



Deri ikamesi için gözenekli bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu

Production and characterization of porous bacterial cellulose for skin substitution

Doruk Deniz İlmenöz¹, Zalıke Keskin Erdoğan², Elif Esin Hameş^{*1,3}

¹ Biyomedikal Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

² Biomaterials and Tissue Engineering Division, Eastman Dental Institute, University College London, London, UK

³ Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author *: esin.hames@ege.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 23.08.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 02.11.2022

Atıf şekli/How to cite: İLMENÖZ, D.D., KESKİN ERDOĞAN, Z., HAMEŞ, E.E. (2023) Deri ikamesi için gözenekli bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. DEUFMD, 25(74), 263-274.

Araştırma Makalesi/Research Article

DOI:10.21205/deufmd.2023257401

Öz

Bakteriyel selüloz (BS), biyoyumlu, üretimi kolay, yüksek çekme dayanımı gösteren, nanofibril ağ yapısı ile yüksek su tutma özelliğinde olan ve bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal bir polimerdir. Medikal uygulamalar için iyi bir aday olan BS, membran yapısı nedeniyle deri ikamesi çalışmalarında geliştirilebilir bir potansiyel taşımaktadır. Ancak, sıkı yapıdaki selüloz nanofibrilleri hücre tutunması ve göçüne imkân vermemektedir. Bu çalışma kapsamında deri ikamesi olarak kullanılacak yeterli gözenek çapına sahip BS'nin *in situ* üretimi, keratin ile modifikasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Gluconacetobacter xylinus ATCC 700178 suşu kullanılarak iki farklı yöntemle (agar parçalama ve agar damlatma) selüloz nanofibrilleri arasındaki gözenek çapı artırılarak üretilen BS daha sonra derinin önemli bir bileşeni olan keratin ile modifiye edilmiştir. Keratin kaynağı olarak insan saçları kullanılmış ve Shindai özütlemesi ile keratin elde edilmiştir. Keratin çözeltisi BS membranlara emdirilerek malzemenin karakterizasyonu FTIR (Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi), SEM (Taramalı elektron mikroskobu) ve mekanik çekme dayanımı testleri ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, artırılmış gözenek çapına sahip (>100µm) yapısında keratin bulunduran ve 0,1- 0,15 MPa aralığında maksimum çekme dayanımı gösteren, deri ikame adayı olabilecek BS üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, keratin, deri, biyokompozit malzemeler

Abstract

Bacterial cellulose (BC), is a natural polymer produced by certain microorganisms, which is biocompatible, easy to manufacture, has high tensile strength, and has high water retention with its nanofibril network structure. BC is a good candidate for medical applications, and also has potential in skin substitution studies thanks to its membrane structure. However, its tight cellulose nanofibers do not allow cell attachment and migration. In this study, *in situ* keratin modified production, and characterization of BC with sufficient pore diameters that can be potential skin substitute was aimed.

BC has been produced by *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 strain using two different methods (agar shredding and agar dropping) to increase the pore diameter between cellulose nanofibrils using and modified with keratin as an important component of the skin. Human hair was used as the source of keratin and keratin was obtained according to the Shindai extraction method. Keratin solution was impregnated with BC membranes and the characterization of the material was carried out by FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry), SEM (Scanning Electron Microscope) and physical strength tests. As a result, the production of skin replacement candidate BC, containing keratin in its structure with sufficient pore diameter (>100µm) with a tensile strength of the range between 0.1- 0.15 MPa, was produced successfully.

Keywords: Bacterial cellulose, keratin, skin, biocomposite materials

1. Giriş

Yanık vakalarında, en sık tedavi biçimi hastanın kendisinden alınan deri tabakasının hasarlanmış bölgeye yama olarak uygulanmasıdır. Ancak hastadan her zaman yeterli kalite ve büyüklükte deri elde edilemediğinde, bu tedavi bazı durumlarda uygun olmamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yılda yaklaşık 180 bin kişi yanık sebebiyle hayatını kaybetmektedir. 2008 yılında Amerika'da 480 bini aşkın yanık vakası rapor edilmiş ve hastalardan 40 bini hastaneye yatırılmıştır. Derinin yaklaşık %60'nun yandığı durumlarda iyileşme tam olarak gerçekleşmediği için hastaların hayatını kaybetme oranlarının yüksek olduğu görülmektedir [1,2,3]. Ticari deri ikamelerinin çoğunluğu, canlı hücrelerle (hastanın deri hücreleri veya fare hücreleri) birlikte kullanılması gereken ürünlerdir. Bu sebeple üretim ve bakım maliyetleri geleneksel tedavilere göre yüksektir. Ayrıca mevcut yapay deri ikameleri siğir ve domuz kolajeni (Integra, TransCyte™), fare hücreleri (Epicel™), naylon nanofiberler (BioBrane™) gibi alerjik reaksiyona yol açabilecek bileşenler içermektedir. Hücrelerinden arındırılmış kadavra derisi (GammaGraft™, GraftJacket™) içeren bir diğer ürün grubu ise her zaman patojen riski taşımaktadır. Kolajen içeren yapay deri ikameleri hariç diğer ticarileşmiş ürünler neovaskülarizasyonu desteklememektedir. Geleneksel deri nakli tedavisine göre yüksek maliyet, alerjen içerik, neovaskülarizasyonun desteklenmemesi ve patojen taşıma riski, piyasadaki deri ikamelerinin kullanımını sınırlamaktadır [4]. Bu durum yeni deri ikamelerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır.

Temel üreticisi bitkiler olan selülozun, mikroorganizmalar tarafından üretilen formu olan bakteriyel selüloz (BS), bitkisel selülozla aynı kimyasal formüle sahip olmasına rağmen,

taşıdığı farklı fiziksel özellikler ve kimyasal saflığı ile son yıllarda biyomedikal ve hücre-doku kültürü tekniklerinin ilerlemesi sayesinde özellikle medikal alanda ön plana çıkmaktadır [5,6]. β (1-4) bağları ile tekrarlı olarak birbirine bağlanan glukopiranoz (C₆H₁₀O₅)_n formülüne sahip BS, lineer bir kimyasal yapı gösterir. BS'nin sahip olduğu fiziksel özellikler, görece yüksek ısı ve mekanik dayanım, yüksek su tutma kapasitesi, lineer bağlanma yapısının bitkilerdeki gibi lignin ve pektin gibi yapılarla kesintiye uğramamasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında yaygın olarak *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) olmak üzere, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Sarcina* ve *Rhizobium* türleri tarafından sentezlenebilen BS, hücre dışı bir polimerdir [7,8]. *G. xylinus* ile yüksek verimli ve üretimi görece kolay BS üretimi yapılabilmektedir. Organizmanın patojen olmaması, meyve ve meyve ürünlerinde bulunması ve Doğu Asya ülkelerinde gıda ürünlerinde kullanılması, *Gluconacetobacter* suşlarını özellikle medikal amaçlı üretimlerde kullanılabilir yapmaktadır [9]. BS, statik kültürde besiyeri içerisinde sıvı-hava yüzeyinde üretilir ve kültür kabının yüzey alanı büyüklüğünde ve şeklinde BS membranı elde edilir. Farklı amaçlara yönelik olarak yapılan çalkalamalı kültürasyon şartlarında ise BS, membran şeklinde değil pellet şeklinde de üretilmektedir [10]. BS; *i.* yüksek saflıkta nanofibril ağ yapısı (<120nm), [11, 12], *ii.* yüksek kristalinite (%70-80) ve polimerizasyon derecesi, *iii.* yüksek su emme ve tutma kapasitesi (>%99), *iv.* çok fazla sayıda molekül içi ve arası hidrojen bağı ile kararlı yapısı, *v.* yüksek çekme kuvveti, *vi.* toksik olmayan yapısı sebebiyle yüksek biyouyumluluğu, *vii.* katlandığında şeklini koruyabilen ve esnek yapısı, *viii.* karbohidrat yapıda olmasıyla büyük oranda non-immunojenik olması ve *ix.* gerek

üretim esnasında gerekse üretim sonrasında modifikasyonlara uygun olması nedeniyle medikal alanda ilgi çeken bir biyomalzemedir. Modifikasyonlar sayesinde BS'nin mevcut özellikleri istenen amaca göre iyileştirilebilir [13,14,15]. BS hidrojel yapısında bir biyopolimer olduğu için diğer bileşikler ile modifiye edilebilir. Yapılan çalışmalara bakıldığında gerek kimyasal gerek fiziksel özelliklerinin amaca uygun olarak değiştirildiği/geliştirildiği birçok çalışma bulunmaktadır [6]. Antimikrobiyal özellik kazandırılması [16,17], hücre büyümesinin artırılması, hücre dışı matrisin taklit edilerek (kollajen, elastin ve hyaluronan eklenmesiyle) hücre proliferasyonunun artırılması [18,19,20,21], ilaç salım sistemlerinde kullanımı [22,23] örnek olarak verilebilir.

Daha önceki çalışmalar, modifiye edilmemiş BS filmlerinin çekme dayanımı, kopma uzaması ve Young modülü gibi mekanik özelliklerinin kültür koşulları, kurutma koşulları ve bakteri suşu gibi birçok faktöre bağlı olarak sırasıyla 70-300 MPa, %0,5-5 ve 5-17 GPa arasında değişebilir olduğunu göstermektedir [24]. Farklı suşlarla üretilmiş veya yapısı modifiye edilerek işlem uygulanmış BS membranlarının ise daha düşük çekme dayanımları gösterebildiği de önceki çalışmalardan bilinmektedir [25].

BS sahip olduğu biyoyumluluk ve yüksek su tutma kapasitesi nedeni ile plastik cerrahi ve özellikle de yanık tedavisinde araştırılan bir malzemedir [26]. Bu alanda kullanım için statik kültürden elde edilen BS membranı steril edilebilir, biyolojik olarak uyumlu, elastik, kullanımı ve saklaması kolay, salgıları emebilen ve gerekli nemi sağlayabilen yapıdadır. Ayrıca düşük maliyetli üretimi, nanofiber ağ yapısı ve kültür koşulları ile ayarlanabilir kalınlığı ilave avantajlarıdır [6,15]. Yara üzerine örtü olarak kullanıldığında dokuyu ikincil enfeksiyonlardan ve mekanik yaralanmalardan korumasının yanında klinik denemelerle de iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir [26,27]. Ancak doğal BS'nin sahip olduğu gözenek yapısının hücre göçüne ve neovaskülarizasyona uygun şekilde artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada istenilen büyüklük ve şekilde hazırlanabilen, biyoyumlu, deri gibi bariyer işlevi görebilecek, içerdiği keratin sayesinde deri fibroblast hücrelerini destekleyen, neovaskülarizasyon ve hücre göçüne uygun gözenek yapısında BS üretimi hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Aşı kültürü hazırlanması

BS üretiminde *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 suşu ve Hestrin & Schramm besiyeri (H&S) [glukoz 20 gr, Na₂HPO₄ 2,7 gr, bakto pepton 5 gr, maya özütü 5 gr, sitrik asit 1,15 gr, destile su 1000 ml (pH 5,0)] kullanılmıştır [28]. İlk aşamada *G. xylinus* stok (-20°C) çözeltiden 10 ml H&S içeren tüplere inokule edilmiş ve 5 gün 30°C'de kültüvasyona bırakılmıştır. Ardından, aşı kültürünün hazırlanması için 100 ml H&S besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere, aktiveleştirilen kültürden inokulasyon yapılmış ve 30°C'de 24-36 saat boyunca 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Aşı kültür her üretim öncesi hazırlanmış ve üretim besiyerine %2 v/v oranında inokulasyon yapılmıştır.

2.2. Agar partiküllerinin oluşturulması

Malzemenin hücre göçüne ve neovaskülarizasyona izin verecek şekilde gözenek çapı ve sayısının artırılmasında BS üretim besiyerine eklenmek üzere agar partikülleri, agar parçalama [29] ve agar damlatma şeklinde elde edilerek kullanılmıştır.

Agar parçalama yönteminde %2 w/v oranında agar H&S besiyeri içerisinde hazırlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Ardından yaklaşık 50-60°C'ye soğuduğunda içerisine katılacağı kadar steril hava basılmıştır. Burada amaç, katılaşmakta olan agarın içerisine havanın hapsedilmesini sağlamak ve daha sonra parçalanarak partikül haline getirildiğinde içerisine hapsolmuş hava kabarcıkları sayesinde partiküllerin sıvı ortamda yüzeyde kalmasını sağlamaktır. Agarın soğuyarak tamamen katılaşmasının ardından steril blender (blendır çalışma modu 300 rpm'de her 60 saniyede (sn) 15 sn dinlendirme ile 3 tekrarlı) ile parçalanmış ve üretim yapılacak erlenlere ilave edilmiştir.

Agar damlatma yönteminde ise benzer şekilde %2 w/v oranında agar, H&S besiyeri içerisinde hazırlanmış ve otoklavda steril hale getirilmiştir. Ardından sıcak agar çözeltisi (~80°C) şırıngaya alınarak soğuk steril H&S besiyerine aseptik koşullarda damlatılarak agar partikülleri oluşturulmuş ve üretim yapılacak erlenlere ilave edilmiştir.

2.3. *In situ* gözenekli BS üretimi

Statik kültürde uygun besin ve sıcaklık şartlarında mikroorganizma tarafından besiyerinin sıvı-hava ara yüzeyinde (Şekil 1) BS

üretilmektedir. Her bir mikroorganizma tarafından hücre dışına salgılanan çok ince selüloz nanofiberleri hücre dışında birleşerek sıkı bir ağ yapısı oluşturmaktadır.



Şekil 1. H&S besiyerinin sıvı-hava ara yüzeyinde üretilmiş BS membranın görünümü.

Figure 1. Appearance of the BC membrane produced at the liquid-air interface of the H&S medium.

Çalışmada, mikroorganizma tarafından selüloz fibrilleri üretilirken diğer deyişle BS membranı oluşturulurken gözenekli şekilde *in situ* BS üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Bayır ve ark. (2019) [29] tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. İki farklı yöntem ve kontrol için deney düzeneği kurulmuştur.

Yöntem I: 250 ml'lik erlenlerde 100 ml çalışma hacminde H&S besiyeri içerisine önceden agar parçalama ve agar damlatma yöntemleri ile hazırlanmış steril agar partikülleri 5 w/v oranında ilave edilmiş ardından aşı kültürü %2 v/v oranında inokule edilerek erlenler statik kültürde 30°C'de 5-6 gün inkübe edilmiştir.

Yöntem II: 250 ml'lik erlenlerde 100 ml çalışma hacminde H&S besiyeri hazırlanmış ancak bu yöntemde besiyerine %0,1-0,3 w/v agar ilave edilerek besiyerinin viskozitesi arttırılmıştır [29]. Ardından Yöntem I'deki gibi önceden agar parçalama ve agar damlatma yöntemleri ile hazırlanmış agar partikülleri besiyerine ilave edilerek (%5 w/v) aşı kültürü ile %2 v/v oranında aşılanmış ve statik kültürde 30°C'de 5-6 gün inkübe edilmiştir.

Üretim inkübasyonu sonlandırıldıktan sonra BS membranlar hasat edilmiştir. Kontrol grubunda BS üretimi agar partikülü içermeyen H&S besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4. BS membranların temizlenmesi

BS, üretim ortamından uzaklaştırıldığında besin ortamıyla aynı renktedir. Besiyeri artıklarından, mikrobiyal hücre kalıntılarında ve agar partiküllerinden arındırılması için BS membranların temizlenmesinde yaygın olarak kullanılan seyreltilmiş NaOH alkali çözeltisi ile kaynatma ve destile su ile durulama işlemi

uygulanmıştır. Bunun için BS membranlar 0,1 M NaOH alkali çözeltisi ile 60-90 °C arasında 3-4 saate kadar bekletmenin ardından destile su ile kaynatılarak durulama işlemi gerçekleştirilmiştir [32]. BS üretilirken içerisine hapsolan agar partikülleri yüksek ısı içeren bu temizleme işlemi ile eriyerek malzemeden uzaklaşmış ve böylece BS fibrilleri arasında boşlukların temizlenerek gözeneklerin oluşması sağlanmıştır.

2.5. Keratin çözeltisi (Shindai özütlemesi)

İzmir'de kuaförlerden boyasız ve ağarmamış saçlar etik kurul onayı ile [Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul (13-12.1/12)] toplanmış ve %0,5 sodyum dodesil sülfat ile yıkanarak destile su içerisinde bekletilmiştir. Ardından geriye kalan lipidleri uzaklaştırmak için saçlar n-hegzan içerisinde 12 saat boyunca çeker ocak içerisinde bekletilmiştir. N-Hegzan içinden alınan örnekler bir süre çeker ocakta bekletilip kurutulduktan sonra, önce makasla küçük parçalara ayrılmış ardından 26000 devirde (1 devir/sn) bilyalı değirmende toz haline getirilmiştir. Toz halindeki 20 g saç, 400 ml özütleme çözeltisi (25 mM Tris (pH: 8,5), 2,6 M tiyoüre, 5M üre ve %5 v/v 2-β- merkaptotanol) içerisine alınarak, 50 °C'de 72 saat bekletilmiştir. Ardından 4500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek üst sıvı alınmış ve filtre (2,5 µm) edilmiştir. Elde edilen keratin çözeltisi 1:50 oranında destile su ile MWCO (Molecular Weight Cut Off) 6-8 kDa olan diyaliz membran kullanılarak 10 gün 25°C'de diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyu her 12 saatte bir değiştirilerek pH kontrolü ile keratin çözeltisinde hiçbir tuz kalmayınca kadar tekrarlanmıştır. Son aşamada kalan partiküllerin uzaklaştırılması için 9000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiş kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır [30,31].

2.6. Keratin yükleme

Temizlendikten sonra kesilen (~2 cm²) ve 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilen ıslak BS membranlar laminar akışlı kabinde aseptik şartlar altında absorbladığı suyun bir kısmı filtre kâğıdı yardımıyla alınmış ve keratin çözeltisi 6 farklı noktadan 1 ml (0,3 mg) hacimde BS membranlarının üzerine damlatılarak emdirilmiştir [32].

2.7. Karakterizasyon Testleri

2.7.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Malzemelerin hazırlanmasında numuneler - 50°C'de 0,042 mbar vakum altında liyofilizatörde (dry-freeze; LABCONCO) kurutulmuş ardından, Leica EM ACE600 kaplama cihazı ile %80 altın ve %20 palladyum ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra SEM (Thermo Scientific Apreo S) ile görüntü ve ölçümler alınmıştır.

2.7.2. Mekanik analiz

Mekanik analizler 37°C'de TA Instruments Q800 TA Instruments Q800 DMA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve malzemelerin çekme dayanımı ölçülmüştür. BS mekanik dayanımı üzerinde etkili olan gözeneklilik için denemeler yapılmıştır. Hidrojel yapısında olan örneklerin kalınlığı dijital kaliper yardımıyla ölçülerek ortalama $1,3 \pm 0,27$ mm oldukları belirlenmiştir. Örnekler cihazın çenelerine yerleştirilmiş sıkıştırma nedeniyle kopma gerçekleşmeden sağlıklı şekilde alınan ölçümler ile TA Instruments Universal Analysis Software kullanılarak ortalama kalınlık değeri üzerinden stress-strain grafiği çizilmiştir.

2.7.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR)

Liyofilize örneklerin analizi, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum Two, FTIR Spektrofotometre, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. $600-4000 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede taramalar elde edilmiş ve ilgili bölgeyi yansıtan 2500-500 aralığı grafikte çizilmiştir. Örneklerde amid gruplarının varlığı incelenmiş ve kontrol örnekleri ile korelasyonu Spectrum programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. FTIR spektrumu ham veri analizi OriginPro 2021 programı ile yapılmıştır.

Tüm karakterizasyon testleri Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Arş. Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

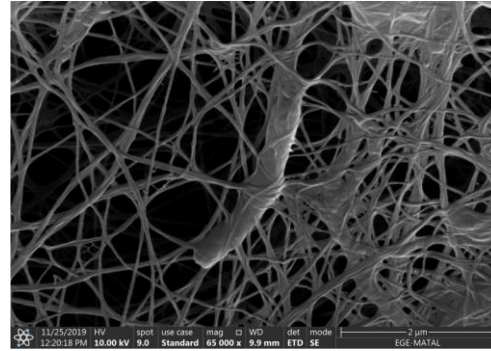
3. Bulgular

3.1. *In situ* gözenekli BS üretimi ve keratin yüklenme

Üretim sonrası SEM görüntüsü alınan BS membranının nanofibril ağ yapısı ve bakteri hücrelerinden dış ortama çıkan selüloz fibrillerinin SEM görünümü Şekil 2'de gösterilmiştir. Gözenek boyutu ve sayısı artırılmış BS membranların üretim sonrası ve temizleme sonrası makro görünimleri ise Şekil 3'te sunulmuştur.

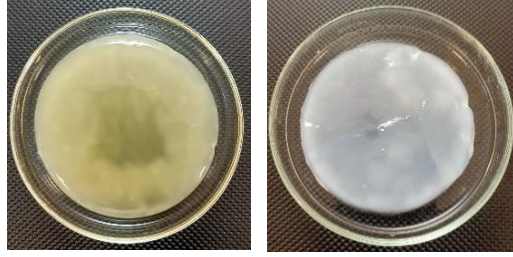
Üretim sırasında kullanılan agar partikülleri karşılaştırıldığında damlatma yönteminde küresel ve boyutları birbirine yakın agar partiküllerinin elde edilebildiği belirlenmiştir.

Birinci yöntemde agar partikülleri besiyerinde çökeltme gösterdiğinden sıvı hava ara yüzeyinde BS üretimine herhangi bir girişim sağlanamamış ve gözenek arttırıcı etki göstermemiştir. Buna karşın besiyerinin viskozitesinin arttırıldığı ikinci yöntemde agar partiküllerinin sıvı besiyerinin sıvı-hava ara yüzeyinde toplanması konusunda besiyerine %0,3 w/v oranında agar ilavesi başarılı sonuç vermiştir ve BS'nin gözenek çapı arttırılmıştır. Agar parçalama ve agar damlatma ile elde edilen agar partikülleri ile yapılan BS üretim sonucunda aynı sürede yakın kalınlıklarda BS membranları elde edilmiştir. Ardından Shindai özütlemesi ile insan saçından elde edilen çözünür keratin (0,3mg/ml) temizlenen gözenekli BS membranlara emdirilmiştir.



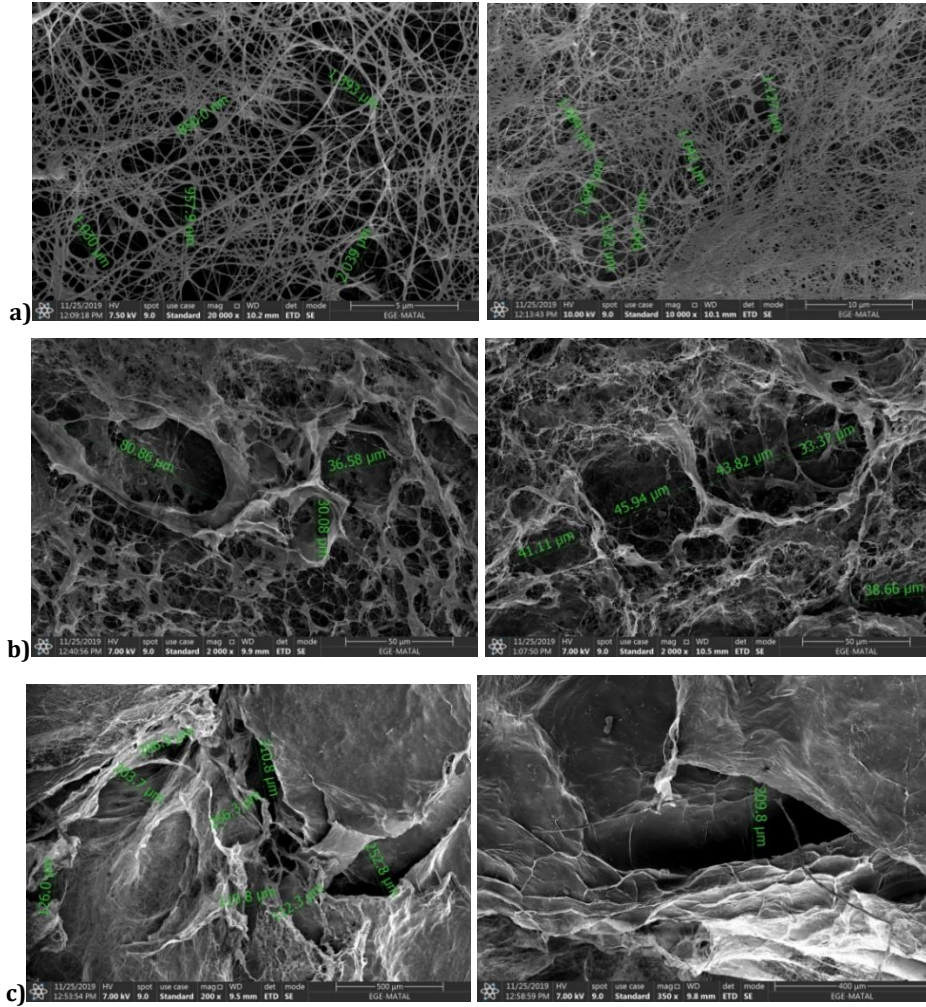
Şekil 2. *G. xylinus*'un selüloz üretimi (65.000x)

Figure 2. Cellulose production by *G. xylinus* (65.000x)



Şekil 3. BS makro görünümü a) üretim sonrası, b) temizleme sonrası

Figure 3. Appearance of BC a) after production b) after purification



Şekil 4. Doğal ve gözenekli BS membranların farklı büyütmelerdeki görüntüleri a) doğal BS gözenek yapısı, b) agar damlatma yöntemi ile elde edilmiş BS gözenek yapısı, c) agar parçalama yöntemi ile elde edilmiş BS gözenek yapısı

Figure 4. Views of natural and porous BC membranes at different magnifications a) natural BC pore structure, b) BC pore structure obtained by agar dropping method, c) BC pore structure obtained by agar shredding method

3.2. Karakterizasyon testleri

3.2.1. SEM

Elde edilen BS membranların gözenek yapılarının incelenmesi için SEM görüntülemesi yapılmıştır. Kontrol BS örneğinde nanoselüloz fibrillerinin görüntüsü ve fibriller arası gözenek büyüklükleri şekil 4a'da görülmektedir. Gözenekli *in situ* üretim ile elde edilen örnekler incelendiğinde agar damlatma ile por boyutları arttırılan BS membranındaki gözeneklerin ağırlıklı 30-50µm aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4b). Agar parçalama ile üretilen BS yapısında 300 µm'ye varan boşluklar gözlemlenmiştir (Şekil 4c). Bu yöntem ile başarılı şekilde BS membranında gözenekler oluşturulmuştur.

BS fiber kalınlıkları 10-100 nm arasında değişen çaplara sahiptir [33]. Keratin ile modifikasyondan sonra fibril kalınlıkları keratin kaplanması nedeniyle nanoboyutta kalınlaşmış olsa da mevcut geniş aralıkta bir fark oluşturmamıştır.

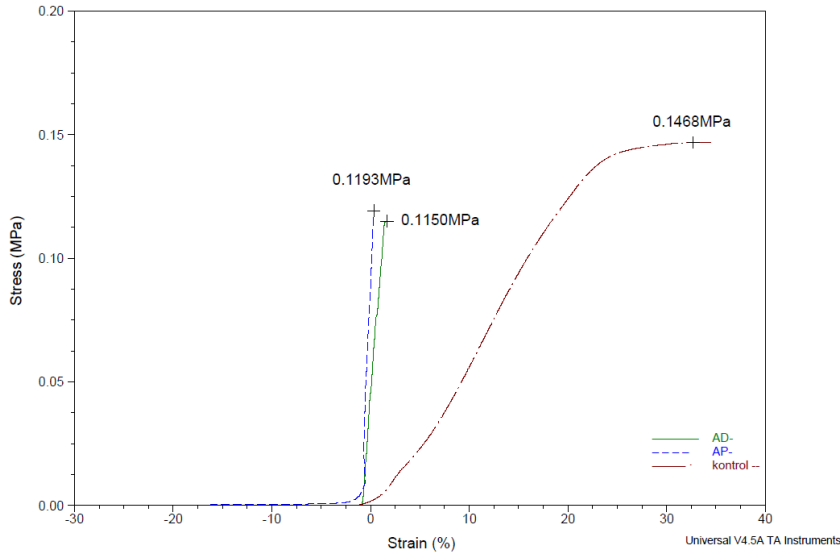
3.2.2. Mekanik Özellikler

Herhangi bir işlem görmemiş doğal BS'nin maksimum çekme dayanımı 0,1468 MPa olarak ölçülmüştür. Gözenek yapısı arttırılan BS örneklerinde ise agar parçalama yönteminde

0,1193 MPa ve agar damlatma yönteminde 0,1150 MPa çekme dayanımı ölçülmüştür (Şekil 5).

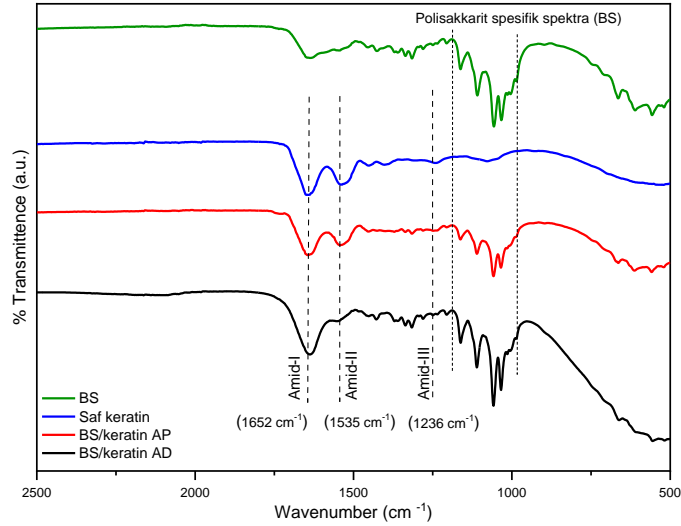
3.2.3. FTIR Analizi

İki farklı yöntemle modifiye edilen ve keratin yüklenen BS örneklerinin analizinde, protein yapısında bulunan tipik amid bağları saf keratin spektrumunda 1652 (Amid-I), 1535 (Amid-II) ve 1236 (Amid-III) cm^{-1} olarak gözlemlenmiştir. Buna ek olarak polisakkarit spesifik bölge bu çalışmada BS'yi temsil etmekte olup spektra üzerinde işaretlenmiştir (Şekil 6). Tablo 1, örneklerin birbiri ile FTIR sonucu üzerinden karşılaştırmalı korelasyon seviyesini göstermektedir. Sonuçlarda BS ve keratinin birbiri ile olan korelasyonu yaklaşık %21 değeri ile minimum eşleşme göstermiştir. Bunun yanı sıra BS-keratin örneklerinden agar damlatma, keratin ile %32,5 benzerlik gösterirken agar parçalama yöntemi %63,5 korelasyon göstererek BS yapısına en yoğun keratin yükleme oranını vermiştir. Bu sonuçlara göre agar parçalama ile elde edilen keratin yüklenen BS membranın keratin ile benzerliği 0,635 olarak belirlenirken agar damlatma ile bu değer 0,324 olarak belirlenmiştir. Saf BS ve keratinin benzerliği ise 0,209 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 5. Kontrol ve gözenekli BS membranların fiziksel dayanım grafiği (AD: agar damlatma, AP: agar parçalama)

Figure 5. Mechanical strength (stress-strain) plot of control and porous membranes of BC (AD: agar dropping method, AP: Agar shredding)



Şekil 6. BS, saf keratin ve agar damlatma (AD) ve agar parçalama (AP) yöntemleri ile modifiye edilmiş BS-keratin örneklerinin FTIR spektrumu

Figure 6. FTIR spectrum of BC, keratin, and BC-keratin samples that modified by agar dropping (AD) and agar shredding (AP) methods

Tablo 1. BS, keratin ve BS-keratin (AD, AP) örneklerinin FTIR korelasyon tablosu

Table 1. FTIR correlation table of BC, keratin and BC-keratin (AD,AP) samples

Örnek	Kontrol	Korelasyon	% Korelasyon
BS	Keratin	0,209	~21
BS-keratin (AD)	Keratin	0,324	~32,5
BS-keratin (AP)	Keratin	0,635	~63,5

4. Tartışma ve Sonuç

Yanık yaralarında kullanılacak deri ikamelerinin; enfeksiyona direnç, su kaybını engelleme, kaydırıcı kuvvetlere karşı koyabilme, düşük maliyet, yaygın olarak bulunabilme, yüksek raf ömrü ve depolama kolaylığı, antijen bulundurmaması, kalınlığının ayarlanabilmesi, uzun süre yaranın üstünde kalabilme, düzensiz yüzeylere de uygulanabilme ve kolay kullanım gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir [34,35].

Doku mühendisliğinde kullanılan üç boyutlu doku iskelesi sistemlerinde BS nanoyapıları

kullanılmaktadır. Saf nanoselüloz fibril ağ sisteminin mikromimarisi bakterinin fermentasyon prosesi esnasında kontrol edilebilir durumdadır [36]. Bu kontrolü gözenek büyüklüğü ve sayısı açısından sağlamak için farklı partiküllü yapılar ve çeşitli yöntemler kullanılmıştır [29,36,37]. Üretimden sonra agar partikülleri BS membrandan uzaklaştırılarak doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen doku iskeleleri düz kaslara eklenerek, potansiyel kan damarı oluşumları için incelenmiştir. Ancak parafin ve nişastanın yapıdan tamamen uzaklaştırılması agar kullanımı kadar kolay olmamaktadır.

Hemen tüm dokular kan damarlarıyla beslenme ve dokulardaki oksijen ve besin difüzyonu nedeniyle damarlara ihtiyaç duyar ve bunun için 200µm gözeneklere ihtiyaç vardır [38]. Genel olarak oksijen ve besin transferi, hücrelerel farklılaşma ve hücre göçü için 100 µm gözenek boyutları kabul görmektedir [39,40].

Bu çalışmada deri ikamesi olarak kullanılabilir BS'nin özelliklerle hücre göçü, oksijen ve besin transferine izin verecek şekilde gözenekliliğinin artırılması ve keratin ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında herhangi bir modifikasyon yapılmamış BS membranının yapısı, beklenildiği gibi sıkı selüloz nanofiberlerinden oluşmaktadır (Şekil 4a). Fiberler arası mesafe literatür çalışmalarıyla da uyumludur [29,30,41].

Gözenek büyüklüğü ve sayısının artırılması amacıyla iki farklı yöntemle *in situ* olarak BS modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Partikül olarak hem BS genel yapısına zarar vermeyecek hem de modifikasyon sonrası BS yapısından kolaylıkla uzaklaştırılabilecek [29] olan agar kullanımı seçilmiştir. Bunun için iki farklı yöntemle elde edilen agar partiküllerinin uygulanması sonrası agar damlatma yöntemiyle elde edilen partiküllerin kullanımında küresel ve homojen boyutlarda gözenekler elde edilmesine rağmen gözeneklerin yeterli büyüklüğe sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4b). Ek olarak Şekil 6'da gösterildiği üzere agar damlatma yönteminde Amid II bağı görece daha az yoğun bir pik verdiği için bu yöntemle oluşturulan gözeneklerin malzeme yapısına keratin yüklenmesinde daha az katkı sağladığını düşündürmüştür. Agar parçalama ile elde edilen agar partikülleri kullanılarak *in situ* BS membran üretimi sonrası ise fibroblastların yerleşebileceği ve tutunabileceği büyüklüklerde gözeneklerin oluşturulduğu (Şekil 4c) ve keratine özgü belirgin amid pikleri (Şekil 6) gözlemlenmiştir.

BS, modifikasyonlar sonrası genel özelliklerini korumakla beraber yapısındaki gözenek sayısı ve büyüklüğü sebebiyle maksimum çekme kuvveti buna orantılı olarak doğal BS (0,1468MPa) ile karşılaştırıldığında daha düşük (0,1150MPa ve 0,1193 MPa) olarak ölçülmüştür (Şekil 5). Malzeme üzerinde yapılan modifikasyonlar uygulanan yöntemlere göre bazı durumlarda malzemenin dayanımını düşürmektedir [6,42,43]. Bu çalışmada da

gözenek sayısı ve çapının artması ile BS'nin çekme dayanım değeri düşmüştür.

Deri yapısal olarak farklı katmanlara sahiptir ve her bir katmanın kendine özgü mekanik özellikleri vardır [44], bunun yanı sıra vücudun farklı bölgelerinin deri kalınlığı ve mekanik dayanım özellikleri de değişkenlik göstermektedir [45]. İnsan derisinin mekanik özellikleri hakkında literatürde bulunan veriler genellikle karın ve sırt bölgelerini kapsamakta ve maksimum çekme dayanımı 1-24 MPa aralığında değişkenlik göstermektedir. Potansiyel deri ikame malzemesi olarak araştırdığımız BS'nin literatürde farklı üretimleri ve formları için geniş aralıklarda mekanik dayanım değerleri rapor edilmiştir (200-250 MPa çekme dayanımı) [46]. Bu çalışmada ise elde edilen mekanik dayanım 0.14MPa olarak ölçülmüştür, bu değer çeşitli üretim optimizasyonları ile artırılabilir özelliktedir ve bu halıyla de üst deri doku kaybı ve yaralanmalarında mekanik destek sağlayabilir potansiyelindedir. Ciddi yanık ve doku kaybı olan durumlarda bölgenin boyut ve kalınlığına göre mekanik özellikler ile bağdaşan malzeme geliştirilmesi ileriki deri ikame malzemesi araştırmalarının konusu olmalıdır. Her iki yöntem de (agar damlatma ve parçalama) optimizasyona uygun olduğundan parametreler değiştirilerek farklı gözenek dağılımına sahip BS membranlar elde edilebilir. Ancak burada BS membranın taşıması istenen dayanım, esneklik gibi diğer özelliklerinin de korunduğu bir optimizasyon yapılmalıdır. Uygulama açısından değerlendirildiğinde agar parçalama yöntemi proses olarak daha basit bir yöntem olarak tercih edilebilir görülmektedir.

Literatürde daha önce gözenek yapısı artırılarak keratinle modifiye edilmiş BS deri ikamesine rastlanılmamıştır. BS yapısal olarak nano boyutlarda gözeneklere (50-200 nm) sahiptir ve bu özelliği onun doku mühendisliği uygulamalarında hücre göçünü sınırlandırmakta ve damarlanmaya engel oluşturmaktadır. Grubumuzun önceki çalışmalarında alınan sonuçlar doğrultusunda BS'nin gözenek çapı agar parçalama tekniği kullanılarak 275 µm çaplarına kadar artırılmış ve bu sayede Saos-2 hücre hattı ile yapılan *in vitro* çalışmalar, hücrelerin BS nanofiberleri arasında hücre göçüne olanak sağladığı gösterilmiştir [29]. Bu çalışmada uygulanan agar parçalama yöntemi sonrası önceki çalışmalar ile paralel gözenek çapları elde edilmiştir (~200 µm) (Şekil 4c) Doğal BS'nin keratin ile modifikasyonunun deri ikamesi için

olumlu sonuçları *in vitro* hücre kültürü ile doğrulanmıştır. Keratinin, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin yüzey adezyonunu desteklediği bilinmektedir [30].

FTIR sonuçlarında gözlemlenen amid grupları malzemenin yapısına keratinin eklendiğini göstermektedir. İki yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında agar parçalama modifikasyonu sonrası oluşan gözenek çapı daha büyük olduğundan keratinin yapı içerisinde daha yoğun yer aldığını (Tablo 1) doğrulamaktadır. Keratin içeren BS esaslı deri ikamesinin keratinosit hücrelerinin tutunma ve çoğalmasında teşvik edeceği ve bu hücrelerden VEGF (Damar Epiteli Büyüme Faktörü-Vascular Endothelial Growth Factor) salgılanmasına yol açarak neovaskülarizasyonu destekleyeceği öngörülebilir. Yara dokusuna doğrudan VEGF verilmesinin damarlanmayı tetiklediği ve kanser oluşumuna yardımcı olduğu görülmüştür [47]. Bu durumun ortaya çıkmaması için yaraya doğrudan VEGF uygulamak yerine bu büyüme faktörünü salgılayan keratinositlerin stimüle edilerek tümör oluşum riski olmadan damar üretimi sağlanabilir.

Bu çalışmada yüksek saflıkta, biyoyumlu, eşsiz karakteristikleri ve modifikasyonlara açık yönü ile biyomedikal alanda aday bir biyomalzeme olan BS kullanılarak ticari değer taşıyabilecek deri ikamesi geliştirme araştırmaları için önemli bir özellik olan gözenekliliğin sağlanması yönünde veriler elde edilmiştir. Mevcut çalışmanın devamı niteliğinde olacak ileriki çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* denemelerin yapılması halinde gözenekliliğin artırılmasının, keratinle modifiye edilmiş BS'nin etkisi daha ileri seviyede gösterilebilir. Mevcut bulgular keratinle modifiye edilmiş ve gözenek çapı arttırılmış BS'nin yara örtüsü olarak kullanımı ile canlı dokuların iyileşmesine olan etkisinin araştırılması gibi farklı safhalara da taşınabilir potansiyelindedir. Çalışmada BS mekanik dayanım analizlerinde örneklerin kaygan yapısı sebebiyle çekme cihazının örneği tutan çene kısımları BS örneklerine bölgesel hasar vererek erken kopmalara sebep olmuştur. Bu şekilde hidrojel formuna sahip malzemelerin mekanik analizlerinde bu durum bir karakterizasyon limitasyonu olarak değerlendirilmeli ve malzeme formuna uygun optimizasyonlar yapılmalıdır.

4. Discussion and Results

In this study, using BC, as a candidate biomaterial in the biomedical field with its properties of high purity, biocompatibility, unique characteristics and openness to modifications, the data were obtained to provide porosity, as an essential feature for skin substitute development research that may add commercial value to the final product from this material. In future studies, which will continue from this presented study, the effect of increasing the porosity and keratin-modified BS can be further demonstrated with *in vitro* and *in vivo* experiments. The presented findings have the potential to be carried to different stages, such as the use of BC modified with keratin and increased pore diameter as a wound dressing and investigating the effect on the healing of living tissues. In this study, due to the slippery nature of the BC samples, during mechanical strength analysis, the jaw parts of the pulling device that hold the sample caused local damage and caused the premature rupture. Therefore, for the mechanical analysis of this material in its hydrogel form, this should be considered a characterization limitation, and optimizations should be made according to the material form.

Etik kurul onayı ve çıkar çatışması beyanı

Hazırlanan makalede etik kurul izni alınmasına gerek yoktur.

Hazırlanan makalede herhangi bir kişi/kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) (Proje No: FYL-2018-20231) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] WHO, Burns- Key facts, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> (Erişim Tarihi: 19/08/2021)
- [2] Schulz III, J. T., Tompkins, R. G., Burke, J. F. 2000. Artificial skin, Annual Review of Medicine, Cilt. 51(1), s. 231-244. DOI: 10.1146/annurev.med.51.1.231
- [3] Beele, H. 2002. Artificial skin: past, present and future, The International Journal of Artificial Organs, Cilt. 5(3), s. 163-173. DOI: 10.1177/039139880202500302
- [4] Nyame, T.T., Chiang, H.A., Leavitt, T., Ozambela, M., Orgill, D.P. 2015. Tissue-Engineered Skin Substitutes, Plastic and Reconstructive Surgery, Cilt. 136(6), s. 1379-1388. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001748

- [5] Jozala, A.F., de Lencastre-Novaes, L.C., Lopes, A.M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P.G., Pessoa-Jr, A., Froto, D., Gerenutti M., Chaud M.V. 2016. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Cilt. 100, s. 2063–2072. DOI: 10.1007/s00253-015-7243-4
- [6] Emre Oz, Y., Keskin-Erdogan, Z., Safa, N., Hames Tuna, E.E. 2021. A review of functionalised bacterial cellulose for targeted biomedical fields, *Journal of Biomaterials Applications*. DOI: 10.1177/0885328221998033
- [7] Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A. 2011. Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis, *Biomacromolecules*, Cilt. 12(3), s. 730–736. DOI: 10.1021/bm101363t
- [8] Wei, B., Yang, G., Hong, F. 2011. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers*, Cilt. 84(1), s. 533–538. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.017
- [9] Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H. P., Marsch, S. 2006. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Polysaccharides II*, s.49-96. DOI: 10.1007/12_097
- [10] Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose*, Cilt. 5(3), s. 187-200.
- [11] Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., Uryu, M. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, *Journal of Materials Science*, Cilt. 24(9), s. 3141–3145. DOI: 10.1007/BF01139032
- [12] Cannon, R.E., Anderson, S.M. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose, *Critical Reviews in Microbiology*, Cilt. 17(6), s. 435–447. DOI: 10.3109/10408419109115207
- [13] Jonas, R., Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, Cilt. 59(1–3), s. 101–106. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3
- [14] Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. 2000. Bacterial cellulose- a masterpiece of nature's arts, *Journal of Materials Science*, Cilt. 35(2), s. 261–270. DOI: 10.1023/A:1004775229149
- [15] Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., Hames, E.E. 2016. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, *International Journal of Biological Macromolecules*, Cilt. 90, s. 2–10. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.052
- [16] Castellano, J.J., Shafii, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E., Mannari, R.J., Payne, W.G., Smith, D.J., Robson M.C. 2007. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *International Wound Journal*, Cilt. 4(2), s. 114-122. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x
- [17] Barud, H.S., Regiani, T., Marques, R.F.C., Lustri, W.R., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L., 2011. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes, *Journal of Nanomaterials*. Article ID 721631DOI: 10.1155/2011/721631
- [18] Culebras, M., Grande, C.J., Torres, F.G., Troncoso, O.P., Gomez, C.M., Bañó, M.C. 2015. Optimization of cell growth on bacterial cellulose by adsorption of collagen and poly-l-lysine, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Cilt. 64(8), s. 411–415. DOI: 10.1080/00914037.2014.958829
- [19] Ghalia, M.A., Dahman, Y. 2017. Fabrication and enhanced mechanical properties of porous PLA/PEG copolymer reinforced with bacterial cellulose nanofibers for soft tissue engineering applications, *Polymer Testing*, Cilt. 61, s. 114-131. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2017.05.016
- [20] Li, Y., Jiang, H., Zheng, W., Gong, N., Chen, L., Jiang, X., Yang, G. 2015. Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair, *Journal of Materials Chemistry B*, Cilt. 3(17), s. 3498-3507. DOI: 10.1039/C4TB01819B
- [21] Moraes, P.R.F.D.S., Saska, S., Barud, H., Lima, L. R.D., Martins, V.D.C.A., Plepis, A.M.D.G., Ribeiro, S.J.L., Gaspar, A.M.M. 2016. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing, *Materials Research*, Cilt. 19, s. 106-116. DOI: 10.1590/1980-5373-MR-2015-0249
- [22] Huang, L., Chen, X., Nguyen, T.X., Tang, H., Zhang, L., Yang, G. 2013. Nano-cellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers. *Journal of Materials Chemistry B*, Cilt. 1(23), s. 2976-2984. DOI: 10.1039/C3TB20149J
- [23] Amin, M.C.I.M., Ahmad, N., Halib, N., & Ahmad, I. 2012. Synthesis and characterization of thermo-and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, Cilt. 88(2), s. 465-473. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.12.022
- [24] Potivara, K., & Phisalaphong, M. (2019). Development and Characterization of Bacterial Cellulose Reinforced with Natural Rubber. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(14), 2323. <https://doi.org/10.3390/ma12142323>.
- [25] Si-Qian Chen, Patricia Lopez-Sanchez, Dongjie Wang, Deirdre Mikkelsen, Michael J. Gidley, Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*, *Food Hydrocolloids*, Volume 81, 2018, 87-95, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.031>
- [26] Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown Jr, R.M. 2006. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds, *Biomaterials*, Cilt. 27(2), s. 145-151. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035
- [27] Portal, O., Clark, W.A., Levinson, D.J. 2009. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers, *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, Cilt. 21(1), s. 1–3. PMID: 25904579

- [28] Hestrin, S., Schramm, M.J.B.J. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochemical Journal*, Cilt. 58(2), s. 345. DOI: 10.1042/bj0580345
- [29] Bayir, E., Bilgi, E., Hames, E. E., Sendemir, A. 2019. Production of hydroxyapatite-bacterial cellulose composite scaffolds with enhanced pore diameters for bone tissue engineering applications, *Cellulose*, Cilt. 26(18), s. 9803-9817. DOI: 10.1007/s10570-019-02763-9
- [30] Keskin, Z., Sendemir Urkmez, A., Hames, E. E. 2017. Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, Cilt. 75, s. 1144-1153. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.035
- [31] Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., Fujii, T., Fuhii, T., Fujii, T. 2002. A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Cilt. 25(5), s. 569-572. DOI: 10.1248/bpb.25.569
- [32] Keskin Z. 2015 Keratin içeren bakteriyel selüloz tabanlı kompozit biyomalze üretimi, karakterizasyon ve biyoyapay deri geliştirilmesinde kullanım potansiyelinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 s, İzmir.
- [33] Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2), 219-224.
- [34] Haddad, A.G., Giatsidis, G., Orgill, D.P., Halvorson, E.G. 2017. Skin Substitutes and Bioscaffolds, *Clinics in Plastic Surgery*, Cilt. 44(3), s. 627-634. DOI: 10.1016/j.cps.2017.02.019
- [35] Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Tache, F., Zaharescu, T., Grosu, E. 2007. Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, Cilt. 265(1), s. 434-438. DOI: 10.1016/j.nimb.2007.09.036
- [36] Backdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., Gatenholm, P. 2008. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cilt. 2(6), s. 320-330. DOI: 10.1002/term.97
- [37] Xiong, G., Luo, H., Zhang, C., Zhu, Y., Wan, Y. 2015. Enhanced biological behavior of bacterial cellulose scaffold by creation of macropores and surface immobilization of collagen, *Macromolecular Research*, Cilt. 23(8), s. 734-740. DOI: 10.1007/s13233-015-3099-9
- [38] Rouwkema, J., Koopman, B.F., Blitterswijk, C. A.V., Dhert, W.J., Malda, J. 2009. Supply of nutrients to cells in engineered tissues, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Cilt. 26(1), s. 163-178. DOI: 10.5661/bger-26-163
- [39] Loh, Q.L., Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size, *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, Cilt. 19(6), s. 485-502. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0437
- [40] Hollister, S.J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, Cilt. 4(7), s. 518-524.
- [41] Brown, R.M. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Cilt. 42, s. 487-495. DOI: 10.1002/pola.10877
- [42] Yin N, Stilwell MD, Santos TM, Wang, H., Weibel, D.B. 2015. Agarose particle-templated porous bacterial cellulose and its application in cartilage growth *in vitro*, *Acta Biomaterialia*, Cilt. 12, s. 129-138. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.10.019
- [43] Huang J.W., Lv X.G., Li Z., Song, L.J., Feng, C., Xie, M.K., Li, C., Li, H.B., Wang, J.H., Zhu, W.D., Chen S.Y., Wang H.P., Xu, Y.M. 2015. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model. *Biomedical Materials*, Cilt. 10(5), s. 055005.
- [44] Maria F. Leyva-Mendivil, Anton Page, Neil W. Bressloff, Georges Limbert. 2015. A mechanistic insight into the mechanical role of the stratum corneum during stretching and compression of the skin, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Cilt. 49, s. 197-219 DOI:10.1016/j.jmbbm.2015.05.010.
- [45] Griffin, M.F., Leung, B.C., Premakumar, Y. et al. Comparison of the mechanical properties of different skin sites for auricular and nasal reconstruction. 2017. *J of Otolaryngol - Head and Neck Surg* 46, 33 DOI: 10.1186/s40463-017-0210-6
- [46] Joodaki H, Panzer MB. Skin mechanical properties and modeling: A review. 2018. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*.;232(4):323-343. doi:10.1177/0954411918759801
- [47] Johnson, K.E., Wilgus, T.A. 2012. Multiple roles for VEGF in non-melanoma skin cancer: angiogenesis and beyond, *Journal of Skin Cancer*, Article ID 483439. DOI: 10.1155/2012/483439