraksiyonu ile elde edilen keratin diyalizatınının Zeta potansiyeli

üzerinden parçacık boyut dağılım analizi yapılmıştır. Buna göre zeta ortalama parçacık boyutu 68.31 nm olarak ölçülmüştür (Bkz. Şekil.18).

### Results

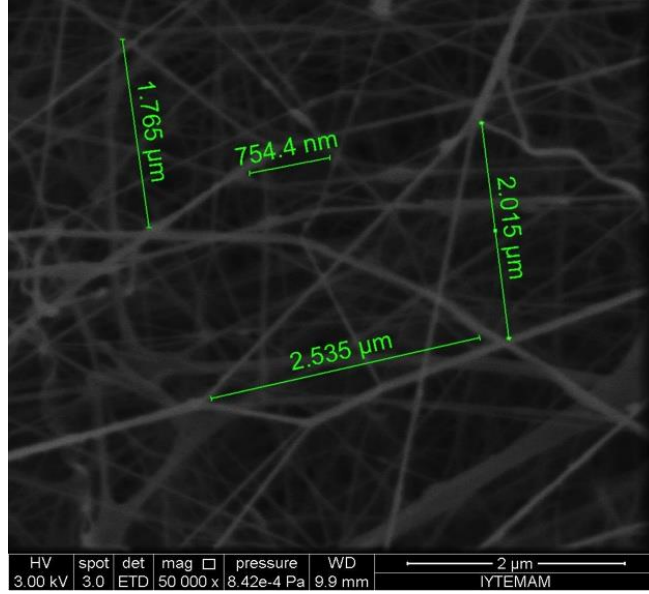
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 68,31	<b>Peak 1:</b> 84,11	100,0	40,78
<b>Pdl:</b> 0,186	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,963	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



**Şekil.18** Keratin Zeta sizer boyut dağılımı

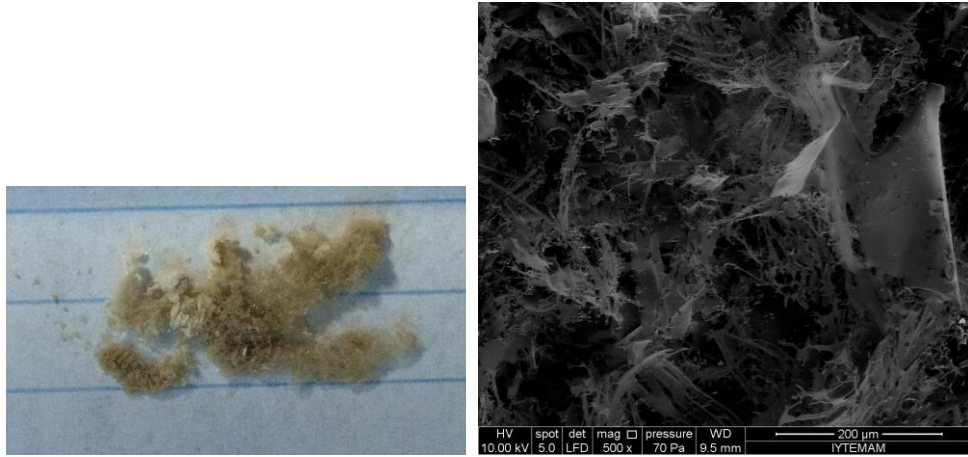
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda keratin moleküllerinin BS'nin nanofiber ağ boşluklarına girebilecek düzeyde boyuta sahip olduğu söylenebilmektedir. Üretilen BS membranındaki nanofiberler arası boşlukların (Bkz. Şekil 19) keratin parçacıklarını alabilmeye müsait oldukları görülmektedir. Bu sonuç BS'nin por boyutları ile karşılaştırıldığında BS/keratin kompozitinin oluşturulmasını destekleyen sonuçlar doğurmuştur.



Şekil.19 BC por boyutları SEM görünümü

#### 4.3.5. Keratin EDX, SEM ve XRD analizleri

Shindai ekstraksiyonu ile elde edilen keratin diyalizati malzeme özelliklerinin tayini ve yapısal karakterizasyonlarından önce liyofilize edilmiştir.

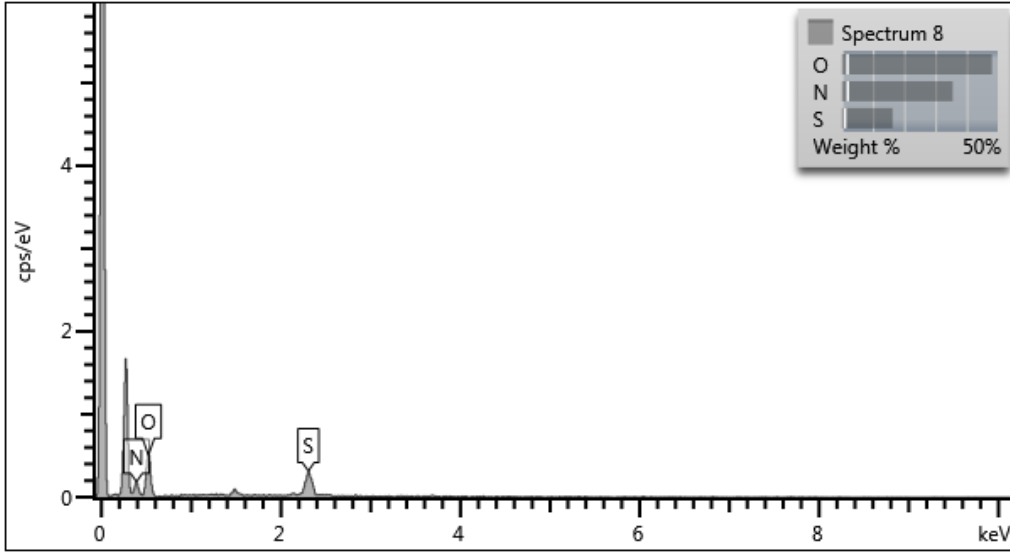


Şekil.20 Liyofilize edilen keratinin makro ve SEM görüntüsü

Liyofilize edilen keratin porlu bir iskelete sahip sarımsı toz bulutu şeklini almıştır (Bkz. Şekil 20.).

SEM görüntüsünde homojen bir iskelet dışında herhangi bir farklı yapıya rastlanmamıştır. Keratinin aynı örnek üzerinden yapılan EDX sonuçları ise Şekil

21 ve Tablo 6’da verilmiştir.



Şekil.21 Liyofilize keratin EDX analizi

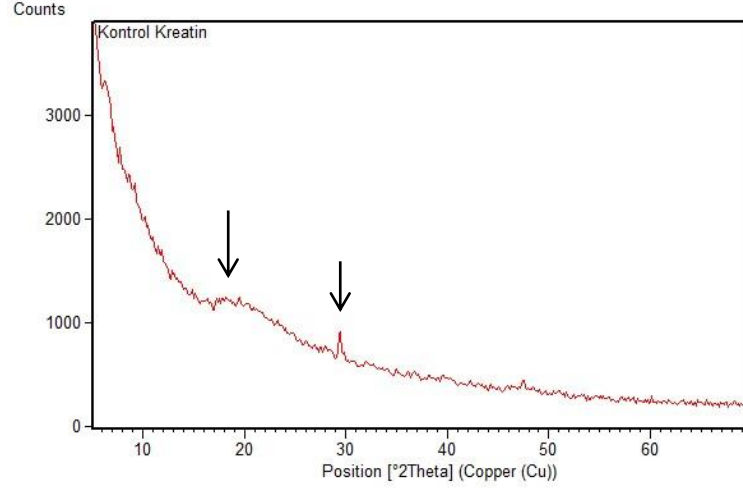
EDX sonucuna göre insan saçından izole edilen keratin ağırlıkça % 35 azot, %48 oksijen, %16 sülfür elementi içermektedir (Bkz. Tablo 6).

**Tablo 6:** Keratin EDX analizi

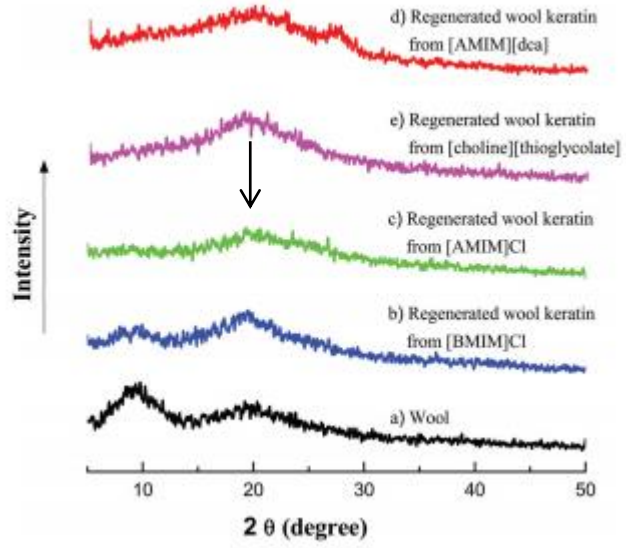
Element	Wt%	Atomik %
N	35.54	41.89
O	48.18	49.73
S	16.28	8.38
Total:	100.00	100.00

İnsan saçından izole edilen keratin için yapılan XRD analizi literatürdeki (Bkz. Şekil.23) keratin profilleri ile paralellik göstermektedir. 29 Teta noktasında fazla bir pik vermiş olan protein, amonyum fosfat ve amonyum nitrat tuzları nedeniyle gözlenmiştir (Bkz. Şekil. 22). İlerleyen çalışmalarda tuzların uzaklaştırılması için keratin diyalizatları kullanımdan önce tekrar diyaliz edilmiş ve Ellman’s ajanı ile tuzların uzaklaştırılması kontrol edilmiştir. Tekrar bir XRD

analizi yapılmamış ancak ikinci diyaliz öncesi ve sonrası örneklerin Ellman reaktifi ile elde edilen sonuç tuzların uzaklaştırıldığını göstermiştir.



Şekil.22 Keratin XRD paterni



Şekil.23 Farklı kaynaklardan izole keratin XRD paternleri (Idris et al., 2014)

#### 4.4. Keratin/BS Kompoziti Üretimleri

Tez önerisinde de belirtilen ve bu tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan birincil hedef saçtan izole edilen keratinin BS yapısına üretim esnasında

eklenmesi ve BS'nin *in situ* modifikasyonu ile yeni bir kompozit biyomalzeme üretimi olmuştur.

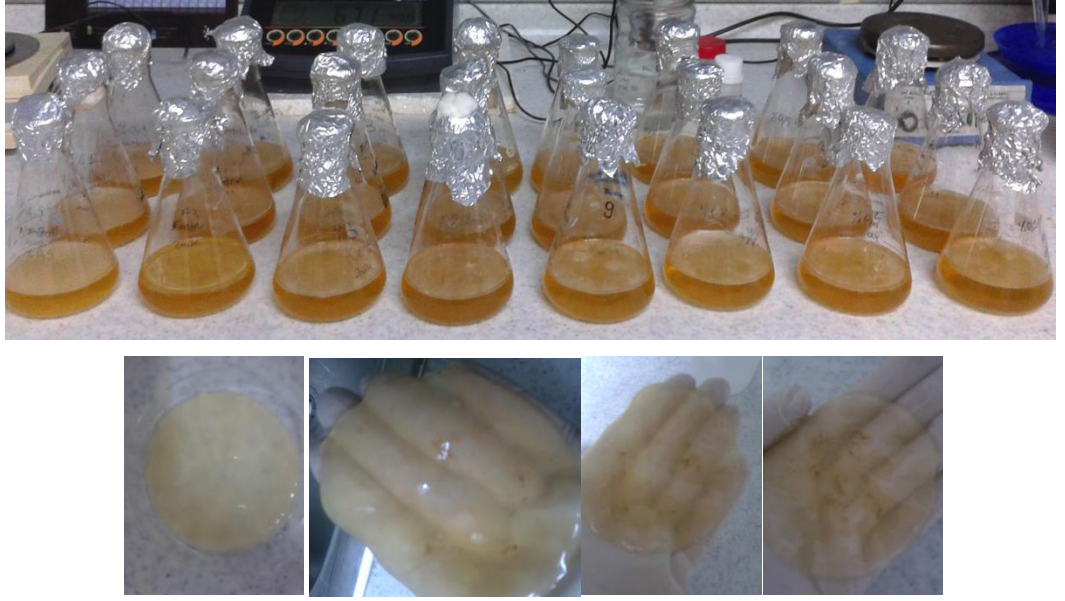
Aynı zamanda *in situ* modifikasyonun yanı sıra elde edilen keratin ve BS üretim sonrasında (post) modifikasyon ile de birleştirilmesi denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

#### **4.4.1. *In situ* modifikasyon ile BS/keratin kompozit üretimi**

Önceki çalışmalar bölümünde de detaylandırıldığı gibi bakteriyel selülozun üretim ortamına eklenen farklı maddeler ile *in situ* modifikasyonu pek çok çalışmada başarılı sonuçlar vermiştir. Bu tez kapsamında kurulan BS/keratin üretim hipotezi yapılan bu deneme ve sonuçları ile desteklenmiştir.

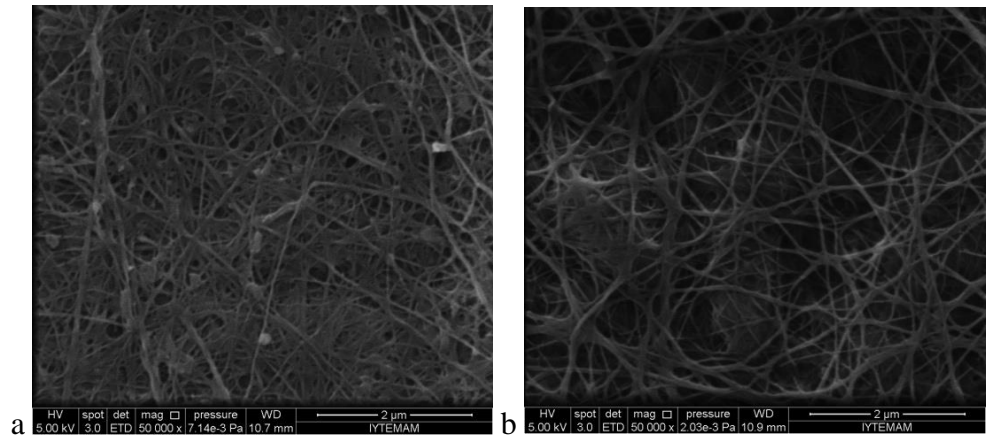
Steril keratin diyalizati %1-2-3 w/v oranlarında HS besin ortamına aseptik koşullarda eklenmiştir. Besin ortamına eklenecek keratin miktarının seçilmesinde önceki çalışmalardaki veriler dikkate alınmıştır (Abeer et al., 2014; Huang et al., 2010; Klemm et al., 2006; Ruka et al., 2013; Wu et al., 2014). Bu üretimlerden elde edilen bakteriyel selülozlara yapılan karakterizasyonlar sonucunda kontrol ile karşılaştırıldığında sadece %3 oranında keratin içeren ortamdan hasat edilen BS'lerin yapısında keratine rastlanmıştır. Bu sebeple ilerleyen çalışmalarda ağırlıkça %3 oranında keratin içeren besin ortamında *in situ* BS/keratin üretimi ile devam edilmiştir. Tez metninde *in situ* BS/keratin kompoziti olarak adlandırılan örnekler %3 keratin içeren ortamda üretilmiş malzemeyi ifade etmektedir.





**Şekil.24** 5 günlük inkübasyon sonrası *in situ* modifikasyon denemesi üretimleri ve sırasıyla üretilen BS örnekleri kontrol, %1 w/v, %2 w/v, %3 w/v, saflaştırma öncesi görünümleri

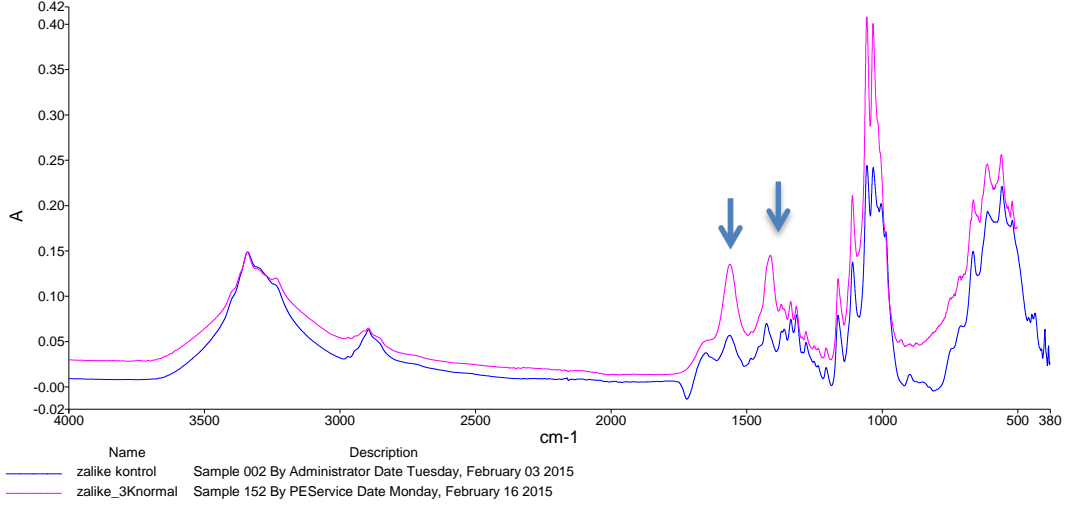
SEM görüntülerinde keratin içeren ve içermeyen BS örnekleri arasında şekilsel (Bkz. Şekil24) ve mikroskopik bir fark gözlenmemektedir. Bu görüntülerde hedeflenen yapay deri için BS'nin sahip olduğu fibroblast ve keratinositlerin yerleşip tutunabileceği 3 boyutlu fiber ağ yapısının BS/keratin kompozitinde de korunduğu açıkça görülebilmektedir (Bkz. Şekil.25).



**Şekil.25** a ) BS, b) *in situ* BS/keratin kompoziti SEM görüntüsü

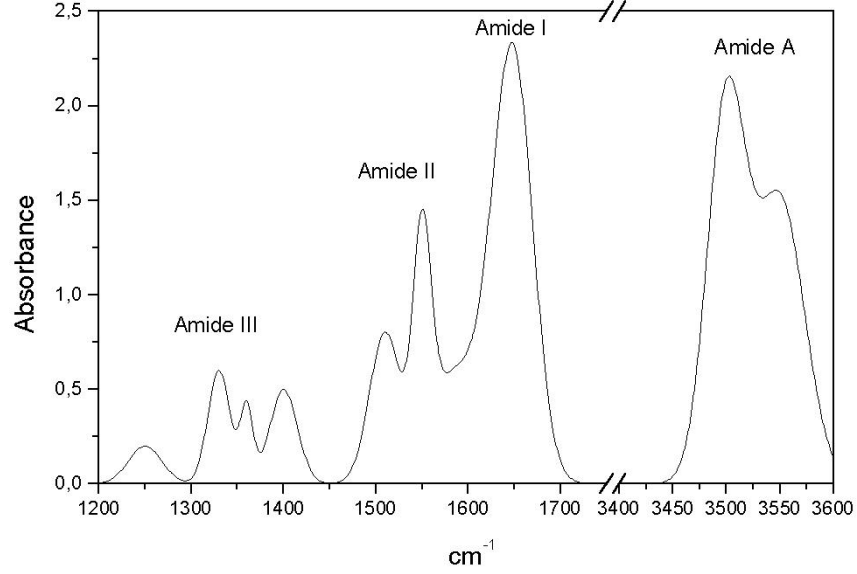
BS'nin yapısında amid I ve amid II bağları bulunmazken *in situ* BS/keratin

kompozitinde amid pikleri gözlenmiştir. Bu grafik *in situ* modifiye edilen BS membranında proteinlere karakteristik amid piklerinin varlığı nedeniyle keratinin başarılı de yapıya eklendiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 26).



**Şekil.26** *In situ* BS/keratin kompoziti FTIR analizi

Amid I proteinlerin en yoğun soğurulan bandıdır. Birincil olarak C=O (70-85%) titreşimlerinden ve C-N gruplarından (10-20%) doğar ve frekans aralığı 1600 and 1700  $\text{cm}^{-1}$ ' dir. Amid II ise 1510 ve 1580  $\text{cm}^{-1}$  band aralığı bölgesinde frekans verir ve amid I'e göre çok daha kompleksdir. Amide II ise ağırlıklı olarak N-H (%40-60 potansiyel enerji) bağı kıvrım düzleminden türemektedir. Potansiyel enerjinin kalanı C-N (%18-40) ve C-C (%10) titreşimlerinden ortaya çıkar (Bkz. Şekil 27) (Jena Library of Biological Molecules ).

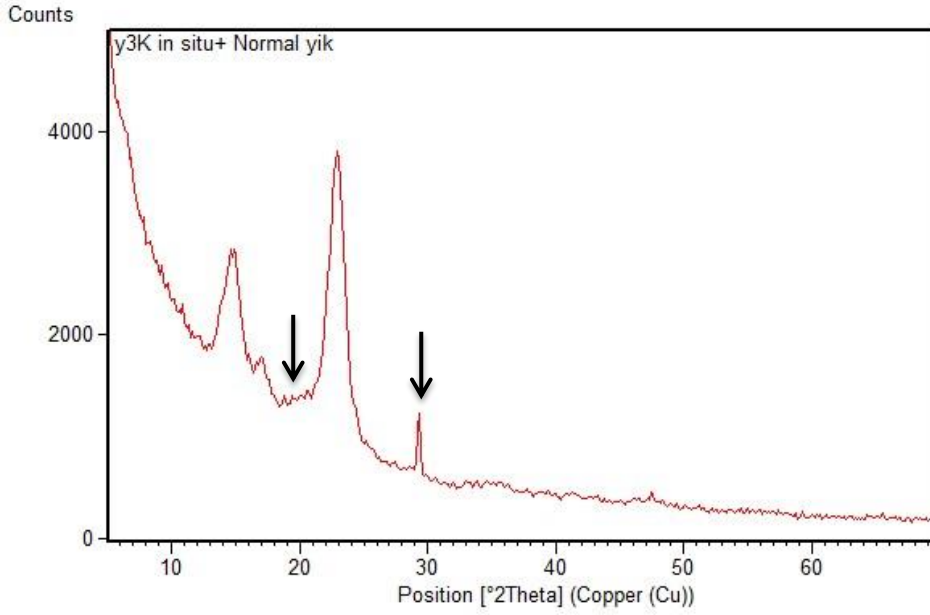


**Şekil.27** Amid bağları FTIR spektrumu “Jena Library of Biological Macromolecules”

Bakteriyel selüloz literatürden de doğrulandığı üzere sahip olduğu X ışını kırınım pikleri 14,16, 22 tetadadır (Czaja et al., 2004).

Çalışmada kullanılan keratin XRD analizi *in situ* BS/keratin kompoziti ile karşılaştırıldığında hem keratine hem de bakteriyel selüloza ait kırınımın olduğu bir profil göstermiştir. Keratin literatür verileriyle de örtüşen 20 tetalarda kristalitesi düşük dar pikler vermektedir (Bkz. Şekil 23). Bu profil BS ile oluşturduğu kompozitte net olarak görülmektedir (Bkz. Şekil 26).

Şekil 28’de 29 tetada işaretli olan pik diyaliz yetersiz kaldığından yapıda kalan amonyum fosfat ve amonyum nitrat tuzlarının verdiği bir piktir. XRD search match programının verdiği referans ile doğrulanmıştır.



Şekil.28 *In situ* üretilen BS/keratin kompozitinin XRD analizi

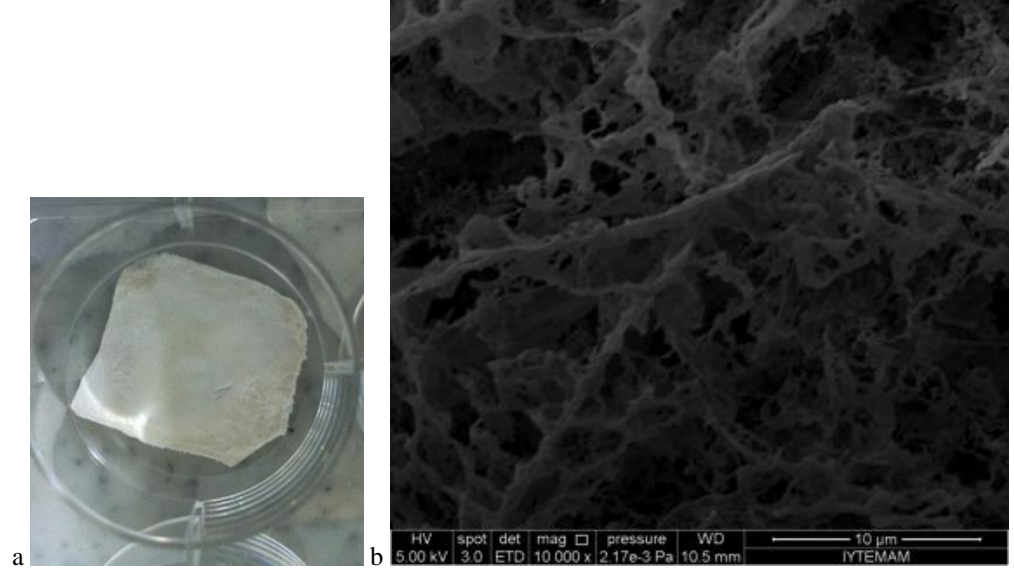
#### 4.4.2. Post modifikasyon ile BS/keratin üretimi

Tez kapsamında BS'nin modifikasyonu için *in situ* yöntemden farklı olarak post modifikasyon yaklaşımı da kullanılmıştır. Bu aşamada BS membranları önce üretilerek saflaştırılmış ardından  $0,1 \text{ ml/cm}^2$  oranında ( $0,366 \text{ mg/cm}^2$ ) keratin yüklemesi yapılmıştır.

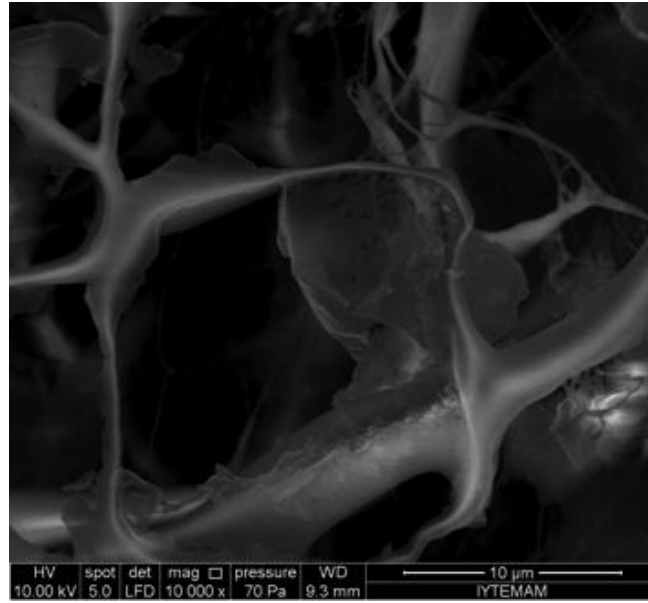
Emdirme (impregnasyon) ve liyofilizasyon yöntemiyle yapılan keratin/BS kompoziti dış görünüş olarak kontrol BS ve *in situ* üretilen BS/keratin kompozitinden farklı olarak daha süngerimsi ve sarımsı bir dış görünüme sahip olmuştur (Bkz. Şekil 29a).

Bu yöntem keratin diyalizatının BS'nin adsorbe ettiği su yerine geçmesi prensibine dayanmaktadır. SEM görüntüsünden alınan sonuçlara göre keratin diyalizatı BS fiberlerini nano boyutta kaplamış ve hücre dışı matris benzeri karmaşık ve porlu bir yapı oluşturmuştur (Bkz. Şekil. 29b-30). Fiberler arası

boşluk hala korunurken bu yapı hücre bağlanması ve sinyalizasyonu için ideal görünmektedir.



**Şekil.29** Post modifiye BS/keratin kompoziti: a) Makro görüntüsü b) SEM görüntüsü



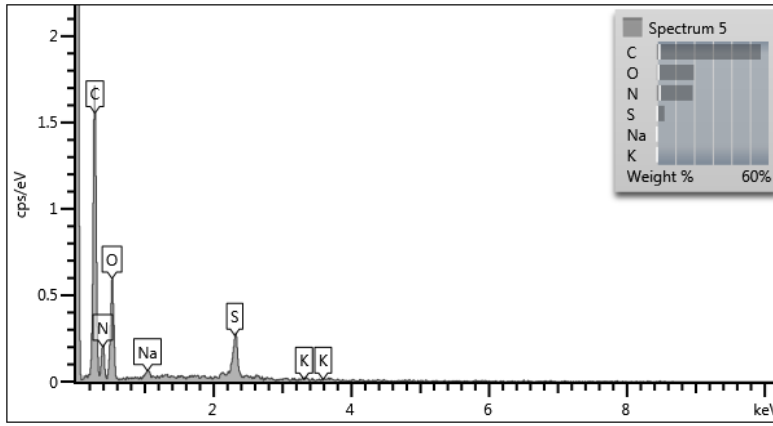
**Şekil.30** Post modifiye BS/keratin kompozitinin SEM görüntüsü

Post modifikasyonla üretilen BS/keratin kompozitinin EDX sonucu incelendiğinde BS yapısında normalde var olan karbon, hidrojen, oksijen ve mikroorganizma kaynaklı azot dışında (saflaştırılmış BS'de ağırlıkça maksimum

%6 oranında) ağırlıkça %4 oranında sülfür ve %10-15 kadar fazla azot elementi bulunmaktadır (Bkz. Tablo 7, Şekil 31). Malzemenin azot miktarının artışı keratin proteininin yapısındaki azottan, sülfür ise sahip olduğu disülfid bağlarından kaynaklanmaktadır.

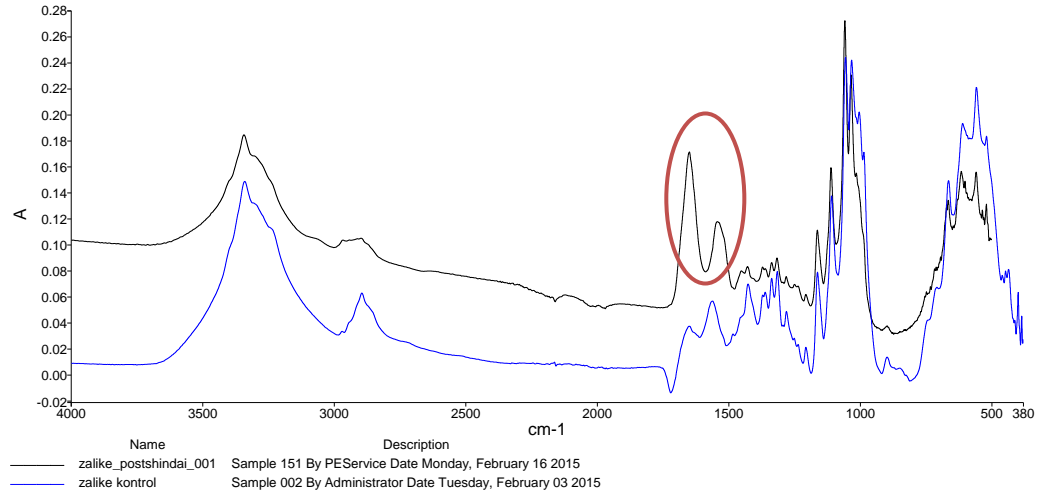
**Tablo 7:** Post modifiye BS/keratin kompozitinin EDX analizi

Element	Wt%	Atomik %
C	55.80	62.56
N	19.30	18.56
O	19.89	16.75
S	4.21	1.77
Total:	100.00	100.00



**Şekil.31** Post modifiye BS/keratin EDX analizi

Keratinden gelen işaretli Amid I ve Amid II bağları Şekil 32’te de görülmektedir. Karakterizasyon bulguları hem *in situ* hem de post modifikasyon yaklaşımları ile keratin içeren BS kompozit üretiminde başarılı sonuçları göstermektedir.



**Şekil.32** Post modifiye BS/keratin kompoziti FTIR analizi

#### 4.5. Mekanik Dayanım Sonuçları

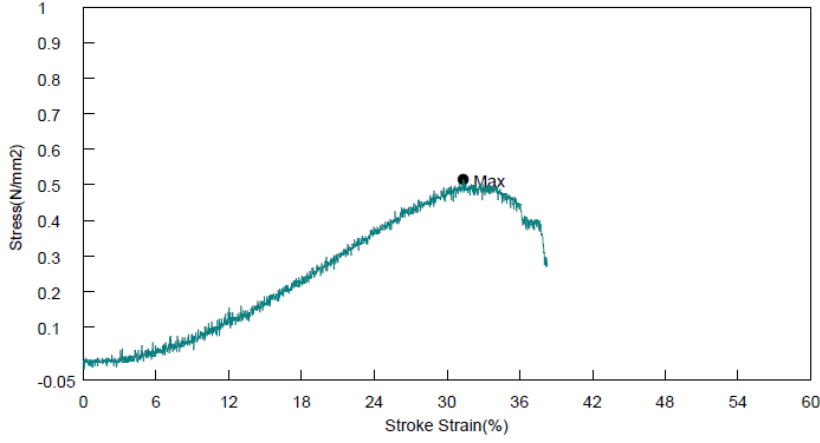
*In situ* üretim ile BS'nin yapısına keratin katılmasının mekanik dayanımı nasıl etkilediğini belirlemek için mekanik çekme testi yapılmıştır. Keratin ile modifiye kompozit biyomalzemenin kontrol BS ile karşılaştırıldığında çekme dayanımının % 41,4 oranında azaldığı belirlenmiştir.

BS çekme dayanımı 1,7 mm kalınlıkta örnek için 18 Newton çıkmıştır. Bu değer literatür verileriyle paralellik göstermektedir (Scionti, 2010).

Shape: Plate

	Thickness	Width	Gauge Length
Units	mm	mm	mm
1 - 1	1.7000	20.7100	30.8000

Name	Max Force	Max Disp	Max Stress	Max Strain
Units	N	mm	N/mm <sup>2</sup>	%
1 - 1	18.1250	9.65300	0.51481	31.3409

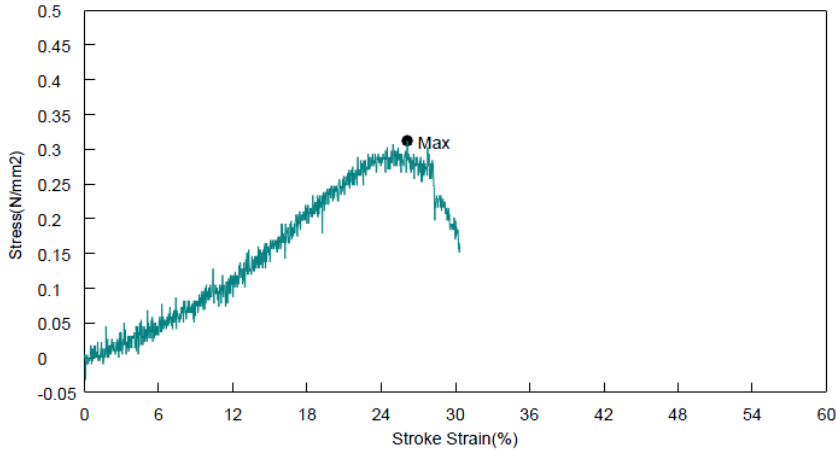


Şekil.33 Kontrol BS çekme testi

Shape: Plate

	Thickness	Width	Gauge Length
Units	mm	mm	mm
1 - 1	1.5000	22.7000	29.0000

Name	Max Force	Max Disp	Max Stress	Max Strain
Units	N	mm	N/mm2	%
1 - 1	10.6250	7.57200	0.31204	26.1103



Şekil.34 *In situ* BS/keratin kompoziti çekme testi

*In situ* BS/keratin kompoziti 1,5 mm kalınlığındaki örnek için çekme dayanımı 10 Newton olarak ölçülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında BS/keratin kompozitinin çekme dayanımının düşmesi keratinin bakteriyel selülozun yapısal kristalinitesini düşürmüş olabileceğini göstermektedir.

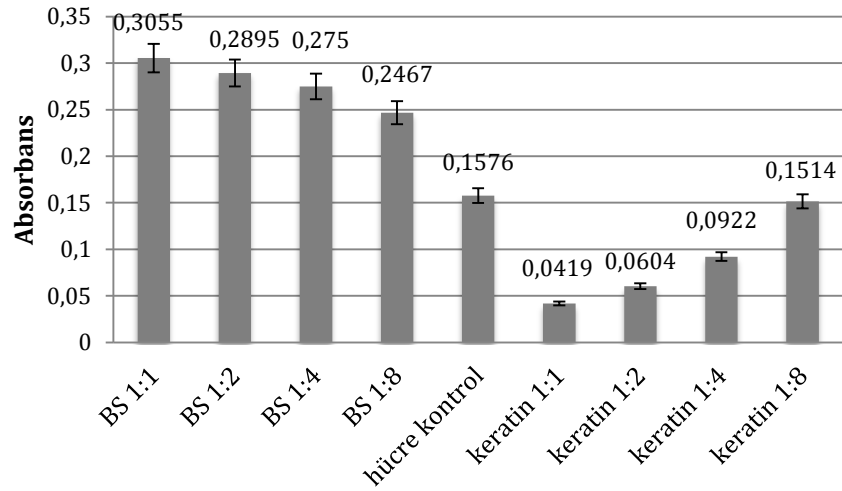


## 4.6. Sitotoksosite Sonuçları

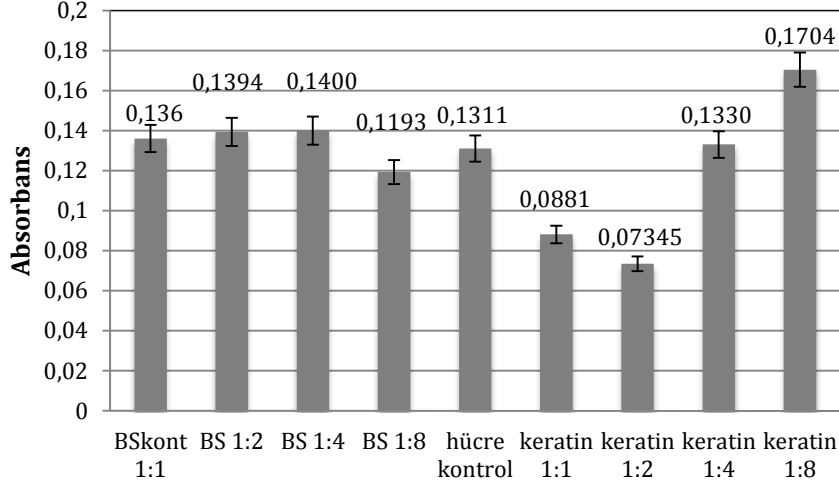
### 4.6.1. Ekstraksiyon yöntemi ile sitotoksosite testi

Bu testte amaç kompozit oluşturmada kullanılan BS, keratin diyalizati, post modifiye BS/keratin kompozit ve *in situ* BS/keratin kompozit ekstraktlarının farklı seyreltme miktarlarının L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki varsa toksik etkisini gözlemektir. Bunun yanında biyomalzemenin hedefi deri olduğu için sitotoksosite testleri HS2 insan deri keratinosit hücreleri için de tekrarlanmıştır. 24. ve 48. saatlerde MTT analizi ile hücrelerin canlılık ölçümleri alınmıştır.

Keratin diyalizati zaten sıvı formda bir ekstrakt olduğu için fraksiyon direkt olarak 1:1 örnek olarak kullanılmıştır. BS ise 6cm<sup>2</sup>/ml olacak şekilde kesilen örnekler bir gece boyunca serumsuz besi ortamında ekstrakte edilmiştir. Bu besin ortamı 1:1 BS ekstraktı olarak adlandırılmıştır.

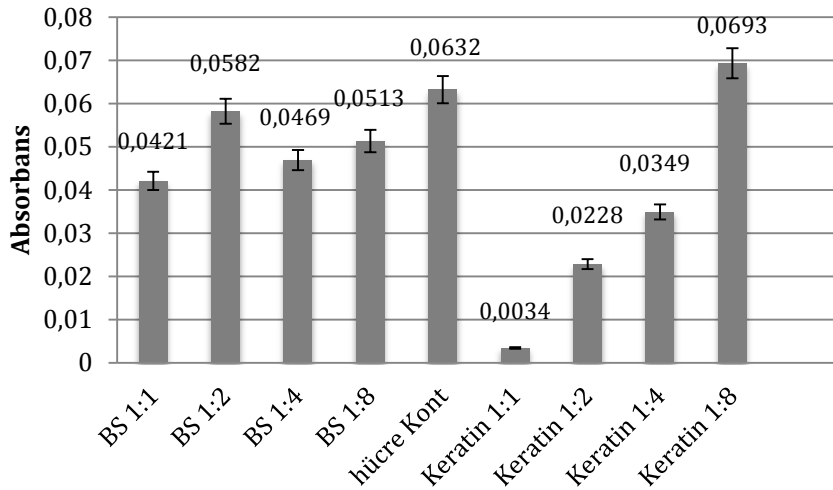


**Grafik 2.** BS ve Keratin diyalizati ekstraksiyon yöntemi-sitotoksosite 24. saat MTT (L929 hücre hattı)

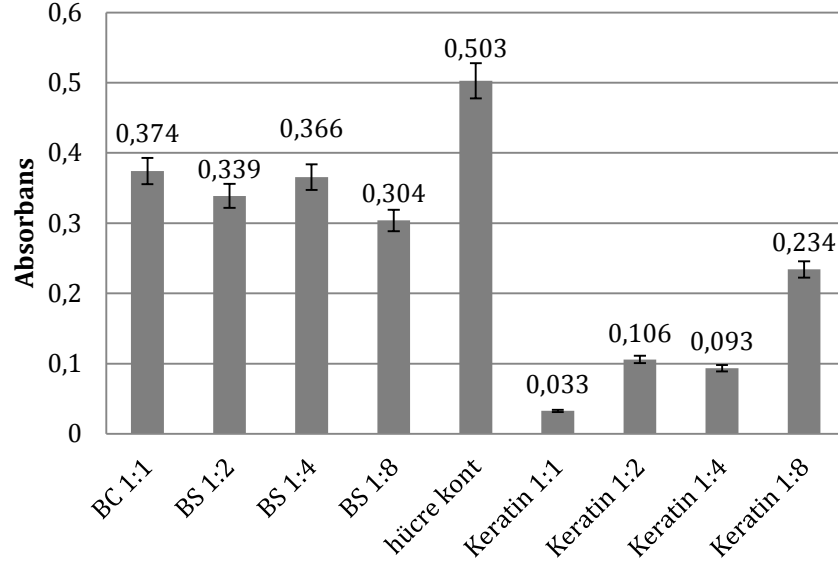


**Grafik 3.** BS kontrol ve keratineksraksiyon yöntemi - sitotoksisite 48. saat MTT (L929 hücre hattı)

L929 fare fibroblast hücreleri ile yapılan ekstraksiyon sitotoksisite denemesinin 24. ve 48. saat canlılık analiz grafikleri incelendiğinde keratin diyalizatının 1:1, 1:2, 1:4 seyreltme oranlarındaki ekstraktlar hariç hiçbir BS/keratin kompozit malzemesinin sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca keratin diyalizatının 1:8 konsantrasyonu fibroblastlar için 48. saatte hücre canlılığına pozitif bir etki göstermiştir.



**Grafik 5.** BS kontrol ve keratin diyalizatı ekstraksiyon yöntemi ile yapılan sitotoksiste 24.saat MTT (HS2 hücre hattı)



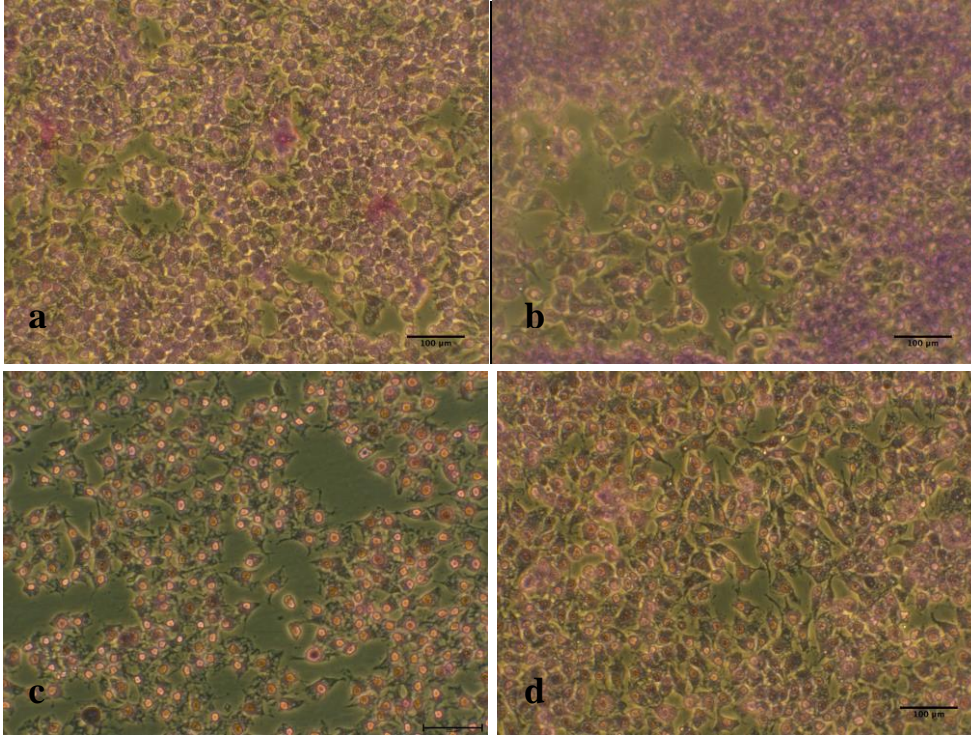
**Grafik 6.** BS kontrol ve keratin diyalizatı ekstraksiyon yöntemi ile yapılan sitotoksisite 48.saat MTT (HS2 hücre hattı)

HS2 insan deri keratinosit hücreleri üzerinde yapılan ekstraksiyon sitotoksisite denemesinin 24. ve 48. saat analiz grafikleri incelendiğinde BS kontrol örneğinin bu hücreler üzerinde hiçbir toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Keratin diyalizatı tek başına kullanıldığında ise 1:1, 1:2 ve 1:4 seyreltmelerde 48. saatte hücrelerin ölmeye başladığı görülmektedir.

#### 4.6.2. İndirekt sitotoksisite testi

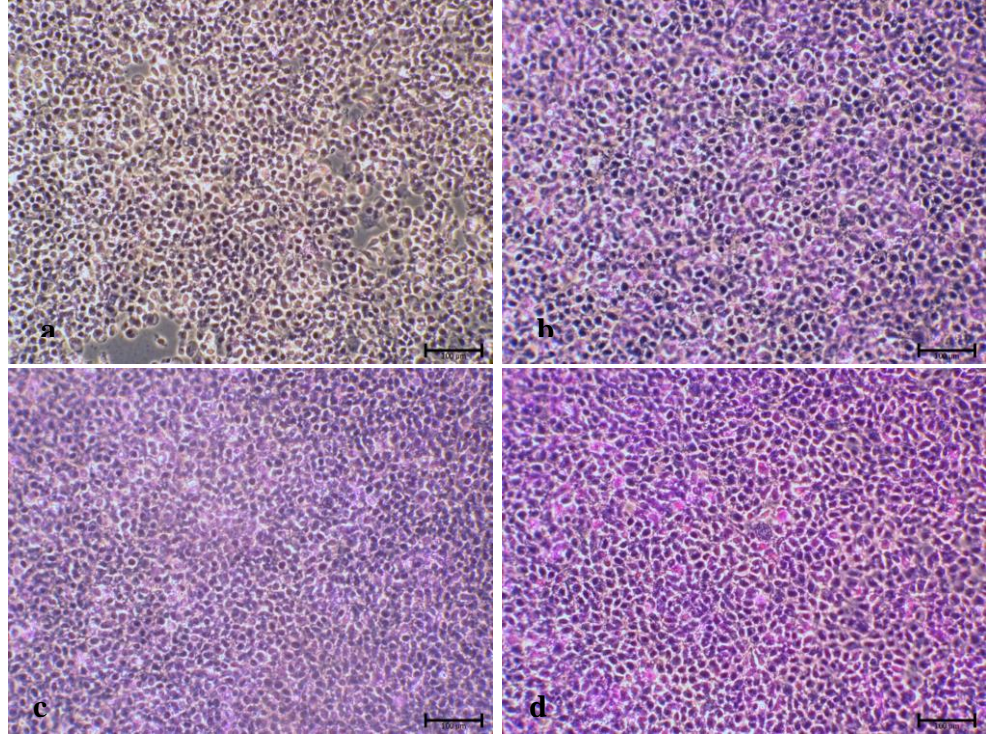
İndirekt sitotoksisite testi malzeme ile hücrelerin direkt temasının olmadığı, arada agar besin ortamı bulunan bir sitotoksisite yöntemidir. Aynı şekilde bu yöntem ile de hem L929 hem de HS2 hücre hatları üzerinde BS kontrol ve BS/keratin kompozit malzemelerin sitotoksisitesine bakılmıştır. 72. saat sonunda yapılan giemsa ve kristal viyole boyama ile hücrelerin morfolojileri incelenmiştir. Bu testte sonuç kalitatif gözleme dayalıdır. Materyalin pleyt üzerinde tam alt kısmında yer alan hücrelerde ölüm veya morfolojik değişiklik gözlenmiyorsa bu durum malzemenin toksik etkisi olmadığı, agar içerisinden hücreler üzerine

herhangi bir toksik madde difüzyonun gerçekleşmediği şeklinde yorumlanabilir.



**Şekil.35** L929 hücre hattı indirekt sitotoksosite sonuçları a) hücre kontrolü b) BS kontrol c) *in situ* BS/keratin kompoziti d) Post BS-keratin

Işık mikroskobu ve Giemsa boyama yardımıyla yapılan gözlemden L929 hücreleri üzerinde kontrol BS'nin veya BS/keratin kompozitlerinin oluşturduğu bir sitotoksosite gözlenmemiştir. 6 gözlü pleytlerde yapılan bu testte, kontrolü yapılan materyal pleytin tam ortasına yerleştirilmiştir. Bu sebeple morfolojik gözlem fotoğrafları pleytlerin tam orta kısımlarından çekilmiştir (Bkz. Şekil 35).



**Şekil.36** HS2 hücre hattı indirekt sitotoksosite sonuçları a) hücre kontrol b) BS kontrol, c) *in situ* BS/keratin kompoziti, d)Post BS-keratin kompoziti

Işık mikroskobu ve kristal viyole boyama yardımı ile bakılan HS2 hücre hattında BS'nin kendisi ve kompozitlerinin bulunduğu pleytlerde hücre kontrolü ile karşılaştırıldığında morfoloji veya hücre yoğunluğu açısından herhangi bir fark görülmemiştir. Oluşturulan *in situ* ve post modifiye BS/keratin kompozitlerinin ise L929 ve HS2 hücreleri ile yapılan indirekt sitotoksosite testleri negatif sonuçlar vermiş materyalin toksik etkisi gözlenmemiştir.

#### 4.7. Endotoksosite Testi Sonuçları

Bu testin endotoksinlerle reaksiyon veren lizatın duyarlılık sınırı ( $\lambda$ ) 0,25 EU/mL'dir. Test sonuçları verilen lizat duyarlılığı ile bir örnek konsantrasyonunu test etmek ve test örneğinin sınır değerden daha fazla ya da daha az endotoksin varlığı analizi esasına dayanmaktadır.

**Dilüsyon ile örneğin endotoksin miktarını bulma:** Endotoksin, bu testte örnek dilüsyon serisinin pozitif bulunduğu son seyreltmeye göre ölçülmektedir. Kitin test edilmesi amacıyla standart oluşturulması için LRW ile seyreltilmiş ve seyreltmeler test edilmiştir.

**Tablo 8.** Endotoksisite sonuçları

Standart	Test Sonucu
Seyreltilmemiş	+
1:2 (0,5 EU/ml)	+
1:4 (0,25 EU/ml)	+
1:8 (0,125 EU/ml)	+
1:16 (0,06 EU/ml)	-
1:32 (0,03 EU/ml)	-
1:64 (0,0015 EU/ml)	-
Negatif kontrol	-
BS kontrol (1:1)	+
Keratin (1:1)	+
In situ BS/ker. (1:1)	+
Post BS/ker. (1:1)	+
BS kontrol (1:10)	-
In situ BS/ker. (1:10)	-
Post BS/ker. (1:10)	-

Örnekteki endotoksin konsantrasyonunu hesaplamak için son pozitif dilüsyonun karşılığı ile Pyrotell duyarlılığı ( $\lambda$ ) çarpılmıştır.

$$\text{Kons.} = (\lambda) \times (10/1) = (0.25 \text{ EU/mL})(10) = 2,5 \text{ EU/mL}$$

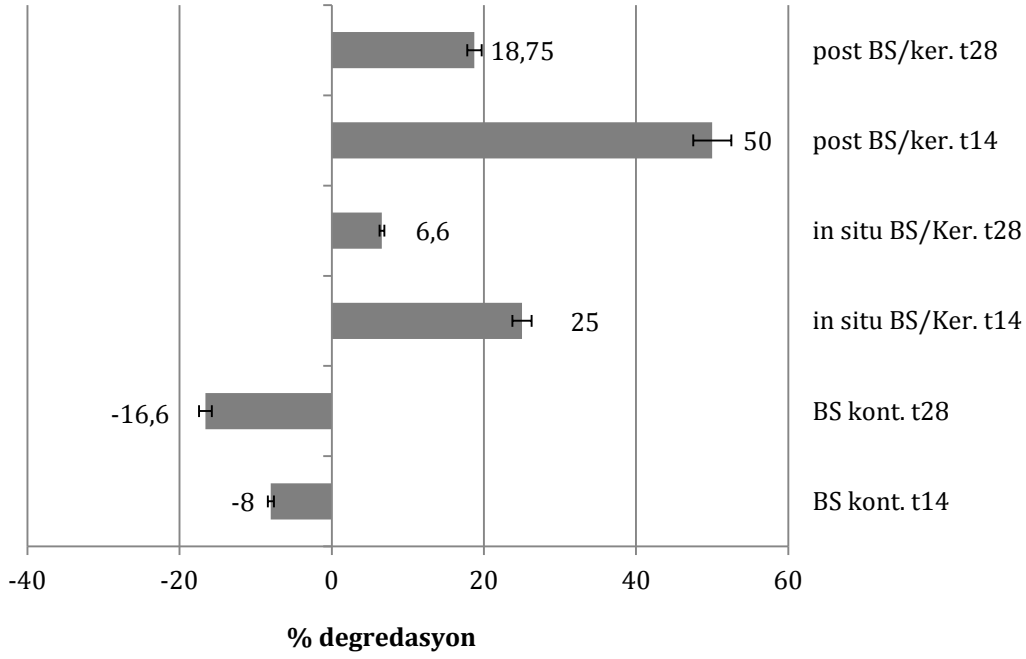
BS kontrol, keratin kontrol ve kompozit örnekleri ile yapılan denemeler için endotoksin içeriği seyreltilmemiş örneklerde pozitif 10 kat seyreltilmiş kontrol ve kompozit örneklerinde negatif sonuç vermiştir. Bu sonuçlar seyreltmesiz ekstraktlar ile yapılmıştır. Örneklerin farklı seyreltmeler için endotoksisite test tekrarı yapılabilir. BS'nin saflaştırılması farklı yıkama prosedürleri uygulanarak tekrarlanabilir. Kantitatif bir entotoksin analizi yapılarak hassasiyeti daha yüksek sonuçlar elde edilebilir.

#### 4.8. Biyodegradasyon Testi

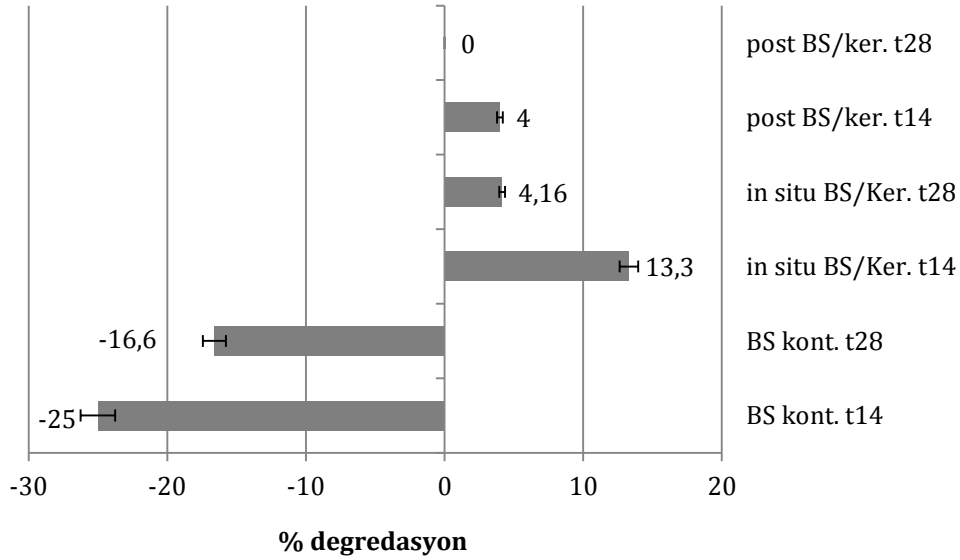
BS kontrol ve hem *in situ* hem de post BS/keratin kompozitleri için PBS (Phosphate Buffer Saline) ve SBF (Simulated Body Fluid) olmak üzere iki farklı tampon ile yapılan degradasyon denemesinin sonuçlarında BS kontrol örneklerinin degradasyonu gözlenmemiştir. Bununla birlikte BS kontrol örneklerinin kuru ağırlıkları ilerleyen haftalarda (14. ve 28. günlerinde) artış göstermiştir. Kullanılan tampon çözeltilerin içerisindeki tuzlar BS yüzeyine mineralize olarak kuru ağırlığı arttırmıştır (Bkz. Şekil 37 ve Şekil 38). *In situ* BS/keratin kompozit örnekleri PBS ve SBF çözeltilerinin her ikisinde de kontrol ile karşılaştırıldığında iyi bir degradasyon profili sergilemişlerdir. PBS içerisinde T14 sonunda %25 oranında degradasyon gösteren *in situ* BS/keratin T28'de sadece %6,6 oranında bozunma göstermiştir. Her hafta düzenli olarak sıvı değişimi yapılan örnekler yıkama yapılmadan PBS/SBF eklemesi yapıldığı için tuz çökelmelerinin oluşumu bu durumun potansiyel sebeplerinden biri olabilir.

Post BS/keratin kompoziti T14 PBS'te %50 ile en yüksek degradasyon yüzdesini göstermiştir.

PBS ile yapılan degradasyon analizleri daha anlamlı sonuçlar vermiştir. Laboratuvarımızda yapılan BS ile ilgili farklı bir çalışmada da SBF sıvısı içerisinde BS inkübasyonu malzeme üzerinde yüksek miktarda çökeltme ve mineralizasyon sonuçlarını doğurmuştur. Bu deneme kapsamında SBF degradasyon sonuçlarının PBS'e göre negatif ve tutarsız çıkması mineralizasyon kaynaklı kuru ağırlık nedeniyledir.



Şekil.37 PBS içerisinde % degradasyon sonuçları



Şekil.38 SBF içerisinde % degradasyon sonuçları

Keratin biyomalzeme olarak biyobozunurluğu yüksek bir materyaldir. Degradasyon sonuçları genel bir çıkarımla keratinin; BS'nin yavaş degradasyonunu hızlandırabilecek potansiyelde olduğu yönündedir. Degradasyon denemeleri farklı yöntemlerle tekrarlanabilir. BS yapısına katılan keratinin çekme



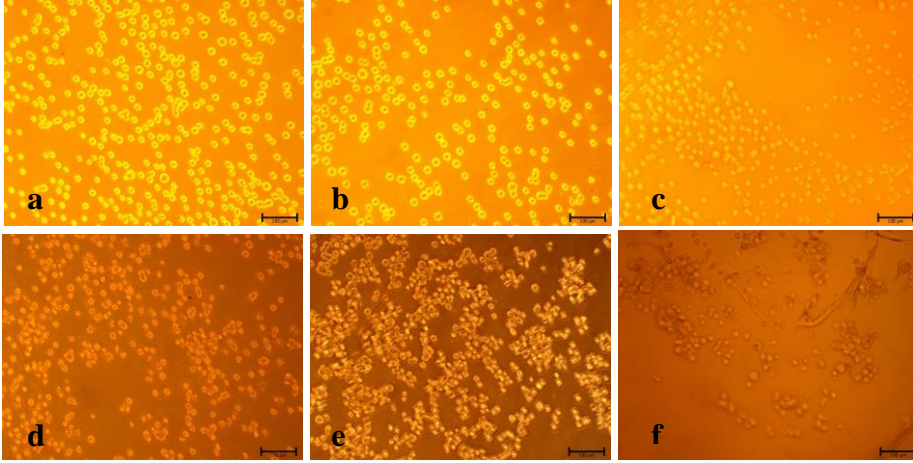
dayanımını azalttığı sonuçlar da göz önüne alındığında degradasyon potansiyelini arttırmış olması tutarlı bir sonuç olarak yorumlanmaktadır.

#### **4.9. *In vitro* Hayvan Hücre Kültürü**

Üretimi ve karakterizasyonları tamamlanan BS ve BS/keratin kompozit malzemelerinin biyoyapay deri geliştirmede kullanım potansiyelinin araştırılması kapsamında *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde BS kontrol, post modifiye BS/keratin kompoziti ve *in situ* BS/keratin kompoziti malzemelerinin alt ve üst yüzeylerine HS2 insan deri keratinosit ve Detroit insan deri fibroblast hücrelerinin ekilerek ko-kültürü yapılmıştır. Öncelikle T0'da malzemelerin üst yüzeylerine HS2 hücreleri ekilmiş ve T1 (ekimden sonraki 1. gün) ve T3 (ekimden sonraki 3. gün)'te fiksasyonları yapılarak SEM görüntülemesi yapılmıştır. Dördüncü günde (T4)'te örnekler ters çevrilerek yüzeye Detroit hücreleri ekilmiştir. Ardından bu örneklerin her iki yüzeyi için de T5 ve T7 de SEM görüntülemesi yapılmıştır.

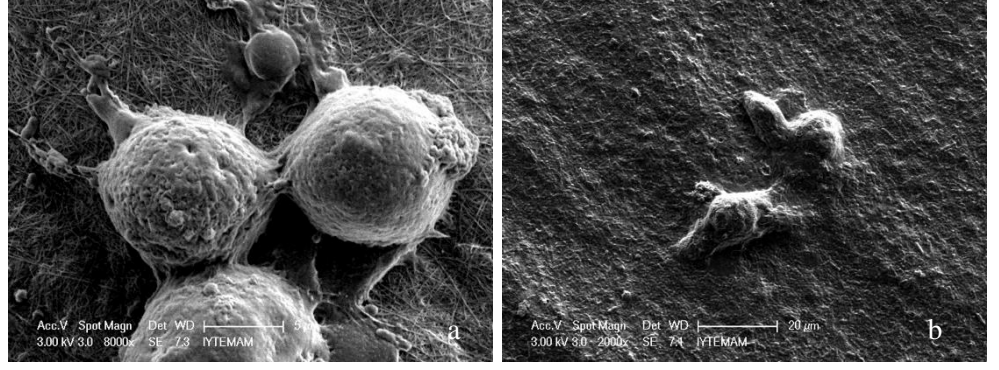
Bu deneme seti iki kez tekrarlanmıştır 2. günde ışık mikroskobu ile hücrelerin durumu takip edilip görüntü alınmıştır.

Işık mikroskobu görüntülerinden 2. günde HS2'lerin tüm yüzeylerde canlılıklarını korudukları görülmektedir.

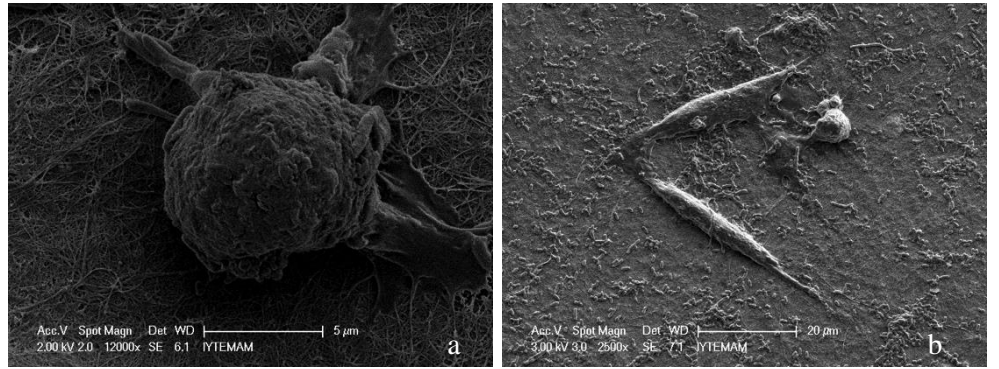


**Şekil.39** HS2 hücrelerinin materyal üzerinde T0 ve T2 de ışık mikroskobu görüntüleri a) BS kontrol T0, b) *in situ* BS/keratin T0, c) Post BS/keratin T0, d) BS kontrol T2, e) *in situ* BS/keratin T2, f) Post BS/keratin T2

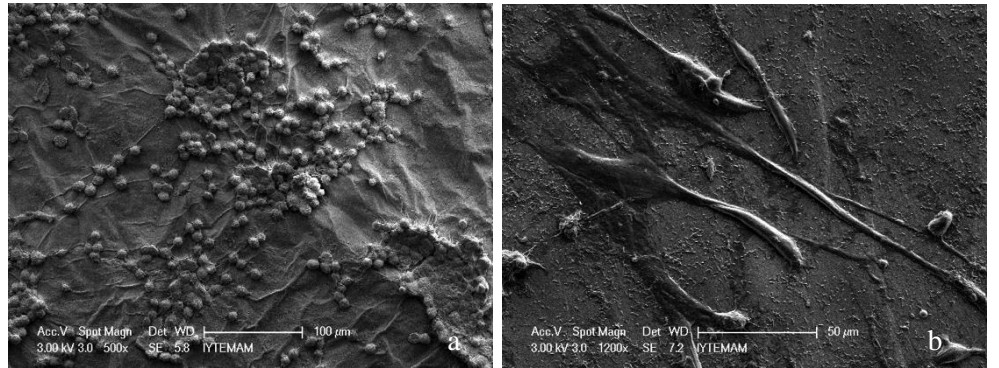
İnkübasyon süresince yapılan mikroskobik gözlemler ve SEM görüntülerinden HS2 hücrelerinin keratin varlığında daha iyi tutunma çoğalma gösterdiklerini özellikle post modifikasyonla üretilen (emdirme - liyofilizasyon) BS/keratin kompoziti üzerinde hücre yoğunluklarının BS kontrole göre daha iyi olduğu yorumu yapılabilmektedir (Bkz. Şekil 40,41,42,43). Şekil 41b ve 42b’de Detroit hücrelerinin orjinal morfolojilerindeki gelişimleri açık bir şekilde görülmektedir. Bu durumda tez hipotezini doğrulamış ve malzemelerin diğer yüzeyine ekilen Detroit hücreleri her iki kompozit materyal üzerinde de kontrole kıyasla kendi morfolojilerinde tutunma özellikleri gösterebilmişlerdir.



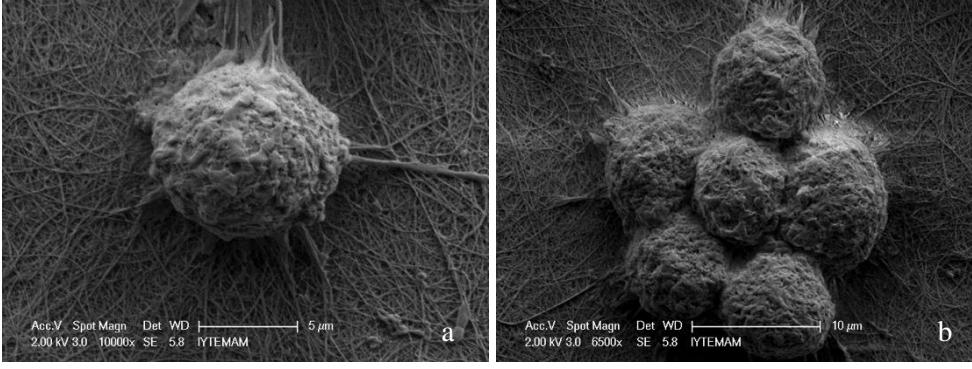
Şekil.40 BS kontrol üzerinde a) T3 – HS2 ve b) T7 – Detroit SEM görüntüleri



Şekil.41 *In situ* BS/keratin kompoziti üzerinde a) T3 – HS2 ve b) T7 – Detroit SEM görüntüleri



Şekil.42 Post BS/keratin kompoziti üzerinde a) T3 – HS2 ve b) T7 – Detroit SEM görüntüleri



**Şekil.43** a-b) Post modifiye BS/keratin üzerinde HS2 hücrelerinin tutunma - SEM görüntüsü

Önceki çalışmalarda Sancavanakit ve arkadaşları (2006) deri fibroblast hücrelerinin BS doku iskelesi üzerinde iyi tutunmadıklarını bildirmişlerdir (Sanchavanakit et al., 2006). Tez kapsamında BS'nin keratin ile modifiye edilmesiyle deri hücreleri için destekleyici özellikte yeni bir kompozit malzeme üretimi sağlanmıştır.

## 5.GENEL SONUÇLAR

İnsan saçından keratin izolasyonu Shindai ekstraksiyon yöntemi ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen keratin diyalizatın karakterizasyonları yapılmıştır. Bu yüksek lisans tezinin hipotezini oluşturan konu keratin ile bakteriyel selülozun birleştirilmesi ve yapay deri oluşturma potansiyelinin değerlendirilmesi olarak özetlenebilir. Tez kapsamında bu hipotez iki farklı yaklaşım ile doğrulanmış ve gerçekleştirilmiştir. *In situ* ve post modifikasyon ile keratin içeren bakteriyel selüloz biyokompozitinin üretimi ilk kez bu çalışmada denenmiş ve başarılmıştır. İnsan deri hücreleri ile yapılan *in vitro* hayvan hücre kültürü çalışmaları bu kompozit malzemenin deri hücrelerinin büyüme ve gelişmesini desteklediği ve biyoyapay deri geliştirmede kullanım potansiyeli olabileceği doğrultusunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde BS üzerinde tutunma afinitelerinin zayıf olduğu bildirilen deri fibroblastları keratin içeren bakteriyel selüloz tabanlı kompozitler üzerinde iyi bir tutunma profili sergileyerek kendi morfolojilerinde gelişme göstermişlerdir.

## 6.ÖNERİLER

Shindai özütünden keratin karakterizasyonu için dizi analizi, Western Blot, saf keratin ile karşılaştırmalı SDS PAGE vb. gibi ileri teknikler yapılabilir.

Endotoksisite denemelerinde seyreltme yapılmayan örneklerin endotoksin içeriği pozitif çıkmış, on kat seyreltilmiş örnekler ise endotoksin negatif çıkmıştır. Örneklerin seri seyreltmelerine LAL testi tekrarlanarak sınır endotoksin değeri bulunabilir veya farklı bir endotoksin testi ile deneme kantitatif olarak yapılabilir.

Degradasyon denemeleri sonucunda kuru ağırlıklarında artış gözlenen malzemelere SEM/EDX analizi yapılarak malzeme yüzeyindeki mineralizasyon gösterilebilir. Haftalık olarak değiştirilen bozunma sıvılarına LC/MS cihazı ile glukoz tayini yapılarak bozunma süreci izlenebilir. Degradasyon analizine alternatif olarak üretilen kompozit malzemelerin degradasyon testleri *in vivo* olarak da gerçekleştirilebilir.

Malzeme üzerindeki hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimlerini daha ayrıntılı incelemek için çeşitli floresan boyamalar yapılabilir. Keratinosit ve fibroblast hücreleri için kompozitlerden kesit alınarak immunohistokimyasal analizler gerçekleştirilebilir.

Bu tez kapsamında, *in situ* ve post modifikasyon yöntemiyle üretilen yeni BS/keratin kompozit biyomalzeme, kıl kökü ve sinir ucu gibi derinin diğer elemanlarını ve *in vivo* denemeleri de içeren daha ileri yapay deri geliştirilmesi çalışmalarına temel oluşturmaktadır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Abeer, M. M., Mohd Amin, M. C. I., and Martin, C.,** 2014, A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), 1047–1061 pp.
- Apel, P. J., Garrett, J. P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T. L., Van Dyke, M. E.,** 2008, Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *The Journal of Hand Surgery*, 33(9), 1541–7 pp.
- Balaji, S., Kumara, R., Sripriyaa, R., RAO, U., Mandalb, A., Kakkara, P., NeelaKanta Reddyc, P., Kumar Sehgal, P.** 2010, Characterization of keratin–collagen 3D scaffold for biomedical applications. *Polymer Advanced Technologies*, 2012, 23, 500–507 pp.
- Barud, H. S., Regiani, T., Marques, R. F. C., Lustri, W. R., Messaddeq, Y., and Ribeiro, S. J. L.,** 2011, Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. *Journal of Nanomaterials*.
- Brown, R. M.,** 2004, Cellulose Structure and Biosynthesis : what is in store for the 21st century *Journal of Polymer Science*, 42(February), 487–495 pp.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., and 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 pp.
- Culebras, M., Grande, C. J., Torres, F. G., Troncoso, O. P., Gomez, C. M., and 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., and Brown, R. M.,** 2006, Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145–151 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Czaja, W., Romanovicz, D., and Brown, R. M.,** 2004, Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3), 403–411 pp.
- Demir, T., Hameş, E. E., Öncel, S. S., and Vardar-Sukan, F.,** 2015, An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 134–140 pp.
- Dubey, V., Pandey, L. K., and Saxena, C.,** 2005, Pervaporative separation of ethanol/water azeotrope using a novel chitosan-impregnated bacterial cellulose membrane and chitosan-poly(vinyl alcohol) blends. *Journal of Membrane Science*, 251(1-2), 131–136 pp.
- Erbas Kiziltas, E., Kiziltas, A., Blumentritt, M., and 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.
- Fu, L., Zhang, J., and Yang, G.,** 2013, Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1432–1442 pp.
- Fujii, T., Takayama, S., Ito, Y.,** 2013, A novel purification procedure for keratin-associated proteins and keratin from human hair. *Journal of Biological Macromolecules*, 13(3), 92-106 pp.
- Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., and Carmen Bañó, M.,** 2009, Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 5(5), 1605–1615 pp.
- Hill, P., Brantley, H., and Van Dyke, M.,** 2010, Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. *Biomaterials*, 31(4), 585–593 pp.
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, a. M., and 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 pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Huang, H. C., Chen, L. C., Lin, S. Bin, Hsu, C. P., and 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.
- Idris, A., Vijayaraghavan, R., Rana, U. A., Patti, a. F., and MacFarlane, D. R.**, 2014, Dissolution and regeneration of wool keratin in ionic liquids. *Green Chemistry*, 16(5), 2857 p.
- Ifuku, S., Tsuji, M., Morimoto, M., Saimoto, H., and 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., and Budhiono, A.**, 2000, Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270 pp.
- Izawa, I., and Inagaki, M.**, 2006, Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science*, 97(3), 167–174 pp.
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S., and Wang, S. S.**, 2008, Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27 pp.
- Jing, W., Chunxi, Y., Yizao, W., Honglin, L., Fang, H., Kerong, D., and 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., and Farah, L. F.**, 1998, Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 101–106 pp.
- Karthikeyan, R., Balaji, S., and Sehgal, P.**, 2007, Industrial applications of keratins-a review. *Journal of Scientific and Industrial ...*, 66(September), 710–715 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H. P., and Marsch, S.,** 2006, Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Advances in Polymer Science*, 205(1), 49–96 pp.
- Krystynowicz, a, Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, a, Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., and Bielecki, S.,** 2002, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(4), 189–195 pp.
- Laemmli-like, R.,** 1996, Mini-PROTEAN TGX™ Gel: A Versatile and Robust Laemmli-Like Precast Gel for SDS-PAGE. *Electrophoresis*, 5–8 pp.
- Lane, EB., and McLean, WHI.,** 2004, Keratins and skin disorders. *Journal of Pathology*, 204: 355–366 pp.
- Li, Y., Qing, S., Zhou, J., and Yang, G.,** 2014, Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 496–501 pp.
- Lin, S. P., Loira Calvar, I., Catchmark, J. M., Liu, J. R., Demirci, A., and Cheng, K. C.,** 2013, Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20(5), 2191–2219 pp.
- Lopes, T. D., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A., and 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.
- Luo, H., Zhang, J., Xiong, G., and Wan, Y.,** 2014, Evolution of morphology of bacterial cellulose scaffolds during early culture. *Carbohydrate Polymers*, 111, 722–728 pp.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P., and Leube, R. E.,** 2007, Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2021–2032 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Martins, D., Prado, H. Do, and Leite, R.,** 2011, Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. *Integrated Waste Management Volume II*, 472 p.
- Metcalf, A. D., and Ferguson, M. W. J.,** 2007, Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 4(14), 413–437 pp.
- Moll, R., Divo, M., and Langbein, L.,** 2008, The human keratins: Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705–733 pp.
- Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., and Fujii, T.,** 2002, A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 569–572 pp.
- Nakayama, A., Kakugo, A., Gong, J. P., Osada, Y., Takai, M., Erata, T., and Kawano, S.,** 2004, High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose. *Advanced Functional Materials*, 14(11), 1124–1128 pp.
- Nandgaonkar, A. G., Wang, Q., Fu, K., Krause, W. E., Wei, Q., Gorga, R., and A. Lucia, L.,** 2014, A one-pot biosynthesis of reduced graphene oxide (RGO)/bacterial cellulose (BC) nanocomposites. *Green Chemistry*, 16(6), 3195–3201 pp.
- Pandey, L. K., Saxena, C., and Dubey, V.,** 2005, Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 42(3), 213–218 pp.
- Park, S. U., Lee, B. K., Kim, M. S., Park, K. K., Sung, W. J., Kim, H. Y., Park, D. H.,** 2014, The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. *International Wound Journal*, 11(1), 35–43 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Pavaloiu, R.-D., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jinga, S. I., and 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.
- Rouse, J. G., and Van Dyke, M. E.,** 2010, A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2), 999–1014 pp.
- Ruka, D. R., Simon, G. P., and Dean, K. M.,** 2013, In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1717–1723 pp.
- Sanchavanakit, N., Sangrungraungroj, W., Kaomongkolgit, R., Banaprasert, T., Pavasant, P., and Phisalaphong, M.,** 2006, Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnology Progress*, 22(4), 1194–1199 pp.
- Schultz, S. J., and Champoux, J. J.,** 2008, RNase H activity: Structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Research*, 134(1-2), 86–103 pp.
- Scionti, G.,** 2010, Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Implants  
Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Implants.
- Shen, D., Wang, X., Zhang, L., Zhao, X., Li, J., Cheng, K., and Zhang, J.,** 2011, The amelioration of cardiac dysfunction after myocardial infarction by the injection of keratin biomaterials derived from human hair. *Biomaterials*, 32(35), 9290–9 pp.
- Sierpinski, P., Garrett, J., Ma, J., Apel, P., Klorig, D., Smith, T., Van Dyke, M.,** 2008, The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, 29(1), 118–128 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A., and Yamauchi, K.,** 2002, Preparation and characterization of keratin – chitosan composite film. *Advances*, 23(May 2001), 817–825 pp.
- Thiruvengadam, V., and Vitta, S.,** 2013, Ni-bacterial cellulose nanocomposite; a magnetically active inorganic-organic hybrid gel. *Rsc Advances*, 3, 12765–12773 pp.
- Wang, J., Lu, X., Ng, P. F., Lee, K. I., Fei, B., Xin, J. H., and 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.
- Wu, J., Zheng, Y., Song, W., Luan, J., Wen, X., Wu, Z., Guo, S.,** 2014, In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 762–771 pp.
- Yamanaka, S., and Sugiyama, J.,** 2000, Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 7(3), 213–225 pp.
- Yu, J., Yu, D. W., Checkla, D. M., Freedberg, I. M., and Bertolino, a P.,** 1993, Human hair keratins. *The Journal of Investigative Dermatology*.



## ÖZGEÇMİŞ

### **Zalike Keskin**

**Biyomühendis** (Ege Üniversitesi,  
Mühendislik Fakültesi,  
Biyomühendislik Bölümü)

**Yüksek Lisans** (Ege Üniversitesi,  
Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyomühendislik Anabilim Dalı)

35100 Bornova/ İzmir/Türkiye

e-posta: [zalike@gmail.com](mailto:zalike@gmail.com)

Tel: 0535 735 9521



### **Eğitim Bilgileri**

**Yüksek Lisans, Eylül 2013 - 2015;** Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD, İzmir/Türkiye

**Lisans, Ağustos 2009 – Haziran 2013;** Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Türkiye

**Lise, Eylül 2005 – Haziran, 2009;** Alaplı Anadolu Lisesi, Matematik/Fen Bölümü, Zonguldak/Türkiye

**İlköğretim – Ortaöğretim, Eylül 1998 – Haziran 2005;** Alaplı Kasımlı İlköğretim Okulu, Zonguldak/Türkiye

### **Yüksek Lisans Tez Konusu:**

Keratin İçeren Bakteriyel Selüloz Tabanlı Yeni Bir Kompozit Biyomalzeme Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoyapay Deri Geliştirilmesinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması (TÜBİTAK 114M082) (Danışman: Doç.Dr.E.Esin HAMEŞ-2015)

### **Lisans Bitirme Tez Konusu:**

Statik Kültürde Üretilen Bakteriye Selüloz Membranların Doku İskelesi Olarak Kullanımı ve Mekanik Karakterizasyonu (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aylın ŞENDEMİR ÜRKMEZ - 2013 )

### **Dil Bilgileri**

Türkçe – Anadil

İngilizce – İyi Seviyede (YDS 2015: 80.00)

Almanca – Başlangıç Seviyesinde

Korece – Başlangıç Seviyesinde (Hobi)

### **Staj Bilgileri**

İşletme Stajı, Sanofi-Aventis, Üretim Tesisleri, ZENTIVA Sağlık Ürünleri A.Ş., 5 Ağustos - 6 Eylül 2012, Lüleburgaz-Kırklareli, Türkiye.

### **Sertifikalar ve Katıldığı Program Bilgileri**

**Uluslararası Biyomedikal Mühendisliği Kongresi 2015 IBMEC**, Katılımı, 11-14 Mart 2015, Girne/KIBRIS

**Uluslararası Biyomühendislik Kongresi**, Katılımı, 12-15 Kasım 2013, Kuşadası/İzmir

**15. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu**, Katılımı, 12-15 Kasım 2013, Kuşadası/Türkiye

**18. Ege Onkoloji Günleri, “Onkolojide Nano Tıp Uygulamaları Kursu”**, Katılım Belgesi, 7 Kasım 2013, Ege Üniversitesi Hastanesi /İzmir *Kurs Başkanı: Ayfer Haydaroğlu*

**Lisansüstü Öğrencileri Oryantasyon Programı**, E.Ü EBİLTEM- TTO, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dekanlığı, 25-27 Eylül 2013

**Araştırma Deneyim Sertifikası**, 2011, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

“Araştırma Laboratuvarlarında Gönüllü Çalışma” -320 saat-“Hayvan Hücre



ve Doku Kültürü Laboratuvarı” *Danışman: Aylin Şendemir Ürkmez*

**“Değişim Sürecinde Yönetim ve Yönetmelik” Semineri**, 8-11 Mayıs 2013, Etik Yönetim Danışmanlığı, İsmail TÜRKMEN.

**İngilizce Kursu Katılım Sertifikası**, YDS Academy of Language Studies, 4 Mart – 4 Nisan 2013, İzmir/Türkiye

**Doku Mühendisliği Sempozyumu**, EBİLTEM, Ege Üniversitesi, EBİLTET, 11 Nisan 2011.

**Nanotechnology in Medicine, Functional Materials and Their Medical Application**, 4-5 Temmuz 2011, Ege Üniversitesi, İzmir/Türkiye.

**EBİLTET 2.Kök Hücre Sempozyumu**, EBİLTEM, EBİLTET, Ege Üniversitesi Sağlık, Spor ve Kültür Daire Başkanlığı, 23 Mart 2011, İzmir/Türkiye

**“Yapay Doku ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar”** EBİLTEM, EBİLTET, 27 Ekim, 2009

**2008 - 2009, TÜBİTAK- OYAK “Hayat Matematiktir” Liselerarası Matematik Yarışması**, Alaplı Anadolu Lisesi, -2 yıl üst üste okul temsilciliği-

## **Uluslararası Bildiriler**

**Keskin, Z.**, Hameş E.E. 2015. Different Purification Approaches to Bacterial Nano Cellulose for Biomedical Applications **“International Biomedical Engineering Congress 2015 IBMEC”** Girne/Kıbrıs

**Keskin, Z.**, Duman, O.M, Hameş, E., Şendemir-Ürkmez A. 2013. Bacterial Cellulose Membranes Produced in Static Culture, the Use of Skin Fibroblast Cells as a Tissue Scaffold and Mechanical Characterization. **“19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013)”** Kuşadası, AYDIN/Türkiye