

# TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ PROJE

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

MediCure

PROJE ADI

Antimikrobiyal Peptid Konjüge Edilmiş GelMa Hidrojel Tabanlı

Yara Örtüsünün Geliştirilmesi ve Çoklu İlaç Dirençli

Mikroorganizmalara Karşı Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

BAŞVURU ID

407419

## İÇİNDEKİLER

<b>1.Proje özeti</b> .....	<b>3</b>
<b>2.Problem/Sorun</b> .....	<b>4</b>
<b>3.Çözüm</b> .....	<b>4</b>
<b>4.Yöntem</b> .....	<b>6</b>
<i>İş Paketi 4.1. Peptit Sentezi</i> .....	<i>6</i>
<i>İş Paketi 4.2. GelMa Sentezi</i> .....	<i>7</i>
<i>İş Paketi 4.3. GelMa/Cys-Temporin-SHf Konjugasyonu</i> .....	<i>9</i>
<i>İş Paketi 4.4. GelMa/Cys-Temporin-SHf Karakterizasyonu</i> .....	<i>9</i>
<i>İş Paketi 4.5. Cys-Temporin-SHf Konjuge GelMa Hidrojelinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi</i> .....	<i>9</i>
<i>İş Paketi 4.6. Cys-Temporin-SHf Konjuge Edilmiş GelMa Hidrojelinin Sitotoksite Analizi</i> .....	<i>10</i>
<i>İş Paketi 4.7. Elde Edilen Verilen İstatiksel Analizi</i> .....	<i>10</i>
<b>5.Yenilikçi (İnovatif) Yönü</b> .....	<b>10</b>
<b>6.Uygulanabilirlik</b> .....	<b>11</b>
<b>7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması</b> .....	<b>12</b>
<b>8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi</b> .....	<b>14</b>
<b>9. Riskler</b> .....	<b>15</b>
<b>10. Kaynaklar</b> .....	<b>16</b>

## 1.Proje özeti

Enfekte yaralar günümüzde insanlar için büyük bir sorun haline gelmektedir. Enfekte yaraların tedavisinde en önemli adım yara çevresindeki ve içerisindeki enfeksiyonun giderilmesidir. Eğer bu adım düzgün bir şekilde gerçekleştirilmezse yaraların iyileşmesi mümkün değildir. Yavaş iyileşen ya da iyileşmeyen yaralar diyabet hastalarının uzuvlarına hatta daha ileri seviyede hayatlarını kaybetmelerine neden olmaktadır (Rehman et al., 2019). Günümüzde bu gibi olumsuz durumları engellemek için yara örtülerine antimikrobiyal etkinlik kazandırmak amacıyla klorheksidin yüklenmesi, gümüş yüklenmesi ve soğuk plazma ile muamelesi gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır. Fakat antimikrobiyal etkinliğe karşı geliştirilen bu yöntemlerin yara bölgesinde toksisiteye sebep olarak yara iyileşmesini geciktirmesi ve uzun dönem antimikrobiyal etkinliğinin düşük olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Antimikrobiyal peptidler (AMP), birçok hayvan ve bitki türleri tarafından üretilen, çok hücreli organizmaların kalıtsal immün yanıtının bir parçası olan ve enfeksiyonlara karşı organizmanın koruma mekanizmasına önemli ölçüde katkıda bulunan, heterojen molekül gruplarıdır (Batoni, Maisetta, Brancatisano, Esin, & Campa, 2011a; Hancock, 1997). AMP'nin yeni bir antimikrobiyal ajan olarak tedavi amaçlı kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Dünya genelinde önemli halk sağlığı problemi olan ve gün geçtikçe artan oranlarda morbidite nedeni olmaya başlayan, konvansiyonel ilaçlara karşı dirençli, patojenik mikroorganizmaların oranındaki artış ve hızlı yayılımları AMP'in yaygın olarak kullanmaya başlamasının sebeplerini oluşturmaktadır (Stempel, Strehmel, & Overhage, 2015). Cys-Temporin-SHf (CFFFLSRIF) AMP'i gram pozitif ve gram negatif bakteri ve mayalara karşı geniş spektrumlu mikrobisidal aktiviteye sahiptir ve doğada bulunan kısa sekanslı bir peptiddir. Kısa sekanslı olması, basit bileşimi ve geniş spektrumlu olması sebebiyle antimikrobiyal peptid olarak gelecek vaad etmektedir (Abbassi et al., 2010). Yara bölgesinde toksisite oluşmasını engellemek ve yaraları daha hızlı bir şekilde iyileştirmek için günümüzde Doku Mühendisliği yaklaşımı ile yara örtüsü çalışmaları sürdürülmektedir. Son zamanlarda doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan hidrojel yüksek oranda su tutan ve suda çözünür polimerlerin UV ışını altında çapraz bağlanması sonucu oluşan üç boyutlu ağlardan meydana gelmektedir. Hidrojellerin canlı doku ile benzerlikleri biyomedikal uygulamalarda birçok avantaj sağlamaktadır. Jelatinin metakrilik anhidrit ile çapraz bağlanması ile üretilen GelMa (GelatinMethacryloyl) hidrojel yüksek su içeriğine, küçük moleküllere karşı geçirgenliğe, ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklere ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir (Rehman et al., 2019). GelMa her ne kadar yara kapanmasında etkili olsa da antimikrobiyal olmaması yara örtüsü olarak kullanımı kısıtlamaktadır (Nazir, Ashraf, Iqbal, Ahmad, & Anjum, 2021).

Yapılacak olan bu projenin amacı GelMa hidrojel üzerine çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği belirlenmiş olan AMP'in konjüge edilerek geliştirilecek olan yara örtüsünün enfekte yaralarda kullanılma potansiyelinin *in vitro* olarak belirlenmesini hedeflemektir.

## 2.Problem/Sorun

Enfekte yaraların iyileşebilmesi için yara çevresinde enfeksiyonun engellenmesi gerekmektedir bu adım düzgün bir şekilde tamamlanmadan yara iyileşmesi mümkün olmamaktadır. Enfeksiyonlu yaraların geç iyileşmesinin ana sebebi ise bütünlüğü bozulan deri altı dokusu mikroorganizmalar için nemli, sıcak ve besleyici bir ortam sağlamaktadır (Rehman et al., 2019; Yoshii, Kusakabe, Akita, Tung, & Ishii, 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, dünya çapında 422 milyon insan, Türkiye'de ise 9 milyon 20 bin kişi diyabet hastalığı ile mücadele etmektedir. Diyabet yaygınlaştıkça, diyabetik yaralarda ve buna bağlı olarak yaralarda oluşan enfeksiyonlarda artış gözlemlenmiştir. Şeker Hastalığı insülin yokluğu yetersizliği veya insülin direnci sonucunda oluşan kronik ve metabolik bir bozukluktur. Hastaların kan damarı ve sinir hasarı nedeniyle daha çok ayaklarda görülür ilk başlarda küçük ve fark edilmeyen yaralardır fakat daha sonra enfeksiyona bağlı olarak yetersiz hücre proliferasyonu ve kan damarı oluşumunda azalmalar meydana gelir bunun sonucunda iyileşmesi zor ve yavaş olan ülser dönüşürler(Hourel, 2014). Diyabetik ülser ile mücadele eden pek çok insan organ kaybı yaşamaktadır. Organ kaybının başlıca sebebi ise diyabetik ülser yaralarının iyileşme sürecinin diğer yaralara göre daha uzun sürede gerçekleşmesi ve bu süre uzadıkça enfekte yaranın kemik dokuya zarar vermesidir (Fleck, 2006; Moravej et al., 2018).

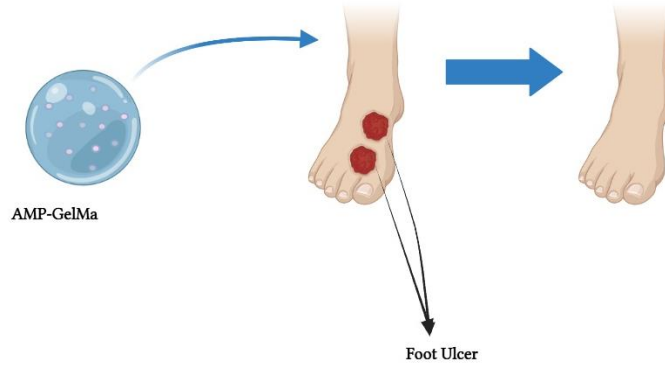


*Resim1: Diyabetik Ülser (Kaya et al., 2009)*

Günümüzde pek çok yara örtüsü geliştirilmiştir ve bu yara örtülerinin amacı doku yenilenmesi, yara iyileşmesi, oksijen değişimi ve mikrobiyal kolonizasyonu önlemektir. (Obagi, Damiani, Grada, & Falanga, 2019). Bu durumları engellemek ve yara örtülerine daha güçlendirmek için klorheksidin yüklenmesi, gümüş yüklenmesi ve soğuk plazma gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. Fakat bu yöntemler deride tahribata neden olarak yara iyileşmesini geciktirmektedir(Batoni, Maisetta, Brancatisano, Esin, & Campa, 2011b; Florio et al., 1997). Bu sebeple geliştirilen pek çok yara örtüsü olmasına rağmen bu yara örtüleri tedavilerde yeterli olmamıştır (Obagi et al., 2019).

## 3.Çözüm

Dünya çapında pek çok insan şeker hastalığı tedavisi görüyor ve bazen bu hastalık nedeni ile enfeksiyonlu yaralar ile mücadele etmek zorunda kalıyorlar. Daha önceden bahsedildiği gibi bu yaralar iyileşmesi zor yaralardır ve eğer bu yaralar düzgün bir şekilde tedavi edilmezse hasta olan kişiler organları kaybetmek zorunda kalıyorlar. Biz projemizde antimikrobiyal peptid konjuge ettiğimiz GelMa hidrojel ile bir yara örtüsü tasarlayarak bu durumun önüne geçmeyi hedeflemekteyiz.



Resim2: AMP Konjuge edilmiş GelMa Hidrojelinin Ayak Ülseri Üzerinde Beklenen Etkisi

Hidrojeller yapışkan olmamaları, büyük ölçüde sudan oluşmaları ve yara iyileşmesinde nemli bir ortam sağlamaları sebebiyle yara örtüsü pazarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu hidrojellerden ayarlanabilir fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip GelMa hidrojel doğal hücre dışı matrisini (ECM) taklit edebilme özelliğine sahiptir (Rehman et al., 2019). Yara iyileşmesi üzerinde pozitif etkinliği bilinen GelMa hidrojellerinin antimikrobiyal özelliğe sahip olmaması yara örtüsü olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sebeple yara bölgesinde toksisiteye sebep olmadan yara iyileşmesini destekleyen ve etkin antimikrobiyal aktivite gösteren GelMa tabanlı yara örtülerinin geliştirilmesi önemli bir potansiyele sahiptir. AMP'ler olarak da bilinen konak savunma molekülleri doğal ya da sentetik olarak kullanılabilir (Francesco, Petkova, & Tzanov, 2018). AMP'ler enfeksiyonlara karşı savaşmak ve mikrobiyal çoğalmaları kontrol altına almak için kullanılmaktadır. Çok hücreli organizmaların, geniş bir istilacı yelpazesine karşı bir savunma sağlayan AMP'ler toksik etki göstermeden gram-pozitif ve gram negatif bakterilere bağışıklık unsuru gibi davranırlar. AMP'lerin biyomalzemeler üzerine konjuge edilmesiyle yeni nesil antimikrobiyal yara örtülerinin geliştirilmesi ile ilgili önemli çalışmalar bulunmaktadır (Mangoni, McDermott, & Zasloff, 2016).

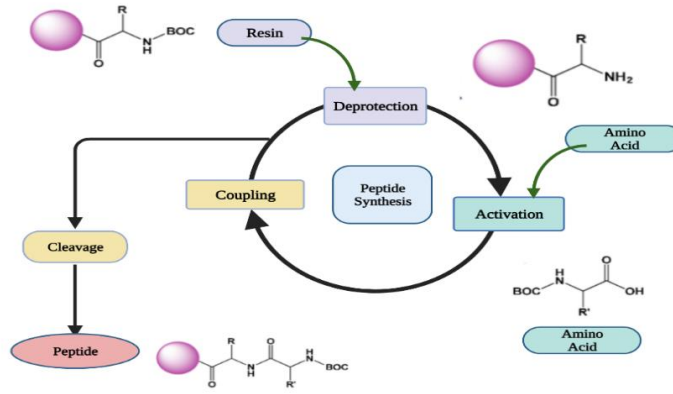
Projemizde, çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği bildirilmiş olan CFFFSLRIF sekanslı Cys-Temporin-SHf AMP' in Gram (-) ve Gram (+) mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik sağlamak için GelMa hidrojeline konjügasyonu ile çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalara karşı etkin enfekte yara tedavisinde kullanım potansiyeli olan yara örtülerinin geliştirilmesidir. Hedeflenen çalışma planı ile Cys-Temporin-SHf AMP, katı aşamalı peptid sentezi yöntemi ile üretilip GelMa hidrojeline konjüge edilecektir. AMP konjüge edilen GelMa hidrojelleri enfekte yara örtüsü olarak kullanılabilme potansiyeli, çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (MDR *P. Aeruginosa*) ve Gram (+) bir bakteri olarak Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerinde yapılacak *in vitro* antimikrobiyal aktivite testleri ve insan keratinosit hücreleri üzerinde yapılacak sitotoksikite testleri ile belirlenecektir. Projenin kabulü ve başarıyla sonuçlanması halinde, geliştirilen antimikrobiyal peptid konjüge edilmiş GelMa tabanlı yara örtüsünün enfekte yaraların bakımında yeni tekniklerin geliştirilmesine öncülük edebileceği düşünülmektedir. Yapılacak çalışma sonucu elde edilecek bulguların önemli bilimsel etki değerine sahip olacağı ve geliştirilen hidrojel tabanlı yara örtüsünün klinikte kullanımına yönelik güçlü potansiyele sahip olması sebebiyle ileride ülke ekonomisine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

#### 4.Yöntem

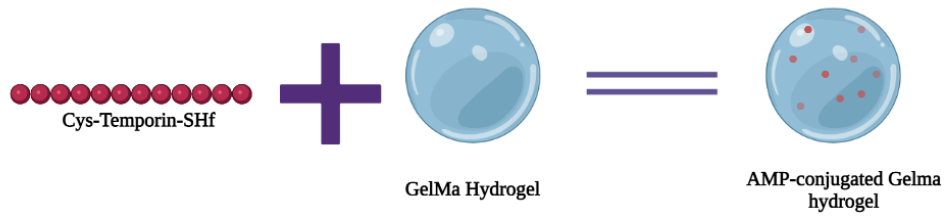
Yapılacak olan yara örtüsü projesi 7 farklı iş paketinden oluşmaktadır. Bu iş paketlerinin ayrıntılı açıklamasına aşağıda yer verilmiştir. Bu uygulanacak olan yöntemler iş paketlerinin tarafsız, seçici, kanıtlama niteliği olan, etik ilkelerine dayanan, eleştirici ve düzeltici olması gibi farklı bilimsel ilkelere dayanmaktadır. Projemiz Teknolojik Hazırlık Seviyesi olarak THS 1'den başlamaktadır. THS1 aşamasında Diyabetik yaraların sorunları, var olan çözümler ve bu çözümlerin eksiklikleri gözlemlenmiştir. Projenin yapım aşamında THS6 seviyesine gelmeyi hedeflemekteyiz. THS7 aşamasında bir prototip oluşturarak uygun bir çevresel ortamda test etmeyi hedeflemekteyiz.

##### ***İş Paketi 4.1. Peptid Sentezi***

Cys-Temporin-Shf (Cys-Phe-Phe-Phe-Leu-Ser-Arg-Ile-Phe) sentezi işlemleri aşağıda açıklanan katı fazda peptid sentezi yöntemi uygulanarak otomatik peptid sentez cihazı kullanılarak proje yürütücüsü tarafından İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Laboratuvarı'nda gerçekleştirilecektir. Katı fazda peptid sentezi işlemi için proje yürütücüsü Dr. Günnur Pulat'ın önceki çalışmalarında izlediği yöntemler takip edilecektir(Günnur Onak, Utku Kürşat Ercan, & Ozan Karaman, 2020; Onak et al., 2018). Antimikrobiyal peptid Rink Amide Nova Gel reçinesi üzerinde sentezlenecektir. Peptid dizisi Rink Amid Nova Gel™ reçinesi (0.62 mmol/g) üzerinde üretilecektir. DMF (2 ml) içerisinde 100 mg reçine 30 dakika boyunca bekletilerek şişirilecek ve daha sonra DMF ile yıkanacaktır (2x3 ml). Fmoc-korunmalı amino asit türevleri (1 eq) ve HOBt (2 eq) kuru DMF (3 ml) ve DIC (1.1 eq) içerisinde çözdürülüp karışıma eklenecektir. Son karışım yani reçineye eklenecek olan karışımın homojen bir şekilde olması için 5-10 dakika boyunca karıştırılacak ve reçineye eklenecektir. Ardından, 0.05 M DMAP'tan 0.2 ml eklenip karışım 30°C'de 4-6 saat boyunca orbital çalkalayıcıda karıştırılacaktır. Reaksiyona girmemiş aminlerin varlığını kontrol etmek için az miktarda reçine ayrılıp Kaiser testine tabii tutulacaktır. Test sonuçları pozitif olursa reçine DMF (5x3 ml) ile yıkanacak ve negatif sonuç bulununcaya kadar işlem tekrarlanacaktır. Test sonuçları negatif çıkarsa reçine ilk önce DMF (5x3 ml) ile yıkanacak, daha sonra Fmoc-koruma grubunun uzaklaştırılması için DMF içerisindeki %20'lik piperidinle oluşturulmuş solüsyon ile 2x15 dakika boyunca bekletilecektir. Son olarak DMF ile yıkanacaktır. Kaiser testi Fmoc koruma grubunun uzaklaştırıldığından emin olmak için tekrarlanacaktır. Kaiser testinin pozitif sonuç çıkmaması halinde %20'lik piperidine içinde inkübasyonu pozitif sonuç alınmaya kadar devam edecektir. Devamında peptid içerisindeki bütün amino asitler de aynı yöntem ile birleştirilecektir. Ardından reçine %95 TFA/ %2.5 TIPS/ %2.5 H<sub>2</sub>O karışımına peptid çapraz bağlayıcısının reçineden ayrılması için iki saat boyunca bırakılacaktır. Çözelti -20°C'de soğuk eter içerisinde ve 24 saat bırakılarak ürünün çökmesi sağlanacaktır. Daha sonra süspansiyon santrifüj edilecek, üst faz atılacak ve katı kısım liyofilizasyon yapılarak elde edilecektir.



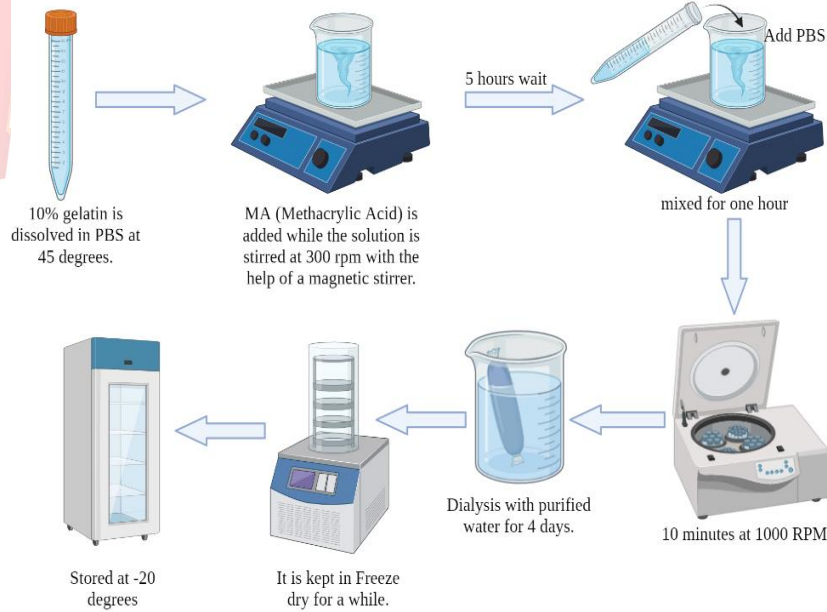
Resim2. Peptid Sentezlenirken Kullanılan Akış Şeması



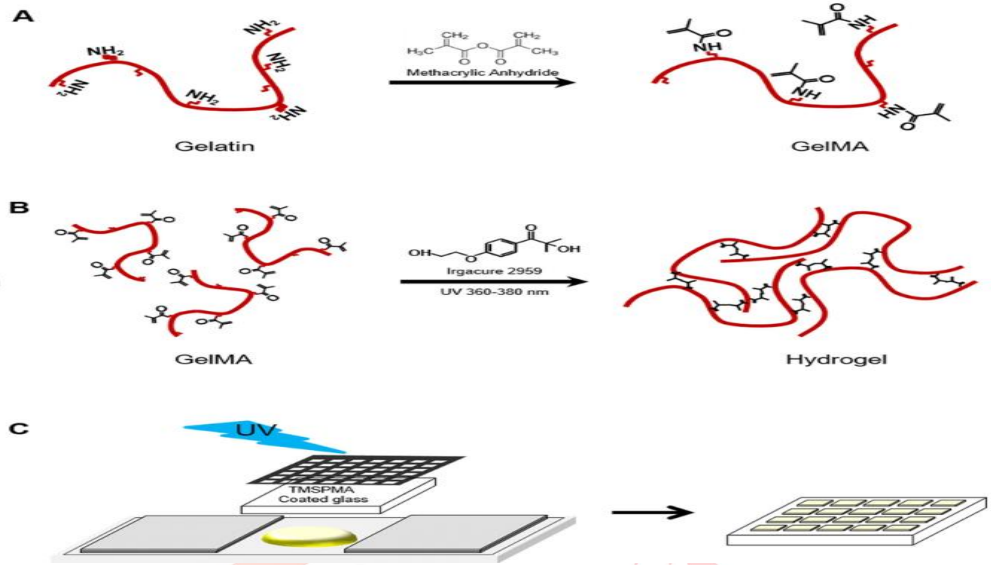
Resim3: Sentezlenen Cys-Tempurin-SHf ile GelMa Hidrojel Konjugasyonu

#### İş Paketi 4.2. GelMa Sentezi

GelMA, daha önce yayınlanmış prosedürlere dayalı olarak sentezlenecektir (Yang et al., 2021). Kısaca, %10 (w/v) jelatin, 45°C'de PBS tamponunda çözülecektir. Daha sonra çözeltiliye 300 rpm'de manyetik karıştırma altında jelatin miktarına göre 0.8 mL/g eklenecektir. 5 saatlik reaksiyondan sonra, reaksiyon çözeltisine 10:1 (v/v) oranında PBS eklenecek ve reaksiyonu durdurmak için oda sıcaklığında 1 saat karıştırılacaktır. Çözelti daha sonra reaksiyona girmemiş jelatini uzaklaştırmak için 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenecek ve süpernatant 4 gün boyunca distile su ile diyaliz edilecektir.



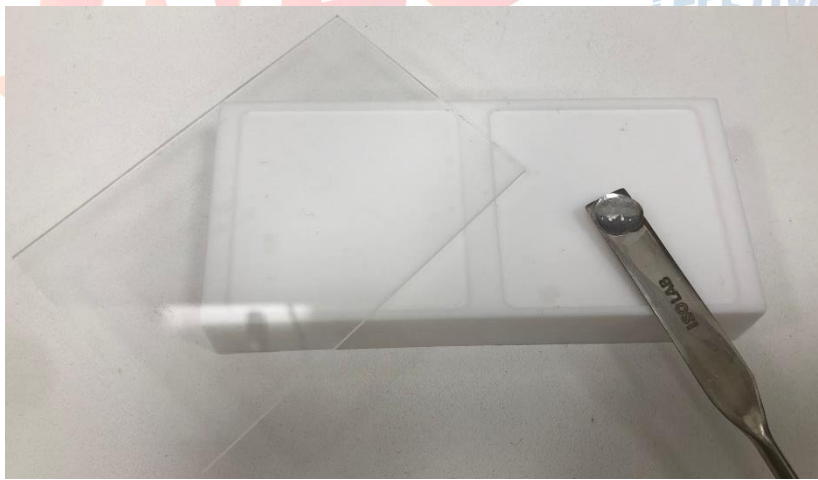
Resim4. GelMa Sentezi



*Resim5. GelMa Hidrojelinin Jelleştirilmesi(Yoon et al., 2016): GelMa Resim4'teki yöntem ile sentezlendikten sonra kullanılması için jelleştirilmesi gerekmektedir. Irgacure ile GelMa, PBS içerisinde çözdürüldükten sonra pipet yardımıyla cam plaka üzerine konulur ve UV cihazı yardımıyla jel haline getirilir.*



*Resim 6. ve Resim7.*



*Resim 8.*

*Resim4'deki yönteme göre sentezlenen GelMa'lar daha sonra Resim5'deki yöntem ile UV ışınına maruz kalır. Resim6, Resim7 ve Resim8 de bu işlemlerden sonra oluşan GelMa'ların görüntüsüne yer verilmiştir.*



### **İş Paketi 4.3. GelMa/Cys-Temporin-SHf Konjugasyonu**

GelMA %10 w/v solüsyonu oluşturmak için trietanolamin (TEOA) tamponu içinde yeniden oluşturulur ve tamamen eriyene kadar 37 °C'de 2 saat karıştırılır. Çözeltinin pH'ı daha sonra 1.0 M HCl veya 1.0 M NaOH eklenerek 8.0-8,5'e ayarlanır. Cys-TetraF2-RR peptitleri, %0.1 w/v solüsyonu oluşturmak için GelMA/TEOA tamponuna ilave edilir. Peptidlerin C-terminal ucundaki sistin, GelMA ile Michael tipi ekleme reaksiyonuna izin vermektedir. Çözelti, 37 °C'de 24 saat karıştırılır ve 6-8 kDa'luk diyaliz tüpü kullanılarak distile suyla 1 hafta diyaliz edilir. 37 °C'de çözeltinin pH'ı 1.0 M HCl veya 1.0 M NaOH eklenerek 7.35-7.45'e ayarlanır ve çözelti liyofilize edilerek -20 °C'de saklanır (O'Grady et al., 2019). Konjugasyon, FT-IR kullanılarak doğrulanacaktır.

### **İş Paketi 4.4. GelMa/Cys-Temporin-SHf Karakterizasyonu**

AMP-GelMa konjugasyon reaksiyonunu sonrasında AMP'in üç boyutlu (3B) hidrojel yüzeyine kovalent bağlanmasının doğrulanması proje danışmanının daha önce kullandığı protokole bağlı kalınarak gerçekleştirilecektir (G. Onak, U. K. Ercan, & O. Karaman, 2020). Kısaca, sentezlenen Cys-Temporin-SHf AMP, önce fluorescein isothiocyanate (FITC) molekülü ile işaretlenecek ve daha sonra resin molekülünden koparılacaktır. İşaretleme (labeling) reaksiyonu FITC molekülündeki succinimidyl ester fonksiyonel grubu ile AMP'in amino grubunda bulunan amin grupları arasında gerçekleşecektir. Daha sonra FITC ile işaretlenen AMP kullanılarak GelMa konjugasyonu yapılacaktır. Üretilen FITC-AMP-GelMa yüzeyi inverted floresan mikroskop (Olympus, CKX41) ile görüntülenecektir. Kısaca, FITC ile işaretlenmiş AMP, 1mM konsantrasyonlarda hazırlanarak GelMa yüzeyine konjugasyonu gerçekleştirilecektir. Konjugasyon sonucunda elde edilen GelMa PBS içerisinde çözdürüldükten sonra floresan yoğunluğu 495 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon dalga boylarında mikropilaka okuyucusu kullanılarak belirlenecektir. AMP-GelMa konjugasyonu reaksiyon verimliliği FITC ile işaretlenmiş AMP'in PBS içerisindeki belirli konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldıktan sonra değerlendirilecektir.

### **İş Paketi 4.5. Cys-Temporin-SHf Konjuge GelMa Hidrojelinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

Cys-Temporin-SHf AMP konjuge GelMa hidrojelinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi için İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilecektir. Laboratuvarda stoğu olan Gram (-) bir bakteri olarak çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (MDR *P. Aeruginosa*) ve Gram (+) bir bakteri olarak MRSA *Styphyllococcus aureus* (MRSA) kullanılacak ve antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesi için planktonik tabakası üzerinde test edilecektir. Agar plaklar üzerine kullanılacak olan organizmalar ekilecektir. Süspans kültür ortamı hazırlamak için agar plakları üzerindeki bir koloni izole edilecek ve 10ml TBS besi ortamına alınacak ve ardında bir gece boyunca 37°C'de inkübasyonu sağlanacaktır. Hazırlanan süspans kültürlerin seyreltme işlemi PBS ile yapılacaktır. Daha sonra PBS ile seyreltilmiş süspans kültürlerin Spektrofotometre yardımıyla 600 nm'de absorbans değerleri okunacaktır. 10<sup>7</sup>CFU/ml konsantrasyonunu 0.2 absorbans değeri temsil eder. Bu absorbans değerini veren seyreltme

kullanılarak süspans kültürlerin gerekli konsantrasyona gelebilmesi için seyreltme yapılacaktır. Bu işlemin ardından antimikrobiyal değerlendirme için organizmanın AMP konjuge GelMa hidrojel ile temas etmesi gereken süre belirlenecektir. Bu amaç doğrultusunda, her iki organizma için  $10^7$ CFU/ml konsantrasyonda süspans kültürleri seri seyreltmeler yoluyla  $10^6$ CFU/ml konsantrasyona seyreltilecek ve daha sonra bu süspans kültürlerden 100 µl alınacaktır. Bu alınan süspans kültür AMP konjuge GelMa hidrojel üzerine aktarılacak ve ardından 15,30,45 ve 60 dakika hidrojel ile temas halinde bırakılacaktır. Temastan sonra AMP konjuge GelMa 6 gözlü özel bir plakaya alınacak ve üzerine 1ml steril PBS eklenecektir. Agar plakalarının üzerine yerleştirilmeden önce, 6 gözlü plaka ultrasonik banyo yardımıyla homojenize edilecek ve homojenizasyon işlemi sonrasında seri seyreltme işlemi uygulanacaktır. Ekim sonrasında agar plakaların 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyonu yapılacaktır. İnkübasyon sonrası yaşayan kolonilerin sayımı ile antimikrobiyal etkinlik değerlendirilecektir. Bununla beraber organizmaların planktonik formları sayesinde AMP konjuge GelMa hidrojelinin maksimum antimikrobiyal etkinliği belirlenecektir. Bunun sonucunda yukarıda anlatılan deneyler tekrar edilecektir.

#### ***İş Paketi 4.6. Cys-Temporin-SHf Konjuge Edilmiş GelMa Hidrojelinin Sitotoksiste Analizi***

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda sitotoksiste çalışmalarında kullanılacak insan keratinosit hatları kültüre edilecektir. Hücreler %10 fetal sıgı serumu (FBS), 100 U/ml penisilin, 4 ng/ml bFGF, DMEM besi ortamı ve 100 mg/ml streptomisin içeren primer besiyeri standart polistren kaplara ekilir. Sıvı azot tankında (ThermoScientific , Bio-cane 47 )  $-196^\circ\text{C}$ 'dondurulup stoklanmadan önce  $37^\circ\text{C}$ 'de ve %5  $\text{CO}_2$  inkübe edilerek çoğaltılacaktır (Karaman et al., 2016). AMP konjuge edilmiş hidrojeller ISO 10993-5 standartlarında belirtirdiği üzere bir gün boyunca besi ortamında bekletilecek ve alınacak olan ekstratların hücre ile muamelesinden sonra MTT işlemi yapılacaktır. Bu işlemde 24lük pleytlere  $2 \times 10^4$  fibroblast/keratinosit ekimi yapılacak ve AMP konjuge edilmiş hidrojeller hücreler üzerindeki etkinlikleri ekimden birinci, ikinci ve üçüncü gün sonra MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ile inkübe edilerek mitokondriyal olarak boyanacaktır. Çalışmalarda GelMa hidrojel ve Cys-Temporin-SHf (CFFFLSRIF) peptidi kullanılacaktır.

#### ***İş Paketi 4.7. Elde Edilen Verilen İstatiksel Analizi***

Deneyler üç tekrarlı olmak üzere ve en az üçer örnek olacak şekilde test edilecektir. Elde edilen sonuçların ortalama değeri ve daha sonra standart sapması bulunacaktır. Standart hata değerlerine raporda yer verilecektir. Gruplar arasındaki ikili ilişkiler Student t-test yardımıyla bulunacaktır.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

### **5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü**

Dünya çapında kronik veya normal yaralar ile mücadele eden pek çok insan bulunmaktadır. Normal yaraların uzun süre iyileşmeyerek enfekte olması sonucunda kronik yaralar meydana gelir (Park et al., 2010; Siddiqui & Bernstein, 2010). Şeker hastalığı sonucunda oluşan diyabetik ülser yaraları geç iyileştiği ve tedavisinin zor olması nedeniyle oldukça maliyetli bir süreçtir. Teknolojik gelişmelerle birlikte yara tedavisinde kullanılmak için birçok yara örtüsü

geliştirilmiştir. Yara örtüleri bakteri yükünü kontrol ederken ayrıca yaradan gelen eksüda miktarını da kontrol eder böylece yarayı çevreden gelebilecek ikinci enfeksiyondan korurken cildi de yara eksüdasından korur(Triller, Huljev, & Planinsek Rucigaj, 2013). Yara örtüsü epitel dokunun oluşması için nem sağlarken diğer bir yandan yara üzerinde bir bariyer oluşturarak yarayı dış etkenlerden korur(Obagi et al., 2019). Geliştirilen yara örtülerinin birçok avantajı ve dezavantajı vardır. Yara örtülerine antimikrobiyal etkinlik kazandırmak için en çok kullanılan yöntem gümüş nanoparçacık yüklemesidir. Fakat geliştirilen bu yöntem yara bölgesinde toksisiteye sebep olarak yara iyileşmesini geciktirmekte ve uzun dönemde düşük bir antimikrobiyal özelliğe sahiptir (Kalantari et al., 2020; Masood et al., 2019).

Yara örtülerinde hücre dışı matris oluşumu yara dokusunda yapısal bir bütünlük sağlaması sebebiyle çok önemlidir. Diyabetik yara iyileşmesinde, büyüme faktörlerinde ve hücre proliferasyonunda bozulma nedeniyle hücre dışı matriste bir malformasyon oluşumu gözlenir (Hourel, 2014). Bu durumu önleyebilmek için bilim insanları tarafından üretilen hücre dışı matrisini takit edebilen, ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özellikleri ile yüksek biyouyumluluğu sayesinde modifiye edilebilen yara örtüsü olma potansiyeline sahip GelMa hidrojelini kullanmayı tercih ettik. Ancak GelMa hidrojelini antimikrobiyal özelliğe sahip olmadığı için farklı antimikrobiyal ajanlar ile entegre edilmelidir. Bu projede diyabetik yaralarda iyileşmeyi destekleyebilme potansiyeli olan GelMa hidrojeline Cys-Temporin-SHf antimikrobiyal peptidi konjüğe edilerek çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı etkili yara örtüsü geliştirilmesi ile yeni nesil bir yara örtüsü tasarımı hedeflenmektedir. Projenin başarılı olması durumunda enfekte yaraların tedavisinde kullanılan yara örtülerine farklı bir yön verecektir ve dünya genelinde 20 milyar dolar olan yara bakım maliyetlerini oldukça düşürecektir.

**Projenin özgün değeri**, çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği bildirilmiş olan CFFFLSRIF sekanslı Cys-Temporin-SHf AMP' in Gram (-) ve Gram (+) mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik sağlamak için GelMa hidrojeline konjügasyonu ile çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalara karşı etkin enfekte yara tedavisinde kullanım potansiyeli olan yara örtülerinin geliştirilmesidir.

## 6.Uygulanabilirlik

Tasarlanacak olan yara örtüsünün bilimsel ve ekonomik alanda uygulanabilirliğinin olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca proje kapsamında projenin devamı olarak yeni projeler geliştirileceğini düşünmekteyiz.

Bilimsel olarak, Projeden bitiminde oluşan sonuçlar dermatoloji, mikrobiyoloji, biyomedikal mühendisliği, malzeme mühendisliği gibi farklı alanlar için önemlidir. Bu bakımdan sonuçların potansiyel olarak: "Evaluation of the use of antimicrobial peptide conjugated GelMa hydrogel as a wound dressing on infected wounds." Başlıklı minimum bir adet makalenin dergilerde yayınlanması ön görülmektedir. Ayrıca tasarlanan yara örtüsünün ilerleyen zamanlarda enfekte yara bakımında kullanılabilir olacak yenilikçi yara örtüsüne öncülük edebileceği düşünülmektedir.

Ekonomik olarak, Sunulan proje, gerek İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'nin stratejik planları ve vizyonu kapsamında gerek ülkemizin 2023 vizyonu kapsamında giderek artan biçimde desteklediği sağlık konusunun güzel bir örneğidir. Yara bakımı maliyeti dünya genelinde 20 milyar dolar seviyesinde olması (Dalla Paola, 2013) ayrıca enfekte yaraların normal yaralara göre daha maliyetli olması ve enfekte yaraların yüksek oranda ölüme sebep olması (Siddiqui

& Bernstein, 2010) gibi olaylar göz önünde bulundurulduğunda antimikrobiyal etkinliği olan ve biyouyumlu yara örtüsü geliştirilmesi konusunda önemli bir yol alınacaktır. Projenin sonucuna bağlı olarak belirlenecek oranda antimikrobiyal etkinliğe sahip AMP konjuge edilmiş GelMa üretim ve kullanımı için patent başvurusu yapılacaktır. AMP konjuge edilmiş GelMa hidrojel tabanlı yara örtüsü *in vitro* denemelerde başarılı olursa öncelikle hayvan denemeleri esnasında klinik denemeler ile ürünün ticari olarak enfekte yara bakımında kullanılabilen ürün haline getirilmesine yönelik çalışmalar bu proje kapsamını takip eden diğer projelerde gerçekleştirilecektir. Böylece, geliştirilen yara örtüsünün ürün haline getirilmesi ile hem ülke ekonomisine katkı sağlanabilecek hem de enfekte olmuş yaraların daha kolay iyileşmesini sağlayacak çalışmaların önünü açacaktır.

Proje kapsamında yapılacak olan AMP konjuge edilmiş GelMa hidrojel tabanlı yara örtüsünün *in vitro* denemelerinin başarılı sonuçlanması durumuna bağlı olarak projenin *in vivo* denemesine için hayvan deneyleri de içeren yeni projelerin hazırlanması planlanmaktadır.

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tablo 7.1. Proje Zaman Planlaması

Görev Adı	Zaman Aralığı (... - ... Ay)	Kim Tarafından Gerçekleştirilecek
Peptit Sentezi	1-3	Nisa Nilsu Çelebi
GelMa Sentezi	1-2	Nisa Nilsu Çelebi
GelMa/Cys-Temporin-SHf Konjugasyonu	1-2	Nisa Nilsu Çelebi
GelMa/Cys-Temporin-SHf Karakterizasyonu	1-2	Nisa Nilsu Çelebi
Cys-Temporin-SHf Konjuge GelMa Hidrojelinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi	1-3	Nisa Nilsu Çelebi
Cys-Temporin-SHf Konjuge Edilmiş GelMa Hidrojelinin Sitotoksite Analizi	1-3	Nisa Nilsu Çelebi
Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi	1-2	Nisa Nilsu Çelebi

Tablo 7.2. Tahmini Maliyet Planlaması

Adı, Modeli	Toplam Bedeli (KDV Hariç, TL)	Gereçesi	Tablo 7.1'e göre Harcamaların Yapılacağı Ay
Pipet ucu, 1-10 ul hacimli, 1000 adet/poşet	220 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Pipet ucu, 20-200 ul hacimli, 1000 adet/poşet	240 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Pipet ucu, 100-1000 ul hacimli, 1000 adet/poşet	300 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Eppendorf tüpleri 1,5 ml lik 500 adet/poşet	250 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Eppendorf tüpleri 2 ml lik 500 adet/poşet	250 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Pudrasız Eldiven (orta boy), 100 çift	125 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Sitenin aminoasiti (25 g)	1.400 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Fenilalanin aminoasiti (25 g)	2.400 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Izolösin aminoasiti (25 g)	950 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Arginin aminoasiti (25 g)	3.500 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Lösin aminoasiti (25 g)	950 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Serin aminoasiti (25 g)	2.400 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
HATU (25 g)	2.500 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
50 mL Santrifüj Tüpü 100 adet/poşet	740 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
15 mL Santrifüj Tüpü 500 adet/poşet	1.850 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
96 kuyucuklu plaka 50 adet/poşet	1.500 TL	İş paketi 4.5 ve 4.6'da kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
24 kuyucuklu plaka 50 adet /poşet	1.500 TL	İş paketi 4.5 ve 4.6'da kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Tryptic Soy Broth (TSB) 500 g	1.450 TL	İş Paketi 4.5'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Triptikaz Soya Agar (TSA) 500 g	4.550 TL	İş paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959) (10 g)	1.800 TL	İş Paketi 4.2'de kullanılacaktır.	1.Ay-2.Ay
Metakrilik Asit (100 g)	2.000 TL	İş Paketi 4.2'de kullanılacaktır.	1.Ay-2.Ay
Diklorometan (DCM) 2 L	4.000 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
N,N-Dimetilformamid (DMF) 2L	4.000 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Triethanolamine Buffer (120 mL)	2.500 TL	İş Paketi 4.3'de kullanılacaktır.	1.Ay-2.Ay

MTT	7.400 TL	İş Paketi 4.6'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Rink Amide MBHA (25 g)	12.800 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Serological Pipet (5,10,25 mL)	4.110 TL	İş Paketi 4.6'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Trypsin-EDTA Solution 100 mL	850 TL	İş Paketi 4.6'da kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Penicilin-Streptomycin 100 mL	750 TL	İş Paketi 4.6'da kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Diethyl Ether 1L	4.500 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Corning® Cell Culture Flasks 25 cm <sup>2</sup> ,75cm <sup>2</sup>	8.250 TL	İş Paketi 4.6'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Fetal Sığır Serum (FBS)	4.600 TL	İş Paketi 4.6'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
N,N- Diisopropylethylamine (DIEA)	925,07 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
DMEM-500 ml-2 adet	360 TL	İş Paketi 4.6'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Trifloraasetik asit (TFA)100g-1 adet	185,46 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Trizopropilsilan (TIPS) 10g-1 adet	790,30 TL	İş Paketi 4.1'de kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Selüloz Membran Diyaliz Tüpü (6-8kD)	4.520 TL	İş Paketi 4.2'de kullanılacaktır.	1.Ay-2.Ay
Parafilm-1 adet	955 TL	Tüm iş paketlerinde kullanılacaktır.	1.Ay-3.Ay
Phosphate Buffer Saline PBS	2.740 TL	İş Paketi 4.2'de kullanılacaktır.	1.Ay-2.Ay
<b>Toplam Tutar</b>	95.110,83TL + % 18 KDV =112.230,78 TL		
<b>Talep Edilen Toplam Tutar</b>	112.230,78 TL		

### 8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi

Türkiye'de 9 milyon 20 bin kişi diyabet rahatsızlığı ile mücadele etmektedir. Diyabet hastalarında meydana gelen normal yaraların enfekte olması sonucunda kronik yaralar oluşur. Diyabet rahatsızlığı sonucunda oluşan yaraların doğru bir şekilde bakımı yapılmazsa diyabetik ülser dönüşme ihtimali oldukça yüksektir. Bu durum diyabet hastaları için zor bir süreçtir çünkü iyileşmesi zaman alırken oldukça da maliyetli bir durumdur. Proje sonunda yapılacak olan yara örtüsünün hedefi iyileşme süresini ve maliyetini düşürmektir.

Tasarlanacak olan yara örtüsünün normal yaralar yerine özellikle enfeksiyonlu yaraların tedavisinde kullanılmasının nedeni ise hücre dışı matrisini taklit edebilen ve nem çekici özelliği olan GelMa ile antimikrobiyal peptidin konjuge edilmiş olmasıdır.

Bu projde diyabetik ülser yaralarına sahip olan hastalara hitap edecektir. Ayrıca diyabetik ülser yarası aslında bir enfeksiyon yarası olduğu için normal enfeksiyonlu yaralara sahip hastalarda da kullanılabilir.

## 9. Riskler

Proje kapsamında oluşabilecek 3 büyük risk vardır.

1. GelMa hidrojel oluşturulurken UV ışını ile etkileşiminden sonra jelleşmemesi problemi olabilir. Jelleşmeme probleminin düzelmesi için UV ışının parametreleri değiştirilerek problem çözülebilir.
2. Peptid sentezi katı madde aşamalı üretileceği için peptid dizilerindeki sekans hataları peptid dizilerinin, saflaştırılması ve karakterizasyonu sırasında belirlenecektir ve bu durum peptidin etkinliğini etkileyeceğinden potansiyel bir risk olarak görülür. Sekans hatalarının sebebi sentez sırasında amino asitlerin yan reaktif grubu ile önceki amino asitlerin reaksiyona girmesi veya eklenmesi diğerlerine göre daha zor olan amino asitlerin varlığı ile ilgilidir. Belirli bir aminoasitin peptid zincirine eklenirken zorluk çekilmesi durumunda N-ethyl-diisopropylamine (DIEA) ve HBTU (O-benzotriazole-N,N,N,N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate) gibi ekleme ajanlarının (couplingagents) farklı konsantrasyonlarda birlikte kullanımı ile reaksiyon tekrarlanacaktır. Bu konsantrasyonlar literatürde belirtildiği şekilde kullanılacaktır.
3. Peptidlerin hidrojel yüzeyindeki konjugasyonu sonucunda verimin yeterli olmaması ve buna bağlı olarak peptid yüzey konsantrasyonunun düşük olması ve hidrojel tabakasının immobilize etkinliğinin düşük olması bir risk oluşturur. Peptid konjugasyonunda uygulanan yöntemin yeteri kadar verimli olmaması durumunda ve buna bağlı olarak etkin konjugasyon elde edilememesi durumunda farklı konjugasyon yöntemleri denenecektir.

RİSK SKORU BELİRLEME MATRİSİ					
OLASILIK X ETKİ	1 ÇOK HAFİF	2 HAFİF	3 ORTA	4 CİDDİ	5 ÇOK CİDDİ
1 ÇOK AZ	1 İHMAL EDİLEBİLİR	2 İHMAL EDİLEBİLİR	3 DÜŞÜK	4 DÜŞÜK	5 DÜŞÜK
2 AZ	2 İHMAL EDİLEBİLİR	4 DÜŞÜK	6 DÜŞÜK	8 ORTA	10 ORTA
3 ORTA	3 DÜŞÜK	6 DÜŞÜK	9 ORTA	12 ORTA	15 YÜKSEK
4 YÜKSEK	4 DÜŞÜK	8 ORTA	12 ORTA	16 YÜKSEK	20 YÜKSEK
5 ÇOK YÜKSEK	5 DÜŞÜK	10 ORTA	15 YÜKSEK	20 YÜKSEK	25 TOLERE EDİLEMEZ

Tablo 9.1.Risk Haritası

		ETKİ	OLASILIK	RİSK PUANI
RİSK 1	GelMa'nın UV ışınından sonra jelleşme problemi	2	2	4
RİSK 2	Peptit dizisindeki sekans hataları sonucu peptitin etkinliğinin etkilenmesi	1	2	2
RİSK 3	Peptit ile hidrojel konjugasyonu sonucunda verimin yeterli olmaması	2	3	6

Tablo 9.2. Risk-Olasılık Tablosu

## 10. Kaynaklar

- Abbassi, F., Lequin, O., Piesse, C., Goasdoué, N., Foulon, T., Nicolas, P., & Ladram, A. (2010). Temporin-SHf, a New Type of Phe-rich and Hydrophobic Ultrashort Antimicrobial Peptide \*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16880-16892. doi:10.1074/jbc.M109.097204
- Batoni, G., Maisetta, G., Brancatisano, F. L., Esin, S., & Campa, M. (2011a). Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits. *Current Medicinal Chemistry*, 18(2), 256-279. doi:10.2174/092986711794088399
- Batoni, G., Maisetta, G., Brancatisano, F. L., Esin, S., & Campa, M. (2011b). Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem*, 18(2), 256-279. doi:10.2174/092986711794088399
- Dalla Paola, L. (2013). Diabetic foot wounds: the value of negative pressure wound therapy with instillation. *Int Wound J*, 10 Suppl 1(Suppl 1), 25-31. doi:10.1111/iwj.12174
- Fleck, C. A. (2006). Fighting infection in chronic wounds. *Adv Skin Wound Care*, 19(4), 184, 186, 188. doi:10.1097/00129334-200605000-00009
- Florio, W., Freer, G., Daila Casa, B., Batoni, G., Maisetta, G., Senesi, S., & Campa, M. (1997). Comparative analysis of subcellular distribution of protein antigens in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. *Can J Microbiol*, 43(8), 744-750. doi:10.1139/m97-107
- Francesko, A., Petkova, P., & Tzanov, T. (2018). Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Curr Med Chem*, 25(41), 5782-5797. doi:10.2174/0929867324666170920161246
- Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet*, 349(9049), 418-422. doi:10.1016/S0140-6736(97)80051-7
- Hourel, N. N. (2014). Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *ScientificWorldJournal*, 2014, 398412. doi:10.1155/2014/398412
- Kalantari, K., Mostafavi, E., Afifi, A. M., Izadiyan, Z., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: promises and pitfalls. *Nanoscale*, 12(4), 2268-2291. doi:10.1039/c9nr08234d
- Karaman, O., Kumar, A., Moeinzadeh, S., He, X., Cui, T., & Jabbari, E. (2016). Effect of surface modification of nanofibres with glutamic acid peptide on calcium phosphate nucleation and osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 10(2), E132-E146. doi:10.1002/term.1775
- Kaya, A., Aydin, F., Altay, T., Karapinar, L., Ozturk, H., & Karakuzu, C. (2009). Can major amputation rates be decreased in diabetic foot ulcers with hyperbaric oxygen therapy? *International orthopaedics*, 33, 441-446. doi:10.1007/s00264-008-0623-y
- Mangoni, M. L., McDermott, A. M., & Zasloff, M. (2016). Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Experimental dermatology*, 25(3), 167-173. doi:10.1111/exd.12929
- Masood, N., Ahmed, R., Tariq, M., Ahmed, Z., Masoud, M. S., Ali, I., . . . Hasan, A. (2019). Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *Int J Pharm*, 559, 23-36. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.01.019



- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb Drug Resist*, 24(6), 747-767. doi:10.1089/mdr.2017.0392
- Nazir, F., Ashraf, I., Iqbal, M., Ahmad, T., & Anjum, S. (2021). 6-deoxy-aminocellulose derivatives embedded soft gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels for improved wound healing applications: In vitro and in vivo studies. *Int J Biol Macromol*, 185, 419-433. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.112
- O'Grady, B., Balotin, K., Bosworth, A., McClatchey, P., Weinstein, R., Gupta, M., . . . Lippmann, E. (2019). Development of an N-Cadherin Biofunctionalized Hydrogel to Support the Formation of Synaptically Connected Neural Networks. doi:10.1101/729079
- Obagi, Z., Damiani, G., Grada, A., & Falanga, V. (2019). Principles of Wound Dressings: A Review. *Surg Technol Int*, 35, 50-57.
- Onak, G., Ercan, U. K., & Karaman, O. (2020). Antibacterial activity of antimicrobial peptide-conjugated nanofibrous membranes. *Biomedical Materials*, 16(1), 015020. doi:10.1088/1748-605x/abb722
- Onak, G., Ercan, U. K., & Karaman, O. (2020). Antibacterial activity of antimicrobial peptide-conjugated nanofibrous membranes. *Biomed Mater*, 16(1), 015020. doi:10.1088/1748-605X/abb722
- Onak, G., Şen, M., Horzum, N., Ercan, U. K., Yaralı, Z. B., Garipcan, B., & Karaman, O. (2018). Aspartic and Glutamic Acid Templated Peptides Conjugation on Plasma Modified Nanofibers for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study. *Sci. Rep.*, 8(1), 17620. doi:10.1038/s41598-018-36109-5
- Park, J. H., Moon, Y. H., Bang, I. S., Kim, Y. C., Kim, S. A., Ahn, S. G., & Yoon, J. H. (2010). Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers Med Sci*, 25(5), 705-710. doi:10.1007/s10103-010-0781-1
- Rehman, S. R. U., Augustine, R., Zahid, A. A., Ahmed, R., Tariq, M., & Hasan, A. (2019). Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. *Int J Nanomedicine*, 14, 9603-9617. doi:10.2147/ijn.s218120
- Siddiqui, A. R., & Bernstein, J. M. (2010). Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 28(5), 519-526. doi:10.1016/j.clindermatol.2010.03.009
- Stempel, N., Strehmel, J., & Overhage, J. (2015). Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des*, 21(1), 67-84.
- Triller, C., Huljev, D., & Planinsek Rucigaj, T. (2013). [Modern wound dressings]. *Acta Med Croatica*, 67 Suppl 1, 81-87.
- Yang, X., Sun, X., Liu, J., Huang, Y., Peng, Y., Xu, Y., & Ren, L. (2021). Photo-crosslinked GelMA/collagen membrane loaded with lysozyme as an antibacterial corneal implant. *Int J Biol Macromol*, 191, 1006-1016. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.09.144
- Yoon, H., Shin, S., Cha, J., Lee, S.-H., Kim, J.-H., Do, J. T., . . . Bae, H. (2016). Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *PLoS One*, 11, e0163902. doi:10.1371/journal.pone.0163902
- Yoshii, Y., Kusakabe, T., Akita, K., Tung, W. L., & Ishii, T. (2017). Reproducibility of three dimensional digital preoperative planning for the osteosynthesis of distal radius fractures. 35(12), 2646-2651. doi:<https://doi.org/10.1002/jor.23578>