

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYAL HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Didem MİMİROĞLU

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Nuray YAZIHAN

ANKARA

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Didem MİMİROĞLU

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Nuray YAZIHAN danışmanlığında Didem MİMİROĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 13.10.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Berrin İmge ERGÜDER

İmza:

Üye: Prof.Dr. Nuray YAZIHAN

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr. Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Didem MİMİROĞLU

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof.Dr. Nuray YAZIHAN

Hyaluronik asit (HA) yüksek molekül ağırlıklı bir glikozaminoglikan polimeridir, molekül ağırlığı onun fizyolojik rolünü, reolojik özelliklerini ve bunlara bağlı olarak uygulama alanlarını belirlemektedir. HA, rutin olarak hem Grup A hem de Grup C *Streptococcus* türlerinin fermantasyonu ile üretilmektedir. Günümüz biyoteknoloji alanı içerisinde hyaluronik asit oldukça önemli bir yere sahiptir. HA' nın farklı formülasyonları ve moleküler ağırlıkları; oftalmoloji, ortopedik cerrahiler, rejenerasyon sürecinin hızlandırılması ve desteklenmesi gibi alanlar başta olmak üzere tıpta ve günümüzde oldukça yüksek bir pazar payına sahip olan kozmetik sektöründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, *Streptococcus equi* (*S.equi*) (9682) mikroorganizması kullanılarak HA üretimi, saflaştırılması, immünojenite ve toksikolojik analizlerin yapılması amaçlanmıştır. Mikrobiyal üretimde optimum koşulların belirlenebilmesi amacıyla, farklı çalkalama hızları, pH değerleri, inkübasyon sıcaklıkları, inokulum ve sukroz konsantrasyonları denenmiştir. Ardından kültür sıvısından ekstraksiyon yöntemi ile HA elde edilmiştir. Elde edilen HA çözeltisine farklı moleküler boyutlardaki diyaliz membranları uygulanarak, saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ve ticari olarak satılan farklı moleküler ağırlıklardaki HA' nın fare deri fibroblast (L929, ATCC) hücre dizisi kullanılarak *in vitro* hücre canlılık değerlendirme (MTT testi) yapılmış ve biyoyumluluk değerlendirme için insan monositik hücre dizisi (THP-1, ATCC) makrofaja, phorbol-12-miristat-13-asetat (PMA) uygulaması ile farklılaştırılarak elde edilen HA makrofaj hücrelerine uygulanmış ve immünolojik yanıt oluşturup oluşturmadığı proinflamatuvar sitokinlerden tümör nekroze edici faktör (TNF- α), interlökin-8 (IL-8) ve anti-inflamatuvar sitokin interlökin-10 (IL-10) sekresyon düzeyleri belirlenerek değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, üretilen HA' nın, ticari olarak alınan HA ile aynı immünolojik yanıtı vermiş olduğu gözlemlenmiştir.

2015, 75 Sayfa

Anahtar Kelimeler: hyaluronik asit, *Streptococcus equi*, biyoyumluluk

ABSTRACT

MScThesis

MICROBIAL PRODUCTION AND PURIFICATION OF HYALURONIC ACID

Didem MIMIROGLU

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nuray YAZIHAN

Hyaluronic acid (HA) is a linear high molecular weight glycosaminoglycan polymer with its molecular weight determining its physiological role, rheological properties and applications. HA is routinely produced through fermentation of both Group A and C streptococci. Today, HA has a very important place in the biotechnology field. HA is used due to its different formulations and molecular weights in ophthalmology, orthopedic surgery, accelerating the process of regeneration and support, especially in commercial medicine and in cosmetic industry in which is widely used and has a very big market today. In this thesis, *Streptococcus equi* (*S.equi*) (9682) was used for the microbial production process and then, purification, immunological and toxicological processes were applied to it which was obtained by *S.equi*. To obtain the optimum conditions of microbial production, different shaking rates, pH values, temperatures, inoculum and sucrose concentrations were applied to culture process. Next, HA was extracted from fermentation culture. And then, HA was purified with using dialysis membranes which have different molecular weight cut-off (MWCO). Mouse fibroblast cells (L929, ATCC) were used for toxicity test (MTT) to evaluate *in vitro* cell viability of the obtained and purchased HA and human monocytes (THP-1) cell line which were differentiated to macrophage cells by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), were used for biocompatibility tests to evaluate tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) cytokines secretion of them for immunological respond. And, the produced and commercial HA gave the same immunological results on these tests.

2015, 75 Pages

Anahtar Kelimeler: hyaluronic acid, *Streptococcus equi*, biocompatibility

TEŞEKKÜR

Hayatımda tam da tekrar dibe batıyorum dediğim anda beni öğrencisi olarak yanına alarak, tekrar hayata bağlayan, üstün bilgisini, entelektüel birikimini, emeğini benden esirgemeyen, sosyal hayatımda da yanımda olan, beni adeta kendi kızı gibi gören çok değerli danışmanım Prof. Dr. Nuray YAZIHAN' a,

Beni, danışmanım Prof. Dr. Nuray YAZIHAN' la tanıştıran ve laboratuvarlarında geçirdiğim süre içerisinde bana destek olan Prof. Dr. Net DAŞ EVCİMEN' e,

Tez deneylerimde daima yanımda olup, bana her aşamada tecrübesiyle ve en umutsuz olduğum anlarda manevi olarak da yanımda olan Uzm. Derya BİRİKEN' e,

Tez çalışmam boyunca bana Hacettepe Üniversitesi Biyokimya laboratuvarlarında sorgusuz sualsiz ve sonsuz çalışma izni veren Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ' a ve tüm Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu' na,

Tezimin en önemli aşamasını laboratuvarlarında bana eğitim vererek, öğreten ve çalışmalarımı gerçekleştirmeme izin veren başta Prof. Dr. Ahmet ÇABUK, Yrd. Doç. Dr. Pınar AYTAR ve Uzm. Serap GEDİKLİ olmak üzere tüm Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü çalışma grubuna,

Yüksek lisansım boyunca beni ailelerinin küçük kızı olarak gören ve beni rahatça kabul eden tüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziopatoloji Bilim Dalı hocalarına ve çalışanlarına,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' nde geçirdiğim iki sene boyunca tüm sorularıma cevap veren, mesai saatleri dışında bile ulaşabildiğim ve ablam olarak gördüğüm öğrenci işleri koordinatörümüz Asuman ERZİNCAN' a,

Beni koşulsuzca seven, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımnda ve ideallerimi gerçekleştirme yolunda en büyük destekçilerim annem Sevgi MİMİROĞLU ve babam Bulut Ömer MİMİROĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14L0230008 nolu proje ve TÜBİTAK BİDEB 2210-C burs programı ve Sanayi Bakanlığı SAN-TEZ 0443STZ2013-2 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bu tez çalışması ideallerini Türkiye Cumhuriyeti' nin baki geleceği üzerine kuran ve onun için çalışan gençlere adanmıştır...

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. HYALURONİK ASİT ÜRETİM YOLLARI	6
2.1.1. HAYVANSAL KAYNAKLI HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ	6
2.1.2. BAKTERİYEL KAYNAKLI HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ	6
2.2. HYALURONİK ASİT MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİ	14
2.3. HYALURONİK ASİTİN İMMÜNOLOJİK YANITI	16
3. AMAC VE GEREKÇE	20
4. MATERYAL VE YÖNTEM	22
4.1. S.EQUI AŞI KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI	22
4.2. S.EQUI ÜRETİM ORTAMININ HAZIRLANMASI	22
4.3. HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ İÇİN KÜLTÜR ORTAMININ OPTİMUM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ	23
4.3.1. SUKROZ MİKTARININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	23
4.3.2. PH DEĞERİNİN HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	24
4.3.3. İNKÜBATÖR ÇALKALAMA HIZININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	24
4.3.4. İNKÜBASYON SICAKLIĞININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	24
4.3.5. İNOKULUM YOĞUNLUĞUNUN HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	24
4.4. KÜLTÜR SIVISINDAN HYALURONİK ASİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ	25
4.5. HYALURONİK ASİTİN DİYALİZ İLE SAFLAŞTIRILMASI	25
4.6. HYALURONİK ASİT MİKTAR TAYİN YÖNTEMİ	26
4.7. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN VE TOKSİSİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ	26
4.8. HYALURONİK ASİT BİYOUYUMLULUK TESTLERİ	28

4.9. ELDE EDİLEN VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	30
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>32</u>
5.1. HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ İÇİN KÜLTÜR ORTAMININ OPTİMUM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ	32
5.1.1. SUKROZ MİKTARININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	32
5.1.2. PH DEĞERİNİN HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	32
5.1.3. İNKÜBASYON ÇALKALAMA HIZININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ .	33
5.1.4. İNKÜBASYON SICAKLIĞININ HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	33
5.1.5. İNOKULUM YOĞUNLUĞUNUN HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	33
5.1.6. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN VE TOKSİSİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ	34
5.1.7. HYALURONİK ASİT BİYOUYUMLULUK TESTLERİ.....	38
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>45</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>57</u>
<u>EK-1 TEZ DENEYLERİNDE KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER</u>	<u>67</u>
<u>EK-2 TEZ DENEYLERİNDE KULLANILAN KİTLER</u>	<u>69</u>
<u>EK-3 TEZ DENEYLERİNDE KULLANILAN LABORATUVAR CİHAZ VE GEREÇLERİ</u>	<u>70</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>71</u>
<u>YÜKSEK LİSANS BOYUNCA ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>73</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HA' nın kimyasal yapısı.....	1
Şekil 1.2. HA' nın sentezi.....	3
Şekil 5.1. Farklı HA gruplarının L929 hücre hattı proliferasyonuna etkisi(24 saat).....	34
Şekil 5.2. Farklı HA gruplarının L929 hücre hattı proliferasyonuna etkisi(48 saat).....	35
Şekil 5.3. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin L929 hücre hattı proliferasyonuna etkisi (24. saat)	35
Şekil 5.4. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin L929 hücre hattı proliferasyonuna etkisi (48. saat)	37
Şekil 5.5. A. THP-1 insan monositik hücreleri (naive form) B. PMA (10 ng/ml) ile 48 saatlik uyarım sonrası makrofaja farklılaşmış hücreler	38
Şekil 5.6. Farklı HA gruplarının THP-1 hücre hattındaki IL-8 sitokin sekresyon düzeyine etkisi.....	39
Şekil 5.7. Farklı HA gruplarının THP-1 hücre hattındaki IL-10 sitokin sekresyon düzeyine etkisi.....	39
Şekil 5.8. Farklı HA gruplarının THP-1 hücre hattındaki TNF- α sitokin sekresyon düzeyine etkisi.....	40
Şekil 5.9. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin THP-1 hücre dizisi ile IL-8 sitokin sekresyon düzeyi sonuçları.....	40
Şekil 5.10. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin THP-1 hücre dizisi ile IL-10 sitokin sekresyon düzeyi sonuçları.....	42
Şekil 5.11. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin THP-1 hücre dizisi ile TNF- α sitokin sekresyon düzeyi sonuçları.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Aşı kültürü hazırlanması.....	22
Çizelge 4.2. <i>S.equi</i> HA üretim ortamı.....	23
Çizelge 4.3. İz element çözeltisi.....	23
Çizelge 4.4. Kültür sıvısı ekstraksiyon çözeltisi	25
Çizelge 4.5. PBS çözeltisi	25
Çizelge 4.6. Sodyum tetraborat çözeltisi	26
Çizelge 4.7. Karbazol çözeltisi	26
Çizelge 4.8. Hücre kültürü besiyeri(hazırlandıktan sonra +4 °C' de saklanmıştır)	28
Çizelge 4.9. MTT boyası (5 mg/ml)	28
Çizelge 4.10. Lizis çözeltisi.....	28
Çizelge 4.11. MTT ve biyouyumluluk denemelerinde kullanılan HA konsantrasyonları... ..	28
Çizelge 4.12. ELISA yıkama tamponu	30
Çizelge 5.1. Sukroz konsantrasyonu optimizasyon sonuçları.....	32
Çizelge 5.2. pH değerleri optimizasyon sonuçları	32
Çizelge 5.3. Çalkalama hızı optimizasyon sonuçları.....	33
Çizelge 5.4. Sıcaklık değerlerinin optimizasyon sonuçları	33
Çizelge 5.5. İnokulum yoğunluğunun optimizasyon sonuçları.....	33

SİMGELER DİZİNİ

ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CAM	Chick embriyo koryo allontoik membran modeli
CCP	Kalsiyum pirofosfat
CDM	Kimyasal belirlenmiş ortam
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat penta hidrat
Da	Dalton
DH	Hinute DH
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle' s Medium
EDTA	Etilen diamin tetraasetikasit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat hepta hidrat
FLS	Fibroblast benzeri sinovisit
g	Gram
GAG	Glikozaminoglikan
h ⁻¹	Saat ⁻¹
H ₂ O	Su
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HA	Hyaluronik asit
HAS	Hyaluronik asit sentaz
HCE	İnsan korneal epitel hücreleri
HCl	Hidroklorik asit
HMWHA	Yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit
HRP	Horse radish peroksidaz
Hyal-1	Hyaluronidaz 1

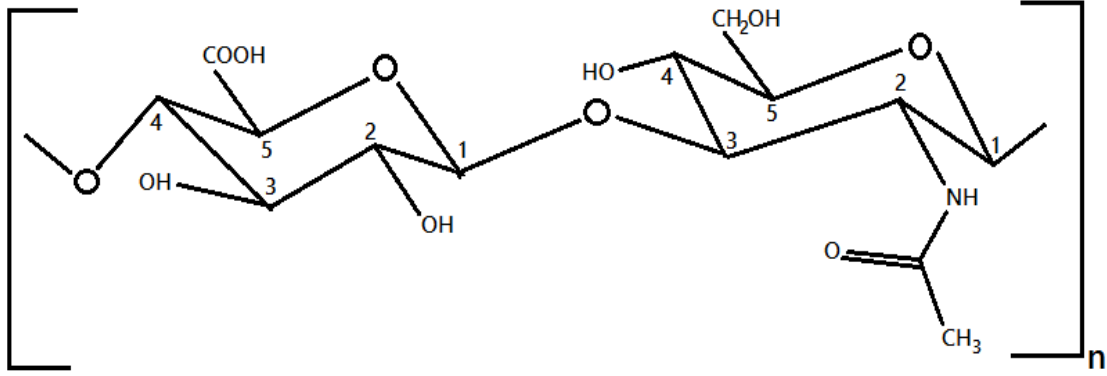
Hyal-2	Hyaluronidaz 2
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IL-10	İnterlökin 10
IL-12p70	İnterlökin 12p70
IL-1 β	İnterlökin 1 β
INF- α	İnterferon α
IFN- γ	İnterferon γ
IVD	İntervertebral disk
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ SO ₄	Potasyum sülfat
kDa	kilodalton
l	Litre
LMWHA	Düşük moleküler ağırlıklı hyaluronik asit
LPS	Lipopolisakkarit
L929	Fare deri fibroblast hücre dizisi
MAP	Mitojen aktive protein kinaz
MCP-1	Monosit kemoatraktant protein-1
MDa	Megadalton
mg	Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat hepta hidrat
ml	Mililitre
MLP-1	Monosit kemoatraktant protein-1
mM	Milimolar
MMP	Matriks metalloproteinazları
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MWCO	Molecular weight cut off
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Disodyum monofosfat dodekahidrat
ng	nanogram
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PFC	Perfluorodecalin
PMA	Phorbol-12-miristat-13-asetat
PPP	Pentoz fosfat yolağı
RAW	Sıçan makrofaj hücre hattı
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma değeri (standart deviation)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	standart hata değeri (standart error of the mean)
<i>S.equi</i>	<i>Streptococcus equi</i>
<i>S.thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>S.zooepidemicus</i>	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
SLS	Sodyum lauril sülfat
subsp.	Subspecies
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör-β
THP-1	İnsan monositik hücre dizisi
TIMP	Metalloproteinazların doku inhibitörleri
TLR-2	Toll-like reseptör 2
TMB	3-3'-5-5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekroze edici faktör
UDP	Üridin difosfat

UDP-GlcNAc	Üridin difosfat-N-Asetilglukozamin
UVB	Ultraviyole B
ZnCl ₂	Çinko klorür
%	Yüzde
g	Yerçekimi kuvveti (g-force)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrad
v/v	Hacim/hacim

1. GİRİŞ

Hyaluronik asit (HA), diğer adıyla hyaluronan, dallanmamış, sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır (GAG) ve tekrarlayan disakkarit birimlerden (β -1,4-D-glukuronik asit (diğer adıyla üronik asit) ve β -1,3-N-asetil-D-glukozamin) oluşmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. HA' nın kimyasal yapısı, Kuo ve arkadaşlarının (1991) çalışmasından modifiye edilmiştir(1)

İlk defa 1934 yılında Karl Meyer ve John Palmer tarafından bulunan HA, sıığırgözü vitroz sıvısından elde edilmiştir. Aynı grup tarafından HA' nın iki şeker molekülünden oluştuğı gösterilmiş ve böylece kimyasal yapısı da 1950' li yıllarda bulunmuştur. Vücut içerisinde fizyolojik koşullarda sodyum tuzu şeklinde bulunan HA, başlangıçta asit olarak izole edilmiştir(2).

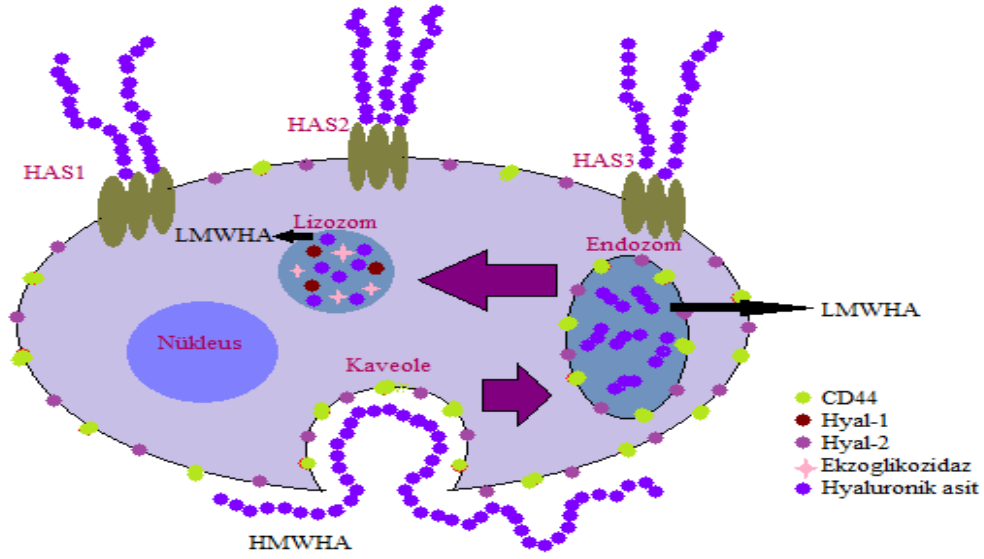
Bir GAG olan HA, diğerlerinin aksine golgi cisimciğinde sentezlenmemektedir. Hücre membranının sitoplazmik yüzeye bakan kısmında sentezlenir ve boyut olarak büyük olduğundan sentezlenme esnasında hücreden çıkışı gerçekleştirilmektedir(3). Bu nedenle basit bir polimer olarak sentezlenme sonrası herhangi bir sülfatlanma veya epimerizasyon reaksiyonuna maruz kalmaz(4). Bu tarz sentez sonrası modifikasyonlar GAG' lara farklı fonksiyonlar kazandırırken, HA bu tarz modifikasyonlara sahip olmamasına karşın birçok biyolojik aktivitede görev almaktadır.

HA, omurgalı dokularının ekstraselüler matriksinde bulunan temel elementlerden biridir. Polianyonik bir molekül olduğ u için su moleküllerine bağlanabilmektedir ve jelatine benzer bir biçimde, bulunduğu çözeltiye viskoz bir özellik verir(5). Higroskopik bir molekül olduğ u için çözeltisi oldukça ozmotiktir(6). Ek olarak HA' nın moleküler

ağırlığının ve konsantrasyonunun yüksek olması da, çözeltinin vizkoelastik özelliğinin yüksek olmasını sağlamaktadır(7).

Genel olarak HA vücutta yüksek moleküler ağırlıklı olarak üretilmektedir, ayrıca orta ve düşük molekül ağırlıklı HA' lar da mevcuttur. Biyoparçalanabilir bir polimer olduğundan vücutta çeşitli işlevlerde çeşitli boyutlarda bulunabilmektedirler. Ancak HA' nın moleküler boyutunun sınıflandırılmasında bazı çelişkiler bulunmaktadır. Literatüre bakıldığında yüksek moleküler ağırlıklı HA için 10^5 - 10^7 Da(8), HA $>10^6$ kDa(9), HA $>5 \times 10^5$ Da(10) ve $2 \times 10^5 - 10 \times 10^6$ (11) gibi değerler yer almakta iken, düşük moleküler ağırlıklı HA için HA <200 kDa(10) ve $2 \times 10^4 - 4,5 \times 10^5$ Da(8) arası düşük-orta moleküler büyüklükte HA olduğu şeklinde farklı kaynaklarda ifadeler yer almaktadır.

HA sentezleyen enzimlere hyaluronik asit sentaz (HAS) enzimleri denilmektedir ve genleri HAS1, HAS2 ve HAS3' tür. HAS enzimleri omurgalılarda, bakterilerde ve algal virüslerde görülen glikozil transferazlardır(12). Birçok omurgalıda dört HAS geni bulunmaktadır, sadece üçü memelilerde farklı özelliklerle ekspresse olur (Şekil 1.2). Bu enzimler ekspresse olurken çeşitli büyüme faktörleriyle ve sitokinlerle kontrol edilirler. HAS genlerinin ekspresyonları doku veya hücre spesifik de olabilmektedir. Bu enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlar aynıdır ancak gerçekleştirmiş oldukları reaksiyonlarla ürünlerinin boyutları farklı olabilmektedir(4).



Şekil 1.2. HA' nın sentezi, Stridh ve arkadaşlarının (2012) çalışmasından modifiye edilmiştir(13)

HAS enzimleri hücre membranının iç yüzeyinde bulunmaktadır ve HA sentezlenme işlemi sırasında Şekil 1.2' de de görüldüğü gibi hücre membranında belirir. HA' nın moleküler boyutu büyük olduğundan, aynı anda hem sentezleme işlemi gerçekleştirilirken, ayrıca HA' nın hücre dışına doğru çıkışı da gerçekleştirilir. Başlangıçta bu mekanizmaya dayanarak HA' nın dışarıya çıkmasını sağlayan eksport mekanizması veya transmembran kanalı ile sentezi gerçekleştiren enzimin ilişkili olabileceği, buna bağlı olarak da farklı iki prosesin farklı zamanlarda gerçekleşiyor olabileceği düşünülüyordu. Ancak daha sonraları biyosentez ve eksport mekanizmasını, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda tek bir polipeptidin gerçekleştirdiği bulunmuştur. Bu duruma bağlı olarak tek bir polipeptidin iki temel glikoziltransferaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir. Aynı zamanda da bunların HA' nın dışarıya salınımı için translokasyonu gerçekleştirebildiği de anlaşılmaktadır(14,15).

Endüstriyel olarak kullanılmakta olan HA farklı şekillerde elde edilmektedir. HA' nın elde edilmesinde en sık kullanılan yöntemler, horozibiği gibi doğrudan dokudan saflaştırma ve bakteriyel üretilimdir. Ancak hayvansal dokulardan izole edilen HA ürünleri, insanlar üzerinde tedavi amacıyla kullanıldıkları zaman bazı riskler mevcuttur. Bunlardan biri çapraz-tür viral enfeksiyon ve immün reaksiyon oluşturmalarıdır(16). Aynı zamanda hayvansal kaynaklı HA, dokudaki proteoglikanlarla kompleks oluşturduğu ve HA parçalayan enzimlerle de kontamine olabileceği için uygulanan saflaştırma işlemlerinden dolayı oldukça maliyetli olmaktadır(17). Bu nedenle günümüzde teknik, ekonomik ve etik

gibi çeşitli açılardan savunulan bakteriyel fermantasyonla HA üretimi gerçekleştirilmektedir. HA sentezi yeteneğine sahip olduğu bilinen bakteriler A ve C grubu gram-pozitif streptokoklardır. Özellikle bir at patojeni olan *S.equi*, insan patojeni *Streptococcus pyogenes*, sığır patojeni *Streptococcus uberis*, *Streptococcus zooepidemicus* (*S.zooepidemicus*) ve *Streptococcus dysgalactiae* HA üreticileridir(18–20) .

Bakteriyel fermantasyon işlemlerinde kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma oranı, çözünmüş oksijen, biyoreaktör tipi) ve kültür ortamının içeriği diğer fermantasyon işlemlerinde olduğu gibi mikrobiyal HA üretimini de önemli ölçüde etkilemektedir(21).

Kesikli, tekrarlı kesikli, beslemeli kesikli ve sürekli kültür gibi çeşitli fermantasyon tipleri HA üretiminde kullanılmaktadır(22,23). Bir kültür kabı içerisinde, fermantasyon sırasında başlangıçtaki kullanılan ortama yeni besin bileşenlerinin eklenmediği ve ortamdan da uzaklaştırma yapılmadığı kültivasyon işlemi olan kesikli fermantasyon işlemi en çok kullanılan HA üretim yöntemidir(23,24).

Biyouyumluluğu, non-immünojenik, biyoparçalanabilir olması ve vizkoelastisiteye sahip olması gibi çok yönlü özelliklerinden dolayı HA, kozmetik, medikal ve farmasötik uygulamalarda ideal bir biyomateryaldir. HA' nın sahip olmuş olduğu polianyoniklik, viskoz yapı gibi karakteristik özellikleri onun yoğun bir şekilde kozmetik dermatolojide ve deri koruyucu ürünlerde mükemmel bir nemlendirici olarak kullanılmasını sağlamaktadır(25). Bunun yanı sıra immünojenitesinin de sınırlı olması çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına izin vermektedir. Günümüzde osteoartrit tedavisinde, oftalmolojik cerrahi müdahalelerde, yara iyileşmesinde ve farklı yollardan ilaç taşıyıcısı olarak da değerlendirilmeye başlanmıştır.

Büyük moleküler ağırlıklı polimer olan HA, higroskopik olması sebebiyle oldukça fazla miktarda su ile etkileşime girebilmektedir. Bu sayede dolgu materyali olarak boşluk doldurucu molekül etkisi gösterebilmektedir ve anti-anjiyojenik, anti-inflamatuar ve immünbaskılayıcı olduğuna dair bilgiler mevcuttur. İmmünbaskılayıcı etkisinin; hücre yüzeyinde bulunan yüzey reseptörlerine ligandların ulaşmasını engelleyecek şekilde yüzeyi kaplamasından kaynaklandığı düşünülmektedir(4). Yüksek moleküler ağırlıklı HA hücrese seviyede birçok enzimatik reaksiyona maruz kalmaktadır ve parçalanarak farklı boyutlarda

HA oluşumuna neden olmaktadır. Küçük HA polimeri fragmentlerinin ise büyük fragmentlerin aksine anjiyojenik, inflamatuvar ve immünostimulatör olduğu bildirilmiştir. Genel olarak bu kısa oligosakkaritlerin vücudun alarm sistemini harekete geçirip uyarıcı etkiye sebep olabildiği düşünülmektedir(26). Küçük HA polimerinin immün sistemin antijen oluşturucu hücreleri olan dendritik hücrelerle sitokin üretimini uyardığı gösterilmiştir(27). Sitokinler, immün ve inflamatuvar yanıt sırasında makrofaj hücreleri başta olmak üzere birçok hücrenin uyarılmasıyla sentezlenerek, diğer hücrelerin bu uyarılara cevap olarak fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan polipeptid yapısındaki maddelerdir. Bunların içerisinde doğuştan immüniteyi sağlayan sitokinlerden TNF- α ve interlökin-1 (IL-1) genel olarak beraber etki göstermektedirler. TNF- α , apoptozisi de tetikleyerek doku hasarına neden olabilen bir sitokindir. IL-8, IL-1 ve TNF- α ' ya cevap olarak uyarılma sonucu aktive olmuş olan makrofajlardan, endotelden ve fibroblastlardan salınarak kemotaktik görev üstlenir ve reepitalizasyon sürecinde önemli rol oynar(28). Özellikle nötrofillerin ve diğer bazı granülositlerin enfeksiyon bölgesine göçüne neden olur ve fagositozu indükler. Bir diğer immün sistem düzenlenmesinde ve inflamasyonda rol oynayan önemli sitokin ise IL-10'dur. IL-10 ise TNF- α ve IL-8'in aksine immün cevabın azalmasında rol oynar(28).

U.S. Food and Drug Administration (FDA) onaylı olan HA'nın dünyadaki pazar payına bakıldığında, kozmetik ve estetik cerrahide kollajenin ve diğer dolgu materyallerinin yerini almasıyla pazar payının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir(29). Günümüzde yaklaşık 100 farklı dolgu materyali olup, bunlardan yarısı HA bazlıdır.

Ülkemize bakıldığında HA polimerinin ihtiyacını karşılamada büyük ölçüde dışa bağımlı olarak hareket ettiğimiz görülmektedir ve her geçen gün de bu pazar payına, gerek osteoartritli hasta sayısının artışı, gerek kozmetik sektörü ve diğer uygulama alanlarındaki artış sonucunda HA'ya olan talep artmaktadır. Bu duruma bağlı olarak, arz-talep çerçevesinde talep edilen HA miktarına bağlı olarak ülkemizde de yüksek oranda HA üretiminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu durum ülkemizde HA üretimine dair çalışmaların önemli ekonomik katkıları olacağını düşündürmüştür.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Hyaluronik Asit Üretim Yolları

2.1.1. Hayvansal Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretimi

HA ilk defa, Karl Meyer ve John Palmer tarafından 1934 yılında sığır gözünden izole edilerek bulunmuştur(5). Ancak kimyasal yapısının tamamen anlaşılabilmesi 20 yıl sonra mümkün olmuştur(2). İlk bulunduğu tarihten itibaren Karl Meyer tarafından 10 yıl boyunca eklem sıvısı, deri, göbek bağı ve horozibiği gibi birçok kaynaktan HA izolasyonu denenmiştir(30). Ardından HA' nın omurgalılardaki birçok dokuda esansiyel bileşen olmasından dolayı hemen hemen her dokudan izolasyonuna başlanmıştır. Ayrıca ilk defa 1949 yılında Boas tarafından horozibiğinden saflaştırılmış olup(31), daha sonraları köpekbalığı derisi gibi başka omurgalılardan da saflaştırılma yolları denenmiştir.

Elde edilen HA' nın medikal uygulamaları ilk olarak 1950' lerin sonunda göz cerrahisinde yapılmaya başlanmıştır(5). Günümüzde büyük moleküler ağırlıklı HA medikal uygulamalar için genellikle horozibiğinden saflaştırılarak kullanılmaktadır(32,33). Ancak hayvansal kaynaklardan elde edilmek istenen HA dokudaki diğer proteoglikanlarla kompleks halinde olduğundan ve saflaştırma işlemleri sırasında degrade edici enzimlerden de korunması gerektiğinden, yapılan ekstraksiyon, saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri oldukça uzun süren ve iş gücü gerektiren uygulamalar haline gelmektedir. Bu durum HA' nın elde edilmesini oldukça maliyetli hale getirmektedir(34). Bunlara bağlı olarak özellikle 80' li yıllardan itibaren mikrobiyal üretime olan ilgi artmıştır ve hayvansal kaynaklardan elde edilen HA yerini yavaş yavaş daha az maliyetli olan mikrobiyal kaynaklı olanlara bırakmaya başlamıştır(35).

2.1.2. Bakteriyel Kaynaklı Hyaluronik Asit Üretimi

Hayvansal doku kaynaklarından HA elde edilmesi için HA' nın dokuda etkileşim halinde bulunmuş olduğu proteoglikanlardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu şekilde yüksek moleküler ağırlıklı HA elde edebilmek oldukça maliyetli olmaktadır. Bunun yanı sıra miktar olarak da yüksek oranda HA üretimi hayvansal dokulardan oldukça sıkıntılı olmaktadır. Ancak bakteriyel üretimle oldukça yüksek miktarlarda maliyeti düşük şekilde

HA üretimi gerçekleştirilmektedir. Aynı zamanda hayvansal dokulardan kaynaklanabilecek viral enfeksiyon ve immünojenik uyarım riski de bulunmaktadır(36).

Endüstriyel olarak HA üretimine bakıldığında özellikle *S.equi subspecies (subsp.) equi* ve *S.equi subsp. zooepidemicus* gibi grup C streptokoklarından 1980' li yılların başından beri üretim gerçekleştirilmektedir ve HA biyosentezinde de uzun yıllardan beri model organizma olarak kullanılmaktadır(37).

Mikrobiyal üretimde kültür koşullarının kontrol edilip optimum koşulların sağlanabilmesi, istenilen hacimlerde üretim gerçekleştirilebilmesi ve gerektiğinde genetik mühendisliğinin de uygulanabilmesiyle verimli ürün üretimi gerçekleştirilebilmektedir(24). Bu sayede birçok üretici fermantasyon koşullarında iyileştirmeye giderek veya mikroorganizmalarda genetik modifikasyonlar yaparak istenilen moleküler büyüklükteki HA üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır.

Mikrobiyal fermantasyonda en önemli unsur mikroorganizmaların laboratuvarında üretilmesi için kullanılan ve içerisinde mikroorganizmaların en temel ihtiyaçlarını karşılayacak maddeleri barındıran kültür ortamıdır. Bu kültür ortamlarının en önemli unsuru yeni hücre materyallerini üretebilmek adına kullanmış oldukları karbon kaynağıdır. Karbon kaynağını takiben azot kaynakları ve çeşitli enzimlerin çalışabilmesi için metaller, tuzlar da oldukça büyük önem teşkil etmektedir. Ayrıca kullanılan mikroorganizmaların aerobik, anaerobik veya fakültatif anaerob olmalarına göre de çözünmüş oksijen konsantrasyonu üretilen ürünü etkilemektedir. Bunlara dayanarak HA üretiminde kültür ortamında değişikliklere gidilerek istenilen moleküler ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda HA üretilmeye çalışılmıştır.

Kültür ortamlarında kullanılan karbon kaynaklarına bakıldığında genel olarak sukroz, maltoz gibi şeker kaynakları kullanılmaktadır. Bunlar için farklı konsantrasyonlarda denemeler yapılmıştır. Azot kaynağı için ise genel olarak maya ekstraktı, pepton veya kazein hidrolizatları tercih edilmektedir ve ortam magnezyum ve fosfat tuzlarını da içermektedir. Azot kaynağının streptokokların büyüme ortamı için oldukça önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir. Çünkü hücresel biyosentez işlemlerinde bu bileşikler azot kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra karbonun da büyük bir kısmını karşılayabilmektedir. Buna dayanarak grup A, grup B ve oral streptokoklar için

üretimlerinde kullanılan tüm bileşenleri ve bu bileşenlerin konsantrasyonları belli olan kimyasal belirlenmiş ortam (CDM), HA üretimini gerçekleştiren grup C streptokokları için spesifik olarak belirlenememiştir(24). Bu nedenledir ki HA üretim prosesinde iyileştirmeye gidilirken besiyeri bileşenlerinin farklı konsantrasyonları denenmektedir.

Kültür koşullarının iyileştirilmesi ile HA üretiminin nasıl değiştiğine yönelik yapılan çalışmalara bakıldığında Kim ve arkadaşları (1996) kültür ortamına lizozim eklenmesini; farklı sıcaklık, pH, karıştırıcı tipi, karıştırıcı hızı ve havalandırma hızlarını denemişlerdir. Sonuç olarak bunların değiştirilmesinin HA' nın moleküler büyüklüğünde ve üretiminde etkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır(21). Ancak daha sonra Ogrodowski ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada lizozimin fermantasyon ortamına eklenmesinin HA konsantrasyonunda düşüşe neden olabileceği gösterilmiştir. Bunun nedeninin kullanılan bakteriyel suşun türünün farklılığı ve fermantasyon koşullarının farklı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir(38).

Izawa ve arkadaşları (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada süt ürünlerinden kullanılabilir ve yüksek miktarda ekzopolisakkarit (HA içeren) üretimi gerçekleştiren *S.thermophilus* suşları izole edilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde HA üretim ortamında HA' nın degradasyonunda rol alan hyaluronidaz enzimi ve endotoksin kontaminasyonunun önlenmesi amaçlanmıştır. Yağsız süttten izole edilen 46 *S.thermophilus* suşundan, 6 suşun (*S.thermophilus* YIT 2001, 2025, 2059, 2084, 2091 ve 2098) HA üretimini gerçekleştirdiği bulunmuştur. Bu suşlardan en çok HA üretimini gerçekleştiren 8 mg/l HA konsantrasyonu ile YIT 2084 suşu olduğu sonucuna varılmıştır ve üretilen HA' nın moleküler büyüklüğünün 2000 ile 100 kDa arasında değiştiği gözlemlenmiştir(39).

Izawa ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada endüstriyel uygulamaları geliştirebilmek amacıyla, *S.thermophilus* YIT 2084 suşundan elde edilen HA üretim verimini arttırmak için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla besiyerinde yağsız süt kullanılarak pH, havalandırma hızı, karıştırma hızı ve sıcaklık parametreleri denenmiştir. Ayrıca soya fasulyesi peptidleri azot kaynağı olarak denenmiştir ve gözlenebilecek verim de incelenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda pH 6,8, 40 °C, 100 rpm, 0 VVM ve %1 DH (Hminute DH) eklenmesi ile gerçekleşen optimum fermantasyon koşulları ve soya fasulyesinin eklendiği durumda 200 mg/l HA üretimi gerçekleştirilmiştir(40).

Chen ve arkadaşları (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Streptococcus equisimilis* CVCC55116 wild-type' dan streptomisin üretmeyen NC2168 numaralı suş üretilerek, HA üretimi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya göre geliştirilen optimum koşullar 32 °C, 200 rpm, pH 7,8 ve ortam hacmi 20 ml olarak belirlenmiştir ve bu koşullarda gerçekleştirilen üretim ile 224,52 mg/l HA elde edilmiştir(41).

Benedini ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada HA üretimi için *S.zooepidemicus* (ATCC 39920) ile hazırlanan inokulum ortamında kullanılan ortam bileşeninde değişiklik yapılmaya gidilmiştir. Bu amaçla HA üretiminden sonra kültür ortamında hayvansal kaynaklı kontaminasyon olmaması amacıyla, ilk kültür ortamında Brain-Heart infusion ve koyun kanı yerine soy pepton kullanımı denenmiştir. 37 g/l Brain-Heart infusion ve %5' lik (v/v) koyun kanı yerine 67 g/l soy pepton kullanılmıştır ve pepton kullanımının üretilen HA miktarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır(42).

Karbon kaynağının konsantrasyonuna yönelik *S.zooepidemicus* (ATCC 35246) ile yapılan bir çalışmada, iki kompartmanlı fermantasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve kullanılan glukozun sınırlandırılmasına gidilmiştir. Glukoz sınırlı büyümede, üretilen HA' nın konsantrasyonunun değişmediği ancak moleküler ağırlığında bir düşüş olabileceği durumu gözlenmiştir(23). Mikrobiyal HA üretiminde benzer başka bir çalışmada da yine glukoz sınırlandırılmasına gidilmiş ve HAS enzimine yeni bir şeker eklenememesine bağlı olarak, HA' nın ortalama moleküler ağırlığında bir düşüş yaşanabilme ihtimalinin olduğu gözlenmiştir(43). Bir diğer çalışma ise Pires ve arkadaşları (2010) tarafından yapılmıştır ve başlangıç glukoz konsantrasyonunun metabolik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla *S.zooepidemicus* (ATCC 39920) suşu kullanılmıştır ve farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları olarak 0, 5, 25, 45 ve 90 g/l denenmiştir. Çalışmanın sonucunda 25 g/l başlangıç glukoz konsantrasyonunun diğer konsantrasyonlara göre yüksek miktarda HA üretiminde daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır(44).

Pires ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada tarımsal kaynak artıklarının mikrobiyal HA üretimi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmada *S.equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC 39920) kullanılarak, konsantre soy protein hidrolizatları, konsantre peynir altı suyu ve kaju fıstığı meyve suyu ile ayrı ayrı hazırlanan besiyeri ortamlarında HA üretimi değerlendirilmiştir. Glukoz ve maya ekstraktı içeren ortam kontrol olarak

kullanılmıştır. En yüksek konsantrasyonda HA üretimi kaju fıstığının meyve suyu ile hazırlanan besiyerinde gerçekleştirildiği görülmüştür (0,89 g/l)(45).

Kültür ortamının en önemli bileşenlerinden azot kaynağı için yapılmış olan bir çalışmada, sınırlı kompleks azot ortamında büyümenin nasıl olduğu değerlendirilmiştir. Azot sınırlı büyümede HA biyokütle veriminde artış olabileceği sonucuna varılmıştır(23).

HA mikrobiyal üretim ortamında oksijenin varlığının değerlendirilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, HA polimerinin aerobik veya anaerobik olarak üretilbildiği, ancak aerobik ortam sağlandığında üretilen HA' nın moleküler boyutunun daha büyük olabileceği sonucuna varılmıştır(46). Bu durum çözülmüş oksijen miktarı arttıkça, üretilen HA' nın moleküler boyutunun diğerlerine göre daha büyük olabilme ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Bununla ilgili yapılmış olan bir başka çalışmada da fakültatif anaerob ve aynı zamanda da aerotolerant olan *S.zooepidemicus*' un (ATCC 35246) oksijenin varlığında daha hızlı ve kompleks biyokütle verimiyle büyüebildiği gösterilmiştir. HA veriminin ve ortalama moleküler ağırlığının anaerobik kültür koşullarıyla kıyaslandığında, aerobik ortamda daha iyi olabileceği sonucuna varılmıştır(43).

Aerobik fermantasyonlara bakıldığında, Newton' un viskozite kanununa uymayan akışkan sistemleri olan non-Newtonian sistemlerinde oksijen oldukça önemlidir. Bu tür sistemlerde oksijenin çözünürlüğü oldukça düşüktür.

HA gibi polisakkaritlerin fermantasyon ortamları, çözeltileri non-Newtonian özellik göstermektedir. Buna bağlı olarak da üretim sırasında gerekli olan çözülmüş oksijenin konsantrasyonunun yüksek tutulması adına çalkalama ve havalandırma hızlarında değişikliklere gidilmiştir(47).

Liu ve arkadaşları (2008) tarafından *S.zooepidemicus* (WSH-24) ile yapılan çalışmada HA üretiminin artırılması için kesikli kültür ortamına hyaluronidaz enzimi eklenerek, HA degradasyonuna bağlı olarak oksijen transferi arttırılmaya çalışılmıştır. 8-16 saatler arasında eklenen hyaluronidaz konsantrasyonu sırasıyla 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 ve 0,25 g/l olacak şekilde arttırılmıştır. Buna bağlı olarak ortamdaki daha iyi bir oksijen transferi gerçekleşmiş olup çözülmüş oksijen konsantrasyonunda %1,5, %3, %5, %10 ve %15

şeklinde artış gözlenmiştir. Ancak HA üretim miktarına bakıldığında 0,15 g/l hyaluronidaz konsantrasyonu ekleme işleminden sonra herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir(48).

Liu ve arkadaşları (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada farklı çözünmüş oksijen kontrolü yaklaşımlarının, mikrobiyal HA üretimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla üç farklı aşamalı karıştırma hızı, iki aşamalı çözünmüş oksijen ve oksijen vektörü olan perfluorodecalin (PFC) yaklaşımları kullanılmıştır. Üç farklı karıştırma hızı kontrol yaklaşımında 200-400-600 rpm hızları belli saat aralıkları ile kullanılmış olup, 5,5 g/l HA üretimi gerçekleştirilmiştir. İki aşamalı çözünmüş oksijen kontrol yaklaşımında üretim esnasında sırasıyla %10 ve %5 konsantrasyonları yine belli saat aralıklarında kullanılarak 6,3 g/l HA üretimi ve son olarak da %3 PFC' den (v/v) kullanıldığında, HA üretimi 6,6 g/l' ye yükselmiştir(49).

Zhang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada çalkalama hızının HA üretimine olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada karıştırıcının hızının artmasıyla kütle transferinin de artabileceği ve buna bağlı olarak HA' nın moleküler büyüklüğünün artışının sağlanabileceği gösterilmiştir. Ancak oldukça yüksek çalkalama hızlarının (450 rpm- 1000 rpm) biyoreaktörde eksponansiyel büyüme fazında NADH oksidaz tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına yol açabildiği ve bunun da HA' nın moleküler büyüklüğünde azalmaya neden olabildiği durumu gösterilmiştir(50).

Mikrobiyal üretim proseslerinde uygun bir besiyeri seçimi mikroorganizmaların üremesi için en temel koşullardan birini oluşturmaktadır. Uygun besiyerlerinin sağlanabilmesi için farklı kültürasyon koşullarının oluşturulması da gerekmektedir. Buna bağlı olarak üç farklı kültürasyon şekli olduğu gözlenmektedir; kesikli büyüme, yarı-kesikli büyüme ve sürekli kültürlerde büyümedir.

Kesikli kültürasyon işleminde başlangıçta hazırlanan besiyerine proses süresince herhangi bir ekleme yapılmazken aynı zamanda besiyerinden herhangi bir uzaklaştırma da yapılmamaktadır. Yarı kesikli kültür sistemleri, başlangıçta kesikli olarak başlayan prosese, zamanla azalan substratın belli aralıklarla azar azar eklenerek gerçekleştirilmesi yöntemidir. Sürekli kültür sistemlerinde ise ortama sürekli olarak besiyeri ilavesi gerçekleştirilirken aynı miktarda da besiyeri ve biyokütle ortamdan uzaklaştırılır.

Farklı kültür sistemleri mikrobiyal HA üretiminde uygulanmıştır. Burada en genel olarak kullanılan kültürasyon işlemi kesikli kültür sistemleridir ve HA üretiminde optimum kültür koşullarının oluşturulmasında en çok kullanılan yöntemdir(51). Bu kültür sistemleri moleküler ağırlığı 1×10^6 Da ile $2,5 \times 10^6$ Da arasında değişen HA' nın üretiminde en sık kullanılan metottur. Yaygın olarak kullanılan üretim sıcaklığının 30 ile 37 °C arasında olduğu görülmektedir ve pH ise 6,5 ile 7,5 arasında değişim göstermektedir. Kullanılan karbon kaynağının konsantrasyon aralığı ise 10 ile 60 g/l olarak ifade edilmektedir(46).

Kesikli kültürle yapılan üretimin yanında iki basamaklı kültür modelleri de oluşturulmaya çalışılmıştır. Buna örnek olarak Cooney ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada, iki kompartmanlı HA fermantasyon modeli gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu model sayesinde tüketilen substratın ve üretilen ürünün akışı tahmin edilmiştir(23). Bunun yanı sıra Liu ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışma da bu duruma örnek gösterilebilir. Burada ikili kültür modeli uygulanmış olup, hem kesikli hem de yarı kesikli kültür sistemi kullanılmıştır. Bu modelde kesikli kültürde HA sentez oranının yüksek olduğu ve yarı kesikli kültürde ise yüksek hücre büyüme hızı gözlemlendiği için, hücre büyümesinin inhibisyonunu azaltıp, bu sayede HA üretiminin artışına doğru sistemi kaydırmışlardır(52).

Sürekli kültürler ise mikrobiyal HA üretiminde hem maliyetli olması açısından hem de özellikle kemostat kültürlerde HA üreten fenotiplerin stabil olmamasından dolayı pek kullanılamamaktadır. Yalnızca tek stabil sürekli kültür HA üretim prosesi streptokoklar tarafından $0,12 \text{ h}^{-1}$ seyreltme hızının altında gerçekleştirilmiştir(36).

S.equi subsp. *zooepidemicus* (ATCC 39920) ile gerçekleştirilen bir başka HA üretim prosesinde bakteride bulunan metabolik proseslerin yarışmasının HA' nın moleküler ağırlığının üzerine olan etkisine bakılmıştır. Jagannath ve Ramachandran (2010) tarafından yapılan çalışmada karbon, azot kaynağı ve enerji üretimi için yarışan üç önemli metabolik yolağın (glikoliz, HA sentezi ve biyokütle oluşumu) HA' nın moleküler ağırlığının belirlenmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda moleküler ağırlığın artışı için en iyi stratejinin glikolizin zayıflatılarak, HA üretim prosesini arttırmak olabileceği sonucuna varmışlardır(53). Bununla ilgili yapılan bir diğer çalışma ise Shah ve arkadaşları (2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. *S.equi* subsp. *zooepidemicus*' da (ATCC 39920) HA üretiminin karbon kaynağı için biyokütle üretimi, pentoz fosfat yolağı (PPP) ve glikoliz

yoluyla laktat oluşumu ile yarıştığı bilinmektedir. Burada yapılan metabolik akış analizi çalışmaları ile belli sonuçlara ulaşılmıştır. Karbon akışının glikoliz ve pentoz fosfat yolağının tersine yönlendirilerek, HA prekürsörlerinin oluşumunun artırılması yoluna gidildiği durumda HA konsantrasyonunun ve moleküler büyüklüğünün artırılabilmesi mümkün olabilmektedir(54).

Yiting ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada üretilen HA' nın sahip olduğu moleküler büyüklüğün önemli olmasına bağlı olarak, üretim ortamına eklenebilecek prekürsör maddenin konsantrasyonunun rolü değerlendirilmiştir. Bu çalışmada üretimi gerçekleştirilen HA' nın moleküler büyüklüğünün kontrolünde UDP-N asetilglukozamin (UDP-GlcNAc) prekürsör madde olarak kullanılmıştır. Buna bağlı olarak, hem besleme stratejisiyle hem de genetik mühendisliği yoluyla bu prekürsör maddenin konsantrasyonu artırılarak etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır. Hücrelerin glukozamin ile beslenmesi UDP-GlcNAc' nin intraselüler konsantrasyonunun artışına neden olmuştur. Bununla beraber diğer yandan üretilen HA' nın moleküler büyüklüğünün düşük olması sonucunu beraberinde getirmiştir. Glukoz ve GlcNAc' nin beraber kullanılması ile de moleküler büyüklükte önemli bir artış sağlanamamıştır. Ancak genetik mühendisliği ile gerçekleştirilen yaklaşımlar sonucunda, UDP-GlcNAc ve moleküler büyüklükte artışa gidilebilmiştir. Bu yaklaşımla UDP-GlcNAc' nin düşük konsantrasyonlarında, moleküler büyüklük ile UDP-GlcNAc arasında pozitif bir korelasyonun olduğu gözlemlenmiştir(55).

Mikrobiyal HA üretim maliyetini düşürme ve daha yüksek moleküler ağırlıkta HA üretim ihtiyacı ile son zamanlarda genetik mühendisliğinin kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Genetik mühendisliği yardımı ile HA üretimi için Widner ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada *Streptococcus equisimilis*' den HAS enzimini kodlayan *hasA* geni alınarak, *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*)' de HA ekspresyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak burada 1-MDa boyutlarında HA üretimi gerçekleştirilmiştir. *B.subtilis*' ten elde edilen HA hem endotoksin içermediğinden güvenli hem de *B.subtilis* grup A ve C streptokoklara göre minimal ortamda büyüyebildiğinden daha az maliyetlidir(56).

Krahulec ve Krahulcova (2006) tarafından yapılan çalışmada HA parçalayan enzim olan β -glukuronidaz enziminin olmadığı mutant suşlar geliştirilmiştir. Buna bağlı olarak mutant suşlarda HA üretiminin yaklaşık olarak %20 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçla beraber üretilen HA moleküler büyüklük açısından değerlendirildiğinde, moleküler büyüklüğünün de %2 oranında arttığı bir sonuç elde edilmiştir(57).

Mao ve Chen (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada endüstriyel gıda polimeri üretici suşu olan *Agrobacterium* sp. ATCC 31749, HA üreticisi olarak kullanılmıştır. Bu amaçla geliştirilen vektörde *Pasteurella multocida*' dan alınan HA sentaz geni ve *Escherichia coli* K5 suşundan alınan UDP-glukoz dehidrogenaz genlerinin koekspressyonu gerçekleştirilmiştir. Burada elde edilen HA moleküler büyüklüğü 0,7-2 MDa arasında değişmektedir(58).

Bunların yanı sıra *Escherichia coli*(59), *Streptococcus thermophilus* (*S.thermophilus*)(60) ve *Pichia pastoris*(61) metabolizma mühendisliği ile HA üretiminin gerçekleştirilmiş olduğu diğer suşlardır.

2.2. Hyaluronik Asit Miktar Tayin Yöntemleri

HA, sülfatlanmamış, N-asetilglukozamin ve D-glukuronik asit (üronik asit) disakkarit birimlerinden oluşan bir GAG' dır. Saf HA renksiz bir bileşendir. Miktar tayin yöntemlerine bakıldığı zaman UV-spektrofotometre ile belli absorbans ölçümlerinin alınabilmesi için renkli bileşikler oluşturabilmek amacıyla, belli renk tepkimelerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu renk tepkimeleri miktarı saptanmak istenen bileşenlerin sahip oldukları reaktif gruplarla gerçekleşmektedir. HA da sahip olduğu disakkarit birimlerinin reaktif gruplarıyla belli renk tepkimelerini oluşturabilmektedir. Bu sayede de HA miktar tayinleri gerçekleştirilmektedir.

HA miktar tayin yöntemlerine bakıldığında en bilinen ve en çok kullanılan yöntem karbazol yöntemidir. Bitter ve Muir (1962) tarafından Dische' nin modifiye edilen yöntemi ile borat varlığında üronik asitin miktar tayinini gerçekleştirmek amacıyla karbazol yöntemi tanımlanmıştır. Tanımlanan bu yöntem ile duyarlılık iki kez artırılmış olup, 4 ile 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığındaki ölçümler için uygun olabileceği bulunmuştur. Yüksek oranda renk oluşumu hızlı bir şekilde gerçekleştirilip ve en az 16 saat bozulmadan kalması

sağlanabilmiştir(62). Gerçekleştirilen karbazol yöntemiyle fazla kimyasal malzemenin ve zamanın tüketilmesi sebebiyle Cesaretti ve arkadaşları (2003) tarafından karbazol metodunun 96 kuyucuklu plakalarda yapılabilmesine yönelik optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir(63). Bu çalışma ile hem malzemedan hem de zamandan tasarruf edilmektedir.

Bir diğer sık kullanılan HA ölçüm yöntemi Alcian Blue yöntemidir. Kimyasal açıdan çalışılırken dikkat edilmediğinde zararı yüksek olabilecek sülfürik asidin kullanılması ve iki kez ısıtma işleminin yapılmasından dolayı karbazol yönteminin uygun olmadığı durumlarda bu yöntem kullanılabilir(32). İlk olarak 1979 yılında Gold tarafından geliştirilen bu yöntem, mikrogram düzeyindeki GAG' ların alcian blue boyası ile çözünebilir kompleksler oluşturabilmesi ilkesine dayanır(64). Ancak karbazol metodu kadar duyarlı bir metot değildir ve yüksek klorür iyonu konsantrasyonlarında girişim yapabilmektedir. Daha sonraları Karlsson ve Björnsson tarafından 2001 yılında biyolojik sıvılarda proteoglikanların miktarlarının saptanması için kullanılmıştır(65).

Jourdian ve arkadaşları (1979) tarafından geliştirilmiş olan bir diğer HA miktar tayin yöntemi ise tiyobarbitirik yöntemidir. Bu yöntem HA' ya spesifik ve duyarlı bir yöntem olarak bilinmektedir. Ancak içerisinde endüstriyel olarak kullanılan mikrobiyal HA liyaz enziminin varlığına gereksinim duyulmasından dolayı maliyeti yüksek olabilecek nitelikte bir miktar tayin yöntemidir. Enzim ile muamele edilen örnek sonucunda oluşan formil piruvik asit tiyobarbitirik asit ile renkli kromofor oluşturup, 549 nm' de ölçümü yapılmaktadır(66). Daha sonra 1980 yılında Adams ve Muir tarafından modifiye edilerek daha duyarlı bir yöntem haline getirilmiştir(67).

Yaygın olarak kullanılan HA miktar tayin yöntemlerinden biri de Morgan-Elson yöntemidir(68). N-asetilglukozamin disakkarit birimi üzerinden HA miktar tayini yapılmaktadır(32).

HA miktar tayinlerinden en duyarlı olarak kullanılan yöntem ise enzim bağlı HA miktar tayin yöntemleridir. Burada HA bağlayıcı proteinler kullanılarak HA' ya spesifik bağlanma sağlanıp, miktar tayini yapılmaktadır. Diğer yöntemlere kıyasla çok daha duyarlı olmasına rağmen, oldukça maliyetli bir yöntemdir. Bu yöntemle nanogram konsantrasyonlarında HA miktarları belirlenebilmektedir(32).

Bunun yanısıra HA' nın doku ve sıvılarda varlığı ve düzeyi ELISA (Ezzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ve benzeri gibi yöntemlerle spesifik antikorlar kullanılarak yapılabilmektedir.

2.3. Hyaluronik Asitin İmmünolojik Yanıtı

Günümüzde HA özellikle tıp ve kozmetik olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alanlarda kullanılan endüstriyel HA' ların hepsi ya hayvansal dokulardan izole edilmektedir ya da bakteriyel olarak üretimi gerçekleştirilmektedir. Üretilen bu HA' nın kimyasal yapısı insan vücudu içerisinde bulunan HA ile benzediği için biyouyumlu ve non-immünojenik olduğu düşünülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı HA' nın kozmetik uygulama dışında, yara iyileşmesinde, eklem hastalıklarında, biyomateryallerde kullanımı söz konusudur. HA' nın hücre proliferasyonunda ve hücre göçünü artırarak doku rejenerasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir(69).

Yara iyileşmesi karmaşık ancak düzenli gerçekleşen bir olaydır. Farklı birkaç evreden meydana gelmektedir ve HA bu evrelerde birçok önemli rolü üstlenmektedir. Yara iyileşmesi sürecine baktığımızda ilk 24 saat içerisinde pıhtılaşma mekanizması devreye girmektedir. Burada yüksek moleküler ağırlıklı olan HA görev alır. Yaralanmadan sonra HA üretiminde artış olur ve yara bölgesinde birikerek, fibrinojene bağlanır. Bu başlangıçtaki yüksek moleküler ağırlıklı HA anti-anjiyojeniktir ve immünbaskılayıcıdır(4). Aynı zamanda burada hücrelerin hareketini sağlayacak ortamı da oluşturarak granülositlerin buraya göç etmesine yardım olur ve ortamdaki ölü dokuların, bakterilerin ve diğer kontaminantların uzaklaşmasını sağlar.

Yara iyileşmesinin ikinci aşamasında (24 saatten sonraki süre içerisinde) inflamasyon basamağı devreye girer. İnsizyon alanını makrofajlar doldurmaya başlar ve çeşitli sitokinlerin salımı gerçekleşir. Bu aşamada ise düşük moleküler ağırlıklı HA devreye girmektedir(70). Büyük moleküler ağırlıklı olan HA ortamda parçalanarak düşük moleküler ağırlıklı hale getirilir(71). Düşük moleküler ağırlıklı HA' nın çeşitli çalışmalarda makrofajlardan IL-8(71), TNF- α (72) sitokin salınımına neden olduğu bildirilmiştir.

TNF- α , yara bölgesinde birçok görevde rol oynamaktadır. Bunlar arasında fibroblast proliferasyonunun ve keratinositlerin düzenlenmesi, kollajen birikimi, ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi ve yıkımı, immün cevabın düzenlenmesi ve büyüme faktörlerinin üretilmesi gibi prosesler yer almaktadır(72,73). TNF- α , düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman indirekt olarak inflamasyonu düzenleyerek yara iyileşmesini ve makrofajların büyüme faktörü üretimini artırır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, yara iyileşmesinde zararlı etkilere neden olur(74).

Bir diğer yara iyileşmesinde önemli olan sitokin ise IL-8' dir. IL-8, keratinosit göçünü ve proliferasyonunu artırarak reepitelizasyon sürecinde rol oynar(74). Dokunun yeniden şekillenmesini düzenler. Nötrofiller için kemotaksisi artırarak, enfeksiyon alanına göçlerini sağlar.

HA tarafından indüklenen kemokinleri baskılayan sitokinlerden en önemlisi anti-inflamatuar özellikteki IL-10' dur. Bu sayede inflamatuvar cevapların sınırlanmasında ve sonlandırılmasında önemli rol oynamaktadır(73). Makrofajların aktivasyonunu durdurarak, inflamasyon sonrası görülen TNF- α gibi sitokinlerinin inhibisyonuna neden olmaktadır(75).

Farklı moleküler ağırlıktaki HA' ların immünojenik etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Maharjan ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada yüksek moleküler ağırlıklı (yaklaşık 2×10^6 Da) ve düşük moleküler ağırlıklı (yaklaşık olarak 0,8 ile 8×10^5 Da) HA' ların doku hasarı sonrasında makrofajlar üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada, yüksek moleküler ağırlıklı HA' nın insan monositlerini fibrositlere dönüştürebildiğini ancak düşük moleküler ağırlıklı olan HA' nın ise fibrosit farklılaşmasını engelleyebileceği durumu gözlenmiştir(71).

Lyle ve arkadaşları (2010) tarafından yapılmış olan çalışmada, makrofajlar tarafından sitotoksik bir metabolit olarak kullanılan nitrik oksit (NO) üretiminin, düşük moleküler ağırlıklı HA tarafından nasıl etkilendiğine bakılmıştır. Bu amaçla sıçan hücre hattı olan RAW 264.7 kullanılmıştır. Bu tür hücre tiplerinde NO, makrofaj aracılı inflamatuvar reaksiyonların belirteci olarak değerlendirilmektedir. Çalışmada düşük moleküler ağırlıktaki HA' nın NO uyarımına neden olmadığı, NO uyarımındaki temel belirtecin endotoksin düzeyi olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın sonucunda düşük moleküler

ağırlıklı HA' nın makrofaj aracılı inflamatuvar reaksiyonlarını direkt olarak tetikleyemeyeceği ihtimalinin olduğu gösterilmiştir. Bu durum, ortamda endotoksin konsantrasyonunun oldukça düşük düzeyde olabildiği koşul için gösterilmiştir. Ancak çalışmada da belirtildiği gibi sıçan hücrelerinin *in vitro* sonuçları, deney koşullarının yetersiz olmasından dolayı sınırlı kalmıştır(76).

Baeva ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışma ile elde ettikleri sonuçlar 2010 yılında yaptıkları çalışmanın devamı olarak, bu sonuçları destekleyecek niteliktedir. Yeni yapılan çalışmalarında farklı moleküler ağırlıktaki HA' lar ile insan makrofaj hücreleri üzerinde interlökin 1 β (IL-1 β) üretimine bakmışlardır. Burada elde edilen sonuçlar ile daha önceki çalışmalarda olduğu gibi yüksek moleküler ağırlıklı HA' nın çoğunlukla anti-inflamatuar olabileceği ve düşük moleküler ağırlıklı HA' nın ise immün sistemi uyarıcı nitelikte inflamatuvar olarak rol oynayabileceği kanısına varılmıştır. Bu çalışmada HA moleküler boyutları 400 Da ile $1,7 \times 10^6$ Da aralıklarında ve düşük endotoksin konsantrasyonları düzeylerinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuca bakıldığında, yüksek inflamatuvar durumu gözlemlendiğinde IL-1 β üretimi yüksek moleküler ağırlıklı HA ile baskılanabilmektedir. Buna ek olarak mililitrede miligram seviyelerinde düşük moleküler ağırlıklı HA kullanıldığı zaman da IL-1 β üretiminin baskılanabileceği gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, yapılan bir önceki çalışma ile benzer veriler elde edilerek, endotoksin düzeylerinin oldukça az tutulduğu düzeylerde, düşük moleküler ağırlıklı HA' nın direkt olarak makrofaj aracılı inflamatuvar reaksiyonunu arttırmadığı hipotezi desteklenmiştir(77).

Ke ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada ise farklı boyutlardaki düşük moleküler ağırlıklı HA (LMWHA)' lar denenerek, bunların immüno stimulator ve anti-anjiyojenik aktivitelerine bakılmıştır. Çalışmada $1,45 \times 10^5$ Da boyutunda LMWHA-1, $4,52 \times 10^4$ Da boyutunda LMWHA-2 ve $1,05 \times 10^6$ Da boyutunda HA kullanılmıştır. İmmüno stimulator aktiviteleri *in vitro* hücre ve *in vivo* hayvan modelleri ile denenerek değerlendirilmiştir. Anjiyojenezis etkilerine ise *in vivo* olarak chick embriyo koryo allantoik membran modeli (CAM) kullanılarak bakılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında LMWHA-1 ve LMWHA-2' nin, kullanılan HA' ya göre daha güçlü immüno stimulator etkide bulunabileceği durumu gözlenmiştir. CAM modelinde elde edilen sonuca göre her bir HA' nın anjiyojenezisi baskıladığı ancak LMWHA-1' in diğerlerine göre daha yüksek anti-anjiyojenik aktivite gösterebildiği

gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde LMWHA' nın potansiyel doğal bir immünomodulator ve CAM sonuçlarına göre de antianjiyojenik bir etkiye sahip molekül olabileceği sonucuna varılmıştır(78).

3. AMAÇ VE GEREKÇE

Biyoyumlu, non-immünojenik, biyoparçalanabilir ve viskoelastik gibi özellikleri nedeniyle, günümüzde biyoteknoloji, kozmetik, ortopedik tedavi, oftalmoloji, farmakoloji gibi medikal alanlarda HA oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Sülfatlanmamış bir GAG olan ve tekrarlayan disakkarit birimlerinden (β -1,4-D-glukuronik asit ve β -1,3-N-asetil-D-glukozamin) oluşan HA bu yapısı sayesinde birçok biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır. Genel olarak HA, vücutta yüksek moleküler ağırlıklı olarak yaklaşık 10^5 - 10^7 Da aralığında üretilmektedir(79), bunun yanı sıra farklı işlevlerine göre orta ve düşük moleküler ağırlıklı olarak da bulunabilmektedirler. Farklı boyutlarda bulunması ona vücutta farklı işlevlerde rol oynamasına izin vermektedir.

HA' nın şu anda dünyadaki pazar payının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir(34). Özellikle kozmetik ve estetik cerrahiye bakıldığında, bu alanda kullanılan en önemli biyomateryal olan kollajenin ve diğer dolgu materyallerinin de yerini aldığı görülmektedir. Bir diğer önemli kullanım alanı olan medikal sektöründe HA kilogram başına 40,000- 60,000 dolar değerinde satılmaktadır(34). Günümüzde yaklaşık olarak 100 farklı dolgu materyali olup, bunların yarısı HA bazlıdır.

HA üretiminin ülkemizdeki durumuna bakıldığında HA polimerinin ihtiyacını karşılamada büyük ölçüde dışa bağımlı olarak hareket edildiği görülmektedir. Gün geçtikçe de gerek osteoartritli hasta sayısındaki artış gerek kozmetik sektöründe ve diğer uygulama alanlarındaki artan ihtiyaç sonucunda HA' ya olan talep daha da fazla artmaktadır. Bu nedenle ülkemizde HA polimerinin üretimine yönelik ciddi çalışmaların yapılması gerekmektedir, bu sayede dışa bağımlı hareket edilmesine gerek kalmadan çok daha ucuza alım gerçekleştirilerek, ülke ekonomisine de katkıda bulunulacaktır.

Buna bağlı olarak tez kapsamında *S.equi* ile mikrobiyal HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle farklı sıcaklık, pH, karıştırıcı hızı, glukoz ve inokulum miktarları çalışılarak, optimum koşullar belirlenmiştir. Ardından üretilen HA' nın kültür ortamından etanol çöktürmesi ile ekstraksiyonu gerçekleştirilerek, belli saflıkta elde edilmesi için farklı boyutlarda diyaliz membranları kullanılmıştır. Diyaliz membranlarının kullanılması ile saflaştırma işleminde maliyet düşürülmeye çalışılmıştır. Elde edilen HA' ların miktar tayinleri için en çok kullanılan yöntem olan karbazol yöntemi kullanılmıştır. Son olarak

elde edilen HA' nın ve farklı moleküler boyutlardaki ticari HA' ların immünolojik yanıtları değerlendirilmiştir. Bunun için THP-1 insan monosit hücre dizisi kullanılarak, üretilen HA hücre kültürü ortamına uygulanmıştır ve TNF- α , IL-8 ve IL-10 sitokin sekresyon düzeyleri ölçülmüştür. Aynı zamanda HA' nın fibroblast hücre dizisi L929 proliferasyonuna etkisi *in vitro* MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen immünolojik yanıt ve *in vitro* denemelerle biyouyumluluğu belirlenerek, üretilen HA' nın ülkemizin dışa bağımlılığını azaltacak yönde gerek medikal gerek kozmetik sektöründe olası kullanımını belirlemek amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. *S.equi* Aşı Kültürünün Hazırlanması ve Stoklanması

HA üreticisi olarak kullanılmış olan *S.equi* (9682) suşu, Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu' ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Deneyler esnasında kullanılacak olan aşı kültürü için triptik soy broth besiyeri (Çizelge 4.1) hazırlanmıştır. *S.equi*' nin, stok bakteri kültürlerinin muhafaza edildiği kanlı agar besi ortamından aseptik koşullarda steril öze ile 100 ml' lik erlenlerde bulunan triptik soy broth besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan erlenler 37 °C' de 150 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra hazırlanan aşı kültürleri üretim ortamı için inokulum olarak kullanılmıştır. İnokulum olarak ekimi yapılan bakterinin miktarı OD olarak belirlenmiştir(80).

Çizelge 4.1. Aşı kültürü hazırlanması

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
Triptik soy broth	30 g/l
H ₂ O	

4.2. *S.equi* Üretim Ortamının Hazırlanması

HA üretimi için kültür ortamı belirtilen miktarlarda hazırlanıp (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3), besiyeri olarak kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri ortamının pH' sı 7,2' ye ayarlanmıştır. Daha sonra besiyeri ortamına aşı kültüründen 1 ml ekim yapılarak, 24 saat 37 °C' de 150 rpm' de inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 4.2. *S.equi* HA üretim ortamı

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
Sukroz	70,0 g/l
Maya özütü	25,0 g/l
K ₂ SO ₄	1,3 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	6,2 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 g/l
İz element çözeltisi	2,5 ml
H ₂ O	

Çizelge 4.3. İz element çözeltisi

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
CaCl ₂	2,0 g/l
ZnCl ₂	0,046 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,019 g/l
H ₂ O	

4.3. Hyaluronik Asit Üretimi için Kültür Ortamının Optimum Koşullarının Belirlenmesi

S.equi ile HA üretimi için yapılan kültür ortamı optimizasyon çalışmalarında amaç yüksek miktarda HA üretimini gerçekleştirebilecek ortamı sağlayabilmektir. Bu nedenle en uygun HA üretim koşullarını belirleyebilmek için farklı sukroz miktarı, üretim ortamı pH değeri, inkübasyon çalkalama hızı, inkübasyon sıcaklığı, inokulum miktarı parametreleri çalışılmıştır(81). Her bir parametre n=3 tekrarlı olacak şekilde denenmiştir.

4.3.1. Sukroz Miktarının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

HA üretimi için kültür ortamının optimum sukroz miktarının saptanabilmesi amacıyla kullanılan farklı sukroz konsantrasyonları 50, 70 ve 100 g/l (n=3) şeklinde belirlenmiştir. Sukroz dışındaki diğer HA üretim ortamı bileşenleri Çizelge 4.2' de belirtildiği şekilde hazırlanarak, farklı sukroz konsantrasyonları çalışılmıştır. Hazırlanan üretim ortamlarının pH değeri 7,2' ye ayarlanarak, 37 °C' de 150 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.2. pH Değerinin Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

HA üretimi için kültür ortamının optimum pH değerinin belirlenebilmesi amacıyla pH 5, 7 ve 9 değerleri (n=3) denenmiştir. Bir önceki optimizasyon çalışmasında belirlenen sukroz konsantrasyonu kullanılarak, diğer üretim ortam bileşenlerinin miktarları Çizelge 4.2' de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan üretim ortamlarının pH değerleri 5, 7 ve 9' a ayarlanarak, 37 °C' de 150 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.3. İnkübatör Çalkalama Hızının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

HA üretimi için kültür ortamının optimum çalkalama hızının belirlenebilmesi amacıyla statik, 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızı değerleri (n=3) kullanılmıştır. Besiyeri hazırlanmasında sukroz konsantrasyonu için optimizasyon çalışmasında belirlenen konsantrasyon değeri kullanılarak, diğer üretim ortamı bileşenlerinin miktarları Çizelge 4.2' de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır ve üretim ortamının pH değeri optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen pH değerine ayarlanarak, 37 °C' de 150 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.4. İnkübasyon Sıcaklığının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

HA üretimi için kültür ortamının optimum sıcaklık değerinin belirlenebilmesi amacıyla 20, 25, 30 ve 37 °C değerleri (n=3) kullanılmıştır. Besiyeri hazırlanmasında sukroz konsantrasyonu için optimizasyon çalışmasında belirlenen konsantrasyon değeri kullanılarak, diğer üretim ortamı bileşenlerinin miktarları Çizelge 4.2' de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır ve üretim ortamının pH değeri optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen pH değerine ayarlanarak, 37 °C' de 200 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4.3.5. İnokulum Yoğunluğunun Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

HA üretimi için kültür ortamında optimum inokulum yoğunluğunun belirlenebilmesi amacıyla %1, 2, 5 ve 10 konsantrasyon değerleri (n=3) kullanılmıştır. Besiyeri hazırlanmasında sukroz konsantrasyonu için optimizasyon çalışmasında belirlenen konsantrasyon değeri kullanılarak, diğer üretim ortamı bileşenlerinin miktarları Çizelge 4.2' de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır ve üretim ortamının pH değeri optimizasyon

çalışması sonucunda belirlenen pH değerine ayarlanarak, 37 °C’ de 200 rpm’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4.4. Kültür Sıvısından Hyaluronik Asit Ekstraksiyon Yöntemi

Kültür sıvısında gerçekleştirilen HA üretimi sonucunda, buradan ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültür sıvılarının üzerlerine eşit hacimde %0,1’ lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenerek, bu şekilde 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kültür sıvısındaki bakteri hücrelerinin parçalanması gerçekleştirilen örnekler 10 dakikanın sonunda 5000 g’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantların üzerlerine 3 kat hacim olacak şekilde etil alkol eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından örnekler tekrar 5000 g’ de 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonunda süpernatantlar dökülerek, pelletler fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) çözdürülmüştür.

Çizelge 4.4. Kültür sıvısı ekstraksiyon çözeltisi

Malzeme	Konsantrasyon
SDS	1 g
H ₂ O	1000 ml

Çizelge 4.5. PBS çözeltisi

Malzeme	Konsantrasyon
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l
H ₂ O	

4.5. Hyaluronik Asitin Diyaliz ile Saflaştırılması

Üretimi gerçekleştirilen HA’ nın saflaştırma işlemi için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bunun için farklı boyutlardaki (3000, 10000 ve 20000 MWCO) diyaliz kasetleri kullanılmıştır. Üretilen HA’ dan 9 ml alınıp, farklı boyutlardaki diyaliz kasetlerine yerleştirilerek PBS’ ye karşı gece boyu +4 °C’ de diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.6. Hyaluronik Asit Miktar Tayin Yöntemi

HA miktarının belirlenmesi amacı ile Bitter ve Muir' in modifiye karbazol yöntemi kullanılmıştır(62,63). Hyaluronik asit miktar tayin yöntemi hem ekstraksiyon sonrası hem de diyaliz işlemi sonrasında gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonu yapılan örneklerden 50 µl alınarak, üzerlerine 200 µl 25 mM sodyumtetraborat çözeltisinden eklenerek vortekslenmiştir. Ardından 10 dakika boyunca 100 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Isıtma işleminden sonra, örnekler 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek, soğutulmuştur. Soğuyan örneklerin üzerlerine, %0,125' lik karbazol çözeltisinden 50 µl eklenerek, tekrar 10 dakika boyunca 100 °C' de inkübe edilmiştir. Isıtılan örnekler oda sıcaklığında 15 dakika soğutulduktan sonra, 550 nm' de UV-spektrofotometre aracılığıyla absorbans ölçümü yapılmıştır. Aynı şekilde hazırlanan standartlar ile oluşturulan eğriye dayanarak, HA miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Sodyum tetraborat çözeltisi

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
Sodyumtetraborat	0,9525 g
Derişik sülfürik asit	100 ml

Çizelge 4.7. Karbazol çözeltisi

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
Karbazol	0,125 g
Etil alkol	100 ml

4.7. Hücre Proliferasyonunun ve Toksisitenin Değerlendirilmesi

Tez kapsamında elde edilen HA örneklerinin ve ticari olarak satın alınmış olan farklı moleküler büyüklükteki HA' ların (1,2 kDa, 8-15 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa, 50-70 kDa ve 70-120 kDa) fibroblast hücre proliferasyonuna etkisi ve olası toksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla tetrazolyum tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi kullanılmıştır. Zamana ve doza bağlı olarak çeşitli etken maddeler ile inkübasyona bırakılmış hücreler MTT ile muamele edilerek formazan kristalleri oluşturması sağlanmış ve oluşan bu kristaller çözöldükten sonra spektrofotometrede değerlendirilmiştir. Bu yöntemle bir hücre

topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, çöken reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Zamana ve doza bağlı olarak deney protokülüne göre çeşitli etken maddeler ile inkübasyona bırakılmış hücreler MTT ile muamele edilerek formazan kristalleri oluşturması sağlanmış ve oluşan bu kristalleri çözünür duruma getirmek için önceden hazırlanmış çözelti solüsyonu 10 µl/kuyucuk şeklinde eklenmektedir. Bu solüsyon izopropanol içinde hazırlanmış 0.1 N HCL ve % 0.5 Triton X-100' den oluşmaktadır. Kristaller çözücü ile çözüldükten sonra spektrofotometrede 550 nm' de değerlendirilmiştir.

Elde edilen HA örnekleri ve farklı moleküler boyutlardaki ticari HA formlarının hücre proliferasyonundaki etkisinin değerlendirilmesi, L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC) ile yapılmıştır. Hücreler, 2 mM L-glutamin, %10 fetal bovine serum, 100 ünite/ml penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's ortamı (DMEM) içerisinde 37 °C de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. 75 cm²' lik flasklarda inkübe edilen hücrelerden, hücre proliferasyonunun yapılması için 96' lık hücre kültürü plaklarına 100.000 hücre/ml konsantrasyonunda olmak üzere her kuyucuğa 100 µl' lik ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan 4 saat sonra plağa yapışmış olan hücrelerin üzerine 50 µl taze DMEM besiyeri içinde Çizelge 4.11' de konsantrasyonlarının belirtildiği gibi olacak şekilde PBS içerisinde çözülmüş ve 0,2 µm boyutlarındaki filtreden geçirilerek sterilize edilmiş olan örnekler eklenmiştir (n=8). Örneklerin fibroblast hücrelerindeki proliferasyona etkileri 24. ve 48. saatlerde MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Hücre kültürü besiyeri(hazırlandıktan sonra +4 °C’ de saklanmıştır)

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
Fetal Bovine Serum	50 ml
Penisilin-Streptomisin (100 µl/ml)	0,5 ml
L-Glutamin (2 mM)	5 ml
DMEM besiyeri	500 ml

Çizelge 4.9. MTT boyası (5 mg/ml)

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
MTT	250 mg
PBS tamponu	50 ml

Çizelge 4.10. Lizis çözeltisi

Malzeme	Çalışılan Konsantrasyon
HCl (1N)	10 ml
Triton X-100 (1,65 M)	1,21 ml
İzopropanol	100 ml

Çizelge 4.11. MTT ve biyoyumluluk denemelerinde kullanılan HA konsantrasyonları

HA deney grupları	Örnek miktarı	Son konsantrasyon
MWCO 3500	42,078 mg/ml	1 mg/ml
MWCO 10000	39,763 mg/ml	1 mg/ml
MWCO 20000	39,115 mg/ml	1 mg/ml
1,2 kDa	2,5 mg/ml	1 mg/ml
8-15 kDa	25 mg/ml	1 mg/ml
10-30 kDa	25 mg/ml	1 mg/ml
30-50 kDa	25 mg/ml	1 mg/ml
50-70 kDa	25 mg/ml	1 mg/ml
70-120 kDa	25 mg/ml	1 mg/ml

4.8. Hyaluronik Asit Biyoyumluluk Testleri

Tez kapsamında üretimi gerçekleştirilen ve ticari olarak satın alınan farklı moleküler büyüklükteki HA'ların (1,2 kDa, 8-15 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa, 50-70 kDa ve 70-120 kDa) immünolojik yanıtları TNF- α , IL-8 ve IL-10 düzeylerine bakılarak

değerlendirilmiştir. Bu denemeler için insan monositik hücresi olan THP-1 hücre hattı (ATCC) kullanılmıştır. Elde edilen HA örneklerinin sitokin sekresyon düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak elde edilmiştir(82).

Denemede kullanılacak THP-1 hücreleri Çizelge 4.8' de belirtilen besiyerinde 37 °C ve %5 CO₂ ihtiva eden etüvde çoğaltılmıştır. Çoğalan THP-1 monosit hücreleri 10 ng/ml phorbol-12-miristat-13-asetat (PMA) içeren besiyerinde 2 gün inkübe edilerek, makrofaj formuna dönüştürülmüşlerdir. Örneklerle deneme işlemine başlamadan bir gün önce PMA içeren besiyeri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Ardından hücreler %0,25 Tripsin-EDTA ile kaldırılarak, 24 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 3x10⁵ hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Son olarak ekim yapılan kuyucuklara farklı moleküler ağırlıklara sahip HA gruplarından Çizelge 4.11' de belirtilen örnek konsantrasyonları eklenmiştir ve PMA ile makrofaja dönüştürülen hücrelerin sitokin sekresyon cevap varlığı HA gruplarına ek olarak 1 µg/ml lipopolisakkarit (LPS) uyarımı yapılan deney grubu eklenerek test edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardaki hücre süpernatantları ELISA yöntemiyle sitokin sekresyon düzeylerine bakılması amacıyla toplanmıştır ve sitokin ölçümleri ticari olarak temin edilen ELISA development kitleri kullanılarak kit prosedürüne uygun bir şekilde ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

TNF- α , IL-8 ve IL-10 sekresyon düzeylerine bakmak amacıyla kullanılan ELISA prosedürü aşağıda belirtildiği şekildedir:

- 1) 96 kuyucuklu ELISA plakları, 1X kaplama tamponu içerisinde dilue edilen primer antikor çözeltisinden her bir kuyuya 100 µl olacak şekilde koyularak kaplanır. Filmle kapatılan plaklar gece boyunca +4 °C' de inkübe edilir.
- 2) Gece boyu inkübe edilen plaklar 3 kez yıkama tamponu kullanılarak ELISA yıkayıcısında yıkama işlemi yapılır.
- 3) Yıkama işlemi yapılan plaklardaki her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 1X ELISA/ELISPOT çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilir ve bloklama yapılır.
- 4) Bloklama işleminden sonra plaklardaki kuyucuklara koyulacak olan TNF- α , IL-8 ve IL-10 standartları 1X ELISA/ELISPOT dilusyonu ile en yüksek konsantrasyon 2 ng/ml olacak şekilde ½ dilüsyonla 7 farklı konsantrasyonda hazırlanır.

- 5) 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklamaya bırakılan plaklar 1 kez yıkama tamponu kullanılarak ELISA yıkayıcısı ile yıkanır.
- 6) Yıkama işleminden sonra HA uygulaması sonrası elde edilen süpernatant örnekleri ve hazırlanan standartlardan her bir kuyucuğa 100 µl konularak, 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 7) İnkübasyon işleminden sonra plakalar tekrar yıkama tamponunda ELISA yıkayıcısı ile yıkanır.
- 8) Kuyucuklar biyotin işaretli TNF- α , IL-8 ve IL-10 antikorları ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
- 9) İnkübasyon işleminden sonra plakalar tekrar yıkama tamponunda ELISA yıkayıcısı ile yıkanır.
- 10) Yıkama işlemi uygulanan plakalardaki kuyucukların her birine 1/5000 dilue edilmiş 100 µl avidin-HRP (horse radish peroksidaz) çözeltisi eklenir ve plakalar filmle kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılır.
- 11) İnkübasyon işleminden sonra 3 kez yıkama tamponu ile ELISA yıkayıcısında yıkanan plakalardaki her bir kuyucuğa 1X TMB (3-3'-5-5'-tetrametilbenzidin) çözeltisinden 100 µl eklenir ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak renklenme gözlenir.
- 12) İnkübasyon işlemi sonucunda mavi renge dönüşen her bir örnek kuyucuktaki renk reaksiyonu 1M H₂SO₄ stop solüsyonu durdurulur.
- 13) Renk reaksiyonu durdurma işleminden sonra plakalar 450 nm' de okunarak absorbanslar kaydedilir.

Çizelge 4.12. ELISA yıkama tamponu

Malzeme	Çalışılan konsantrasyon
PBS (1X)	1000 ml
Tween 20	1 ml

4.9.Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

Elde edilen sonuçların normalite testleri yapıldıktan sonra gruplar arası fark SPSS 16.0 kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Grup ortalamaları farklı bulunan sonuçlara Tukey testi uygulanmıştır. Sitokin sekresyon düzeyleri arasındaki

korelasyon analizi Pearson's testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Hyaluronik Asit Üretimi İçin Kültür Ortamının Optimum Koşullarının Belirlenmesi

5.1.1. Sukroz Miktarının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çizelge 5.1. Sukroz konsantrasyonu optimizasyon sonuçları

Çalışılan sukroz konsantrasyonu (g/l)	Elde Edilen HA miktarı (g/l)
50	0,51436
70	0,663867
100	0,80852

HA üretim ortamının optimizasyonu için çalışılan farklı sukroz konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, en iyi HA üretiminin 100 g/l sukroz konsantrasyonu ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Burada ekimi yapılan bakterinin OD(600)' si 1,90' dır.

5.1.2. pH Değerinin Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çizelge 5.2. pH değerleri optimizasyon sonuçları

Çalışılan pH değerleri	Elde Edilen HA miktarı (g/l)
5	0,6526
7	0,8067
9	0,7826

HA üretim ortamının optimizasyonu için çalışılan farklı pH değerleri ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, en iyi HA üretiminin pH 7 değeri ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Burada ekimi yapılan bakterinin OD(600)' si 1,91' dir.

5.1.3. İnkübasyon Çalkalama Hızının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çizelge 5.3. Çalkalama hızı optimizasyon sonuçları

Çalışılan çalkalama hızı değerleri (rpm)	Elde Edilen HA miktarı (g/l)
Statik	0,1648
100	0,7036
150	0,8095
200	0,9026

HA üretim ortamının optimizasyonu için çalışılan farklı çalkalama hızı değerleri ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, en iyi HA üretiminin 200 rpm ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Burada ekimi yapılan bakterinin OD(600)' si 1,87' dir.

5.1.4. İnkübasyon Sıcaklığının Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çizelge 5.4. Sıcaklık değerlerinin optimizasyon sonuçları

Çalışılan sıcaklık değerleri (°C)	Elde Edilen HA miktarı (g/l)
20	0,68308
25	0,7256
30	0,88812
37	0,9026

HA üretim ortamının optimizasyonu için çalışılan farklı sıcaklık değerleri ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, en iyi HA üretiminin 37 °C ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Burada ekimi yapılan bakterinin OD(600)' si 1,87' dir.

5.1.5. İnokulum Yoğunluğunun Hyaluronik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

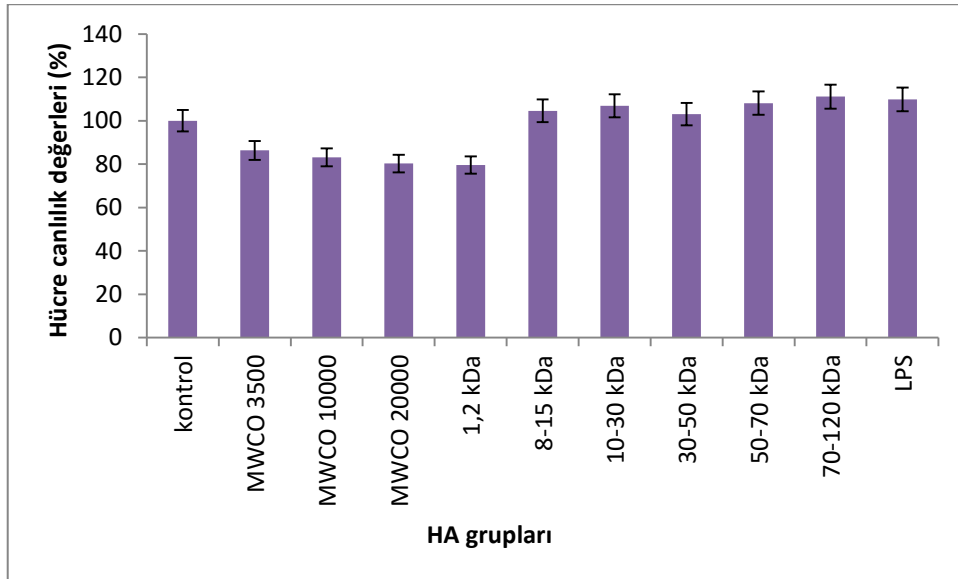
Çizelge 5.5. İnokulum yoğunluğunun optimizasyon sonuçları

Çalışılan inokulum yoğunluğu değerleri (%)	Elde Edilen HA miktarı (g/l)
1	0,9026
2	0,9515
5	1,0526
10	1,0736

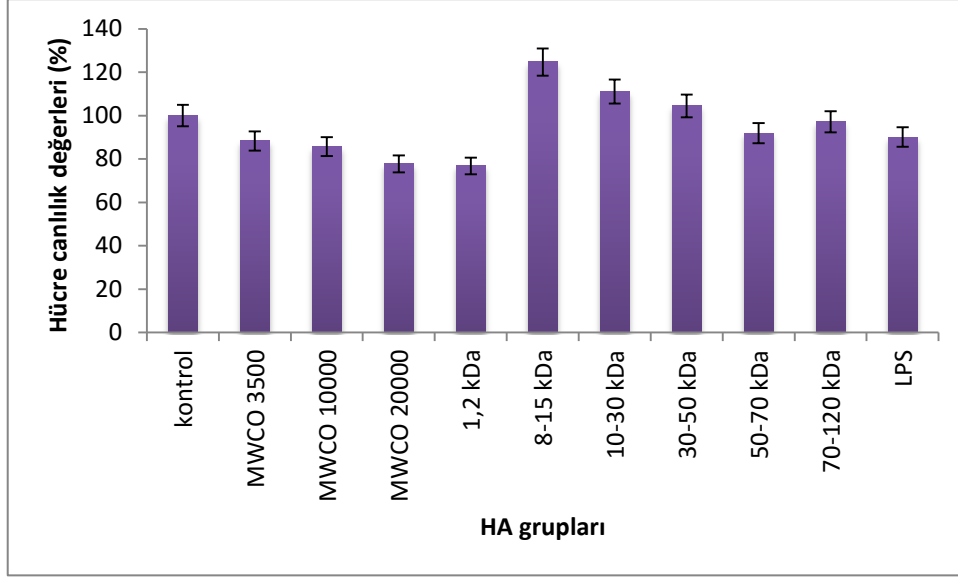
HA üretim ortamının optimizasyonu için çalışılan farklı inokulum yoğunluğu değerleri ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, en iyi HA üretiminin %5 ve %10 inokulum yoğunluğu ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Burada ekimi yapılan bakterinin OD(600)' si 1,87' dir.

5.1.6. Hücre Proliferasyonunun ve Toksisitenin Değerlendirilmesi

HA üretim ortamı optimizasyon çalışmalarından sonra optimum koşullarda üretilen HA' lara farklı moleküler boyutlarda (3500, 10000 ve 20000 MWCO) membranlarla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz membranları ile yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra üretimi gerçekleştirilen ve ticari olarak alınan farklı boyutlardaki HA' ların toksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla, 24. ve 48. saatlerde MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen hücre canlılık düzeylerinin sonuçları kontrole oranlanarak yüzde değişim olarak aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

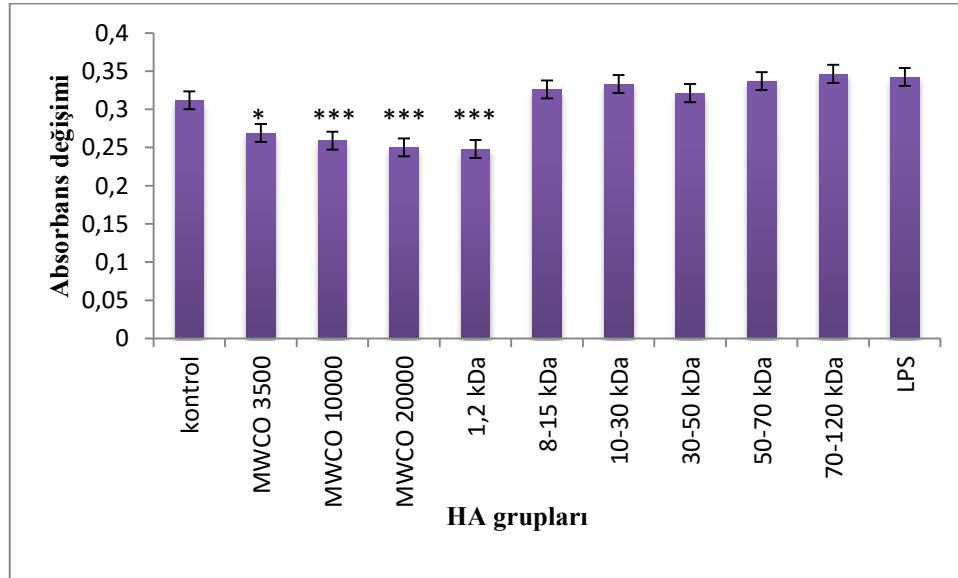


Şekil 5.1. Farklı HA gruplarının fare fibroblast hücre dizisinin (L929, ATCC) proliferasyonuna etkisi. Sonuçlar kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir (24 saat). $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.



Şekil 5.2. Farklı HA gruplarının fare fibroblast hücre dizisinin (L929, ATCC) proliferasyonuna etkisi. Sonuçlar kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir (48 saat). $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

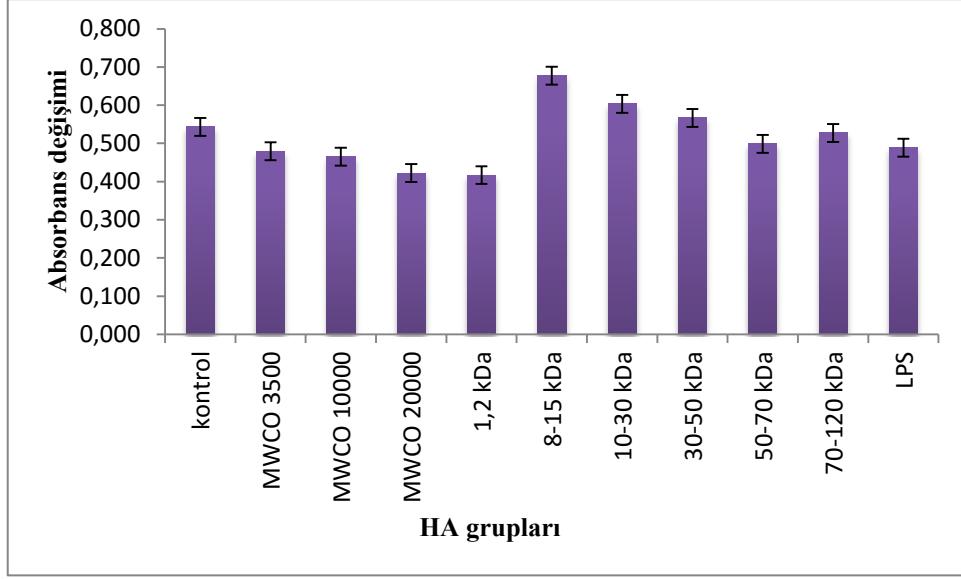
Farklı HA grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık grupların kontrolle ve kendi içinde karşılaştırılması şeklinde değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 5.3. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin fare fibroblast hücre dizisinin (L929, ATCC) proliferasyonuna etkisi (24. saat). Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ Farklı HA gruplarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılıkları göstermektedir.

24. saat MTT testinde grupların istatistiksel olarak birbirlerine göre anlamlı olup olmadıkları da %95' lik güven aralığına göre değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

- Kontrol grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,028$), MWCO 10000 ($p=0,001$), MWCO 20000 ($p=0,000$), 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 3500 grubuna göre kontrol ($p=0,028$), 8-15 kDa ($p=0,09$), 10-30 kDa ($p=0,003$), 50-70 kDa ($p=0,001$), 70-120 kDa ($p=0,000$) ve LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 10000 grubuna göre kontrol ($p=0,001$), 8-15 kDa ($p=0,002$), 10-30 kDa ($p=0,000$), 30-50 kDa ($p=0,006$), 50-70 kDa ($p=0,000$), 70-120 kDa ($p=0,000$) ve LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 20000 grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 8-15 kDa ($p=0,000$), 10-30 kDa ($p=0,000$), 30-50 kDa ($p=0,001$), 50-70 kDa ($p=0,000$), 70-120 kDa ($p=0,000$) ve LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 1,2 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 8-15 kDa ($p=0,000$), 10-30 kDa ($p=0,000$), 30-50 kDa ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,000$), 70-120 kDa ($p=0,000$) ve LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 8-15 kDa grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,019$), 10000 ($p=0,002$), 20000 ($p=0,000$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 10-30 kDa grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,003$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,000$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 30-50 kDa grubuna göre MWCO 10000 ($p=0,006$), 20000 ($p=0,001$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 50-70 kDa grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,001$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,000$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 70-120 kDa grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,000$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,000$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- LPS grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,000$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,000$) ve 1,2 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.



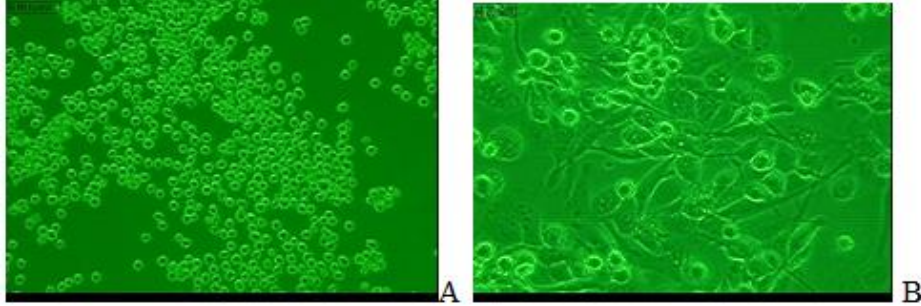
Şekil 5.4. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin fare fibroblast hücre dizisinin (L929, ATCC) proliferasyonuna etkisi (48. saat). Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir.

48. saat MTT testinde grupların istatistiksel olarak birbirlerine göre anlamlı olup olmadıkları da %95' lik güven aralığına göre değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

- MWCO 3500 grubuna göre 8-15 kDa ($p=0,042$) grubunun değışimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 10000 grubuna göre 8-15 kDa ($p=0,019$) grubunun değışimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 20000 grubuna göre 8-15 kDa ($p=0,001$) grubunun değışimleri anlamlı bulunmuştur.
- 1,2 kDa grubuna göre 8-15 kDa ($p=0,001$) grubunun değışimleri anlamlı bulunmuştur.
- 8-15 kDa grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,042$), 10000 ($p=0,019$), 20000 ($p=0,001$) ve 1,2 kDa ($p=0,001$) gruplarının değışimleri anlamlı bulunmuştur.

5.1.7. Hyaluronik Asit Biyouyumluluk Testleri

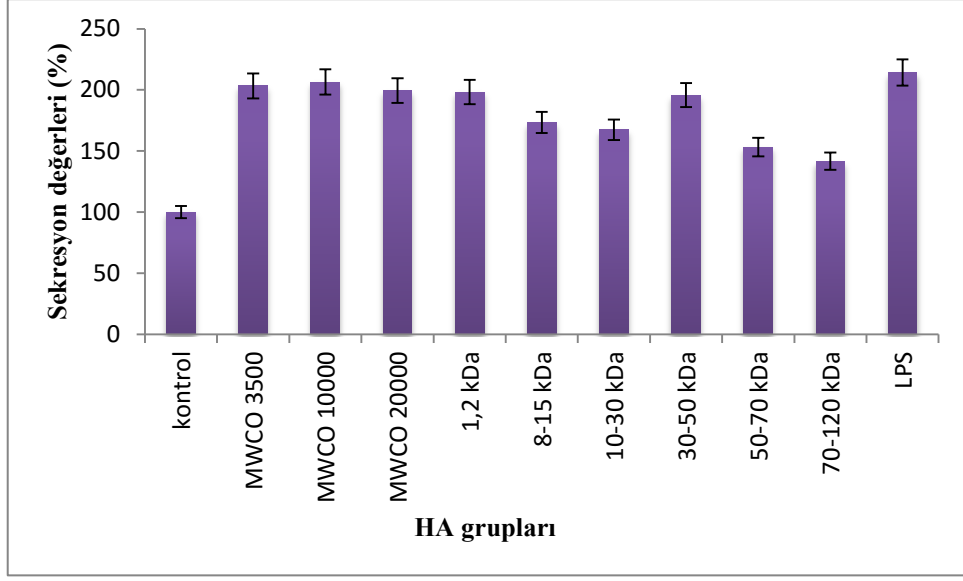
HA biyouyumluluk testleri THP-1 hücre dizisi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için insan monositik hücrelerinin (native form) ilk olarak PMA yardımıyla makrofaja farklılaşmaları gerçekleştirilmiştir.



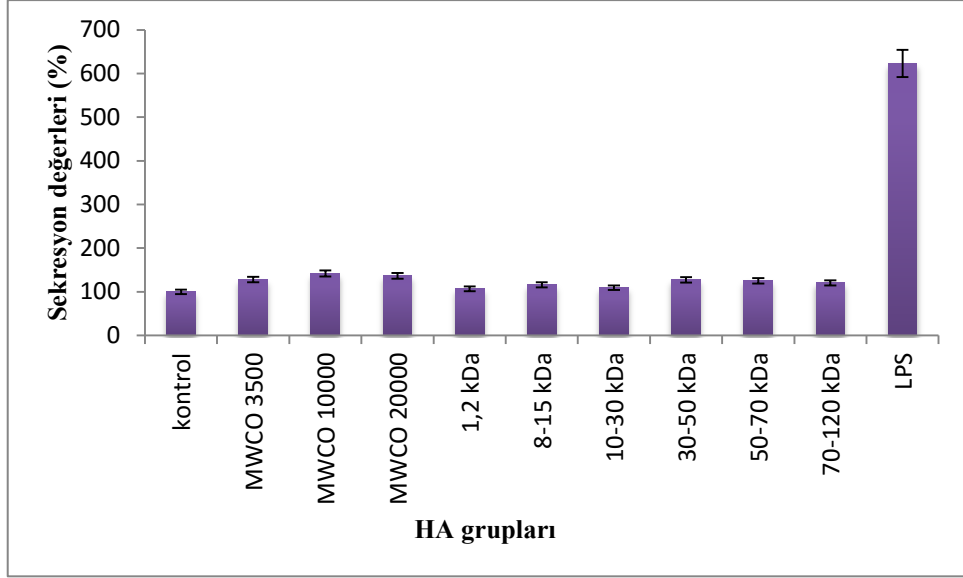
Şekil 5.5. A. İnsan monositik hücre dizisi (THP-1, ATCC) (naive form) B. PMA (10 ng/ml) ile 48 saatlik uyarım sonrası makrofaja farklılaşmış hücreler (10X, 40X)

İnsan monositik hücre dizisi THP-1 hücreleri doğal formunda yuvarlak ve yapışmayan iken, 48 saat 10 ng/ml PMA uygulaması sonrasında hücre kültürü ortamında flaska yapışmış ve tipik makrofaj görüntüsü olan hücre uzantılarını oluşturmuştur. Sitokin sekresyon cevabı deney gruplarına 1 µg/ml lipopolisakkarit (LPS) uyarımı eklenerek test edilmiştir.

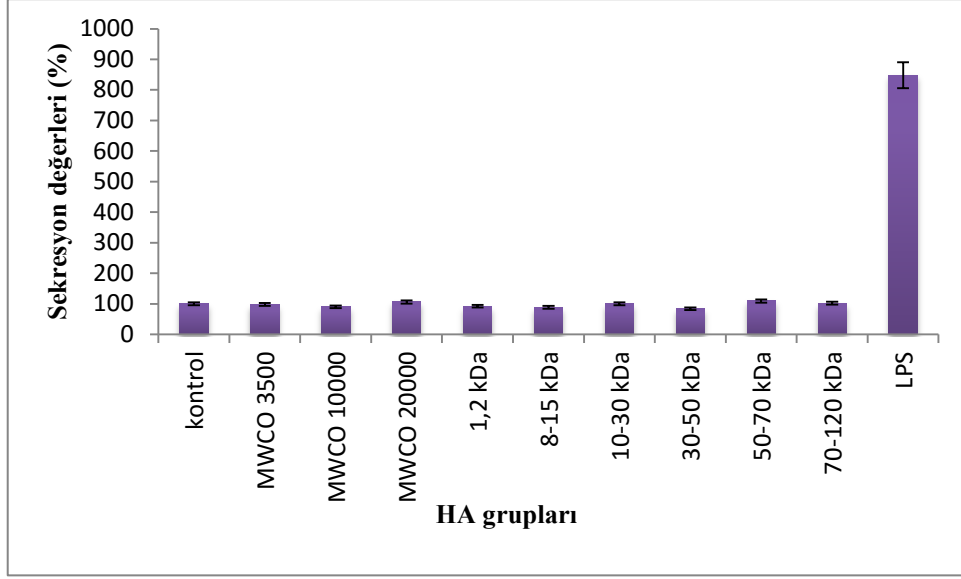
HA üretim ortamı optimizasyon çalışmalarından sonra optimum koşullarda üretilen HA' lara farklı moleküler boyutlarda (3500, 10000 ve 20000 MWCO) membranlarla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz membranları ile yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra üretimi gerçekleştirilen ve ticari olarak alınan farklı boyutlardaki HA' ların immünolojik yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla IL-8, IL-10 ve TNF-α sitokinlerinin sekresyon düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen sitokin sekresyon düzeylerinin sonuçları yüzdesel olarak aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 5.6. Farklı HA gruplarının insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) IL-8 sitokin sekresyon düzeyine etkisi. Sonuçlar kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

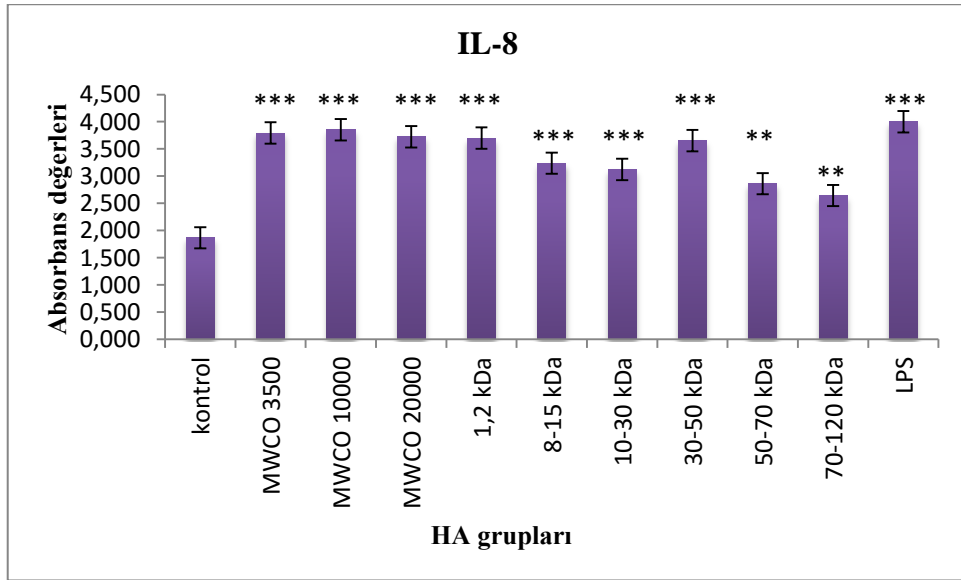


Şekil 5.7. Farklı HA gruplarının insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) IL-10 sitokin sekresyon düzeyine etkisi. Sonuçlar kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.



Şekil 5.8. Farklı HA gruplarının insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) TNF- α sitokin sekresyon düzeyine etkisi. Sonuçlar kontrol grubuna göre yüzde değişim olarak verilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

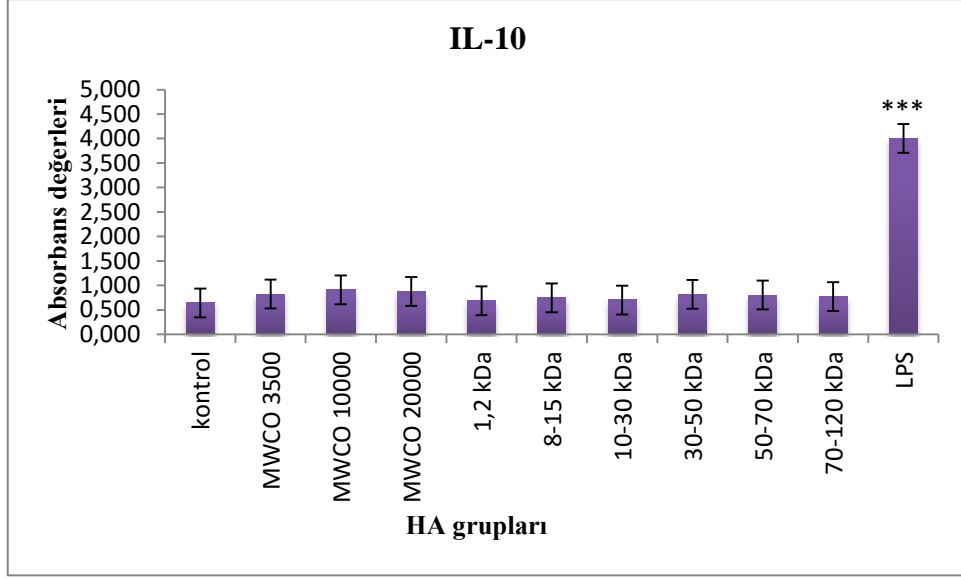
Farklı HA grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık grupların kontrolle ve kendi içinde karşılaştırılması şeklinde değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 5.9. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) IL-8 sitokin sekresyon düzeyi sonuçları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ Farklı HA gruplarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılıkları göstermektedir.

IL-8 sitokin sekresyon düzeylerinde grupların istatistiksel olarak birbirlerine göre anlamlı olup olmadıkları %95 güven aralığına göre değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

- Kontrol grubuna göre MWCO 3500 ($p=0,000$), MWCO 10000 ($p=0,000$), MWCO 20000 ($p=0,000$), 1,2 kDa ($p=0,000$), 8-15 kDa ($p=0,000$), 10-30 kDa ($p=0,000$), 30-50 kDa ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,003$), 70-120 kDa ($p=0,045$), LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 3500 grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,007$) ve 70-120 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 10000 grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,003$) ve 70-120 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 20000 grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,017$) ve 70-120 kDa ($p=0,001$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 1,2 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,022$) ve 70-120 kDa ($p=0,001$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 8-15 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 10-30 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,000$) ve LPS ($p=0,014$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 30-50 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 50-70 kDa ($p=0,038$) ve 70-120 kDa ($p=0,003$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 50-70 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,003$), MWCO 3500 ($p=0,007$), 10000 ($p=0,003$), 20000 ($p=0,017$), 1,2 kDa ($p=0,022$), 30-50 kDa ($p=0,038$) ve LPS ($p=0,001$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- 70-120 kDa grubuna göre kontrol ($p=0,045$), MWCO 3500 ($p=0,000$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,001$), 1,2 kDa ($p=0,001$), 30-50 kDa ($p=0,003$) ve LPS ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.
- LPS grubuna göre kontrol ($p=0,000$), 10-30 kDa ($p=0,014$), 50-70 kDa ($p=0,001$) ve 70-120 kDa ($p=0,000$) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.

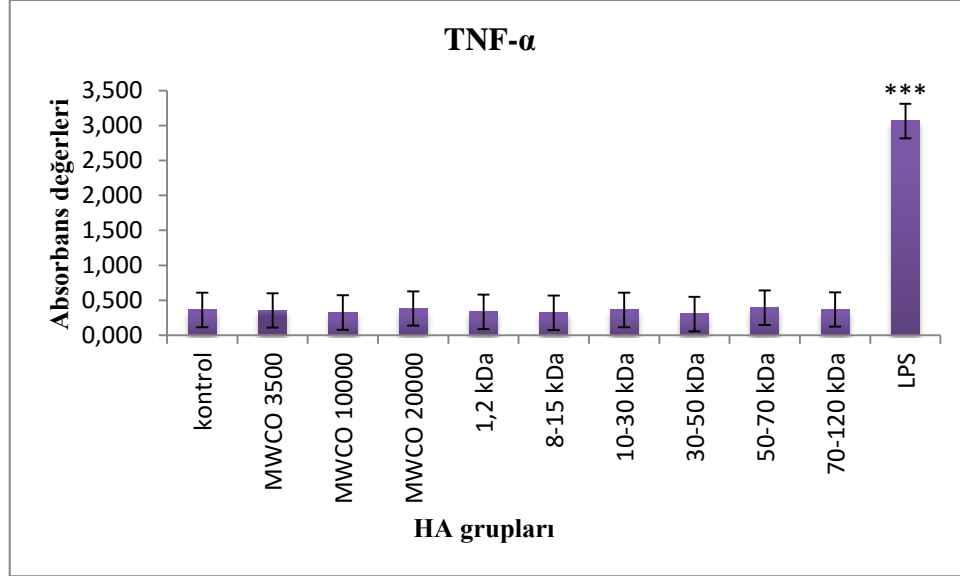


Şekil 5.10. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) IL-10 sitokin sekresyon düzeyi sonuçları. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir. *** $p < 0,001$ Farklı HA gruplarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılıkları göstermektedir.

IL-10 sitokin sekresyon düzeylerinde grupların istatistiksel olarak birbirlerine göre anlamlı olup olmadıkları %95 güven aralığına göre değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

- Kontrol grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 3500 grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 10000 grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 20000 grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 1,2 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 8-15 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 10-30 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 30-50 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 50-70 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 70-120 kDa grubuna göre LPS ($p=0,000$) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- LPS grubuna göre kontrol ($p=0,000$), MWCO 3500 ($p=0,000$), 10000 ($p=0,000$), 20000 ($p=0,000$), 1,2 kDa ($p=0,000$), 8-15 kDa ($p=0,000$), 10-30 kDa ($p=0,000$),

30-50 kDa (p=0,000), 50-70 kDa (p=0,000) ve 70-120 kDa (p=0,000) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.



Şekil 5.11. Farklı HA gruplarının ve LPS' nin insan monositik hücre dizisinde (THP-1, ATCC) TNF- α sitokin sekresyon düzeyi sonuçları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ***p<0,001 Farklı HA gruplarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılıkları göstermektedir.

TNF- α sitokin sekresyon düzeylerinde grupların istatistiksel olarak birbirlerine göre anlamlı olup olmadıkları %95 güven aralığına göre değerlendirilmiştir. p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

- Kontrol grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 3500 grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 10000 grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- MWCO 20000 grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 1,2 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 8-15 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 10-30 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 30-50 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.

- 50-70 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- 70-120 kDa grubuna göre LPS (p=0,000) grubunun değişimi anlamlı bulunmuştur.
- LPS grubuna göre kontrol (p=0,000), MWCO 3500 (p=0,000), 10000 (p=0,000), 20000 (p=0,000), 1,2 kDa (p=0,000), 8-15 kDa (p=0,000), 10-30 kDa (p=0,000), 30-50 kDa (p=0,000), 50-70 kDa (p=0,000) ve 70-120 kDa (p=0,000) gruplarının değişimleri anlamlı bulunmuştur.

Sitokin sekresyon düzeyleri arasındaki korelasyon analizi Pearson's testi ile yapılmıştır ve şu sonuçlar elde edilmiştir:

- IL-8 sekresyon düzeyi, IL-10**¹ (R=0,391, P=0,008) sekresyon düzeyi ile ilişkili ve anlamlı bulunmuştur.
- TNF- α sekresyon düzeyi, IL-10** (R=0,893, P=0,000) sekresyon düzeyi ile ilişkili ve anlamlı bulunmuştur.
- IL-10 sekresyon düzeyi, IL-8** (R=0,391, P=0,008) ve TNF- α ** (R=0,893, P=0,000) sekresyon düzeyleri ile ilişkili ve anlamlı bulunmuştur.

¹ **Korelasyon $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde başta kollajen olmak üzere birçok dolgu materyalinin yerini almaya başlayan HA, kozmetik, tıp ve biyoteknoloji alanlarında oldukça büyük bir öneme sahiptir. Sahip olmuş olduğu kimyasal yapısından dolayı vücutta birçok önemli görevi yerine getirebilmektedir. Buna bağlı olarak endüstriyel anlamda viskocerrahi, viskozite arttırıcı, viskodeslekleyici ve viskokoruyucu olarak farklı alanlarda tercih edilebilmektedir(83).

Viskoelastik, polianyonik bir yapıya sahip olması ve biyouyumluluğunun son derece yüksek olması kozmetik alanında kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Bu sayede kırışıklıklara karşı elastikiyeti arttırıcı ve aynı zamanda da cildi nemlendirici yönde kullanılabilir(84).

Tıp alanında ise yaygın olarak ortopedik cerrahide artritli hastalarda eklem içi kayganlaştırıcı sıvı olarak ve oftalmolojik cerrahi müdahalelerde ise boşlukların giderimi amacıyla kullanılmaktadır(83).

Yaygın kullanım amaçlarına bakıldığında HA üretimine dünya genelinde oldukça fazla miktarda ihtiyaç olduğu anlaşılabilmektedir. Bu nedenle 2005 yılında 1 milyon doların üzerinde olan HA' nın dünyadaki pazar payı her geçen yıl daha da artmaktadır(34). Yaygın olarak horozibiğinden saflaştırma ve bakteriyel fermantasyon yoluyla HA' nın üretimi gerçekleştirilmektedir. Ancak horozibiğinden saflaştırma işlemi hem maliyetli hem de hayvansal kaynaklardan yüksek oranda kontaminasyon riskinden dolayı, HA' nın üretiminde bakteriyel fermantasyon yoluna doğru olan eğilim artmıştır.

HA üretiminin bakteriyel fermantasyon prosesinde kullanılan kesikli, yarı kesikli ve sürekli kültür sistemlerinden yaygın olarak tercih edilen yöntem kesikli kültür sistemidir. Özellikle de HA' nın moleküler büyüklüğünün ve konsantrasyonunun arttırılması yönündeki optimizasyon çalışmaları bu kültür prosesi ile gerçekleştirilmektedir. Bir çok optimizasyon prosesinde olduğu gibi burada da kültür şartları (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, havalandırma oranı, çözünmüş oksijen, biyoreaktör tipi) ve kültür ortamının içeriği bakteriyel HA üretimini önemli ölçüde etkilemektedir(21).

Ülkemizde her geçen gün uygulama alanı oldukça genişleyen HA' nın üretimine bakıldığında, yurtdışına bağımlı olarak hareket ettiğimiz görülmektedir. Bu durum zaten maliyeti yüksek olan HA' nın, hastalarımızın kullanımına kadar gelen süreç sonunda daha da maliyetli hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle ülkemizde de HA' nın üretimine yönelik çalışmaların hızlandırılması gerekmekte olup, dışarıya olan bağımlılık azaltılmalıdır. Ayrıca üretilen HA' nın immünolojik olarak da belli biyoyumluluk testlerinden geçirilmesi ve kullanımının kabul edilebilir duruma getirilmesi gerekmektedir.

Tez kapsamına bakıldığında, yapılan çalışma ile bakteriyel kökenli insan uygulamaları için yüksek biyoyumluluğa sahip yerli HA üretimi amaçlanmıştır. Optimum koşullarda HA üretimi gerçekleştirilip, üretilen HA' nın immünolojik yanıtı değerlendirilmeye çalışılmıştır. HA' nın moleküler büyüklüklerinin sınıflandırılması konusunda net bir kanıya varılamaması durumu söz konusu olduğundan farklı moleküler boyutlarda ticari HA alımı gerçekleştirilmiş olup, bunların da immünolojik yanıtları çalışılmış ve üretilen HA' nınki ile karşılaştırılmıştır.

Kültür koşullarında yeni materyalleri üretebilme adına bakteriler tarafından kullanılan en önemli besin kaynağı karbon kaynağıdır. Çalışma kapsamında karbon kaynağı olarak sukroz kullanılmış olup 50, 70 ve 100 g/l konsantrasyonları optimizasyon için denenmiştir. Çizelge 5.1' de gösterildiği gibi en yüksek HA konsantrasyonuna 100 g/l sukroz miktarı ile ulaşılmıştır. Liu ve arkadaşları (2009) tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmada *S.zooepidemicus* (WSH-24) suşu kullanarak 70 g/l başlangıç sukroz konsantrasyonu ile yüksek konsantrasyonda HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan bakterinin miktarı OD olarak ölçülmüştür. Ancak burada karbon kaynağı optimizasyon çalışması yapılmamıştır ve 4 litre fermantasyon hacmi ile çalışılmıştır(80). Rangasway ve Jain (2008) tarafından yapılan çalışmada ise *S.equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC 39920) tarafından yüksek miktarda HA üretimi için farklı karbon kaynakları denenmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz ve laktoz denenmiş olup, en iyi sonuç sukroz ile sağlanmış ve 10 litrelik biyoreaktör içerisinde 50 g/l sukroz ve 10 g/l kazein hidrolizatı kullanılarak, 5-6 g/l aralığında HA elde edilmiştir(85).

Kültür ortamı için pH optimizasyon sonuçlarına bakıldığında Çizelge 5.2' de gösterildiği gibi üretim prosesi için optimum pH değeri 7 bulunmuştur. Elde edilen pH değeri Kim, Yoo ve arkadaşları (1996) tarafından gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında da

optimum olarak bulunmuştur(21). Ayrıca sonuç, Huang ve arkadaşları (2006) tarafından, Duan ve arkadaşları (2008) ile Liu ve arkadaşları (2008) tarafından da *S.zooepidemicus* ile gerçekleştirilmiş olan HA üretimi çalışması ile de desteklenmektedir. Bu iki çalışmada da ortam pH' sı 7' ye ayarlanmış ve bu şekilde üretim gerçekleştirilmiştir(52,86,87). Bunun yanı sıra başka bir çalışmada alkali stresin üretim ortamında oluşturulup, HA üretimi için oluşturduğu etkiye de bakılmıştır. Liu ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışma ile *S.zooepidemicus*' un (WSH-24) kesikli olarak alkali strese sokulmasının HA üretimini nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Üretim esnasında ortam ilk 6 saat pH 7' de, ardından 1 saat pH 8,5' te ve tekrar pH 7' ye getirilerek üretimin tamamlanması sağlanmıştır. Çalışmanın sonucunda kontrol üretim ortamında $5,0 \pm 0,1$ g/l HA üretimi gerçekleştirilmişken, alkali stres ile beraber gerçekleştirilen üretim sonucunda HA' nın konsantrasyonu $6,5 \pm 0,2$ g/l olarak tespit edilmiştir(88).

HA gibi polisakkaritlerin fermantasyon ortamları, Newton' un viskozite kanunlarına uymayan akışkan sistemi olan non-Newtonian özellik göstermektedir. Öte yandan HA üretim prosesinde çözülmüş oksijen konsantrasyonu ve ortamdaki diğer besiyeri bileşenlerinin de homojen bir dağılımının sağlanması bakteriyel üretim proseslerinde oldukça önemlidir(21,47,50,87). Buna bağlı olarak da üretim sırasında gerekli olan çözülmüş oksijenin konsantrasyonunun yüksek tutulması adına çalkalama hızlarında optimizasyon çalışmasına gidilmiştir ve Çizelge 5.3' te gösterildiği gibi optimum çalkalama hızının 200 rpm olduğu sonucuna varılmıştır. Yine Liu ve arkadaşları (2009) tarafından bu değer kullanılarak HA üretimi gerçekleştirilmiştir(80).

Kültür ortamının optimizasyon çalışmalarında denenmiş olan bir diğer parametre de sıcaklık olmuştur. Çizelge 5.4' te sonucun gösterildiği gibi HA üretimi için bulunan optimum sıcaklık değeri 37 °C olmuştur. Bu optimum sıcaklık değeri, Kim ve arkadaşları (1996) tarafından gerçekleştirilmiş olan optimizasyon çalışmasında da 37 °C olarak gösterilmiştir(21). Huang ve arkadaşları (2006) ve Duan ve arkadaşları (2008) tarafından da *S.zooepidemicus* ile gerçekleştirilen diğer HA üretim çalışmalarında da kültürasyon sıcaklığı 37 °C' ye ayarlanmış ve üretim gerçekleştirilmiştir(86,87).

HA üretim ortamı için yapılan inokulum yoğunluğu optimizasyon çalışmasında ise Çizelge 5.5' de belirtildiği gibi optimum konsantrasyon değeri %10 olarak bulunmuştur. Literatüre bakıldığında inokulum yoğunluk değeri ile ilgili net bir ifadeye rastlanmamaktadır. Ancak

bir Armstrong ve Johns (1997) tarafından *S.equi* subsp. *zoepidemicus* (ATCC 35246) ile gerçekleştirilen HA üretim prosesinde inokulum yoğunluk miktarı %13 olarak kullanılmış olup, az miktarlardaki inokulum yoğunluğu ile fermantasyon ürünlerinin daha az olabileceği ifade edilmiştir(89).

Tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan optimizasyon çalışmasında genel olarak HA üretimi için kullanılmakta olan(89) kesikli kültür prosesi tercih edilmiştir. Ayrıca kesikli kültür prosesi endüstriyel olarak da HA üretimi için tercih edilen yöntemdir. Sürekli kültür sistemleri ile kesikli kültür sistemleri karşılaştırıldığında, sürekli kültür sistemlerinde substrat kullanım verimliliği oldukça düşüktür ve bu durum endüstriyel olarak yöntemin az tercih edilmesinin de temel sebebidir. Bir diğer neden ise uzun süreli proseslerde HA üretiminin veriminin azalmasıdır(90).

S.equi ile gerçekleştirilen HA üretim optimizasyon çalışması ile tez kapsamında elde edilen HA' nın konsantrasyonu 1,0736 g/l olarak bulunmuştur. Literatüre bakıldığında farklı alt suşlarla daha yüksek konsantrasyonlarda HA' nın üretilebildiği gözlemlenmektedir. Kim ve arkadaşları (1996) tarafından *S.equi* (KFCC 10830) mutant suşu ile yapılan optimizasyon çalışmasında HA miktarı 6-7 g/l olarak elde edilmiştir(21). Rangaswamy ve Jain (2008) tarafından *S.equi* subsp. *zoepidemicus* (ATCC 39920) gerçekleştirilen optimum HA üretim prosesinde HA miktarı 5-6 g/l olarak elde edilmiştir(91). Im ve arkadaşları (2009) tarafından *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC 11935BP) ile gerçekleştirilen HA üretim optimizasyon çalışmasında ise elde edilen HA miktarı 6,94 g/l olarak bulunmuştur(92). Liu ve arkadaşları (2009) tarafından *S.zoepidemicus* WSH-24 suşu ile gerçekleştirilen optimum HA üretim prosesinde ise HA miktarı 6,7 g/l olarak saptanmıştır. Ekimi yapılan bakterinin miktarı OD olarak ölçülmüştür(80). Literatürle karşılaştırıldığı zaman tez kapsamında üretilen HA miktarının daha az olduğu yorumu yapılsa bile aslında tam olarak bir kıyaslama mümkün olmamaktadır. Bunun sebebinin farklı üretim koşullarının uygulanması, farklı hacimlerde farklı fermentörlerin kullanılması, üretim esnasında imkan dahilinde farklı parametrelerin de ölçülüp kullanılabilmesi gibi durumlardan kaynaklanabileceği yorumu yapılabilir.

HA üretim ortamı optimizasyon çalışmalarından sonra optimum koşullarda üretilen HA' lara farklı moleküler boyutlarda (3500, 10000 ve 20000 MWCO) membranlarla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz membranları ile yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra

üretimi gerçekleştirilen ve ticari olarak alınan farklı boyutlardaki HA' ların toksisitesi HA uygulamalarında temel hedef hücrelerden biri olan fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Farklı moleküler boyutlardaki HA gruplarının, L929 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre proliferasyonlarındaki değişimi MTT testi ile değerlendirilmiştir. HA, insan vücudunda farklı boyutlarda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra literatür incelendiğinde düşük, orta ve yüksek moleküler boyutlarda HA tanımlamalarında da çelişkiler olduğu görülmektedir. Bu nedenle ticari olarak bulunan farklı HA boyutları (1,2 kDa-120 kDa, 6 farklı boyut) temin edilerek, hücre kültürü uygulamalarında kullanılıp etkileri incelenmiştir.

Elde edilen hücre canlılık düzeylerinin sonuçları kontrol grubuna göre yüzdesel değişim olarak Şekil 5.1 ve Şekil 5.2' de gösterilmiştir. Genel olarak MTT testinin 24 ve 48 saatlik sonuçlarına bakıldığında 24. saatte, üretilen HA grupları (MWCO 3500, 10000 ve 20000) tarafından akut bir toksisitenin veya hücre proliferasyonunda azalmanın oluşturulmuş olduğu, ancak 48. saatte bu etkinin kaybolmuş olduğu gözlenmiştir. 24. saatte ortaya çıkan etki anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Aynı şekilde ticari olarak satın alınmış olan 1,2 kDa boyutundaki HA' nın da 24. saatte akut bir toksisite yaratmış olduğu, 48. saatte ise etkisinin azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu durum düşük moleküler boyutlardaki uygulamalarının erken dönemde fibroblastlarda hücre proliferasyonunda azalmaya neden olabileceğini düşündürmektedir.

HA biyouyumluluk testleri THP-1 hücre dizisinde proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin sekresyonuna etkilerinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için insan monositik hücrelerinin (naive form) ilk olarak PMA uygulaması ile makrofaja farklılaşmaları gerçekleştirilmiştir. Makrofaj hücreleri 1 $\mu\text{g/ml}$ *Klebsiella* lipopolisakariti ile uyarılarak bazal ve uyarıma cevap sitokin sekresyonunun olup olmadığı belirlenmiştir. Kullandığımız makrofaj hücrelerinde bazal TNF- α , IL-8 ve IL-10 sekresyonları bulunmakta, LPS uyarımına beklenen cevabı vermektedir. Diyaliz membranları ile yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra üretimi gerçekleştirilen ve ticari olarak temin edilen farklı moleküler boyutlardaki HA' ların immünolojik yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla TNF- α , IL-8 (proinflamatuvar) ve IL-10 (anti-inflamatuvar) sitokinlerinin sekresyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

Elde edilen IL-8 sitokin sekresyon düzeylerinin sonuçları kontrol grubuna göre yüzdesel olarak ve istatistiksel olarak sırasıyla Şekil 5.6 ve Şekil 5.9' da gösterilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında tüm gruplarda IL-8 sitokin sekresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Gruplar ayrı ayrı incelendiğinde LPS' nin diğer tüm gruplara göre daha yüksek bir uyarıma sebep olduğu gözlenmiştir. LPS uygulama sonrası IL-8 sekresyon düzeyi kontrol, 10-30 kDa, 50-70 kDa ve 70-120 kDa gruplarına göre anlamlı farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Üretimi gerçekleştirilmiş ve farklı MWCO' larda (MWCO 3500, 10000 ve 20000) diyaliz membranlarından geçirilmiş olan HA uygulaması sonrasında düşük moleküler ağırlıklı HA ile benzer bir uyarım gerçekleştirmiştir. Bu durum 50-70 kDa ve 70-120 kDa grupları ile daha büyük moleküler ağırlıklı HA arasından da gözlenmiştir ($p<0,05$).

Üretim sonucu elde edilen HA ile düşük moleküler ağırlıklı HA' nın benzer düzeyde IL-8 sekresyonuna neden olması dermal bölgede yara iyileşme sürecinin ilk 24 saatindeki inflamatuvar süreçte yer alan GAG ve hyaluronan sülfatlarla benzer bir aktiviteye sahip olduğu düşündürmektedir. Bu evrede ortamdaki büyük moleküler ağırlıklı HA' ların parçalanması ile oluşan düşük moleküler ağırlıklı HA' lar makrofajlardan IL-8 ve TNF- α salgılamasına neden olur ve ortama yara iyileşmesinde rol alan diğer hücrelerin göçünü kolaylaştırır(70–72).

Elde edilen TNF- α sitokin sekresyon düzeylerinin sonuçları kontrol grubuna göre yüzdesel olarak ve istatistiksel olarak sırasıyla Şekil 5.8 ve Şekil 5.11' de gösterilmiştir. Burada TNF- α sitokin düzeyinin kontrol grubuna göre, MWCO 20000, 10-30 kDa, 50-70 kDa, 70-120 kDa ve LPS grupları tarafından artırıldığı gözlenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda yalnızca LPS grubunun gerçekleştirmiş olduğu uyarım anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Grupların bir uyarıma neden olmaları ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, istenilen bir durumdur. Çünkü TNF- α düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman indirekt olarak inflamasyonu düzenleyerek yara iyileşmesini ve makrofajların büyüme faktörü üretimini arttıran ancak yüksek konsantrasyonlarda, yara iyileşmesinde zararlı etkilere neden olan bir sitokindir(74).

Elde edilen IL-10 sitokin sekresyon düzeylerinin sonuçları kontrol grubuna göre yüzdesel olarak ve istatistiksel olarak sırasıyla Şekil 5.7 ve Şekil 5.10' da gösterilmiştir. Bu

sonuçlara bakıldığında, kontrol grubuna göre IL-10 sitokin sekresyonunu LPS dışındaki tüm grupların az da olsa arttırdığı, LPS' nin ise yüksek bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak yapılan analiz sonucunda da bir tek LPS grubunun gerçekleştirmiş olduğu artışın anlamlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p < 0,05$). Elde edilen bu sonuçlar IL-8 ve TNF- α sonuçları ile karşılaştırıldığında beklenen bir durumdur. HA tarafından indüklenen kemokinleri baskılayan sitokinlerden en önemlisi olan anti-inflamatuar özellikteki IL-10, TNF- α ve IL-8' in aksine immün cevabın azalmasında ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır(28). Bu sayede inflamatuvar cevapların sınırlanmasında ve sonlandırılmasında görev almaktadır(73). Çalışmamızda gruplardan IL-10 salınımı TNF- α ve IL-8 salınımı ile korele bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu durum IL-10' un endojen anti-inflamatuar olarak TNF- α ' ya cevap olarak salgılanmış olabileceğini düşündürmektedir. IL-10 makrofajların aktivasyonunu durdurarak, inflamasyon sonrası görülen TNF- α gibi sitokinlerinin inhibisyonuna neden olmaktadır(75). Bu durum elde edilen sonuçlarla desteklenmiş olmaktadır.

Literatüre baktığımız zaman HA' in farklı immün hücre hatlarında etkilerinin araştırıldığını görmekteyiz. Termeer ve arkadaşları (2000) tarafından HA oligosakkaritlerinin dendritik hücreler üzerinde etkili bir aktifleyici komponent olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada farklı boyutlarda HA' lar kullanılmıştır. Küçük moleküler boyutlu olarak tetra ve heksasakkaritler, orta boyutlarda $8 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ ve büyük moleküler boyutlarda $6 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ HA kullanılmıştır. Bu HA' lardan yalnızca küçük boyutlardaki HA' ların insan monosit kökenli dendritik hücrelerde immunofenotipik olgunlaşmayı indüklediği ve IL-1 β , TNF- α ve IL-12 sitokinlerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgulara göre inflamasyon sırasında, küçük boyutlardaki HA' ların dendritik hücrelerle etkileşimi söz konusu olduğunda, bu hücrelerin etkilenip, maturasyonuna neden olabileceği yorumu yapılmıştır(93).

Haslinger ve arkadaşları (2001) insan peritoneal mezotelyal hücreleri üzerinde farklı moleküler büyüklükteki HA uygulamalarının monosit kemoatraktant protein-1 (MCP-1) ve IL-8 kemokinlerinin ekspresyonlarını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Burada $> 10^6$ Da ve $1 - 7 \times 10^5$ Da büyüklüklerinde olacak şekilde farklı HA' lar kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda $1 - 7 \times 10^5$ Da aralığındaki HA' ların MCP-1 ve IL-8 sentezini arttırdığını, çalışmalarında yapmış oldukları immunoassay denemeleriyle göstermişlerdir(94).

Sezgin ve arkadaşlarının (2005) yapmış oldukları çalışmada diz osteoartritisinde tedavi amaçlı HA kullanıldığında inflamatuvar sitokinleri etkileyip etkilemedikleri ve nasıl etkilediği anlaşılmaya çalışılmıştır. Burada 1×10^6 Da büyüklüğünde HA kullanılmış (2 ml HA-15 mg/ml) ve bir haftalık zaman aralıklarıyla 3 kez enjeksiyon yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda klinik iyileşme ile ilişkili olarak sinoviyal sıvıda interlökin 6 (IL-6) düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber IL-8 ve TNF- α düzeylerinde ise sinoviyal sıvıda herhangi bir etki gözlenemediği belirtilmiştir(95).

İnsan osteoartritisinin gelişmesinde aktiflenmiş sinovisitler önemli rol oynayabilmektedir. Yüksek moleküler boyutlardaki HA diz osteoartritisinde viskodeslekleyici olarak kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak Wang ve arkadaşları (2006) tarafından yapılmış olan çalışmada HA' nın sinovisitler üzerindeki etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. Çalışmada 600-800 kDa HMWHA uygulamasının IL-1 ile uyarılmış ve uyarılmamış fibroblast benzeri sinovisitler (FLS) üzerinde IL-6, IL-8 ve TNF- α ' nın da bulunduğu 16 osteoartrit ile ilişkili sitokin ve proteinin gen ekspresyonlarındaki değişimi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda HMWHA' nın, FLS' de TNF- α , IL-8 ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üzerinde down regülasyona neden olduğu ve bu azalarak düzenlenme durumuna HA' nın en temel reseptörlerinden biri olan CD44 reseptörünün neden olabileceği yorumu yapılmıştır. Bunun sonucunda HA' nın bu etki ile anti-inflamatuvar etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmıştır(96).

Gariboldi ve arkadaşlarının (2008) yapmış oldukları çalışmada LMWHA' nı keratinositlerin koruyuculuğunu artırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Bunun için moleküler büyüklüğü 200 kDa' un altında %0,25- %0,5 konsantrasyonunda HA kullanılmıştır. Standart doz olarak ise genel olarak topikal uygulamalarda kullanılan %0,2 tercih edilmiştir. Çalışmanın sonucunda belirtildiği şekilde β -defensin 2 yanıtıyla LMWHA' nın keratinosit aktivasyonunu sağladığı, *ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarla da epidermal kompartmanın tüm katmanlarından salgılandığı gözlemlenmiştir ve kültür ortamında IL-8, TNF- α , IL-1 β veya IL-6 üretiminin gerçekleşmediği de gösterilmiştir(97).

Pauloin ve arkadaşları (2009) tarafından yılında gerçekleştirilen çalışma ile HMWHA' nın insan korneal epitel (HCE) hücreleri üzerinde ultraviyole B (UVB) etkisine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada hücreler 30 dakika boyunca %0,2 konsantrasyonunda ve $1,5 \times 10^6$ Da HMWHA ile inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlara

bakıldığında HMWHA' nın HCE hücre canlılığında artışa, IL-6 ve IL-8 düzeylerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra kaspaz-3 ile kaspaz-8 aktivasyonunda azalmaya neden olarak da apoptozisi azalttığı görülmüştür. Tüm bu sonuçlara bakıldığında, UVB radyasyonuna karşı HMWHA' nın koruyucu etkiye sahip olduğu yorumu yapılmıştır(98). Pauloin ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise HMWHA' nın sodyum lauril sülfat (SLS) ile indüklenmiş toksik etkiye karşı korneal koruma etkinliğinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışma kapsamında HCE hücre hattı kullanılmış olup, %0,2' lik HMWHA (10^6 Da) 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 20 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda SLS uygulaması gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çalışmaların sonucuna bakıldığında HMWHA' nın SLS ile indüklenmiş oksidatif stres, apoptozis ve inflamatuvar sitokin sekresyonunda azalmaya neden olduğu yapılan hücre canlılık, kaspaz-3, -8, -9, IL-6 ve IL-8 üretimi gibi çalışmaları da içeren denemelerle gözlemlenmiştir(99).

Campo ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada farklı moleküler boyutlardaki HA' ların (50 kDa, 1000 kDa ve 5000 kDa) fare kondrositlerinde PMA ile indüklenmiş inflamasyona olan etkileri araştırılmıştır. Düşük moleküler boyuttaki HA CD44 ekspresyonunu ve PMA ile etkileştirilmemiş kondrositlerde inflamasyonu artırırken, PMA ile etkileştirilmiş kondrositlerde CD44, TNF- α ekspresyonunu arttırmıştır. Bununla beraber PMA' nın da neden olduğu etkiyi arttırmıştır. Yüksek moleküler boyuttaki HA etkileştirilmemiş kondrositlerde bir etki yaratmamıştır. Ancak PMA ile uyarılmış hücrelerde inflamasyonu azaltmıştır. Orta moleküler boyuttaki HA' nın bir etkiye sahip olup olmadığına bakıldığında ise bir etkisi gözlemlenmemiştir. Buradaki sonuçlara bakıldığında farklı moleküler büyüklüklerdeki HA' nın inflamasyonu etkileyebileceği sonucuna varılmıştır(100).

Wallet ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada romatoidartrit inflamasyonu kapsamında interferon γ (IFN γ) ile uyarılmış olan makrofaj hücrelerinde HMWHA' nın oluşturduğu etki gözlemlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda HMWHA ile makrofajların TNF üretimini ve T hücrelerinin TH1' e farklılaşmasını sağlayan TH1 sitokin interlökin 12p70 (IL-12p70) sekresyonunu arttırmış olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber regülatör ve anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10' un HMWHA indüklü sekresyonunun baskılandığı gözlemlenmiştir(101).

Neuman ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada HA' nın, kozmetik ve farmasötik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan etanolün sebep olduğu apoptozise olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla iki farklı etanol konsantrasyonu (50 mM ve 100 mM) ile muamele edilmiş insan A431 epidermoid deri hücreleri ve fare fibroblast hücreleri %2, %4 ve %8 konsantrasyonlarında formüle edilen Healing HA-jelly ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak etanolün deri hücrelerinde apoptozise sebep olan bir sitokin olan TNF- α ' nın etkisini arttırarak apoptozisi indüklediği gözlemlenerek, %2 ile %4 HA konsantrasyonlarında bir tedavi uygulandığı zaman TNF- α konsantrasyonunun azaldığı, bu sayede de apoptozisin azaldığı ve morfolojik inflamasyonun her iki hücre dizisinde de azaldığı sonucuna varılmıştır(102). Neuman ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise aynı hücre hatlarında etanol konsantrasyonu yalnızca 100 mM ve Healing HA-jelly konsantrasyonu ise %2 ve %4 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada TNF- α , transforme edici büyüme faktör- β (TGF- β), interferon- α (IFN- α), IL-6, IL1- β , matriks metalloproteinazları (MMP) ve metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda etanol tarafından sekresyonu gerçekleşen pro-inflamatuarlar ile hücrel toksisitede artış olduğu ve HA tarafından bu pro-inflamatuarların düzeylerinin azaltıldığı sonucuna ulaşılmıştır(103).

Patil ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada daha önce araştırılmamış olarak kalan *S.equi* subsp. *zooepidemicus* MTCC 3523 suşu ile HA üretimi gerçekleştirilerek, elde edilen HA' nın yara iyileştirici olarak kullanıldığındaki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen HA' nın moleküler büyüklüğü $5,38 \times 10^5$ Da olarak belirlenmiştir ve yara iyileştirmesi için Wistar ratları ile yapılan denemede üretilen HA' nın 12. ve 16. günlerde yara iyileştirmede etkili olduğu gözlemlenmiştir(104).

Quero ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada HA' nın intervertebral disk (IVD) üzerindeki inflamatuvar ve katabolik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla insan IVD hücreleri kullanılmak üzere hastalardan izole edilmiştir. Etkileri değerlendirilecek olan HA fragmentleri, Ultrapure HMWHA (Healon 5)' dan hyaluronidaz enzimi ile parçalanarak hazırlanmıştır. HA fragmentlerinin sitokin ve matriks degrade edici enzim üretimine olan etkileri, bu fragmentlerin etkilerinin düzenlenmesinde rol alan spesifik hücre yüzey reseptörleri ve sinyal transdüksiyon yolları değerlendirilerek çalışmada sonuca varılmıştır. IVD hücrelerinin HA fragmentleri ile muamelesi sonucunda sitokin, protein ve reseptörlerin mRNA ekspresyon düzeylerine bakılarak, IL-6, IL-8, IL-1 β , siklooksijenaz-2,

MMP-1 ve MMP-13' ün mRNA ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir. Elde edilen diğer sonuçlarla beraber insan IVD hücrelerinin HA fragmentleri bağımlı uyarımının, immün sistemde önemli rol oynayan Toll-like reseptör-2 (TLR-2) ile düzenlenen mitojen aktive protein (MAP) kinaz yolağının aktivasyonu ile düzenlendiği yorumu yapılmıştır(105).

Oliviero ve arkadaşları (2015) tarafından yapılmış olan çalışmada osteoartrit süreci ile ilişkili olarak HA' ların anti-inflamatuar özellikleri anlaşılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla modifiye edilmemiş 500-730 kDa ve >1500 kDa boyutlarında iki çeşit HA ve HYADD®4 (amid bağlarıyla hexadecylic yan zincirleriyle modifiye edilmiş HA) ürünü olmak üzere üç farklı HA kullanılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmada THP-1 hücre hattını uyararak için osteoartritte çeşitli formlarda bulunan sentetik kalsiyum pirofosfat kristalleri (CPP) de kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda HA hexadecylamide türevinin CPP ve LPS ile oluşturulan inflamatuvar cevabı baskılayarak anti-inflamatuar etki gösterdiği yorumu yapılmıştır(106).

Rooney ve arkadaşları (2015) insan ürotelyal hücrelerini HTB4 kullanarak *in vitro* ortamda inflamatuvar interstisyel sistit modeli oluşturularak 0,4 mg/ml konsantrasyonunda HA' nın IL-6 ve IL-8 sekresyonuna olan etkisi ve geçirgenliğe olan etkisini araştırmışlardır. Sitokin sekresyonu, GAG sekresyonu ve trans-epitel geçirgenliğe dayanarak değerlendirme yapılan çalışmada, pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 ve IL-8' in HA tarafından baskılandığı ve sülfatlanmış GAG' ların salınımının artışı sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca epitelial katman geçirgenliğini pozitif olarak etkilediği sonucuna da varılmıştır(107).

Rayahin ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada makrofaj üzerinde düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı HA' ların etkisi anlaşılmasına çalışılmıştır. Çalışmada 5-3000 kDa ve hyaluronidaz ile muamele edilmiş HA' dan 1 µM konsantrasyonunda kullanılmıştır ve murin makrofajları üzerinde deneme yapılmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı HA' nın makrofaj aktivasyonunu sağladığı ve düşük moleküler ağırlıklı HA' nın da pro-inflamatuar cevaba neden olduğu gözlemlenerek, makrofaj fenotip düzenlenmesinin moleküler büyüklüğe bağlı olduğu yorumu yapılmıştır(108).

Literatürden de anlaşıldığı üzere HA' nın farklı hücre hatlarında koruyucu etkilere sahip olduğu görülmektedir. Bu da HA' nın birçok hastalığın tedavisinde kullanımının önünü açmaktadır. Buna bağlı olarak da her geçen gün HA' ya olan talep artmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında çalışılan optimum koşullarda HA üretimi gerçekleştirilmiş ve elde edilen HA' ların sitotoksikite ve biyouyumluluk analizleri sonucunda insan kullanımına uygun olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki farklı moleküler boyutlardaki HA uygulamalarının sitokin sekresyon cevabına etkileri ile uyumludur. Ülkemizin HA alımı açısından dışa bağımlılığını azaltmaya yönelik yapılan tez kapsamında HA üretiminin gerçekleştirilebilmesi için en önemli adım atılmış olup, sonuç tatmin edici düzeydedir. Bundan sonraki aşamada üretilen HA' nın moleküler boyutlarının belirlenmesi ve üretimi gerçekleştirilen farklı boyutlardaki HA' ların stabilizasyonunun sağlanması ve farklı ticari HA uygulamalarına göre *in vitro/in vivo* biyoetkinlik değerlendirmelerinin yapılması ürettiğimiz HA' nın ticari alanda yer alabilmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Kuo J, Brook S, Products M, Park WC, February R. Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides. *Bioconjug. Chem.* 1991:232–241.
2. Garg, Hari G. and Hales CA. *Chemistry and Biology of Hyaluronan.*; 2004.
3. Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* 1984;220(2):597–600.
4. Stern R, Asari A a., Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur. J. Cell Biol.* 2006;85(8):699–715.
5. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Praha).* 2008;2008(8):397–411.
6. Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: Tying up the giant. *J. Biol. Chem.* 2002;277(7):4585–4588.
7. Gribbon P, Heng BC, Hardingham TE. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochem. J.* 2000;350 Pt 1:329–335.
8. Fakhari A, Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomater.* 2013;9(7):7081–7092.
9. Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP. Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell Death Dis.* 2013;4(10):e819–11.
10. Ruppert SM, Hawn TR, Arrigoni A, Wight TN, Bollyky PL. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Stanford Immunol.* 2014:186–192.
11. Won C, Yeon J, Won J, Lee J, Woong J, Yeon J, Hwang K, Shik Y, Il Y. Potential anti-osteoporotic activity of low-molecular weight hyaluronan by attenuation of osteoclast cell differentiation and function in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;449(4):438–443.

12. DeAngelis P. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 1999;56:670–682.
13. Stridh S, Palm F, Hansell P. Renal interstitial hyaluronan : functional aspects during normal and pathological conditions. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012. doi:10.1152/ajpregu.00332.2011.
14. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* 1997;272(22):13997–14000.
15. Spicer AP, Tien JYL. Hyaluronan and Morphogenesis. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 2004;72(1):89–108.
16. Leonard B a B, Woischnik M, Podbielski a. Production of stabilized virulence factor-negative variants by group A streptococci during stationary phase. *Infect. Immun.* 1998;66(8):3841–3847.
17. Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers* 2010:387–412.
18. Widner B, Behr R, Dollen S Von. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. ...* 2005;71(7):3747–3752.
19. Chien L-J, Lee C-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;77(2):339–346.
20. Akasaka H, Komasaki H, Arai T. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. 1989:2–7.
21. Kim J, Yoo S, Oh D, Kweon Y. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzym. Microb. ...* 1996;0229(96):440–445.
22. Blank L. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol. ...* 2005;1. doi:10.1002/bit.20466.
23. Cooney MJ, Goh LT, Lee PL, Johns MR. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological implications of glucose and complex nitrogen- limited growth. *Biotechnol. Prog.* 1999;15(5):898–910.

24. Armstrong D, Cooney M, Johns M. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. ...* 1997;47:309–312.
25. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)*. 2008;53(8):397–411.
26. Powell J, Horton M. Threat matrix. *Immunol. Res.* 2005:207–218.
27. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.* 2000;165(4):1863–1870.
28. Kumar V, Cotran RS. *Robbins' Basic Pathology*. [Chicago] American Medical Association.; 1994.
29. Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005;66(4):341–351.
30. Kennedy JF, Phillips Glyn O., Williams PA, Hascall VC. *Hyaluronan.*; 2002.
31. Boast FN. Isolation of Hyaluronic Acid From The Cock's Comb. *J. Biol. Chem.* 1949.
32. Kuo JW. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products.*; 2006.
33. Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* 2007:17–25.
34. Chong B, Blank L. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. ...* 2005:341–351.
35. Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. Biotechnological production and application of hyaluronan. *Biopolymers* 2010. Available at: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/12157.pdf>. Accessed October 27, 2014.
36. Blank LM, McLaughlin RL, Nielsen LK. Stable production of hyaluronic acid in streptococcus zooepidemicus chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;90(6):685–693.

37. DeAngelis P. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry* 1996;29(6):9768–9771.
38. Ogrodowski CS, Hokka CO, Santana M. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005;121-124:753–761.
39. Izawa N, Hanamizu T, Iizuka R, Sone T, Mizukoshi H, Kimura K, Chiba K. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 2009;107(2):119–123.
40. Izawa N, Hanamizu T, Sone T, Chiba K. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. *J. Biosci. Bioeng.* 2010;109(4):356–360.
41. Chen Y-H, Li J, Liu L, Liu H-Z, Wang Q. Optimization of Flask Culture Medium and Conditions for Hyaluronic Acid Production by a *Streptococcus Equisimilis* Mutant NC2168. *Brazilian J. Microbiol.* 2012:1553–1561.
42. Benedini LJ, Helena M, Santana A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresour. Technol.* 2013;130:798–800.
43. Chong BF, Nielsen LK. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochem. Eng. J.* 2003;16(2):153–162.
44. Pires AMB, Santana MH a. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010;162(6):1751–1761.
45. Pires AMB, Macedo AC, Eguchi SY, Santana MHA. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresour. Technol.* 2010;101(16):6506–6509.
46. Armstrong DC, Johns MR. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(7).
47. Duan X-J, Yang L, Zhang X, Tan W-S. Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008;18(4):718–724.

48. Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem.* 2008;110:923–926.
49. Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009:755–763.
50. Zhang X, Duan XJ, Tan WS. Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem.* 2010;119(4):1643–1646.
51. Don MM, Shoparwe NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochem. Eng. J.* 2010;49(1):95–103.
52. Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresour. Technol.* 2008;99(17):8532–6.
53. Jagannath S, Ramachandran KB. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochem. Eng. J.* 2010;48(2):148–158.
54. Shah M V, Badle SS, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochem. Eng. J.* 2013;80:53–60.
55. Yiting W, Esteban C, Steen JA, Keld L. The Role of Hyaluronic Acid Precursor Concentrations in Molecular Weight Control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Mol. Biotechnol.* 2014;56:147–156.
56. Widner B, Behr R, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, Deangelis PL, Weigel PH, Brown S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(7):3747–52.
57. Krahulec J, Krahulcová J. Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in beta-glucuronidase in laboratory conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006;71(4):415–22.
58. Mao Z, Chen R. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol. Prog.* 2007;23:1038–1042.

59. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab. Eng.* 2008;10:24–32.
60. Izawa N, Serata M, Sone T, Omasa T, Ohtake H. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *JBIOSC* 2011;111(6):665–670.
61. Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J. Biotechnol.* 2014;185:28–36.
62. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 1962;4(4):330–334.
63. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr. Polym.* 2003;54(1):59–61.
64. Gold EW. A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations. *Anal. Biochem.* 1979;99(1):183–188.
65. Karlsson M, Björnsson S. Quantitation of proteoglycans in biological fluids using Alcian blue. In: *Proteoglycan Protocols*. Springer; 2001:159–173.
66. Jourdain GW, Wolfman M, Sarber R, Distler J. A specific, sensitive method for the determination of hyaluronate. *Anal. Biochem.* 1979;96(2):474–480.
67. Adams ME, Muir H. An automated version of the periodate-thiobarbituric acid assay for analysis of Δ -4, 5 unsaturated uronic acids and its application to the assay of hyaluronic acid and chondroitin sulfates. *Anal. Biochem.* 1980;109(2):426–431.
68. Elson LA, Morgan WTJ. A Colorimetric Method for the Determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem J.* 1934:988–995.
69. Kawasaki, Kenzo; Ochi, Mitsuo; Uchio Yuji; Adachi, Nobuo; Matsusaki M. Hyaluronic Acid Enhances Proliferation and Chondroitin Sulfate Synthesis in Cultured Chondrocytes Embedded in Collagen Gels. *J. Cell. Physiol.* 1999;148(June 1998):142–148.
70. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.* 2002;21(1):25–29.
71. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation. *PLoS One* 2011;6(10).

doi:10.1371/journal.pone.0026078.

72. Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DWH. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 1993;91(6):2368–2377.
73. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* 2003:835–870.
74. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008:585–601.
75. Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Regulation of Hyaluronan-Induced Chemokine Gene Expression by IL-10 and IFN- γ in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* 2015:3023–3030.
76. Lyle DB, Breger JC, Baeva LF, Shallcross JC, Durfor CN, Wang NS, Langone JJ. Low molecular weight hyaluronic acid effects on murine macrophage nitric oxide production. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2010;94(3):893–904.
77. Baeva LF, Lyle DB, Rios M, Langone JJ, Lightfoote MM. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1 β production. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2013:305–314.
78. Ke C, Wang D, Sun Y, Qiao D, Ye H, Zeng X. Immunostimulatory and antiangiogenic activities of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem. Toxicol.* 2013;58:401–407.
79. Fakhari a., Berklund C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomater.* 2013;9(7):7081–7092.
80. Liu L, Sun J, Xu W, Du G, Chen J. Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. *Biotechnol. Prog.* 2009:1819–1825.
81. Aytar P, Buruk Y, Çabuk A. *Streptococcus equi* ile Hyaluronik Asit Üretiminde Optimum Koşulların Plackett Burman Yöntemi ile Belirlenmesi. *Elektron. Mikrobiyoloji Derg. TR* 2013:28–35.

82. Yazihan N. Erythropoietin Reduces Lipopolysaccharide-Induced Cell Damage and Midkine Secretion in U937 Human Histiocytic Lymphoma Cells. *Adv. Ther.* 2008;25(5):502–514.
83. Balazs EA. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. *Chem. Biol. hyaluronan. Elsevier, Amsterdam* 2004;415.
84. Trommer H, Wartewig S, Böttcher R, Pöpl A, Hoentsch J, Ozegowski JH, Neubert RHH. The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. *Int. J. Pharm.* 2003;254(2):223–234.
85. Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnol. Lett.* 2008;493–496.
86. Duan X-J, Yang L, Zhang X, Tan W-S. Effect of Oxygen and Shear Stress on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008;18:718–724.
87. Huang W, Chen S, Chen T. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2006;32:239–243.
88. Liu L, Wang M, Du G, Chen J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Let. Appl. Microbiol.* 2008;46:383–388.
89. Armstrong DC, Johns MR. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(7):2759–2764.
90. Huang W, Chen S, Chen T. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2008;40:460–464.
91. Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnol. Lett.* 2008;30(3):493–6.
92. Im JH, Song JM, Kang JH, Kang DJ. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36(11):1337–1344.
93. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Weiss JM, Prehm P, Simon JC, Cells D, Termeer

- CC, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan Are Potent Activators of Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2000. doi:10.4049/jimmunol.165.4.1863.
94. Haslinger B, Mandl-Weber S, Sellmayer A, Sitter T. Hyaluronan fragments induce the synthesis of MCP-1 and IL-8 in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res.* 2001:79–86.
 95. Sezgin M, Demirel ÇA, Karaca C, Ortancıl Ö, Ülkar GB, Kanık A, Çakçı A. Does hyaluronan affect inflammatory cytokines in knee osteoarthritis? *Rheumatol. Int.* 2005:264–269.
 96. Wang C-T, Lin Y-T, Chiang BMD, Lln Y-H, Hou S-M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2006. doi:10.1016/j.joca.2006.05.009.
 97. Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Sommariva M, Sfondrini L, Balsari A, Rumio C, Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sommariva M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A, Rumio C. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Increases the Self-Defense of Skin Epithelium by Induction of β -Defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* 2008. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2103.
 98. Pauloin T, Dutot M, Joly F, Warnet J, Rat P. High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells. *Mol. Vis.* 2009;(January):577–583.
 99. Pauloin T, Liang H, Chavinier E. Corneal Protection With High-Molecular-Weight Hyaluronan Against In Vitro and In Vivo Sodium Lauryl Sulfate-Induced Toxic Effects. *Cornea* 2009;28(9):1032–1041.
 100. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ascola AD, Traina P, Calatroni A. Differential effect of molecular size HA in mouse chondrocytes stimulated with PMA. *BBA - Gen. Subj.* 2009;1790(10):1353–1367.
 101. Wallet MA, Wallet SM, Guiulfo G, Sleasman JW, Goodenow MM. IFN-gamma primes macrophages for inflammatory activation by high molecular weight hyaluronan. *Cell. Immunol.* 2010;262(2):84–88.
 102. Neuman MG, Oruña L, Coto G, Lago G, Nanau R, Vincent M. Hyaluronic acid signals for repair in ethanol-induced apoptosis in skin cells in vitro. *Clin. Biochem.* 2010;43(10-11):822–826.

103. Neuman MG, Nanau RM, Oruña L, Coto G. In vitro Anti-Inflammatory Effects of Hyaluronic Acid in Ethanol-Induced Damage in Skin Cells. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011;14(3):425–437.
104. Patil KP, Patil DK, Chaudhari BL, Chincholkar SB. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *J. Biosci. Bioeng.* 2011;111(3):286–288.
105. Quero L, Klawitter M, Schmaus A, Rothley M, Sleeman J, Tieden AN, Klasen J, Boos N, Hottiger MO, Wuertz K, Richards PJ. Hyaluronic acid fragments enhance the inflammatory and catabolic response in human intervertebral disc cells through modulation of toll-like receptor 2 signalling pathways. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15(4):R94.
106. Oliviero F, Scanu A, Ramonda R, Frallonardo P, Sfriso P, Dayer J, Punzi L. IL-1 β and IL-8 are scavenged by the hexadecylamide derivative of hyaluronic acid: A new mechanism. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2015:2823–2829.
107. Rooney P, Srivastava A, Watson L, Quinlan LR, Pandit A. Hyaluronic acid decreases IL-6 and IL-8 secretion and permeability in an inflammatory model of interstitial cystitis. *Acta Biomater.* 2015;19:66–75.
108. Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, Koh TJ, Gemeinhart RA. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influence Macrophage Activation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015. doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00181.

EK-1 Tez DeneYlerinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Malzemenin Adı	Markası	Katalog Numarası	Kullanım Amacı
Triptik soy broth (bakteriyal)	Conda	1224.00	Aşı kültürü hazırlanması
Sodyum klorür (NaCl)	VWR	27810.295	Tampon hazırlanması
Maya özütü (bakteriyal)	Conda	1702.00	Aşı kültürü hazırlanması
Sukroz	Merck	57-50-1	Üretim ortamı hazırlanması
Potasyum sülfat (K ₂ SO ₄)	Merck	#7778-80-5	Üretim ortamı hazırlanması
Magnezyum sülfat hepta hidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	10034-99-8	Üretim ortamı hazırlanması
Sodyum monohidrojen fosfat dodeka hidrat (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	Merck	#1303-96-4	Üretim ortamı hazırlanması
Demir sülfat hepta hidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma-Aldrich	7782-63-0	Üretim ortamı hazırlanması
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck	#10043-52-4	İz element çözeltisi
Çinko klorür (ZnCl ₂)	Merck	1.08815.1000	İz element çözeltisi
Bakır sülfat penta hidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	Merck	#7758-99-8	İz element çözeltisi
SDS (sodyum dodesil sülfat)	Genaxxon bioscience	M3290.0100	Ekstraksiyon çözeltisi hazırlanması
Etil alkol	Alkomed	CAS 64-17-5	Genel Kullanım
Etil alkol	Alkomed	CAS 64-17-5	Çöktürme işlemi
Etil alkol	Sigma-Aldrich	#SZBD0210V	Çözelti hazırlama
Potasyum klorür (KCl)	Merck	1.04936.1000	Tampon hazırlama
Potasyum mono hidrojenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck	4871	Tampon hazırlama
Sodyumtetraborat	Merck	1.06303.1000	HA miktar tayini
Karbazol	Glentham Life Sciences	86-74-8	HA miktar tayini
D-glukuronik asit	Sigma-Aldrich	#SLBJ1774V	HA miktar tayini
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Merck	1.09074.1000	Reaksiyon durdurma solüsyonus

MTT	Sigma-Aldrich	M2128	Hücre canlılık testi
DMEM	Sigma-Aldrich	RNBD0131	Hücre kültürü
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich	T4049	Hücre kültürü
Fetal Bovine Serum	PAA	A15-649	Hücre kültürü
Penisilin-Streptomisin	Sigma-Aldrich	#SLBH5008V	Hücre kültürü
L-Glutamin	HyQ		Hücre kültürü
Lipopolisakkarit (LPS) (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Sigma-Aldrich	L1519	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hidroklorik asit (HCl)	Merck	1.09057.1000	Lizis çözeltisi hazırlanması
2-Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)	Merck	1.09634.2511	Lizis çözeltisi hazırlanması
Triton X-100	Merck	1.08603.1000	Lizis çözeltisi hazırlanması
Tween 20	Merck	8.22184.1000	Yıkama tamponu
Hyaluronik Asit (1200 mol wt)	Sigma-Aldrich	49775	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hyaluronik Asit (8000-15000 mol wt)	Sigma-Aldrich	40583	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hyaluronik Asit (10000-30000 mol wt)	Sigma-Aldrich	94137	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hyaluronik Asit (30000-50000 mol wt)	Sigma-Aldrich	42686	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hyaluronik Asit (50000-70000 mol wt)	Sigma-Aldrich	08185	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri
Hyaluronik Asit (70000-120000 mol wt)	Sigma-Aldrich	96144	Hücre canlılık ve biyoyumluluk testleri

EK-2 Tez Deneylerinde Kullanılan Kitler

Kitin Adı	Markası	Katalog Numarası	Kullanım Amacı
Human TNF- α	eBioscience	#88-7346-88	ELISA-immünolojik yanıt
Human IL-8	eBioscience	#88-8086-88	ELISA-immünolojik yanıt
Human IL-10	eBioscience	#88-7106-88	ELISA-immünolojik yanıt

EK-3 Tez Deneylerinde Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Gereçleri

Kullanılan Cihaz	Markası	Katalog Numarası-Modeli
Çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler	SM-30
Vorteks	VELP Scientifica	Zx ³
Tartı	Sartorius	BP110S
Manyetik karıştırıcı	Wisd WiseStir	MSH-20A
Otoklav	NÜVE	OT 40L/ OT 90L
Buzdolabı	Samsung	RT58EDEW
-80 °C dondurucu	Sanyo	MDF-U53V
pH metre	WTW	315i
UV-spektrofotometre	SHIMADZU	UVmini 1240
ELISA plak okuyucu	Epoch BioTek	
ELISA plak yıkayıcı	Mindray	MW-12A
Santrifüj	Beckman Coulter	Allegra X-30R
Santrifüj	Hettich Zentrifüger	Rotina 35R
Isıtıcı blok	Eppendorf	ThermoMixer C
Diyaliz membranı (20,000 MWCO)	Thermo Scientific	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 (#87736)
Diyaliz membranı (10,000 MWCO)	Thermo Scientific	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 (#87731)
Diyaliz membranı (3,500 MWCO)	Thermo Scientific	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 (#87724)
Laminar flow	Thermo Scientific	S2020 1.2
Hücre kültürü etüvü	Thermo Scientific	371
Filtre	GVS	13130033507
Mikroskop	LEICA	DFC295

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Didem MİMİROĞLU

Doğum Yeri: Antalya

Doğum Tarihi: 03.04.1990

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ankara Atatürk Lisesi (2004-2007)

Muğla Anadolu Lisesi (2007-2008)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2008-2013)

İstanbul Üniversitesi Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi Sosyoloji Lisans Bölümü
(2015-...)

İş Tecrübesi

Kurumu: Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ)

Görevi: Araştırma Görevlisi- Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kapsamında

Yılları: Ekim 2015

Kurumu: Cumhuriyet Üniversitesi

Görevi: Araştırma Görevlisi - Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kapsamında

Yılları: Şubat 2015

Yayımlar

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- **BIOMED 2015 (21st International Biomaterial Science and Technology Symposium)**
"In vivo studies of the scaffolds for wound healing"
Poster sunumu, Ekim 2015
- **11th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NanoTR-11)**
"Bacterial Nanofiber PHB and PHBV for Medical Dress"
Sözlü sunum, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Haziran 2015

- **10th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NanoTR-10)**
“Kozmetik Amaçlı Lipozom Enkapsüle Lipaz Hazırlanması”
Poster sunumu, Yeditepe Üniversitesi, Haziran 2014

YÜKSEK LİSANS BOYUNCA ÇIKAN YAYINLAR

In vivo studies of the scaffolds for wound healing

Murat Demirbilek¹, Nuray Yazıhan², Didem Mimirolu³, Emir Baki Denkbaş⁴

¹Advanced Technologies Application and Research Center, Hacettepe University

²Internal Medicine-Pathophysiology, Faculty of Medicine, Ankara University

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Cumhuriyet University

⁴Biochemistry Division, Department of Chemistry, Hacettepe University

didem.mimiroglu@gmail.com

INTRODUCTION

Wound healing is a complex physiological process. Natural and synthetic gel-like materials, films/membranes, composites, micro/nanoparticulate systems have featured in the development of biomaterials for wound healing process. In this case, the biological response to a material becomes very important when it's in contact with the human body and therefore new in vitro models are necessary to evaluate the biocompatibility of biomaterials [1].

In this study to determine the biocompatibility; alginate, chitosan, alginate-chitosan blend, tri-ethanolamine-alginate (TEA-Alg) blend scaffolds were prepared and cytotoxicity of these scaffolds on macrophage (THP-1), L929, keratinocyte (HaCaT) was determined. Tensile strength (MPa) and maximum elongation of break values (mm) of the scaffold were also tested. Cytochrome-C, Fibroblast Growth Factors (FGF), collagen type I profiles were determined.

MATERIALS & METHODS

Aqueous chitosan (1% low viscosity, dissolved in 1% acetic acid) and alginate (1% low viscosity) solutions were prepared. For chitosan-alginate blend scaffold, the polymer solutions were mixed in a value ratio of 1:1 (v/v). For Alg-TEA blend scaffolds, 1% alginate solution was prepared and TEA was added to the solution different ratio (0.5, 1, 3 %; v/v). Polymer solutions were casted into petri dishes, frozen at 80 °C for 24h and lyophilized for 48h.

Cytotoxicity of the scaffolds on the THP-1, L929, HaCaT cell lines were performed by MTT methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical examinations of the scaffolds were determined with SEM photographs and it was seen that all scaffolds have honeycomb and highly porous structure (Figure 1). Tensile strength (MPa) and maximum elongation of break (mm) of scaffolds were determined. It was seen that mixing TEA increases the tensile strength and maximum elongation at break values of the Alg scaffolds and also adding more than 1% TEA causes to antiplastic effect. 15 day degradation rate of the scaffolds were determined. The observed mass losses are as following: CS was 41,60±1,31%; Alg was 73,84±3,99%; Alg-CS was 43,47±2,26%; Alg-0,5%TEA was 56,83±6,3; Alg-1%TEA 69,12±2,91; Alg-3%TEA was 47,72±8,23.

MTT test was used to measuring of cytotoxicity. It was found that the cytotoxicity of Alg, CS and Alg-CS blend scaffolds on L929 were less than 10% and also on THP-1 cells were less than 20%. The cytotoxic effects

of CS, Alg and blend scaffolds on keratinocyte were not seen. For Alg-TEA blend scaffolds, it was determined that, increasing TEA concentration increases the cytotoxic effects on keratinocyte cells.

Cytochrome-C and FGF levels of fibroblast cells were measured. It was seen that, TEA led to an increase on cytochrome-C levels of fibroblast cells. The cytochrome-C levels of CS, Alg and blend scaffold groups were under the control group. All groups increased the FGF levels. The highest group was Alg-TEA blend scaffolds.

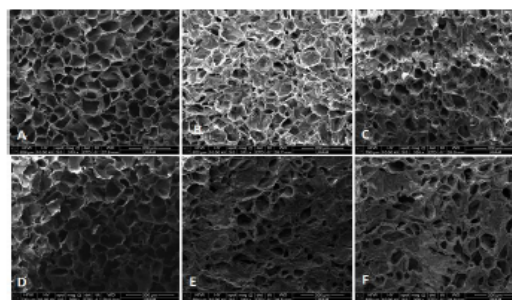


Figure1. (A) Chitosan, (B) Alginate, (C) Chitosan-alginate blend, (D) Alginate-0.5%TEA blend, (E) Alginate-1%TEA blend, (F)Alginate-3%TEA blend scaffolds

CONCLUSION

In summary, biocompatibility and immunocompatibility of Alg, CS, Alg-CS blend and Alg-TEA blend scaffolds are performed and it is established that TEA usage over 1% blend is not suitable for bioengineering materials.

REFERENCES

1. Stephen F. Badylak and Thomas W. Gilbert. Immune Response to Biologic Scaffold Materials. *Semin Immunol.* 2008 April; 20(2): 109–116.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by Ministry of Science, Industry and Technology Project, San-Tez No: 0443.STZ.2013-2

Bacterial Nanofiber PHB and PHBV for Medical Dress

Nuray Yazihan¹, Murat Demirbilek², Didem Mimiroğlu¹, Emir Baki Denkbaş³
¹Internal Medicine-Pathophysiology, Faculty of Medicine, Ankara University
²Advanced Technologies Application and Research Center, Hacettepe University
³Biochemistry Division, Department of Chemistry, Hacettepe University
murat.demirbilek@yahoo.com

Introduction

Wound healing is an integrated multifunctional process in dermal structure. Determination of bioavailability of biomaterials in each dermal component and related molecules is very important. Nanofibrous membranes are highly soft materials with high surface-to-volume ratios, and therefore can serve as excellent carriers for therapeutic agents or accelerate wound healing. In the study poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) nanofiber membranes were prepared. PHB and PHBV are produced by a number of bacteria, such as *Alcaligenes eutrophus*, under nutrient depletion conditions as intracellular storage material of carbon and energy. PHAs are used in many tissue engineering studies in the literature including sutures, adhesion barriers, and they guide tissue repair/regeneration devices, articular cartilage repair devices, tendon repair devices, bone-marrow scaffolds, wound dressing (Baki 2010), and cardiovascular patches (Gaudio et al. 2012).

Material Methods

PHB and PHBV were produced by *Alcaligenes eutrophus*, under different nutrient depletion conditions. These polymers were characterized by H-NMR. Nanofiber membranes were produced by electrospun technic. Morphological characterizations were performed by SEM photograph (Figure 1).

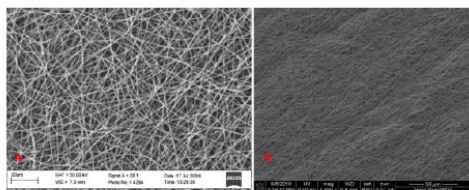


Figure 1 PHB (A), PHBV (B) nanofiber membranes.

Cytotoxicity of the scaffolds on the THP1 and L929 cell lines were performed by MTT methods. Cytochrome-c activity, Fibroblast Growth Factors (FGF) level, and collagen type I level of fibroblast cultured on the scaffolds were determined. Also vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of the human endothelial cells cultured on the scaffolds were determined.

Results

Cytochrome-c is localized in the mitochondrial intermembranes. The release of cytochrome-c from mitochondria to the cytosol, where it activates the caspase family of proteases is believed to be primary trigger leading to the onset of apoptosis. FGFs are

potent regulators of the cell proliferation, differentiation and function and are critically important in normal development, tissue maintenance and wound repair. Type I collagen is the most abundant collagen of the ECM. It is present in scar tissue, the end product when tissue heals by repair. VEGF is a signal protein produced by cells that stimulates vasculogenesis and angiogenesis. According to the results, PHB and PHBV did not increase cytochrome-c levels and also did not affect the collagen type 1 release. Meanwhile these scaffolds caused an increase at the level of FGF and VEGF (Figure 2).

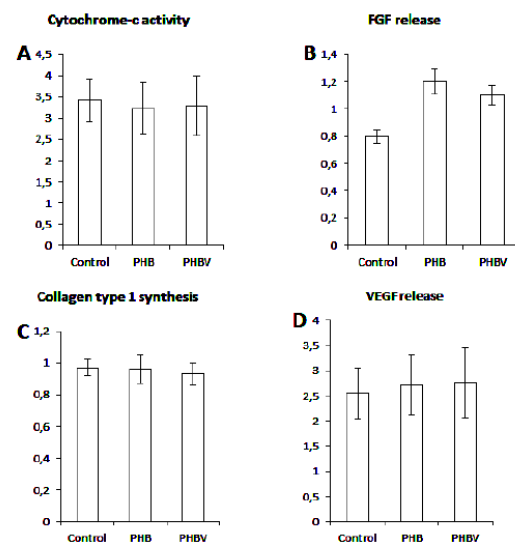


Figure 2 Cytochrome-c (A), FGF (B), collagen type-1 (C) VEGF (D) levels

References

- Baki H. 2010. Amphiphilic Poly (3-hydroxyalkanoate)s: potential candidates for medical applications. Int J Polym Sci. Doi:10.1155/2010/423460.
- Gaudio CD, Fioravanzo L, Folin M, Marchi F, Ercolani E, Bianco A. 2012. Electrospun tubular scaffolds: on the effectiveness of blending poly (ϵ -caprolactone) with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 100B: 1883–1898.

Acknowledgments

This study was supported by Ministry of Science, Industry and Technology Project, San-Tez No: 0443.STZ.2013-2.



Preparation of Lipase Encapsulated Liposomes for Cosmetic Applications



Didem Mimirolu,^{1,2*} and Ali Kilinc¹

¹ Biochemistry Department, Ege University, Izmir, 35100, Turkey
²Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, 06580, Turkey
didem.mimirolu@gmail.com

ABSTRACT

Lipases are the hydrolase enzymes (E.C. 3.1.1.3) and they catalyze the cleavage reaction of a long chain of acylglycerols. They are widely used in different industrial fields, especially cosmetic and perfume industries. Cellulite therapy is one of the most important cosmetic applications and there are numerous investigations for this purposes. The best administration route for the delivery of active agent is transdermal route in those therapies and very big efforts are paid for the new formulations in this era. Liposomes are the most favourable carriers in cosmetic applications due to very similar structures of them with the cell membranes for uptake. In this study, firstly, the lipase enzyme was partially purified by ammonium sulfate and acetone precipitation from oat (*Avena sativa* L.). Then, lipase was encapsulated in liposomes and finally, the glycerine formulation was prepared with encapsulated liposomes for topical application.

Materials

Chemicals that were used; sodium chloride (NaCl) and calcium chloride dihydrated (CaCl₂·2H₂O) from Riedel-de Haën, Tris-base (C₄H₁₁N₃O₃) and ammonium sulfate (NH₄SO₄) from Sigma-Aldrich, phosphatidylcholine (H3C-(CH₂)₁₄-COOH) (from soybean), cholesterol (C₂₇H₄₆O) (from lanolin) and tributyrin from Fluka-Biochemika, acetone (C₃H₆O) and chloroform (CHCl₃) from Tekkim. Triton X-100 that was used, was anatically purity. Oat (*Avena sativa* L.) was purchased from local markets.



Cellulite

Conclusion

The graph of volumetric activity, total activity and specific activity values are shown in Table 1. The activity values after liposome encapsulation are shown in Table 2. The stability values of relative activity after liposome encapsulation are shown in Figure 1. Briefly, it is shown that liposomes are more stable at +4 °C as the study of Bozkir and Kocyiğit (1995).



Topical preparation

	Volumetric activity (U/ml)	Total activity (Unit)	Specific activity (U/mg)	Protein concentrations (mg/ml)
Homogenate	4.7	579	4.95	0.93
Ammonium sulfate precipitation (%80)	12.8	256	19.7	0.63
Acetone precipitation (%20)	4.33	86.6	12.37	0.35

Chart 1. Activity and protein concentration measurements of lipase

Preparation of liposomes	Volumetric activity (U/ml)
After ammonium sulfate precipitation	3.34
After acetone precipitation	3.36

Graph 2. Activity measurements after the encapsulation of lipases in liposomes

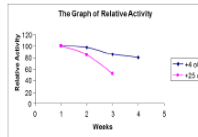


Figure 1. Relative activity measurements after stability tests.

The Partially Purification of Lipase Enzyme

For homogenization of oat, buffer contains 10 mM Tris-base, 1 mM CaCl₂, 0.1 M NaCl and 0.1% Triton X-100 (pH 7.4). 10 g oat was homogenized in 125 ml cold buffer for 30 minutes. Homogenate was centrifugated at +4 °C, 9000 rpm for 30 minutes. Then, supernatant was precipitated with 80% ammonium sulfate. After that, precipitated was centrifugated at +4 °C, 9000 rpm for 45 minutes. The pellets were resuspended with the homogenization buffer (not contained Triton X-100). Next, it was precipitated with 20% acetone to remove oil that was came from oats.

Liposome Encapsulation Method Dehydration-Rehydration Method

Liposome encapsulation was made by rehydration-dehydration method with using phosphatidylcholine (lecithin) and cholesterol (2:1, w/w). Sonication bath was used for liposome encapsulation. Phosphatidylcholine and cholesterol (10 mg) were suspended in 0.5 ml chloroform and then lipid film was prepared under nitrogen. Lipid film was rehydrated by 0.5 ml trisma buffer that contains lipase enzymes.

References

- Mohamed, Saleh A., et al. "Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite." *Process Biochemistry* 46.3 (2011): 642-648.
- Sahasrabudhe, M. R. "Measurement of lipase activity in single grains of oat (*Avena sativa* L.)." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 59.8 (1982): 354-355.
- Martí, Meritxell, et al. "Laccases stabilization with phosphatidylcholine liposomes." *Journal of Biophysical Chemistry* 3.1 (2012): 81-87.
- BOZKIR, Asuman, and Saadet KOÇYİĞİT. "Lipozomların Fiziksel Ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi An Investigation of Physical And Chemical Stabilities On Liposomes."

Preparation of Topical Formulation and Stability Tests

For topical preparation, %99 purity glycerine was used. Glycerine and liposome (2:1, v/v) were mixed together by homogenization for 30 minutes.

Normally, there are no procedures for liposome stability tests. In this study, liposomes were standed at +4 °C for one month. Briefly it is possible to say that, lipase encapsulated liposome system is promising for the treatment of cellulite.



This project was carried out as the final graduation project and was supported by TUBITAK BİDEB 2209/A.

Thanks to Specialist Taylan ÖZTÜRK and Research Assistant Dr. Funda KARTAL, for their support.