



**ÜÇ BOYUTLU BİYOSARGI GELİŞTİRİLMESİ İÇİN KOLAJEN VE  
DOPA'NIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Halil İbrahim AKBAŞ**

**Eskişehir, 2018**

**ÜÇ BOYUTLU BİYOSARGI GELİŞTİRİLMESİ İÇİN KOLAJEN VE  
DOPA'NIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ**

**Halil İbrahim AKBAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**

**Eskişehir  
Eskişehir Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Aralık, 2018**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Halil İbrahim AKBAŞ**'ın “**Üç Boyutlu Biyosargı Geliştirilmesi İçin Kolajen Ve Dopa'nın Biyoteknolojik Üretimi**” başlıklı tezi **25/12/2018** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

|                     | <u>Unvanı Adı Soyadı</u>        | <u>İmza</u> |
|---------------------|---------------------------------|-------------|
| Üye (Tez Danışmanı) | : Prof. Dr. Arzu ERSÖZ          | .....       |
| Üye                 | : Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK | .....       |
| Üye                 | : Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER   | .....       |

**Prof. Dr. Ersin YÜCEL**

**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## ÖZET

### Üç Boyutlu Biyosargı Geliştirilmesi İçin Kolajen ve Dopa'nın Biyoteknolojik Üretimi

Halil İbrahim AKBAŞ

İleri Teknoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aralık, 2018

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Yara iyileşmesi birbirinden farklı hücreler, hormonlar ve büyüme faktörlerinin rol aldığı karmaşık bir olaydır. Son yıllarda, aljinat, kolajen, kitosan vb. içeren birçok yara sargısı ticari olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada kolajen tabanlı yara iyileşmesine katkıda bulunacak MADOPA içeren hidrojel geliştirilmiştir. Hidrojelde kullanılacak kolajen, koyun derisinden pepsin ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiş, Sirius red miktar tayini, Uv-vis spektroskopisi, CD spektroskopisi, SDS-page ve FT-IR-ATR ile karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Hidrojinin diğer yapı taşı olan MADOPA üretimi için, kültür Mantarından (*Agaricus Bisporus*) tirozinaz enzimi ekstraksiyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve sephadex g-75 jel filtrasyon ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda karakterizasyonlar, FT-IR, SDS-page, BCA miktar tayini, tirozinaz aktivite tayini şeklinde yapılmıştır. Çalışmamızdaki üçüncü basamak poli (HEMA-MAH-Cu(II) kriyojel kolon kullanarak immobilize tirozinaz sistemi geliştirmektir. Elde edilen kolonun karakterizasyonu şişme testi, FT-IR, SEM ve kolon verimi ile karakterize edilmiştir. Dördüncü basamak MAT'ın MADOPA'ya dönüşmesidir. Bu basamakta immobilize ve serbest enzimin aktivite farkları son ürün MADOPA'ya bakarak karşılaştırılmıştır. Son basamak olarak yara sargısı olarak kullanılacak Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipyridyl)<sub>2</sub>-Cl hidrojel sargı 3B biyoyazıcı ile geliştirilmiştir. Bu materyal, biyobozunabilir, biyoyumlu ve non-toksiktir.

**Anahtar Sözcükler:** Hidrojel, 3B biyoyazıcı, Kolajen, DOPA, Yara Sargısı, Tirozinaz, Kriyojel

## ABSTRACT

Biotechnological Production of Collagen and Dopa for Development of Three-Dimensional Wound Dressing

Halil İbrahim AKBAŞ

Department of Biology

Eskişehir Technical University, Graduate School of Sciences, November, 2018

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Wound healing complicated process including different cells, hormones and growth factors. In last decades, There has been a lot of commercial products about the wound dressing including, alginate, collagen, chitosan etc. In this study, MADOPA-containing hydrogel was developed to contribute collagen-based wound healing. Collagen was isolated from the sheep skin by pepsin extraction method and characterized with Sirius red quantification, Uv-vis spectroscopy, CD spectroscopy, SDS-page and FT-IR-ATR. Tyrosinase enzyme from edible mushroom (*agaricus bisporus*) was partially purified by extraction, ammonium sulfate precipitation and sephadex g-75 gel filtration for the production of MADOPA, which is the other composition of hydrogel. Characterization of tyrosinase was performed with FT-IR, SDS-page, BCA quantification and tyrosinase activity determination. Third part of the working is development of immobilise tyrosinase system with poly (HEMA-MAH-Cu (II) cryogel column. Swelling test, FT-IR, SEM monitoring and yield of the column was performed for characterization. Transformation of MAT to MADOPA is the fourth part of the working. In this step, differences between free and immobilise enzyme was compared with the production of MADOPA. Final part of working was production of collagen-co-DOPA-co-MATrp-Ru(bipyridyl)<sub>2</sub>-Cl with 3D hydrogel for wound dressing. This material is biodegradable, biocompatible and non-toxic.

**Anahtar Sözcükler:** Hydrogel, 3D bioprinter, Collagen, DOPA, Wound Dressing, Tyrosinase, Cryogel

## TEŞEKKÜR

Tüm tez çalışmam boyunca sabrı, bilgisi ile bana yol gösteren danışmanım Prof.Dr. Arzu ERSÖZ'e

Eğitimim boyunca bilgisi ve bakış açısı ile nasıl bilim yapılması gerektiğini bize gösteren, tezimin şekillenmesinde katkı sağlayan ve her zaman bir baba gibi yanımda olan Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Deneysel çalışmalarım sırasında, hiçbir zaman benden yardımımı esirgemeyen Prof. Dr. Deniz HÜR'e, Doç. Dr. Ayça ÖZCAN'a, Doç. Dr. Filiz YILMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER'e,

3B biyoyazıcı çalışmalarında her zaman yanımda olan ve çalışmalarına yardımcı olan Doç.Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ ve Semra ÖZGÜN KÖSE'e

Tüm yüksek lisans hayatım boyunca kahrımı çeken, bana hep destek olan, birlikte deney yapmayı ve eğlenmeyi sevdiğim sevgili arkadaşlarım Meltem KARAHAN ve Yağmur ALEV'e

Benden önce mezun olarak aramızdan ayrılan, her zaman dost kalacağım canım arkadaşlarım Ayça BAKIR, Derya KARAASLAN ve Sercan GÜZEL'e

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım, tüm tez çalışmalarım boyunca gerek bilgisi gerek yardımseverliği ile yanımda olan canım arkadaşım, abim ve meslektaşım Arş. Gör. Umut ÇELİKOĞLU'a

8 yıldır hayatımın her anında yanımda olan, bilgisiyle ve sevgisiyle hayatıma ışık tutan, her anımı anlamlı kılan, yüzümü güldüren Selin ÇİM'e

Bu zamana kadar her zaman arkamda olan, maddi manevi beni destekleyen ve benimle gurur duyan canım annem Sabiha AKBAŞ'a ve kardeşim Samet AKBAŞ'a

Acısını ve eksikliğini hala kalbimde hissettiğim, yazdığım bu tezin gerçek sahibi babam İrfan AKBAŞ'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Halil İbrahim AKBAŞ

25/12/2018

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Halil İbrahim AKBAŞ

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| BAŞLIK SAYFASI.....  | i    |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....   | ii   |
| ÖZET.....  | iii  |
| ABSTRACT.....  | iv   |
| TEŞEKKÜR.....  | v    |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....                   | vi   |
| İÇİNDEKİLER.....   | vii  |
| TABLolar DİZİNİ.....   | xii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | xiii |
| GÖRSELLER DİZİNİ.....  | xiv  |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                   | xv   |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 1.1. Deri.....   | 1    |
| 1.1.1. Epidermis.....  | 3    |
| 1.1.2. Dermis.....   | 3    |
| 1.1.3. Hipodermis.....   | 3    |
| 1.2. Yara İyileşmesi.....  | 4    |
| 1.2.1. Hemostaz.....   | 4    |
| 1.2.2. Enflamasyon.....  | 4    |
| 1.2.3. Proliferasyon ve onarım.....                                | 5    |
| 1.2.4. Remodelizasyon.....   | 6    |
| 1.3. Yara Eksüdasyonu.....   | 6    |
| 1.4. Yara Sargısında Kullanılan Materyaller ve Tarihçeleri.....    | 7    |
| 1.5. İdeal Bir Sargı Materyalindeki Olması Gereken Özellikler..... | 8    |
| 1.6. Yara Sargılarının Sınıflandırılması.....                      | 8    |



|  |    |
|--|----|
| 1.6.1. Geleneksel yara sargıları.....                                    | 8  |
| 1.6.2. Modern yara sargıları.....  | 9  |
| 1.6.2.1. <i>Hidrojel sargılama</i> .....                                 | 9  |
| 1.6.2.2. <i>Aljinat sargılama</i> .....                                  | 10 |
| 1.6.2.3. <i>Köpük sargılama</i> .....                                    | 11 |
| 1.6.2.4. <i>Hidrokolloid sargılama</i> .....                             | 11 |
| 1.6.2.5. <i>Hidrofiber sargılama</i> .....                               | 12 |
| 1.6.2.6. <i>Yarı-geçirgen film sargılar</i> .....                        | 12 |
| 1.6.3. Biyoaktif sargılar.....   | 13 |
| 1.7. Kolajen.....  | 13 |
| 1.7.1. Kolajenin yapısı.....   | 14 |
| 1.7.2. Kolajen ailesi.....   | 14 |
| 1.8. Tirozinaz.....  | 15 |
| 1.8.1. Mantar tirozinaz.....   | 16 |
| 1.9. Üç Boyutlu (3B) Biyoyazıcı ve Yara İyileşmesi.....                  | 17 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM.....  | 19 |
| 2.1. Gereçler.....   | 19 |
| 2.2. Yöntem.....   | 19 |
| 2.2.1. Kolajen izolasyonu.....   | 19 |
| 2.2.1.1. <i>Koyun derisinin hazırlanması</i> .....                       | 20 |
| 2.2.1.2. <i>Kolajen olmayan dokunun ortamdaki uzaklaştırılması</i> ..... | 20 |
| 2.2.1.3. <i>Kolajen ekstraksiyonu</i> .....                              | 20 |
| 2.2.1.4. <i>Kolajenin santrifüjlenmesi ve çöktürülmesi</i> .....         | 20 |
| 2.2.1.5. <i>Tuzun uzaklaştırılması</i> .....                             | 21 |
| 2.2.2. Kolajen karakterizasyonu.....                                     | 21 |
| 2.2.2.1. <i>Sirius red kolajen miktar tayini</i> .....                   | 21 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.2.2. FTIR-ATR analizi .....                                  | 22 |
| 2.2.2.3. Uv-vis spektroskopisi .....                             | 22 |
| 2.2.2.4. Farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlük testi ..... | 22 |
| 2.2.2.5. CD spektrum analizi.....                                | 22 |
| 2.2.2.6. SDS-PAGE jel elektroforezi .....                        | 23 |
| 2.2.3. Tirozinaz kısmi saflaştırılması .....                     | 24 |
| 2.2.3.1. Mantar ekstraksiyonu .....                              | 24 |
| 2.2.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi .....                         | 24 |
| 2.2.3.3. Sephadex g-75 kolon ile tuz uzaklaştırılması .....      | 25 |
| 2.2.3.4. Tirozinaz miktar tayini .....                           | 25 |
| 2.2.3.5. Tirozinaz aktivite tayini.....                          | 26 |
| 2.2.3.6. SDS-PAGE jel elektroforezi .....                        | 26 |
| 2.2.4. İmmobilize tirozinaz kolon geliştirme .....               | 27 |
| 2.2.4.1. N-metakriloil-L-Histidin sentezi (MAH) .....            | 27 |
| 2.2.4.2. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerinin sentezlenmesi .....      | 27 |
| 2.2.4.3. Poli (HEMA-MAH-Cu (II)) kolonun hazırlanması .....      | 28 |
| 2.2.4.4. Kriyojel kolonların karakterizasyonu .....              | 28 |
| 2.2.4.5. Şişme testi.....  | 28 |
| 2.2.4.6. SEM analizi .....                                       | 29 |
| 2.2.4.7. FT-IR analizi .....                                     | 29 |
| 2.2.4.8. Tirozinaz immobilizasyonu .....                         | 29 |
| 2.2.5. DOPA dönüşümü .....                                       | 29 |
| 2.2.5.1. DOPA standart grafiği.....                              | 29 |
| 2.2.5.2. Serbest enzim ile DOPA dönüşümünün ölçülmesi .....      | 30 |
| 2.2.5.3. Serbest enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi .....    | 30 |
| 2.2.5.4. İmmobilize enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi ..... | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.6. Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipy <sub>2</sub> -Cl 3B hidrojel sargı geliştirilmesi..... | 31 |
| 2.2.6.1. <i>Geliştirilen biyo-mürekkep ile 3B biyo-yazım işlemi</i> .....                      | 31 |
| 3. BULGULAR .....  | 33 |
| 3.1. Kolajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....   | 33 |
| 3.1.1. Sirius red ile kolajen miktar tayini.....   | 34 |
| 3.1.2. FT-IR-ATR .....   | 35 |
| 3.1.3. Uv-Vis spektroskopisi.....  | 35 |
| 3.1.4. Farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlük testi .....                                 | 36 |
| 3.1.5. CD spektrum analizi .....   | 37 |
| 3.1.6. SDS Page .....  | 38 |
| 3.2. Kısmı Tirozinaz Saflaştırılması.....  | 38 |
| 3.2.1. Mantar ekstraksiyonu.....   | 38 |
| 3.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....  | 39 |
| 3.2.3. Sephadex g-75 kromatografisi .....  | 39 |
| 3.2.4. Tirozinaz aktivite tayini .....   | 40 |
| 3.3. İmmobilize Tirozinaz Kolonu .....   | 42 |
| 3.3.1. Şişme testi .....   | 43 |
| 3.3.2. SEM ile yüzey morfolojisi analizi .....   | 43 |
| 3.3.3. FT-IR .....   | 44 |
| 3.4. Tirozinaz İmmobilizasyonu.....  | 44 |
| 3.5. DOPA dönüşümü .....   | 46 |
| 3.5.1. DOPA standart grafiği .....   | 46 |
| 3.5.2. Serbest enzim ile DOPA dönüşümünün ölçülmesi.....                                       | 47 |
| 3.5.3. Serbest enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi .....                                    | 47 |
| 3.5.4. İmmobilize enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi.....                                  | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 3.6. 3B Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipy <sub>2</sub> -Cl Hidrojel Sargı..... | 49 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....   | 50 |
| KAYNAKÇA .....  | 54 |
| ÖZGEÇMİŞ  |    |



## TABLolar DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 1. 1</b> Kolajen Ailesi Üyeleri.....                               | 15 |
| <b>Tablo 1. 2.</b> Çeşitli biyo-yazıcı teknolojileri .....                  | 17 |
| <b>Tablo 2. 1.</b> Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler listesi.....      | 19 |
| <b>Tablo 2. 2.</b> Kolajen için kullanılan SDS-page jelinin içeriği.....    | 23 |
| <b>Tablo 2. 3.</b> Reaksiyon karışımı .....                                 | 26 |
| <b>Tablo 2. 4.</b> Tirozinaz için kullanılan SDS-page jelinin içeriği ..... | 27 |
| <b>Tablo 2. 5.</b> 3B biyo- yazıcıda kullanılan parametreler .....          | 32 |
| <b>Tablo 3. 1.</b> Tirozinaz saflaştırma karşılaştırması .....              | 41 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1. Doku onarımının şematik gösterimi.....   | 5  |
| Şekil 1.2. Kolajen üçlü sarmalın genel yapısı. (a) Üçlü sarmalın kristal yapısı. (b) Top çubuk modeli ile dönüş açısının gösterilmesi. (c) Her bir birimdeki hidrojen bağları. .... | 14 |
| Şekil 1.3. Tirozinin son ürün melanine kadar dönüşümü.....  | 16 |
| Şekil 3. 1. Tuz giderme grafiği.....  | 34 |
| Şekil 3. 2. Sirius Red Standart Grafiği.....  | 34 |
| Şekil 3. 3. Kolajen FT-IR Spektrumu .....   | 35 |
| Şekil 3. 4. Kolajenin Uv-Vis Spektroskopisi .....   | 36 |
| Şekil 3. 5. Kolajenin çözünürlüğüne pH'ın etkisi .....  | 36 |
| Şekil 3. 6. Kolajenin çözünürlüğüne NaCl derişiminin etkisi.....  | 37 |
| Şekil 3. 7. Kolajenin CD Spektrumu.....   | 37 |
| Şekil 3. 8. BSA Standart Grafiği.....   | 39 |
| Şekil 3. 9. İletkenlik absorbands grafiği.....  | 40 |
| Şekil 3. 10. Tirozinazın ham özüt aktivitesi.....   | 41 |
| Şekil 3. 11. Tirozinazın amonyum sülfat sonrası aktivitesi .....  | 42 |
| Şekil 3. 12. Tirozinazın Sephadex G-75 Sonrası aktivitesi.....  | 42 |
| Şekil 3.13. Poli(HEMA), poli(HEMA-MAH) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarına ait FT-IR analiz sonuçları .....  | 44 |
| Şekil 3. 14. Zamana Bağlı Tirozinaz Aktivite Grafiği .....  | 45 |
| Şekil 3.15. Zamana Bağlı Kolon Tutma Kapasitesi.....  | 46 |
| Şekil 3.16. L-DOPA Standart Grafiği .....   | 46 |
| Şekil 3. 17. Serbest Tirozinaz/L-DOPA Dönüşümü .....  | 47 |
| Şekil 3. 18. Serbest Tirozinaz/MADOPA Dönüşümü .....  | 48 |
| Şekil 3. 19. İmmobilize Tirozinaz Kolon/MADOPA Dönüşümü.....  | 48 |
| Şekil 3. 20. Optik Mikroskop altında 3B doku iskeletinin görüntüsü.....   | 49 |

## GÖRSELLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Görsel 2. 1.</b> Poli(HEMA-MAH-Cu(II) Kolon .....                                      | 28 |
| <b>Görsel 2. 2.</b> Çeşitli derişimlerde L-DOPA standardı .....                           | 30 |
| <b>Görsel 3. 1.</b> Saflaştırma işleminden sonra kolajen çözeltisi .....                  | 33 |
| <b>Görsel 3. 2.</b> Kollajen SDS-page Görüntüsü .....                                     | 38 |
| <b>Görsel 3. 3.</b> Sephadex G-75 kolon.....  | 40 |
| <b>Görsel 3. 4.</b> Poli (HEMA-MAH) ve Poli (HEMA-MAH-Cu(II) kolun.....                   | 43 |
| <b>Görsel 3.5.</b> Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarının SEM görüntüleri ..... | 44 |



## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                       |  |
|-----------------------|--|
| °C:                   | Santigrat  |
| BSA:                  | Bovine Serum Albumin   |
| DNA:                  | Deoksiribonükleotit  |
| mg:                   | Mikrogram  |
| µl:                   | Mikrolitre   |
| L:                    | Litre  |
| mL:                   | Mililitre  |
| 3B:                   | Üç boyutlu   |
| dak.:                 | Dakika   |
| FT-IR:                | Fourier Dönüşüm Kızılötesi   |
| SEM:                  | Taramalı Elektron Mikroskobu   |
| L-DOPA:               | 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin   |
| MAH:                  | N-metakriloil-L-Histidin   |
| ANADOLUCA:            | AmiNoAsit monomer dekore edilmiş Rutenyum şelatlarının ışık etkili konjugasyon yaklaşımı |
| APS:                  | Amonyum Persülfat  |
| HEMA:                 | Hidroksietil Metakrilat  |
| SEM:                  | Taramalı Elektron Mikroskobu   |
| TEMED:                | Tetraetil Metilendiamin  |
| MAT:                  | N-metakriloil-L-Tirozin  |
| CD:                   | Dairesel dikroizm  |
| SDS-page elektroforez | Sodyumdedosilsülfat-poliakrilamidjel elektroforezi                                       |



## 1. GİRİŞ

Her yıl dünya çapında milyonlarca insan hem akut hem de kronik cilt yaralanmaları yaşar. kronik yaralardan muzdarip olan insanların tahmini sayısı yılda 37 milyon civarındadır (Wild vd., 2010). Bu durum sadece bireysel bazda etki göstermez aynı zamanda ülkelerin ekonomisini de etkilemektedir. Amerika sadece tedavisi olmayan kronik yaralar için deri sağlığı ile ilgili ayrılan bütçenin üçte birini kullanmaktadır.

Geçtiğimiz elli yılda, yara tedavisi, optimum bir iyileşme süreci için yara yatağını kurutmak yerine dengeli bir nemli ortamın gerekli olduğunun farkına vardı. Ana görevleri yara eksüdasını emmek olan ve genellikle yara bölgesinde kabuk oluşturan dikkat çekici bir iz bırakan geleneksel yara sargıları yerlerini eksüdanın aşırı birikmesini engelleyen, belirli derecede nem oluşturan ve yeni deri oluşumunu yara izi olmadan sağlayan modern sargılara bırakmıştır (Cutting, 2010).

Her ne kadar aktif farmasötik bileşenler içeren ürünler de dahil olmak üzere çeşitli tipte yara sargıları mevcut olsada ideal yara sargısı mevcut değildir. Çünkü tek bir sargı, yara iyileşmesini desteklemek için gerekli olan tüm özelliklere sahip değildir. Bu özellikler, nem dengesini koruma, patojenlere karşı bariyer olarak davranma, enfeksiyonu önleme, su değişimi, buhar ve gazları kullanma, uygulama ve çıkarmayla ilgili olarak kullanımı kolay, sık değişiklik gerektirmeyen, ağrıyı rahatlatma ve koku kontrolünü sağlama yeteneği olmasıdır (Seaman, 2002). Uygun bir yara sargısı seçmek için, yara tipini ve dokunun durumunu, hastanın aktivite düzeyini ve kişisel ihtiyaçlarını dikkate almak gerekir. Seçilen sargının verimi altta yatan hastalıkların varlığı, beslenme durumu, yara eksüdası miktarı ve yaranın mikroflorası gibi çeşitli faktörlerden etkilenecektir (Fonder vd., 2008).

Bu çalışmada hidrojellerin yukarıda sayılan avantajları ve üç boyutlu (3B) biyoyazım işleminin avantajları (3D bioprinting) birleştirilerek ve tez kapsamında sentezlenen biyomoleküllerle hazırlanan biyomürekkep entegrasyonu sağlanarak nihai 3B hidrojel sargı geliştirilmesi amaçlanmış olup, ekstraselüler matrikste bulunan kolajenleri ve bu kolajenlerde yer alan tirozin aminasitler ve 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) üzerinden örgülenecek çoklu bir çapraz bağlanma işlemi eşliğinde optimize biyomürekkebin 3B biyoyazım işlemi ve in situ çapraz bağlanma sonucu hazırlanan 3B biyosargı hidrojel üretimi hedeflenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kolajen hidrojellerin hücre sinyaline katıldığı ve ekstraselüler matriksi düzenlediği gösterilmiştir. Kolajenin üçlü yapısı integrinler, Diskoidin Domain Reseptörleri, Mannoze reseptörleri ve osteoblast reseptörleri ile etkileşime girerek adezyon, profereleşme ve hücre göçü gibi hücreler arası olayları düzenler. Fakat hücreler pasif sinyal tanıma yolu ile hidrojel yüzeyine yapışmasına rağmen, kolajen hidrojelleri hala istenilen hücre adezyon talebini karşılayamamaktadır (Zhu vd., 2016).

Biyoyazıcıda tez kapsamında ürettiğimiz biyomürekkeple yazdırılan 3B hidrojel sargıda; geometrisi ve aralarındaki boşluklar çok iyi biyoyazdırılmış nefes alabilen, besin geçişine uygun, bakteri üretmeyen bir 3B sargının yanı sıra sargıdaki moleküller arası çapraz bağların doğal ekstraselüler matrikse mimik etmesi amacıyla i) kolajenin tirozinleri ile fotoduyarlı başlatıcıdaki tirozin arasında ii) kolajendeki tirozinlerle N-metakriloil-L-fenilalanin (MADOPA) arasında iii) kolajendeki tirozin ile fotoduyarlı başlatıcı molekülü arasında ve iv) MADOPA ile fotoduyarlı başlatıcıdaki tirozin arasında farklı esneklikte çapraz bağların oda sıcaklığında ve gün ışığında ANADOLUCA çapraz bağlama metodu yoluyla (SAY vd., 2011) elastin ve proteoglikanlar kullanmadan sadece saflaştırdığımız kolajen proteini üzerinde 3B biyoyazdırılmasının yolunu açmış bulunmaktayız.

Ayrıca Hidrojel içerisinde bulunan MADOPA ile Mussel Adhesive proteinini taklit eden, hücreler için ıslak ortamda bile maksimum yapışma sağlayacak ortam oluşturan biyobozunabilir, biyouyumlu ve toksik olmayan bir yara sargısı oluşturmayı amaçlamaktayız.

### **1.1. Deri**

Deri, toplam yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturan vücudun en büyük organıdır. Canlıyı dışarıdan gelen fiziksel, kimyasal ve biyolojik saldırılara karşı korunmasının yanı sıra vücudun aşırı su kaybının önlenmesi ve termoregülasyon olarak adlandırılan vücut sıcaklığının düzenlenmesi gibi birçok hayati işlevi yerine getirir. Derinin köken, görev ve anatomik özellikleri incelendiğinde epidermis, dermis ve hipodermis olarak adlandırılan üç katmandan oluştuğu görülmektedir. (Venus, Waterman, & McNab, 2011).

### **1.1.1. Epidermis**

Epidermis derinin en dış kısmında bulunan tabakadır. Bu nedenle dışarıdan gelen etmenlere karşı canlının ilk bariyeri konumundadır. Kalınlığı vücutta bulunduğu bölgeye bağlı olarak değişiklik gösterebilir ve yaklaşık 0.05-1 mm kalınlığındadır. Epidermiste keratinositler, melanositler ve Langerhans (Merkel) hücreleri olmak üzere üç ana tip hücre bulunmaktadır. Keratinositler, sürekli olarak bazal laminada üretilen ve olgunlaşma, farklılaşma ve yüzeye doğru göç süreçlerinden geçen, epidermiste baskın hücrelerdir. Keratinositler farklılaştıkça, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum corneum olarak bilinen taban tabakasının üzerinde üç katman oluştururlar (Honari & Maibach, 2014).

Melanositler, esas olarak bazal katmanda bulunan, nöral krest türevli, pigment sentezleyen dendritik hücrelerdir. Melanositler, melanin pigmentinin üretiminden ve keratinositlere transferinden sorumludurlar (Honari & Maibach, 2014; Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011).

Langerhans hücreleri deride immünolojik savunmanın ilk hattını oluştururlar. Bu hücreler kemik iliğinden türetilir ve total epidermisin %2 ile %8'i arasında bulunur. Son olarak epidermiste bulunan özel bir hücre tipi olan Merkel hücreleri, vücudun parmak ucu gibi yüksek dokunma duyarlılık bölgelerinde yer alan ve bazal keratinositlere bağlı olarak bulunan, oval şekilli, mekanoreseptörlerdir (Albanna vd., 2016).

### **1.1.2. Dermis**

Dermis, kalın, lifli ve elastik olan (çoğunlukla kolajen, elastin ve fibrillin olmak üzere) epidermisin altında bulunan tabakadır ve cilde esnekliğini ve gücünü verir. Epidermisi korur ve sinir uçlarını, ter bezlerini, yağ bezlerini, saç köklerini ve kan damarlarını içerir. Fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve dolaşımdaki bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipi dermiste bulunur. Dermis, cildin esnekliğinden, bükülebilirliğinden ve gerilme direncinden sorumludur ve mekanik hasara karşı koruma sağlar, suyu düzenler ve termal düzenlemede yardımcı olur. Ayrıca dermis, yara iyileşmesinde önemli rol oynar (Honari & Maibach, 2014; Sharma & Paul, 2015).

### **1.1.3. Hipodermis**

Cildin en alt tabakası deri altı yağ tabakasıdır ve aynı zamanda "cildin altında" anlamına gelen "hipodermis" olarak da adlandırılır. Gevşek bağ dokusu, elastin ve

fibroblastlar, makrofajlar ve adipositler gibi hücrelerden oluşur. Vücuttaki adipositlerin %50'lik kısmını içeren bu tabaka; damarlar, sinir hücreleri ve kolajen içeren septa adı verilen özel bir bağ dokusu ile dermisi kaslara ve kemiklere bağlayarak doku bütünlüğünü sağlamada önemli bir rol oynar. Vücut ısısının düzenlenmesinde (termoregülasyon) görev yapan bu doku vücut homeostaziyle sağlamada da görev yapmış olur. Bu görevlerin yanısıra, leptin adı verilen bir hormon üretimini sağlayarak vücut ağırlığını düzenlenmesine de katkıda bulunur (Sharma & Paul, 2015).

## **1.2. Yara İyileşmesi**

Yara iyileşmesi, yaralanmadan hemen sonrasında başlayan ve dokudaki yaranın giderilmesini sağlayacak bir takım fizyolojik cevaplar ile devam eden sistemik bir süreçtir (Phillips, 2000). Genel olarak 4 ana basamaktan oluşur (Şekil 1). İlk aşama, hemostaz, hemen yaralanma anında meydana gelir ve genellikle saatler içinde tamamlanır. İkinci aşama, enflamasyon, hemostaz başladıktan kısa bir süre sonra başlar ve genellikle yaralanmadan sonra ilk 24 ila 72 saat içinde tamamlanır. Üçüncü aşama olan proliferasyon ve onarım tipik olarak yaralanmadan 1 ila 3 hafta sonra ortaya çıkar. Dördüncü ve son aşama olan remodelizasyon, yaralanmadan yaklaşık 3 hafta sonra başlar ve fizyolojik tamamlanma elde etmek için aylar ya da bir kaç yıl gerekebilir (Strodtbeck, 2001).

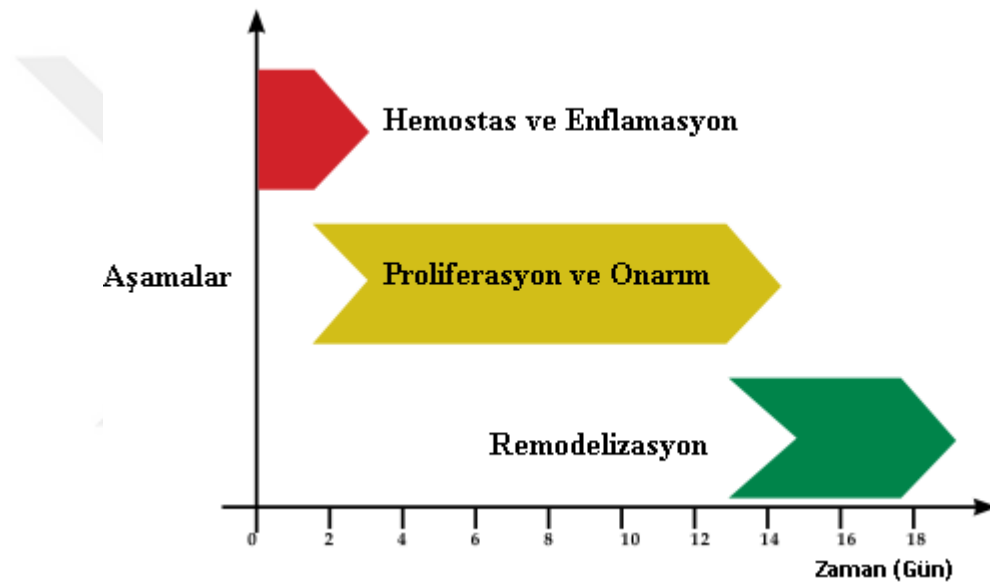
### **1.2.1. Hemostaz**

Hemostaz, kan pıhtılaşmasını tetikleyen bir fibrin ve trombosit tıkaçı aracılığıyla gerçekleşir. Endotel hücrelerinin hasar görmesi sonucunda ortaya çıkan kolajen, trombositlerin aktivasyon, adhezyon ve agregasyona maruz kalmasına neden olur. Trombositler trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ )'yı da içeren kemotaktik faktörler üretirler. Bu büyüme faktörleri, enflamatuar ve proliferatif fazlar için gerekli olan makrofajları, nötrofilleri, fibroblastları, endotelial hücreleri ve düz kas hücrelerini kendilerine çekerler. Trombosit dokusundaki fibrinojenden türetilen fibrin, gelen makrofajlar ve fibroblastlar için bir matris görevi görür (Morton & Phillips, 2016).

### **1.2.2. Enflamasyon**

Enflamasyon basamağı travma gerçekleştikten sonra dakikalar içerisinde nötrofillerin endotelial hücreye yapışması ile başlar. Nötrofiller bakterilerin fagositozunu,

matriks proteinlerinin degregasyonu ve diğer makrofaj ve nötrofillerinin kendilerine doğru çekilme olayını ekstraselüler boşlukta gerçekleştirirler ve bu boşluğa göçü kolaylaştırmak için elastaz ve kolajenaz kullanırlar. Makrofajlar akut iyileşme sürecindeki en önemli hücrelerdir Patojenik organizmaları parçalarlar ve granülizasyon doku gelişimi ve angiogenesisi uyarırlar. Makrofaj büyüme faktörleri arasında PDGF, TGF- $\beta$ , fibroblast büyüme faktörü, interlökin-1, interlökin-6 ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  bulunmaktadır. TGF- $\beta$ , özellikle makrofajların uyarılması ve fibroblast fonksiyonunun, kemotaksisin ve kolajen birikmesinin uyarılması açısından önemlidir (Singh, Young, & McNaught, 2017).



Şekil 1.1. Doku onarımının şematik gösterimi

### 1.2.3. Proliferasyon ve onarım

Proliferatif faz 4 ila 21. gün arasında ortaya çıkar ve karakteristik olarak anjiyogenez, hücre dışı matris (ECM) oluşumu ve epitelizasyon görülür. ECM oluşumu trombosit degranülasyonu ile başlar, çünkü PDGF proteoglikan ve kolajen oluşumu için bir promotör görevi görür. Fibroblastlar PDGF uyarılarına cevap verip kolajen üretmenin yanısıra yara kontraksyonunu uyarmak için miyofibroblastlara dönüşürler. Fibroblastlar ayrıca keratinositlerden epitelizasyonu uyaran keratinosit büyüme faktörünü (KGF) salgırlar ve endotel hücreleri vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörünü oluşturarak kan damarlarının içe büyümesini uyarırlar. Normal yara iyileşmesi fizyolojisinin bir ayırt edici özelliği, yaklaşık 21 gün sonunda

kolajen birikiminin maksimuma gelmesi ve birikimin durdurulmasıdır (Childs & Murthy, 2017).

#### **1.2.4. Remodelizasyon**

Yara onarımının son aşaması olan yeniden modelleme yaralanmadan yaklaşık olarak 3 hafta sonra başlar ve bir yıl veya daha uzun sürer. Bu aşamada, yaralanmadan sonra harekete geçirilen tüm süreçler azalır ve sona erer. Endotelial hücrelerin, makrofajların ve miyofibroblastların çoğu, apoptosise (yani, programlanmış hücre ölümüne) uğrar veya yaradan uzaklaşır ve yerlerini birkaç hücre içeren ve çoğunlukla kolajen ve diğer hücre dışı matriks proteinlerinden oluşan bir kütleyle bırakır. Epitelial-mezenkimal etkileşimler muhtemelen cilt bütünlüğünü ve homeostazı sürekli olarak düzenler ve ciltte diğer hücre tiplerini korumak için geri bildirim döngüleri oluştururlar. 6-12 ay süresince aselüler matriks, Kolajen tip III'den baskın olan Kolajen tip I'e tekrar şekillenir. Bu işlem fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından salgılanan matriks metalloproteinazlar tarafından gerçekleştirilir ve tamir edilen dokuları güçlendirir (Gurtner vd., 2008).

#### **1.3. Yara Eksüdasyonu**

Yara iyileşmesi sıklıkla yara iyileşmesinin tüm aşamalarında önemli rol oynayan yara eksüdasyonuna yol açar. Yara sıvısının hacmi ve içeriği, yaranın iyileşme potansiyeli ile ilişkilidir. Yüksek miktarda yara eksüdası mikrobiyal büyümeye ve dolayısıyla enfeksiyona neden olabilir. Ayrıca aşırı yara eksüdası derinin maserasyonuna yol açabilir. Yara eksüdasının fizyokimyasal özellikleri yaranın akut mu yoksa kronik mi olduğunu gösterir ve yarada bulunan bakteri seviyesi hakkında bilgi verir. Akut yaralarda bulunan yara sıvısı, normal seviyede proinflamatuvar sitokinler, matriks metalloproteinazlar, metalloproteinazların doku inhibitörleri ve büyüme faktörleri ile karakterize edilirken, kronik yaralar yüksek miktarda proinflamatuvar sitokinler ve matriks metalloproteinazlar ve düşük seviyede metalloproteinazların doku inhibitörleri ve büyüme faktörleri ile karakterize edilir. Enfekte olmuş yaralarda organizmaların neden olduğu kokulu ve iltihaplı bir eksüda bulunur. Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı, yara iyileşmesi için yara eksüdasının uygun yönetimi çok önemlidir (Cutting, 2003).

#### **1.4. Yara Sargısında Kullanılan Materyaller ve Tarihçeleri**

Yara, ister küçük bir kesik, isterse büyük bir yarık olsun düzgün bir şekilde tedavi edilmesi önemlidir ve tedavi sürecinin bir kısmını yara sargısı içerir. Sargı, yara ile doğrudan temas kuracak şekilde tasarlanır ve sargının yara yüzeyinde kalmasını sağlayacak bandajlama ile karıştırılmamalıdır (Dhivya, Padma, & Santhina, 2015).

Tarihsel olarak bilinen en eski yara bakımı milattan önce (MÖ) 2500 yılında mezapotamyada görülmüştür. Küflü ekmekler antibiyotik olarak kullanılmış ve inflamasyon ve enfeksiyon görüldüğü zaman çeşitli bitki ve mineraller kullanılmıştır. Mezapotamyalılar bal ve reçine ile sargılama yapmadan önce yarayı su ya da süt ile yıkamıştır.

Antik Yunanistan'da, Hipokrat (460-370) yaranın bal, yağ ve şarap ile tedavi edilmesinden önce şarap ve sirke ile yıkanması gerektiğini öne sunmuştur. Ayrıca suyun ya da şarabın içerisinde kaynatılan yün uygun bir bandaj malzemesi olarak kabul edilmiştir (Daunton et al., 2012).

18. yüzyıla kadar ameliyat tıbbın farklı ve saygın bir alanı olarak görülmemektedir. 18. yüzyıldan sonra cerrahiye verilen önem, 19. yüzyılda bulunan antibiyotiklerin enfeksiyonları kontrol altına alması ve ölüm sayılarını azaltması, 20. yüzyılda modern sargı materyallerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır (Queen et al., 2004).

1962 yılında Winter'ın kapalı yaraların açık yaralara göre epitelizasyon için geçen sürenin daha az olduğunu bulması sargı materyallerinin geliştirilmesinde dönüm noktası olmuştur (Sarabahi, 2012; Winter, 1962). Yara bir sargı malzemesi ile kapatıldığında proteinazlar, kemotatik komplementler ve büyüme faktörleri yaraya daha fazla etki ederler. Sargılar fibroblast ve epitel hücre göçünün uyarılması için gerekli olan elektrokimyasal uyarımların korunmasında ve yarada meydana gelecek travmaların engellenmesi için fiziksel bariyer olarak kullanılmasında bile etkilidir (Sarabahi, 2012).

1990'ların ortasından günümüze kadar, hidrojeller, hidrokolloidler, alginatlar, sentetik köpükler, silikon kafesler, doku yapıştırıcıları, buhar geçirgen yapışkan filmler ve gümüş / kolajen içeren çeşitli sargı ürünleri ortaya çıkmıştır (Shah, 2011).

### **1.5. İdeal Bir Sargı Materyalindeki Olması Gereken Özellikler**

İdeal bir sargı yaraya özgü seçilmelidir. Genel olarak bir sargıda olması gereken çeşitli özellikler bulunmaktadır. Bunlar;

- Sargı nemli ortam sağlamalı veya nemli ortamı korumalıdır.
- Epidermal göçü arttırmalıdır.
- Anjiyogenez ve bağ dokusu sentezini teşvik etmelidir.
- Yaralı doku ve çevre arasındaki gaz alışverişine izin vermelidir.
- Yara yatağındaki kan akışını iyileştirmek için uygun doku sıcaklığını korumalıdır.
- Bakteriyel enfeksiyona karşı koruma sağlamalıdır.
- Yaraya yapışmamalı ve iyileştikten sonra çıkarılması kolay olmalıdır.
- Lökosit göçünü arttırmak ve enzim birikimini desteklemek için debridman eylemi sağlamalıdır.
- Steril olmalı, toksik ve alerjik olmamalıdır (Dhivya vd., 2015).

### **1.6. Yara Sargılarının Sınıflandırılması**

Yara sargıları genel olarak geleneksel ve modern sargılar olarak ikiye ayrılırlar. Geleneksel sargılar, hidrofilik pamuk, doğal ya da sentetik bandajlar ve gazlı bezlerdir. Modern sargılar ise hidrokolloidler, aljinat sargı, hidrofiberler, köpük sargılar, yarı geçirgen film sargılar ve hidrojellerdir. Sargının işlevselliğine (tıkayıcı, emici vb.), malzemenin tipine (kolajen, hidrojel vb.), ve ürünün fiziksel formuna (jel, merhem vb.) göre de sınıflandırma yapılabilir. Ayrıca yara yüzeyi ile doğrudan temas halinde olan birincil sargılar, birincil sargıları örten ikincil sargılar ve ortada bir emici bölge ve etrafındaki bir yapışkan kısımdan oluşan ada sargılar olarak da sınıflandırılabilir (Boateng vd., 2008). Bu çalışmada yara sargıları, geleneksel, modern ve biyoaktif olarak sınıflandırılacaktır.

#### **1.6.1. Geleneksel yara sargıları**

Gazlı bez, plaster, bandajlar (doğal veya sentetik) ve hidrofilik pamuk da dahil olmak üzere geleneksel pansuman ürünleri kuru yapılarıdır ve yaraların kirlenmeden



korunması için birincil veya ikincil pansuman olarak kullanılır. Gazlı bezler dokunmuş ya da dokunmamış pamuk, yapay ipek ya da polyesterden yapılır ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı bir çeşit koruma sağlar. Bazı gazlı bezler, yapılarında bulunan lifler sayesinde açık yarada bulunan eksüda ve sıvıların emilmesine yardımcı olurlar. Bu gazlı bezler sağlıklı dokuyu maserasyondan korumak için sürekli değişim gerektirir. Ayrıca düşük maliyetlidirler. Aşırı yara sıvısına bağlı olarak gazlı bezler nemli hale geçerler. Bu nemli hal yüzünden yapışkanlık hali gözlenir ve yaradan uzaklaştırılırken acı oluştururlar. Doğal pamuktan ve selülozdan yapılan bandajlar ya da poliamid materyallerden yapılan sentetik bandajlar işlevsellik açısından farklılık gösterirler. Genellikle geleneksel sargılar hafif eksüda seviyesi gösteren kuru ve temiz yaralar için ya da ikincil sargı materyali olarak kullanılır. Geleneksel sargılar yaraya nemli ortam sağlamakta başarısız olduğu için, bunların yerini daha gelişmiş formülasyonlara sahip modern sargılar almıştır (Queen vd., 2004).

### **1.6.2. Modern yara sargıları**

Modern yara sargıları sadece yaranın üstünü kapatmak yerine, yaranın fonksiyonunu kolaylaştırmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu sargıların temel amacı yarayı dehidrasyondan korumak ve yara iyileşmesini desteklemektir. Yaranın nedenine ve tipine bağlı olarak, piyasada çok sayıda ürün bulunmaktadır. Modern yara sargıları çıkış olarak sentetik polimerlerdir ve pasif ve interaktif olarak sınıflandırılabilirler. Pasif yara sargıları gazlı bez ve tül sargı gibi tıkayıcı olmayan yaranın üstünü kapatan ve derinin tekrardan işlevselliğini kazanmasına yardımcı olan yapılardır. İnteraktif sargılama ise köpük, hidrojel, film ve hidrokolloid formda bulunan yarı tıkayıcı ya da tıkayıcı materyallerdir. Bu sargılar bakterilerin yara çevresine girişine izin vermeyen bariyer görevi görürler (Dhivya vd., 2015).

#### **1.6.2.1. Hidrojel sargılama**

Hidrojeller, çözünebilir polimerlerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla üretilen, büyük ölçüde hidrofilik makromoleküler yapılardır. Fizyolojik ortamlara yüksek duyarlılık, hidrofilik doğa, yumuşak dokuya benzer su içeriği ve yeterli esneklik gibi kendine özgü özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için mükemmel adaylardır (Kamoun, Kenawy, & Chen, 2017). Hidrojeller ağırlıkça yaklaşık %90 su ve %10 doğal veya sentetik polimerlerden oluşurlar. Bu yüksek su içeriği, kuru ve nekrotik yaraların tedavisi için hidrojel sargıları diğer sargılardan bir adım daha öne geçirmektedir (Koehler,

Brandl, & Goepferich, 2018). Ayrıca basınç ülserleri, cerrahi yaralar, radyasyon onkolojisi yaraları da dahil olmak üzere tüm yanıklarda kullanılabilirler ve yeni doğanların derisi için de sorun teşkil etmezler (Vowden & Vowden, 2017).

Hidrojel pansumanlar yaygın olarak üç biçimde bulunur: amorf jel, emdirilmiş gazlı bez ve yaprak şeklinde hidrojel. Hidrojeller, yara yatağını rehidre ederler, soğuma etkilerinden dolayı ağrıyı azaltırlar, yapışkan değildirler, ölü boşlukları doldururlar, uygulanması ve çıkarılması kolaydır (Ilenghoven vd., 2017). Ayrıca geçirgen yapılarından dolayı dokunun "nefes almasına" izin vermeyen, gaz halinde bulunan CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O değişimini de sağlarlar (Koehler vd., 2018).

Frehner & Watts, (2016) herhangi bir teröpatik katkı olmadan hidrojel sargılamının yara iyileşmesini nasıl etkilediğini derlemişler ve hidrojellerin avantajlarını kanıtlarıyla sunmuşlardır. Bu çalışmaya göre hidrojeller;

1. Granülasyon ve epitelizasyonu kolaylaştırmak için nemli bir yara yatağı oluşumunu teşvik ederler ve nemli bir yara yatağı oluşturmak için kuru yaraları rehidre ederler.
2. Amorf hidrojel sargıların uyumlu özellikleri, küçük yaralarda sargı ve yara yatağı arasındaki teması en üst düzeye çıkarır. Bu durum, bakterilerin gelişebileceği yaranın içinde ölü alan oluşumunu azaltır.
3. Hidrojin türü ve tutarlılığına bağlı olarak, sargı, enfekte olmayan yaralarda birkaç gün boyunca yerinde bırakılabilir.
4. Şeffaf hidrojeller sargıyı rahatsız etmeden yaranın gözlemlenebilmesine olanak sağlar.
5. Hidrojel kurumadıkça, yara ve etrafındaki dokulardan zarar vermeden kolayca uzaklaştırılabilir.
6. Hidrojin nemli yapısı ve içerdiği yüksek su oranından dolayı sağladığı soğutma etkisi sayesinde acıyı azaltır.

#### **1.6.2.2. Aljinat sargılama**

Alginatlar, başta *Laminaria*, *Macrocystis* ve *Ascophyllum* olmak üzere çeşitli deniz yosunu cinslerinden elde edilen, mannuronik ve guluronik asit birimleri içeren yapılardır.

Aljinat sargılama bu yapılarının kalsiyum ya da sodyum tuzlarından elde edilen emici ve biyo-bozunabilir yapıya sahiptirler. Yüksek emici özelliği, bakteriyal kontaminasyonu engelleyen ve yara eksüdasını sınırlayan güçlü hidrofilik jel formasyonları sayesinde (Thomas, 2000). Aljinat yara örtüleri yaraya uygulandığında, aljinatta bulunan iyonlar koruyucu bir film oluşturmak üzere kanla değiştirilir. Aljinat sargılama aşırı akıntılı yaralar için uygundur fakat kuru yara, üçüncü derecede yanık ve kemiğin açıkta kaldığı yaralar için uygun değildir. Ayrıca bu sargılar ikincil bir sargı malzemesi gerektirmektedir çünkü yarayı dehidre ederler (Clark, 2012).

### **1.6.2.3. Köpük sargılama**

Köpük sargılar hidrofilik ya da hidrofobik yapıda olan, bakterilere karşı bir bariyer sistemi bulunan yargı geçirgen yapılardır. Poliüretan ya da silikon bazlı bu yapılar yara eksüdasının çok fazla olduğu durumlarla mücadele etmek için uygundur. Yaraya ısı yalıtımı sağlarlar, nemli bir yara ortamı oluştururlar, yapışkan değildirler ve yaradan uzaklaştırma sırasında yaraya zarar vermezler (Atkin, Stephenson, & Bateman, 2015).

Poliüretan köpükler iki ya da üç katmandan oluşan, yara ile temas eden hidrofilik yüzey ve hidrofobik destek kısımdan oluşan oldukça emici yapılardır. Hidrofilik yüzey yara eksüdasının homojen dağılımını kolaylaştırır ve yarı geçirgen katman sayesinde dış sızıntıyı önler (Fogh & Nielsen, 2015).

Silikon köpükler karıştırıldıklarında köpüğe dönüşebilen ve yaranın şekline uymak için genişleyebilen iki esnek silikon polimerinden meydana gelirler. Silikon köpüklerin en büyük avantajı eksüdayı tutma kabiliyetidir. Ayrıca, silikon köpük sargılar yara çevresindeki bölgeyi daha fazla hasardan korurlar (Fogh & Nielsen, 2015).

### **1.6.2.4. Hidrokolloid sargılama**

Hidrokolloidler dışta poliüretan tabaka ve iç tarafta jelatin, pektin ya da karboksimetilselülozdan oluşan, yara yatağı için ideal nemli çevreyi sağlayan, yara eksüdasını kontrol eden otolitik debrimanı kolaylaştıran, acıyı azaltan ve dış mikroorganizmalara karşı koruyucu bariyer sağlayan emici yapıda yara sargı materyalleridir. Hidrojeller gibi, hidrokolloidler minimum ila orta derecede akıntıyı emebilir ve kısmi veya tam kalınlıkta akut ve kronik yaralar için kullanımı uygundur. Tıkayıcı özellikte oldukları için hidrokolloid yara örtüleri yaraya su, oksijen ya da bakterinin girmesine izin vermez (Pott vd., 2014).

Hidrojellerde olduğu gibi hidrokolloidler yarannın granülüzasyonuna ya da epitelizasyonuna yardımcı olurlar. Fakat tıkaçıcı yapıları yüzünden yara ya da etrafındaki doku enfekte olmuşsa ya da diyabetik ayak ülseri gibi hastalıklarda kullanılmaz (Czemplik, Kulma, & Szopa, 2013).

#### **1.6.2.5. Hidrofiber sargılama**

Hidrofiber, iğneleme işlemi ile bir arada tutulan bir bez formunda bulunan sodyum-karboksimetilselülozdan oluşan yumuşak, steril, dokunmamış bir tampon veya şerit sargı olarak tanımlanır. Bu uyumlu malzeme yüksek miktarda yara sıvısını emebilir. Daha sonra vücudun iyileşme sürecini desteklemek için nemli bir ortam oluşturan yumuşak bir jele dönüşür. Ayrıca yeni oluşan dokuya zarar vermeden ölü dokunun yaradan uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Richetta vd., 2011).

Hidrofiber sargılar aşırı derecede akıntılı akut ve kronik yaralar için kullanılabilirler ve aşağıda gösterildiği gibi katkı sağlarlar;

- İyileşmeyi desteklemek için nemli bir yara ortamı sağlamak
- Mükemmel emme ve sıvıyı hapsedme kapasitesi
- Sargının çıkartılmasında azaltılmış çapraz kontaminasyon
- Dengeli inflamatuvar yanıt
- Yarayı çevreleyen deri için koruma
- Azaltılmış maserasyon (Ag, 1997).

#### **1.6.2.6. Yarı-geçirgen film sargılar**

Yarı geçirgen filmler, yara yönetimindeki ilk önemli ilerlemelerden biridir ve yaraların sargılanması için büyük değişikliklere neden oldular. Hipoalerjenik akrilik yapıştırıcı ile kaplanmış poliüretan steril plastik tabakalardan oluşurlar ve esas olarak şeffaf bir birincil yara örtüsü olarak kullanılırlar. Sıvılar ve bakterilere karşı geçirgen olmamalarına rağmen, hava ve su buharına karşı geçirgendirler. Bu geçirgenlik markadan markaya değişkenlik gösteren nem ve buhar iletim oranına bağlıdır. Bu mekanizma sayesinde film sargılar nemli bir yara ortamı oluşturur. Yarı geçirgen film sargılar çok esnektirler. Bu özellikleri sayesinde eklemler gibi zor anatomik bölgelerde bulunan yaralar için iyi birer seçimdirler. Fakat bu sargılar, yüksek miktarda yara eksüdası ile baş

edememektedir ve dikkatsizce kullanımda yara yatağını çevreleyen deride maserasyona neden olurlar (Jones, 2006).

### **1.6.3. Biyoaktif sargılar**

Modern yara sargısının son türü biyoaktif sargıdır ve iyileşme sürecinde önemli rol oynayan biyomateryallerden üretilir. Bu pansumanlar biyo-uyumlulukları, biyobozunabilirlikleri ve toksik olmayan doğaları ile bilinirler ve genellikle doğal dokulardan veya kolajen, hyalüronik asit (HA), kitosan, aljinat ve elastin gibi yapay kaynaklardan elde edilir. Bu malzemelerin polimerleri, yaranın niteliğine ve tipine bağlı olarak tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılırlar. Biyoaktif sargılar bazen yara iyileşme sürecini hızlandırmak amacı ile büyüme faktörleri ve antimikrobiyaller ile birleştirilebilirler (Dhivya vd., 2015).

Büyük bir yapısal protein olan kolajen, fibroblast oluşumunu başlatır ve yara dokusu ile temas ettiğinde endotel göçünü hızlandırır. HA, benzersiz biyolojik ve fizikokimyasal özelliklere sahip, ekstraselüler matrikste (ECM) bulunan bir glikozaminoglikan bileşenidir. Kolajene benzer şekilde işlev gösteren HA ayrıca biyoyumlu, biyobozunabilir ve doğal olarak immünojenesiteden yoksundur. Kitosan, yara iyileşmesinin proliferatif aşamasında granülasyon dokusunun oluşumunu teşvik eder. Diğer pansumanlarla karşılaştırıldığında, biyolojik pansumanların diğer pansuman tiplerinden daha üstün olduğu bildirilmiştir (Dhivya vd., 2015).

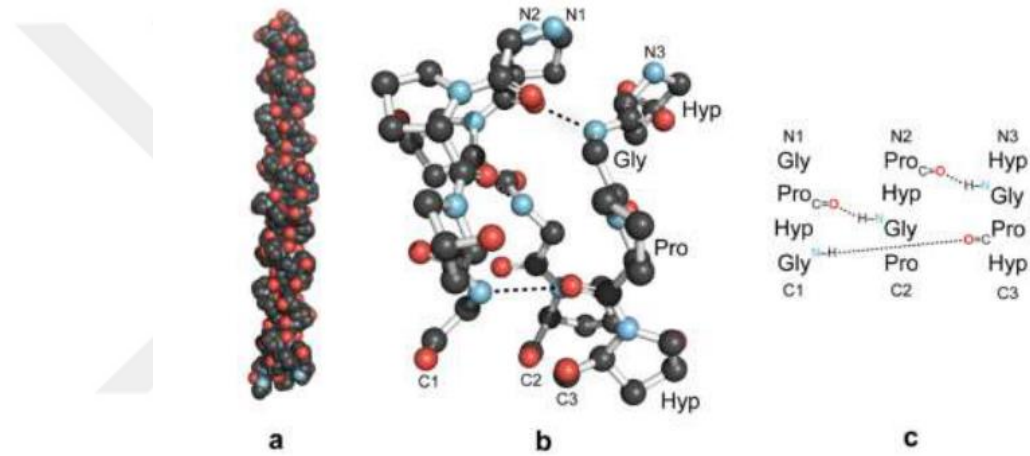
### **1.7. Kolajen**

Kolajen, üçlü sarmal yapıda bulunan ve üç polipeptit zincirinden oluşan tüm hayvanların vücudunda bulunan yapısal proteindir. İnsanlarda toplam proteinin üçte birini oluştururken cildin kuru ağırlığının dörtte üçünü oluşturur ve ECM'nin en yaygın bileşenidir (Shoulders & Raines, 2009). Kolajenler tüm bağ dokularının ana yapısal elemanıdır. Ayrıca hemen hemen tüm parankimal organların interstisyel dokusunda bulunurlar. Burada dokular ve organların stabilitesine katkıda bulunur ve yapısal bütünlüklerini korurlar. Ayrıca hücresel çevrede önemli işlevleri yerine getirir ve büyüme faktörleri gibi hücresel araçların depolanması ve serbest bırakılmasında yer alır. İntegrinler, diskoidin domain reseptörler, glikoprotein VI ve özel proteoglikan reseptörler kolajenlerle etkileşime girerek adezyon, farklılaşma, büyüme, hücrelerin hayatta kalması gibi olaylara olanak sağlar. Ayrıca biyobozunabilir olmaları, düşük immüniteye sahip

olmaları ve yüksek miktarda saflaştırılmaya olanak sağlamaları, tıp, kozmetik ve gıda sanayisinde kolajenlerin kullanımının önünü açmıştır (Gelse, Pöschl, & Aigner, 2003).

### 1.7.1. Kolajenin yapısı

En temel düzeyde kolajen, üç polipeptit  $\alpha$  zincirinin birbirine yakın bir şekilde paketlenmesiyle oluşan eşsiz sağ sarmal yapıdır (Şekil 1.2). Üçlü sarmal yapıda bulunan kolajen molekülünün her iki ucunda sarmal olmayan bir bölge (telopeptit) bulunur. Kolajen molekülünün polipeptit zinciri her üçüncü pozisyonda bir glisin (Gly) içeren Gly-X-Y tekrarı olarak basitleştirilebilir. X ve Y amino asitleri farklı olabilir ama genellikle sırasıyla %28 prolin ve % 38 4-hidroksiprolindir (Andriotis vd., 2015).



**Şekil 1.2.** Kolajen üçlü sarmalın genel yapısı. (a) Üçlü sarmalın kristal yapısı. (b) Top çubuk modeli ile dönüş açısının gösterilmesi. (c) Her bir birimdeki hidrojen bağları.

Üçlü sarmalın kararlılığı her üçüncü rezidüde bulunan glisin, yüksek prolin ve hidroksiprolin içeriği, zincirler arası hidrojen bağları, lizin ve aspartat içeren elektrostatik etkileşimler ile sağlanır (Ricard-Blum, 2011)

### 1.7.2. Kolajen ailesi

Tüm kolajen tipleri yapılarına, fonksiyonlarına ve büyüklüklerine göre farklılık gösterirler. Bugüne kadar 28 farklı kolajen molekülü tanımlanmıştır. Bunlar yapılarına ve supramoleküler organizasyonlarına göre fibril oluşturan kolajenler (Kolajen tip I, II, III, V, ve XI), bazal membran kolajenleri ( Kolajen tip IV), mikrofibriler kolajenler (Kolajen tip VI), tutundurucu kolajenler (Kolajen tip VII), hegzagonal ağ oluşturan kolajenler (Kolajen tip VIII ve X), FACIT kolajenler (Kolajen tip IX, XII, XIV, XIX, XX ve XXI), Transmembran kolajenler (Kolajen tip XIII ve XVII), Multiplenksiler (Kolajen tip XV,

XVI ve XVIII) ve diğerkleri (Kolajen tip XXVIII) olarak sınıflandırılırlar (Fratzl, 2008) (Tablo 1.1).

**Tablo 1. 1.** Kolajen ailesi üyeleri

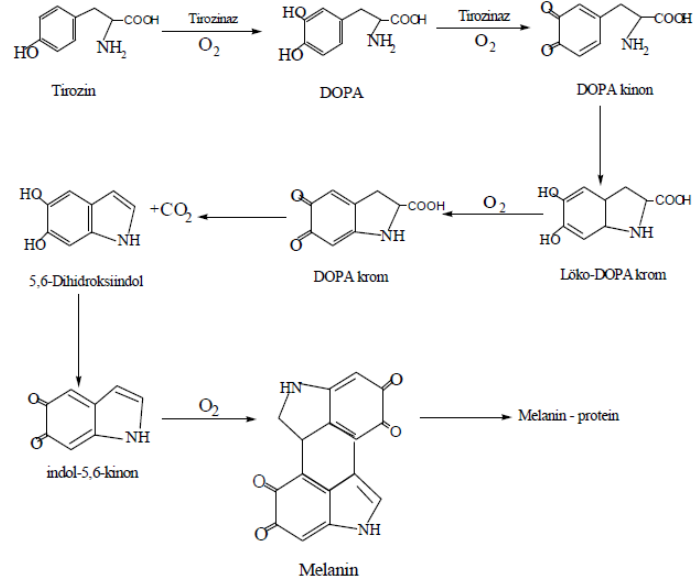
| Kolajen Ailesi              | Üyeler  |
|-----------------------------|---|
| Fibril Oluşturan Kolajenler | Kolajen tip I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII        |
| FACIT kolajen               | Kolajen tip IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI ve XXII |
| Mikrofibriler Kolajen       | Kolajen tip VI                                      |
| Bazal Membran Kollajen      | Kolajen tip IV                                      |
| Kısa Zincirli Kolajenler    | Kolajen Tip VIII ve X                               |
| Transmembran Kolajenler     | Kolajen tip XIII, XVII, XXIII ve XXV                |
| Tutundurucu Kolajen         | Kolajen tip VII                                     |
| Multiplenksiler             | Kolajen tip XV, XVI ve XVIII                        |
| Diğerkolajenler             | Kolajen tip XXVIII                                  |

Fibril oluşturan kolajenler, toplam kolajenin %90'ını oluşturan en büyük ve en geniş kolajen familyasıdır. Tip I ve V kolajen fibrilleri, kemik yapısında önemli bir rol oynarlarken, kolajen tip II ve XI esas olarak, kıkırdak matrisinin bir parçasıdır. Kolajenin gerilme direnci ve burulma karaklılığı özellikleri, bu dokuların stabilitesini ve bütünlüğünü etkiler (Rest vd., 1997). Kolajen tip IV bazal membranda bulunan ve bu membranın en önemli yapısal bileşimidir (Ricard-Blum, 2011). Kolajen VI, disülfid çapraz bağları içeren ve bu bağlar ile hücreleri ve diğerkolajen moleküllerini birbirine bağlayan ince-boncuklu filamentlerin ağına katkıda bulunan bir mikrofibriler kolajendir (Gelse et al., 2003). Kolajen tip VII tutundurucu fibrillerinin ana bileşenidir, bazal membran ile ilişkili yapılardır ve dermisen epidermise doğru şekilde bağlanması için gereklidirler (Dayal et al., 2014). Kolajen tip VIII ve X kısa zincirli kolajenlerdir. Kolajen tip VIII endotel hücrelerinin alt kısmında bulunur, kolajen X kemikleşme sırasında ise kıkırdığın hipertropik bölgesinde bulunur (Knupp & Squire, 2005). FACIT kolajenleri tek başlarına fibril oluşturmazlar fakat kolajen fibrillerinin yüzeyleri ile ilişkilidirler (Ricard-Blum, 2011).

### 1.8. Tirozinaz

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) çok fonksiyonlu bakır içeren farklı organizmalarda çeşitli fizyolojik roller oynayan bir enzimdir. Tirozinaz fenollerin o-hidroksilasyonunu sağlayan daha sonra ürün olarak ortamda bulunan o-difenollerini oksidasyon ile o-kinonlara dönüştüren bakır içeren tek enzimdir (Şekil 1.3). Mantar ve omurgalılarda, melanin pigmentinin tirozinden oluşumundaki ilk basamağı katalizler. Bitkilerde doku hasarı

sirasında meydana gelen esmerleşme sırasında bitkileri oksitler. Bir diğer olası rolü ise yaraları böceklerden ve bakterilerden korumaktır. Ayrıca böceklerde deri değişirme sürecine dahil olur ve deniz canlılarının bir yere kendini tutturmasında aktif rol oynar (Haghbeen, Jazii, & Karkhane, 2004).



Şekil 1.3. Tirozinin son ürün melanine kadar dönüşümü

Bu zamana kadar tirozinaz kaynağı olarak, yenilebilen mantarlar, çürükçül mantarlar, filementöz mantarlar, elma, patates, muz, avakado, sicilya domatesi, patlıcan, ayva ve hatta yeşil hindistan cevizi suyu kullanılmıştır (Velichkova, 2015).

### 1.8.1. Mantar tirozinaz

Mantar tirozinaz, ticari olarak bulunduğu için ve ucuz olmasından dolayı araştırmacılar arasında çok popülerdir. Ayrıca bu enzimin özelliğini araştırmak için kolay araçlar vardır. Mantarlar arasında *Agaricus bisporus* dünya çapında en çok tüketilen türdür. Bu nedenle araştırmaların çoğu bu tür üzerinde yoğunlaşmıştır. Kültür mantarından (*Agaricus bisporus*) elde edilen tirozinaz heterotetramer yapıda olan 2 ağır zincir ve 2 hafif zincir içeren 120 kilodalton (kDa) boyutunda proteindir. Tirozinaz enzimi 3 farklı bölge içerir. Merkezde bulunan bölge iki bakır-bağlama bölgesi içerir. Bu bölge tarafından tutulan bakırlar, enzimin aktif bölgesine korunmuş altı histidin rezidüsü sayesinde bağlanır (Seo, Sharma, & Sharma, 2003).



Tirozinaz enzimi sayesinde fenollerin o-difenollere dönüşmesi oldukça çekici bir katalitik yetenektir. Bu yüzden ilaç ya da ilaç benzeri katekol ürünlerin tirozinaz kullanılarak dönüştürülmesi bu enzimi biyoteknolojik uygulamalar için dikkat çekici bir hale getirmiştir. Bunun en büyük örneği L-DOPA'dır (Zaidi, Ali, & Ali, 2014).

### 1.9. Üç Boyutlu (3B) Biyoyazıcı ve Yara İyileşmesi

Biyobaskılama, kompleks 3B yapılarda yaşayan hücreleri, biyomateryalleri ve faktörleri biriktirebilen bir katkı üretim teknolojisidir. Katman katman baskı işlemi ile yapıların üretilmesi için bilgisayar kontrollü bir 3B yazıcı kullanılarak yüksek derecede esneklik ve tekrarlanabilirlik sağlar. Biyobaskılama genellikle aşağıdaki üç adımı içerir;

1. Model tanımlama ve malzeme seçimi için doku ve organların doğru bilgilerinin toplanması.
2. Yazıcıyı dokuları basacak şekilde kontrol etmek için bilginin elektrik sinyaline aktarılması.
3. İstikrarlı bir yapı oluşturulması (He vd., 2018).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok biyo-yazıcı teknolojisi bulunmaktadır. Bunlarda en çok kullanılanları Mürekkep püskürtmeli baskı, Ekstrüzyon bazlı baskı, Lazer destekli baskı ve Digital Light Processing (DLP) tabanlı baskıdır. Aralarındaki farklılıklar tablo 1.2'de gösterildiği gibidir.

**Tablo 1. 2. Çeşitli biyo-yazıcı teknolojileri**

|                 | <b>Mürekkep püskürtmeli baskı</b> | <b>Ekstrüzyon bazlı baskı</b> | <b>Lazer destekli baskı</b> | <b>DLP tabanlı baskı</b> |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Yazma işlemi    | Dizisel (damla damla)             | Dizisel (sadır satır)         | Dizisel (nokta nokta)       | Paralel ve durmaksızın   |
| Yazma Hızı      | Orta                              | Yavaş                         | Orta                        | Hızlı                    |
| Çözünürlük      | 50 µm                             | 5 µm                          | <500 nm                     | 1 µm                     |
| Hücre Canlılığı | > %85                             | %40–80                        | > %85                       | %85–95                   |
| Materyal Seçimi | Sıcaklık/pH/ışığa duyarlı         | Sıcaklık/Işığa duyarlı        | Işığa duyarlı               | Işığa duyarlı            |

Yara iyileşmesi birkaç farklı aşama ve bir dizi hücre ve sitokin içeren karmaşık bir prosedürdür. Bu aşamaları kolaylaştırmak için, selüloz, aljinat, kolajen kitin, HA ve diğerleri gibi bir dizi doğal biyomateryal geliştirilmiştir.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.Gereçler

Deneilerin gerçekleştirilmesinde Tablo 2.1’ de verilen cihaz ve sarf malzemeleri kullanılmıştır.

**Tablo 2.1.** *Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler listesi*

| Cihazlar ve Sarf Malzemeleri          | Firma, Ülke                          |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| +4 Buzdolabı                          | Liebherr, Medline, Almanya           |
| -20 Buzdolabı                         | Liebherr, Medline, Almanya           |
| Çalkalayıcı                           | Thermo, Amerika                      |
| Döner Buharlaştırıcı (R-300)          | Büchi Rotavapor, İsviçre             |
| Mikroplaka Okuyucu                    | BioTek Synergy H1, Amerika           |
| Etüv                                  | Innovens, Jouan, Amerika             |
| FT-IR Spektrofotometre (Spectrum 100) | PerkinElmer,                         |
| 3D Bioplotter TM system               | EnvisionTEC, 4th generation, İspanya |
| Küçük Santrifüj                       | Hettich, Almanya                     |
| Liyofilizatör                         | Labconco, Freezone, Amerika          |
| Manyetik Karıştırıcı                  | Jeio Tech, Lab Companion, Amerika    |
| Mikropipet Uçları                     | Isolab, Almanya                      |
| Santrifüj                             | Sigma, Amerika                       |
| pH Metre (H1 2211 pH/ORP)             | Hanna, Amerika                       |
| Pipetör                               | Brand, Transferpette, Almanya        |
| Hassas Terazi                         | Ohaus, Pioneer, Amerika              |
| Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)    | Zeiss Ultra Plus, Almanya            |
| CD Spectrometre                       | Chirascan™-Plus, İngiltere           |
| Ultrasonik Su Banyosu                 | Lab Companion, Amerika               |
| Vorteks                               | Stuart, İngiltere                    |

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Kolajen İzolasyonu

Bütün preparatif prosedürler sürekli olarak 4°C’de manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiştir. Kolajenin koyun derisinden izolasyonu için olan gerekli olan yöntemler aşağıdaki aşamalardan oluşur; koyun derisinin hazırlanması, kolajen olmayan dokunun ortamdaki uzaklaştırılması, kolajen ekstraksiyonu, kolajenin santrifüjlenmesi ve çöktürülmesi, tuzun uzaklaştırılması ve kolajen karakterizasyonu.

### **2.2.1.1. Koyun derisinin hazırlanması**

Kolajen kaynağı olarak kullanılacak olan koyun derisi yerel mezbahaneden temin edilmiştir. Laboratuvar ortamına getirilene kadar 4°C’de soğuk zincir ile taşınmış, laboratuvarda kullanılana kadar ise -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Deri kir ve pislikten arındırılmak için su ile iyice yıkanmıştır. Kıl ve yağın deriden uzaklaştırılması için jilet kullanılmıştır. Pislikten arındırılan, kıl ve yağ uzaklaştırılan deri makas yardımı ile 1x1 cm boyutlarına getirilmiştir. Laboratuvar terazisi ile tartılan deriden 50 g saflaştırılma işlemleri için ayrılmış ve -80°C’de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra blender yardımı ile parçalanması sağlanmıştır.

### **2.2.1.2. Kolajen olmayan dokunun ortamdaki uzaklaştırılması**

Blender ile parçalanmış deri parçaları 1 L’lik behere alınarak üzerine 500 mL 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiş ve 4°C’de 2 gün karışmaya bırakılmıştır. Her 24 saatte NaOH çözeltisi ortamdaki uzaklaştırılıp yerine yeni çözelti eklenmiştir. 2. günün sonunda deri çözeltisi 125 mm filtre kullanılarak süzümüştür. Daha sonra deri, pH nötral seviyeye gelene kadar 4 kere 500 mL soğuk distile su ile yıkanmış ve her yıkama sırasında pH ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Yıkama işleminden sonra, yağın ortamdaki uzaklaştırılması için deri 1 L’lik temiz bir behere alınarak üzerine 500 mL %10 bütül alkol(v/v) eklenmiş ve 24 saat karışmaya bırakılmıştır. 24 saat sonunda bütül alkol ortamdaki uzaklaştırılarak deri tekrardan 500 mL %10 bütül alkol çözeltisi ile 24 saat muamele edilmiştir. 2 günün sonunda deri 125 mm filtre kâğıdı kullanılarak süzümüş ve alkolün ortamdaki tamamen uzaklaştırılması için 2 L soğuk distile su ile yıkanmıştır.

### **2.2.1.3. Kolajen ekstraksiyonu**

1 L’lik temiz behere alınan deri çözeltisi üzerine 500 mL 0.5 M asetik asit çözeltisi ve %0,1 pepsin (v/w) eklenerek 6 gün karışmaya bırakılmıştır. 6 günün sonunda viskoz bir görünüme sahip olan karışım alınarak sonraki işlemlere geçilmiştir.

### **2.2.1.4. Kolajenin santrifüjlenmesi ve çöktürülmesi**

Altıncı günün sonunda çözelti 125 mm filtre kullanılarak süzülerek çökelti kısmı uzaklaştırılmış ve 420 mL süzüntü falcon tüplerine alınarak 12000 rpm 4°C’de 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz toplanmış ve miktarı 320 mL olarak belirlenmiştir. Çöktürme işlemi için son hacim 0,9 M olacak şekilde 20.007 g NaCl

eklenmiş ve çözelti 4 °C’de 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakikanın sonunda görünür hale gelen kolajen fibrilleri 12000 rpm 4°C’de 1 saat santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrasında üst faz uzaklaştırılarak peletlerin bir araya getirilmesi sağlanmıştır. Peletler 60 mL 0,5 M asetik asit içerisinde 30 dakika vorteks kullanılarak çözünmesi sağlanmıştır.

#### **2.2.1.5. Tuzun uzaklaştırılması**

Tuzun ortamdan uzaklaştırılması için 50k Amicon Ultra-15 santrifüj filtresi kullanılmıştır. 4 farklı tüpe alınan kolajen çözeltisi 4000 rpm 4 °C’de 1 saat boyunca santrifüj edilmiş, her santrifüjün sonunda alt fazın iletkenlik değeri microsiemens cinsinden ölçülmüş ve grafik çizilmiştir. 6 saatin sonunda 60 mL kolajen örneği karakterizasyon işlemlerinin yapılması için 100 mL beher içerisinde alınmış ve 4°C’ye kaldırılmıştır.

#### **2.2.2. Kolajen karakterizasyonu**

Kolajen karakterizasyon işlemleri, Sirius red ile kolajen miktar tayini, Fourier Dönüşüm Kızılötesi- Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) ile fonksiyonel grup tayini, Farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlük testi, Dairesel dikroizm spektrumu (CD spektrumu) ile ikincil yapı analizi ve Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-Page) ile boyut analizi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

##### **2.2.2.1. Sirius red kolajen miktar tayini**

Sirius red kolajen miktar tayini Keira vd., (Keira, Ferreira, Gragnani, Duarte, & Barbosa, 2004) uyguladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde (0,8 mgmL<sup>-1</sup>, 0,6 mgmL<sup>-1</sup>, 0,4 mgmL<sup>-1</sup>, 0,2 mgmL<sup>-1</sup> ve 0,1 mgmL<sup>-1</sup>) kolajen 0,5 M asetik asit içerisinde çözdürülmüştür. Kör olarak sadece 0,5 M asetik asit kullanılmıştır. Direct Red 80 sirius red boyası son derişim 50 µM (69 µgmL<sup>-1</sup>) olacak şekilde 5 ml 0,5 M asetik asit içerisinde çözdürülmüştür.

Farklı ependorf tüplerine alınan 100 µL kolajen çözeltisi üzerine 1 mL sirius red boyası eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş, 30 dakikanın sonunda 30.000 g’de 30 dak. santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 200 µl örnek alınarak 540 nm’de okuma işlemi yapılmıştır. Okuma sonucunda kalibrasyon eğrisi çizilerek  $y = 0.0009x + 0.0566$  ( $R^2 = 0.9982$ ) denklemi elde edilmiştir. Bu denklem koyun derisinden elde edilen kolajen

miktarını hesaplamak için kullanılmıştır. Koyun derisinden elde edilen kolajen miktarını hesaplamak için örnek 1:1 oranında 0,5 M asetik asit ile seyreltilmiş ve yukarıdaki yöntem kullanılarak 540 nm’de ölçülmüştür.

#### **2.2.2.2. FTIR-ATR analizi**

FTIR-ATR ile fonksiyonel grup analizi için 5 mL kolajen çözeltisinin çözücüsü liyofilizatör kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Katı hale gelen kolajen bistüri yardımıyla yaklaşık olarak 0,2 mm kalınlığında kesilmiş ve ATR başlığına yerleştirilmiş 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ölçüm alınmıştır.

#### **2.2.2.3. Uv-Vis spektroskopisi**

1:100 oranında 0,5 M asetik asit ile seyreltilen kolajen örneği 200-800 nm dalga boyları arasında ölçülmüştür.

#### **2.2.2.4. Farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlük testi**

Koyun derisinden izole edilen kolajenin farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlüğünün ölçülmesi Montero vd., (1991) geliştirdiği yöntemde ufak değışiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

0,5 M asetik asit içerisinde çözülmüş 5 mL kolajen ( $1,6 \text{ mgmL}^{-1}$ ) çözeltisi bir behere alınmıştır. Üzerine 1 M HCl ya da 1 M NaOH, pH’ı istenilen seviyeye (1-10) getirmek için eklenmiş ve son hacim saf su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı altında  $4^{\circ}\text{C}$ ’de 30 dak karışmaya bırakıldıktan sonra 20000 g  $4^{\circ}\text{C}$ ’de 30 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant alınarak sirius red ile kolajen miktar tayini yapılmış ve grafik çizilmiştir.

0,5 M asetik asit içerisinde çözülmüş 5 ml kolajen ( $1,6 \text{ mgmL}^{-1}$ ) çözeltisi içerisinde, farklı derişimlerde (%0, %2, %4, %6, %8, %10 ve %12 (w/v)) 5 ml 0,5 M asetik asit içerisinde çözdürülmüş NaCl çözeltisi eklenmiştir. Karışım  $4^{\circ}\text{C}$ ’de manyetik karıştırıcı altında karışmaya bırakılmış ve 30 dakikanın sonunda 20.000 g  $4^{\circ}\text{C}$ ’de 30 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminin ardından süpernatant alınarak sirius red ile kolajen miktar tayini yapılmış ve grafik çizilmiştir.

#### **2.2.2.5. CD spektrum analizi**

CD spektrum analizi Chirascan™-Plus CD Spectrometer ve Pro-Data™ Software Suite (her ikisi de Applied Photophysics Ltd, Leatherhead,) kullanılarak ölçülmüştür. CD

spektumu 180-300 nm aralığında, 20 nm bant genişliği ile oda sıcaklığında 0.1 mm Hellma Analytics quartz küvet kullanılarak kaydedilmiştir. Kolajen örneği 0.1 mgmL<sup>-1</sup> olacak şekilde 0.5 M asetik asit ile seyreltilmiştir ve daha sonra ölçüm alınmıştır.

#### 2.2.2.6. SDS-PAGE jel elektroforezi

Koyun derisinden elde edilen kolajen örneğinin boyut analizi ve saflığının belirlenmesi için Laemmli, (1970) metodu kullanılmıştır. Bu çalışmada, %7,5'lik ayırma ve %4'lük yükleme jeli kullanılmıştır (Tablo 2.2). 10 µL kolajen örneği 14 µL 0,5 M asetik asit ile seyreltilmiş ve üzerinde 8 µL 4x SDS-page yükleme boyası eklenmiştir. 95 °C'de 5 dak. ısıtılan örneklerden 25 µL alınıp kuyucuklara yüklenmiştir. Ayırma jeline gelene kadar sistemden 90 volt (V) akım geçirilmiş, ayırma jeline geldikten sonra akım 150 volta yükseltilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel 3 saat fiksatif içerisine alınmış ve 100 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. 3 saatin sonunda fiksatif ortamdan uzaklaştırılmış ve boya çözeltisi eklenerek 1 gece 100 rpm'de çalkalanarak boyamaya bırakılmıştır. Boya çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra tekrardan fiksatif eklenip 30 dak. çalkalanmaya bırakılmıştır. 30 dak.'nın sonucunda fiksatif ortamdan uzaklaştırılıp, ortama yıkama çözeltisi eklenmiş ve bantlar açılana kadar karışmaya bırakılmıştır. Bantlar açıldıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir.

**Tablo 2. 2.** Kolajen için kullanılan SDS-page jelinin içeriği

| %7,5 Ayırma Jeli                                   |         |
|--|---------|
| Bileşen  | Miktar  |
| H <sub>2</sub> O                                   | 4,9 mL  |
| Akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v) | 2,5 mL  |
| 1,5 M Tris(pH=8,8)                                 | 2,5 mL  |
| %10 (w/v) SDS                                      | 0,1 mL  |
| %10 (w/v) amonyumpersülfat (APS)                   | 50 µL   |
| Tetrametiletildiamin (TEMED)                       | 5 µL    |
| %4 Yükleme Jeli                                    |         |
| Bileşen  | Miktar  |
| H <sub>2</sub> O                                   | 3 mL    |
| Akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v) | 0,66 mL |
| 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)                            | 1,26 mL |
| % 10 (w/v) SDS                                     | 50 µL   |
| %10 APS  | 25 µL   |
| TEMED  | 3 µL    |

### 2.2.3. Tirozinaz kısmi saflaştırılması

Tirozinaz kaynağı olarak kullanılacak olan kültür mantarı (*Agaricus bisporus*) yerel marketten temin edilmiştir. Tirozinaz saflaştırılması Haghbeen vd., (2004) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

#### 2.2.3.1. Mantar ekstraksiyonu

Yerel marketten alınan mantardan 30,305 gram tartılarak ekstraksiyon öncesi dış kaynaklı kontaminasyonu önlemek için 1 L saf su ile iyice yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından -80°C'de 1 saat bekletilmiş ve daha sonra blender yardımıyla parçalanmıştır. Ekstrakt temiz bir behere alınarak üzerine 1 mM PMSF içeren 50 mL Tris-HCl (25 mM, pH 5,8) tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dak. karışmaya bırakılmıştır. Karışmanın ardından 13,500 g 4°C'de 30 dak. santrifüj edilmiş ve üst faz alınıp amonyum sülfat çöktürmesi işlemine geçilmiştir. Her basamaktan sonra 1 mL örnek aktivite tayini, SDS-Page ve miktar tayini deneyleri için ayrılmıştır.

#### 2.2.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Bu çalışmada %35 ve %70 olmak üzere iki kademeli amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır (Wingfield, 2016). Öncelikle 11,780 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tartılıp süpernatant üzerine yavaş yavaş ilave edilerek buz altında 2 saat karışmaya bırakılmıştır. 2 saatin sonunda 15000g'de 30 dak. 4°C'de santrifüj edilmiş ve pelet uzaklaştırılarak ikinci kademe amonyum sülfat çöktürmesine geçilmiştir.

%70 amonyum sülfat çöktürmesi için santrifüj sonunda elde edilen süpernatant üzerine 13,256 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yavaş yavaş ilave edilmiş ve buz altında bir gece karışmaya bırakılmıştır. 1 gecenin sonucunda 15000g'de 30 dak. 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pelet 10 mL Tris-HCl (25 mM, pH 5.8) tamponu içerisinde çözdürülmüştür. Sephadex G-75 kolon muamelesine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Eklenen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarları aşağıdaki denkleme (denklem 1) göre belirlenmiştir.

Denklem 1. Çözeltiye eklenecek Amonyum Sülfat Miktarı

$$x = 505 \frac{S2 - S1}{1 - 0,285S2}$$

x: 1 litre çözeltiye eklenecek gram amonyum sülfat miktarı



S1: Amonyum sülfatın başlangıç derişimi (%)

S2: Amonyum sülfatın son derişimi (%)

### **2.2.3.3. Sephadex g-75 kolon ile tuz uzaklaştırılması**

Tuz uzaklaştırılması ve tirozinazın kısmi saflaştırılması için 2 g Sephadex G-75(Marka) superfine 30 mL Tris-HCl (25 mM, pH 4,8) tamponu içerisine alınarak 1 gece oda sıcaklığında şişmeye bırakılmıştır. 1 gecenin ardından akta C 16/20 kolonun alt tarafı pamuk ile kapatılarak sephadex G-75 çözeltisi yavaşça kolona doldurulmuş ve doldurma sonucunda 1,6 cm x 12 cm kolon elde edilmiştir. Kolonu dengelemek için 100 mL Tris-HCl (25 mM, pH 5.8) tamponu kolondan geçirilmiştir. Dengelemenin ardından 1 mL amonyum sülfat sonrası örnek kolona yüklenerek peristatik pompa yardımı ile 1,5 mLdak.<sup>-1</sup> akış hızında elüsyon gerçekleştirilmiştir. Elüsyon sonucunda toplanan tüplerin iletkenlikleri ölçülmüş ve Take3 Micro-Volume Plate kullanılarak 280 nm’de protein içeriklerine belirlenmiştir. Seçilen fraksiyonlar aynı tüp içerisinde toplanarak liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.3.4.Tirozinaz miktar tayini**

Tirozinaz miktar tayini için Thermo Pierce’s Bicinchoninic Acid (BCA) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem alkali ortamda proteinler tarafından Cu<sup>+2</sup>’nin Cu<sup>+1</sup>’e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme sonucu ortaya çıkan bakır katyonu BCA’da bulunan iki moleküllü şelatlar ve ortaya 562 nm’de ölçülebilen mor renk ortaya koyar (Smith vd., 1985).

Farklı derişimlerde (0,2 mgmL<sup>-1</sup>, 0,4 mgmL<sup>-1</sup>, 0,6 mgmL<sup>-1</sup> 0,8 mgmL<sup>-1</sup> ve 1 mgmL<sup>-1</sup>) Bovine Serum albümin (BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. 2,5 mL BCA Reagent A (0,1 M sodyum hidroksit içinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, BCA ve sodyum tartarat) üzerine 50 µL BCA reagent B (%4 bakır sülfat) çözeltisi eklenerek BCA Çalışma Reaktifi (WR) oluşturulmuştur. 200 µL WR 96 kuyucuklu mikropalakaya konmuş ve üzerlerine sırasıyla farklı derişimlerde 25 µL BSA çözeltisi eklenmiştir. Üzeri kapatılan mikropalaka 37 °C’de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. 30 dakikanın sonucunda 562 nm’de mikropalaka okuyucuda okunmuş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Tirozinaz miktarı,  $y = 0,0012x + 0,1278$  ( $R^2 = 0,9928$ ) denklemi kullanılarak belirlenmiştir.

### 2.2.3.5. Tirozinaz aktivite tayini

Tirozinaz aktivitesi, Duckworth ve Coleman'ın geliştirdiği L-tirozinin O<sub>2</sub> varlığında tirozinaz enziminin katalizlediği L-DOPA-kinon dönüşümünün kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır (Duckworth & Coleman, 1970). Bu yöntemde tablo 2.3'de görülen reaksiyon karışımı hazırlanıp 5 dak. boyunca O<sub>2</sub> ile muamele edilmiştir. 5 dak.'nın sonunda 2,9 ml reaksiyon karışımı quartz küvet içerisine alınmış ve üzerine 100 µL tirozinaz çözeltisi eklenmiştir. 10 dak. boyunca 280 nm'de kinetik olarak ölçüm alınmıştır. Ham ekstrat, amonyum sülfat sonrası ve jel filtrasyon sonrası tirozinaz aktivitesi denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır. 1 enzim ünitesi 25 °C'de pH 6,5'te her dakikada L-tirozin içeren 3 mL reaksiyon karışımında 280 nm'de 0,001 absorbans artışı olarak tanımlanır.

**Tablo 2.3.** Reaksiyon karışımı

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Saf Su                                | 9 ml  |
| 50 mM Potasyum fosfat tamponu, pH 6.5 | 10 ml |
| 1 mM L-Tirozin solüsyonu              | 10 ml |

$$\text{Unit/ml enzim} = \frac{\left( \frac{\Delta A_{280\text{nmTest}}}{\text{dak.}} - \frac{\Delta A_{280\text{nmBlank}}}{\text{dak.}} \right) (\text{df})}{(0,001) (0,1)}$$

**Denklem 2.** Tirozinaz aktivitesi denklemi (df : Dilüsyon faktörü; 0,001: 3 ml reaksiyon karışımı içinde 25° C'de pH 6,5'te Tirozinaz ünite başına A280nm / dakika değişim; 0,1= Ortama eklenen enzim miktarı (ml))

### 2.2.3.6. SDS-PAGE jel elektroforezi

Kültür mantarında (*Agaricus bisporus*) elde edilen tirozinaz örneğinin boyut analizi için Laemmli, (1970) metodu kullanılmıştır. Bu çalışmada %12'lik ayırma ve %4'lük yükleme jeli kullanılmıştır (Tablo 2.4). Sırasıyla kuyucuklara ham numune, amonyum sülfat sonrası ve jel filtrasyon sonrası numuneler eklemiştir. 90 volta ayırma jeline gelene kadar yürütme işlemi yapılmış, ayırma jelinden sonra akım 150 volta yükseltilmiştir. Yürütme işleminin ardından önce fiksatif daha sonrada boya çözeltisi içerisine alınıp, 1 gece çalkalayıcı içerisinde karışmaya bırakılmıştır. 1 gecenin ardından boya çözeltisi uzaklaştırılıp yıkama çözeltisi eklenmiş ve bantlar açılana kadar karışmaya bırakılmıştır. Bantlar açıldıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir.

**Tablo 2.4.** Tirozinaz için kullanılan SDS-page jelinin içeriği

| % 12 Ayırma Jeli                                    |         |
|---|---------|
| Bileşen   | Miktar  |
| H <sub>2</sub> O                                    | 3,5 mL  |
| Akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v)  | 4 mL    |
| 1,5 M Tris(pH=8,8)                                  | 2,5 mL  |
| % 10 (w/v) SDS                                      | 0,1 mL  |
| % 10 (w/v) amonyumpersulfat (APS)                   | 50 µL   |
| Tetrametiletildiamin (TEMED)                        | 5 µL    |
| %4 Yükleme Jeli                                     |         |
| Bileşen   | Miktar  |
| H <sub>2</sub> O                                    | 3 mL    |
| Akrilamid/N, N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v) | 0,66 mL |
| 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)                             | 1,26 mL |
| % 10 (w/v) SDS                                      | 50 µL   |
| % 10 APS  | 25 µL   |
| TEMED   | 2,3 µL  |

#### 2.2.4. İmmobilize tirozinaz kolon geliştirme

Bu çalışmada 3B biyoyazıcıda kullanılacak olan MADOPA'nın dönüşümü için gerekli olan poli(hidroksil metakrilat-ko-N-metakriloik-L-Histidin-Bakır(II)) ((p(HEMA-MAH-Cu(II))) kolonun sentezlenmesi, karakterizasyonu ve immobilizasyonu yapılmıştır.

##### 2.2.4.1. N-metakriloil-L-Histidin sentezi (MAH)

14,64 mmol L-histidin 20 mL NaOH (1M) içerisinde çözülerek balon içerisine alınmıştır. 20 mL 1,4-dioksan içerisinde 10,68 mmol metakroil benzotriazol (MA-Bt) çözdürülmüştür. MA-Bt çözeltisi damla damla histidin çözeltisi üzerine damlatılmış ve reaksiyon oda sıcaklığında 30 dak. karışmaya bırakılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen kalıntı su ile seyreltilmiş ve 120 mL etil asetat ile muamele edilmiştir. Muamele işleminden sonra 1 M HCl kullanılarak pH: 7 seviyesine getirilmiş ve su evaporatör kullanılarak uçurulmuştur (SAY vd., 2011).

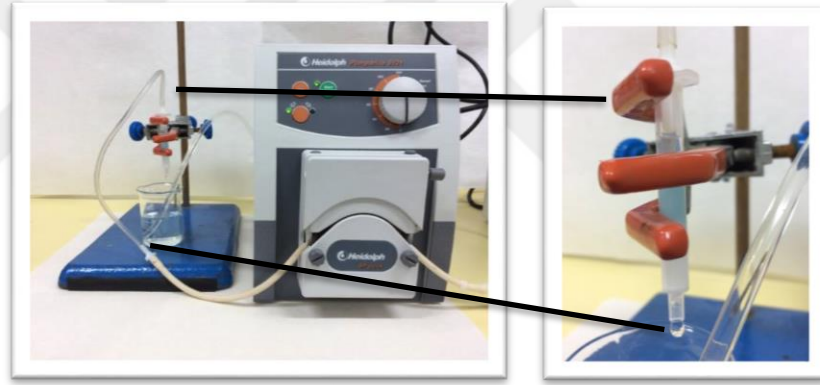
##### 2.2.4.2. Poli (HEMA-MAH) kriyojellerinin sentezlenmesi

Kriyojel kolon sentezi ANADOLUCA metodunda ufak farklılıklar yapılarak gerçekleştirilmiştir (SAY vd., 2011). Stok çözelti oluşturmak için 1045 µL saf su içerisine monomer olarak 112,5 µL HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak 21,225 mg N,N-

metilen-bis-akrilamid (MBAAm) eklenmiş ve iyice çözünene kadar karışmaya bırakılmıştır. 1 mL kriyojel kolon hazırlamak için 760  $\mu\text{L}$  stok çözelti alınıp üzerine su içerisinde maksimum doygunluk seviyesinde çözdürülmüş MAH'tan 240  $\mu\text{L}$  eklenmiş ve buz banyosunda azot altında karışmaya bırakılmıştır. 2 saatin sonunda polimerizasyon başlatıcısı olarak 10  $\mu\text{L}$  APS ve katalizör olarak 1  $\mu\text{L}$  TEMED eklenmiş ve 1 dakika karışımın ardından ucu kapatılmış enjektörlere aktarılmıştır.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına alınarak buzun çözünmesi sağlanmıştır. Saflığı engelleyecek maddelerin giderilmesi için 50 mL saf su ile yıkanmıştır.

#### **2.2.4.3. Poli (HEMA-MAH-Cu (II)) kolonun hazırlanması**

Kriyojel kolonda metal şelat kompleksinin oluşması için 20 mL  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (50 mM) 1 saat boyunca kolondan sirküle edilmiştir. 1 saatin sonunda kolon 50 ml saf su ile yıkanarak bağlanmayan bakır uzaklaştırılmıştır (Görsel 2.1).



Görsel 2. 1. Poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolon

#### **2.2.4.4. Kriyojel kolonların karakterizasyonu**

Kriyojel kolon karakterizasyonu için sırasıyla şişme testi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve FT-IR ile fonksiyonel grup analizi yapılmıştır.

#### **2.2.4.5. Şişme testi**

Poli (HEMA) ve poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonlar etüv içerisinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ağırlıkları sabit lana kadar kurumaya bırakılmıştır. Kurumanın ardından ağırlıkları tartılıp not edilmiştir. 20 mL saf su içeren ortama bırakılan kriyojel kolonlar 20 dak. sonra yaş ağırlıkları ile ölçülüp denklem 3 kullanılarak şişme kapasiteleri hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Derecesi}(\%) = \left[ \frac{W_h - W_r}{W_r} \right] \times 100$$

**Denklem 3.** Şişme derecesi formülü ( $W_h$ =Yaş ağırlık  $W_r$ = Kuru ağırlık)

#### **2.2.4.6. SEM analizi**

SEM analizi için 60 °C’de 1 gece kurutulan örnekler altın ile kaplanmış ve SEM’de yüzey analizi için görüntülenmiştir

#### **2.2.4.7. FT-IR analizi**

60 °C’de 1 gece kurutulan p(HEMA), p(HEMA-MAH) ve p(HEMA-MAH-Cu (II) kolonlardan bistüri yardımı ile yaklaşık olarak 1 mm kalınlığında kesit alınmıştır. Daha sonra bu kesit etüvde kurutulmuş potasyum bromür (KBr) ile muamele edilerek disk haline getirilmiş ve FT-IR cihazında incelenmiştir.

#### **2.2.4.8. Tirozinaz immobilizasyonu**

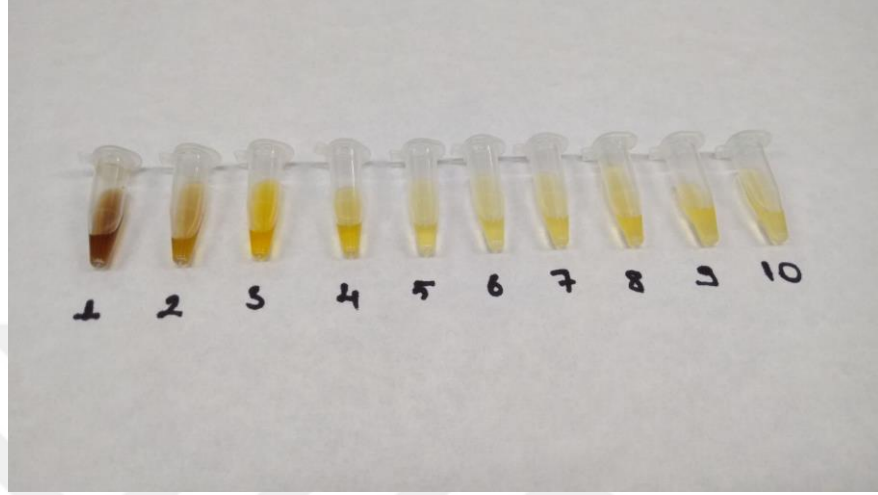
Tirozinaz immobilizasyonu için öncelikle kolonu dengelemek amacıyla 50 mL Tris-HCl (25 mM, pH 5,8) peristatik pompa yardımı ile kolondan geçirilmiştir. Akış hızı 1 mLdak.<sup>-1</sup> olacak şekilde peristatik pompa ayarlanmıştır. Daha sonra kolonun tutma kapasitesi ve veriminin hesaplanması için kısmi olarak saflaştırılan 5 mL (120 unit) tirozinaz enzimi 60 dak. boyunca kolondan sirküle edilmiştir. Enzim kolona verilmeden önce 0,25 µM membran filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlamıştır. Sirkülasyon gerçekleştirilirken belirli sürelerde (0, 5, 10, 20, 40 ve 60. dakikalarda) 100 µL örnek toplanarak tirozinaz aktivitesi ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda kolon verimliliği ve kolon tutma kapasitesinin grafiği çizilmiştir. Kör olarak aynı zaman aralıklarında p(HEMA) kolondan geçirilen tirozinaz aktivitesi ölçülmüş sonuçların karşılaştırılması sağlanmıştır.

#### **2.2.5. DOPA dönüşümü**

##### **2.2.5.1. DOPA standart grafiği**

DOPA standart grafiği Arnow, (1937) yöntemine göre yapılmıştır. 1 mgmL<sup>-1</sup> stok L-DOPA çözeltisi oluşturulmuş ve değişik derişimlerde (0,5 mgmL<sup>-1</sup>, 0,25 mgmL<sup>-1</sup>, 0,125 mgmL<sup>-1</sup>, 0,0625 mgmL<sup>-1</sup>, 0,0312 mgmL<sup>-1</sup>, 0,0156 mgmL<sup>-1</sup>, 0,007 mgmL<sup>-1</sup>, 0,003 mgmL<sup>-1</sup> ve 0,0019 mgmL<sup>-1</sup>) L-DOPA çözeltisi için seri dilüsyonlar yapılmıştır. Daha sonra farklı derişimlerdeki L-DOPA çözeltilerine sırasıyla 1 ml HCl (2 M), 1ml NaOH

(2 M), %15 sodyum molibdat (w/v) ve %15 sodyum nitrit (w/v) içeren 1 ml çözelti eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır. 1 saat sonra örneklerden 200 µl alınarak mikropilaya okuyucuda 460 nm’de ölçülmüştür ve  $y=0,0026x+0,0934$  ( $R^2 = 0,9875$ ) denkleminde sahip standart grafik elde edilmiştir (Görsel 2.2)



**Görsel 2.2.** Çeşitli derişimlerde L-DOPA standardı Serbest enzim ile DOPA dönüşümünün ölçülmesi

2,5 mM tirozin ve 2,5 mM askorbik asit içeren 8 mL Tris-HCl (pH:5.8) tampon bir beher içerisine alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında karışmaya bırakılan çözelti üzerine 1 mL (500 Unit) tirozinaz enzimi eklenmiştir. L-DOPA oluşumu için gerekli olan 10 dak. bekleme süresinden sonra 3 dak. aralıklarla 1 mL sıvı alınmış sırasıyla sırasıyla 1 mL HCl (2 M), 1 mL NaOH (2 M), %15 sodyum molibdat (w/v) ve %15 sodyum nitrit (w/v) içeren 1 mL çözelti eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır.1 saat sonra örneklerden 200 µL alınarak mikropilaya okuyucuda 460 nm’de ölçülmüştür.

#### **2.2.5.2. Serbest enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi**

2,5 mM tirozin içerecek şekilde tartılan MAT 25 mL Tris-HCl (pH: 6,8) tampon içerisine alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. İçerisine L-DOPA'nın melanine dönüşümünü inhibe etmek amacıyla 2,5 mM askorbik asit eklenmiştir. Oda sıcaklığında karışmaya bırakılan çözelti üzerine 1 mL (100 Unit) tirozinaz enzimi eklenmiştir. L-DOPA oluşumu için gerekli olan 10 dak. bekleme süresinden sonra 1 saat aralıklarla 1 mL sıvı alınmış sırasıyla 1 mL HCl (2 M), 1 mL NaOH (2 M), %15 sodyum molibdat (w/v) ve %15 sodyum nitrit (w/v) içeren 1 mL çözelti eklenmiş ve

vortekslenerek karıştırılmıştır. 1 saat sonra örneklerden 200 µL alınarak mikropilaka okuyucuda 460 nm’de ölçülmüştür.

### **2.2.5.3. İmmobilize enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi**

2,5 mM tirozin içerecek şekilde tartılan MAT ve 2,5 mM askorbik asit 25 mL Tris-HCl (pH 6,8) içerisinde çözülmüş ve oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. 0,125 mm membran filtre içerisine alınan tirozinaz immobilize edilmiş 1 mL poli (HEMA-MAH-Cu (II)) kolonun etrafı zımba yardımıyla kapatılmıştır. Bu kolon tirozin çözelti içerisine daldırılmış ve karışmaya bırakılmıştır. 12 dak. bekleme süresinden sonra 1 saat aralıklarla 1 mL sıvı alınmış sırasıyla 1 mL HCl (2 M), 1 mL NaOH (2 M), %15 sodyum molibdat (w/v) ve %15 sodyum nitrit (w/v) içeren 1 mL çözelti eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır. 1 saat sonra örneklerden 200 µL alınarak mikropilaka okuyucuda 460 nm’de ölçülmüştür.

### **2.2.6. Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipyridyl)<sub>2</sub>-Cl 3B hidrojel sargı geliştirilmesi**

% 1,1 Jelatin ile % 9 Sodyum Aljinat deiyonize su içerisinde 45-50 °C ‘de yaklaşık 2 saat karıştırılmıştır. Yaklaşık 35 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra hidrojel içerisine sentezlenen MADOPA oranı %20 olacak şekilde eklenmiştir. Hücre iyileştirmesine destek olmak amacıyla hazırlanan hidrojel içerisine %5 Kolajen ilave edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak ANADOLUCA metoduna göre sentezlenen fotosensitif monomer olan MATrp-Ru(bipyridyl)<sub>2</sub>-Cl eklenerek APS eşliğinde ışığa duyarlı çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yara iyileştirici özelliği olan doku iskelelerini 3B biyo-yazıcıda basmak amacıyla 3D Bioplotter TM system (EnvisionTEC, 4th generation) biyo-yazıcı kullanılmıştır.

#### **2.2.6.1. Geliştirilen biyo-mürekkep ile 3B biyo-yazım işlemi**

Hazırlanan fotosensitif monomer içeren hidrojel 3B biyo-yazıcı ile tablo 2.3’de gösterilen parametreler altında basılmıştır.

**Tablo 2. 5.** 3B biyo- yazıcıda kullanılan parametreler

|  |                 |
|--|-----------------|
| İğne Çapı (mm)                         | 0,25            |
| Yazma Sıcaklığı (°C)                   | 26 °C – 29 °C   |
| Yazma (XY) Hızı (mm/s)                 | 10 – 12         |
| Basınç (bar)                           | 1,2 – 1,5       |
| Akış öncesi ve sonrası gecikme (s)     | - 0,1 – 0,1     |
| Kullanılan Mürekkep MiktarıAmount (µL) | ~ 100           |
| Yazma süresi (s)                       | 60              |
| Boyutlar (mm) (X x Y x Z)              | 10 x 13,5 x 0,8 |

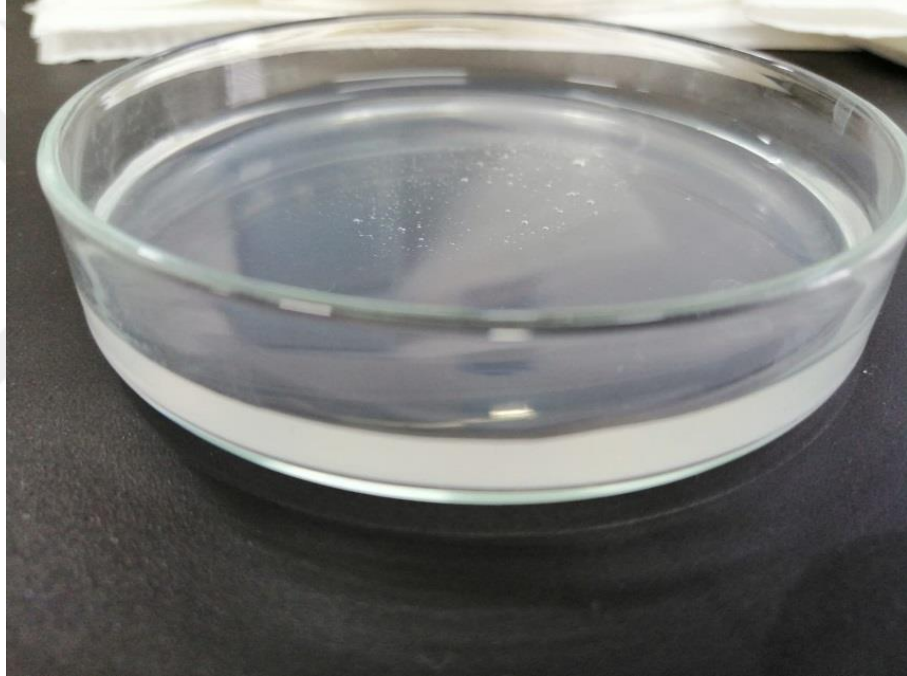




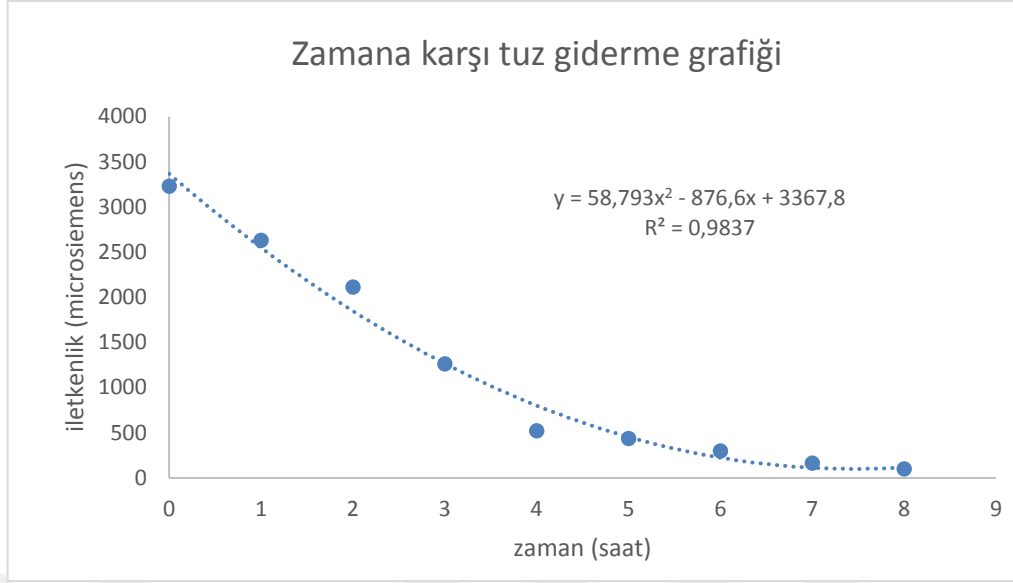
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Kolajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu

50 g koyun derisi ile başlanan kolajen izolasyonu toplamda 7 gün sürmüştür. 6. günün sonunda kolajen örneği manyetik karıştırıcı altında karışamayacak seviyede viskoz hale geldiği gözlemlenmiştir. Kolojen çözünebilir hale geldikten sonra 50k Amicon Ultra-15 ultra santifijüf tüp kullanılarak ortamdaki NaCl uzaklaştırılmıştır (Görsel 3.1) Başlangıçta NaCl miktarından dolayı ortamın iletkenlik değeri 3230  $\mu\text{S}$  iken 8 saatin sonunda ortamdaki iletkenlik değeri 101  $\mu\text{S}$ 'a düşürülmüştür (Şekil 3.1). Bu durumda çöktürme işlemi için kullanılan tuz 8 saat sonunda ortamdaki uzaklaştırılmıştır.



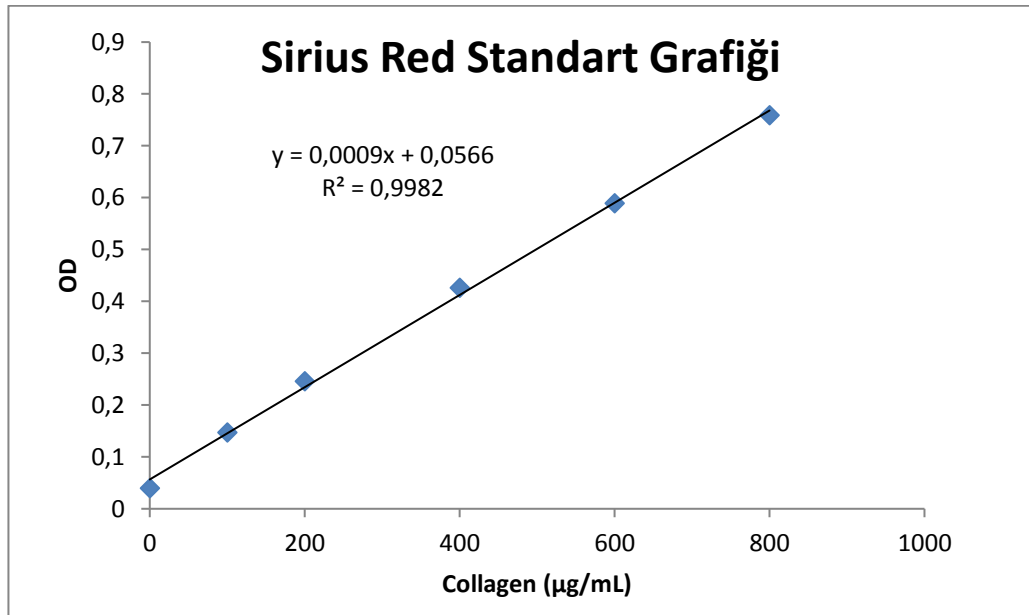
**Görsel 3. 1.** *Saflaştırma işleminden sonra kolajen çözeltisi*



**Şekil 3. 1. Tuz giderme grafiği**

### 3.1.1. Sirius red ile kolajen miktar tayini

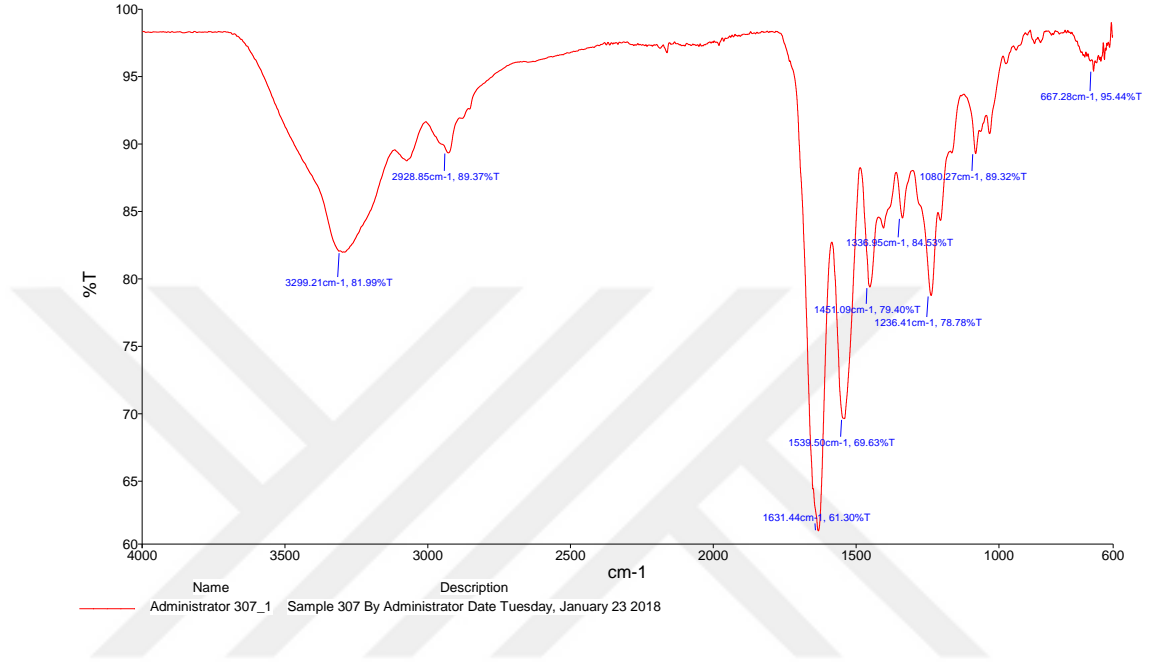
Sirius red boyasının azalan miktarına göre çizilen şekil 3.2’de görüldüğü gibidir. 50 g deri ile başlanan izolasyon işlemi sonucunda 60 ml kolajen çözeltisi elde edilmiştir. Kolajenin son derişimi  $200,222 \text{ mgmL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. 50 g deriden ekstrakte edilen toplam kolajen miktarı 12,012 g’dır. Saflaştırma verimi ise %24.024 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 3.2. Sirius red standart grafiği**

### 3.1.2. FT-IR-ATR

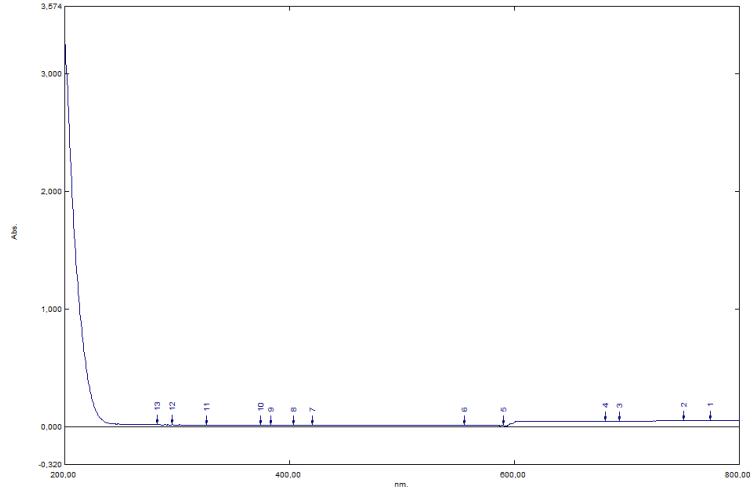
Koyun derisinden izole edilen kolajen'in FT-IR spektrumu şekil 3.3'de görüldüğü gibidir. Kolajene ait karakteristik bantlar 3299  $\text{cm}^{-1}$  görülen Amid A bandı, 2928  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen Amid B bandı, 1631  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen keskin Amid I bandı, 1539  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen Amid II bandı ve 1236  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen Amid III bandıdır.



Şekil 3.3. Kolajen FT-IR spektrumu

### 3.1.3. Uv-Vis spektroskopisi

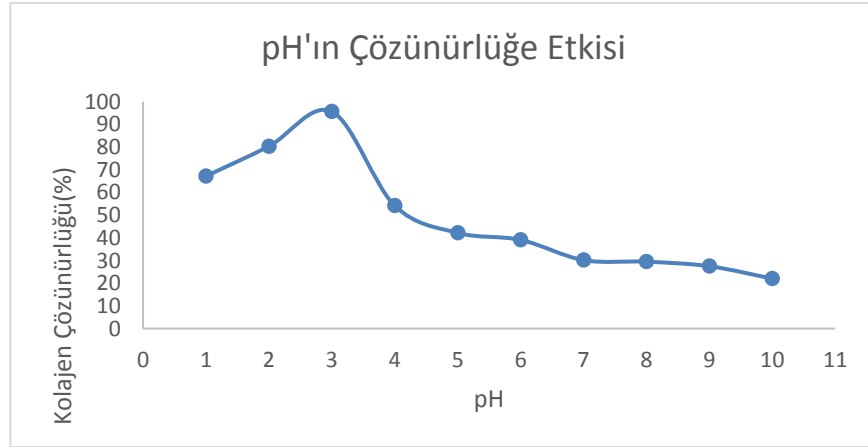
Uv-vis sonucuna göre kolajen örneği 200 nm'de yoğun bir pik vermiştir. (Şekil 3.4) Başka hiçbir bölgede pik görünmemektedir.



Şekil 3. 4. Kolajenin Uv-Vis spektroskopisi

### 3.1.4. Farklı pH ve NaCl derişimlerinde çözünürlük testi

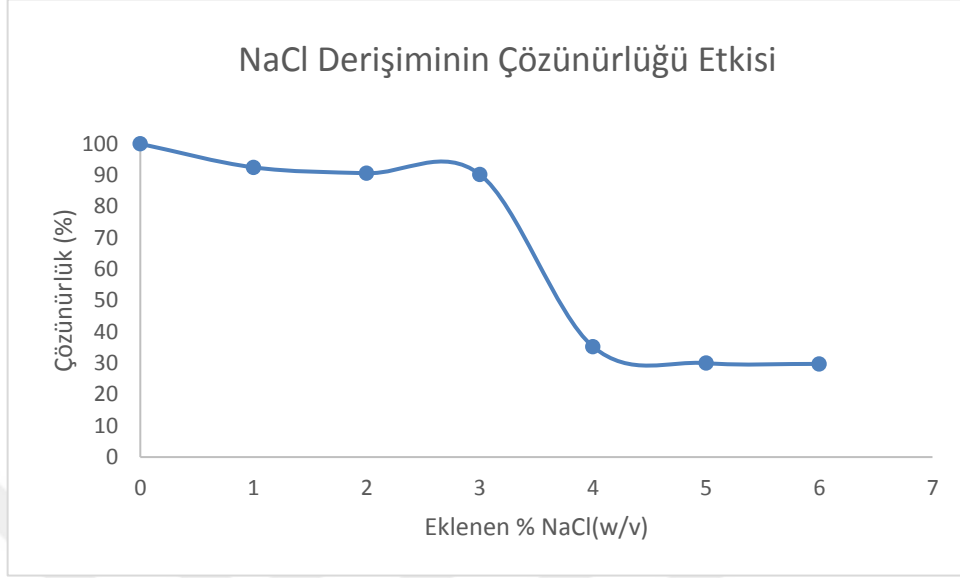
pH ve NaCl derişiminin çözünürlük üzerine etkileri şekil 3.5 ve şekil 3.6'da gösterilmiştir. Koyun derisinden elde edilen kolajenin maksimum çözünürlüğünün pH 3'te olduğu bulunmuştur. pH artışı ile çözünürlük arasında ters bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle pH 3 üzerinde kayda değer bir çözünürlük kaybı olduğu tespit edilmiştir. pH 7 ile 10 arasında çözünürlük en düşük değerlere ulaşmıştır ve neredeyse %70'e yakın çözünürlük kaybı vardır.



Şekil 3. 5. Kolajenin çözünürlüğüne pH'in etkisi

Tuz derişimlerinin çözünürlük üzerine etkisine baktığımızda, pH'e benzer sonuçlar görülmektedir. Artan tuz derişimi çözünürlüğü negatif etkilemektedir. %3 tuz derişimi

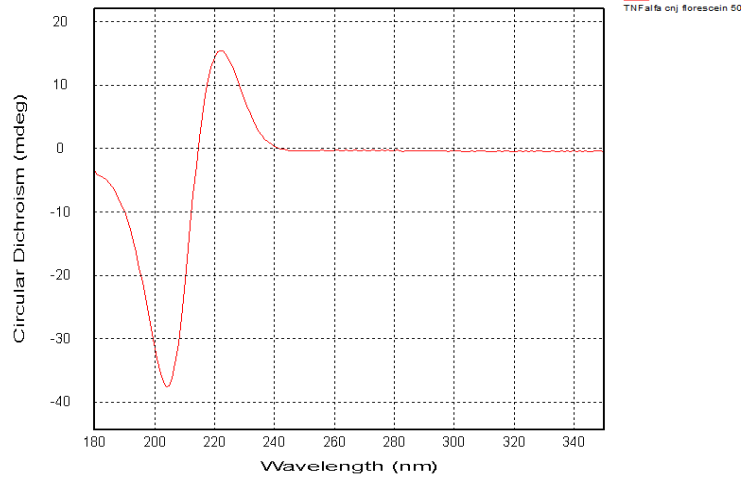
kolajen çözünürlüğü için maksimum değerdir. %4 tuz derişiminde çok keskin bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.6. Kolajenin çözünürlüğüne NaCl derişiminin etkisi

### 3.1.5. CD spektrum analizi

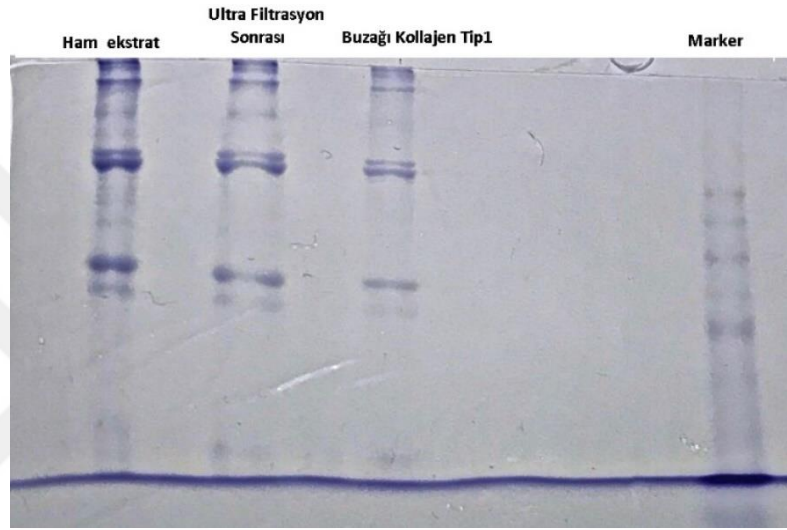
Koyun derisinden izole edilen kolajenin CD spektrumuna bakıldığında, 205 nm’de minimum pik ve 221 nm’de maksimum pik gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca sıfır rotasyonu yaklaşık olarak 212 nm’dir (Şekil 3.7). Bu pik değerleri üçlü sarmal yapının spektrum değerleri ile aynıdır (Jeness, Sprecher, & Johnson, 1976).



Şekil 3.7. Kolajenin CD spektrumu

### 3.1.6. SDS-Page

Koyun Derisinden elde edilen kolajenin SDS-page görüntüsü görsel 3.2’de görüldüğü gibidir. Markera ait SDS-jel problemi yaşanmıştır. Fakat standart numune ile ham ekstrakt ve sephadex sonrası numune karşılaştırıldığında bire bir aynı yapılar görülmektedir. Ultrafiltrasyon sonrası örneği bant aralıklarında simir görüntüsünün olmaması, ultrafiltrasyon tüpü ile sadece tuzun değil, kontaminasyonlarında uzaklaştırıldığını göstermektedir.

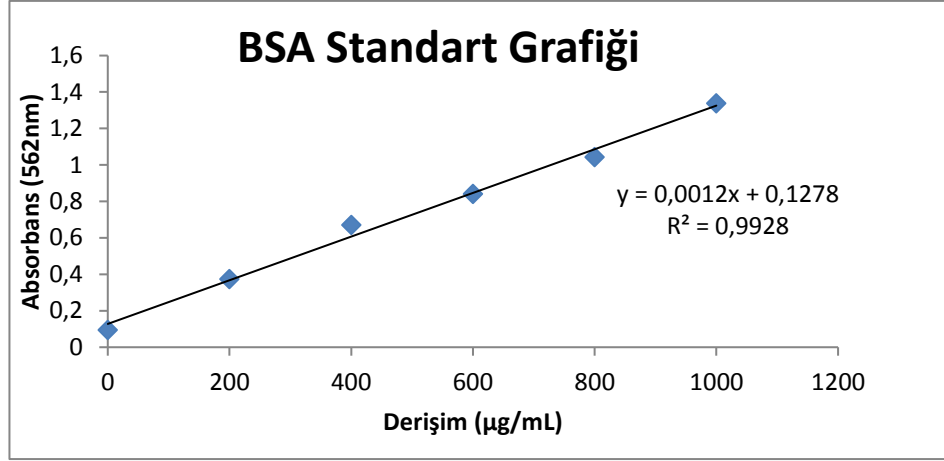


Görsel 3.2. Kollajen SDS-page görüntüsü

## 3.2. Kısmi Tirozinaz Saflaştırılması

### 3.2.1. Mantar ekstraksiyonu

Tirozinaz kısmi saflaştırma işlemi için 50 mL Tris-HCl (25 mM, pH 5.8) tamponu kullanılmıştır. Her basamak sonrası 2 mL numune ayrılmış ve numunelerin protein miktarları şekil 3.8’de görülen BSA standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında ham numunenin protein miktarı  $2,469 \text{ mgmL}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Litaratür ile karşılaştırıldığında elde edilen ham numune miktarının ortalama bir değer olduğu bulunmuştur (Haghbeen vd., 2004; Velichkova, 2015; Zaidi vd., 2014).



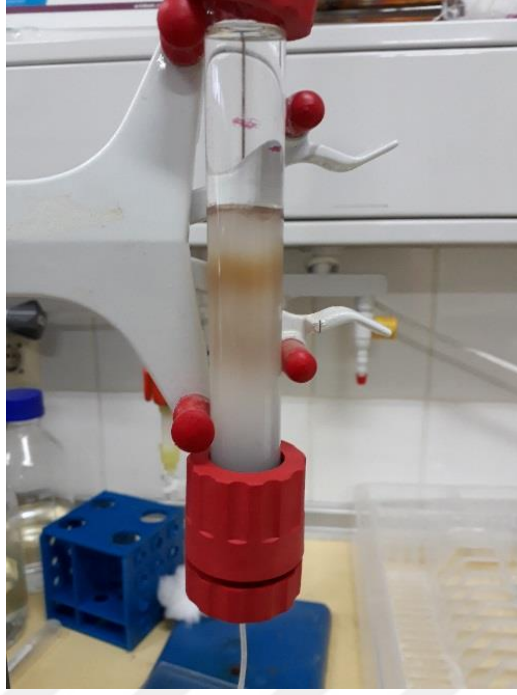
Şekil 3.8. BSA standart grafiği

### 3.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

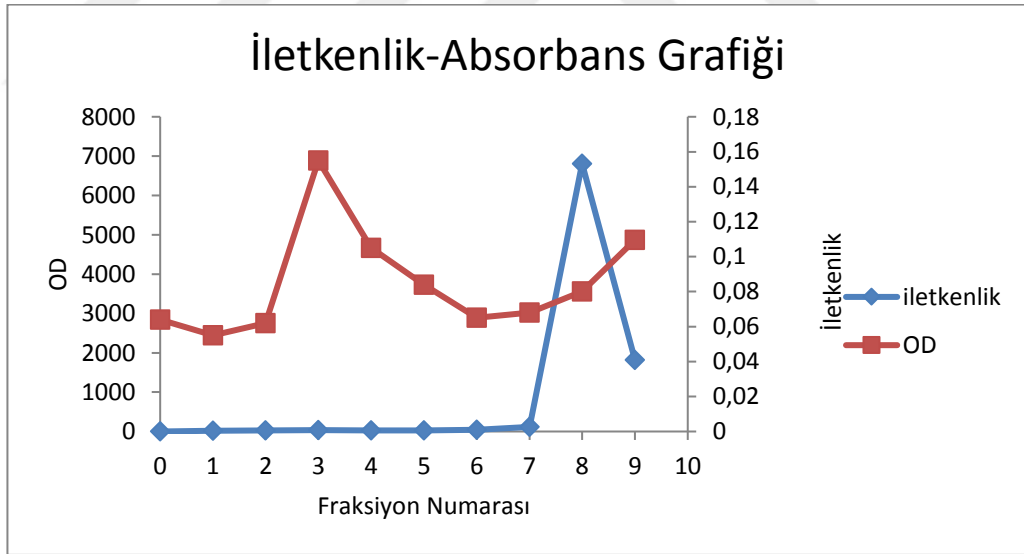
Mantar Ekstraksiyonundan sonra proteinlerin çöktürülmesi için %35 ve %70 amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmıştır. Çöktürme sonucunda pelet minimum hacimde (10 ml) Tris-HCl (25 mM, pH 5,8) tamponu içerisinde çözülmüştür. Amonyum sülfat sonrası numunenin protein miktarı  $0,896 \text{ mgmL}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3. Sephadex g-75 kromatografisi

Amonyum Sülfat çöktürmesinden sonra 10 ml Tris-HCl (25 mM, pH 5.8) tamponda çözülen pelet, tuzun ve diğer proteinlerin ayrılması için sephadex g-75 kolona (Görsel 3.3) yüklenmiş ve şekil 3.9'de görülen grafik elde edilmiştir. Grafikteki sonuçlara göre 3, 4 ve 5 numaralı fraksiyonlar yüksek absorbans değeri ve düşük tuz oranı nedeniyle aynı havuz içerisinde toplanmıştır. Jel filtrasyon işleminin ardından 40 mL örnek toplanmıştır. Sephadex G-75 sonrası numunenin protein miktarı  $0,094 \text{ mgmL}^{-1}$  olarak bulunmuştur.



Görsel 3.3. Sephadex g-75 kolon



Şekil 3.9. İletkenlik absorbans grafiği

#### 3.2.4. Tirozinaz aktivite tayini

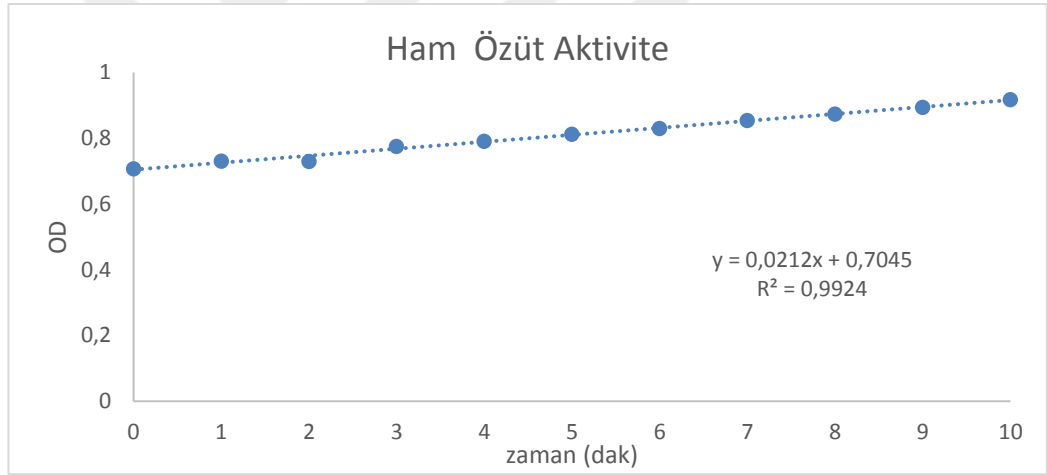
Ham ekstrat, Amonyum sülfat sonrası ve sephadex sonrası elde edilen numunelerden tirozinaz aktivite tayini yapılmıştır (Şekil 3.10, 3.11, 3.12). Tirozinaz aktiviteleri 10 dakikalık kinetik ölçüm sonucunda sırasıyla 210 U/mL, 769 U/mL ve 126



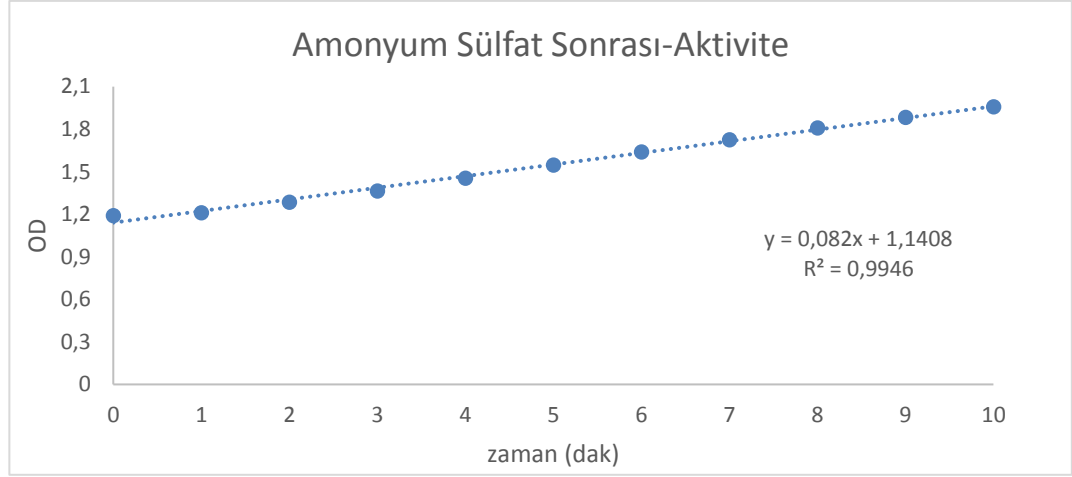
U/mL olarak hesaplanmıştır. Spesifik aktivite oranları, saflaştırma derecesi ve % verim tablo 3.1’de gösterildiği gibidir.

**Tablo 3. 1.** *Tirozinaz saflaştırma karşılaştırması*

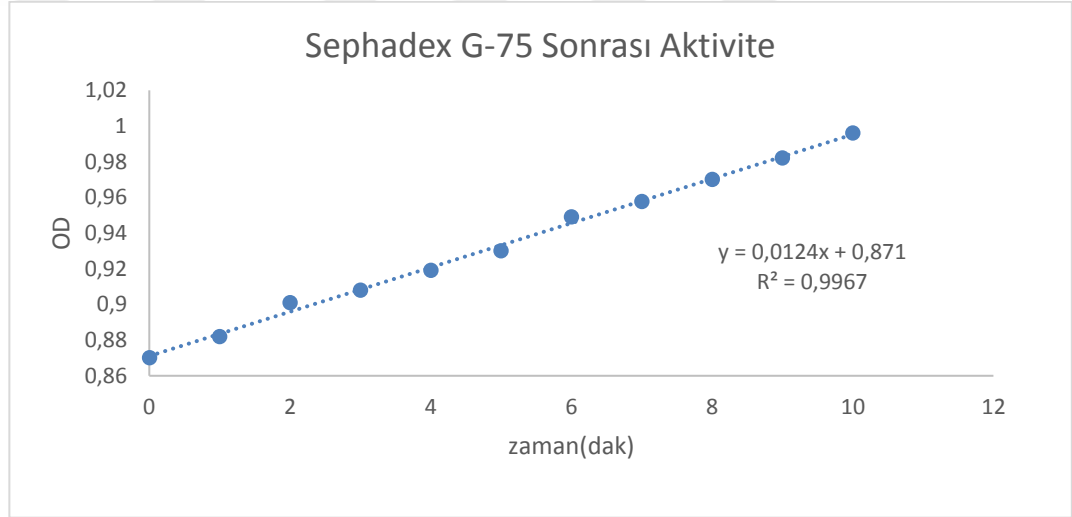
|                | Hacim (ml) | Toplam protein (mg) | Aktivite (U/ml) | Toplam Aktivite (U) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Saflaştırma derecesi | Verim (%) |
|----------------|------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------------|----------------------|-----------|
| Ham ekstrat    | 50         | 123,45              | 210             | 10500               | 85,05                    | 1                    | 100       |
| Amonyum Sülfat | 10         | 8,96                | 769             | 7690                | 858,258                  | 10,09                | 73,23     |
| Sephadex       | 40         | 3,79                | 126             | 5040                | 2210,81                  | 25,99                | 48        |



**Şekil 3.10.** *Tirozinazın ham özüt aktivitesi*



Şekil 3. 11. Tirozinazın amonyum sülfat sonrası aktivitesi



Şekil 3. 12. Tirozinazın sephadex g-75 sonrası aktivitesi

### 3.3. İmmobilize tirozinaz kolonu

1 saat boyunca MAH-Cu(II) metal şelat kompleksi oluşturmak için 20 mL  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (50 mM) poli(HEMA-MAH) kolondan sirküle edilmiştir. 1 saatin sonunda bağlanmayan Cu(II) 50 mL saf su kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Toplamda 2 saatin sonunda poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolon mavi renge dönüşmüştür (Görsel 3.4 ).



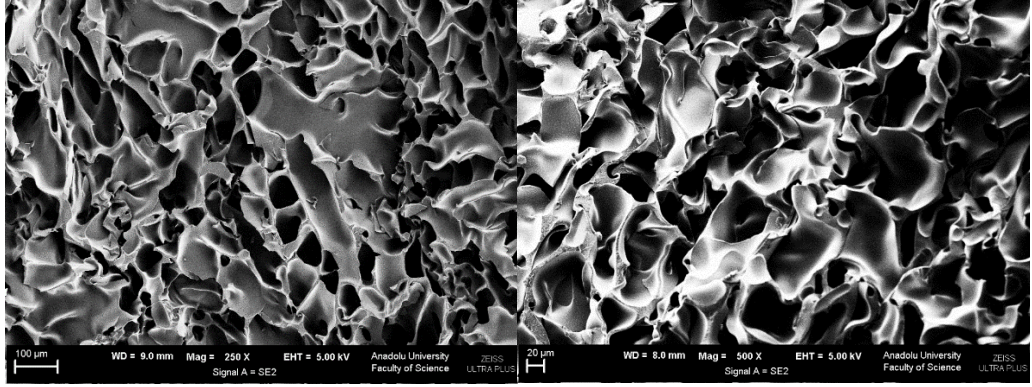
**Görsel 3. 4.** *Poli (HEMA-MAH) ve Poli (HEMA-MAH-Cu(II)) kolon*

### **3.3.1. Şişme testi**

Tirozinaz saflaştırılması için hazırlanan poli(HEMA-MAH-Cu (II)) ve kontrol grubu olarak kullanılan poli(HEMA) kolon 37 °C'de etüvde kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından ağırlıkları tartılmıştır.  $W_r$ (poli-HEMA) kolon 0,106 gram ve  $W_r$  (poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolon ise 0,156 gram bulunmuştur. 30 dakika su içerisinde bırakılan kolonlar tekrardan ölçülmüş,  $W_h$ (poli-HEMA) 1.204 g ve  $W_h$ (poli-HEMA-MAH-Cu(II)) 2.096 gram olarak bulunmuştur. Denklem kullanılarak yüzde şişme kapasiteleri bulunmuştur. Buna göre poli(HEMA) kriyojel kolonun şişme kapasitesi %1026, poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonun şişme kapasitesi ise %1244 olarak hesaplanmıştır. Yüksek şişme kapasitesine sahip kriyojeller büyük porlara sahiptir ve çapraz bağları daha kuvvetlidirler.

### **3.3.2. SEM ile yüzey morfolojisi analizi**

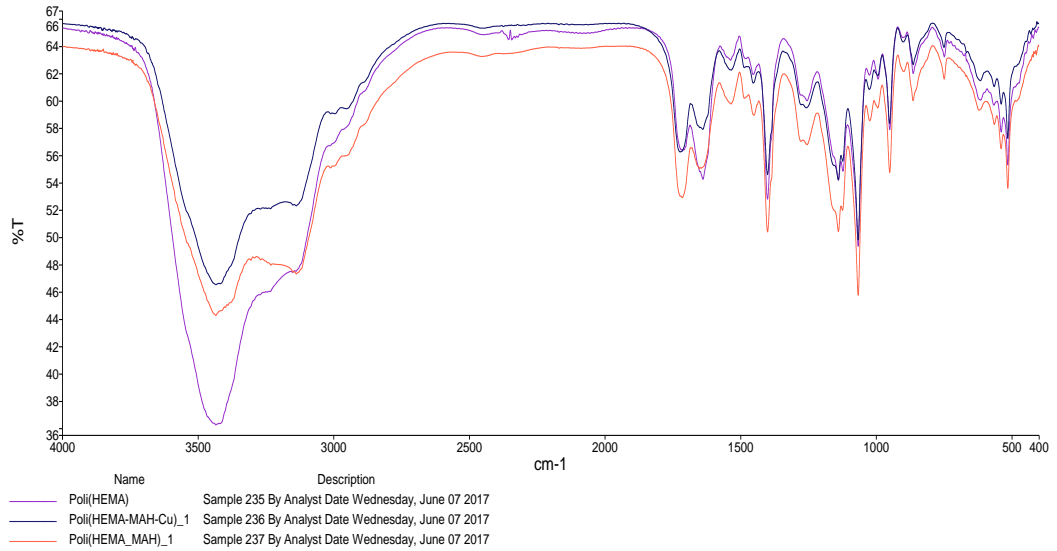
Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarının SEM görüntüleri (Görsel 3.5) sonucunda por büyüklüklerinin 20-100  $\mu\text{m}$  civarı olduğu gözlemlenmiştir.



Görsel 3. 5. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarının SEM görüntüleri

### 3.3.3. FT-IR

Poli(HEMA), poli(HEMA-MAH) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarına ait FT-IR analizleri sonucunda (Şekil 3.13) pikler  $3420\text{ cm}^{-1}$ 'de (-OH gerilme),  $2950\text{ cm}^{-1}$ 'de (CH<sub>2</sub> gerilme)  $1728\text{ cm}^{-1}$ 'de (C=O) ve  $1250\text{-}849\text{ cm}^{-1}$  aralığında (C-O ve C-O-C gerilme frekansları) gözlemlenmiştir. Bu pik aralıkları poli(HEMA)'ya ait karakteristik piklerdir ve HEMA'nın varlığını göstermektedir. Metal şelat kompleksi oluşumu sırasında kolonda herhangi bir fonksiyonel grup kaybı gözlemlenmemiştir.



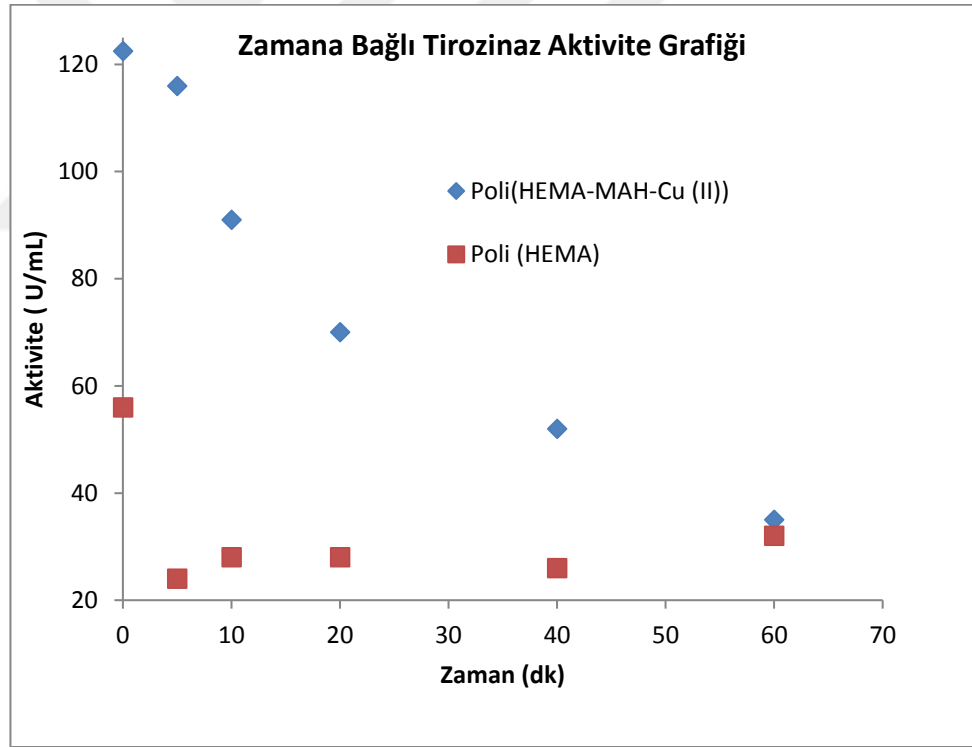
Şekil 3. 13. Poli(HEMA), poli(HEMA-MAH) ve poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonlarına ait FT-IR analiz sonuçları

### 3.4. Tirozinaz immobilizasyonu

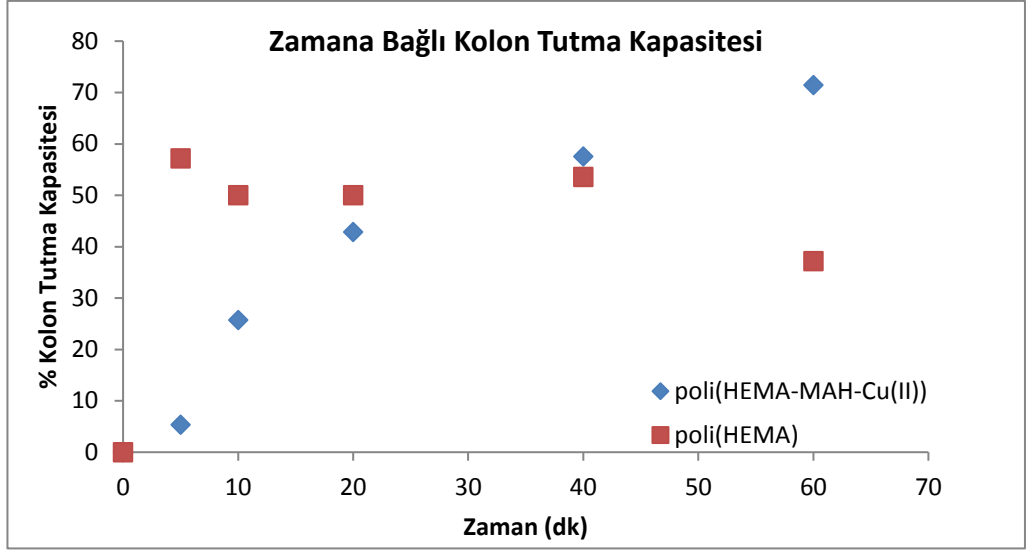
60 dak sonucunda kolonun tirozinaz tutma kapasitesi ve aktivite grafiği şekil 3.14'de görüldüğü gibidir. 122,5 U tirozinaz enzimi ile başlanan sirkülasyon deneyi

sonucunda poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolondan okunan son aktivite değeri 35 U'dur. 0,5, 10, 20, 40 ve 60. dakikalarda alınan ölçümlerde aktivite değerinin kademeli olarak azaldığı bulunmuştur. 1 ml poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonun 60 dakika sonucunda tutabileceği tirozinaz aktivite değeri 87.5 U olarak ve poli(HEMA-MAH-Cu (II)) kolon verimi ise % 71,43 olarak hesaplanmıştır.

Kontrol grubu olarak kullanılan poli (HEMA) kolonda 56 U enzim 60 dak boyunca sirküle edilmiştir. 60 dakikanın sonunda kolondan son ölçülen tirozinaz aktivitesi 32 U'dur. Zamana bağlı olarak tirozinaz aktivitelerinde anlamlı bir değişim bulunamamıştır (Şekil 3.14). Bu durum poli(HEMA) kolon ile tirozinaz arasında immobilizasyonu sağlayacak aktif grup olmaması ile doğru orantılıdır. Poli (HEMA) kolonun verimi %42,86 olarak bulunmuştur (Şekil 3.15). Fakat zamana bağlı olarak düşen kolon verimi göz önüne alındığında, bu değer ilerleyen zamanlarda daha da düşeceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 14. Zamana bağlı tirozinaz aktivite grafiği

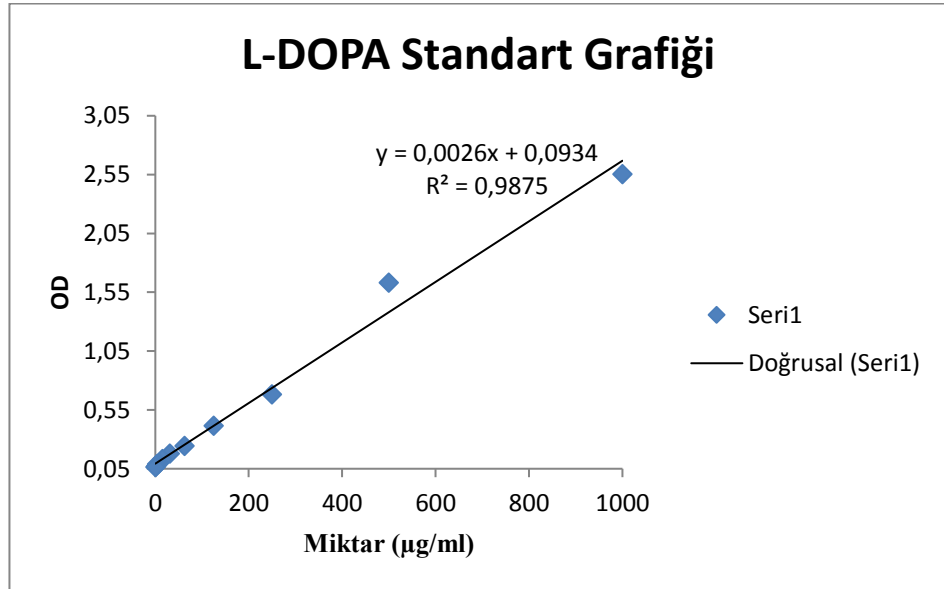


Şekil 3.15. Zamana bağlı kolon tutma kapasitesi

### 3.5. DOPA Dönüşümü

#### 3.5.1. DOPA standart grafiği

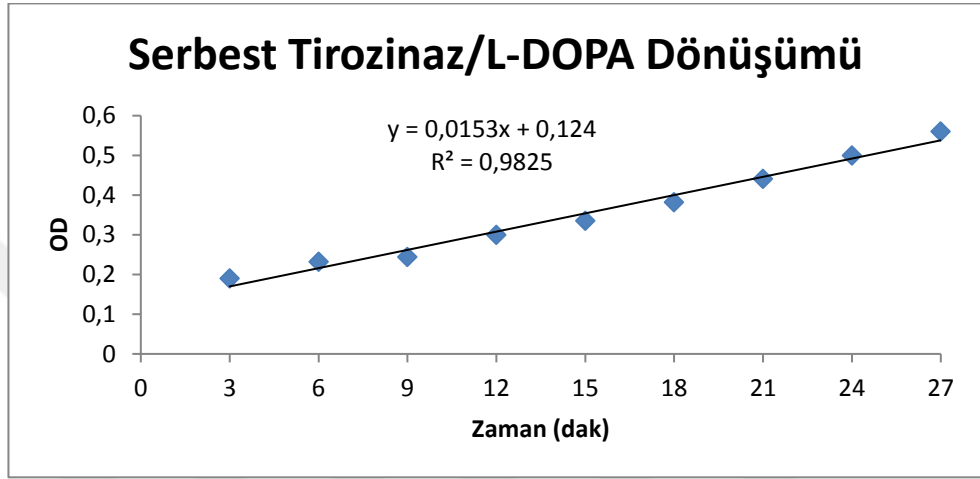
DOPA dönüşümünün ölçülmesi için kullanılacak DOPA standart grafiği bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki grafik elde edilmiştir (Şekil 3.16). Seri dilüsyonlar sonucunda  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ile  $1,953 \text{ } \mu\text{g/ml}$  arasında DOPA standart grafiği çizilmiştir.



Şekil 3.16. L-DOPA standart grafiği

### 3.5.2. Serbest enzim ile DOPA dönüşümünün ölçülmesi

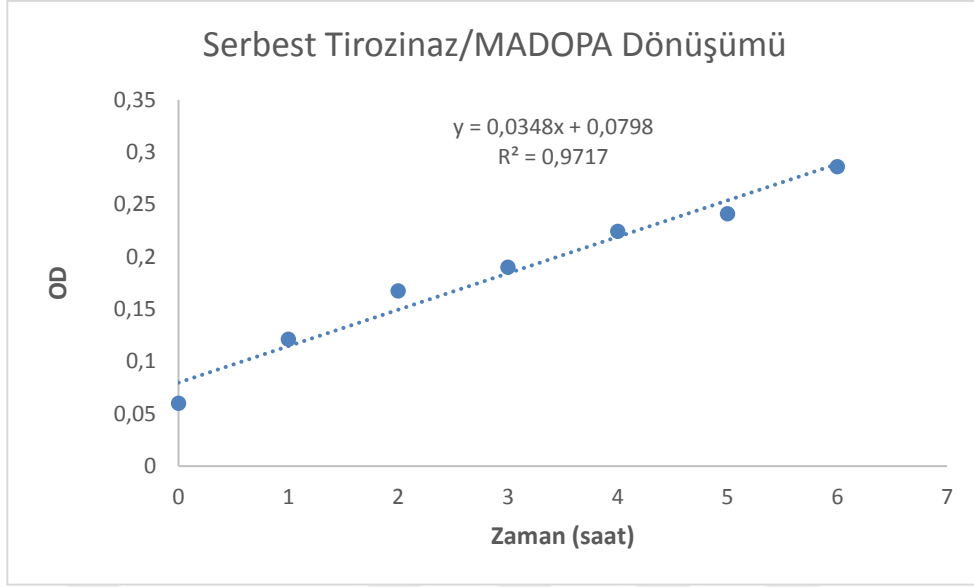
Ortama konulan 500-unit tirozinaz enzimi ile DOPA dönüşümünün zamana bağlı değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3.17). L-DOPA oluşumu için gerekli olan 10 dak. bekleme süresinden sonra her 3 dakikada bir alınan örneklerdeki L-DOPA miktarı hesaplanmıştır. 27 dakikanın sonunda elde edilen L-DOPA derişimi 179,461  $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Elde edilen toplam L-DOPA miktarı ise 1,435 mg'dır.



Şekil 3. 17. Serbest tirozinaz/L-DOPA dönüşümü

### 3.5.3. Serbest enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi

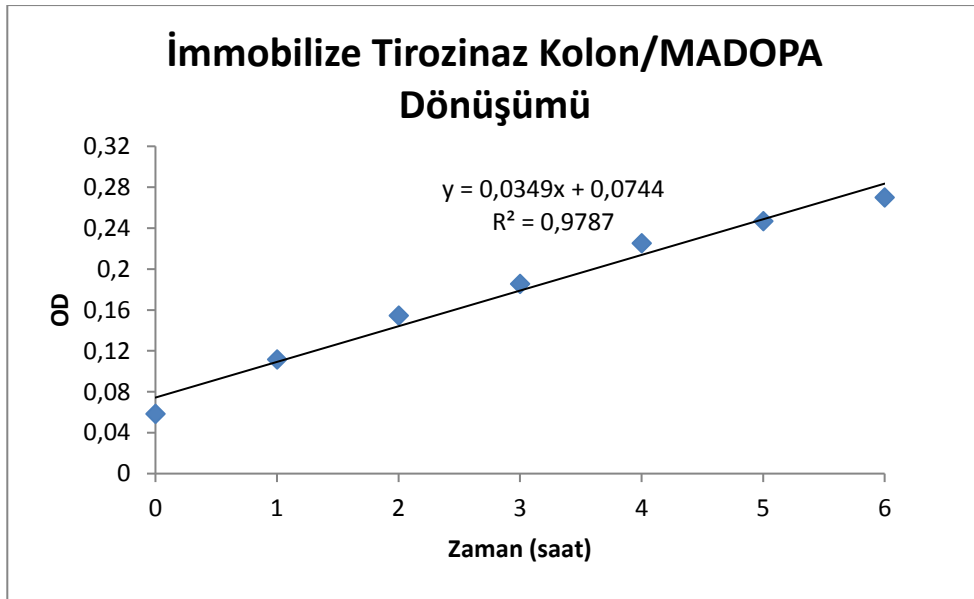
Serbest enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi için 100 U tirozinaz enzimi kullanılmıştır. 100 U enzim poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolonunun absorblayabileceği maksimum enzim miktarıdır. Her saat başı alınan 1 mL örnek DOPA dönüşümünün ölçülmesi için kullanılmıştır (Şekil 3.18). 6 saatin sonunda elde edilen MADOPA derişimi 74,07  $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Elde edilen toplam MADOPA miktarı ise 1,851 mg'dır.



Şekil 3. 18. Serbest tirozinaz/MADOPA dönüşümü

#### 3.5.4. İmmobilize enzim ile MADOPA dönüşümünün ölçülmesi

100 U tirozinaz enzimi absorblanmış immobilize tirozinaz kolon ile yapılan çalışmalarda 6 saatin sonunda elde edilen MADOPA derişimi 67,923 µg/mL'dir (Şekil 3.19). Elde edilen toplam MADOPA miktarı 1,698 mg'dır. Serbest enzim ile karşılaştırıldığında MADOPA üretiminde 0,153 mg'lık bir kayıp görünmektedir. İmmobilize enzim ile serbest enzim arasında %8,266'lık verim kaybı olduğu bulunmuştur.

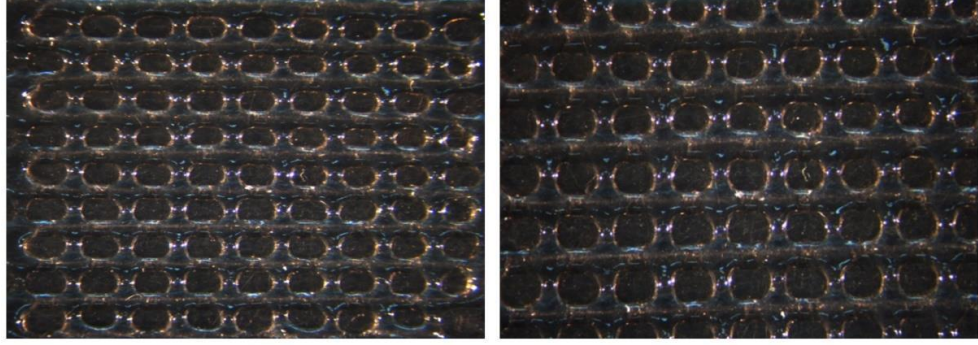


Şekil 3. 19. İmmobilize tirozinaz kolon/MADOPA dönüşümü



### 3.6. 3B Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipyridine)<sub>2</sub>-Cl Hidrojel Sargı

3B biyoyazıcı ile elde edilen Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-Ru(bipyridine)<sub>2</sub>-Cl 3 boyutlu doku iskelelerinin şişme oranı %465 olarak bulunmuştur. Şekil 3.20’de elde edilen doku iskeletinin optik mikroskop altındaki fotoğrafları görüntülenmiştir.



*Şekil 3. 20.* Optik mikroskop altında 3B doku iskeletinin görüntüsü

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolajen kaynağı olarak çeşitli canlıların kullanıldığı literatürde bolca bulunmaktadır. Genel olarak kolajen kaynağı olarak inek, domuz, balık, tavuk, fare ve deniz omurgasızları kullanılmaktadır (Silvipriya vd., 2015). Bu çalışmada maliyeti düşük, bulunması kolay ve kolajen içeriği yüksek olduğu bilinen koyun derisi kullanılmıştır. Kolajen izolasyonu sonucunda elde edilen verim %24.024 olarak hesaplanmıştır.

Uv-vis spektrumunda görüldüğü gibi belirgin kolajen absorbanı 200 nm civarında görülmüştür. Genel olarak triptofan, tirozin ve fenilalanin 280 nm civarında ışığı absorbe eder (Lin & Liu, 2006). Triptofan kolajende hiç bulunmaz ve kolajen ihmal edilebilir miktarda tirozin içerir (Kittiphattanabawon vd., 2005). Bu sonuçlar kolajen olmayan proteinin ortamdaki uzaklaştırılmasının yüksek derecede etkili olduğunu göstermektedir.

CD spektrum sonuçları incelendiğinde, 205 nm'de minimum pik ve 221 nm'de maksimum pik ve sıfır rotasyonu yaklaşık olarak 212 nm olduğu görülmüştür. Bu pikler tipik olarak üçlü sarmal yapının pikleridir (Ikoma vd., 2003). Ayrıca CD spektrumundan düzgün pik alabilmek için ortama konulan numunenin %95 saflıkta olması gerektiği literatür tarafından bildirilmiştir (Greenfield, 2006). Bu durumda elde edilen kolajen örneğinin en az %95 saflıkta olduğu söylenebilir.

Koyun derisinden izole edilen kolajenin çözünürlüğüne pH'ın etkisine baktığımızda pH 3'ün üstünde çözünürlüğüm azalmaya başladığı bulunmuştur. Düşük çözünürlük pH 7 ile 10 arasında gözlenmiştir. Bir protein, pH değerleri izoelektronik noktanın (pI) altında veya üstünde olduğunda net negatif veya pozitif yüke sahiptir. Protein pI değerine ulaştığında net yükü 0 olur ve protein çökmeye başlar (Nahar vd., 2017). Bu sonuçlar, koyun derisinden izole edilen kolajenin pH 7-10 aralığında pI değerine ulaştığı ve proteinin net yükünün 0 olduğunu göstermektedir. Bu durum protein çökmesi ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, pI'den daha düşük pH'larda, protein moleküllerinin yüklü kalıntıları arasındaki itme kuvvetleri, çekme kuvvetlerinden daha büyüktür, bu da proteinin çözünmesine neden olur (Nahar vd., 2017).

NaCl derişiminin çözünürlük etkisi üzerine baktığımızda %4 tuz derişiminde keskin bir düşüşün olduğunu görmekteyiz. Artan tuz derişimi ile çözünürlük arasında negatif bir ilişki vardır. Nalinanon vd., (2007) *Priacanthus tayenus* ile yaptıkları

çalışmada benzer sonucu bulmuşlardır. Bu durum tuz derişimi ile doğru orantılı olarak ortaya çıkan ‘salting out’ etkisi ile açıklanabilir (Endo, Pfennigsdorff, & Goss, 2012).

Mantar, homojenizasyon işlemleri sırasında kolayca oksitlenen çok sayıda fenolik bileşik içerir. Mantar ekstresinin fenolik içeriğinin oksidasyonu ve ardışık polimerizasyonu üzerine melaninlerin makromolekülleri oluşur. Mantardan tirozinazın saflaştırılması, mantarda doku miktarının azlığı ve bu dokularda yüksek melanin içeriğinden dolayı zordur (Zaidi vd., 2014). Tüm olası reaksiyonları durdurmak için Jolley vd., (1974) mantarı sıvı azot içerisinde homojenize etme yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntem aşırı düşük sıcaklıklarda çalışıldığı ve sıvı azot gerektirdiği için aşırı zahmetlidir. İkinci olarak sıvı azot içerisinde homojenizasyon gerçekleştirildikten sonra elde edilen yapı sulu ortama aktarılacağı için melanin oluşumunu tetikleyecektir. Bu çalışmada uygulanan yöntemde ise; fenolik bileşiklerin oksitlenmesini engellemek için -80 °C’de 1 saat bekletme yöntemi seçilmiştir. 1 saatin ardından blenderda parçalanmış mantar, soğuk tampon içerisine alınarak oda sıcaklığında 30 dak. karışmaya bırakılmıştır. Bunun sonucunda düşük sıcaklıklarda fenolik bileşiklerin oksitlenmesi en aza indirgenmiş olur. Sephadex g-75 hem tuzun hem de büyük oranda fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Haghbeen vd., (2004) tüm işlemler sonucunda saflaştırma derecesini 104 bulurken Zaidi vd., (2014) 16.36 bulmuşlardır. Bu çalışmada ise saflaştırma derecesi 25,99 bulunmuştur. Bu durum yüksek saflaştırma derecesinin birbirini izleyen ion değişim ve jel filtrasyon kromatografisi sayesinde olduğunu göstermiştir. Kısmi saflaştırma göz önüne alındığında elde edilen değer çöktürme bazında değerlendirildiğinde, en yüksek değer olarak bu çalışmada gözlemlenmiştir.

Sentezlenen poli(HEMA-MAH-Cu(II)) elektron mikroskobu, şişme testi, FT-IR ile karakterize edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda kriyojel kolonun gözenek boyutları 20-200 µm arasında bulunmuştur. Bu boyutlar Yun vd., (2009) yaptığı çalışma ile benzerlik gösterir. 100 µm'ye kadar birbiriyle bağlantılı gözeneklere sahip süper-gözenekli yapılar, matrisin tıkanması riski olmadan farklı boyutlardaki malzemelerin saflaştırılmasını sağlar. Çok küçük moleküller, örneğin metaller, toksinler, hormonlar, proteinler, plazmidler, virüsler ve hatta sağlam hücreler gibi daha büyük yapılar kriyojel kolonlar üzerinde işlenebilir (Yun et al., 2009). Poli(HEMA-MAH-Cu (II)) kolonun şişme

derecesi %1244 bulunurken Poli (HEMA) kolonun şişme derecesi % 1026 bulunmuştur. Bu durum ortamda bulunan hidrofilik grup sayısındaki artış ile doğru orantılıdır.

Tirozinazın immobilizasyon çalışmalarının sonucunda. Poli(HEMA-MAH-Cu(II)) kolon verimi % 71,43 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan poli (HEMA) kolonun tirozinaz tutma verimi %42,86 olarak bulunmuştur. Fakat poli (HEMA) kolonun zamana karşı çizilen grafiğine bakıldığında anlamlı bir sonuç görülememektedir. Sirkülasyon süresinin arttırılması sonucunda poli(HEMA) kolonda tirozinaz tutma veriminin azalacağı düşünülmektedir. Litaratürde kriyojel kolona ait litaratür bilgisi olmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

3B biyoyazıcı uygulamalarında kullanılmak üzere MADOPA dönüşümü yapılmıştır. Serbest enzim ile L-DOPA dönüşümü sırasında 500 U enzim kullanılmış ve 28 dak. sonunda 1.435 mg L-DOPA elde edilmiştir. Litaratür çalışmalarında L-DOPA dönüşümü için çeşitlik yöntemler geliştirilmiştir. Seetharam & Saville, (2002) tirozinaz enzimini zeolite üzerine immobilize ederek 500 mL reaksiyon ortamında 7 saatte 111-135 mg arası L-DOPA dönüşümünü gerçekleştirmişlerdir. Tuncagil vd.,(2009) manyetik boncuklar üzerine tirozinaz enzimini immobilize etmişlerdir. Ates vd., (2007) bakır-aljinat boncuklar kullanarak saatte 4,5 mgL<sup>-1</sup> L-DOPA üretmişlerdir. Fakat litaratürde MADOPA dönüşümü ile ilgili hiçbir kaynak yoktur. Serbest enzim ile MADOPA dönüşümü için 100 U saflaştırılmış tirozinaz enzimi kullanılmıştır. 6 saatin sonunda 1,851 mg MADOPA üretilmiştir. İmmobilize enzim ile MADOPA dönüşümü sırasında ilse %8,266'lık bir verim kaybı görülmüştür. Fakat bu durum ihmal edilebilir sınırlar içerisindedir. L-DOPA dönüşümünün MADOPA'ya göre daha hızlı olmasının en büyük sebebi kullanılan enzim aktivitesinin daha yüksek olması ve MAT bileşiğinin serbest tirozine göre daha kompleks yapıda olmasıdır.

Hidrojeller, su veya bir çözücü içine girdiğinde şişer, ancak çözünmez. Genellikle hidrojelleri tanımlamak için şişme derecesi ağ yoğunluğu, çözücü doğası, polimer çözücü etkileşim parametresi gibi birçok faktöre bağlıdır. Genel olarak hidrojellerin şişme dereceleri %280 ile 870 arasında değişiklik gösterir (Hess vd., 2016). 3B biyoyazıcı ile basılan doku iskeletinin şişme kapasitesi litaratür ile doğrusallık göstermektedir.

Özetle, Bu çalışmada ağ yapısı ile ekstraselüler matriksi taklit edebilecek, MADOPA içeriğinden dolayı hücrelerin yüksek adezyonuna izin veren büyüme,

farklılaşma ve çoğalma gibi hücrel faaliyetleri yerine getiren, yara iyileşmesini hızlandırıcı, toksik olmayan, biyouyumlu ve biyoçözünabilir hidrojel yara sargısı üretilmiştir. Ayrıca ilk defa immobilize tirozinaz kriyojel kolan kullanarak literatüre MADOPA dönüşümü kazandırılmıştır.



## KAYNAKÇA

- Ag, A. (1997). Technology update : Understanding Hydrofiber ® Technology. *In Vitro*, 14–19.
- Albanna, M. Z., Holmes IV, J. H., Allen-Hoffmann, B. L., & Rooney, P. J. (2016). *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801654-1.00013-9>
- Andriotis, O. G., Chang, S. W., Vanleene, M., Howarth, P. H., Davies, D. E., Shefelbine, S. J., ... Thurner, P. J. (2015). Structure – mechanics relationships of collagen fibrils in the osteogenesis imperfecta mouse model. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(20150701). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0701>
- Arnou, B. Y. L. E. (1937). hydrochloric acid and enough distilled water to make a volume of 1 liter. Preserve under toluene. 531. *Compare A Journal Of Comparative Education*, 531–537. <https://doi.org/10.1126/science.86.2225.176>
- Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E., & Mehmetoglu, U. (2007). Production of l-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 683–687. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.031>
- Atkin, L., Stephenson, J., & Bateman, S. D. (2015). Foam dressings: A review of the literature and evaluation of fluid-handling capacity of four leading foam dressings. *Wounds UK*, 11(1), 75–81.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems:A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Childs, D. R., & Murthy, A. S. (2017). Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*, 97(1), 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>
- Clark, M. (2012). Technology and product reviews TeCHNOLOGY UPDATe : Rediscovering alginate dressings. *Wounds International*, 3(1), 3–6. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00923.x/abstract>

- Cutting, K. F. (2003). Wound exudate: composition and functions. *British Journal of Community Nursing*, 8(Sup3), S4–S9. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2003.8.Sup3.11577>
- Cutting, K. F. (2010). Wound dressings : 21st century performance requirements. *Journal of Wound Care*, (Supl), 4–9. <https://doi.org/10.12968/jowc.2010.19.Sup1.48258>
- Czemplik, M., Kulma, A., & Szopa, J. (2013). The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *American Academy of Dermatology*, 68(4), e117–e126. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.06.028>
- Daunton, C., Kothari, S., Smith, L., & Steele, D. (2012). A history of materials and practices for wound management. *Wound Practice and Research The Australian Journal of Wound Management*, 20(4), 174–186. Retrieved from <http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=058025628512911;res=IELH EA>
- Dayal, J. H. S., Cole, C. L., Pourreyron, C., Watt, S. a, Lim, Y. Z., Salas-Alanis, J. C., ... South, A. P. (2014). Type VII collagen regulates expression of OATP1B3, promotes front-to-rear polarity and increases structural organisation in 3D spheroid cultures of RDEB tumour keratinocytes. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 4), 740–751. <https://doi.org/10.1242/jcs.128454>
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhina, E. (2015). Wound dressings – a review. *BioMedicine*, 5(4), 24–28. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>
- Duckworth, H. W., & Coleman, J. E. (1970). Physicochemical and Mushroom Tyrosinase \* Kinetic Properties of, 245(7), 1613–1625.
- Endo, S., Pfennigsdorff, A., & Goss, K.-U. (2012). Salting-Out Effect in Aqueous NaCl Solutions Increases with Size and Decreases with Polarities of Solute Molecule. *Environmental Science and Technology*, 46(3), 1496–1503. <https://doi.org/10.1021/es203183z>
- Fogh, K., & Nielsen, J. (2015). Clinical utility of foam dressings in wound management: a review. *Chronic Wound Care Management and Research, Volume 2*, 31. <https://doi.org/10.2147/CWC MR.S50832>

- Fonder, M. A., Lazarus, G. S., Cowan, D. A., Aronson-Cook, B., Kohli, A. R., & Mamelak, A. J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185–206. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.08.048>
- Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9>
- Frehner, E., & Watts, R. (2016). Evidence summary: Wound management-hydrogel dressings without additional therapeutic additives. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, 24(1), 59.
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>. Using
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Haghbeen, K., Jazii, F. R., & Karkhane, A. A. (2004). Purification of tyrosinase from edible mushroom. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(3), 189–194.
- He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M., & Li, X. (2018). Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns & Trauma*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s41038-017-0104-x>
- Hess, N. C. L., Carlson, D. J., Inder, J. D., Jesulola, E., Mcfarlane, J. R., & Smart, N. A. (2016). Biomedical applications of hydrogels handbook. *Physiological Research*, 65(3), 461–468. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Honari, G., & Maibach, H. (2014). *Skin Structure and Function. Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis*



- niloticas. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3–5), 199–204.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00054-0)
- Ilengthoven, D., Chan, C. Y., Ahmad, W., Wsr, K., Sj, M., & Ibrahim, S. (2017). A Review of Wound Dressing Practices. *Clinical Dermatology Open Access*, 2(6), 1–12.
- Jeness, D. D., Sprecher, C., & Johnson, W. C. (1976). Circular dichroism of collagen, gelatin, and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet. *Biopolymers*, 15(3), 513–521.  
<https://doi.org/10.1002/bip.1976.360150308>
- Jolley, R. L., Evans, L. H., Makino, N., & Mason, H. S. (1974). Oxytyrosinase ". *The Journal of Biological Chemistry*, 249(2), 335–345.
- Jones, V. (2006). Wound dressings. *Bmj*, 332(7544), 777–780.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.332.7544.777>
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217–233.  
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>
- Keira, S. M., Ferreira, L. M., Gragnani, A., Duarte, I. D. S., & Barbosa, J. (2004). Experimental model for collagen estimation in cell culture. *Acta Cirurgica Brasileira*, 19, 17–22. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000700005>
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363–372.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Knupp, C., & Squire, J. M. (2005). Molecular packing in network-forming collagens. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 375–403. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70011-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70011-5)
- Koehler, J., Brandl, F. P., & Goepferich, A. M. (2018). Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European Polymer Journal*, 100, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046>
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology

- of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/228549a0>
- Lin, Y. K., & Liu, D. C. (2006). Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99(2), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.053>
- Montero, P., Jiménez-Colmenero, F., & Borderías, J. (1991). Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(1), 137–146. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540115>
- Morton, L. M., & Phillips, T. J. (2016). Wound healing and treating wounds Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.068>
- Nahar, M. K., Zakaria, Z., Hashim, U., & Bari, M. F. (2017). Effect of pH and salt concentration on protein solubility of slaughtered and non-slaughtered broiler chicken meat. *Sains Malaysiana*, 46(5), 719–724. <https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4605-06>
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.035>
- Phillips, S. J. (2000). Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 46(6), S2–S5. <https://doi.org/10.1097/00002480-200011000-00029>
- Pott, F. S., Meier, M. J., Stocco, J. G. D., Crozeta, K., & Ribas, J. D. (2014). The effectiveness of hydrocolloid dressings versus other dressings in the healing of pressure ulcers in adults and older adults: a systematic review and meta-analysis. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 22(3), 511–520. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3480.2445>

- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H., & Sussman, G. (2004). A dressing history. *International Wound Journal*, 1(1), 59–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2004.0009.x>
- Rest, M. van der, Aubert-Foucher, E., Dublet, B., & Eichenberger, D. (1997). Structure and function of the fibril-associated collagens. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 433–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.433>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Richetta, A. G., Cantisani, C., Li, V. W., Mattozzi, C., Melis, L., De Gado, F., ... Calvieri, S. (2011). Hydrofiber dressing and wound repair: review of the literature and new patents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 5(February), 150–154. <https://doi.org/10.2174/187221311795399264>
- Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), 379. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.101321>
- SAY, R., ERSOZ, A., HUR, D., YILMAZ, F., DENIZLI, A., OZCAN, A. A., ... KECILI, R. (2011). PHOTSENSITIVE AMINOACID-MONOMER LINKAGE AND BIOCONJUGATION APPLICATIONS IN LIFE SCIENCES AND BIOTECHNOLOGY.
- Seaman, S. (2002). Dressing Selection in Chronic. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 92(1), 24–33.
- Seetharam, G., & Saville, B. a. (2002). -DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 747–753. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00182-5)
- Seo, S.-Y., Sharma, V. K., & Sharma, N. (2003). Mushroom Tyrosinase : Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 2837–2853.
- Shah, J. B. (2011). The history of wound care. *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 3(3), 65–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcws.2012.04.002>
- Sharma, C., & Paul, W. (2015). *Advances in Wound Healing Materials : Science and Skin*

- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Silvipriya, K. S., Krishna Kumar, K., Bhat, A. R., Dinesh Kumar, B., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 123–127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>
- Singh, S., Young, A., & McNaught, C. E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (United Kingdom)*, 35(9), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Strodtbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 1(1), 43–52. <https://doi.org/10.1053/nbin.2001.23176>
- Thomas, S. (2000). Alginate dressings in surgery and wound management — part 1. *Journal of Wound Care*, 9(2), 56–60. <https://doi.org/10.12968/jowc.2000.9.2.26338>
- Tuncagil, S., Kayahan, S. K., Bayramoglu, G., Arica, M. Y., & Toppare, L. (2009). L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1–4), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.014>
- Velichkova, P. (2015). Isolation and Purification of Tyrosinase From Different Plant Sources. In *First National Conference of Biotechnology* (Vol. 100, pp. 70–75).
- Venus, M., Waterman, J., & McNab, I. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery*, 29(10), 471–474. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.010>
- Vowden, K., & Vowden, P. (2017). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (United Kingdom)*, 35(9), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>

- Wild, T., Rahbarnia, A., Kellner, M., Sobotka, L., & Eberlein, T. (2010). Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*, 26(9), 862–866. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.05.008>
- Wingfield, P. T. (2016). HHS Public Access. *Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13.Protein>
- Winter, G. D. (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, 193(4812), 293–294. <https://doi.org/10.1038/193293a0>
- Yun, J., Kirsebom, H., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2009). Modeling of protein breakthrough performance in cryogel columns by taking into account the overall axial dispersion. *Journal of Separation Science*, 32(15–16), 2601–2607. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900320>
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., & Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Research*, 2014(August). <https://doi.org/10.1155/2014/120739>
- Zhu, S., Gu, Z., Xiong, S., An, Y., Liu, Y., Yin, T., ... Hu, Y. (2016). Fabrication of a novel bio-inspired collagen-polydopamine hydrogel and insights into the formation mechanism for biomedical applications. *RSC Advances*, 6(70), 66180–66190. <https://doi.org/10.1039/c6ra12306f>

## ÖZGEÇMİŞ

**Halil İbrahim Akbaş**

**h.i.akbass@gmail.com**

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Kişisel Bilgiler</b> | <b>İsim:</b> Halil İbrahim Akbaş<br><b>Doğum Tarihi:</b> 19.02.1990<br><b>Doğum Yeri:</b> Mersin<br><b>İsim:</b> h.i.akbass@gmail.com   |
| <b>Eğitim</b>           | <b>Anadolu Üniversitesi, Eskişehir,</b><br>Biyoteknoloji, Yüksek Lisans<br><i>Şubat 2015- Aralık 2018,</i><br><b>Tez:</b> Yara Sargısı Olarak Kolajen-ko-DOPA-ko-MATrp-<br>Ru(bipyrr)2-Cl 3B Hidrojel Sargı Geliştirilmesi<br><br><b>Anadolu Üniversitesi, Eskişehir</b><br>Biyoloji, Lisans<br><i>Eylül 2009-Haziran 2014</i><br><b>Tez:</b> Yapay Gübre Olarak Kullanılan Potasyum Nitratın <i>Lumbricus</i><br><i>Terrestiris</i> (Lamarck, 1809) (Anelida: Lumbridae) 'de CAT ve GST<br>Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri |
| <b>İş Deneyimi</b>      | <b>Bionkit Biyo-Nano Kimya Teknolojileri, Eskişehir</b><br><i>01.07.2015 - 31.12.2016</i><br><i>AR&amp;GE Uzmanı</i>  |
| <b>Projeler</b>         | “Protein Nanoboncuk Tabanlı Biyokimyasal Tanı Amaçlı Ön-Derleştirme<br>Kitleri ve Materyallerinin Geliştirilmesi” (Araştırmacı, <b>TUBİTAK 1511</b> ,<br>01.07.14- 01.07.16)<br>“Protein Tabanlı ve Sinerjik İşlevsellikte Biyo-boyalar Geliştirilmesi ve<br>Biyo-yazıcı Ortamında Çok Boyutlu Kemik ve Kıkırdak Üretiminde<br>Kullanılabilirlikleri” (Araştırmacı, Anadolu Üniversitesi <b>Bilimsel</b><br><b>Araştırma Projeleri (BAP)</b> , 05.06.2015- 05.06.2016)  |

---

---

**Yetkinlikler**

**Dil – İngilizce Okuma: Çok İyi Yazma: Çok İyi Konuşma: Çok İyi**

**Teknikler** –Agaroz Jel Elektroforezi,Denatüre Edici Page (SDS PAGE), Doğal Page ( Native PAGE) PAGE, Mikroplaka Okuyucusu (ELISA), Floresans Spektrometresi, UV- VIS Spectroscopy, Hızlı protein sıvı kromatografisi ( FPLC), Zetasizer, Circular Dichroism (CD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon değişim Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), 2-D Jel Elektroforezi, Pymol, Vektor NTI, Rekombinant protein üretimi, Primer tasarımı, Plasmid Dizayn, Linerizasyon (PCR), Ligasyon, Plasmid Transformasyon, Minipreb plasmid İzolasyonu, Besi yeri hazırlama, Bakteri Ekimi, İnokülasyon, Protein Ekspirasyonu,

---

**Stajlar ve Sertifikalar**

Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi Uygulamalı HPLC Çalıştayı Katılım Belgesi, 12-13 Mayıs 2018  
Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi Uygulamalı İstatistik Çalıştayı Katılım Belgesi, 11 Mayıs 2018  
University of Coimbra Center for Neuroscience and Cell Biology Erasmus Staj, 03/09/2018-01/12/2018

---

**Yayınlar**

1. “ *A new Fluorescence Based Protein Quantitation Assay:* ” yazım aşamasında
2. “ *Development and Characterization of New Column System for Single Step Purification of Bromelain from Pineapple*” yazım aşamasında

---

**Sunumlar**

Akbas, H.I., Karahan, M., Celikoglu, U., Ersoz, A., and Say, R., “*Tirozinaz Enziminin Saflaştırılması İçin Kriyojel Tabanlı Kromatografik Materyal Geliştirilmesi*” 11. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi, 15-17 Haziran 2017

---

**Başarılar**

**Lisans Onur Belgesi - Anadolu Üniversitesi 2014-2015 Güz**  
**Lisans Onur Belgesi - Anadolu Üniversitesi 2014-2015 Bahar**

---