



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**YAPAY DERİ GREFTLERİ OLARAK KERATİN/BORİK ASİT
TEMELLİ YAPILARIN SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAFİYE NUR YILDIZ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**YAPAY DERİ GREFTLERİ OLARAK KERATİN/BORİK ASİT TEMELLİ
YAPILARIN SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAFİYE NUR YILDIZ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2022-3983

ÇANAKKALE – 2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Safiye Nur YILDIZ

06/07/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN'a,

Çalışmanın uygulama aşamasında her türlü bilgi birikimlerini, çalışmaya değer katan önerileri esirgemeyen, bilimsel ve hayat tecrübeleri ile destek olan, bu süreçte asla yalnız bırakmayan değerli Tuğba SEZGİN ARSLAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bu süreçte düşünce ve görüşleri ile yardımlarıyla beni destekleyen çok sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU, Arş. Gör. Hilal Deniz YILMAZ, Elif Beyza DEMİRAY'a

Çalışma sürecinde yaşanan tüm zorlukları benimle beraber göğüsleyen, fikirleri ve yardımlarıyla her daim yanımda olan laboratuvar ortamında ve günlük hayatımda kıymetli arkadaşlıkları için değerli Şerife YENİCAN ve Tuğçe KURT'a

Yüksek lisansım boyunca her daim varlığı ile yanımda olan maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili ev arkadaşım Fatma ÖZSOY'a

Tez yazımı sürecinde beni bilimsel ve manevi anlamda destekleyen yardımlarını esirgemeyen Bayram ÜNAL'a

Çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için gerekli analizlerin gerçekleştirilmesi için bilgi birikimlerini ve zamanlarını paylaşan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi kurumu tarafından desteklenmiştir (FYL-2022-3983)

Hayatımın her evresinde ve eğitim sürecimde bana maddi manevi destek olan değerli ailem Ali YILDIZ, Saniye YILDIZ ve Özel Tuğçe YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Safiye Nur YILDIZ
Çanakkale, Haziran 2023

ÖZET

YAPAY DERİ GREFTLERİ OLARAK KERATİN/BORİK ASİT TEMELLİ YAPILARIN SENTEZİ

Safiye Nur YILDIZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

06/07/2023, 87

Deri-doku mühendisliğinde yara iyileşmesi için tasarlanan yapay deri greftleri incelendiğinde yara iyileşmesine yardımcı olabilecek filmlerin, hidrojellerin vb. uygulamaların önemli ve dikkat çeken bir yere sahip olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında ise koyun yünü keratini (KK) ve denizanası kollajenin (DK) benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikleri ile yara iyileşmesi mekanizmasına biyoaktif özelliklerinden dolayı bor ve silisyumun modifiye edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda sol- jel reaksiyonları kullanılarak keratin ve kollajen biyomalzemelerine bor ve silika molekülleri eklenmiştir. Sentez sonucunda kompozit filmler elde edilmiştir. Koyun yününden keratin ekstraksiyonu gerçekleştirilmesi sonrasında -SH grupları ve Lowry protein analizleri ile biyokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Filmlerin, organik ve inorganik molekülleri arasındaki bağları göstermek amacıyla ATR-FTIR, ²⁹Si-MAS-NMR, ¹¹B-MAS-NMR ve XRD analizleri yapılmıştır. Ayrıca TGA tekniği ile filmlerin termal stabilitesine bakılırken mikro mekanik çekme testi ile mekanik mukavemeti incelenmiştir. Filmlerin yüzey alanları ve gözenekliliği BET-BJH tekniği ile belirlenirken bozunma davranışı in vitro biyobozunurluk testi ile belirlenmiştir. FE-SEM, EDX ve elementel haritalama analizleri ile ayrıntılı olarak filmlerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Filmlerin karakterizasyonlarından sonra tavuk koryoallantoik membran testi ile anjiyogenez potansiyeli araştırılmıştır.

Bor ve silika nanoparçacıklarıyla bağlanmış olan proteinler ile filmlerin yüzey alanı ve gözenekliliğini arttırmıştır. Böylelikle oldukça iyi bir biyobozunurluğa sahip olduğu görülmüştür. Kompozit filmlerin, bor ve silikanın etkisi olarak termal ve mekanik olarak dayanımları artmıştır. Yapılan *in-ovo* çalışmalarına göre filmler pro-anjiyogenik bir etki göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlar düşünüldüğünde tasarlanan filmlerin, deri doku mühendisliği uygulamalarında kompozit bir malzeme olarak potansiyel bir terapötik fayda sağlayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Keratin, Denizanası Kollajen, Bor, Silisyum, Sol-Jel Reaksiyonları, Deri Doku Mühendisliği

ABSTRACT

SYNTHESIS OF KERATIN/BORIC ACID-BASED NETWORKS AS ARTIFICIAL SKIN GRAFTS

Safiye Nur YILDIZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering

Advisor: Assoc. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

06/07/2023, 87

This thesis aims to modify boron and silicon due to the unique chemical and physical properties of sheep wool keratin and jellyfish collagen and their bioactive properties to wound healing mechanisms. Boron and silica molecules were added using sol-gel reactions in this direction. Composite films were obtained as a result of synthesis. After the extraction of keratin, biochemical characterizations of -SH groups and Lowry protein analyses were performed. In addition, ATR-FTIR, ²⁹Si-NMR, ¹¹B-MAS-NMR, and XRD analyses were performed to show the bonds between organic and inorganic molecules of the films. In addition, the thermal stability of the films was examined with the TGA technique, while the mechanical strength was concerned with the micromechanical tensile test. The BET-BJH technique determined the surface areas and porosity of the films, while the degradation behavior was determined by the in vitro biodegradability test. Detailed characterizations of the films were carried out with FE-SEM, EDX, and elemental mapping analyses. After the characterization of the films, angiogenesis potential was investigated by the chicken chorioallantoic membrane test. Proteins bonded with boron and silica nanoparticles increased the surface area and porosity of the films. Thus, it has been observed that it has excellent biodegradability.

Furthermore, the thermal and mechanical strength of the composite films increased due to the effect of boron and silica. According to the *in-ovo* studies, the films showed a pro-angiogenic effect. Considering all these results, the designed films could provide a therapeutic benefit as a composite material in skin tissue engineering applications.

Keywords: Keratin, Jellyfish Collagen, Boron, Silicon, Sol-Gel Reactions, Skin Tissue Engineering



İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|------------------------------|----------|
| ETİK BEYAN..... | i |
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR..... | x |
| TABLolar DİZİNİ..... | xii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiii |

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

| | |
|---|----|
| 1.1. Deri ve Yapısı | 4 |
| 1.1.1. Epidermis | 6 |
| 1.1.2. Dermis | 8 |
| 1.1.3. Hipodermis..... | 9 |
| 1.2. Yara ve Tipleri | 9 |
| 1.2.1. Akut Yara..... | 9 |
| 1.2. Kronik Yara..... | 10 |
| 1.3. Yara İyileşmesi | 10 |
| 1.4. Yara İyileşmesi Aşamaları..... | 10 |
| 1.4.1 Hemostaz | 11 |
| 1.4.2 İnflamasyon..... | 12 |
| 1.4.3 Proliferasyon..... | 13 |
| 1.4.4 Yeniden Şekillenme..... | 13 |
| 1.5. Yara Örtüsü Uygulamaları..... | 14 |
| 1.5.1. Geleneksel Yara Örtüleri..... | 15 |
| 1.5.2. Modern Yara Örtüleri..... | 16 |
| 1.6. Deri Doku Mühendisliği için Biyomalzemeler..... | 17 |
| 1.6.1. Sentetik Polimerler..... | 17 |
| 1.6.2. Doğal Polimerler..... | 18 |
| 1.7. Bor Mineralinin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri..... | 30 |
| 1.8. Silisyum Elementi ve Uygulamaları..... | 31 |

| | |
|-------------------|----|
| İKİNCİ BÖLÜM | 33 |
| ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | |

| | |
|-----------------|----|
| ÜÇÜNCÜ BÖLÜM | 39 |
| MATERYAL YÖNTEM | |

| | |
|---|----|
| 3.1. Materyal | 39 |
| 3.2. Yöntem..... | 39 |
| 3.2.1. Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu..... | 39 |
| 3.2.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu..... | 40 |
| 3.2.3. Koyun Yünü Keratini Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini..... | 41 |
| 3.2.4. Serbest Sülfidril Grubu Tayini..... | 43 |
| 3.2.5. Bor ve Silisyum Temelli Malzemelerin Sol-Jel Sentezi ve Yapay Deri Greftlerinin Üretimi..... | 44 |
| 3.2.6. Yapay Deri Greftlerinin Çapraz Bağlanması..... | 46 |
| 3.3. Yapay Deri Greftlerinin Fizikokimyasal Analizleri..... | 47 |
| 3.3.1. ATR-FTIR..... | 47 |
| 3.3.2. Katı Hal Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (11B-MAS NMR ve Si NMR)..... | 47 |
| 3.3.3. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi..... | 47 |
| 3.3.4. Termogravimetrik (TGA) Analizi..... | 48 |
| 3.3.5. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi..... | 48 |
| 3.3.6. Mikromekanik Çekme Testi..... | 48 |
| 3.3.7. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS) Analizi..... | 48 |
| 3.4. Biyobozunurluk Testi..... | 49 |
| 3.5. <i>in ovo</i> Civciv Koryoallantoik Membran Analizi (CAM)..... | 49 |
| 3.6. Anjiyojenik Yanıtların Histolojik Değerlendirmesi..... | 50 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz..... | 50 |

| | | |
|---------------------|---|----|
| DÖRDÜNCÜ BÖLÜM | | 51 |
| ARAŞTIRMA BULGULARI | | |
| 4.1. | Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu | 51 |
| 4.2. | Serbest Sülfidril Grubu Tayini..... | 52 |
| 4.3. | Yapay Deri Greftlerinin Fizikokimyasal Analizleri..... | 53 |
| 4.3.1. | ATR-FTIR..... | 53 |
| 4.3.2. | NMR Analizleri..... | 55 |
| 4.3.3. | XRD Analizleri..... | 56 |
| 4.4. | Filmlerin TGA Analizleri..... | 57 |
| 4.5. | BET Analizi..... | 58 |
| 4.6. | Mikromekanik Çekme Testi..... | 58 |
| 4.7. | SEM ve EDS Analizleri..... | 60 |
| 4.8. | Filmlerin <i>in vitro</i> biyobozunurluk çalışmaları..... | 62 |
| 4.9. | CAM Analizi..... | 64 |
| 4.10 | Anjiyojenik Yanıtların Histolojik Değerlendirmesi..... | 66 |
| BEŞİNCİ BÖLÜM | | |
| SONUÇ ve ÖNERİLER | | 68 |
| KAYNAKÇA | | 71 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| KK | Koyun yünü keratin |
| DK | Denizanası kollajen |
| BA | Borik asit |
| Si | Silisyum |
| KK-BA-Si | Keratin-Borik asit-Silisyum |
| DK-BA-Si | Denizanası Kollajeni-Borik asit-Silisyum |
| KK-DK-BA-Si | Keratin-Denizanası Kollajen-Borik asit-Silisyum |
| HDM | Hücre dışı matriksi |
| DDM | Deri doku mühendisliği |
| -SH | Serbest sülfidril grubu |
| TEOS | Tetraetil ortosilikat |
| rTEOS | Reaktif TEOS |
| CAM | Koryoallantoik membran testi |
| EDD | Embriyonik gelişim günü |
| PLA | Poli-laktik asit |
| PGL | Poli-glikolik asit |
| PLGA | Poli-laktik-ko-glikolid asit |
| RGD | Arg-Gly-Asp |
| BSA | Sığır serum albümin |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| Na ₂ SO ₃ | Sodyum sülfid |
| B(OH) ₃ | Borik asit |
| B(OH) ₄ ⁻ | Borat anyonları |
| NHS | N-hidroksisüksinimit |
| MES | 2-morfolino etansülfonik asit |
| EDTA | Etilen diamin tetra asetik asit |
| H&E | Hematoksilen-Eozin |
| Pa | Paskal |
| kPa | Kilo paskal |
| EDC | N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethylkarbodiimit hidroklorür |

| | |
|--------------------------|---|
| LDV | Leu-Asp-Val |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi |
| ATR-FTIR | Zayıflatılmış toplam yansıtmalı-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi |
| XRD | X-ışını difraktometresi |
| ²⁹ Si-MAS-NMR | Silisyum nükleer manyetik rezonans spektrometresi |
| ¹¹ B-MAS-NMR | Bor nükleer manyetik rezonans spektrometresi |
| PCL | Polikaprolakton |
| TGA | Termogravimetrik analiz |
| BET | Brunauer-Emmett-Teller |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| °C | Derece Santigrat |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| w/v | Kütle/Hacim |
| ml | Mililitre |
| µm | Mikrometre |
| µl | Mikrolitre |
| µg | Mikrogram |
| mg | Miligram |

TABLULAR DİZİNİ

| Tablo No | Tablo Adı | Sayfa No |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------|
| Tablo 1 | Sentetik biyomalzemeler | 18 |
| Tablo 2 | Polisakkarit temelli biyomalzemeler | 20 |
| Tablo 3 | Protein temelli biyomalzemeler | 21 |
| Tablo 4 | Lowry reaksiyon çözeltileri | 42 |
| Tablo 5 | Filmlerin BET-BJH sonuçları | 58 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No | Şekil Adı | Sayfa No |
|----------|---|----------|
| Şekil 1 | İnsan deri dokusunun yapısı | 5 |
| Şekil 2 | Derinin yapısı ve hücre tipleri | 6 |
| Şekil 3 | Epidermisin yapısı | 7 |
| Şekil 4 | Yara iyileşme basamaklarının tahmini süresi | 11 |
| Şekil 5 | Yara iyileşmesinin aşamaları | 14 |
| Şekil 6 | İdeal yara örtüsünün özellikleri | 15 |
| Şekil 7 | Keratin kaynakları | 22 |
| Şekil 8 | Keratinin yapısı | 24 |
| Şekil 9 | Keratinin yara iyileşmesi aşamalarındaki etkisi | 25 |
| Şekil 10 | Keratinin doku mühendisliğinde kullanım alanları | 26 |
| Şekil 11 | Kollajen kaynakları | 27 |
| Şekil 12 | Kollajen kaynaklarının avantaj ve dezavantajları | 28 |
| Şekil 13 | Kollajen yapısı | 29 |
| Şekil 14 | Kollajenin doku mühendisliği uygulamaları | 30 |
| Şekil 15 | Silisyum aktiviteleri | 32 |
| Şekil 16 | Keratin ekstraksiyonu | 40 |
| Şekil 17 | Denizanasından kollajen izolasyonu | 41 |
| Şekil 18 | rTEOS eldesi | 44 |
| Şekil 19 | Sol-jel dönüşümü ve filmlerin eldesi sonrasında makro görüntüleri | 46 |
| Şekil 20 | Filmlerin stereo mikroskop görüntüleri | 47 |
| Şekil 21 | Filmlerin çekme testi ile uzama ve kopma hali | 49 |
| Şekil 22 | <i>in ovo</i> makro görüntüleri | 50 |
| Şekil 23 | Sülfitolizis reaksiyonu | 51 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Şekil 24 | BSA kalibrasyon grafiği Lowry yöntemine göre | 52 |
| Şekil 25 | L-sistein ile yapılmış olan kalibrasyon grafiği | 53 |
| Şekil 26 | FT-IR sonuçları | 54 |
| Şekil 27 | KK-DK-BA-Sİ filmin NMR sonuçları | 55 |
| Şekil 28 | Filmlerin XRD spektrumları | 56 |
| Şekil 29 | Filmlerin TGA termogramları | 57 |
| Şekil 30 | Filmlerin çekme testi sonucu gerinim-gerilim grafiği ve Young Modülü | 59 |
| Şekil 31 | Filmlerin çekme gücü ve kopma gerilimi | 60 |
| Şekil 32 | Filmlerin SEM-EDS analizleri | 61 |
| Şekil 33 | Filmlerin elementel haritalama sonuçları | 62 |
| Şekil 34 | Filmlerin 3. ve 7. Gün aralıklarla bozunma oranları | 63 |
| Şekil 35 | Kan damar yoğunluğu indeksi sonuçları | 64 |
| Şekil 36 | Filmlerin <i>in ovo</i> CAM analizleri | 65 |
| Şekil 37 | Filmlerin CAM ile EDD 10 da alındıktan sonra SEM görüntüleri | 65 |
| Şekil 38 | Filmlerin H&E boyayama ile kan damarlarının histolojik değerlendirilmesi | 67 |

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Deri, vücudu korumak amacıyla bir bariyer gibi davranan en büyük organlarımızdan biridir. Deri dış ortama doğrudan maruz kalmasından kaynaklı olarak birçok yaralanmalara özellikle yanık gibi hasarlara karşı fazlasıyla açıktır. Deride gerçekleşen yaralanmalar ikiye ayrılır: kronik ve akut yaralar (Kamoun vd., 2017). Akut yaralar genellikle iyileşmenin hızlı olduğu ve sonrasında yara izinin kalmadığı yaralanmalardır. Bunlar genellikle ameliyat sonrası veya sırasında oluşan cerrahi kesiler, basit yanık ve kesiklerden kaynaklı oluşmaktadır (Prasathkumar & Sadhasivam, 2021). Kronik yaralar, iyileşmesi oldukça uzun süren ya da iyileşmeyen yaralardır. Genel olarak diyabete ya da kansere bağlı ülserlerden kaynaklanmaktadır. (Wu vd., 2022). Derinin sahip olduğu yara iyileşme mekanizmasında dolayı birçok yara zaman içerisinde doğal koşullarda yenilenip düzelebilmektedir. Ancak bazı ağır, büyük yaralarda ve doku kayıplarının yaşandığı kronik yaralarda bu mekanizma sekteye uğrayabilir ya da yeterli gelemeyebilir. Bu tür durumlarda tedavi süreci, iyileşme sürelerinin uzaması ile büyük maliyetler gerektiren oldukça sancılı süreçlerdir. Ayrıca yaşanan doku kayıpları kişinin hayatında fiziksel anlamda etkilemekle beraber sosyo-psikolojik olarak etkileyebilmektedir (Selig vd., 2012). Zaman içerisinde hasta popülasyonunun artması, günümüzde uygulanan tedavilerin karmaşıklığı ve tüm bunlarla birlikte hasta beklentilerinin sonucunda doku rejenerasyonunun etkisini arttırabilecek yeni stratejilere ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Ehrenreich & Ruszczak, 2006). Son yıllarda doku mühendisliğiyle beraber rejeneratif tıp uygulamaları, doku yenilenmesini ve onarımını desteklemek amacıyla yeni yaklaşımlar içeren çalışmalar ilgi çekmektedir. Bu çalışmalarda, insanların yaşam kalitesini iyileştirmek için tekrarlanabilir, sağlam ve daha ideal bir şekilde doku yenilenmesini desteklemek amacıyla yenilikçi iskeleler, kök hücreler ve hücre-iskele etkileşimlerini kullanılmaktadır (H. S. Kim vd., 2019).

Literatüre bakıldığında, sitotoksik olmayan, yeteri kadar gaz geçirgenliği sağlayıp, mikroorganizmaların penetrasyonunu engelleyen, daha hızlı iyileşme süreci ve yara kapanmasını amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda biyopolimerleri baz alan ürünler tasarlayıp ve ticarileştirmeye yönelik girişimler yapılmaktadır. Bu konuda birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar hidrojeller, filmler, köpükler gibi biyomalzemelerin kullanılmasına dayanan yöntemlerdir. (Zheng vd., 2022) (Hu vd., 2020)

Doku mühendisliği alanında geliştirilmiş ideal bir deri ikamesinin ya da yara örtülerinin;

1- Yara iyileşme mekanizmasının aşamalarını bozmayıp (Hemostaz-inflamasyon -Proliferasyon- ve Yeniden Şekillenme) aksine iyileşmeye katkı sağlayabilir olması

2- Nem ortamını düzenleme

3- Oksijen değişimi gibi gaz geçirgenliğine izin verme

4- Hareketi kolaylaştırabilmesi için esnek bir yapıda olması

5- Zararlı olabilecek mikroorganizmalardan koruma

6- Sitotoksik etki olmayan

gibi özelliklere sahip olması gerekir (Singh vd., 2022).

Deri yenilenmesinin gerçekleşmeyecek durumda olduğu vakalarda; rejenerasyonu tetikleyebilecek, iyileşmeyi hızlandırabilecek uygun malzemelerin tercih edilmesi kritik noktalardan biridir. Protein bazlı biyomalzemeler, hücrel etkileşimler, hücre dışı matriksi (HDM) olarak görev yapabilme yeteneklerinden dolayı biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir potansiyele sahip malzemelerdir. Keratin, kollajen, jelatin, ipek, fibrin vb. proteinler doğal biyomalzemelerin geliştirilmesinde araştırılmışlardır (Eisenbarth, 2007).

Keratin, saç, tüy, yün, boynuz, gibi epidermal yapıların ve hücre iskeletlerinin önemli bir kısmını oluşturan ara filamentlerle ilişkisi olan sistein açısından oldukça zengin proteinlerdir. Keratin, biyoyumluluğu, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ötürü biyomedikal alanındaki kullanımları için incelenmiştir. İnsan saç veya yünden elde edilen keratinlerin, hücrel bağlanmaya yardımcı olan glutamik-aspartik asit-serin ve lösin-aspartik asit-valin (LDV) gibi hücre bağlayıcılara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği sayesinde hücrel bağlanma, çoğalma gibi davranışları sağlayan üç boyutlu bir yapı oluştururlar.

Yüksek biyoyumlulukları, rejenerasyon yetenekleri kontrol edilip daha ayrıntılı incelendiğinde aslında keratin bazlı biyomalzemelerin, rejeneratif tıp, doku mühendisliği ve biyomedikal gibi alanlarda kullanımları oldukça avantajlı olabilmektedir (Rouse & Van Dyke, 2010).

Doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilen diğer bir önemli biyomalzeme ise kolajendir. Kollajen, bağ dokularında ve HDM'nin yapısında bulunan önemli bir proteindir. Elastikiye, yüksek gerilme mukavemeti, yeniden şekillendirme gibi özelliklerinden dolayı yara iyileşmesi sürecinde önemli derecede katkıda bulunur. Kollajen içeren formülasyonlar, bahsi geçen özelliklerden dolayı, yara iyileşmesi uygulamalarında fazlasıyla kullanılmaktadır (Sharma vd., 2022).

Son zamanlarda bor, magnezyum, çinko gibi mineraller farklı özellikleri nedeniyle sağlık ve tıp alanlarında çeşitli uygulamalarla kullanılmaktadır. Bor türevleri, gösterdikleri antimikrobiyal aktivite, büyüme faktörü ekspresyonu, vaskülarizasyon, keratinosit göçü ve proliferasyonu gibi eşsiz özellikleri nedeniyle yara iyileşme sürecini hızlandırabilmektedir (Chebassier vd., 2004). Silika bazlı biyomalzemelerin anjiyogenezde etkin role sahip olan malzemelerden olduğu görülmüştür. Silikanın epidermal hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırarak desteklediği de keşfedilmiştir (Fan vd., 2022). Tüm bunlar, silika ve bor bazlı biyomalzemelerin yara örtülerinin formülasyonunda anahtar faktörler olabileceğini düşündürmektedir.

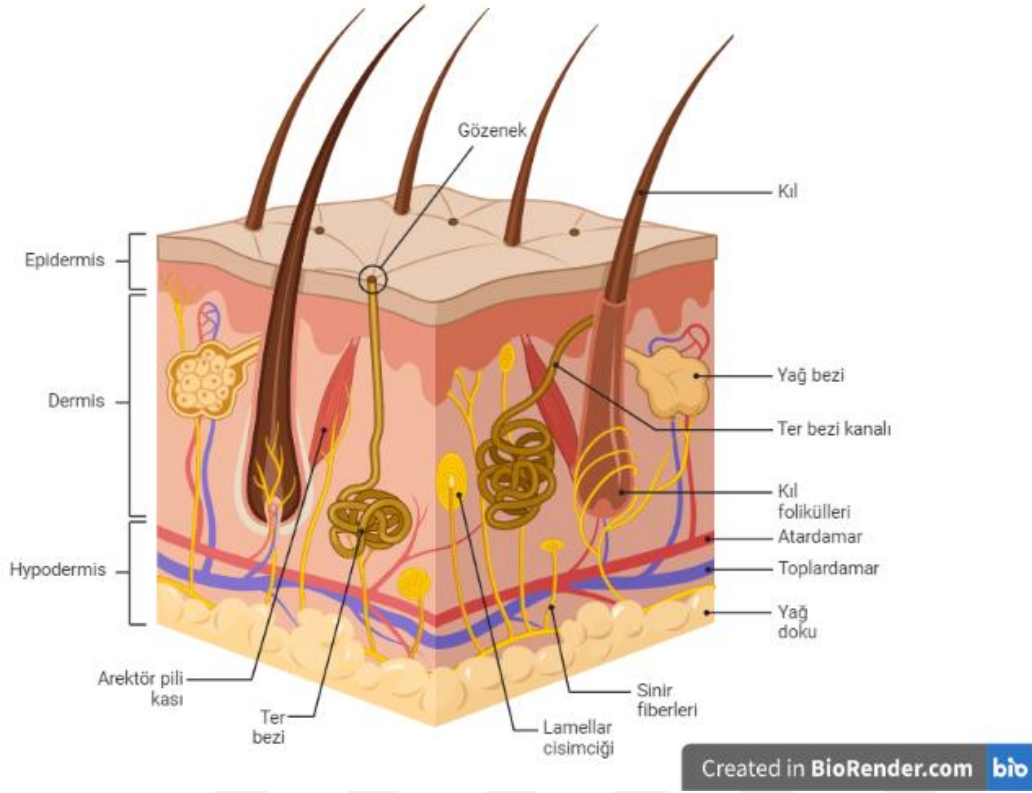
Deri dokusu mühendisliği çalışmalarında sol-jel reaksiyonları ile elde edilen silika içerikli kompozit biyomalzemelerin kullanımı dikkatleri üzerine çekmiştir. Sol-jel tekniğinin bu tür uygulamalarda bazı önemli avantajları vardır. Örneğin reaksiyon, diğer uygulamalara kıyasla daha düşük sıcaklıklarda daha uygun maliyetli bir şekilde gerçekleşebilir. TEOS genellikle sol-jel yönteminde silika öncüsü olarak kullanılır. TEOS ile sadece reaksiyon parametrelerindeki değişimlerle elde edilen yapıların morfolojileri değişebilmektedir. Bu nedenle sıklıkla tercih edilmektedir (Singh vd., 2016)

Bu çalışma ile geliştirilen filmler, biyopolimerlerin iyileştirme yetenekleri nedeniyle farmasötik ve deri-doku mühendisliği uygulamaları için kullanım potansiyellerinin kapsamlı bir şekilde araştırılmasına olanak sağlamıştır. Böylelikle benzeri yara iyileştirme süreçlerinde istenen gereksinimlere göre üretilen filmler, pansuman malzemeleri, merhemler, hidrojeller, süngerler, elektrospun fiberler gibi biyomateryal bazlı sistemlerin geliştirilmesinde öncülük sağlayarak bu tür sistemlerin üretilmesini hızlandırabilme potansiyeli ile kuramsal olarak yarar sağlayabilecektir.

Bu tez çalışmasında atık koyun yününden sülfitoliz yöntemi ile keratin ekstraksiyonu ve denizanasından pepsin çözünür kollajen izolasyonu yapılmıştır. Yukarıda bahsedilen keratin, kolajen, bor ve silikanın biyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri değerlendirilerek, antibakteriyel özellik gösterecek ve anjiyogenezi arttıracak yara örtüsü benzeri yeni filmler tasarlanmıştır. Bu amaç için silika ve bor içeren üç farklı film tasarlandı: keratin (KK-BA-Si), kolajen (DK-BA-Si) ve keratin/ kolajen (KK-DK-BA-Si). Tüm filmler, BA-Si'nin kovalent olmayan etkileşimler yoluyla proteinlere bağlandığı sol-jel prosedürüyle elde edildi. Yara örtülerinin yapısal, fizikokimyasal, biyokimyasal ve mekanik özellikleri incelenerek başlıklar altında deneysel çalışmaların sonuçları paylaşılmıştır. Ayrıca geliştirilen filmlerin anjiyogenez özellikleri *in-ovo* modelinde tavuk koryoallontoik membran (CAM) testi ile incelenmiş ve sonuçlar histolojik olarak değerlendirilip, SEM mikrografları ile gösterilmiştir.

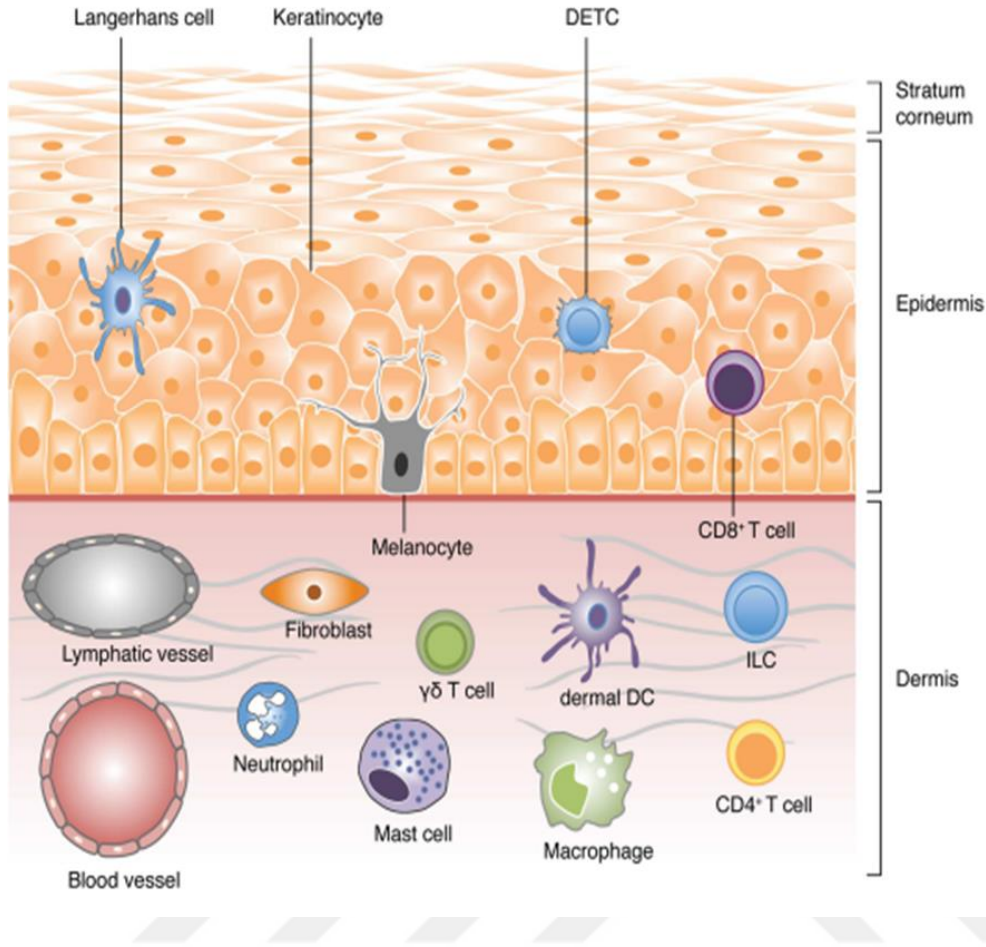
1.1. Deri ve Yapısı

Deri, çevreye karşı koruyucu bir kalkan görevi olan en büyük organdır. Tüm vücudu kaplayarak vücut ısısını düzenleyen, su geçirmeyen yalıtkan bir bariyer gibi davranır. Ayrıca fiziksel yaralara karşı korurken, ter bezleri ile atık ürünlerin atılmasına yardımcı olmak gibi işlevleri de yapmaktadır. Bunların haricinde enfeksiyonları önlemek ve biyolojik etkileri olan, antimikrobiyal peptidler, nöropeptitler ve sitokinler üretir. Cildi ultraviyole ışıklardan koruyan ve rengini belirleyen pigment hücrelerini içerir (Gilaberte vd., 2016) (Banerjee & Sen, 2015). Deri tabakası, dışarıdan içeriye doğru olacak şekilde üç katmandan meydana gelmektedir. Bunlar epidermis, dermis ve hipodermistir. (Şekil 1)



Şekil 1. İnsan deri dokusunun yapısı (Görsel BioRender ile çizilmiştir.)

İnsan derisi birçok hücre tiplerini de içermektedir. Derinin her bir tabakasında farklı hücreler ve faktörler bulunmaktadır. Bunlar Şekil 2’ de özetlenmiştir. Ektoderm kökenli epidermis tabakasında keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri bulunmaktadır. Epidermis, içerisinde vasküler yapılar bulundurmaz. Mezoderm yapısındaki dermis tabakasında ise daha çok kan ve lenf damarları, fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar bulunmaktadır.



Şekil 2. Derinin yapısı ve hücre tipleri (Chong vd., 2013)

1.1.1. Epidermis

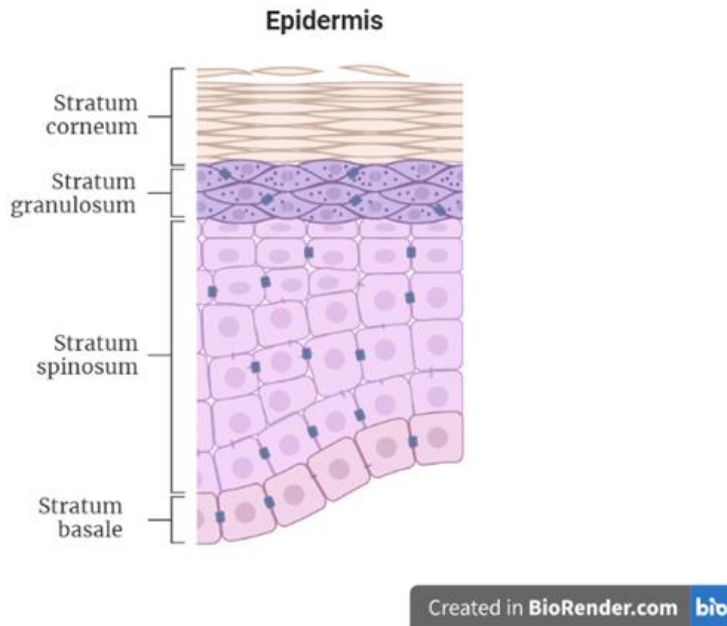
Deri de ki en dış katman olan epiderminin, vücutta bulunduğu konuma göre 0,5 mm ile 1,5mm arasında kalınlığı değişmektedir. UV, patojenler gibi dış etken olarak kabul edilen durumlara karşı koruyucu kalkan görevi üstlenir. Ayrıca vücut ısısının düzenlenmesinden ve nemin tutulmasından sorumlu olan önemli bileşendir. Epidermis, ölen hücreler ve farklılaşan hücrelerin sürekli olarak yenilediği bir dokudur. Bu yenilenme yaklaşık olarak 2 ay sürebilmektedir. Tırnakların ve ter bezlerinin oluşumu epidermis sayesinde. Epiderminin hücre tipleri incelendiğinde melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve keratinositlerden oluşmaktadır (Baroni & Buommino, 2012).

Keratinositler epiderminin %80'ni oluşturan keratini üretmekten sorumlu hücrelerdir. Keratinazasyon, keratinin sentezi ve keratinin parçalanması ile ilgilidir.

Epidermin katmanlarında keratinositlerin, korneositlere farklılaşması ile gerçekleşir (McGowan & Coulombe, 2000). Böylelikle keratin ara filament demetleri oluşur.

Keratinler bir tabaka oluşturup çevresel bir bariyer görevi ile uygulanan strese karşı dayanan sertliği sağlarlar. Langerhans, yabancı cisimlerden ve patojenlerden koruyan bağışıklık hücreleridir (Merad vd., 2008). Merkel hücreleri dokunma duyusundan sorumlu iken Melanositler, melanin üreterek cilde rengini verip UV radyasyonundan korurlar. (Sulaimon & Kitchell, 2003)

Epidermis genellikle dört katmana ayrılır (Şekil 3). Bu tabakalar stratum corneum, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum basale'dır. Bazal tabaka epidermin yenilenmesinden sorumludur. Bu katmandaki hücreler farklılaşmaya devam etmek için stratum spinosuma doğru yükselirken, sinyal moleküllerinde oluşan sorun nedeniyle diğer hücreler apoptoza uğrarlar. Granüler hücre tabakası, canlı hücre içeren son tabakadır. Bu katmanda, granüler hücreler, keratin üretir ve depolarlar aynı zamanda stratum corneum'da su itici bir bariyer oluşturan lipitleri serbest bırakan granüller içerir. Stratum corneum, epidermin en dış tabakasıdır. Keratinositlerin, çekirdekli ölü hücrelere dönüştüğü korneositlerden oluşur. Bu hücreler ile deri bir bariyer görevi görür.



Şekil 3. Epidermin yapısı (Görsel BioRender da çizilmiştir.)

1.1.2. Dermis

Derinin büyük bir kısmını oluşturan dermis yapısal ve beslenme desteği sağlamaktadır. Dermis, bağ dokusu, damarlar, sinirler ve diğer özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır. Bu katman içerisinde kıl folikülleri, ter bezi ve yağ bezi de bulunmaktadır. Dermis papiller tabaka ve retiküler tabakalardan oluşur. Papiller dermis sıkı olmayan bir yapıda düzenlenmiş kollajen lifleri içerirken retiküler tabaka cilde paralel uzanan kalın kollajen demetleri içerir. Dermis epidermal hücrelere besin ve oksijen sağlamaktadır. Retiküler tabaka ise kollajen lifler ve elastik lifler ile cilde elastikiyetini ve sağlığını vermektedir. Kan ve lenf damarlarının yapısal hücrelerinde yer aldığı stromal hücreler ve fibroblastlar dermis tabakasında bulunmaktadır. Ayrıca lenfoid ve miyeloid hücreleri dermiste bulunabilmektedir. Dermisin yapısında bulunan bileşenlerinin birçoğu mezodermal kökenlidir (Smith & Holbrook, 1986). Dermis, içerdiği mukopolisakarit jel sayesinde kollajen ve elastik lifler bir arada durabilmektedir. Dermisin en büyük kısmını oluşturan kollajen lifleri yapıya güç kazandırmaktadır. Elastin lifleri ise esneklik sağlarken aynı zamanda hidrasyon ve viskozite sağlamaktadır. Fibröz doku içerisinde sinirler, kıl kökleri, kan ve lenfatik damarlar gömülü bir şekildedir (Brincat vd., 2005).

Kan ve lenfatik damarlar, besin sağlamak ve immünolojik süreçler gibi önemli homeostatik görevlerden sorumludur. Kan damarları epidermin altında bulunurken, lenfatik damarlar dermin içinde çok daha derinde yer almaktadır. Kan damarları doku içinde besin ve oksijen sağlamaktadır. Ayrıca yara iyileşmesi, sıcaklık ve immünolojik görevleri vardır. Derinin damar yapısına bakıldığında diğer dokulara kıyasla bağ dokusu tarafından desteklenen kalın duvarları nedeniyle kesme kuvvetlerine karşı uyumludur. Veil hücreleri dermiste bulunan damarlara özel bir alan sağlar. Dermis içerisinde bulunan deri damarları epidermalı beslemektedir (Huggenberger & Detmar, 2011). Lenf kanalları ise dokuları bakterilerden, hücrelerden, proteinlerden temizleyip damardan yayılan sıvıyı emer böylelikle interstisyel sıvının basıncını düzenlemektedir. Derideki lenf akışı, doku hareketlerine ve büyük ölçekli kas kasılmalarına bağlıdır (Skobe & Detmar, 2000).

1.1.3. Hipodermis

Yedek bir enerji kaynağı olarak görev yapan hipodermis bir yastık gibi deriyi korumaktadır. Ayrıca alttaki yapılar üstünde hareket etmesini sağlamaktadır. Vücut hatlarını şekillendirmede etkisi bulunmaktadır. Hipodermis, adipositlerden oluşmaktadır.

Adipositler fibröz bağ dokusu tarafından tanımlanmaktadır. Hipodermis, ekzotropi, endotrofi gibi biyolojik reaksiyonlar yoluyla enerji depolamaktadır. Adipositler, vücut ağırlığını düzenleyen leptini üretmektedirler (Gilaberte vd., 2016).

1.2. Yara ve Tipleri

Yara, ciltte ya da kemiklerde oluşabilen vücut dokularının fiziksel yaralanmasıdır. Birçok faktör travma, yanıklar veya enfeksiyonlar yaralara sebep olabilir. Yaralar kendi içinde iyileşme sürecine göre veya süresine göre sınıflandırılabilir. Yara yönetimi yaranın ciddiyetine yahut tipine bağlı olarak ardışık süreçler içermektedir. Akut ve kronik olmak üzere yaralar ikiye ayrılabilirler.

1.2.1. Akut Yara

Genellikle kesik, delinme, yanık gibi ani gelişen yaralar ya da travmaların neden olduğu yaralar akut yara olarak sınıflandırılır. Öngörülebilir bir iyileşme sürecine sahiptirler. Genellikle 8-12 hafta arasındaki sürelerde iyileşme görülmektedir. Akut yara tedavisinde, zarar almış nekrotik dokunun uzaklaştırılması, yaraların araştırılması, oluşan enfeksiyonun tedavisi şeklinde ve kapatılması şeklinde gerçekleştirilebilir. Akut yaraların tedavisi, temizlenmesi, pansuman uygulanması gibi basit yara bakımı ile yapılabilmektedir. Yara iyileşmesini bazı önemli faktörler etkileyebilmektedir bunlar nemli yara ortamının sürdürülmesi ve uygun hasta eğitiminin gerekli şekilde sağlanmasıdır (Dai vd., 2020).

1.2.2. Kronik Yara

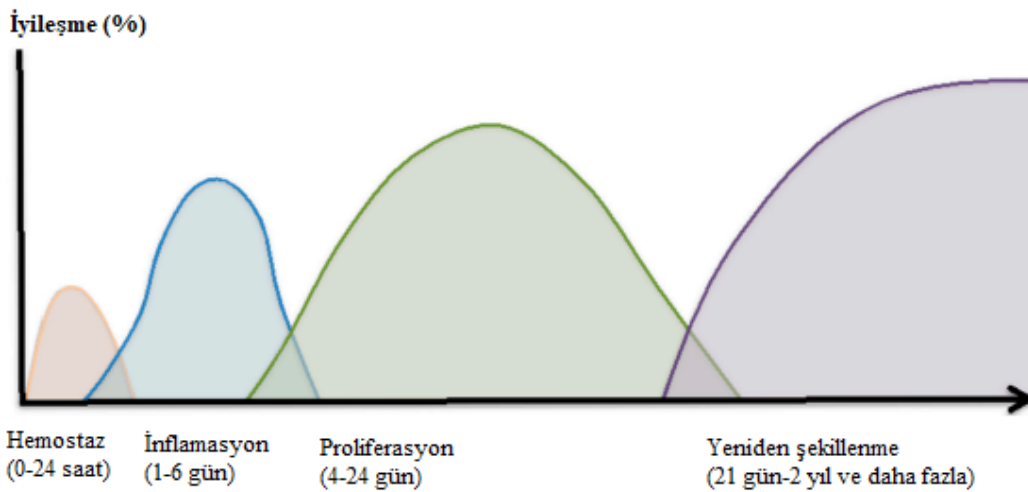
Kronik yaralar iyileşme süreci oldukça uzun süren yahut iyileşmenin tam olarak gerçekleşmediği durumdur. Genellikle diyabet, enfeksiyonlar, ülserler gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Kronik yara tedavisinde inflamasyon ve enfeksiyonun kontrolü önemlidir. Tedavisi genellikle yara pansumanları, cerrahi müdahaleler veya yara debridmanı ile olabilmektedir. Deri ikameleri, tedavi sürecinde oldukça aktif olarak incelenen ve kullanılan uygulamalardır (Han, 2017).

1.3. Yara İyileşmesi

İnsan hayatı boyunca birçok yaralar meydana gelebilmektedir. Yaralanmalar gerçekleştikten sonra doku bütünlüğü tekrardan sağlanıp hücre içi veya hücre dışı yolaklarının aktivasyonunun gerçekleşmesi durumu kontrol edilmelidir. Yara iyileşmesi doku da gelen hasara göre gerçekleşen biyolojik bir süreçtir. İyileşme sürecinde hasarlı dokuların onarımı veya eksilen dokunun tekrardan oluşturulması için vücudun farklı kısımlarında anlaşılması zor olan bir dizi olay gerçekleşmektedir. Kullanılan ilaçlar, yaş, kişinin genel sağlık durumu, kronik rahatsızlıklar, yaşam tarzı gibi etkenler, yara iyileşme sürecini etkileyebilmektedir. İyileşme sürecinin nasıl gerçekleştiğini anlamak, iyileşmeye yardımcı olmayı ve komplikasyon oluşmasını önlemek için önemli bir adımdır (Reinke & Sorg, 2012; Rezvani Ghomi vd., 2019).

1.4. Yara İyileşmesi Aşamaları

Yaranın iyileşmesi kademeli olarak dört farklı aşamaya bölünebilir. Bu aşamalar hemostaz aşaması ile başlayarak, inflamasyon aşaması, proliferasyon aşaması ve son olarak yeniden şekillenme aşaması olarak devam etmektedir. Normal bir yara iyileşme sürecinin aşamaları ve tahmini süreleri Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. Yara iyileşme basamaklarının tahmini süreleri (Than vd., 2017)

1.4.1 Hemostaz

Deri yaralanmaları gerçekleştiğinde etkilenen bölgedeki kan damarları hasar görür ve çoğu zaman bir kanama gerçekleşir. Bu kanama mikroorganizmaları temizlemeye yardımcı olur. Böylelikle hemostaz aşaması aktive olur ve bu durum kanamayı durdurarak iyileşme sürecini başlatmak için vücudun verdiği doğal bir tepkidir. Yara iyileşme sürecindeki ilk aşama olan hemostaz, gerçekleşen kanamayı durdurmak için kan pıhtısının oluşmasını içermektedir. Daha sonrasında gerçekleşen yara iyileşmesi aşamaları olan inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenmenin doğru çalışabilmesi için önemli ve gerekli bir aşamadır. Hemostaz kendi içinde üç basamakta gerçekleşmektedir. İlk olarak vazokonstriksiyonda, yırtılan ve etkilenen damarlar kan akışını azaltarak kanamayı durdurmak için hızlıca daralmaya başlar. Bu süreç sinir sisteminin etkisi ile kan damarlarındaki düz kasların kasılmasıyla gerçekleşir. Bu aşamada trombositler, kan damarlarının duvarlarında yer alan düz kasların çalışmasını aktive eden trombosit kaynaklı büyüme faktörünü (TKBF) üretirler (Berk vd., 1986).

Hemostazdaki ikinci adım ise birincil hemostaz şeklinde isimlendirilen trombosit tıkaçının oluşmasını içerir. Trombositler, pıhtılaşma da ki en etkin kan hücreleridir. Aktive edilmiş trombositler aynı zamanda trombosit agregasyonunu artıran tromboksan A2 gibi bileşikler de serbest bırakır. Tüm bu olaylar trombosit tıkaçının oluşmasıyla sonuçlanır (Şekil 5).

Tıkaç içerisindeki trombositler, aşağıda sıralanan çeşitli büyüme faktörlerini salgılayan alfa granüllerini degranüle eder ve onları serbest bırakır:

- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
- İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
- Epidermal büyüme faktörü
- Dönüştürücü büyüme faktörü- β
- Trombosit faktörü-IV.

Salınan büyüme faktörleri çeşitli yaralanmaların tedavisinde önemli etkilere sahiptir. (Golebiewska & Poole, 2015) Son aşama ise fibrin pıhtısının oluşmasıdır. Trombosit tıkaçının etrafını sararak daha kalıcı bir pıhtı oluşmasına yardımcı olur (Rodrigues vd., 2019).

1.4.2. İnflamasyon

Hemostazdan sonraki aşama olan inflamasyon yara iyileşmesinde vücudun verdiği doğal bir tepkimedir. Bu aşamanın amacı yaranın temizlenip enfeksiyon oluşumunu engelleyerek yarayı bir sonraki aşamaya hazırlamaktır. Yaralanma gerçekleşikten hemen sonra nötrofiller yaraya göç ederler. Nötrofiller, TGF- β sinyali, interlökin aktivasyonu gibi birçok mekanizmalara aracılık ederler (Broughton). Nötrofiller yarada bulunan bakteri gibi mikroorganizmaları yok ederler. Bu aşamada üç farklı mekanizma gerçekleşebilir. Birinci, fagositoz olarak isimlendirilen doğrudan yutup yok ettikleridir (Levin vd., 2016). İkinci mekanizma ise, katepsin, laktoferrin gibi maddeleri salarak bakteri veya ölü dokuyu yok ederler. Son olarak ise hücre dışı boşluğa uzanan kromatin ve proteaz tuzakları üreterek bakterileri yakalayarak öldürürler (Yipp & Kubes, 2013). Nötrofiller ilk görevlerini bitirdikten sonra apoptoza uğrayabilirler ya da makrofajlar tarafından fagosite olabilirler (Bratton & Henson, 2011). Makrofajlar, oldukça büyük fagositik hücrelerdir. Yaralanmadan 48 saat sonra konsantrasyonları artmaktadır. TGF- β ve EGF gibi anjiyogenezi uyarmada ve inflamatuvar yanıtı düzenlemede görev alan büyüme faktörlerini içinde barındırır. Yara iyileşmesinin geri kalan kısmında makrofajlar baskındırlar. Kalan mikroorganizmaları, hücre kalıntıları ve görevini tamamlamış olan nötrofilleri yok ederler. Bunun haricinde yara onarımını başlatmak için gerekli olan faktörleri ve sitokinleri salgırlar (Krieg vd., 2010). Yara iyileşmesinde iltihaplanmaya karşı bir dizi hücre daha savaşmaya devam eder. Bunlar lenfositler, trombositler, keratinositler ve fibroblastlardır.

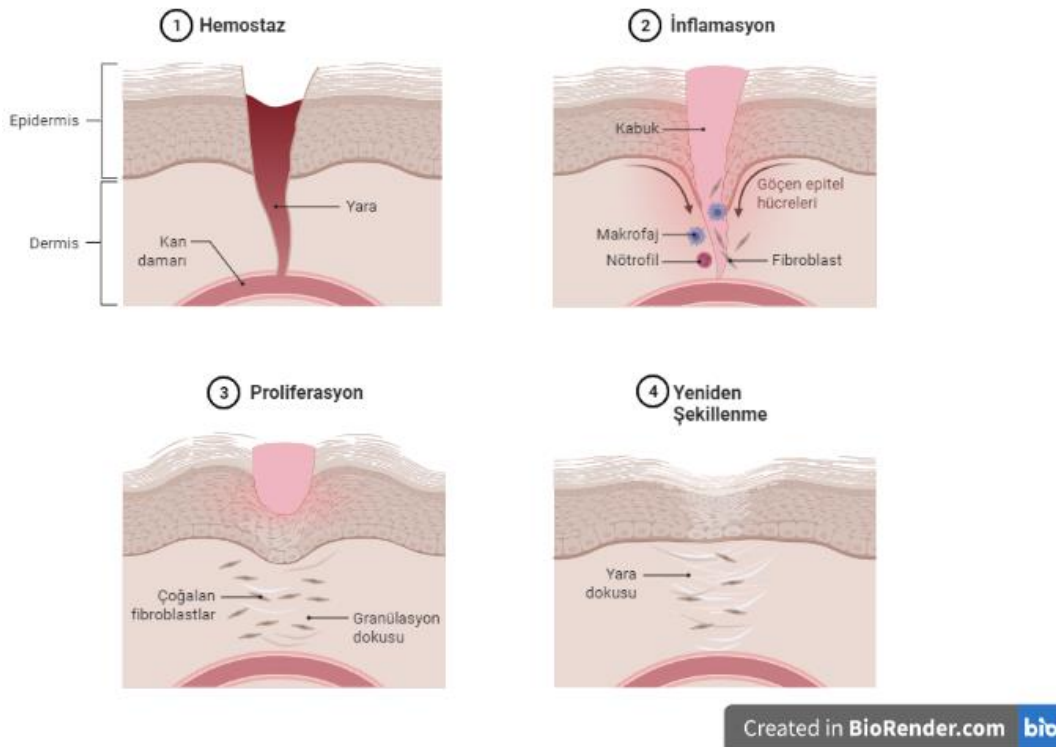
1.4.3. Proliferasyon

Yara iyileşmesinin üçüncü aşaması olan proliferasyonda eş zamanlı olarak yeniden epitelizasyon, neovaskülarizasyon ve immünomodülasyon gibi süreçler ile granülasyon dokusunun oluşması şeklinde gözlemlenir. Bir yaranın iyileşebilmesi için yeni kan damarların yahut neovaskülarizasyonun gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Anjiyogenez, hemostatik tıkaçın, trombositleri, TGF- β , PDGF ve FGF serbest bırakmasıyla başlamaktadır. Bu aşamada kan damarlarının onarımı için endotel hücrelerini indükleyen VEGF salgınmaktadır. VEGF ve HDM'nin yeniden şekillenmesi ile anjiyogenez başlamaktadır. Bu süreç ilerledikçe yaranın etrafında damarlarla bir ağ oluşmaktadır (Eilken & Adams, 2010).

Fibroblastlar, proliferasyonda oldukça büyük bir rol oynarlar. Büyüme faktörleri ile uyarılan fibroblastlar çoğalır ve yaraya doğru göç ederler. Fibroblastlar, hyalüronan, proteoglikanlar ve fibronektinlerle granülasyon meydana gelmektedir. Bu aşamada fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajenler dokunun güçlenmesi açısından oldukça önemlidir (Fujiwara vd., 2013). En büyük hücre gruplarından olan keratinositler lokal olarak salınan büyüme faktörleri ile çoğalır ve yaraya göç etmeye başlar. Keratinositler yara üstünde bölünüp ve farklılaşarak yeni bir deri tabakası oluştururlar.

1.4.4. Yeniden Şekillenme

Son aşama olan yeniden şekillenmede, granülasyon dokusunun olgunlaşarak bağ dokusuna ya da skara dönüşmesidir. Ancak bu süreç aylar hatta yıllarca sürebilmektedir. Biriken kollajen ve diğer proteinler artık daha iyi organize olmaya başlarlar. Sonunda sağlam doku görünene kadar sentez ve bozunma arasındaki denge devam etmektedir. Bu süreçte kollajen demetlerinin gücü artmaya, fibronektin ve hyalüronan değişmesi ile devam etmektedir. Neovaskülarizasyon artık durur (Frances, 2001).



Şekil 5. Yara İyileşmesinin aşamaları (Görsel BioRender da çizilmiştir.)

1.5. Yara Örtüsü Uygulamaları

Yara iyileşmesinde süreci hızlandırmak ve enfeksiyon gibi komplikasyonların oluşmasının önüne geçmek adına deri için ideal olabilecek bir yara örtüsü gerekmektedir. Yara iyileşmesinin gerçekleşebilmesi için elverişli bir ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Yara örtülerinde bulunması ihtiyaç olan özellikler Şekil 6'da görülmektedir. Bu özellikler düşünülerek farklı yara örtüsü uygulamaları yapılmaktadır. Yara örtüleri sınıflandırılırken fiziksel formlarına göre hidrojel, film, köpük, süngerler şeklinde olabilir. Yara örtülerini iki başlık altında modern ve geleneksel yara örtüleri şeklinde sınıflandırabilmekteyiz (Rezvani Ghomi vd., 2019).



Şekil 6. İdeal yara örtüsünün özellikleri (Rezvani Ghomi vd., 2019)

1.5.1. Geleneksel Yara Örtüleri

Geleneksel örtülerdeki amaç, yara iyileşmesine katkı sağlamak değil yarayı dış ortamdan korumak ve enfeksiyon gibi kontaminasyonları önlemektir. Gazlı bezler, bandajlar, flasterler, yara bantları bunlara örnektirler. Pamuk, ipek, polyester gibi malzemelerden yapılan örtüler bakteriler ve mikroplara karşı koruma sağlamakta iken bazı gazlı bezlerde yaradan gelen akıntıları emmek amacıyla kullanılır. Pansumanların sık sık değiştirilmesi yara bakımında oldukça önemlidir. Geleneksel yara örtüleri, yara iyileşmesine yeterli katkı sağlamadığından çok daha gelişmiş olan modern yara örtüleri geliştirilmeye çalışılmıştır (Boateng vd., 2008).

1.5.2. Modern Yara Örtüleri

Modern yara örtülerinde amaç ise, gazlı bezlerde olduğu gibi yarayı kapatmak değil yara iyileşmesi aşamalarına katkı sağlamaktır. Yaranın bulunduğu yere, nedenine ve tipine göre değişebilmektedir. Sentetik veya doğal polimerlerden yapılabilmektedir. Bunlar hidrojel, film, sünger ya da köpük formda bulunabilir.

Süngerler solüsyonların dondurularak kurutulması ile elde edilen yara iyileştirme de kullanılan örtülerdendir. Süngerlerde kullanılan malzemeye ve yapılan yonteme göre gözeneklilik değişmektedir. Sahip oldukları gözeneklilik, oksijen geçirgenliği, sıvı emme kabiliyeti gibi özellikleri nedeniyle birçok tedavide kullanılmıştır. Süngerler, nemli ortamı sağlanması ve granüle dokunun oluşumuna yardım etmektedir. Deri-doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla kollajen, aljinat, ipek ve kitosan gibi doğal polimerler ile süngerler geliştirilmiştir. Süngerlerin bir dezavantajı ise sahip oldukları geniş gözeneklerde büyüme faktörlerinin ve ilaçların hızlı dağılması ile tesirin eksik olmasıdır (Ramanathan vd., 2017).

Hidrojeller ise yüksek su içeriğine sahip olan polimerlerin, fiziksel veya kimyasal yollarla çapraz bağlanması ile polimer zincirlerin üç boyutlu bir yapı almasıyla elde edilir. Oldukça gözenekli yapılardır. Sahip oldukları hidrofilik yapısı ile gaz değişimi ve sıvı dengesini sağlayarak yara çevresinde gerekli nemi sağlamaktadırlar. Hidrojeller, HDM'nin yapısını taklit ederek hücre göçünü, proliferasyonunu destekleyebilmektedir.

Hem doğal hem de sentetik malzemeler kullanılarak çeşitli, hidrojeller sentezlenebilmektedir. Hidrojellerin dezavantajları ise sahip oldukları yapı ile dikilebilir formda olmaması ve geniş gözenekli yapısı ile ilaç salınımlarında sorunlar olabilmektedir (Annabi, 2014).

Bu tez çalışmasında ise yara örtülerinin film formuna odaklanılmıştır. Filmler solvent döküm tekniği, tuz liçi, kalıplama gibi yöntemlerle elde edilebilmektedir. Esnek yapıları ile yara çevresine uyum sağlamaları ile avantajlıdır. Gaz geçirgenliği olduğu gibi bakteri geçirimsizdir. Filmler sentetik, doğal polimerler ve aktif malzemeler ile hazırlanabilmektedir (Savencu vd., 2021).

1.6. Deri Doku Mühendisliği için Biyomalzemeler

Deri doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli sentetik, doğal veya kompozit malzemeler kullanılabilir. Kullanılan biyomalzemeler nano yahut mikro ölçekte de olabilmektedir. Bugüne kadar deri doku mühendisliği uygulamalarında deri dokusunun yenilenmesine destek olup yara iyileşmesine katkı sağlayabilen çeşitli malzemeler kullanılmıştır. Kullanılan biyomalzemelerin HDM'yi taklit ederek yapısal destek sağlayabilecek özellikte malzemeler şeklinde tasarlanmaktadır. Biyomalzemeler, uygun mekanik özellikler, biyoyumluluk, biyobozunurluk, hücrel aktivitelere izin verme gibi özelliklere sahip olmalıdır. DDM'de kullanılan biyomalzemeleri sentetik ve doğal polimerler şeklinde sınıflandırabiliriz. Kullanılan doğal polimerler karbonhidrat ya da protein kökenli olabilmektedir. Bunlar iyileşmeye katkı sağlayarak doku yenilenmesini desteklemektedir. Diğer yandan sentetik polimerler kontrol edilebilir şekilde üretilmektedir (Chaudhari vd., 2016).

1.6.1. Sentetik Polimerler

Sentetik malzemeler ayarlanabilen bozunurluğa, güzel mekanik özelliklere sahiptirler ayrıca üretilmeleri oldukça kolay ve maliyeti düşüktür. Bu özelliklerinden dolayı deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanımları araştırılmıştır. Deri doku mühendisliğinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı olan, kopolimleri de dahil olmak üzere poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sentetik polimerlerde fonksiyonel gruplar kimyasal olarak ayarlanıp, doku rejenerasyonu için uygun hale getirilebilmektedir. Her ne kadar ayarlanabilir olsalar da biyouyumlulukları ve hücre afinitesi, doğal biyomalzemelere oranla düşüktürler. Kullanılan sentetik materyallerin bazı durumlarda bozunma ürünleri inflamatuvar yanıtla neden olacak şekilde sitotoksik olabilmektedir (Griffith, 2002). Deri doku mühendisliğinde kullanılabilen bazı sentetik malzemeler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1
Sentetik biyomalzemeler (Ghorbani vd., 2018)

| Polimerler | Özellikleri |
|------------|---|
| PLA | <ul style="list-style-type: none"> • Biyouyumlu • Biyobozunur • Termal stabiliteye sahip • Hücre adezyonunu destekleyici • Toksik ve inflamatuvar değildir |
| PLGA | <ul style="list-style-type: none"> • Biyobozunur • Zayıf mekanik mukavemet • Ayarlanabilir özellikler • Biyouyumlu • Esnek |
| PCL | <ul style="list-style-type: none"> • Yavaş biyobozunurluk • Hidrofobik • Düşük biyoaktivite • Düşük erime noktası |
| PGA | <ul style="list-style-type: none"> • Biyouyumlu • Biyobozunur • Hücre adezyonunu destekler • İnflamatuvar değildir |

1.6.2 Doğal Polimerler

Doğal polimerler, biyouyumlulukları, hücre proliferasyonu, biyolojik olarak parçalanabilir olması gibi doğal biyoaktiviteleri nedeniyle deri doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen önemli polimerlerdir.

Doğal polimerlerin bu özellikleri doğal olarak karşıladıkları için kullanımları oldukça uygundur (Naseri & Ahmadi, 2022). HDM, hücrelerin çoğalma, göç ve farklılaşmasına yardımcı olduğu gibi hücrelere fiziksel destek sağlayıp homeostaz, morfogenez benzeri hücresel aktiviteleri düzenlemek ile doku yenilenmesinde kritik bir önem arz etmektedir (Achilleas vd., 2016).

Vücut zarar gördüğü durumlarda HDM ile kusurları iyileştiremeyebilir. Bunlar düşünüldüğünden doğal polimerlerle üretilmiş yara örtüleri deri doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmıştır. Yara iyileşmesine destek bağlamında kullanım için düşünülebilecek birçok doğal biyomalzeme bulunmaktadır.

Deri yenilenmesinde kullanılan doğal biyomalzemeler protein veya polisakkarit kaynaklı olabilmektedir. Bu polimerler, zarar görmüş dokuyu onararak iyileşmeyi uyarır ve etkili deri rejenerasyonunu destekler (Huang & Fu, 2010).

Deri doku mühendisliğinde protein kaynaklı malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinler, deri bileşenlerinin büyük çoğunluğunu oluştururlar. Bundan kaynaklı olarak fibroblastlar ve keratinositler için uygun bir mikro ortam sağlarlar. Aynı zamanda, hücre adezyon dizilerinin varlığından dolayı, proteinler HDM'nin gelişmesinde etkin parametrelerden biridir. Bir malzeme geliştirirken doğayı taklit etme girişimlerimiz, aslında bir rutin şekilde protein biyosentezinin hücresel sistemleri tarafından inanılmaz bir şekilde yüksek bir verimlilikle gerçekleşir. Tasarlanan ürünlerde istenilen özelliklere sahip olunabilmesi için dikkat edilecek temel husus, tanımlanmış proteinlerin iyi oranda saflaştırılmış olmasıdır. Protein kaynaklı biyomalzemelere keratin, kollajen, ipek, aljinat, jelatin gibi örnekler verilebilir (Malafaya vd., 2007).

Polisakkaritler, basit şeker monomerlerinin, monosakkaritlerin hidroksil gruplarından birine O -glikosidik bağlarla birbirine bağlanarak polimerler oluşmaktadır. Monosakkaritlerin bileşimindeki, zincir şekilleri ve moleküler ağırlıkları polimerlerin çözünürlük, jelleşme biçimi ve yüzey özellikleri gibi birçok fiziksel özelliklerini belirlemektedir. Polisakkarit temelli biyomalzemelere kitosan, hyaluronik asit ve aljinat örnek verilebilecek en popüler malzemelerdir.

Bunlar kitosan, selüloz, desktran ve gluklanlar gibi homoglukan polisakkaritler olduğu gibi aljinat, agaroz, pektin, zamklar ve glikozaminoglikanlar gibi heteroglukan polisakkaritler şeklinde sınıflandırılabilir. Hepsi kendi özgü biyoyumluluk, biyobozunurluk ve fizikokimyasal özellikler sergilemektedir (Nishinari & Takahashi, 2003). Tablo 2 ve 3'te DDM uygulamalarında sıklıkla kullanılan polisakkarit ve protein kökenli doğal polimerler kısaca özetlenmiştir.

Tablo 2

Polisakkarit temelli biyomalzemeler (Lin vd., 2015)

| Polimerler | Özellikleri |
|-----------------|---|
| Kitosan | <ul style="list-style-type: none"> • Biyolojik olarak yenilenebilir • Biyoyumlu • Antijenik ve toksik değildir • Biyofonksiyoneldir • Antibakteriyel • Yüksek kırılgenlik |
| Hyalüronik asit | <ul style="list-style-type: none"> • İyi hücre afinitesi • Gelişmiş viskoelastik özellikler • Düşük mekanik mukavemet • Biyoyumlu • Biyobozunabilir |
| Selüloz | <ul style="list-style-type: none"> • Mikrofiber özelliğinden dolayı olağanüstü mekanik özelliklere sahiptir • Hidrofilik • Kolay ayarlanabilir özellikler |
| Aljinat | <ul style="list-style-type: none"> • Biyoyumlu • Kontrol edilemeyen bozunma kinetiklerine sahip • Karboksil uç gruplarına sahip anyonik bir polimer |

Tablo 3
Protein temelli biyomalzemeler (Gu & Coulombe, 2007)

| Polimerler | Özellikleri |
|--------------|---|
| Keratin | <ul style="list-style-type: none">• Kararlı kimyasal özellikler• Yüksek mekanik güç• Biyobozunur• Biyouyumlu• Hücresel etkileşim |
| Kollajen | <ul style="list-style-type: none">• Biyouyumluluk• Düşük antijenite• Çapraz bağlanma kabiliyeti• Hücre dışı matrisin ana protein bileşimi |
| İpek Fibroin | <ul style="list-style-type: none">• Esneklik ve gerilme mukavemeti gibi iyi mekanik özelliklere sahiptir• Bozunma ürünleri toksik değil• Biyouyumlu |
| Jelatin | <ul style="list-style-type: none">• Biyobozunur• Biyouyumlu• Hemostatik özellik• Zayıf mekaniksel özellik• Kırılgan |
| Fibrin | <ul style="list-style-type: none">• Anjiyogenezi• Granülasyon dokusu oluşumu• Fibroblast proliferasyonunu destekler• Biyouyumludur |

Keratin

Keratin, epitel hücrelerinde en çok bulunan yapısal proteinlerdendir ve kollajenlerle birlikte hayvanlarda en önemli biyopolimerin başında gelir (Coulombe & Omary, 2002). Keratinler, omurgalıların bazı epitel hücrelerinde üretilen, çözünmeyen ve filament oluşturan proteinlerdir. Ara filament proteinlerinin üst ailesindedirler (Riemer & Weber, 1998). Epidermisin büyük kısmını oluşturan keratinler saç, yün, tırnaklar, boynuzlar ve tüyler gibi epidermal uzantıları oluşturan fibröz bir proteindir. (Şekil 7)

Keratini, diğer proteinlerden ayrıştıran en önemli ve kritik özelliklerinden biri yüksek sistein içeriği barındırmasıdır (Bragulla & Homberger, 2009).



Şekil 7. Keratin kaynakları (Chilakamarry vd., 2021)

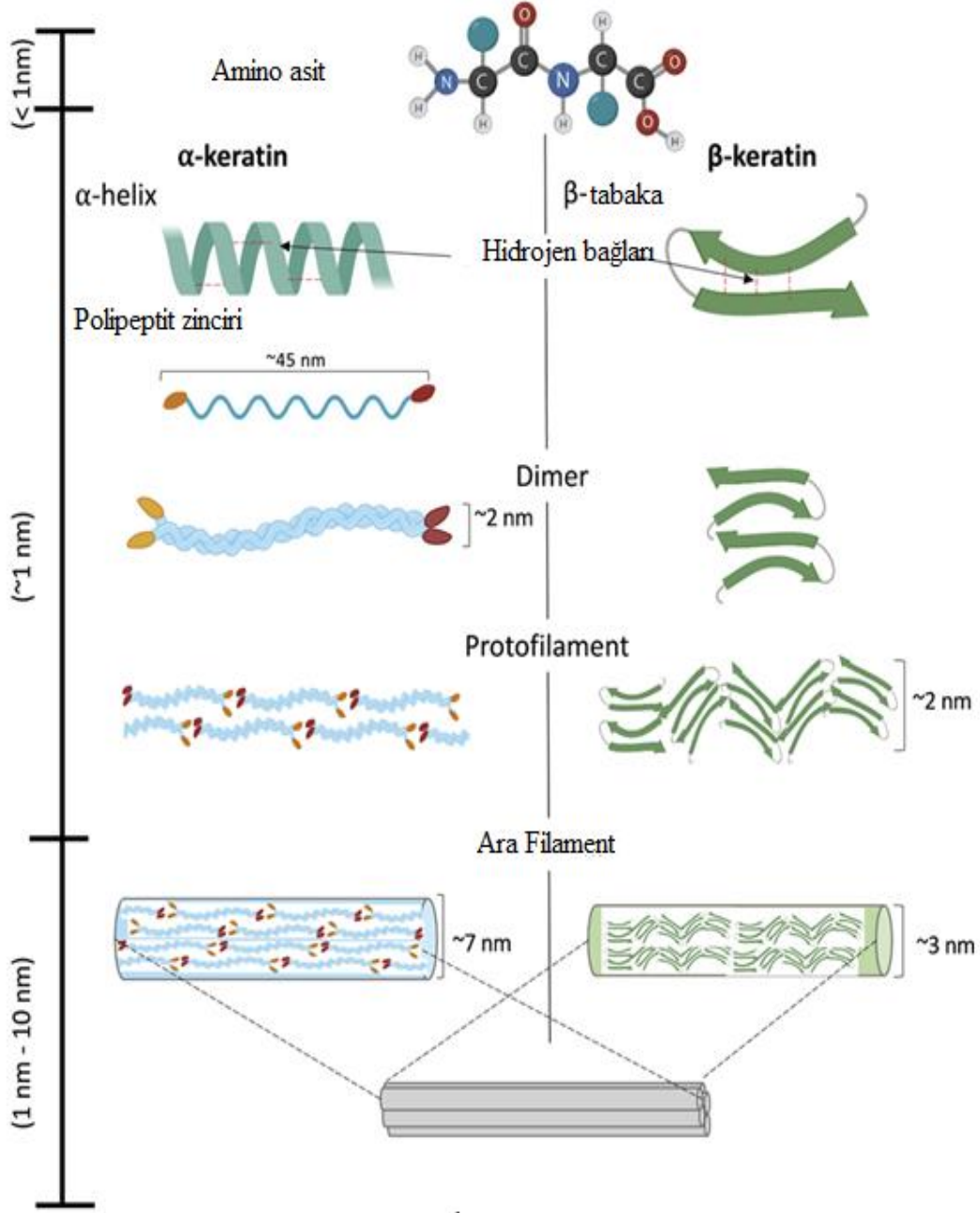
Keratinin yapısına bakıldığında temel olarak makromoleküller polipeptit zincirlerinden oluşmaktadır. İçeriğindeki aminoasit dizisi, yükü, boyutu, polaritesi ile farklılık gösteren bu polipeptit zincirler keratinin birincil yapısının farklılığını yansıtmaktadır. Bu zincirler heliks şeklinde yani α -sarmalı şeklinde veya yan yana kıvrımlı β -tabakalar halinde bağlanabilmektedirler. Bu zincirler sarmal bir bobin halinde kıvrılır ve yan yana sıralanır. Memelilerde α -keratin varyantı, saç, derinin epidermal tabakası, tüy, tırnak ve boynuz önemli bileşenler arasındadır. Sürüngenler ve kuşların tüyleri, pençeleri ve gagaları β -tabaka ile yapılanmıştır. α -heliksler ve β -tabakalar, proteinlerdeki destekleyici yapılardır bundan dolayı, keratinlerin sınıflandırılmasında kullanılır. α keratin, yün, tüyler, saç, tırnaklar, boynuzlar, toynaklar ve stratum corneum da bulunmaktadır. β -tabakalar ise tüyler, kuş gagaları ve pençeleri, sürüngen pençeleri ve pullarında bulunmaktadır. α - ve β -keratin birlikte sürüngen epidermisi, pangolin pullarında bulunur (Alibardi vd., 2009).

Disülfid bağ miktarı arttıkça yapı daha sağlam ve sert olmaktadır. Buna kuşların gagaları ya da hayvanların toynakları örnek verilebilir. α -keratin, protein matriksi içerisinde bulunan filamentler oluşturmaktadır. Sistein bakımından oldukça zengin iken daha az prolin içermektedir.

β -keratin yapısında ise filamentler sıkı olmayan bir şekilde sıralanmıştır bundan dolayı yumuşak keratin olarak bilinmektedir. Sistein bakımından fakir iken alanin açısından oldukça zengindir. α - ve β -keratinin atomik ölçeği ile alt nano ölçeği arasındaki karşılaştırması Şekil 8'de verilmiştir. Her ikisi de atomik ölçekte amino asitlerden oluşmaktadır. α -keratini yapısında amino asitler hidrojen bağları ile bağlanarak, α -sarmalı ikincil protein yapısını oluşturmaktadır.

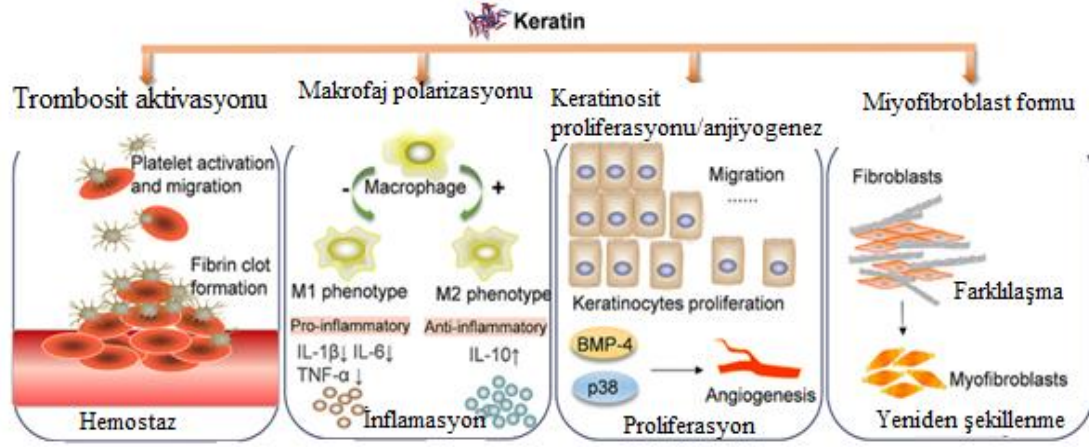
Polipeptit zincirleri şeklinde de ifade edilen protein yapısı ara filamentlerin yapı taşıdır. İki polipeptit zincirleri ile dimer yapısı oluşmaktadır. Dimerler, uzunlamasına disülfid bağları ile bağlanarak protofilament yapısını oluştururlar. İki protofilament bir protofibril oluştur ve dört protofibril yapısı bağlanarak ara filamentleri oluşturmaktadır. α -keratin ve β -keratin birbirinden nano ölçekte ayrılmaktadır. β -keratinde benzer bir düzende ilerlemektedir. Karşılaştırıldığında, β -keratin farklı bir ikincil protein yapısına sahiptir. β -keratin, anti paralel peptit zincirleri yana yana gelerek, sert bir yüzey oluştururlar. Her ikisi de daha sonra mikro ölçekte, farklı organizmalar için farklılık göstermektedir.

Amino asit analizlerine bakıldığında, keratin büyük miktarda sistin, glisin, alanin, prolin ve serin içermektedir. Ayrıca düşük miktarda lizin, histidin, metiyonin ve triptofan içermektedir (Korniłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011). Disülfid bağlarının zincirler arası ve zincir içi oldukça fazla olması ayrıca hidrojen, hidrofobik ve iyonik bağlarla kombinasyonlar halinde, kararlı kimyasal yapı ve hem enzimatik hem de termal direnç sağlamaktadır. İçerdikleri disülfid bağları ve çapraz bağları nedeniyle keratin çoğu çözücüde çözünmezler. Bundan dolayı keratini çıkarmak için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Bunlar indirgeme, oksidasyon, mikrodalga radyasyonu, iyonik sıvıların kullanımı ve enzimlerin kullanıldığı yaklaşımlardır (Shavandi vd., 2017).



Şekil 8. Keratinin yapısı (Lazarus vd., 2021)

Yara iyileşmesi, vücudun doğal bir şekilde gerçekleştirdiği oldukça karmaşık bir süreçtir. Dört aşamada gerçekleşen bu süreçte keratinlerin belirli hücreleri veya molekülleri düzenlediği tespit edilmiştir (S. Y. Kim vd., 2019). Şekil 9 de keratinin yara iyileşmesi sürecinde bulunan aşamalarındaki etkisi gösterilmiştir.



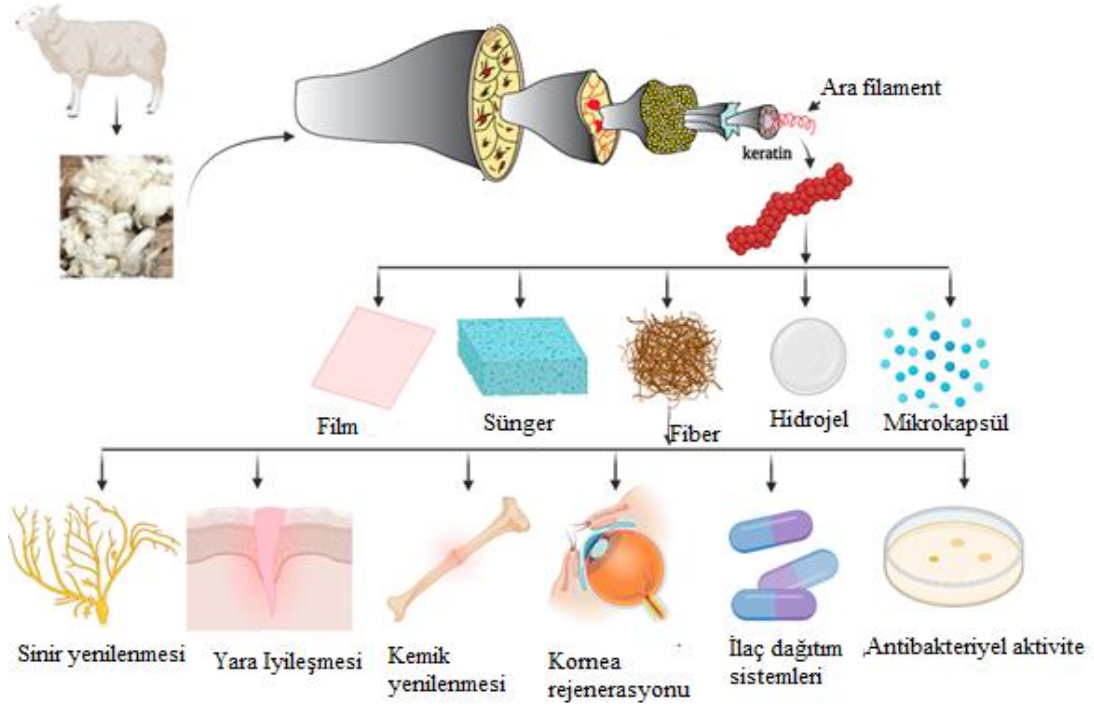
Şekil 9. Keratinin yara iyileşmesi aşamalarındaki etkisi (Ye vd., 2022)

Keratinler, hemostatik fazda trombositleri aktive ederek fibrin pıhtı oluşumunu desteklemektedir. Enflamatuvar fazda makrofajların polarizasyonunu etkileyerek M1 ve M2 fenotipini inhibe ederler. Böylelikle sitokin salınımını düzenler. Proliferasyonda ise keratinosit aktivasyonunu ve göçünü uyarırken aynı zamanda da anjyogenez etkilemektedir. Son olarak yeniden şekillenme aşamasında ise tip IV ve VII kollajen ekspresyonunu düzenler ve böylelikle miyofibroblastların oluşumunu uyarmaktadır.

Antimikrobiyal özellikler yara tedavisinde olduğu gibi biyomedikal uygulamalarında da önemlidir. Keratinin pozitif yüke sahip amino grupları, negatif yüke sahip bakteri duvarlarına bağlanarak bakteriyel büyümeye engel olduğu görülmüştür (Khajavi vd., 2016).

Yün ve insan saçı kaynaklı keratinlerin lösin-aspartik asit-valin (LDV) ve glutamik asit-aspartik asit-serin (EDS) gibi hücresel bağlanmalara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Keratin üç boyutlu bir matris oluşturarak hücresel bağlanmaya ve çoğalmaya yardımcı olur (Magin vd., 2007).

Keratin bu özellikleriyle beraber sahip olduğu mükemmel biyouyumlulukları ile çeşitli biyomedikal uygulamalarda dikkat çekmektedir. Keratin kaynaklı filmler, hidrojeller, süngerler ve fiberler geliştirilerek doku mühendisliğinde birçok alanda kullanılabilir. (Şekil 10)

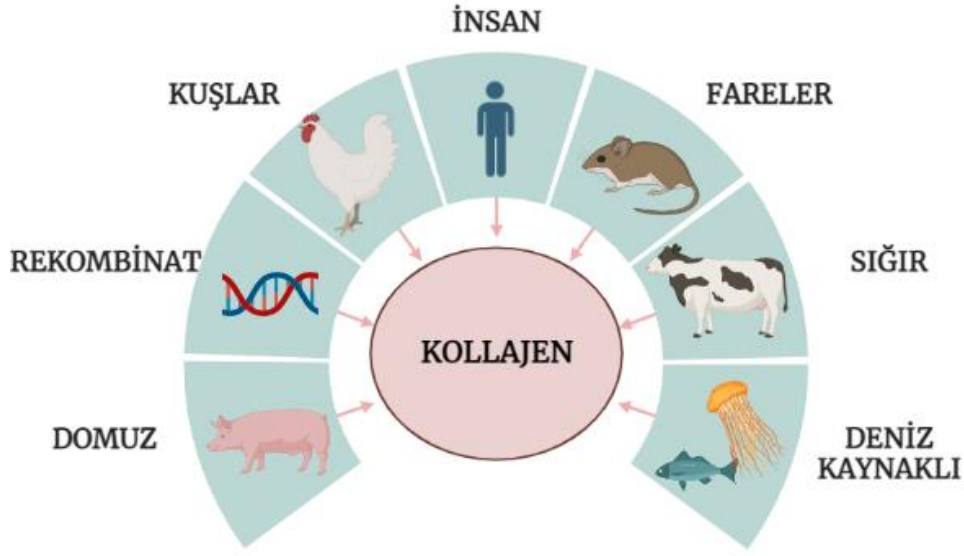


Şekil 10. Keratinin doku mühendisliğinde kullanım alanları (Ranjit vd., 2022)

Kollajen

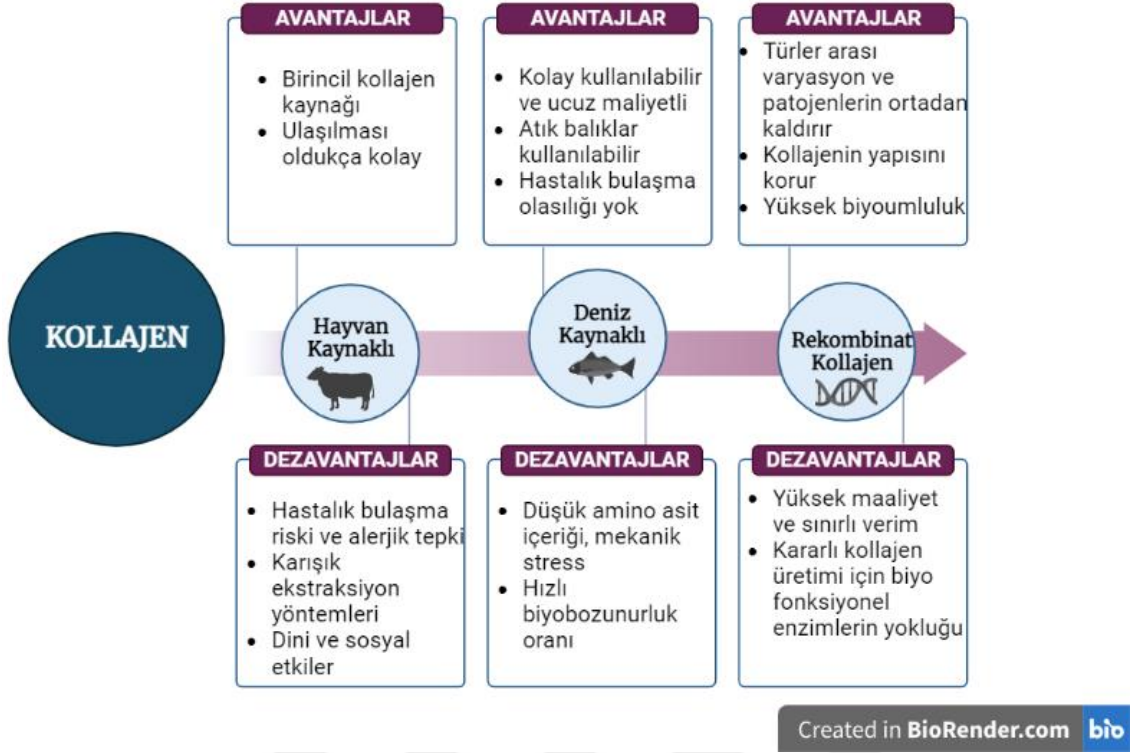
Cilt, kemik ve kas yapısında bulunan kollajen, oldukça önemli olan fibrillerden oluşan bir proteindir. Memelilerin %25-30'unu oluşturmaktadır (Sandhu vd., 2012). Kollajen, kemiklere ve deriye yapısal destek sağlayıp esneklik ve güç kaynağı olan HDM'nin bir proteindir. Yapılardaki bu rolünden dolayı birçok türde bulunmaktadır. Biyouyumlu oluşu, antijenik olmaması ve biyolojik aktivitelerinden dolayı birçok çalışmada kollajene özel olarak odaklanılmıştır (Yeung & Kelly, 2021).

Hayvanlarda oldukça fazla bulunan kollajen, bundan dolayı izolasyonunda hayvanlar birincil kaynak olarak kullanılmaktadır. Şekil 11'de başlıca kollajen kaynakları gösterilmiştir. Bitkiler, prokollajen yani kollajen öncüsünün üretilmesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca bitkisel kaynaklar olan, vitaminler, antioksidanlar ciltte kollajen sentezlenmesine destek olmaktadır (Cherim vd., 2019).



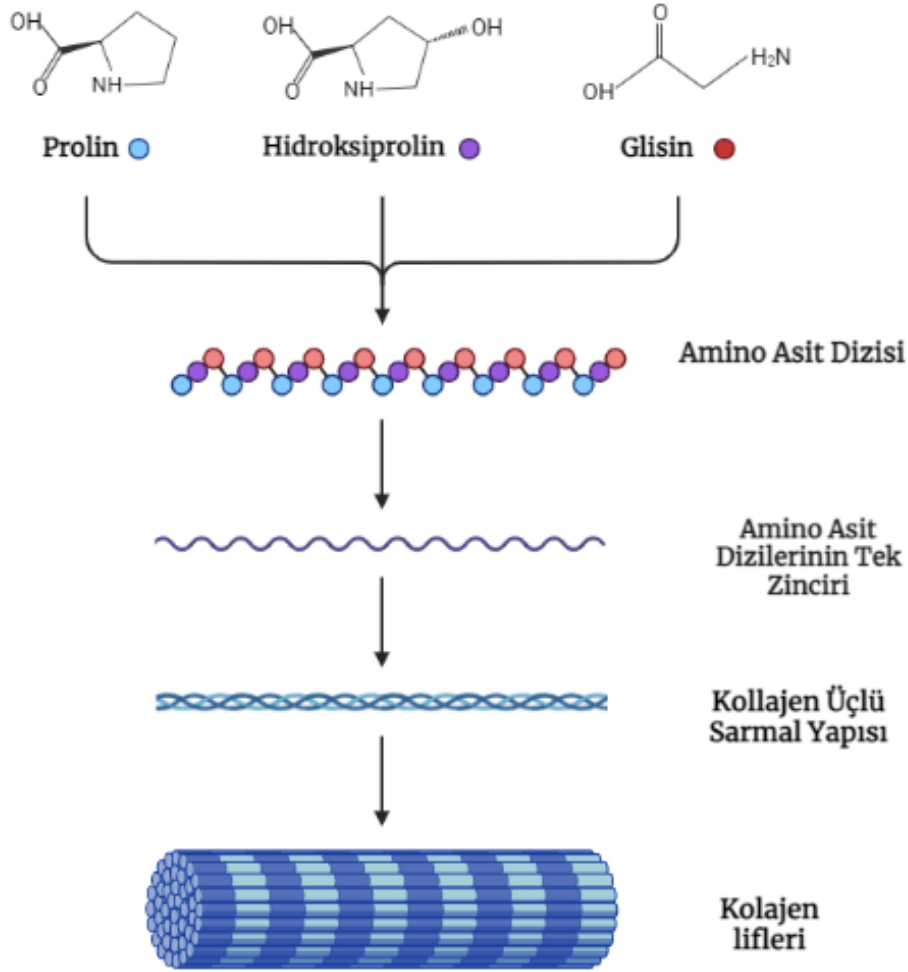
Şekil 11. Kollajen kaynakları (Görsel BioRender da çizilmiştir.)

Çeşitli kaynaklardan elde edilen kollajenlerin, kaynağa göre avantajları ve dezavantajları olabilmektedir. Kollajenin amino asit içeriği kaynağa göre farklılıklar göstermektedir. Kollajen kaynağının seçimi yapılırken, fiziksel ve kimyasal özelliklere etkisi göz önünde bulundurularak kullanılacak yere göre seçilmesi önemlidir. Bu farklılıklar sadece fiziksel ve kimyasal özellikleri etkilemekle kalmayıp aynı zamanda termal stabiliteyi, çapraz bağlanmasını etkilemektedir (Subhan vd., 2021) (Yousefi vd., 2017) (Gauza-Włodarczyk vd., 2017). Şekil 12 de kollajen kaynakları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 12. Kollajen kaynaklarının avantaj ve dezavantajları (Gajbhiye & Wairkar, 2022)

Kollajenin yapısına baktığımızda en yüksek oranda glisin, prolin ve alanin içeren 23 farklı amino asitten oluşmaktadır. Amino asit dizisi, kollajenin yapısını belirlemektedir (Pauling & Corey, 1951). Üç farklı polipeptit zincirinin sarmal bir şekilde kompleks oluşturmasıyla kollajen molekülü elde edilir. (Şekil 13) Her bir polipeptit zinciri yaklaşık 1000 aminoasitten oluşmaktadır. En temel aminoasit olan glisin hidrojen bağlarını kolaylaştırıp üçlü sarmal yapının sıkı bir şekilde stabilize etmektedir. Prolin ve hidroksiprolin, kollajenin stabilitesinde kritik bir etkisi bulunmaktadır ve sarmalın bükülmüş yapısının sağlanmasına yardımcı olmaktadır (O'Leary & Fallas, 2011).



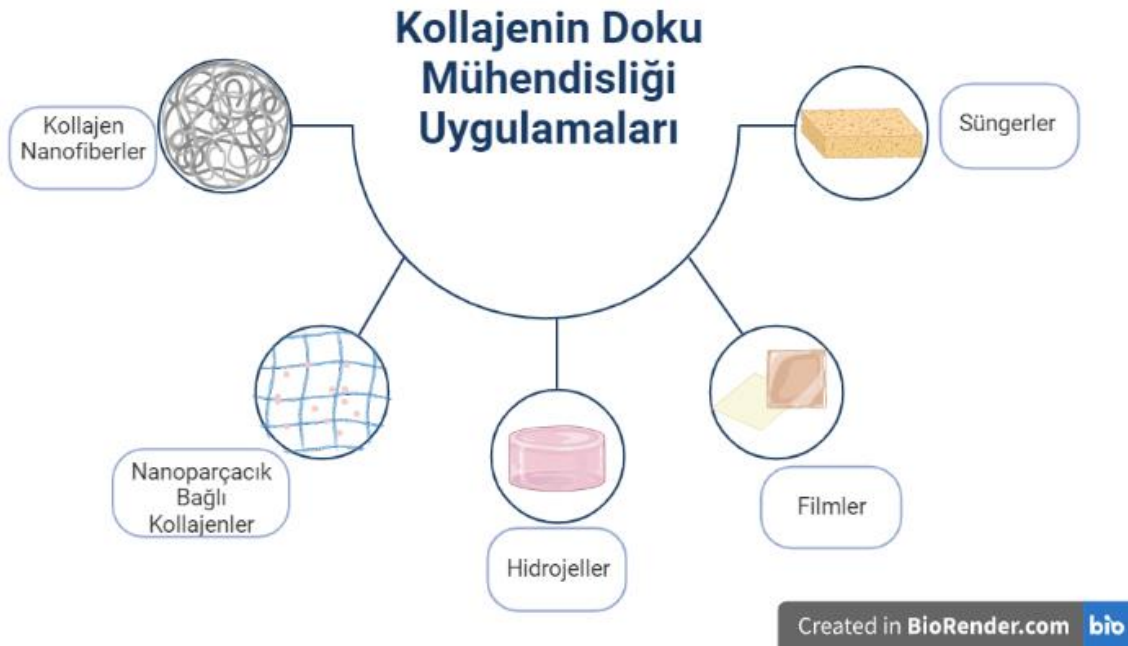
Created in BioRender.com **bio**

Şekil 13. Kollajenin yapısı (Görsel BioRender da çizilmiştir.)

Kollajen, hücrelerin göç, çoğalması ve farklılaşmasını teşvik etmektedir. Böylelikle yara iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Fibroblastların büyümesinin kontrolünde yer alan kollajen, keratinosit çoğalması, farklılaşması ve bağlanmasını belirlerken fibroblastlarında proliferasyonunu etkilemektedir (Ruszczak, 2003). Faydalı özelliklerinden dolayı kollajen sıklıkla yara iyileştirme çalışmalarında kullanılmaktadır (Castile vd., 2001). Kollajen yıkımı ile üretilmesindeki ilişki deri iyileşmesindeki süreç açısından önem arz etmektedir. Yaranın olduğu bölgede kollajenin üretilmesi, dönüştürücü büyüme faktörü- β , interlökin-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü tarafından gerçekleşir.

Böylelikle kollajen birikmesi gerçekleşir ve bu da fibroblastların çoğalmasına ve yeniden epitelizasyona neden olmaktadır (Mathew-Steiner vd., 2021).

Kollajen, yara iyileşmesini destekleyen fibroblastlar, makrofajlar vb. hücreleri indüklemesi, biyouyumluluğu, kolay uygulanabilir olmasından dolayı birçok biyomedikal uygulaması yapılabilmektedir (Chattopadhyay & Raines, 2014). Şekil 14'te kollajenin kullanıldığı sistemler gösterilmiştir.



Şekil 14. Kollajenin doku mühendisliği uygulamaları (Gajbhiye & Wairkar, 2022)

1.7. Bor Mineralinin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri

Doğada elementel halde bulunmayan bor, organizmalarda sodyum ve oksijen ile organobor kompleksleri oluşturabilmektedir. Bor, doğal olarak toprakta, suda ve kayalarda yaygın olarak bulunabilmektedir (Walsh vd., 1994). Organizmalarda Bor'un ~%96'lık dilimi borik asit ($B(OH)_3$) olarak yer alırken, az bir oranda da borat anyonu ($B(OH)_4^-$) bulunmaktadır (Bolaños vd., 2004). Bor mineralinin, organizma üzerindeki biyolojik etkisi tam olarak anlaşılammıştır. Bor, hormonların üretimi, iyon taşınması, kemik rejenerasyonu

gibi bazı metabolik olaylarda rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda %3 borik asit solüsyonunun yaraların iyileşme hızını arttırdığını göstermiştir (Benderdour vd., 1998).

Bor ve türevleri, keratinosit göçünü artırıp, artan matris metalloproteinaz ekspresyonu ile hücre dışı matris dönüşümünün arttırmaktadır. Aynı zamanda anjiyogenezi indükleyen TNF- α 'nın yoğunluğunu artırıp, enflamatuvar mediatörden sorumlu genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Chebassier vd., 2004).

Bor ile yapılan tedavilerde, kemik dokularının üretimlerinden sorumlu HDM proteinleri olan kollajen tip 1, osteopontin, osteokalsin sentezini arttırmaktadır (Doğan vd., 2014).

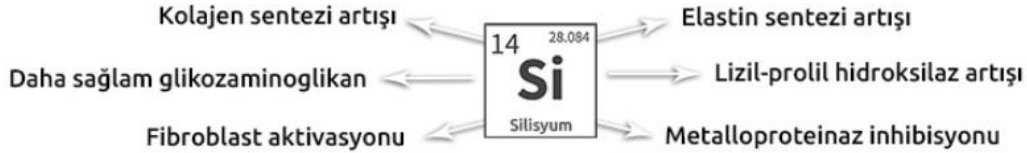
Boronik asitle işlevselleştirilmiş nanomalzemeler biyoalgılama için fazlasıyla kullanılmıştır (Fang vd., 2018; Hatamvand vd., 2019). Bor ve türevlerinin keratinosit migrasyonu, antimikrobiyal özelliği de dahil olmak üzere yara iyileşmesini hızlandırabilmektedir.

Yapılan bir çalışmada ipek fibroin, hyaluronik asit ve jelatinin kombinasyonları ile hidrojel filmler üretilip bunların yara iyileştirmedeki etkisini incelemek için borik asit formüle edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında hidrojel film formülasyonunda borik asitin, yara iyileştirme özelliği sağlamada anahtar olduğunu ve yara iyileştirme tedavisi için alternatif bir yaklaşım sunabileceğini göstermişlerdir (Özen vd., 2022). Tüm bunlar düşünüldüğünde borun deri doku mühendisliğinde önemli çalışmalara öncülük edeceği öngörülmektedir.

1.8. Silisyum Elementi ve Uygulamaları

Silisyum, güneş sisteminde karşılaşılan en çok bulunan sekizinci elementtir. Dünyanın ağırlıkça %27,7'sini oluşturmaktadır. İnsanda demir ve çinkodan sonra bulunan eser elementlerde üçüncü sıradadır. Element halinde oldukça nadir bir şekilde bulunmaktadır. Genellikle oksijene olan ilgisinden dolayı silika ve silikat formlarında bulunmaktadır (Henstock vd., 2015). Silika içeren biyomalzemeler, yara iyileşmesinde, anjiyogeneze ve kemik doku mühendisliğinde etkilere sahiptirler. Potansiyel olarak bir antibakteriyel özellik gösterme eğilimindedirler (Wang vd., 2007). Silisyum, doku mühendisliğinde süngerler, nanoparçacıklar, hidrojeller, filmler gibi formlarda kullanılabilir.

Toksik olmayan bir malzeme şeklinde kabul gören silika bu özelliğinden dolayı ilaç verme çalışmalarında kullanılmaktadır (Wu vd., 2011). Silika içerikli yara örtüleri yara iyileşmesinde ilgi görmektedir. Silika nanoparçacıkları fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu sağlayarak yaralı deriye yayılmasına yardım etmektedir (Quignard vd., 2017). Şekil 15’de silisyumun aktiviteleri gösterilmektedir (Birdi-Chouhan vd., 2016).



Şekil 15. Silisyum aktiviteleri (Birdi-Chouhan vd., 2016)

Sol-jel metodu son zamanlarda dikkat çeken çeşitli uygulamalar için inorganik, organik malzemelerin katkılanmasına izin vermektedir. Sol-jel tekniğinde bir silika öncüsünün bulunduğu sıvının pH, kimyasal bileşim, sıcaklık gibi faktörlerle jel formuna gelmesini içermektedir. Metiltrimetoksisilan, tetraetoksisilan, silisyum alkoksitler, tetrametoksisilan, silika öncüsü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lin & Kuo, 2016).

Silika üzerine yapılan bir çalışmada, kitosanla birlikte bir pansuman malzemesi geliştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında silika nanoparçacıklarının bir kitosan matrisine eklenmesiyle, hızlı yara kapanması ve kollajen rejenerasyonunu hızlandırdığı görülmüştür (Park vd., 2017).

Başka bir çalışmada ise silika nanoparçacıklarının pıhtılaşma süresini azaltarak, düşük konsantrasyonlarda trombin üretimini artırdığı görülmüştür. Böylelikle gelişmiş bir sinerjistik etki yarattığını göstermişlerdir. Yaralı bölgede salınmış olan silikon iyonları, büyüme faktörlerini ve yara iyileştirme sürecini harekete geçirmektedir. Silikanın ek olarak bir biyosentetik etki gerçekleştirilmeden insan akciğer fibroblastlarının proliferasyonunu direk olarak uyardığı bulunmuştur (Arcangeli vd., 2001). Bu etkileri düşünülerek tez çalışmasında silika nanoparçacıkları kullanılarak yara iyileşmesine katkı sağlayabilecek filmler geliştirilmiştir.

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tan vd. yaptıkları bir uygulamada, saflaştırılmış insan saç keratinlerini kullanarak filmler ürettiler. Çalışmanın içeriğinde çapraz bağlayıcı ya da plastikleştirici olmadan başarılı bir şekilde filmler üretmişlerdir. Filmlerin, mekanik ve termal özelliklerine, protein ikincil yapılarına bakılmıştır. Kuru haldeyken filmlerin Young modülü 1.05 ± 0.09 GPa iken ıslak formda viskoelastik bir yapı göstermiştir. Böylelikle aslında plastikleştirici içermeden oldukça yüksek mekanik özellikler gösteren filmler elde etmişlerdir. Bu filmler üzerinde kültürlenmiş insan epidermal keratinositlerinin (İEK'ler), yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını desteklemek için hücre uyumlu yüzeyler sunduğunu göstermişlerdir. Ancak elde ettikleri keratinlerde ilk olarak keratinle ilişkili proteinlerin (KİP) çıkarılmasına gereksinim duymaktadırlar ve böylelikle daha uzun bir üretim süresi gerektirmektedir (Tan vd., 2022).

Zhang vd. insan saç keratinleri ve poli (L -laktatkaprolakton) kopolimer (PLCL) kullanarak nanolifli /keratin hidrojel tasarlamışlardır. Çift katmanlı hazırlanan yara örtüsüne fibroblast büyüme faktörü (FBF-2) yüklenmişlerdir. Hidrojelin elastik modülü 44kPa ile dermisin elastik modülüne benzer bir sonuç göstermiştir. Yapılan çalışmalarda katmanlı yara örtüsünün biyouyumlu ve biyobozunur olduğunu gösterirken *in vivo* çalışmalarda saç foliküllerinin rejenerasyonu, kollajen birikimi ve yeniden epitelizasyon gibi özellikleri desteklediğini göstermişlerdir. FGF-2'nin eklenmesi ile daha iyi bir onarım gerçekleşmiştir. Sonuç olarak keratin, deri onarımı için heyecan verici bir malzeme olabilecektir (Zhang vd., 2023).

Yapılan bir çalışmada Jun-Sung Oh ve Eun-Jung Leea, kitosanın yara iyileştirme özelliğini arttırmak için sol-jel reaksiyonlarını kullanarak kitosan-silika hibrit yara örtüsünü geliştirdiler. Hibrit yara örtüsüne daha sonrasında keratinosit büyüme faktörü (KBF) yüklenmişlerdir. Yara örtüsü KBF için bir salım profili göstermiştir. Böylelikle keratinositlerin bağlanması, çoğalmasını iyileştirmiştir. Yapılan *in vivo* denemelerde yaralarda iltihap olmadan yeni deri oluşumu gözlemlenmiş ve KBF'li pansumanın en iyi yara iyileşmesini gösterdiği bildirmişlerdir. Silikanın, kitosan ile kullanımı ve büyüme faktörlerinin eklenmesi, membranlarda olumlu etkilere neden olmuştur. Böylelikle potansiyel olarak yara iyileşmesini hızlandırabilmek için kullanılacak bir yara örtüsü geliştirilmişlerdir (Oh & Lee, 2019).

Sun vd. Nil Tilapyası derisinden elde edilen kollajen ile kitosanın eklenmesiyle yapılmış olan yara örtülerinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Geliştirdikleri çift katmanlı kompozit yara örtüsü, *in vivo* değerlendirmek için tam kalınlıkta deri yara modelinde uygulayarak, interlökin (IL-1, IL-6, IL-8), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), vasküler epidermal büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörlerini (bFGF), kültürlenmiş fibroblast hücrelerinin canlılığı ve büyüme aktivitesini incelemişlerdir. İki katmanlı kompozit sargının yara iyileşmesini uyardığını ve 28 günlük bir süre içinde yara iyileşmesini sağladığını gösterdiler. Ayrıca yara örtüsünün kollajen sentezini artırıp, fibroblast proliferasyonunu ve canlılığını destekleyebileceğini gösterdiler (Sun vd., 2022).

Sun vd. Nil Tilapyası derisinden tip 1 kollajen izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri kollajenden dondurarak kurutma yöntemi ile süngerler yapmışlardır. Süngerlerin çapraz bağlanmasında kullanılacak olan yöntemleri karşılaştırarak araştırmışlardır. Genipin + ethanol, nordihidroguaiaretik asit (NDGA), EDC/NHS, genipin + PBS, gibi kimyasal çapraz bağlama yöntemlerini incelemişlerdir. Süngerlerin hepsi çapraz bağlama sonrasında mekanik olarak daha sağlamlaşmışlardır. Tüm çapraz bağlı süngerler biyomedikal alanlarda kullanımı için hemostatik uyumluluğa sahiptirler. Ancak bakıldığı zaman EDC/NHS gözenekli mikro yapısı ve özellikleri ile oldukça iyi bir çapraz bağlayıcı olarak kabul edilmiştir. Bundan dolayı EDC/NHS ile çapraz bağlanmış kollajen sünger, oldukça iyi bir hemostatik malzeme olarak kullanılabilir (Sun vd., 2017).

Nzietchueng vd. yaptıkları çalışmada, Bor'un hücre dışı matrisi metabolizmasında yer alan spesifik enzimler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Ayrıca bu enzimler üzerindeki etkisini hücreler ile araştırmışlardır. Sonuçlara bakıldığında bor proteinlerin fosforilasyonunu desteklemektedir. Bu etkinin bor elementinin doğrudan değil, yara iyileşmesinde yer alan sitokinlerin sentezi ya da serbest radikallerin üretilmesini arttırdığı yönünde olabileceğini düşünmektedirler. Bor'un enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi fibroblastlar ile de test edilmiştir. Diğer sonuçların aksine bor, fibroblastlarda, kollajenaz ve katepsin D aktivitelerini arttırmıştır. Yapılan çalışma Bor'un yara iyileşmesindeki rolüne ilişkin bazı noktaları her ne kadar açıklasa da daha ayrıntılı olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmalar gerektirmektedir (Nzietchueng vd., 2002).

Özen vd. yara iyileşme sürecini hızlandırmak için ipek fibroin/jelatin ve hyaluronik asitin kombinasyonu ile hidrojel filmler yapmışlardır. Yara iyileştirme davranışlarını incelemek için filmlere farklı oranlarda borik asit ilave edilmiştir. Filmlerin fizikokimyasal analizleri yapılmış ve L929 fibroblast hücre hattında biyoyumluluk ve yara iyileşmesine bakılmıştır. Borik asitin hidrojellere karşı mekanik özelliklerine olumlu etkileri olmuştur. Borik asit ile yapılan hidrojeller, büyüme faktörünü, hücrelerin proliferasyonunu, makrofaj göçünü, önemli ölçüde arttırmıştır. Bu çalışmada, hidrojel filmlerde %1 oranında (ağırlık/hacim) borik asitin, mekanik sağlamlık ve yara iyileştirme özelliği sağlamada etkili olabileceğini ve yara iyileştirme tedavisi için farklı bir seçenek olarak kullanılabilceğini göstermişlerdir (Özen vd., 2022)

Xu vd. insan saçlarından elde ettikleri keratinleri kullanarak farklı konsantrasyonlardaki keratin çözeltilerinden dondurarak kurutma yöntemi ile yapı iskeleleri hazırladılar. İskelelerin gözenekli yapısı ve hücre uyumluluğu değerlendirildi. Ayrıca keratin iskelelerin bozunurluk özelliği ve yara iyileştirmedeki etkisini değerlendirmek için, sıçanlarda deri altı implantasyon ile tam kalınlıktaki cilt kusurlarının tedavisine bakılmıştır. Yapılan yöntemle bağlı olarak iskeleler oldukça iyi bir gözeneklilik göstermiştir. İskeleler iyi bir biyoyumluluk ve hidrofilik özellik göstermiştir. Elde edilen *in vivo* sonuçlara göre 3. hafta itibari ile tedavi edilen tam kalınlıklı cilt yaralarında eksiksiz epidermis ve saç foliküllerinin oluştuğunu gösterdiler. Bu sonuçlar, insan saçı keratinlerinin cilt yenilenmesi için umut verici dermal ikameler olduğunu göstermektedir (Xu vd., 2013).

Wang vd. gerçekleştirmiş oldukları çalışmada tavuk tüyünden ekstrakte ettikleri keratinlerle yaptıkları hidrojinin yara iyileştirme potansiyelini ve biyoyumluluğunu bir sıçan modeli ile araştırmışlardır. Keratin hidrojelleri H₂O₂ (hidrojen peroksit) kullanarak tiyol gruplarının çapraz bağlama reaksiyonu ile hazırlamışlardır. Hidrojel ile tedavi ettikleri yara modelinin kullanılmayana kıyasla çok daha fazla kollajen birikimin olduğunu ve yara kapanmasının hızlandığını göstermişlerdir. Keratin hidrojellerin olumsuz doku enflamatuvar veya immün toksisitede tepkileri olmamıştır. Bunlar göze alındığında tüy keratini iyi bir biyoyumluluk ve yara iyileştirme etkisi sergilemiştir (Wang vd., 2017).

Hara ve Mori yün keratinden yapılmış olan hidrojeli hidrolik bir sistem kullanarak mekanik olarak sıkıştırılması ile şeffaf filmler elde etmişlerdir. Keratinden yapılmış olan hidrojel ve sıkıştırılması ile elde edilen filmleri biyoyumluluk, biyobozunurluk ve çekme testleri ile inceleyip karşılaştırmışlardır. Keratin film, hidrojelden daha yüksek bir mekanik mukavemete sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca keratin film çok daha yavaş bir bozunma oranı sergilemiştir. Biyoyumluluklarının değerlendirilmesi için farelere deri altı implantasyonu gerçekleştirilmiştir. Keratin film herhangi bir iltihaplanma veya kapsüllenmeye neden olmamıştır (Mori & Hara, 2018).

Demirci vd. sodyum pentaborat pentahidratın (NaB) ve borik asit, insan fibroblast hücreleri (HF) üzerindeki gen ve büyüme faktörü ekspresyonunu teşvik edici özellikleri, antimikrobiyal aktivite, hücresel çoğalma, göç ve anjiyogenez açısından etkinliklerini incelemişlerdir. Tüm bunlara ek olarak bor içerikli hidrojellerin, streptozotosin kaynaklı diyabetik yaraların iyileştirme potansiyelini değerlendirmek amacıyla, sıçanlarda tam kalınlıkta bir yara modeli oluşturmuşlardır. Yapılan çalışmalar neticesinde bor içerikli ürünleri mantar ve mayalara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. İnsan fibroblast hücrelerinin göçünü, proliferasyonunu, gen ekspresyonunu artırırken, sıçan modellerinde yara iyileşme mekanizmasını hızlandırıp skarların iyileştiğini göstermişlerdir. Ancak etkisini arttırmak için formülasyonu ve dozu ile ilgili ekstra çalışmalar yapılması gerekmektedir. Ayrıca farklı kronik yara modellerinde yara iyileştirme etkisi incelenmesi gerekmektedir (Demirci vd., 2016).

DNA hasar onarımı ve oksidatif stres regülasyonu normal hücrelerden kanserli hücrelere geçiş aşamasında fazlasıyla önemlidir. Bu nedenle Tepedelen ve ark. insan epitel hücre hattında, borik asitin yara iyileşmesini ve DNA hasarındaki koruyucu etkisini incelemişlerdir. Bunun için H₂O₂, ETP, Doxo gibi oksidatif stres ve DNA hasarı ajanları kullanılmıştır. Borik asitin varlığında ve yokluğunda immünofloresan ile DNA hasarı üzerindeki etkisine bakılmıştır. Ek olarak bu ajanlarla tedavi edilen epitel hücrelerinde yara iyileşmesindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, borik asidin epitel hücrelerinde oksidatif stresi, DNA hasarını azalttığı ve böylelikle koruyucu bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Buna ek olarak borik asit uygulamasının ilaçlı tedavisinde, HS-2 hücrelerinde proliferasyonu artırıp *in vitro* yara boyutunun azalmasına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Borik asitin enzimler yoluyla DNA hasarını azaltıp azaltmadığı yönünde çok daha fazla çalışmalar yapılması gereklidir (Tepedelen vd., 2016).

Kim vd. bir çalışmalarında, insan saçı keratini bazlı hidrojeller geliştirerek bunların yara iyileşme mekanizması üzerindeki etkilerini, insan keratinosit hücreleri ve cilt kusurlu fare modeli kullanarak *in vitro*yla beraber *in vivo uygulamalarla* değerlendirmişlerdir. Keratinin PEG (poli etilen glikol) ve TA (tiramin) ile konjugasyonu ile bir sol-jel geçişi sağlayarak hidrojeller geliştirmişlerdir. Yaptıkları değerlendirmeler sonucunda keratinosit hücrelerinin EMT'yle (epitelyal-mezemkim geçişi) göçünün keratin ile indüklenebileceğini ve *in vivo* yara modelinde de yara iyileşme mekanizmasının hızlandığını göstermişlerdir (S. Y. Kim vd., 2019).

Sumiyoshi vd. yaptıkları çalışmada deniz anası kollajeninin, sığır tip 1 kollajeninden yapılmış olan deri greftlerine harici olarak uygulanmasının etkilerini incelemişlerdir. Sığır kollajeninden t- butil alkol ile dondurarak kurutma metoduyla yapay deri greftlerini hazırlamışlardır. Deri greftlerini tam kalınlıkta yaraya sahip olan fare modellerine naklettiler. Deniz anası kollajeni solüsyonunu harici etkisini incelemek amacıyla deri greftlerinin üstlerine belirli oranlarda damlatmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre deniz anası kollajeninin harici bir şekilde uygulanması keratinosit göçünün artmasını teşvik etmiştir. Ek olarak gecikmiş olan yara iyileşmesinin tedavisinde oldukça etkili olduğunu göstermişlerdir (Sumiyoshi vd., 2021).

Jinno vd. yaptıkları çalışmada kollajen sünger (KS) ile kollajen- jelatin süngerin (KJS) yara iyileştirme potansiyelini karşılaştırmışlardır. KS ve KJS süngerler dondurarak kurutma metodu ile elde etmişlerdir. Her iki süngerin bFGF'li (temel fibroblast büyüme faktörü) ve eklenmemiş halini fare modellerinde etkinliğini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak KS-bFGF'siz süngerlerin etkinliği KJS süngerler ile eşit olabileceğini göstermişlerdir. KJS- bFGF süngerler ise yara iyileştirme sürecini oldukça hızlandırmışlardır (Jinno vd., 2016).

Wang vd. jelatin, kollajen ve keratinin biyouyumluluklarını ve hücre proliferasyonuna karşı etkinliğini, eşit miktarda ekledikleri PHBV (poli(hidroksibutirat-ko-hidroksivalerat)) ile elektrospun yöntemiyle hazırladıkları nanoliflerle karşılaştırmışlardır. Yapmış oldukları analizler sonucunda malzemelerin hücre proliferasyonunu arttırdığını, oldukça iyi bir biyouyumluluklarının olduğu ve istatistiksel anlamda büyük farklara sahip olmadıklarını göstermişlerdir (Wang vd., 2016).

Sol-jel tekniği, birçok uygulama için yeni hibrit jelleri sentezlemek için kullanılmaktadır. Silika içerikli jellerin hazırlanması için ncü olarak tetraetil ortasilikat (TEOS) sıkça kullanılır. Kakkar ve Madhan yaptıkları bir çalışmada sol-jel geçişinin hidrojel oluşturmak için kullanıldığı keratini silika ile birleştirerek yeni bir keratin hidrojel sisteminin geliştirilmesi üzerinde durmuşlardır. Keratin kaynağı olarak sığır toynakları ve silika öncüsü olarak TEOS kullanmışlardır. MTT tahlili ve DAPI boyaması sonuçlarına bakıldığında, geliştirilen keratin-silika hidrojin fibroblast hücresleriyle biyouyumlu olduğunu görülmüştür. Ayrıca, yüksek bir sıkıştırma modülü ve anında yaylanma sergilemiştir. Geliştirilen hidrojin, özellikle yara iyileşmesi gibi biyomedikal uygulamalarında biyomateryal olarak kullanılabilceğini öngörmektedirler. Ancak çalışmada hidrojin rejeneratif özelliği üzerine bir çalışma yapılmamıştır (Kakkar & Madhan, 2016).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

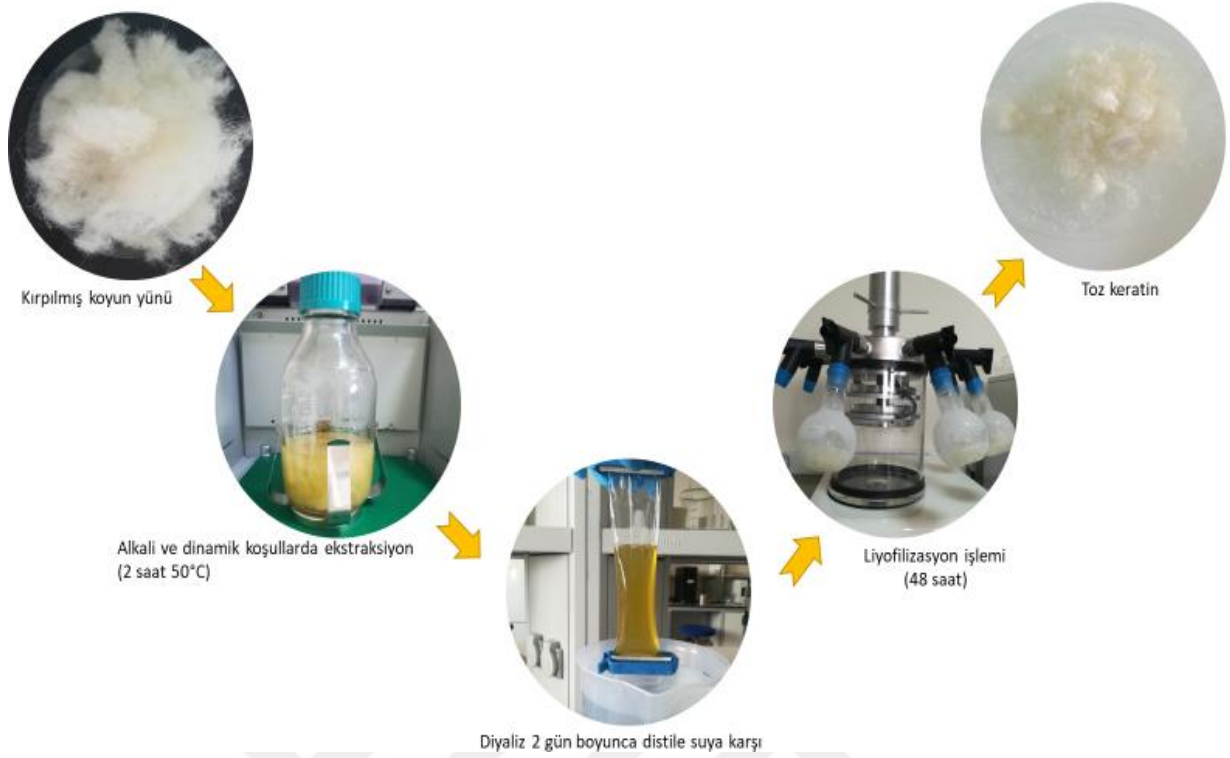
Bu tez çalışmasında koyun yünleri, Çanakkale şehrinde bulunan yerel çiftliklerden temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasal aksi belirtilmedikçe Merck (Sigma-Aldrich) firmasından temin edilmiştir. Deniz kaynaklı kollajen izolasyonu için kullanılan *Rhizostoma pulmo* denizanası türü, Çanakkale Boğazı'ndan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu

Bu proje kapsamında kullanılan keratin, koyun yünlerinden ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraksiyon literatürde yer alan yöntemin çalışmaya uyarlanması ile gerçekleştirilmiştir (Arslan vd., 2017). Atık koyun yünleri alındıktan sonra temizlenip oda şartlarında kurutulmuştur. Küçük parçalara kesilmiş olan koyun yünleri her 5 g için, %5 NaOH (sodyum hidroksit) ve %5 Na₂SO₃ (sodyum sülfite) ile 50°C sıcaklıkta, çalkalayıcı kullanılarak (Incubator, Mini Benchmark, ABD) 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen keratin ekstraktı, oda sıcaklığına getirilip çözünmeyen parçalarından uzaklaştırmak için tülbent yardımıyla süzümüştür. Süzümü daha sonra 15 dk. 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatant, safsızlıklardan arındırmak ve ekstraktın pH'ını 7,2-7,4 'e ayarlamak için saf suya karşı oda sıcaklığında 3 gün boyunca diyaliz (MWCO: 14000Da, Sigma Aldrich, D9527) edilmiştir. Diyaliz işlemi sonrası protein agregatlarının ayrılması için diyalizat, 5 dakika süreyle 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Protein çözeltileri cam balonlara aktararak -26°C'de gece boyunca dondurulmuştur. Keratinin toz forma getirilmesi için, dondurulmuş olan protein çözeltileri liyofilize (Telstar, LyoQuest, İspanya) edilmiştir. Koyun yünü keratin ekstraksiyonu Şekil 16' da özetlenmiştir.



Şekil 16. Keratin ekstraksiyonu

3.2.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu

Kollajen izolasyonu, Derkuş vd. tarafından yapılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir (Derkus vd., 2016). Laboratuvara getirilen denizaneleri saf su ile temizlenip 24 saat %99,9 etanole maruz bırakılmıştır. Daha sonrasında denizaneleri oda şartlarında kurutulmuştur. Kurutulmuş denizaneleri, saf bir kollajen tabakası elde etmek için 0,1 M NaOH içeren bir çözelti içine alınmıştır. Kollajen tabakaları, dinamik bir ortamda 4°C'de iki gün süreyle işlendi. Kollajen tabakaları, pH 7,2-7,4'e düşene kadar distile su ile yıkanmıştır. Kollajenler -26°C'de dondurularak liyofilize edildi ve sonraki kullanımlar için saklandı. Her 1 g kollajen tabakası, 100 ml 0,5 M asetik asit solüsyonunda 4°C'de 2 dakika homojenize edilmiştir. Homojenizata, her 1 g kollajen için 100 mg pepsin (Sigma Aldrich, 500 U/mg) ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı kullanılarak oda koşullarında iki gün boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında 3400 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çözünmeyen partiküller uzaklaştırıldı. Santrifüj işleminden sonra enzim inaktivasyonu için 0,02 M Na₂HP0₄(pH: 8.8) içeren tampona karşı üç gün diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra, 14000 rpm'de 2 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant cam balonlara alınıp -26°C de bir gece dondurulmuştur.

Son olarak, dondurulmuş çözeltilerin liyofilize edilmesi ile toz formda atelokollajen elde edilmiştir. Liyofilize edilen denizanası atelokollajeni +4 °C’de sonraki kullanımlar için saklanmıştır. Kollajen izolasyonunu Şekil 17’de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 17. Denizanasından kollajen izolasyonu

3.2.3. Koyun Yünü Keratini Biyokimyasal Analizleri: Lowry Protein Tayini

Ekstraksiyon sonucunda toplam protein konsantrasyonunu belirlemek için Lowry yöntemi kullanılmıştır. BSA (Sığır serum albümin, Merck-Millipore) standart proteini kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Literatürde yer alan yöntemle göre tayin yapılmıştır (Classics Lowry vd., 1951). Reaksiyonun temeli Folin-Ciocalteu reaktifinin proteinler içerisindeki fenolik aminoasitlerle bazik ortamlarda girdiği tepkimeye dayanmaktadır.

Reaksiyon aşağıda verilen Tablo 4 ‘e göre yapılmıştır;

Tablo 4

Lowry reaksiyon çözeltileri

| Çözelti A | Çözelti B | Çözelti C | Lowry Solüsyonu | Folin-Ciocalteu reaktifi |
|---|--|---|--|--|
| 0,571 g NaOH ve 2,86 g Na ₂ SO ₃ | 1,4232 g CuSO ₄ .5(H ₂ O) | 1,34 g NaK (COO) ₂ (CHOH) ₂ .4H ₂ O | 100:1:1 oranında sırasıyla çözelti A, B ve C | 5 ml Folin Ciocalteu's Fenol Reaktif |
| 100 ml ultra saf su içerisinde | 100 ml ultra saf su içerisinde | 100 ml ultra saf su içerisinde | - | 6 ml ultra saf su |

BSA 0,01-0,1 mg/ml konsantrasyon aralığında olacak şekilde %0,9 (w/v) NaCl ile hazırlanmıştır. 500 µl protein çözeltisi, 700 µl lowry solüsyonu ile karıştırılarak 20 dk karanlık oda şartlarında inkübe edilmiştir. Daha sonrasında 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi eklenip 30 dk karanlık oda şartlarında inkübe edilmiştir. Ek olarak protein haricindeki çözeltiler ile kör çözelti oluşturulmuş ve protein çözeltileriyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında protein yoğunluğuyla doğru orantılı olarak çözeltilerde mavi bir renk gözlemlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) için 650 nm de köre karşı absorbanslar alınmıştır.

Keratin diyalizatlarının konsantrasyonları ve % verimi, Lowry yöntemi ile kalibrasyon grafiği ve denklem (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kuru kütle \% verim} = \left[\frac{\text{proteinlerin kuru ağırlığı (mg)}}{\text{ham malzeme miktarı (mg)}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

Liyofilizasyon sonrasında keratinlerin kuru kütlelerine göre % verimi denklem (3.2) ile hesaplanmıştır.

$$\text{Lowry \% verim} = \frac{[(\text{OD}_{650} / \text{eğim}) \times (\text{seyreltme faktörü}) \times \text{toplam diyalizat hacmi (ml)}]}{[(\text{ham malzeme miktarı (mg)})]} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.4. Serbest Sülfidril Grubu Tayini

Keratin diğer proteinlere kıyasla yüksek sistein içeriğine sahiptir. Sistein miktarının fazlalığıyla moleküler içi disülfid bağları (S-S) oluşmaktadır. Böylelikle proteinin stabilitesi artmaktadır. Keratin ekstraksiyonu sırasında disülfid bağları kırılarak sülfidril grupları (-SH) oluşmaktadır. Sülfidril grupları reaksiyonları indükleyebilen, keratinler için önemli moleküllerdir. Keratin içeriğindeki sülfidril gruplarının tayini Ellman's reaktifi (5,5'- ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) kullanılarak Silva vd. tarafından yapılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir (Silva vd., 2014). L-sistein standardı ile kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Öncelikle ultra saf su içerisinde 0,1 M NaH₂PO₄ ile 1 mM etilendiamintetra asetik asit kullanılarak pH 8,0 olacak şekilde bir tampon hazırlanmıştır. Ellman's reaktifi 4 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde tampon içerisinde hazırlanmıştır. L-sistein standart dilüsyonları 0,1-1 mM konsantrasyon aralıklarında, reaksiyon tamponunda çözdürülerek elde edilmiştir. Bu işlemlerin ardından 2,5 ml tampon çözeltisi, 250 µl protein çözeltisi ve son olarak 50 µl Ellman's reaktif çözeltisi karıştırılarak, 25⁰C sıcaklıkta 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda sarı renkli bir çözelti gözlemlenmiştir. Absorbanslar, 412 nm'de UV-VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir. Keratindeki sülfidril gruplarının belirlenmesi için aynı prosedür uygulanarak denklem (3.3) ile hesaplamalar yapılmıştır.

$$\frac{\text{mM serbest SH grupları}}{\text{g keratin}} = \frac{[(\frac{\text{OD}_{412}}{\text{eğim}}) \times (\text{seyreltme faktörü} \times \text{toplam hacim})]}{\text{keratin ağırlığı (g)}} \quad (3.3)$$

3.2.5. Bor ve Silisyum Temelli Malzemelerin Sol-Jel Sentezi ve Yapay Deri Greftlerinin Üretimi

Yapay deri greftlerinin, bor ve silisyum temelli sentezi sol-jel reaksiyonlarına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Silika nanopartiküllerinin kaynağı olarak %98 saflıkta tetraetil ortosilikat (TEOS, Merck-Millipore) kullanılmıştır. Öncelikle sol hazırlanırken kullanılmak üzere TEOS'un asidik ortamda hidrolizi gerçekleştirilmiş ve reaktif TEOS (rTEOS) hazırlanmıştır (Şekil 18). İlk olarak TEOS (1,1 ml), ultra saf su (0,816 ml) ve HCl (0,1 M,0,125ml) bir cam şişeye eklenip 5 dakika boyunca durmadan oda sıcaklığında vorteks (IKA Genius 4) ile karıştırıldı. 5 dk sonunda karışımın beyaz, bulanık bir hal aldığı gözlenmiştir. Ardından beyaz renkli karışım berraklaşıp homojen oluncaya dek 55°C'de ultrasonik banyoda (Elma, S 30H, Almanya) sonike edildi. TEOS çözeltisi işlemlerden önce taze olarak hazırlanmıştır.



TEOS+HCl+Ultra saf su karışımı



5 dk. Vortex sonrası bulanık TEOS karışımı



10 dk. Sıcaklık kontrollü ultrasonik su banyosu sonrası şeffaf rTEOS

Şekil 18. rTEOS eldesi

Filmlerin sentezinde bor kaynağı olarak %99,5 saflıkta borik asit (H_3BO_3 , Merck-Millipore,) kullanılmıştır. İlk olarak %3 (w/v) konsantrasyonda borik asit ultra saf suda hazırlanmıştır. Literatürde bor ile yapılan çalışmalara bakıldığında polimerleşme sırasında borik asidin kompleks oluşturması için pH'nın yaklaşık 9,24 olması gerektiği üzerinde durulmuştur (Siqueira vd., 2007).

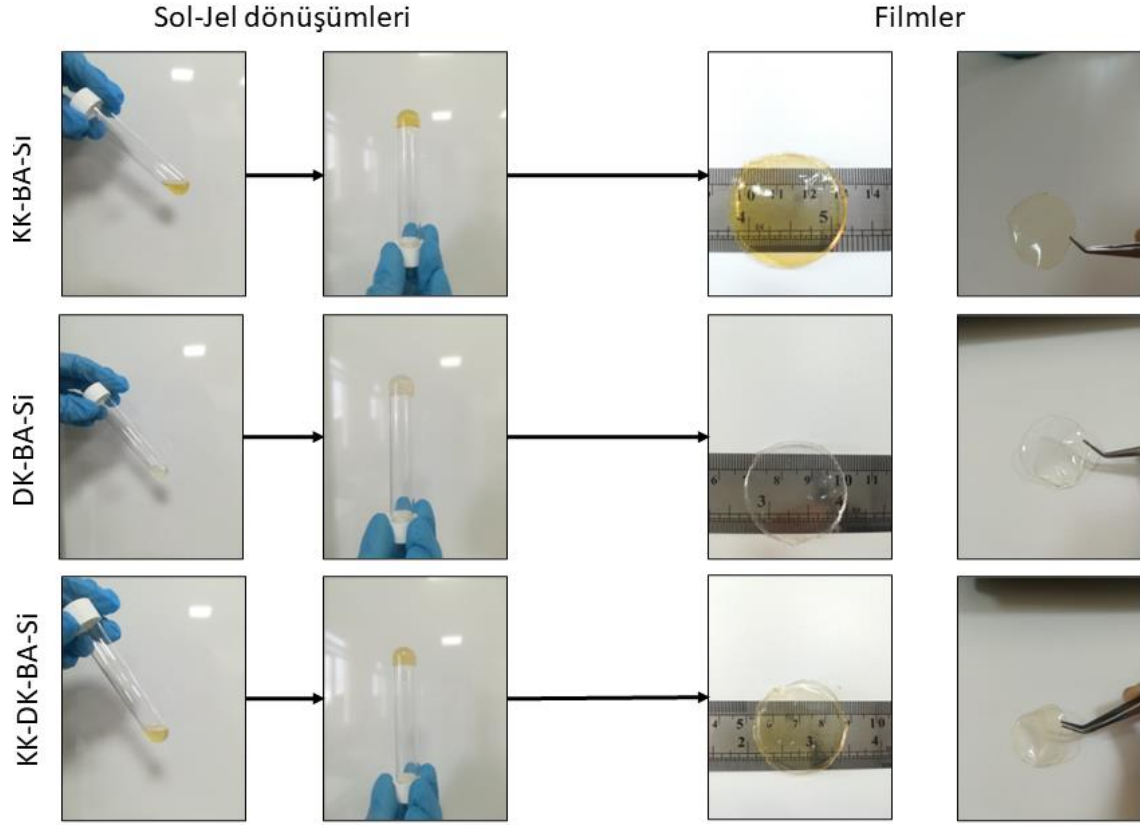
Hazırlanan borik asit çözeltisini $\text{pH} \geq 9,24$ ayarlamak için NaOH (1M) yavaş yavaş eklenmiştir. Böylelikle, tetrahedral tetrahidroborat anyonu oluşturulmuştur.

Keratin, kollajen, keratin-kollajen olmak üzere üç farklı formülasyonda film sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak borik asit solüsyonunda (B, $\text{pH} \geq 9,24$) %10 (w/v) konsantrasyonda KK köpürtmeden karıştırılarak hazırlandı. Ardından çözeltiliye %10 (v/v) oranında gliserol eklenmiştir. Solüsyona, polikondenzasyon reaksiyonunu başlatmak için 1: 10 (v: v) oranında taze hazırlanmış olan rTEOS eklenir ve karıştırma işlemi yapılır. Bu işlem oda sıcaklığında gece boyunca devam eder ve sol-jel dönüşümü gerçekleşir.

DK, borik asit solüsyonunda %5 (w/v) konsantrasyonda çözdürülmüştür. Çözeltiliye %5 (v/v) oranında gliserol eklenmiştir. Polikondenzasyonun gerçekleşmesi için 1: 10 (v: v) rTEOS eklenip ardından oda sıcaklığında gece boyunca bekletilmiştir.

Son olarak borik asit solüsyonunda %5 (w/v) KK ve %5 (w/v) DK çözdürülmüştür ve çözeltiliye %10 (v/v) gliserol eklenmiştir. Sonrasında çözeltiliye 1: 10 (v:v) oranında rTEOS eklenip gece boyunca oda sıcaklığında jeller olgunlaştırılmıştır.

Sol-Jel dönüşümü gerçekleştikten sonra jeller, 1:4 (v:v) oranında ultra saf su ile seyreltilip silikon kalıplara dökülmüştür. Filmler 40°C de 48 saat boyunca hafif nemli bir ortamda kurutulmuştur. Üretilen filmlerin daha kararlı yapıda olması ve kalıplardan kolayca çıkarılması için 110°C de 2 saat kütleme yapılmıştır. Sonuç olarak silika/borik asit temelli yapay yara örtüleri sentezlenmiştir. (Şekil 19)



Şekil 19. Sol-jel dönüşümü ve filmlerin eldesi sonrası makro görüntüleri

3.2.6. Yapay Deri Greftlerinin Çapraz Bağlanması

Sentezlenen filmlerin mekanik olarak dayanıklılığının artması ve yapısal bütünlüğünün korunması için kimyasal bir çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için N-hidroksisüksinimit (NHS) ile N-(3- dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) ajanları kullanılmıştır. Çapraz bağlama prosedürü 2017 yılında Sezgin Arslan'ın yapmış olduğu yöntemine göre, bu tez çalışmasında uygulanmıştır (Arslan, 2017).

Filmler öncelikle 30 dakika 6 kuyucuklu well-plate içerisinde %99,9 saflıktaki etanolde (Millipore-Sigma, Almanya) rijitleşmesi için bekletilmiştir. Bu süreçte gerekli olan solüsyonlar hazırlanmıştır. İlk olarak çapraz bağlayıcıların çalışması için gerekli olan ortam, 0,05 M MES (2- morfolinoetansülfonik asit) ultra saf su içerisinde hazırlanıp, pH 5,5'a ayarlanmıştır. Hazırlanan MES tamponu 1:9 oranında %99,9'luk etanol ile karıştırılmıştır.

Her 6 mg film için, 1 ml hazırlanan tampon içerisine 27,6 mg EDC ile 6,72 mg NHS eklenmiştir. 30 dakikalık bekleme süresi sonunda filmlerin bulunduğu ortamdan etanol uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan çapraz bağlayıcı çözelti filmlere eklenmiştir. Filmler, 120 rpm 25°C'ye ayarlı çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

İki saat boyunca çapraz bağlanan filmler, çapraz bağlayıcıdan arındırmak için saf suda yıkanmıştır. Sonuç olarak çapraz bağlı filmler elde edilmiş, *in-ovo* çalışmaları ve tüm karakterizasyon işlemleri için hazır hale getirilmiştir. Filmlerin stereo mikroskop görüntüleri Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 20. Filmlerin stereo mikroskop görüntüleri

3.3. Yapay Deri Greftlerinin Fizikokimyasal Analizleri

3.3.1. ATR-FTIR

Yapay deri greftlerinin kimyasal yapılarının anlaşılması için ATR-FTIR spektrumları, bir Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) üzerinde 4000-500 cm^{-1} dalga sayıları aralığında kaydedildi.

3.3.2. Katı Hal Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹¹B-MAS NMR ve ²⁹Si NMR)

JEOL ECZ500R (11,75 Tesla, Japonya) marka NMR cihazı kullanılarak oda sıcaklığında KK-DK-B-Si filminin B NMR ve Si NMR spektrumları elde edilmiştir. Spektrumlar, 6 kHz dönüş hızına sahip 3,2 mm zirkonyum oksit rotor kullanılarak alınmıştır.

3.3.3. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Üretilen filmlerin kristallik gibi önemli yapısal bilgilerini elde etmek için 0,02°/dk tarama hızında Cu K α radyasyonuna ($\lambda=1,54$ Å, 45 kV, 40 mA) maruz bırakılarak XRD analizi (PANalytical Empyrean, Hollanda) gerçekleştirildi. $2\theta=5-70^\circ$ aralığında veriler alınıp X'Pert High Score Plus yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

3.3.4. Termogravimetrik (TGA) Analizi

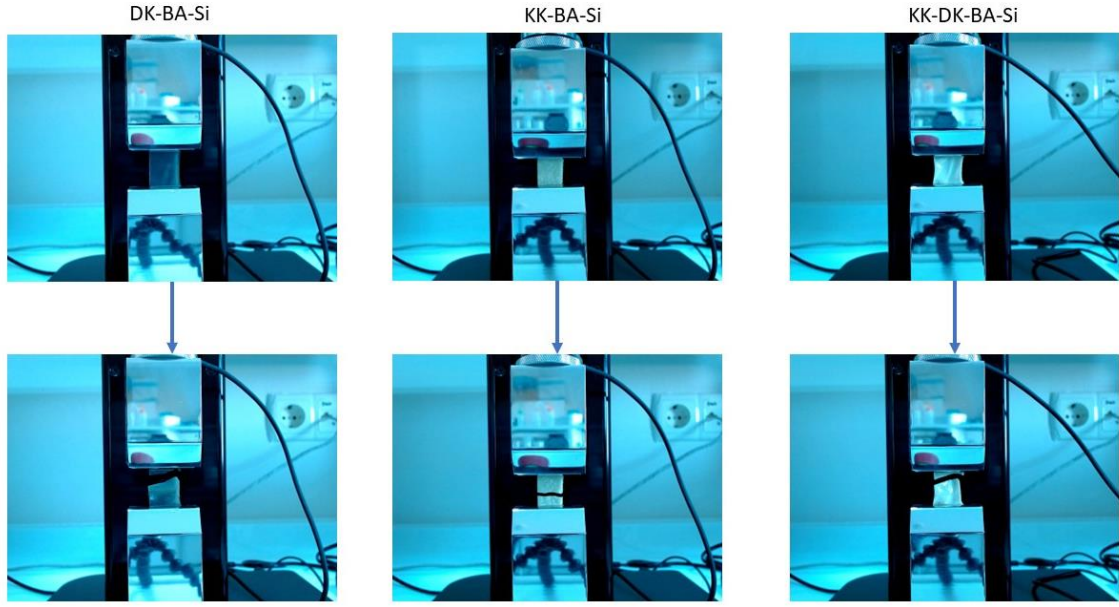
Yapay deri greftlerinin termal davranışları TGA 8000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, ABD) ile incelenmiştir. Ölçümler 10°/dk ısıtma hızıyla 30-650° arasında sıcaklıkla kütle değişimine göre alınmıştır.

3.3.5 Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

Filmlerin, gözenek boyutu karakterizasyonu ve toplam yüzey alanı hesaplaması, Quadsorb SI 5 BET (Quantachrome Instruments, Anton-Paar GmbH, Graz, Avusturya) cihazı kullanılarak ve malzeme içerisindeki gözenekli yapının tespiti için Barrett-Joyner-Halenda (BJH), BET analizleri yapıldı. Analiz, 0,01- 0,99 P/P0 basınç aralığında nitrojen emici gaz (77K) ile yapıldı.

3.3.6 Mikromekanik Çekme Testi

Filmlerin çekme testleri mikromekanik test cihazı (UniVert, Mechanical test system, CellScale biomaterials testing) ile oda sıcaklığında yapılmıştır. Numunelerin çekme testi, 50 N yük hücresi ve 0,16 mm/s çekme hızı ile gerçekleştirilmiştir. Her numune için üç tekrarlı şekilde analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 21). Filmlerin mekanik olarak dayanıklılığını değerlendirmek için gerilim-gerinim grafikleri çizilmiştir.



Şekil 21. Filmlerin çekme testi ile uzama ve kopma hali

3.3.7 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS) Analizi

Yapay deri greftlerinin gözenek yapısı ve yüzey morfolojisi FE-SEM (JEOL JSM-7100-F) ile incelenmiştir. Ayrıca, EDAX EDS birimi ile elementel bileşimi gözlemlenmiş ve elementel haritalama analizleri de yapılmıştır. Tüm numuneler analiz öncesinde 90 saniye altınla kaplandı ve farklı büyütme oranlarında 10 kV’da mikrograflar çekilmiştir.

3.4. *in vitro* Biyobozunurluk Testi

Çapraz bağlı filmlerin biyobozunurluğu proteinaz K (Merck-Millipore) enzimi kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle 0,02 M Tris-HCl, pH 8 olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için tampon içerisine %0,01 sodyum azid ($\geq 99,5\%$) eklenmiştir. Sonrasında %0,01 proteinaz K enzimi tampon içerisinde çözündürülmüştür. Filmlerin kuru ağırlığı (m_i) solüsyon eklenmeden önce tartılmıştır. Ardından numuneler steril 24’lük well-plate içerisine alınıp üstlerini geçecek şekilde 1’er ml enzim çözeltiden eklenmiştir. Numuneler 37 °C de 3 ve 7 günlük zaman noktalarında her üç günde bir enzim solüsyonu yenilenerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında filmler saf su ile yıkanarak

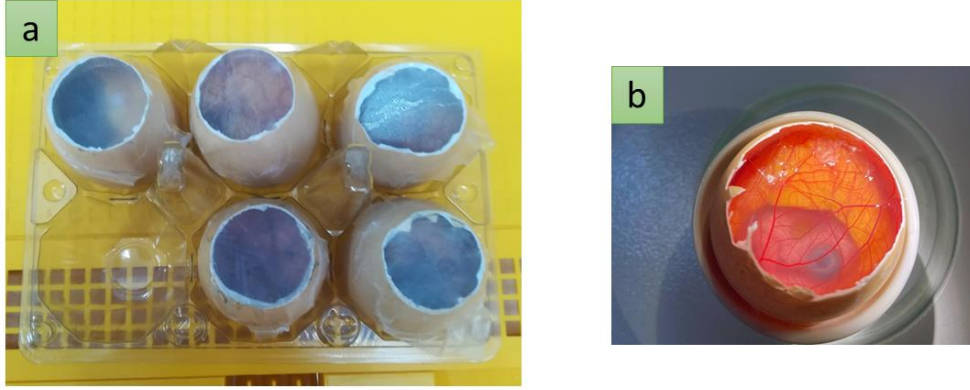
lyofilize edilmiştir. Filmlerin son kütleleri (m_s) tartılıp not edilmiştir. Deney seti 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama biyobozunurluk oranları kaydedilmiştir. Filmlerin yüzde kütle kaybı aşağıda yer alan formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Kütle kaybı (\%)} = [(m_i) - (m_s) / (m_i)] \times 100 \quad (3.4)$$

3.5. *in ovo* Cıvciv Koryoallantoik Membran Analizi (CAM)

Greftlerin vaskülarizasyonu indüklemeye potansiyeli, bir *in-ovo* modelinde cıvciv koryoallantoik membran (CAM) analizi ile değerlendirildi. Döllenen tavuk yumurtaları Çanakkale, Türkiye'de bulunan yerel bir çiftlikten sağlanmıştır. Kısaca, embriyonik gelişimin 0. gününde (EDD 0) tavuk yumurtaları, 37,5°C'de ve %60 bağıl nemde tutulan bir kuluçka makinesinde 72 saat inkübe edildi. Bu işlem sırasında embriyoların yumurta kabuklarına yapışmasını önlemek için yumurtalar belli zaman aralıklarında döndürülmüştür. İnkübasyon sonrasında, küçük bir pencere oluşturmak için yumurta kabuğu kesildi ve çıkarıldı. Yumurtalardaki pencere parafilm kullanılarak kapatıldıktan sonra 37°C'de üç gün süre ile tekrardan inkübe edilmiştir (Şekil 22).

Daha sonra EDD 7'de küçük parçalara ayrılan filmler UV ışık ile sterilize edilip CAM üzerine implante edilmiştir. Yerleştirilen filmlerin etrafındaki alanlar stereo mikroskop (Stemi 305, Zeiss) ile dijital kamera (Axiocam 105 color, Zeiss) kullanılarak görüntüldü. Daha sonra EDD10'da pencere açılarak implante edilen filmlerin görüntüsü alındı. EDD7 ve EDD10'daki görüntüler ImageJ yazılımında bulunan 'Vessel Analysis' ve 'Vascular Density' eklentileri kullanılarak analiz edildi. Vasküler yoğunluk, filmlerin etrafına çizilen bir 1 mm'lik çerçeve ile fark edilebilir kan damarları, kılcal damarlar, arterioller ve venüller dikkate alınarak hesaplanmıştır. EDD 10 ve EDD 7'de filmlerin belirlenen alandaki vasküler yoğunluğunun oranı indeks hesabı yapılarak değerlendirildi. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Eksplante edilen greftlerdeki vaskülarizasyon ve hücre yoğunluğunu SEM görüntüleri ile göstermek için örnekler PBS (PH 7.2-7.4) ile hazırlanan %2,5 Glutaraldehit ile sabitlendi.



Şekil 22. *in ovo* makro görüntüleri. (a) EDD 7 parafilmle kapatılmış yumurtaların inkübasyonu. (b) EDD 10 filmler eksplante edilmeden önce.

3.6. Anjiyojenik Yanıtların Histolojik Değerlendirmesi

CAM vaskülatürünün anjiyogenezinin derinlemesine bir değerlendirmesi için histolojik analiz yapıldı. Histolojik değerlendirme için greftler PBS (PH 7,2-7,4) ile hazırlanan %10 formalin ile fikse edildi. Tüm kesitler, hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Tüm kesitler dijital ışık mikroskobu kullanılarak görüntülendi (Axiocam 105 renkli kamera ile entegre Zeiss Primostar, Jena, Almanya).

3.7. İstatistiksel Analiz

Deneyler, sonuçların tutarlılığı açısından üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların ortalama \pm standart sapmaları hesaplandı. ANOVA yöntemi olarak bilinen tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey testi OriginPro 2022b (9.9.5.167 OriginLab Corporation, Northampton, MA, ABD) programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak, $*p \leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edilirken, $**p > 0,05$ ise anlamlı değil şeklinde kabul edilmektedir.

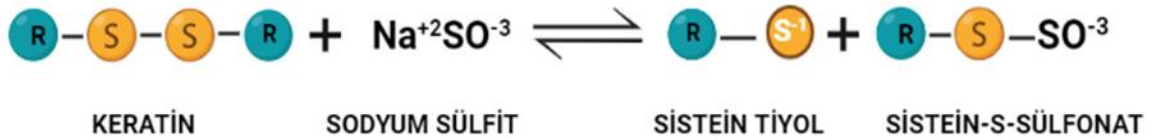
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Koyun Yününden Keratin Ekstraksiyonu

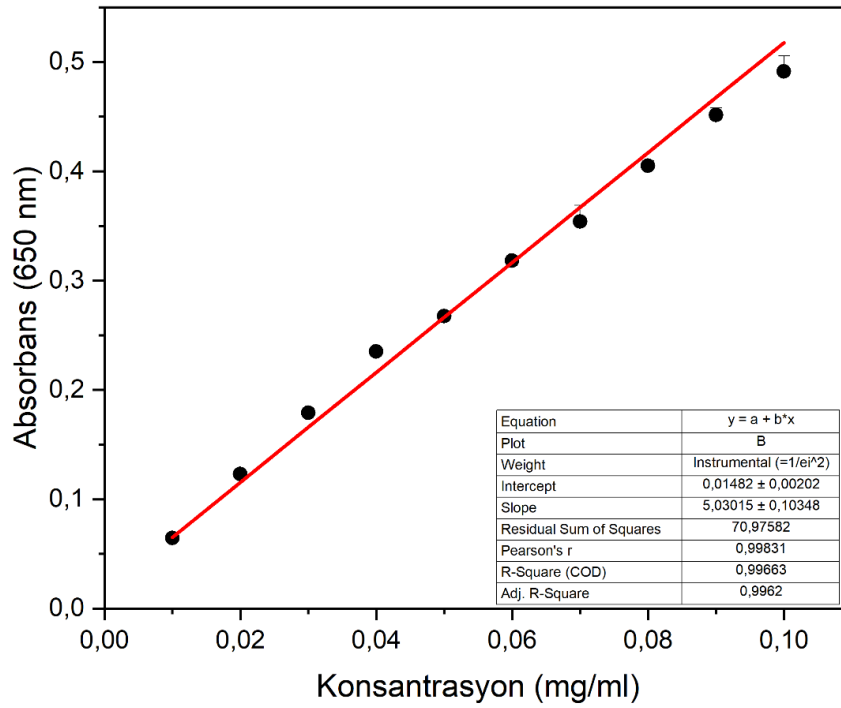
Yünden ekstrakte edilen keratin, biyomedikal alanlarda çeşitli ürünlerin tasarlanması için oldukça ucuz, atıkların değerlendirildiği, yenilenebilir bir malzeme kaynağı olarak kullanılabilir potansiyele sahiptir. Koyun yününden ekstrakte edilen keratinin, diğer yapısal kollajen, elastin gibi proteinlerden farkı yaklaşık %7-13'lük sisteine sahip olmasıdır (Feroz & Dias, 2021). Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında keratin oldukça zor çözünme ve ekstraksiyona sahiptir. Yün keratin, polar ve apolar asitlerle beraber molekül içi ve moleküller arası disülfid bağlarından oluşur. Yün keratinleri enzimler, organik çözücüler, su vb. çözücülerde çözünmezler. İçerdiği sistein nedeniyle yüksek stabiliteyle beraber düşük çözünürlüğe sahiptir. Bu sebeple keratinin ekstraksiyonları için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlar sülfitolizis reaksiyonu, indirgeme, oksidasyon, mikrodalga ışınları gibi yöntemlerdir (Alahyaribeik & Ullah, 2020).

Bu çalışmada sülfitolizis reaksiyonu kullanılarak koyun yünlerinden keratin ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu yöntem kapsamında Na_2SO_3 ile NaOH kullanılmıştır. Na_2SO_3 reaksiyonda disülfid bağlarını parçalayarak reaksiyon hızını artırır. Şekil 23'te reaksiyon mekanizması gösterilmiştir. Na_2SO_3 tek başına yeterli olmadığı için ve verimin artırılması amacıyla NaOH ilave edilmiştir. NaOH ile peptid bağları parçalanarak küçük fraksiyonlarda keratin elde edilmiştir (Wang vd., 2018).



Şekil 23. Sülfitolizis reaksiyonu

Ekstrakte edilen keratinlerin total konsantrasyon içeriğinin belirlenmesi amacıyla Lowry metodu ile Sığır Serum Albümin kullanılarak standart kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. (Şekil 24) Diyalizatın protein içeriği $8,81 \pm 0,10$ mg/ml olarak hesaplanmıştır. Proteinlerin diyalizata göre konsantrasyon verimi $\%51,49 \pm 0,67$ iken kuru ağırlığa göre hesaplanan konsantrasyon verimi ise $\%50,78 \pm 0,17$ bulunmuştur. Her iki yöntem sonucunda konsantrasyonlar karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle proteinlerin yeterince saflaştırıldığı düşünülmektedir.

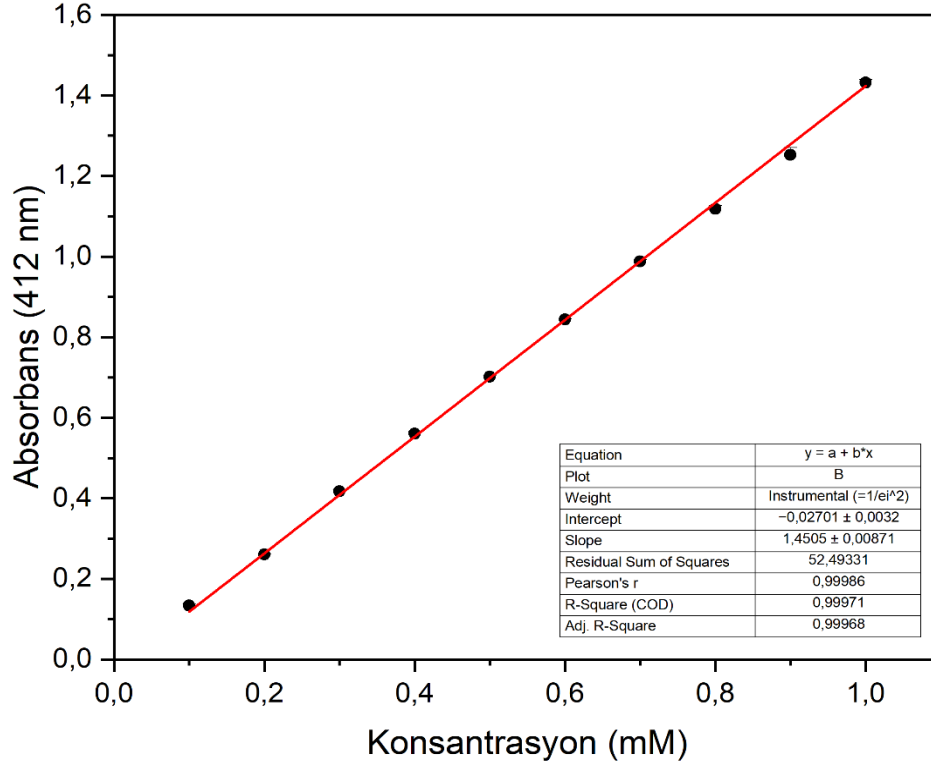


Şekil 24. BSA kalibrasyon grafiği Lowry yöntemine göre

4.2. Serbest Sülfidril Grubu Tayini

Sülfitolizis prosedürü ile gerçekleşen keratin ekstraksiyonu sonucunda disülfür bağları kırılmıştır. Bunun sonucunda sülfidril grupları elde edilmiştir. Keratinin -SH grupların miktarı Ellman's reaktifi ile belirlenmiştir. Şekil 25' de verilen L-sistein kalibrasyon grafiği ile hesaplamalar yapılmıştır.

Keratin içerisindeki -SH, $0,0674 \pm 0,009$ mmol SH/ mg keratin şeklinde bulunmuştur. Keratin içerisinde az miktarda bulunan sistein, filmlerde gözenekli ağ yapıların oluşmasına yardımcı olarak jelleşmeye katkı sağlayabilir.



Şekil 25. L-sistein ile yapılmış olan kalibrasyon grafiği

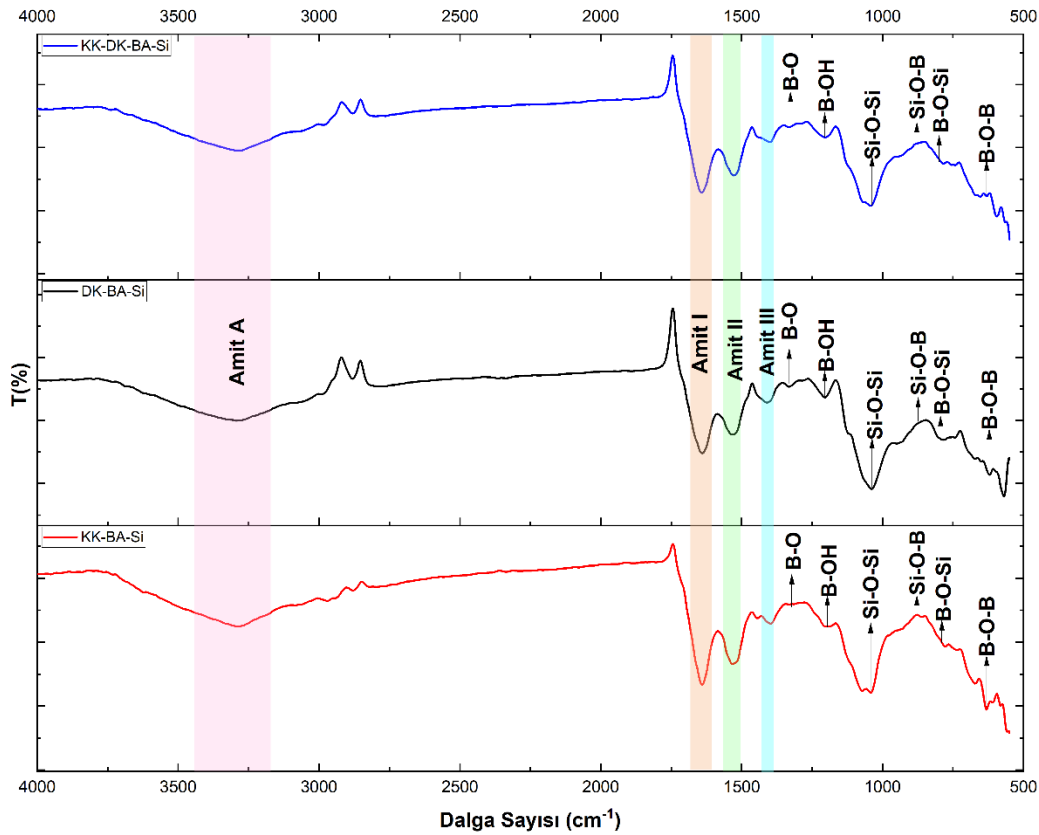
4.3 Yapay Deri Greftlerinin Fizikokimyasal Analizleri

4.3.1 ATR-FTIR

Şekil 26' da KK-B-Si, KK-DK-B-Si ve DK-B-Si filmlerinin ATR-FTIR spektrumu karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Protein esaslı filmlerde FT-IR spektrumları, peptit bağlarına özel olan absorpsiyon bantlarını ifade etmektedir. FT-IR spektrumunda, $3200-3400 \text{ cm}^{-1}$ arasında gözlemlenen pikler, amit A'nın N-H gerilme titreşiminin karakteristik pikleridir (Tonin vd., 2006). 1640 , 1520 ve 1250 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla Amit I, II ve III olarak adlandırılır ve proteinlerin konformasyonel düzenini incelemek için kullanılır (Kakkar & Madhan, 2016). Amit I'in 1640 cm^{-1} 'deki keskin zirvesi, C=O çift bağ germe titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1540 cm^{-1} 'de gözlemlenen Amit II, N-H germe ve C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Son olarak 1240 cm^{-1} 'de gözlemlenen amit III,

C-N gerilme ve N-H, bükülme absorpsiyon piklerine karşılık gelir. Bu karakteristik amit pikleri keskin olarak görülemez bu durum filmlerin sentezi sırasında proteinlerin yapısının bozulmasından kaynaklanmaktadır. Spektruma incelendiğinde TEOS'un varlığı ile ilgili olan Si-O-Si asimetrik titreşim tepe noktası 1090 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Bramanti vd., 2022).

Bor ile modifiye edilmiş filmler, B-O germe titreşimi nedeniyle 1345 cm^{-1} 'de bir absorpsiyon zirvesi göstermiştir. 1190 cm^{-1} 'deki absorpsiyon zirvesi, B-OH ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca 880 cm^{-1} 'de Si-O-B bağlarından dolayı küçük bir bant gözlenmiştir. 810 cm^{-1} 'deki absorpsiyon zirveleri simetrik B-O-Si'den kaynaklanmaktadır (Siqueira vd., 2007). Son olarak, 637 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, B-O-B bağının asimetrik titreşiminden kaynaklanmaktadır (Islam & Nebhani, 2021). Genel olarak, ATR-FTIR analiz sonuçları, silisyum ve borun yapıya dahil edildiğini ve buna ek olarak filmlerin karakteristik yapısının piklerini göstermiştir.



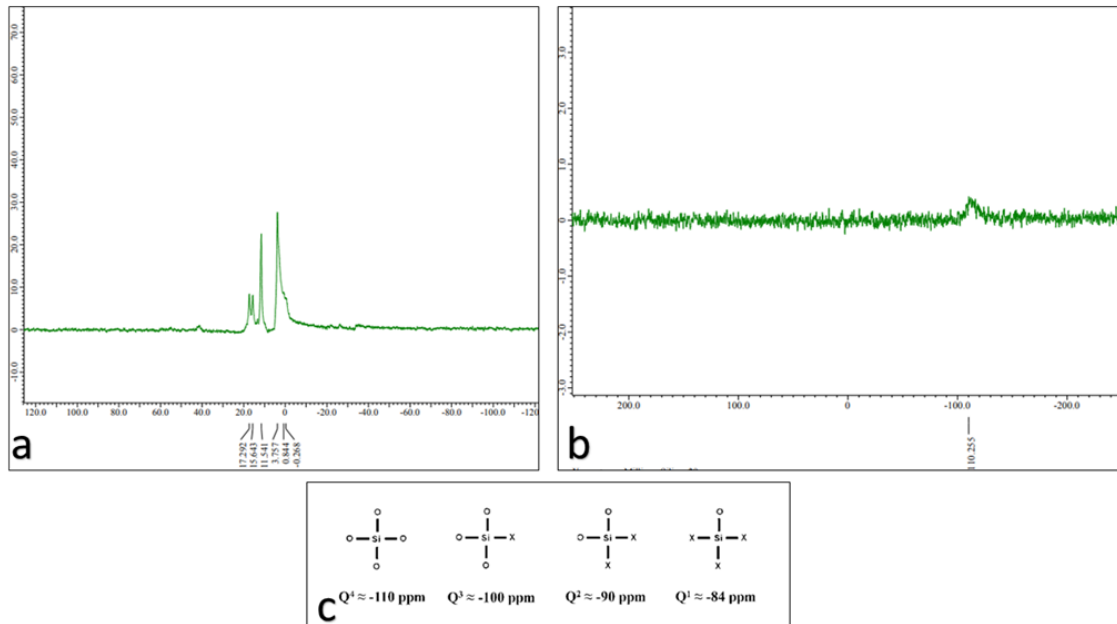
Şekil 26. FT-IR sonuçları

4.3.2. NMR Analizleri

KK-DK-BA-Si filminin ^{11}B MAS NMR ve ^{29}Si -NMR spektrumları, Şekil 26'da gösterilmektedir. Elde edilen filmin ^{11}B MAS NMR spektrumları, bor içeren silikadan oluşan zirvelere sahiptir (Şekil 27.a). 0 ppm civarındaki pikler, tetrahedral bor olarak atanmaktadır. Bu nedenle, 0,844 ppm ve -0,268 ppm'deki kaymalar ile, $\text{B}(\text{OH})_4^-$ formundaki borat iyonlarının tetra-koordinatlı olduğu kabul edilmektedir (Hiraishi vd., 2021). Yaklaşık 11.541 ppm'de gözlenen sinyal, silisyum atomlarının iki çerçevesine bağlı bor ve $\text{B}(\text{OSi})_2\text{OH}$ ile ilişkilidir (Koller vd., 2005). Ortalama izotropik kimyasal kaymalar 15 ppm ile 17,5 ppm arasındadır (Angeli vd., 2010).

16 ila 14 ppm arasında değişen kaymalar, üç koordinatlı borat iyonu $\text{B}(\text{OH})_3$ ile tanımlanır (Ferlat vd., 2008). Spektruma bakıldığında bu durum 15.643 ppm'de görülmektedir. Bu, B-O-B bağ açısına doğrusal bağımlılığı ile tutarlıdır. Son olarak, 17,292 ppm'deki sinyal, düşük silisyum konsantrasyonu ile ilişkili $\text{B}(\text{OSi}-(\text{OH})_2)$ 'ye karşılık gelmektedir (Fild vd., 2000).

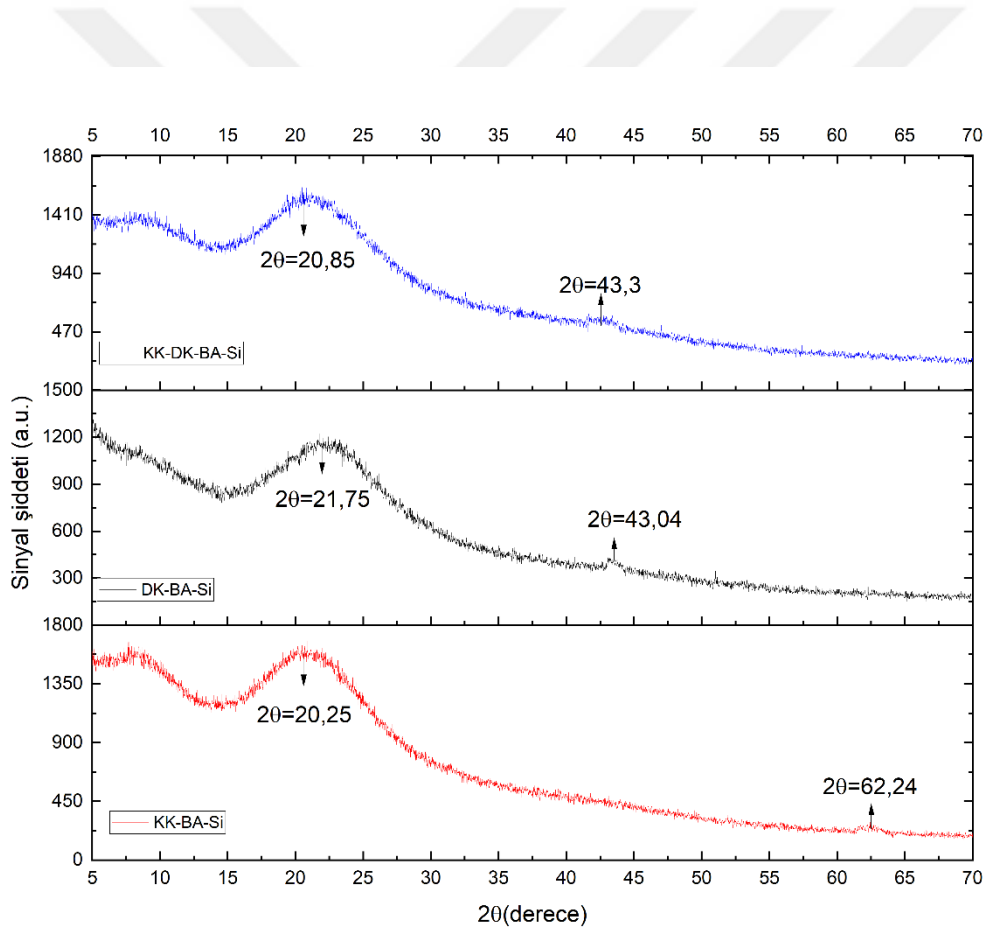
KK-DK-BA-Si filminin ^{29}Si -NMR spektrumları Şekil 27.b'de gösterilmektedir. Şekilde 27.c'de Q_n türlerinin ilgili kimyasal kaymaları (ppm cinsinden) ve moleküler yapısı gösterilmektedir. Sol-jel reaksiyonlarının tamamlanması bu şekilde ifade edilmiştir. -110 ppm'de gözlenen pik, Si-O-Si bağlarını göstermektedir (Xu vd., 2007).



Şekil 27. KK-DK-BA-Si filmin NMR sonuçları. (a) ^{11}B MAS NMR. (b) ^{29}Si -NMR. (c) Q_n kimyasal kaymaları.

4.3.2. XRD Analizleri

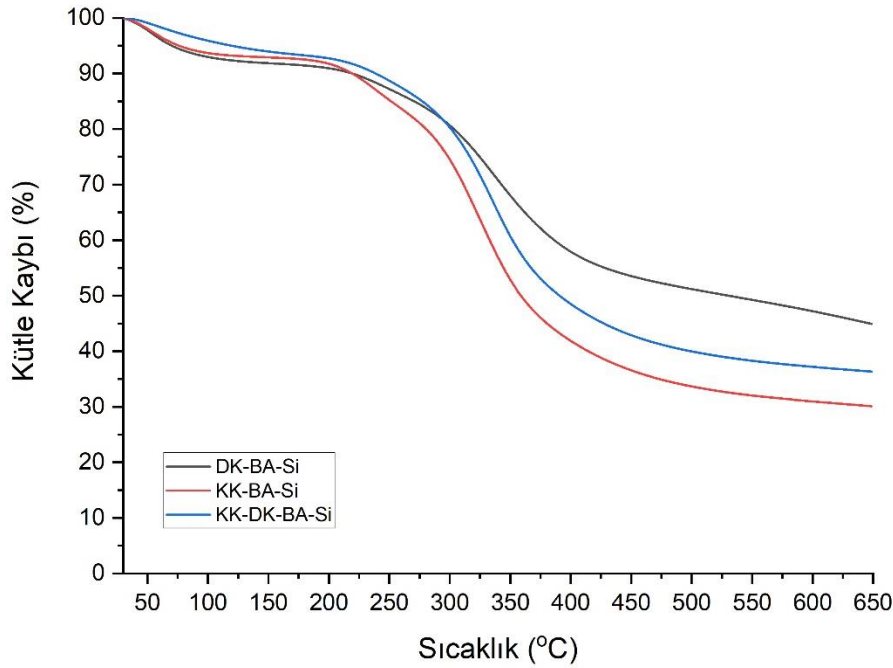
KK-BA-Si, KK-DK-BA-Si ve DK-BA-Si filmlerinin XRD spektrumları Şekil 28'de sunulmuştur. DK-BA-Si filminde, $2\theta=21,75^\circ$ 'te geniş bir karakteristik kollajen tepe noktası görülmüştür (Saska vd., 2012). Benzer şekilde, KK-BA-Si ve KK-DK-BA-Si filmlerinde $2\theta = 20^\circ$ civarında keratinin β -tabaka yapısıyla ilgili tipik bir geniş tepe gözlemlenmiştir (Wang vd., 2022). Ancak keratinin α heliks yapısı net bir şekilde gözlemlenememiştir. Bu, keratinin orijinal yapısının bozulduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca $2\theta = 20-25^\circ$ 'de geniş merkezli bir pik olarak tüm greftlerde silikanın amorf yapısı gözlemlenmiştir (Islam & Nebhani, 2021). Bu nedenle, silika ve keratin tepe noktaları örtüşmektedir. Son olarak, XRD spektrumunda $2\theta = 43$ ve 62° civarında bor etkisi gözlemlenmiştir. (Belaid vd., 2020)



Şekil 28. Filmlerin XRD spektrumları

4.4. Filmlerin TGA Analizleri

Filmlerin termal özellikleri TGA analizi ile incelenmiş ve sonuç olarak bozunma eğrileri Şekil 29'da gösterilmiştir. Termogramlardaki eğri kütle kaybını yüzde şeklinde vermektedir. Eğriler, malzemelerin 30-650 °C sıcaklık aralığında bozulduğunu göstermektedir. Termogramlara incelendiğinde iki önemli ağırlık kaybı gözlenmiştir. 125 °C'ye kadar gözlenen %5-9'luk ilk kütle kaybı, fiziksel olarak adsorplanmış veya yapısal olarak bağlı suyun buharlaşarak uzaklaştığını göstermektedir. Ayrıca termogramlarda gözlemlenen ikinci kütle kaybı, proteinlerin ısıl bozunmasına bağlanabilmektedir. Genel olarak termal bozunma işlemi tamamlanırken DK-BA-Si filminde %50, KK-BA-Si'de %30 ve KK-DK-BA-Si filminde ise %40'luk bir kütle kaybı yaşanmıştır. KK-DK-BA-Si filminin diğer iki film arasında bir değere sahip olması, keratin içeren filmlere kollajen eklenerek termal dayanıklılığı artırdığını göstermektedir. Bunun dışında literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında tüm filmlere bor ve silisyumun eklenmesinin B/Si-OC bağlarından dolayı ısıl kararlılığı artırdığı gözlenmiştir (Bose vd., 2022) (Cao vd., 2022).



Şekil 29. Filmlerin TGA termogramları

4.5. BET Analizi

Filmlerin, gözenek boyutları ve toplam yüzey alanları BET ve BJH analizleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5’te gösterilmiştir. Filmler kendi içlerinde karşılaştırıldığında, kollajen ilavesiyle gözeneklilik arttıkça kompozit filmin yüzey alanı da artmıştır (León-Mancilla vd., 2016). Ayrıca literatürle karşılaştırıldığında filmlere eklenen bor ve silisyumun yüzey boyunca kaplanması ile daha pürüzlü bir yüzey elde edilmiş, böylelikle yüzey alanını arttırdığı gözlemlenmiştir. BJH gözenek yarıçapına göre filmler, IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) sınıflandırmasında mikro gözenekli (<2 nm) aralıktadır (Zdravkov vd., 2008). Kompozit filmin geniş yüzey alanı ve gözenekli yapısı vaskülarizasyon ve sıvı emme oranını artırabilir. Bu nedenle hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırarak yara iyileşmesine katkıda bulunabilir.

Tablo 5
Filmlerin BET-BJH sonuçları

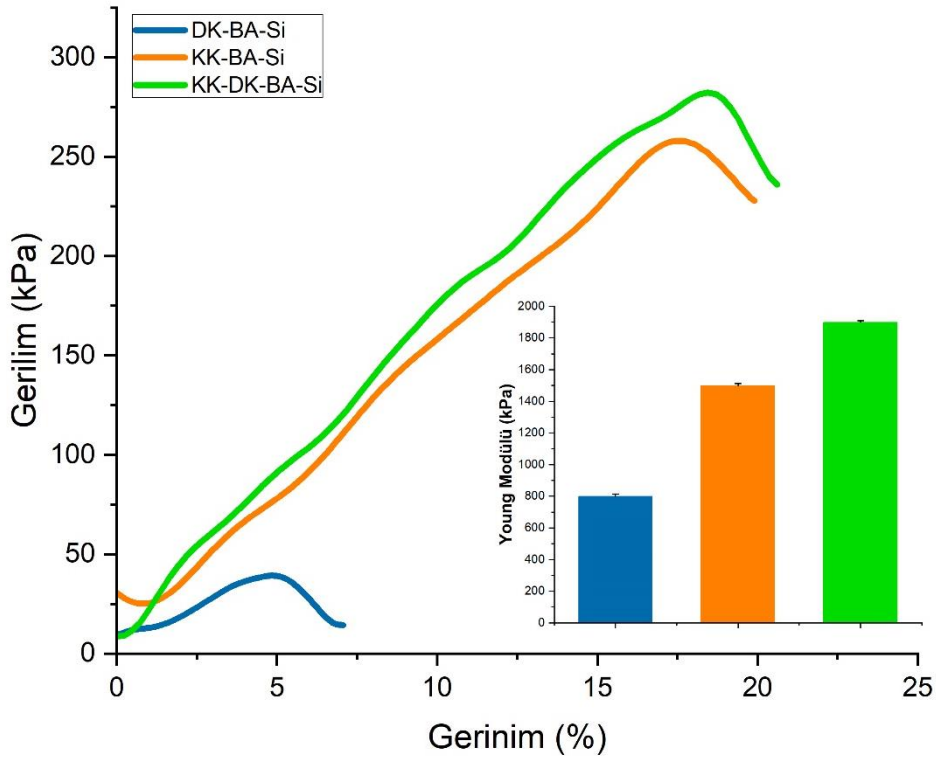
| Örnekler | BET Yüzey Alanı(m ² /g) | BJH Yöntemi | | |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|
| | | Yüzey Alanı (m ² /g) | Gözenek Hacmi(mL/g) | Gözenek Çapı (nm) |
| KK-BA-Si | 1,242 | 1,469 | 0,004 | 2,183 |
| DK-BA-Si | 8,087 | 8,098 | 0,021 | 1,551 |
| KK-DK-BA-Si | 8,372 | 5,975 | 0,025 | 1,938 |

4.6. Mikromekanik Çekme Testi

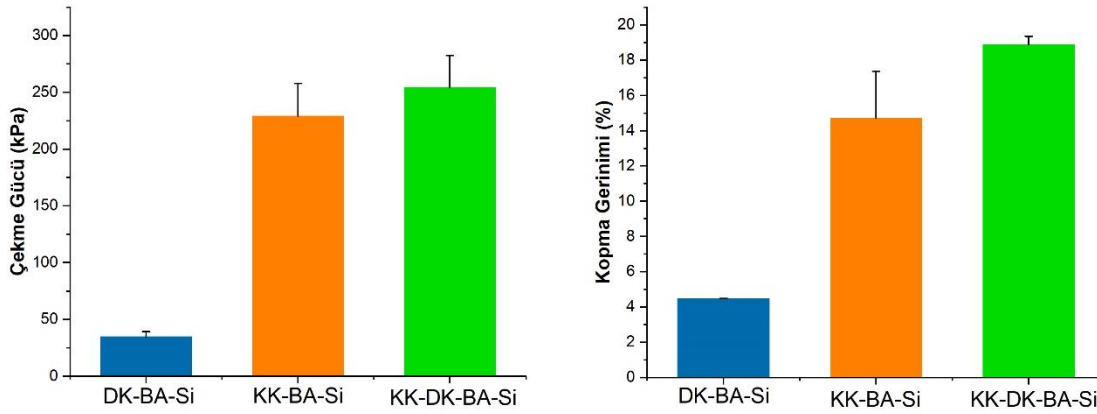
Hemostaz ve yara iyileşmesinde, malzemelerin kullanılabilirliği için iyi mekanik özelliklere sahip olması gereklidir. Bu nedenle, filmlerin mekanik özellikleri çekme testleri kullanılarak değerlendirilmiş ve kendi içlerinde kıyaslanmıştır. Filmlerin çekme testi sonuçları Şekil 29 ve 30’da gösterilmektedir. Şekil 30, gerilim-gerinim eğrisini ve Young modülünü göstermektedir.

KK-BA-Si, DK-BA-Si ve KK-DK-BA-Si filmlerin E değerleri sırasıyla 1500, 800 ve 1900 kPa olarak hesaplanmıştır. KK-DK-BA-Si elastisite modülü diğer ikisine göre daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuç bizlere KK-DK-BA-Si filmin diğerlerine kıyasla çok daha rijit bir yapıda olduğunu göstermektedir. Böylelikle, KK-DK-BA-Si filmi diğerlerinden daha fazla stres altında daha az deformasyona uğramaktadır.

Ayrıca, KK-DK-BA-Si filminin (250 kPa) gerilme mukavemeti ve kırılma gerilimi, KK-BA-Si (225 kPa) ve DK-BA-Si (40 kPa) filmlerine kıyasla daha fazladır. Bu da keratin içeren filmlere kollajen polimerinin eklenmesinin yapıyı daha sağlam hale getirdiğini göstermektedir (Şekil 31) (Moore vd., 2006). Öte yandan, literatürle karşılaştırıldığında bor ve silisyumun keratin filme bağlanmasıyla Young modülünde bir artış gözlenmiştir (Zhao vd., 2022) (Mori & Hara, 2018).



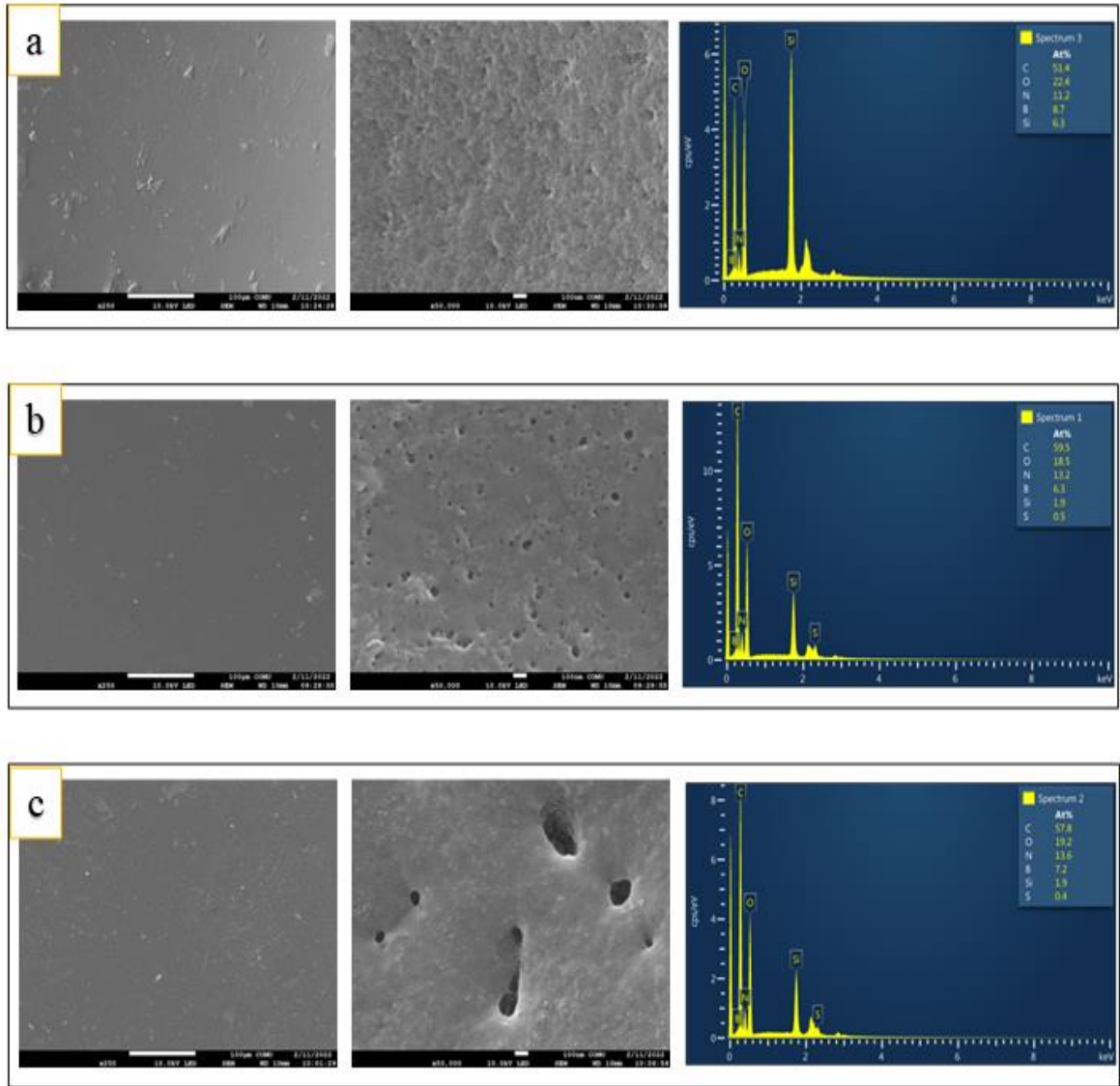
Şekil 30. Filmlerin çekme testi sonucu gerinim- gerilim grafiği ve Young modülü



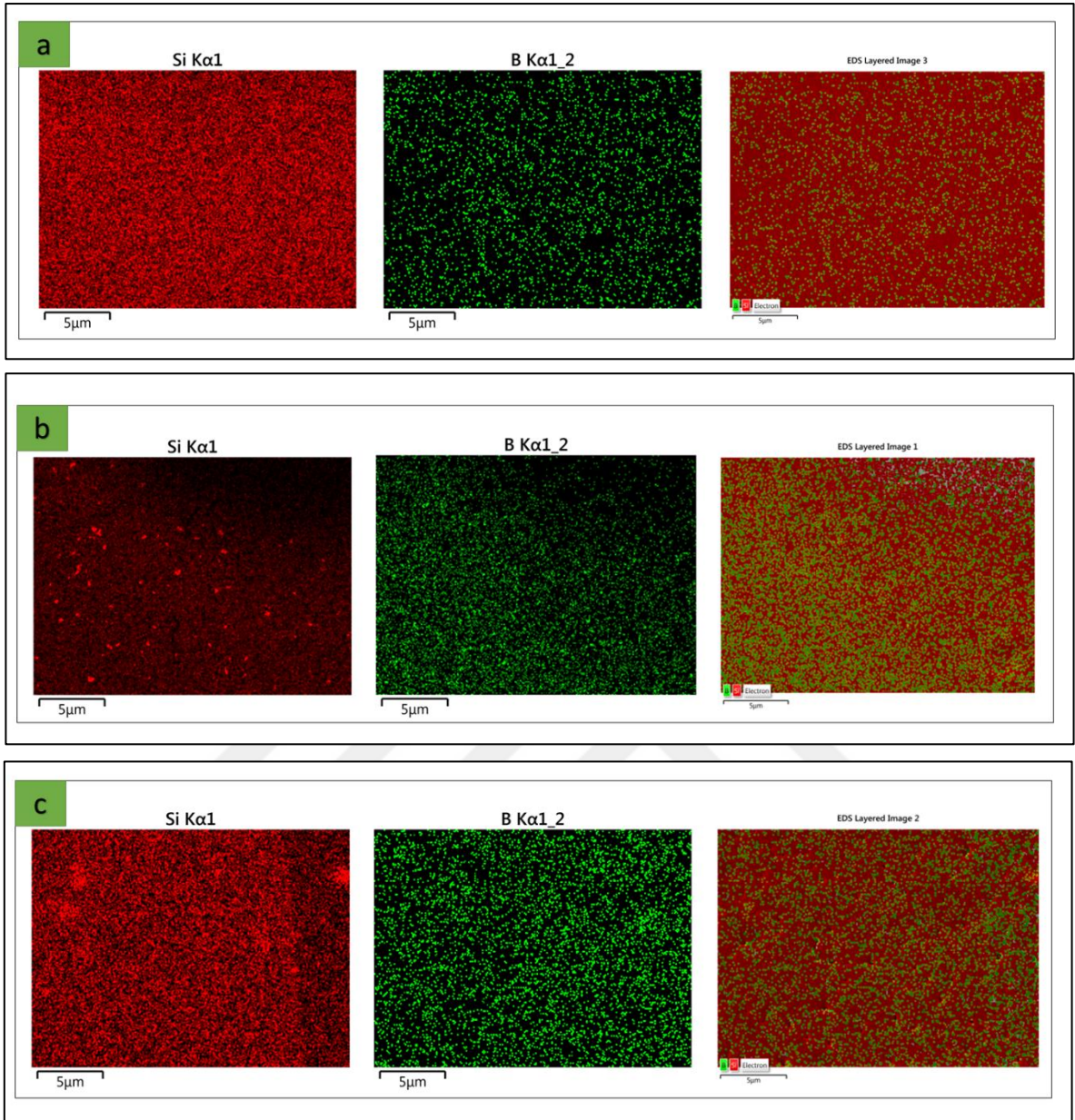
Şekil 31. Filmlerin çekme gücü ve kopma gerilimi

4.7. SEM ve EDS Analizleri

Filmlerin, SEM görüntüleri 250x ve 50.000x büyütme oranlarında alınmış olup, mikrografları Şekil 31’de incelenmiştir. Filmlerin 250x büyütmede alınan görüntülerinde düzgün, homojen dağılımlı yüzeyler sergiledikleri görülmüştür. Bunun başlıca nedeni olarak, B ve Si’un polimerlerle kimyasal olarak bağlanması ve dolayısıyla filmlerde homojen bir şekilde dağılmasından kaynaklanması olabilir (Zirak Hassan Kiadeh vd., 2017). Öte yandan filmlerde 50.000x büyütmelerde daha gözenekli bir yüzey görülmektedir. Bu gözenekli yapı B ve Si’un çapraz bağlanmasından kaynaklanmaktadır (Aliasgharlou vd., 2020), (Özen vd., 2022). Yapıdaki gözeneklilik, hücrelerin yapışmasına ve hemostaz hızının artmasına yardımcı olabilir. Ek olarak, filmlerin elementel bileşimi, EDS analizi ve elementel haritalama ile belirlenmiştir (Şekil 32, Şekil 33). Bu sonuçlar, B ve Si’un yapılar homojen bir şekilde dahil edildiğini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 32. Filmlerin SEM-EDS analizleri. (a) DK-BA-Si, (b) KK-BA-Si, (c) KK-DK-BA-Si



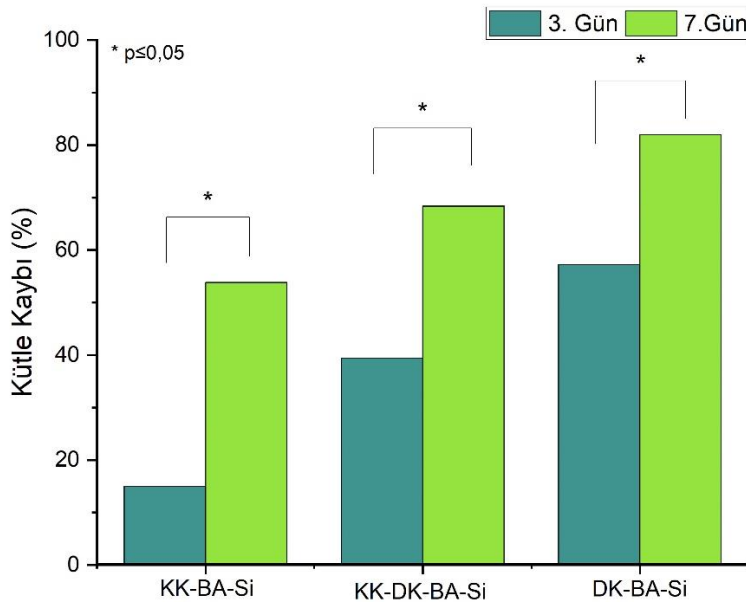
Şekil 33. Filmlerin elementel haritalama sonuçları. (a) DK-BA-Si, (b) KK-BA-Si, (c) KK-DK-BA-Si

4.8. Filmlerin *in vitro* biyobozunurluk çalışmaları

Bir biyomateryal için biyouyumluluk önemli olduğu gibi, materyalin bozunabilirliği de oldukça önemli bir özelliktir. Geliştirilecek olan malzemelerin bozunma süresi, yaranın iyileşme süresine karşılık gelecek şekilde olmalıdır. Bozunma ürünlerinin toksik olmayıp, vücuda zarar vermemesi de önemli bir parametredir (Song vd., 2018).

Filmlerin parçalanabilirliğini incelemek için, proteinaz K enzimi ile 3 ve 7 günlük zaman noktalarında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Filmlerin bozulma oranları hesaplanmış ve ağırlık kaybı yüzdesi olarak gösterilmiştir (Şekil 34).

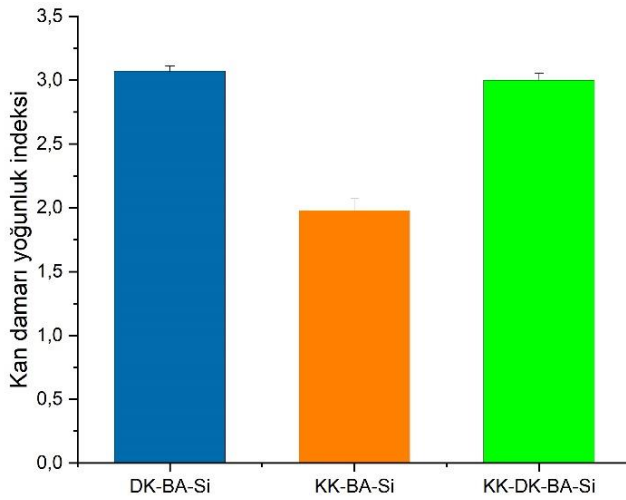
Üç günlük inkübasyonun ardından KK-BA-Si ve DK-BA-Si filmlerinin sırasıyla kütle kaybı %15 ($\pm 1,15$) ve %57,21 ($\pm 6,57$) olarak hesaplanmıştır. Filmler inkübasyonun yedinci gününde, kütlelerinin yüzde 53,83'ünü ($\pm 2,59$) ve yüzde 81,99'unu ($\pm 2,52$) kaybetmişlerdir. Öte yandan, KK-DK-BA-Si filminin 3. günde %39,41 (2,53) ve 7. günde %68,39 (3,63) kütle kaybı vardır. Böylelikle KK-DK-BA-Si filmi, diğer iki film arasında bir kütle kaybına sahiptir. Biyomalzemelerin bozunma süreci, polimerin gözeneklilik, toplam yüzey alanı ve vücudun hangi bölgesine implante edileceği gibi özellikleri ile ilgilidir. Filmlerin Tablo 5'te gösterilen gözeneklilik ve yüzey alanları dikkate alındığında, gözeneklilik arttıkça bozunma yüzdeleri de artmaktadır. Gözenekli yapıları arttıkça su emme eğilimleri artmakta dolayısıyla ağırlık kaybı hızlanarak filmlerin bozunma kinetiklerinde değişikliklere neden olmaktadır (Ulery vd., 2011). Malzemenin vücut tarafından biyolojik olarak parçalanabilme özelliği, uygulama sonrası eksplantasyonun gerekliliğini de ortadan kaldırmaya yardımcı olur. Bu nedenle, maliyet tasarrufu sağlanabilmektedir.



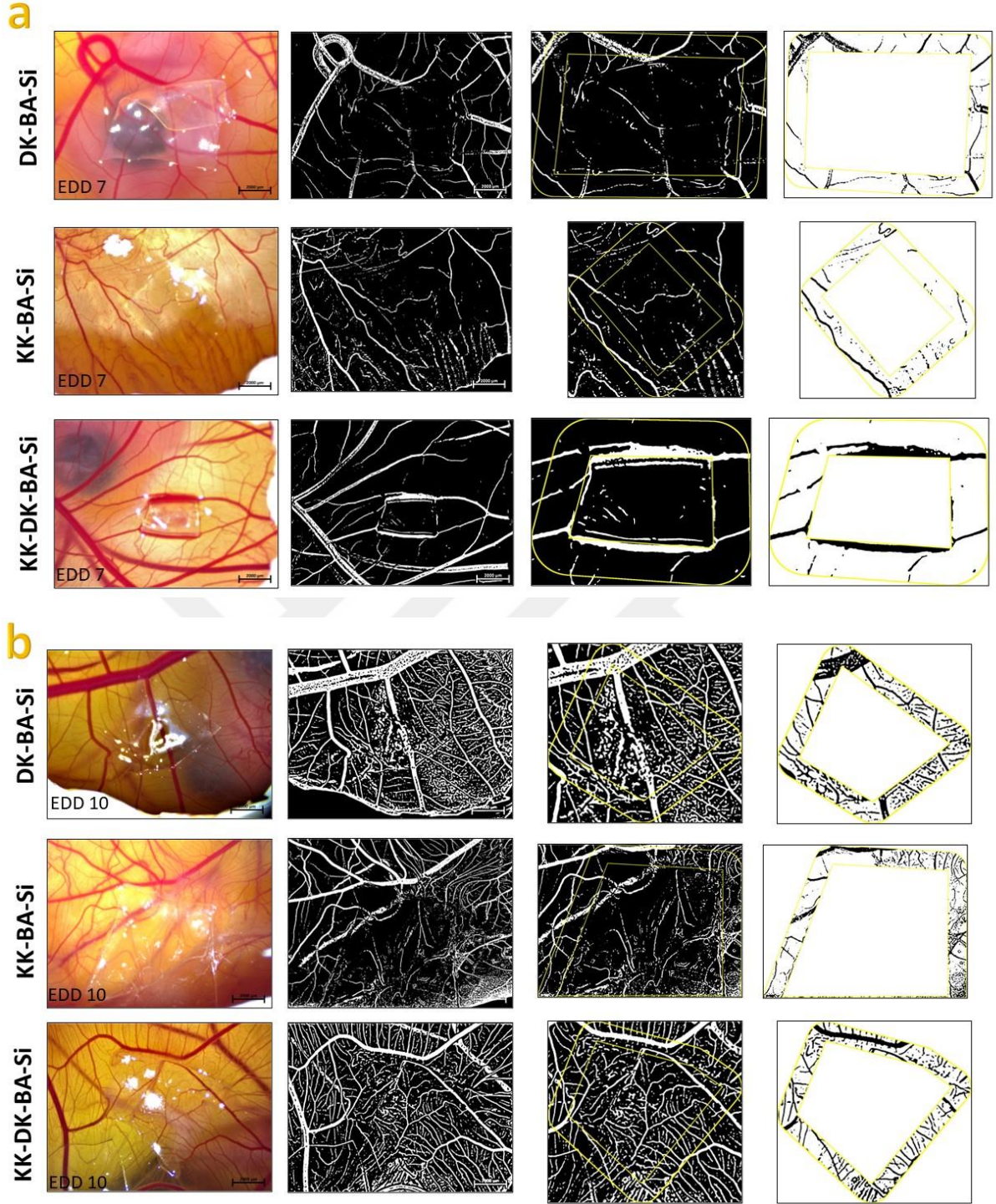
Şekil 34. Filmlerin 3. ve 7. gün zaman noktalarında bozunurluk oranları

4.9. CAM Analizi

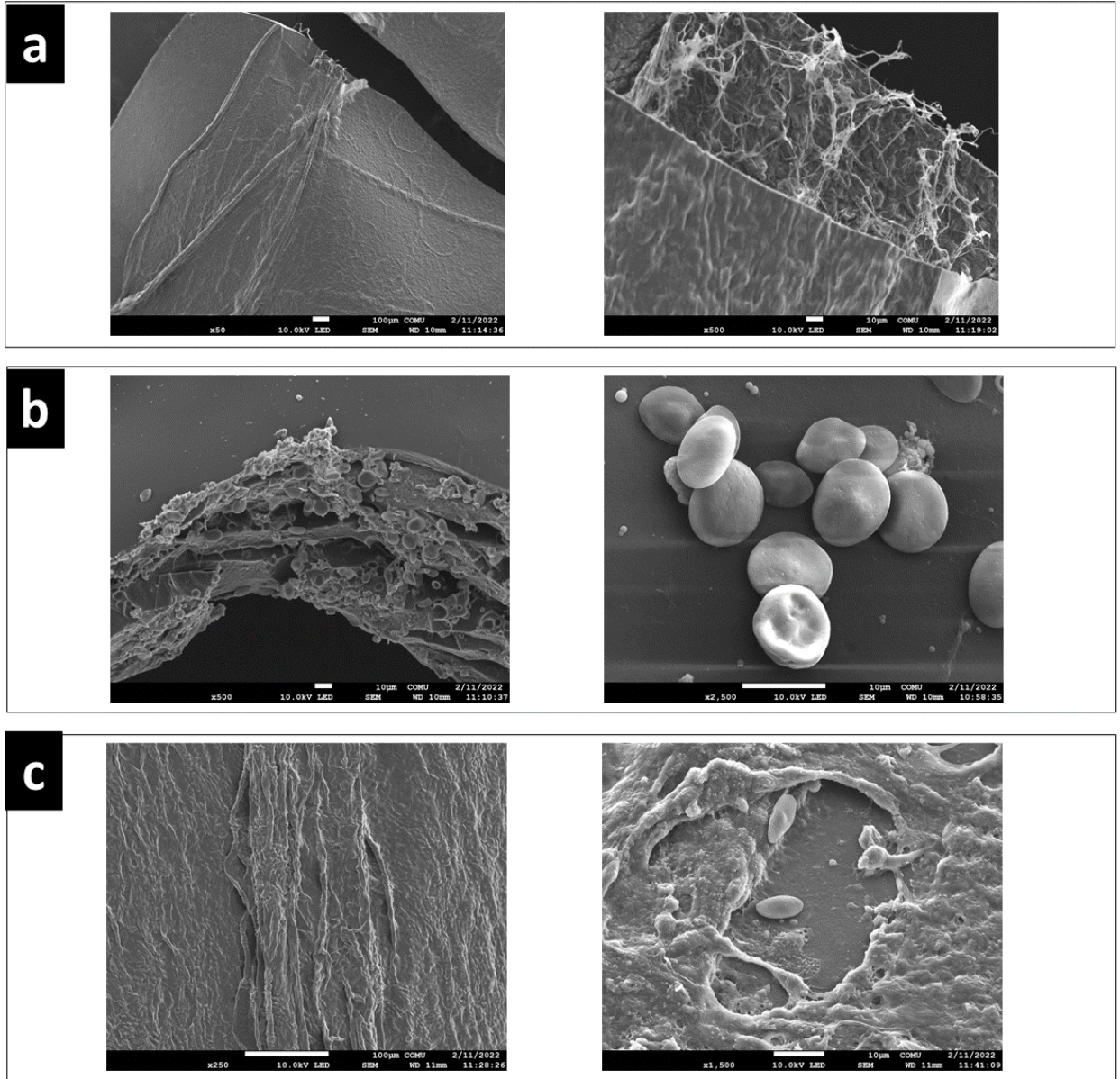
Filmlerin kan damarı oluşumunu indüklenme kapasitesi CAM testi ile incelenmiştir. Veriler, Şekil 35'te gösterildiği gibi ImageJ yazılımında Anjiyogenez Analizi eklentisi kullanılarak kantitatif olarak hesaplanmıştır (Mangir vd., 2019). Stereomikroskopik görüntülere bakıldığında şeffaf filmlerin altında çok sayıda koryoallantoik damar oluşumu gözlemlendi. Ayrıca kan damarlarının filmlere doğru yöneldiği görüldü. Filmlerin yeni oluşan kan damarı yoğunluk indeksi Şekil 36'da verildiği gibi hesaplanmıştır. DK-BA-Si filminin en yüksek yoğunluğa sahip olması kolajen etkisinden dolayı literatür ile uyumludur. Ancak keratin, kollajene göre çok daha az damar oluşumu göstermiştir. Bunun nedeni, kolajenin, endotel hücrelerinin büyümesini ve göçünü teşvik ederek fiziksel bir ortam yaratması ve kan damarlarının inşası için bir yapı iskelesi görevi görebilmesidir (Yang vd., 2022). Bu nedenle, KK-DK-BA-Si, iki film arasında damar yoğunluğu gösterdi. Filmlerin tümü pro-anjiyojenik bir etki gösterdi. Bu nedenle, anjiyogenezin önemli bir yere sahip olduğu yara iyileşme sürecinde tasarlanan filmler, potansiyel bir terapötik fayda sağlayabilir (Wang vd., 2023). Filmlerin EDD 10'da çekilen SEM mikrografları Şekil 37'de gösterilmektedir. Mikrograflar, histogramları ve stereomikroskopik gözlemleri doğrulayan benzer sonuçlar verdi. Ayrıca film üzerinde tavuk kan hücrelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Steinlage vd., 2003). Bununla birlikte, yeni oluşan kan damarları da gösterilmiştir.



Şekil 35. Kan damarı yoğunluğu indeksi sonuçları (n=3)



Şekil 36. Filmlerin *in ovo* CAM analizleri. (a) Filmler EDD 7’de implante edildikten sonra ImageJ anjiyogenez analizörü ile belirlenen görüntüleri. (b) EDD 10 ‘da filmlerin eksplante edilmeden önce ImageJ anjiyogenez analizörü ile belirlenen görüntüleri.

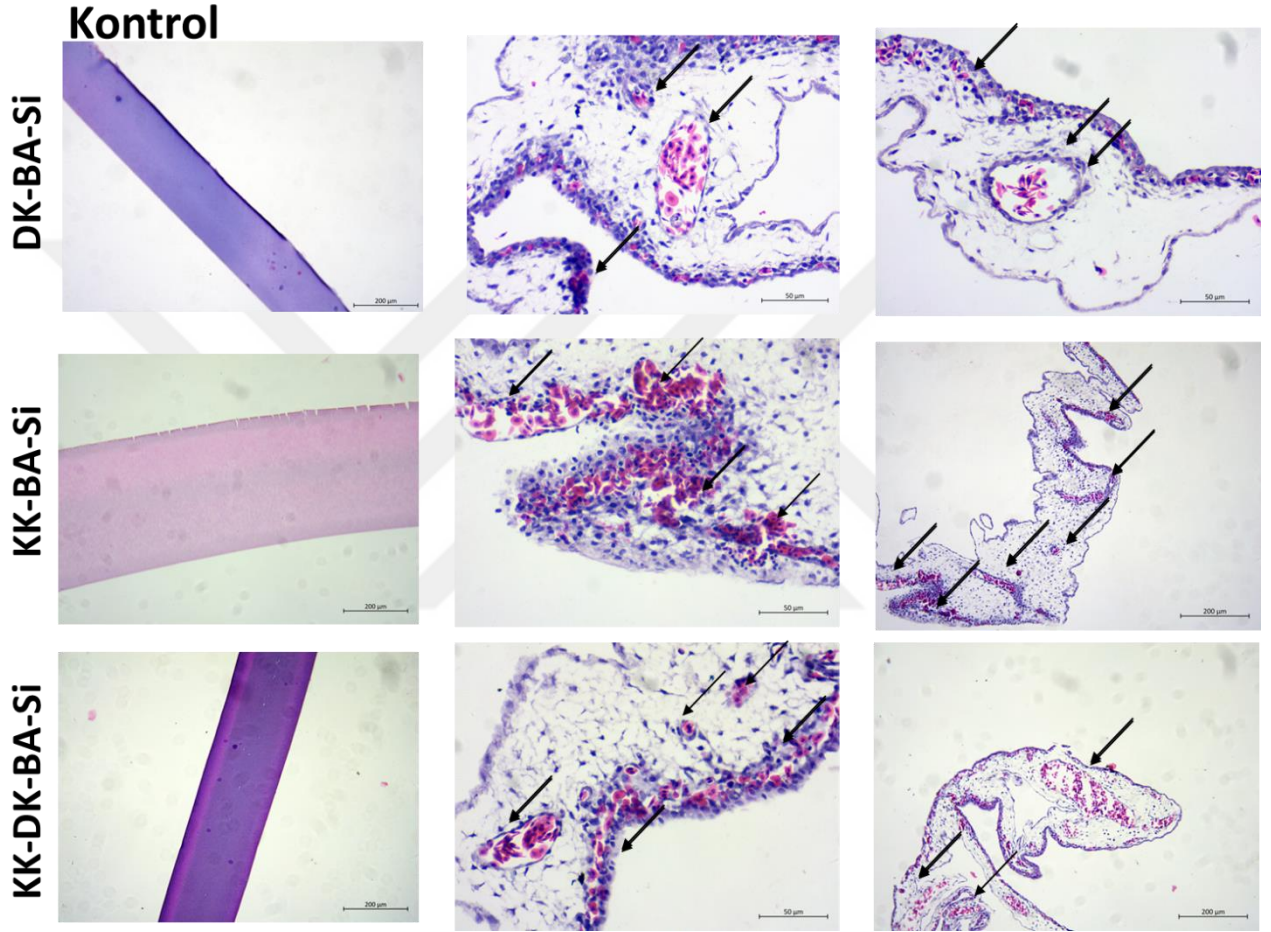


Şekil 37. Filmlerin CAM ile EDD 10 da alındıktan sonra SEM görüntüleri

4.10. Anjiyojenik Yanıtların Histolojik Değerlendirmesi

EDD10'da eksplante edilen filmlerin histolojik kesitleri alınmış ve H/E ile boyanmıştır. Şekil 38'de histoloji görüntüleri verilmiştir. Yara pansumanında ve CAM dokusunda akut, kronik enflamasyon, nekroz veya ters doku tespit edilmedi. Bu sonuçlar, pansumanların biyouyumlu olduğunu ve anjiyogenezi engellemediğini gösterdi. Histoloji kesitleri, hücrelerin çoğalmasının yanı sıra kan damarlarının filmlere sızmasını gösterdi (Eke vd., 2017).

Vaskülarizasyon, filmlerin gözenekliliğine ve bileşimine bağlı olarak farklı oranlarda meydana gelmiştir. (Dhinasekaran vd., 2021). En yoğun vaskülarizasyon, KK-DK-BA-Si yara sargısında ve bitişik CAM dokusunda gözlemlendi. Diğer pansumanlarda da benzer orta düzeyde bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 38. Filmlerin H&E boyama ile kan damarlarının histolojik değerlendirilmesi (siyah ok imleci kan damarlarını göstermektedir.)

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Toplumda zaman içerisinde gerek insan ömrünün uzaması gerek yaşlı nüfusun artması ve bunlara bağlı olarak da bazı hastalıklarda artış yaşanmasına sebep olabilmektedir. Özellikle de diyabete bağlı olarak oluşan ülserler buna örnek verilebilir. Deri yaralanmaları ve yanıklardan kaynaklanan kronik yaralar, dünya geneli sağlık sistemlerinde oldukça büyük bir maliyet gerektiren, ihtimamlı ve uzun süreli tedavileri olan bir süreçtir. Kronik ve enfekte yaralar, yalnızca derinin fizyolojik yapısını bozmayıp aynı zamanda ölümlere neden olabilmektedir. Maalesef, yara tedavileri için yapılan sıkı araştırmalara rağmen birçok vakada yara yönetimi yetersiz kalabilmektedir. Bu bilgiler ışığında yara örtülerinin geliştirilmesine yönelik ilgi giderek arttığı söylenebilir. Şimdiye kadar yara tiplerini tedavi etmek için çok sayıda yara örtüleri geliştirilmiştir. Çeşitli yara örtülerine rağmen hala bazı eksiklikler bulunmaktadır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda kutanöz yara iyileşmesinin kalitesini arttırmak için, deri doku mühendisliği çalışmaları ile halk sağlığındaki bu açığı kapatmaya yönelik yenilikçi hücrel deri ikameleri geliştirmek merak uyandıran bir konu olmuştur.

Doku mühendisliği yaklaşımları son dönemlerde yaşanan sorunlar nedeniyle alternatif bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Bu yöntemde yapay dokuların geliştirilmesi amacıyla doğal ve yapay olmak üzere birçok polimerler, mineraller, metaller araştırılıp çalışmalar yapılmaktadır. Deri doku mühendisliği çalışmalarında özellikle de bir yara örtüsü geliştirmek için kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Bu çalışmaların birçoğu günümüzde kullanılabilen iken bazıları şu an in vitro test aşamalarında.

Deri yenilenmesinde genel olarak kullanılan malzemeler doğal ve sentetik polimerlerdir. Sentetik biyomalzemeler ayarlanabilir özellikleri olmasından dolayı bu alanda ilgi odağı olmuşken doğal biyomalzemeler ile kıyaslandığında daha az biyoyumlu olmaları kullanımları açısından sıkıntı olmaktadır. Doğal polimerlerle yara örtülerinin geliştirilmesi son zamanlarda fazlasıyla ilgi çeken çalışma konuları olmuşturlar. Bunun nedeni matriks ortamını taklit edebilen malzemeler olmalarıdır.

Başka bir açıdan bakıldığında doğal polimerlerle inorganik malzemelerin beraber olduğu hibrit biyomalzemeler, çeşitli avantajlarından dolayı son dönemlerde tercih edilen yöntemlerdir. Hibrit malzemelerin deri mühendisliği çalışmalarında doğal polimerden kaynaklı esneklik, hücresel destek sağlar iken inorganik malzemelerden gelen mekanik dayanım bu konunun dikkat çekmesini sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında ise insan derisinin yapısı ve içeriği göz önünde bulundurarak koyun yünün keratini ve denizanasından izole edilmiş olan kollajen doğal polimerleri ile silisyum ve borik asit kaynaklı bor minerallerinin özellikleri birleştirilmiştir. Keratinin sahip olduğu matriks benzeri biyokimyasal özellikleri ve hücre dışı matriksi ana proteinlerinde olan kollajen, geliştirilen filmlerin temelini oluşturmaktadır. Diğer bir açıdan ise bor ve silisyumla filmlere destek sağlanmak istenmiştir. Bunlar ışığında sol-jel reaksiyonları kullanılarak üç farklı film tasarlanmış ve kendi içlerinde karşılaştırılmıştır. Reaksiyon aşamalarında, koyun yününden sülfitolizis metodu ile keratin ekstrakte edilmiş ve denizanaslarından ise kollajen izolasyonu gerçekleştirilip kullanılmak üzere atelokollajen yapısı elde edilmiştir. Keratinin ekstraksiyonu %50 gibi bir verim ile oldukça iyi bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Borik asit ve silika öncüsü TEOS'dan yararlanılmıştır. Sol- jel metodu ile polimerlerle kimyasal bir ağ yapısı elde edilip döküm tekniği ile filmler elde edilmiştir. Mekanik olarak dayanım sağlamak için EDC ve NHS ajanları ile kimyasal çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Filmlerin kimyasal yapısı katı NMR ve ATR-FTIR analizleri ile incelenmiş, kristal yapısı ise XRD ile belirlenmiştir. TGA analizi ile termal stabilitesine bakılırken mekanik dayanımı ise mikro mekanik çekme testi ile belirlenmiştir.

NMR ve FTIR sonuçları incelendiği bor ve silisyum tüm filmlerde istenildiği gibi yapıya katıldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca literatürle kıyaslandığında yapıya katılan bor ve silisyum sayesinde filmlerin mekanik ve termal dayanımının arttığı gözlemlenmiştir. Bor ve silikanın yüzey boyunca kaplanması ile filmlerin yüzey alanları oldukça artmıştır. Bundan kaynaklı olarak emilim artarak bozunma oranı da artmıştır. Böylelikle besin, oksijen gibi ortamları sağlayabilecek olduğu düşünülmektedir. Yara iyileşmesinde önemli bir adım olan anjiyogenez için, filmler ile *in-ovo* çalışma yapılarak vaskülerizasyona ne kadar izin verdiğine bakılmıştır.

Sadece keratin içerikli filmlere kollajen eklenmesi ile yeni kan damarlarının oluşması artmaktadır. Denizanası kollajenin, kan damarlarının oluşmasındaki etkisi net bir şekilde ortaya konmuştur. Tüm filmler pro-anjiyojenik özellikler göstermiştir. Keratin ve denizanası kollajenin birlikte kullanılması tek başlarına kullanımlarla karşılaştırıldığında etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, tasarlanan filmlerin deri yaralanmalarında kullanılmak üzere uygun olabileceğini, yara iyileşmesi sürecine destek olabileceğini düşünmekteyiz. Filmler eksik olduğu noktalarda geliştirilmeye açıktır ve yenilikçi yara örtülerinin geliştirilmesine yönelik yeni çalışmalara öncülük ederek bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Achilleas, D., Skandalis, S., & Chrysostomi Karamanos, N. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 1(97), 4-27. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- Alahyaribeik, S., & Ullah, A. (2020). Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 449-456. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.144>.
- Aliasgharlou, N., Sana, F. A., Khoshbakht, S., Zolfaghari, P., & Charkhian, H. (2020). Fabrication and characterization of boric acid-crosslinked ethyl cellulose and polyvinyl alcohol films as potential drug release systems for topical drug delivery. *Turkish Journal of Chemistry*, 44(6), 1723-1732. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3906/kim-2008-23>.
- Alibardi, L., Dalla Valle, L., Nardi, A., & Toni, M. (2009). Evolution of hard proteins in the sauropsid integument in relation to the cornification of skin derivatives in amniotes. *J Anat*, 214(4), 560-586. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01045.x>.
- Angeli, F., Charpentier, T., De Ligny, D., & Cailleteau, C. (2010). Boron speciation in soda-lime borosilicate glasses containing zirconium. *Journal of the American Ceramic Society*, 93(9), 2693-2704. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.03771.x>.
- Annabi, N. (2014). Tamayol A. Uquillas JA Akbari M. Bertassoni LE Cha C. Camci-Unal G. Dokmeci MR Peppas NA Khademhosseini A. *Adv. Mater*, 26, 85-124. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390%2Fgels1020162>.
- Arcangeli, G., Cupelli, V., & Giuliano, G. (2001). Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Science of the total environment*, 270(1-3), 135-139. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00781-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00781-6).
- Arslan. (2017). Keratin temelli iskele üretimi ve doku mühendisliği uygulamaları için etkinliğinin değerlendirilmesi. (*Yüksek Lisans Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2017*).
- Arslan, Y. E., Arslan, T. S., Derkus, B., Emregul, E., & Emregul, K. C. (2017). Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to

- regenerative medicine products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 160-170. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.034>.
- Banerjee, J., & Sen, C. K. (2015). Skin Wound Healing. In *MicroRNA in Regenerative Medicine* (pp. 631-651). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/dna.2006.0548>
- Baroni, A., & Buommino, E. (2012). De Gregorio v, Ruocco E, Ruocco v, Wolf R. *Structure and function of the epidermis related to barrier properties. clin Dermatol*, 30, 257V262. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>.
- Belaid, H., Nagarajan, S., Barou, C., Huon, V., Bares, J., Balme, S., . . . Teyssier, C. (2020). Boron nitride based nanobiocomposites: design by 3D printing for bone tissue engineering. *ACS Applied Bio Materials*, 3(4), 1865-1874. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00965>.
- Benderdour, M., Bui-Van, T., Dicko, A., & Belleville, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12(1), 2-7. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(98\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(98)80014-X).
- Berk, B. C., Alexander, R. W., Brock, T. A., Gimbrone Jr, M. A., & Webb, R. C. (1986). Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science*, 232(4746), 87-90. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1126/science.3485309>.
- Birdi-Chouhan, G., Shelton, R., Bowen, J., Goldberg-Oppenheimer, P., Page, S., Hanna, J., . . . Grover, L. (2016). Soluble silicon patterns and templates: calcium phosphate nanocrystal deposition in collagen type 1. *RSC advances*, 6(102), 99809-99815. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C6RA19784A>.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2892-2923. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/jps.21210>.
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., & Blevins, D. (2004). Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(11), 907-912. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.11.002>.
- Bose, S., Li, S., Mele, E., Williams, C. J., & Silberschmidt, V. V. (2022). Stability and mechanical performance of collagen films under different environmental conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 197, 109853. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109853>.

- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy*, 214(4), 516-559. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>.
- Bramanti, E., Bonaccorsi, L., Campanella, B., Ferrari, C., Malara, A., & Freni, A. (2022). Structural characterization of electrospun tetraethylortosilicate (TEOS)/Polyvinylpyrrolidone (PVP) microfibrils. *Materials Chemistry and Physics*, 287, 126248. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126248>.
- Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in immunology*, 32(8), 350-357. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>.
- Brincat, M., Muscat Baron, Y., & Galea, R. (2005). Estrogens and the skin. *Climacteric*, 8(2), 110-123. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/13697130500118100>.
- Broughton, I. (2006). G., Janis, JE, Attinger, CE, 2006. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg*, 117(7 Suppl). Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>.
- Cao, H., Ma, X., Wei, Z., Tan, Y., Chen, S., Ye, T., . . . Yin, F. (2022). Behavior and mechanism of the adsorption of lead by an eco-friendly porous double-network hydrogel derived from keratin. *Chemosphere*, 289, 133086. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133086>.
- Castile, J. D., Taylor, K. M., & Buckton, G. (2001). The influence of incubation temperature and surfactant concentration on the interaction between dimyristoylphosphatidylcholine liposomes and poloxamer surfactants. *International journal of pharmaceuticals*, 221(1-2), 197-209. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00685-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00685-8).
- Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8), 821-833. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/bip.22486>.
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., . . . Pillai, S. R. (2016). Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1974. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>.
- Chebassier, N., Oujija, E. H., Viegas, I., & Dreno, B. (2004). Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration. *Acta dermato-venereologica*, 84(3). Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/00015550410025273>.

- Cherim, M., Mustafa, A., Cadar, E., Lupaşcu, N., Paris, S., & Sirbu, R. (2019). Collagen sources and areas of use. *European Journal of Medicine and Natural Sciences*, 2(2), 8-13. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.26417/ejis.v4i1.p122-128>.
- Chilakamarri, C. R., Mahmood, S., Saffe, S. N. B. M., Arifin, M. A. B., Gupta, A., Sikkandar, M. Y., . . . Narasaiah, B. (2021). Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech*, 11, 1-12. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02734-7>.
- Chong, S. Z., Evrard, M., & Ng, L. G. (2013). Lights, camera, and action: vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens. *Frontiers in Immunology*, 4, 286. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00286>.
- Classics Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Coulombe, P. A., & Omary, M. B. (2002). ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology*, 14(1), 110-122. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(01\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(01)00301-5).
- Dai, C., Shih, S., & Khachemoune, A. (2020). Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(6), 639-648. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>.
- Demirci, S., Doğan, A., Aydın, S., Dülger, E. Ç., & Şahin, F. (2016). Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Molecular and cellular biochemistry*, 417, 119-133. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2719-9>.
- Derkus, B., Arslan, Y. E., Bayrac, A. T., Kantarcioglu, I., Emregul, K. C., & Emregul, E. (2016). Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 725-736. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.095>.
- Dhinasekaran, D., Vimalraj, S., Rajendran, A. R., Saravanan, S., Purushothaman, B., & Subramaniam, B. (2021). Bio-inspired multifunctional collagen/electrospun bioactive glass membranes for bone tissue engineering applications. *Materials*

- Science and Engineering: C*, 126, 111856. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111856>.
- Doğan, A., Demirci, S., Bayir, Y., Halici, Z., Karakus, E., Aydın, A., . . . Karaman, A. (2014). Boron containing poly-(lactide-co-glycolide)(PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 246-253. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.035>.
- Ehrenreich, M., & Ruszczak, Z. (2006). Tissue-engineered temporary wound coverings. Important options for the clinician. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica et Adriatica*, 15(1), 5.
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617-625. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.010>.
- Eisenbarth, E. (2007). Biomaterials for tissue engineering. *Advanced Engineering Materials*, 9(12), 1051-1060. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1038/nbt0695-565>.
- Eke, G., Mangir, N., & Hasirci, N. (2017). 1: CAS: 528: DC% 2BC2sXkvVOmsLo% 3D: Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. vol. 129. *Biomaterials*, 188-198.
- Fan, C., Xu, Q., Hao, R., Wang, C., Que, Y., Chen, Y., . . . Chang, J. (2022). Multi-functional wound dressings based on silicate bioactive materials. *Biomaterials*, 287, 121652. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121652>.
- Fang, G., Wang, H., Bian, Z., Sun, J., Liu, A., Fang, H., . . . Wu, Z. (2018). Recent development of boronic acid-based fluorescent sensors. *RSC advances*, 8(51), 29400-29427. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C8RA04503H>.
- Ferlat, G., Charpentier, T., Seitsonen, A. P., Takada, A., Lazzeri, M., Cormier, L., . . . Mauri, F. (2008). Boroxol rings in liquid and vitreous B₂O₃ from first principles. *Physical review letters*, 101(6), 065504. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.065504>.
- Feroz, S., & Dias, G. (2021). Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked keratin/hydroxyapatite (HA) scaffold fabrication, characterization and in vitro biocompatibility assessment as a bone graft for alveolar bone regeneration. *Heliyon*, 7(11), e08294. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08294>.

- Fild, C., Shantz, D. F., Lobo, R. F., & Koller, H. (2000). Cation-induced transformation of boron-coordination in zeolites. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(13), 3091-3098. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/B002134M>.
- Frances, S. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev*, 1(1), 43-52. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(88\)80351-2](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(88)80351-2).
- Fujiwara, T., Kubo, T., Kanazawa, S., Shingaki, K., Taniguchi, M., Matsuzaki, S., . . . Hosokawa, K. (2013). Direct contact of fibroblasts with neuronal processes promotes differentiation to myofibroblasts and induces contraction of collagen matrix in vitro. *Wound Repair and Regeneration*, 21(4), 588-594. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/wrr.12059>.
- Gajbhiye, S., & Wairkar, S. (2022). Collagen fabricated delivery systems for wound healing: A new roadmap. *Biomaterials Advances*, 213152. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213152>.
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., Mielcarek, S., & Włodarczyk, D. (2017). Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298–670 K. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 468-471. Eriřim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.012>.
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in dermatology* (pp. 1-14). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*, 29(3), 153-162. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.
- Griffith, L. G. (2002). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1), 83-95. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03056.x>.
- Gu, L.-H., & Coulombe, P. A. (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current opinion in cell biology*, 19(1), 13-23. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.12.007>.
- Han, G. (2017). R. ceilly. *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*, 599r610. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- Hatamvand, R., Shams, A., Mohammadifar, E., Yari, A., & Adeli, M. (2019). Synthesis of boronic acid-functionalized poly (glycerol-oligoγ-butyrolactone): Nano-networks

- for efficient electrochemical sensing of biosystems. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 57(13), 1430-1439. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/pola.29406>.
- Henstock, J., Canham, L., & Anderson, S. (2015). Silicon: the evolution of its use in biomaterials. *Acta biomaterialia*, 11, 17-26. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.025>.
- Hiraishi, N., Sayed, M., Hill, R., Tagami, J., & Hayashi, F. (2021). Interactions of boron released from surface pre-reacted glass ionomer with enamel/dentin and its effect on pH. *Scientific Reports*, 11(1), 15734. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95279-x>
- Hu, B., Berkey, C., Feliciano, T., Chen, X., Li, Z., Chen, C., . . . Ni, R. (2020). Thermal-Disrupting Interface Mitigates Intercellular Cohesion Loss for Accurate Topical Antibacterial Therapy. *Advanced Materials*, 32(12), 1907030. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/adma.201907030>.
- Huang, S., & Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release*, 142(2), 149-159. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.018>.
- Huggenberger, R., & Detmar, M. (2011). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*,
- Islam, E., & Nebhani, L. (2021). Concerted effect of boron and porosity on shear thickening behavior of hybrid mesoporous silica dispersions. *Materials Today Chemistry*, 22, 100565. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100565>.
- Jinno, C., Morimoto, N., Ito, R., Sakamoto, M., Ogino, S., Taira, T., & Suzuki, S. (2016). A comparison of conventional collagen sponge and collagen-gelatin sponge in wound healing. *BioMed research international*, 2016. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1155/2016/4567146>.
- Kakkar, P., & Madhan, B. (2016). Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 66, 178-184. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.067>.
- 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. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>.

- Khajavi, R., Rahimi, M. K., Abbasipour, M., & Brendjchi, A. H. (2016). Antibacterial nanofibrous scaffolds with lowered cytotoxicity using keratin extracted from quail feathers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 31(1), 60-71. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1177/0883911515598793>.
- Kim, H. S., Sun, X., Lee, J.-H., Kim, H.-W., Fu, X., & Leong, K. W. (2019). Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 146, 209-239. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.014>.
- Kim, S. Y., Park, B. J., Lee, Y., Park, N. J., Park, K. M., Hwang, Y.-S., & Park, K. D. (2019). Human hair keratin-based hydrogels as dynamic matrices for facilitating wound healing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 73, 142-151. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.01.017>.
- Koller, H., Fild, C., & Lobo, R. F. (2005). Variable anchoring of boron in zeolite beta. *Microporous and mesoporous materials*, 79(1-3), 215-224. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2004.10.035>.
- Korniłowicz-Kowalska, T., & Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste management*, 31(8), 1689-1701. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>.
- Krieg, T., Müller, W., Roers, A., Lucas, S. A. T., Waisman, A., Ranjan, R., & Roes, J. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>.
- Lazarus, B. S., Chadha, C., Velasco-Hogan, A., Barbosa, J. D., Jasiuk, I., & Meyers, M. A. (2021). Engineering with keratin: A functional material and a source of bioinspiration. *Iscience*, 24(8), 102798.
- León-Mancilla, B., Araiza-Téllez, M., Flores-Flores, J., & Piña-Barba, M. (2016). Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of applied research and technology*, 14(1), 77-85. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>.
- Levin, R., Grinstein, S., & Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological reviews*, 273(1), 156-179. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/imr.12439>.

- Lin, H.-Y., Chen, S.-H., Chang, S.-H., & Huang, S.-T. (2015). Tri-layered chitosan scaffold as a potential skin substitute. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(13), 855-867. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1061350>.
- Lin, Y.-F., & Kuo, J.-W. (2016). Mesoporous bis (trimethoxysilyl) hexane (BTMSH)/tetraethyl orthosilicate (TEOS)-based hybrid silica aerogel membranes for CO₂ capture. *Chemical Engineering Journal*, 300, 29-35. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.119>.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P., & Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental cell research*, 313(10), 2021-2032. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.005>.
- Malafaya, P., Silva, G., & Reis, R. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Del Rev* 59 (4–5): 207–233. In.
- Mangir, N. i., Dikici, S., Claeysens, F., & MacNeil, S. (2019). Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(7), 3190-3200. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00172>.
- Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in wound healing. *Bioengineering*, 8(5), 63. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
- McGowan, K. M., & Coulombe, P. A. (2000). Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype. *Journal of investigative dermatology*, 114(6), 1101-1107. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00986.x>.
- Merad, M., Ginhoux, F., & Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 935-947. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1038/nri2455>
- Moore, G. R. P., Martelli, S. M., Gandolfo, C., do Amaral Sobral, P. J., & Laurindo, J. B. (2006). Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 975-982. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.11.001>.

- Mori, H., & Hara, M. (2018). Transparent biocompatible wool keratin film prepared by mechanical compression of porous keratin hydrogel. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 19-25. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.021>.
- Naseri, E., & Ahmadi, A. (2022). A review on wound dressings: Antimicrobial agents, biomaterials, fabrication techniques, and stimuli-responsive drug release. *European Polymer Journal*, 111293. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111293>.
- Nishinari, K., & Takahashi, R. (2003). Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(4-5), 396-400. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00099-2).
- Nzietchueng, R. M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet, P., & Hess, K. (2002). Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 16(4), 239-244. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80051-7).
- O'Leary, L., & Fallas, J. (2011). Bakota EL Kang MK Hartgerink JD Nat. *Chem*, 3, 821-828.
- Oh, J.-S., & Lee, E.-J. (2019). Engineered dressing of hybrid chitosan-silica for effective delivery of keratin growth factor and acceleration of wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109815. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109815>.
- Özen, N., Özbaş, Z., Izbudak, B., Emik, S., Özkahraman, B., & Bal-Öztürk, A. (2022). Boric acid-impregnated silk fibroin/gelatin/hyaluronic acid-based films for improving the wound healing process. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(9), 51715. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/app.51715>.
- Park, J. U., Jung, H. D., Song, E. H., Choi, T. H., Kim, H. E., Song, J., & Kim, S. (2017). The accelerating effect of chitosan-silica hybrid dressing materials on the early phase of wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(7), 1828-1839. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33711>.
- Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37(5), 272-281. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.272>.

- Prasathkumar, M., & Sadhasivam, S. (2021). Chitosan/Hyaluronic acid/Alginate and an assorted polymers loaded with honey, plant, and marine compounds for progressive wound healing—Know-how. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 656-685. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.067>.
- Quignard, S., Coradin, T., Powell, J. J., & Jugdaohsingh, R. (2017). Silica nanoparticles as sources of silicic acid favoring wound healing in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 530-537. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.049>.
- Ramanathan, G., Singaravelu, S., Muthukumar, T., Thyagarajan, S., Perumal, P. T., & Sivagnanam, U. T. (2017). Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 72, 359-370. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.095>.
- Ranjit, E., Hamlet, S., George, R., Sharma, A., & Love, R. M. (2022). Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7(1), 100398. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.10.001>.
- Reinke, J., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European surgical research*, 49(1), 35-43. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/app.47738>.
- Riemer, D., & Weber, K. (1998). Common and variant properties of intermediate filament proteins from lower chordates and vertebrates; two proteins from the tunicate *Styela* and the identification of a type III homologue. *Journal of cell science*, 111(19), 2967-2975. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1242/jcs.111.19.2967>.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>.
- Rosenbaum, A. J., Banerjee, S., Rezak, K. M., & Uhl, R. L. (2018). Advances in wound management. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 26(23), 833-843. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-17-00024>.

- Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2), 999-1014. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/ma3020999>.
- Ruszczak, Z. (2003). Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1595-1611. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.003>.
- Sandhu, S. V., Gupta, S., Bansal, H., & Singla, K. (2012). Collagen in health and disease. *Journal of Orofacial research*, 153-159. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10026-1032>.
- Saska, S., Teixeira, L. N., de Oliveira, P. T., Gaspar, A. M. M., Ribeiro, S. J. L., Messaddeq, Y., & Marchetto, R. (2012). Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*, 22(41), 22102-22112. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C2JM33762B>.
- Savencu, I., Iurian, S., Porfire, A., Bogdan, C., & Tomuța, I. (2021). Review of advances in polymeric wound dressing films. *Reactive and Functional Polymers*, 168, 105059. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>.
- Selig, H. F., Lumenta, D. B., Giretzlehner, M., Jeschke, M. G., Upton, D., & Kamolz, L. P. (2012). The properties of an “ideal” burn wound dressing—what do we need in daily clinical practice? Results of a worldwide online survey among burn care specialists. *Burns*, 38(7), 960-966. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.04.007>.
- Sharma, S., Rai, V. K., Narang, R. K., & Markandeywar, T. S. (2022). Collagen-based formulations for wound healing: A literature review. *Life sciences*, 290, 120096. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120096>.
- Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., & Bekhit, A. E.-D. A. (2017). Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials science*, 5(9), 1699-1735. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C7BM00411G>.
- Silva, R., Singh, R., Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Juhasz, J. A., Roether, J. A., . . . Chrissafis, K. (2014). Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(33), 5441-5451. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C4TB00776J>.
- Singh, R., Foroutan, F., Alqaysi, M., & Han, C. (2016). Sol-gel Based Materials for Biomedical Applications Biomimetic approaches in the development of scaffolds for

- bone repair and regeneration. *J. Prog. Mater. Sci*, 77, 1-79. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001>.
- Singh, V., Marimuthu, T., Makatini, M. M., & Choonara, Y. E. (2022). Biopolymer-Based Wound Dressings with Biochemical Cues for Cell-Instructive Wound Repair. *Polymers*, 14(24), 5371. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/polym14245371>.
- Siqueira, R. L., Yoshida, I. V. P., Pardini, L. C., & Schiavon, M. A. (2007). Poly (borosiloxanes) as precursors for carbon fiber ceramic matrix composites. *Materials Research*, 10, 147-151. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000200009>.
- Skobe, M., & Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Smith, L. T., & Holbrook, K. A. (1986). Embryogenesis of the dermis in human skin. *Pediatric dermatology*, 3(4), 271-280. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.1986.tb00525.x>.
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., & Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug design, development and therapy*, 3117-3145. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>.
- Steinlage, S. J. T., Sander, J. E., Brown, T. P., Lobsinger, C. M., Thayer, S. G., & Martinez, A. (2003). Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets. *Avian Diseases*, 47(1), 229-233. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2003\)047\[0229:DMILCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0229:DMILCA]2.0.CO;2).
- Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F. (2021). A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(6), 1027-1037. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1751585>.
- Sulaimon, S. S., & Kitchell, B. E. (2003). The biology of melanocytes. *Veterinary dermatology*, 14(2), 57-65. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2003.00327.x>.
- Sumiyoshi, H., Okamura, Y., Kawaguchi, A. T., Kubota, T., Endo, H., Yanagawa, T., . . . Inagaki, Y. (2021). External administration of moon jellyfish collagen solution accelerates physiological wound healing and improves delayed wound closure in

- diabetic model mice. *Regenerative Therapy*, 18, 223-230. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.06.008>.
- Sun, L., Li, B., Jiang, D., & Hou, H. (2017). Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 89-96. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.061>.
- Sun, L., Li, L., Wang, Y., Li, M., Xu, S., & Zhang, C. (2022). A collagen-based bi-layered composite dressing for accelerated wound healing. *Journal of Tissue Viability*, 31(1), 180-189. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2021.09.003>.
- Tan, B. Y., Nguyen, L. T., & Ng, K. W. (2022). Development of a mechanically stable human hair keratin film for cell culture. *Materials Today Communications*, 30, 103049. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.103049>.
- Tepedelen, B. E., Soya, E., & Korkmaz, M. (2016). Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological trace element research*, 174, 309-318. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0729-9>.
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Leavesley, D., & Parker, T. (2017). Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 956. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/ijms18050956>.
- Tonin, C., Zoccola, M., Aluigi, A., Varesano, A., Montarsolo, A., Vineis, C., & Zimbardi, F. (2006). Study on the conversion of wool keratin by steam explosion. *Biomacromolecules*, 7(12), 3499-3504. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1021/bm060597w>.
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of polymer science Part B: polymer physics*, 49(12), 832-864. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/polb.22259>.
- Walsh, C. T., Sandstead, H. H., Prasad, A. d. S., Newberne, P. M., & Fraker, P. J. (1994). Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 2), 5-46. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1289/ehp.941025>.
- Wang, J., Gao, H., Qin, C., Zhao, Z., Yuan, H., Wei, J., & Nie, Y. (2022). Experimental and theoretical study on the extraction of keratin from human hair using protic ionic

- liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 368, 120626. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120626>.
- Wang, J., Hao, S., Luo, T., Cheng, Z., Li, W., Gao, F., . . . Wang, B. (2017). Feather keratin hydrogel for wound repair: preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 341-350. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.
- Wang, Q. Q., Zhang, L., Wang, Q. Q., Liu, J., Zhu, P., & Jiang, Z. N. (2018). Sodium sulphide extraction of human keratin. *Ferroelectrics*, 529(1), 105-112. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1080/00150193.2018.1458507>.
- Wang, S., Hou, W., Wei, L., Jia, H., Liu, X., & Xu, B. (2007). Antibacterial activity of nano-SiO₂ antibacterial agent grafted on wool surface. *Surface and Coatings Technology*, 202(3), 460-465. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.06.012>.
- Wang, Y., Ji, J.-Y., Guo, K., Zhang, T., Zhong, X.-C., Zhuang, Z.-M., . . . Chen, J. (2023). Gene liposome nanocomplex-loaded dermal substitute promotes diabetic chronic wound healing and angiogenesis in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 163, 114794. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114794>.
- Wang, Y., Zhang, W., Yuan, J., & Shen, J. (2016). Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 30-34. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.093>.
- Wu, S.-H., Hung, Y., & Mou, C.-Y. (2011). Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers. *Chemical Communications*, 47(36), 9972-9985. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1039/C1CC11760B>.
- Wu, X., Zhu, H., Xu, Y., Kong, B., & Tan, Q. (2022). Chronic wounds: pathological characteristics and their stem cell-based therapies. *Engineered Regeneration*. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.11.004>.
- Xu, S., Sang, L., Zhang, Y., Wang, X., & Li, X. (2013). Biological evaluation of human hair keratin scaffolds for skin wound repair and regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 33(2), 648-655. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.10.011>.
- Xu, Y., Wu, D., Sun, Y., Chen, W., Yuan, H., Deng, F., & Wu, Z. (2007). Effect of polyvinylpyrrolidone on the ammonia-catalyzed sol-gel process of TEOS: Study by in situ ²⁹Si NMR, scattering, and rheology. *Colloids and Surfaces A:*

- Physicochemical and Engineering Aspects*, 305(1-3), 97-104. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.04.047>.
- Yang, C., Zhang, Y., Tang, P., Zheng, T., Zhang, X., Zhang, Y., & Li, G. (2022). Collagen-based hydrogels cross-linked via laccase-mediated system incorporated with Fe³⁺ for wound dressing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 219, 112825. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112825>.
- Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., & Gu, X. (2007). Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials*, 28(9), 1643-1652. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.004>.
- Ye, W., Qin, M., Qiu, R., & Li, J. (2022). Keratin-based wound dressings: From waste to wealth. *International Journal of Biological Macromolecules*. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.216>.
- Yeung, D. A., & Kelly, N. H. (2021). The role of collagen-based biomaterials in chronic wound healing and sports medicine applications. *Bioengineering*, 8(1), 8. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8010008>.
- Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(16), 2784-2794. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>.
- Yousefi, M., Ariffin, F., & Huda, N. (2017). An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 63, 372-382. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.029>.
- Zdravkov, B., Čermák, J., Janků, J., Kučerová, V., & Šefara, M. (2008). Pore classification in the characterization of porous materials. *Chemické listy*, 102(6). Erişim Adresi: <https://doi.org/10.2478/s11532-007-0017-9>.
- Zhang, M., Xu, S., Du, C., Wang, R., Han, C., Che, Y., . . . Zhao, W. (2023). Novel PLCL nanofibrous/keratin hydrogel bilayer wound dressing for skin wound repair. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113119. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113119>.
- Zhao, K., Tian, X., Xing, J., Huang, N., Zhang, H., Zhao, H., & Wang, W. (2022). Tunable mechanical behavior of collagen-based films: A comparison of celluloses in different geometries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 214, 120-127. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.191>.

Zheng, B.-D., Ye, J., Yang, Y.-C., Huang, Y.-Y., & Xiao, M.-T. (2022). Self-healing polysaccharide-based injectable hydrogels with antibacterial activity for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 275, 118770. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118770>.

Zirak Hassan Kiadeh, S., Ghaee, A., Mashak, A., & Mohammadnejad, J. (2017). Preparation of chitosan–silica/PCL composite membrane as wound dressing with enhanced cell attachment. *Polymers for Advanced Technologies*, 28(11), 1396-1408. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1002/pat.4016>.

