KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KUZU İNCE BAĞIRSAK SUBMUKOZASINDAN HÜCRELERİNDEN ARINDIRMA YÖNTEMİ İLE YARA ÖRTÜSÜ ELDESİ VE DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE İNCELENMESİ

GAMZE KARA

KOCAELİ 2015

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMER BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KUZU İNCE BAĞIRSAK SUBMUKOZASINDAN HÜCRELERİNDEN ARINDIRMA YÖNTEMİ İLE YARA ÖRTÜSÜ ELDESİ VE DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE İNCELENMESİ

GAMZE KARA

Yrd.Doç.Dr. Halime KENAR
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Doç.Dr. Güralp ÖZKOÇ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Yrd.Doç.Dr. Deniz YÜCEL
Jüri Üyesi, Acıbadem Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 26.06.2015

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim ve öğretimimde bilgi, beceri ve deneyimleriyle her an yanımda olan, manevi desteğini benden hiçbir koşulda esirgemeyen ve beni yönlendiren, samimiyetiyle ailemden biri gibi hissettiğim değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Halime KENAR'a

Tez çalışmamda örneklerimin SEM görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünden sayın Prof. Dr. Muzaffer ZEREN ve Sayın Uzman Serap GÜMÜŞ'e, Patoloji incelemelerini yapan Yrd. Doç. Dr. Çiğdem VURAL'a, Patoloji kesitlerini almamda yardımcı olan manevi abim Sertan Arkan'a, Patoloji bilgi ve deneyimleriyle tezimde yardımcı olan Aini Wulamujiang'a, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı başkanımız Güralp ÖZKOÇ'a

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile her konuda yardımcı olan, manevi destek ve yardımlarını benden esirgemeyen ve bana inanan en iyi dostum Candan YILMAZ'a

İstatistik çalışmalarında bana yol gösteren Doç. Dr. Canan BAYDEMİR'e ve protein analizlerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Vildan ÖZASLAN'a

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için, 2014-99 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim babam Ali Kara'ya, annem Nazife Kara'ya, kardeşim Baransel Kara'ya ve her durumda yanımda olup, bana destek olan Burak Mağden'e
Teşekkür ederim.

Haziran - 2015 Gamze KARA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
ÖZET viii
ABSTRACT ix
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Biyomalzemeler 4
1.1.1. Polimer malzemeler 4
1.1.1.1. Sentetik polimerler 6
1.1.1.2. Doğal polimerler 6
1.1.1.3. Çapraz bağlayıcılar 8
1.1.1.4. Çapraz bağlayıcı seçimi 9
1.2. Derinin Yapısı ve İşlevi 10
1.2.1. Derinin yapısı 11
1.2.1.1. Epidermis 11
1.2.1.2. Dermis 12
1.2.2. Derinin işlevi 12
1.3. Deri Yaralanmaları 13
1.4. Yara İyileşmesi 14
1.5. Kronik Yaralar: Diyabetik Yaralara Giriş 16
1.6. Yara İyileşmesinde Kullanılan Yara Örtüleri 22
1.7. Deri Doku Mühendisliği Ürünleri 24
2. MALZEME VE YÖNTEM 26
2.1. İnce bağırsak Submukozasının (SIS) Hücrelerinden Arındırılması ve Karakterizasyonu 26
2.1.1. İnce bağırsak submukozasının (SIS) hücrelerinden arındırılması 27
2.1.2. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozasının hematoksilen & eozin (H&E) ve Masson trikrom boyaması 28
2.1.3. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukoza membranların DNA içeriğinin belirlenmesi 28
2.1.4. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozasının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi 29
2.2. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları 29
2.2.1. Hücre kültürü 29
2.2.2. Sitotoksisite testleri: WST-1 ve ölü/canlı hücre boyaması 30
2.2.3. İnsan endotel (HUVEC) ve deri fibroblast hücrelerinin hücrelerinden arındırılmış SIS membranlar üzerinde kültürü ve kılcal damar ağı oluşumunun belirlenmesi 31
2.3. Sünger Yapıların Hazırlanışı ve Karakterizasyonu 31

2.3.1. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskopisi: gözenek çapı hesaplaması 32
2.3.2. Sünger yapıların su tutma kapasitelerinin belirlenmesi ve şişme oranın hesaplanması 32
2.3.3. Sünger yapıların erozyon oranlarının hesaplanması 33
2.3.4. Sünger yapıların mekanik özelliklerinin belirlenmesi 33
2.4. In Vivo Çalışmalar 33
2.4.1. Diyabetik sıçan modelinin oluşturulması 34
2.4.2. Sünger yapıların tam kalınlık yara modeline uygulanması ve takibi 34
2.5. Patoloji Çalışmaları 35
2.6. İstatistiksel Analiz 36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 37
3.1. Hücrelerinden Arındırılmış Ince Bağırsak Submukozası (SIS) Bileşenleri ve Biyouyumluluk Bulguları 37
3.1.1. DNA içeriği 38
3.1.2. H&E boyama 38
3.1.3. Kollajen içeriği (Masson trikrom boyama) 38
3.1.4. Taramalı elektron mikroskobu analizi 39
3.1.5. Sitotoksisite bulguları 40
3.1.6. İnce bağırsak submukozası üzerinde kılcal damar ağı oluşumu 41
3.2. Sünger Yapıların Fiziksel Özellikleri 44
3.2.1. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskobu analizi 45
3.2.2. Sünger yapıların su tutma kapasiteleri ve şişme oranı bulguları 47
3.2.3. Sünger yapıların erozyon oranları 48
3.2.4. Sünger yapıların mekanik özellikleri 49
3.3. Sünger Yapıların In Vivo Bulguları 50
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 56
KAYNAKLAR 60
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 64
ÖZGEÇMİŞ 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hyaluronik asitin gluteraldehit ile çapraz bağlanması.....8
Şekil 1.2. Jelatinin çapraz bağlanmasının şematik gösterimi.....10
Şekil 1.3. Derinin tabakaları.....11
Şekil 1.4. Yara iyileşmesinin fazları.....16
Şekil 1.5. Normal ve diyabetik yara iyileşme fazları.....20
Şekil 2.1. İnce bağırsak tabakaları.....26
Şekil 2.2. Doğal SIS'in görünümü.....27
Şekil 2.3. A. IKA® A10 öğütücü, B. Öğütülmüş stok SIS.....27
Şekil 2.4. Diyabetik sıçan modelinde tam kalınlık yara modeli.....35
Şekil 3.1. Kuzu ince bağırsak submukozası A. Kuzu ince bağırsak submukozasının doğal hali, B. Kuzu ince bağırsak submukozasının hücrelerinden arındırıldıktan sonraki hali.....37
Şekil 3.2. İzole edilen SIS katmanının H&E boyaması. A. SIS, B. Hücrelerinden arındırılmış SIS (Orjinal büyütme 20X).....38
Şekil 3.3. Masson trikrom boyaması. A. SIS (Orjinal büyütme 20X), B. Hücrelerinden arındırılmış SIS (Orjinal büyütme 40X).....39
Şekil 3.4. Hücrelerinden arındırılmış SIS'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....39
Şekil 3.5. WST-1 testi sıfırıncı ve üçüncü gün abzorbans ölçüm değerleri. TCP: doku kültürü polistireni (pozitif kontrol), SIS:hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozası……..40
Şekil 3.6. Hücrelerinden arındırılmış SIS üzerindeki hücrelerin canlı-ölü boyama floresan mikroskop görüntüleri. A. Fibroblast hücreleri B. Fibroblast-endotel hücre ko-kültürü (Orjinal büyütme: 10X) Yeşil: canlı hücre, kırmızı: ölü hücre.....41
Şekil 3.7. Fibroblast hücrelerin falloidin-FITC boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri (Orjinal büyütme:20X).....42
Şekil 3.8. Endotel hücrelerin (HUVEC) anti-CD31 FITC immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri (Orjinal büyütme:20X).....42
Şekil 3.9. Fibroblast ve endotel hücrelerin SIS üzerinde 14 gün sonunda oluşturduğu kılcal damar ağının floresan mikroskop görüntüleri A. Anti-von Willebrand-Texas Red ile immünfloresan boyanmış kılcal damar ağı, 10X, B. Anti-von Willebrand-Texas Red ile immünfloresan boyanmış Kılcal damar ağı ve falloidin-FITC ile floresan boyama, 20X. Kırmızı: kılcal damar ağı, yeşil: aktin filamanlar, mavi: hücre çekirdekleri (DAPI).....43
Şekil 3.10. Elde edilen sünger yapıların makroskobik görüntüleri. A. G:HA:SIS sünger B. G:HA sünger C. G sünger.....44

Şekil 3.11. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. 1A. G sünger kesit görüntüsü, 1B. G sünger yüzey görüntüsü, 2A. G:HA sünger kesit görüntüsü, 2B. G:HA sünger yüzey görüntüsü, 3A. G:HA:SIS sünger kesit görüntüsü, 3B. G:HA:SIS sünger yüzey görüntüsü (Ölçek çubuğu: 100 mikron).....46
Şekil 3.12. G, G:HA ve G:HA:SIS sünger malzemelerin su tutma kapasiteleri.....47
Şekil 3.13. G, G:HA ve G:HA:SIS sünger yapıların erozyon grafiği.....48
Şekil 3.14. Diyabetik sıçan modelinde patolojik kesitlerden alınan H&E boyalı örneklerde PMNL hücrelerinin incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 40X) 51
Şekil 3.15. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde yabancı cisim reaksiyonu varlığının incelenmesi A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 20X).....52
Şekil 3.16. Diyabetik sıçan modelinde patolojik kesitlerden alınan örneklerde kapiller proliferasyonun incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 20X).....52
Şekil 3.17. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde epidermis oluşumunun incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA: SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 10X). Ok yönü: A ve B:epitel tabaka eksikliği, C ve D: tamamlanmış epitel tabaka 54
Şekil 3.18. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde kollajen Varlığının incelenmesi, A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 10X).....55

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Jelatin malzemelerin karakteristik özellikleri 7
Tablo 1.2. Dünyada 2013 yılında gerçekleşmiş ve 2035'de beklenen Diyabet hastası sayıları: ilk 10 ülke.....18
Tablo 1.3. Diyabetik ayak yaralarında Wagner sınıflandırması 21
Tablo 1.4. Günümüzde diyabetik ayak yaralarının tedavisinde kullanılan ticari ürünler.....24
Tablo 1.5. Kronik yaralarda kullanılan ticari deri greftleri.....24
Tablo 3.1. Basma bulguları.....49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

DA	: Diyabetik Ayak
DM	: Diyabetis Mellitus
DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGM-2	: Endothelial Cell Growth Medium (Endotel Hücre Büyütme Besiyeri)
ESB	: European Society For Biomaterials (Avrupa Biyomalzeme Topluluğu)
GA	: Gluteraldehit
HA	: Hyaluronik Asit
H&E	: Hematoksilen & Eozin
IDF	: International Diabetes Federations (Uluslararası Diyabet Federasyonu)
MTT	: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
PAF	: Platelet Aktivasyon Faktörü
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Poli (Laktik-Ko-Glikolik Asit)
PMMA	: Poli (Metil Metakrilat)
SDS	: Sodium Dodesil Sülfat
SIS	: Small Intestinal Submucosa (İnce Bağırsak Submukozası)
TGF	: Trans-Forming Growth Factor (Transforme Edici Büyüme Faktörü)
WST-1	: 2 - (4 - İyodofenil) - 3 - (4 - Nitrofenil) - 5 - (2,4Disulfofenil) - 2H - Tetrazolyum - 1,3, - benzen disülfon

KUZU İNCE BAĞIRSAK SUBMUKOZASINDAN HÜCRELERİNDEN ARINDIRMA YÖNTEMİ İLE YARA ÖRTÜSÜ ELDESİ VE DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Son yıllarda ülkemizde ve dünyada sık görülen diyabetik ayak yaraları, teknolojideki hızlı ilerlemeye rağmen ciddi oranda ekonomik kayıp ve hızlı gelişen ölümlerin nedenidir. Dünya genelinde travma dışı nedenlere bağlı ayak kesilmesi (amputasyon) sebepleri arasında diyabet birinci sırada yer almaktadır. Bu yaraların hızlı gelişmesi ve iyileşmesinin uzun sürmesi nedeniyle iyileşme sürecini kısaltacak yara örtülerine fazlasıyla ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde domuz bağırsağından elde edilen submukozadan geliştirilen biyomalzemeler üzerine yoğunlaşılmıştır.

Çalışmamızda kuzu ince bağırsağından (SIS) hücrelerinden arındırma yöntemiyle diyabetik ayak yaralarının tedavisinde kullanım amaçlı biyouyumlu sünger yapı geliştirilmiştir ve diyabetik rat modelinde tam kalınlık yarada iyileştirme potansiyeli araştırılmıştır. Hücrelerinden arındırılmış kuzu ince bağırsak submukozasının insan fibroblast hücre kültüründe sitotoksik bir etkisinin olmadığı ve fibroblast-endotel ko-kültüründe kılcal damar ağı oluşumunu desteklediği görülmüştür. Diyabetik rat modelinde test etmek üzere glutaraldehit ile çapraz bağlanmış üç farklı içerikte sünger yapı hazırlanmıştır: jelatin (G), jelatin:hyaluronik asit (G:HA) ve jelatin:hyaluronik asit:SIS (G:HA:SIS). Yedi günlük in vitro erozyon testi sonunda G:HA:SIS süngerlerin % 25,5 ağırlık kaybına uğradığı belirlenmiştir. Basma testinde tüm süngerler yakın Young modülüne sahip olurken G:HA:SIS en yüksek değeri vermiştir (5,00 ± 0,04 kPa). 12 günlük in vivo deneyin patolojik sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde, kontrol grubu ve G, G:HA ve G:HA:SIS grupları arasında, granülasyon doku kalınlığı, kollajen birikimi, kılcal damar ağı oluşumu ve yabancı cisim reaksiyonu kriterleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Diğer yandan, G:HA:SIS nakledilen hayvan grubunun % 80'inde epidermal tabaka tamamlanmış ve kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

Preklinik değerlendirmeler, bağırsak submukozasındaki hücre dışı ortamın (ECM) yara iyileşmesinde etkin bir biyomalzeme olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik Ayak Yarası, Hücrelerinden Arındırma, İnce Bağırsak Submukozası, Sünger, Yara İyileşmesi.

DEVELOPMENT OF A WOUND DRESSING FROM SHEEP SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA BY A DECELLULARIZATION METHOD AND ITS STUDY IN A DIABETIC RAT MODEL

ABSTRACT

Despite the fast development of technology in our country and in the World, diabetic foot wounds cause massive economical losses and deaths. Among the reasons of non traumatic foot amputations diabetes comes first. To reduce the healing time of these fast progressing wounds, effective wound dressings are highly needed. In literature, the focus is on biomaterials developed from porcine small intestinal submucosa (SIS).

In our study, sheep SIS based biocompatible sponges were prepared after SIS decellularization and their wound healing potential was investigated on full thickness skin defects in a diabetic rat model. The decellularized SIS membranes had no cytotoxic effects on human fibroblasts and supported capillary formation by HUVECs in a fibroblast-HUVEC co-culture. Glutaraldehyde crosslinked sponges of three different composition were prepared to test in a diabetic rat model: gelatin (G), gelatin:hyaluronic acid (G:HA) and gelatin:hyaluronic ascid:SIS (G:HA:SIS). The G:HA:SIS sponges underwent a 25,5 % weight loss in a 7-day in vitro erosion test. All sponges had a similar Young modulus under compression but G:HA:SIS had the highest value ($5{,}00 \pm 0{,}04$ kPa).

Statistical analyses of pathological results of a 12-day in vivo experiment at a significance level of $p < 0{,}05$ revealed no significant difference among the sham operated, G, G:HA, and G:HA:SIS transplanted groups in terms of granulation tissue thickness, collagen deposition, capillary vessel formation, and foreign body reaction ($p>0{,}05$). On the other hand, in the G:HA:SIS transplanted group 80% of the animals had a completed epidermal layer and this was significantly different than the sham group ($p<0{,}05$). Preclinical studies indicated that the ECM of small intestinal submucosa can be used as an effective biomaterial in wound healing.

Keywords: Diabetic Foot Ulcer, Decellularization, Small Intestinal Submucosa, Sponge, Wound Healing.

GİRİŞ

Günümüzde biyomalzemeler, biyolojik sistemlerle arayüz oluşturarak doku, organ ya da bunların işlevlerini ölçme, tedavi etme, destekleme ya da görevlerini tümden üstlenme amacıyla tasarlanan malzemeler olarak tanımlanmaktadır (ESB Consensus Conference II). Biyomalzemeler insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla temas kurarlar ve bu yüzden de biyomalzemelerin yüzey özellikleri, elektriksel, mekanik ve kimyasal olarak değişebilir. Biyomalzemelerin tüm bu zor koşullara dayanıklı olması gerekir (Pasinli ve diğ., 2004). Biyomalzemeler gelişmekte olan alanların başında gelmekle birlikte, kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır. Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler biyomalzeme kullanımının ilk kanıtlarındandır. Altının diş hekimliğinde kullanılması 2000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. 19. yüzyılın ortalarında, yabancı malzemelerin vucut içinde uygulamaları ile ilgili gelişmeler kaydedilmiştir. Örneğin, 1880'li yıllarda ilk fil dişi protezler vücuda yerleştirilmiştir, ilk metal protez vitalyum alaşımından 1938 yılında üretilmiştir. 1960'lı yılların başına kadar kullanılan bu protezler korozyona uğradığından ve ciddi tehlikeler yarattığından dolayı 1972'li yıllarda alumina ve zirkonya isimli seramik yapı keşfedilmiştir, ancak inert yapıdaki bu seramikler dokuya bağlanamadığından istenildiği gibi kullanılamamıştır. Aynı yıllarda Hench tarafından geliştirilen biyocam ve hidroksiapatit ile bu problem ortadan kaldırılmıştır.

Diğer alanlardaki başarılı gelişmeler ise 1950' li yıllarda kan damarlarının değişimi ve yapay kalp kapakçıklarının geliştirilmesi, 1960'lı yıllarda ise kalça protezlerinin geliştirilmesi şeklinde olmuştur. II. Dünya Savaşından sonraki yıllarda, paraşüt bezi (vinyon N) damar protezlerinde kullanılmıştır. 1970'lerde ilk sentetik ameliyat ipliği, poli(glikolik asit)'ten üretilmiştir. Biyomalzemelerin kullanım alanları sadece implantlarla sınırlı olmayıp, bu malzemeler vücut dışına yerleştirilen cihazlarda, eczacılık ve medikal malzemelerde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Medikal alanda en çok kullanılan malzemelerden biri de yara örtüleri olup, yara bakım marketlerinin önemli bir kolunu oluşturmaktadır. Çok eski çağlardan beri yağ, şeker, vb. gibi birçok maddenin yara iyileşmelerinde kullanıldığı bilinmektedir (Whipple ve diğ., 1963). Daha sonraları, pamuk (Gamgee, 1880) ve gazlı bez (Lumiene, 1903) ile birlikte antibiyotikli merhemler, antiseptik sıvılar bunların yerini almıştır. Günümüzde ise geleneksel tedavi yöntemlerinin yerini yaranın türüne ve bölgesine göre kullanılan uygun yara örtüleri almıştır (Stashak ve diğ., 2004). Eskiden yara iyileşmesinde doğal veya sentetik sargılar, pamuk ve gazlı bez gibi geleneksel örtüler tercih edilirken, bu durum diyabetik ve dekübütüs ülserleri, yanık, ameliyat yarası gibi kronik yaraların tedavisinde dermatologları, cerrahları ve plastik cerrahlarını büyük zorluklarla karşı karşıya bırakmıştır. Yaranın akut veya kronik olması, yara derinliği, hastanın yaşı, beslenme durumu gibi faktörler iyileşme durumunu komplike hale getirmektedir (Chen ve diğ., 1992).

Her geçen gün artan taleple birlikte, yara örtüleri alanındaki araştırma ve geliştirme çalışmaları çok çeşitli yapay ve biyolojik örtülerin üretilmesi üzerine devam ederken, kronik yaralar günümüzde büyüme faktörleri içeren biyoaktif yara örtüleri ve doku mühendisliği ürünleri ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır.

Vücutta hücre dışı ortamın biyoaktif moleküller ve hücreler için önemli bir taşıyıcı olma görevi vardır. Yara tedavisinde kullanılabilecek yara örtülerinde aranan özellikler arasında, hücre dışı ortam elemanları, büyüme faktörleri ve hücre yüzeyi reseptörleri ile spesifik etkileşimleri sağlayacak molekülleri içermesi ön planda gelmektedir (Akbuğa ve diğ., 2005).

Kuzu bağırsağının hücre dışı ortamında, özellikle de submukozasında kollajen, glikozaminoglikan, proteoglikan ve büyüme faktörleri içermesi bu malzemenin doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda iyi bir uygulama malzemesi adayı olabileceği izlenimini yaratmaktadır.

Bu çalışmada kuzu ince bağırsak submukozası hücrelerinden arındırılmıştır ve potansiyel bir yara örtüsü olarak insan fibroblast ve endotel hücre kültüründe biyouyumluluğu test edilmiş ve diyabetik sıçan modeli oluşturularak biyomalzeme tam kalınlık deri yarasının tedavisinde kullanılmıştır.

Hücrelerinden arındırılmış kuzu ince bağırsak submukozası kaynaklı sünger yapının biyouyumlu bir malzeme olduğu ve yara iyileşmesini hızlandırmada etkili olduğu gösterilmiştir.

Geliştirilen yapı diyabetik ayak ülserlerinin tedavisi başta olmak üzere birçok alanda yara iyileşmesini hızlandırma amaçlı kullanılabilecek bir yara örtüsüdür.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Biyomalzemeler

Biyomalzemeler vücut içi ortam ile sürekli etkileşim halinde olup, canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Biyomalzeme alanındaki önemli gelişmeler, yeni hücre kültürü teknikleri ve önemi kanıtlanan büyüme faktörleri, hayati önem taşıyan nakledilebilir doku ve organların üretilebilmesi için yeni olanaklar sağlamaktadır (Principles of Tissue Engineering, 1997).

Yara örtüsü geliştirmede kullanılan biyomalzemeler, sentetik polimerler ve doğal polimerler olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Her bir grubun kullanım amacına göre hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır. Bu malzemelerin mekanik özellikleri, elastisitesi (Young's modulus), yüzey özellikleri yara örtüsü tasarımı yapılırken göz önünde bulundurulmalıdır (O'Brien, 2011).

1.1.1. Polimer malzemeler

Polimerler, en genel tanımıyla yapılarında karbon ve hidrojen bulunduran küçük moleküllerin birbirine bağlanmasıyla elde edilen büyük moleküllerdir. Ucuz olmaları, modifiye edilebilmeleri ve kolay sentezlenmelerinden dolayı medikal uygulamalarda tercih edilen malzemelerden olmuşlardır.

Polimerik malzemelerin vücut içerisinde kullanılabilmeleri için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir ve bu özelliklere sahip olmayan malzemeler vücut içerisinde bir takım sorunlara neden olmaktadır. Bu özellikler en genel şekliyle aşağıdaki gibidir:

1. Biyobozunurluk: Vücut içerisinde kullanılan malzeme istenilen süre içerisinde parçalanmalı ve böylelikle hücreye kendi hücre dışı ortamlarını sentezlemeleri için gerekli olan zaman ve yeri kazandırmalıdır. Süre polimerin yapısına ve kullanılan

hücre türüne göre değişmektedir. Biyobozunurluk kavramı altında incelendiğinde polimerler, biyobozunur doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (Reinholz ve diğ., 2003). Biyobozunur doğal polimerlere; proteinler (soya, fibrin, ipek), polisakkaritler (nisasta, selüloz, kitin/kitosan, aljinat) ve güçlendirici/destekleyici olarak kullanılan doğal fibriller birer örnektir.

Biyobozunur sentetik polimerler; poli (metil metakrilat) (PMMA), poliesterler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit, Dacron, poli (etilen teraftalat) ve bazı poliüretanlar olarak sayılabilir (Freed ve diğ., 1994).

2. Biyouyumluluk: Uygulama sırasında vücutla uyumlu olup dokuda istenmeyen tepkiler meydana getirmeyen (pıhtı, iltihap, hücre ölümü, genotoksisite, kanser vb.), kendini çevreleyen dokuların normal değişimine engel olmayan malzemeler biyouyumlu olarak tanımlanabilir. Ek olarak parçalanma ürünleri de vücuda zarar vermemeli, toksik etki göstermemelidir. Wintermantel ve Mayer bu terimi biraz genişleterek biyomalzemenin yapısal ve yüzey uyumluluğunu ayrı ayrı tanımlamıştır. Yüzey uyumluluğu, bir biyomalzemenin vücut dokularına fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak uygun olmasıdır. Yapısal uyumluluk ise, malzemenin vücut dokularının mekanik davranışına sağladığı optimum uyumdur.

3. Mekanik dayanım: Malzeme yerleştirildiği bölge hedef alınırken, mekanik etkiler nedeniyle parçalanıp dağılmamalıdır. Polimerik biyomalzemeler doğal süreçleri içerisinde yavaş yavaş bozunarak kendisini oluşturan monomerlerine yıkılmalıdır.

4. Uygun yüzey kimyası: Polimerlerin, hücrelerin aktivite göstermesi ve bağlanması için uygun yapıya sahip olması ve gerekli olan fonksiyonel grupları üzerinde taşıması gerekmektedir.

5. Yüksek gözeneklilik: Polimerik biyomalzemelerin üzerine hücre yerleşmesi, birbirleri ile üç boyutlu etkileşmesi ve besin maddelerinin geçişi için biyomalzemenin gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir. Sünger yapısı hazırlanırken gözeneklilik miktarı ve boyutu uygun teknikler kullanılarak ayarlanabilir.

1.1.1.1. Sentetik polimerler

Genel olarak incelendiğinde alfa-hidroksi asit polimerler sınıfında olan ve parçalanma ürünleri vücuttan sindirilerek uzaklaştırılabilen polimerlerdir (Sittinger, 1996).

Bu sınıfın en çok kullanılan polimerleri PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit), PGA, PLA, bazen de Vicryl, Dacron ve diğer bazı poliüretanlardır, ancak en çok üzerinde çalışılan ilk üç polimer türüdür (Freed ve diğ., 1994). Sentetik polimerler, şekillendirme kolaylığı, parçalanma ürününün zararsız olması, biyobozunur ve biyouyumlu, dayanıklı, sünger malzemelerde yüksek gözenikliliğe sahip olması ve uzun süreli uygulamalarda kullanımının uygun olması gibi özellikleri taşımalıdırlar (Reinholz ve diğ., 2003).

1.1.1.2. Doğal polimerler

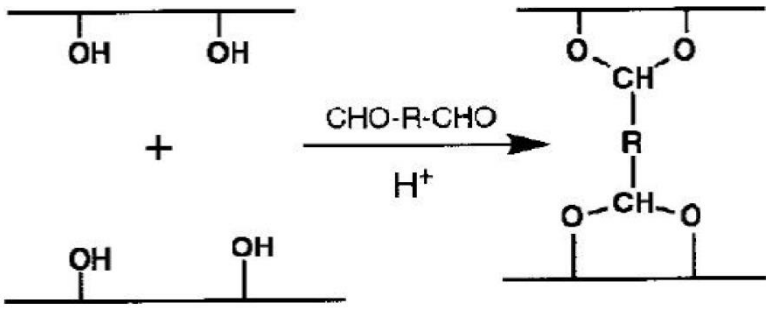
Doğal polimerlerin diğer malzemelerden en büyük farkı, bulundukları ortamda vücut tarafından reddedilmemeleri ve toksik etki göstermemeleridir (Grande ve diğ., 1997). Canlılarda bulunmaları, enzim varlığında bozunmaları, yüksek sıcaklıkta bozunmaları ve kaynağına göre bileşiminin değişmesi doğal polimerlerin sahip olduğu özellikler arasında sayılabilir (Reinholz ve diğ., 2003). Doğal polimerler arasında günümüzde en çok kullanılan malzemeler, kollajen, jelatin ve hyaluronik asittir. Jelatin doğal bir polimer olup ilaç ve medikal alandaki uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır, özellikle biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle yara örtüsü ve ilaç salım sistemlerinde kullanımı tercih edilmektedir. Jelatinin sünger, granül ve film hali sulu ortam içerisinde ve in vivo'da hızlıca bozunmaktadır. Jelatinin yapısının % 50,5'ini karbon, % 6,8'ini hidrojen, % 17'sini azot ve % 25,2'sini oksijen oluşturmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özellik değişimlerinde jelatin yapısını korumaktadır (Gelatin Handbook, 2012). Malzeme tasarımı yaparken kullanılacak olan malzemelerin yapısal özelliklerini çok iyi bilmek gerekir. İki tür jelatin malzeme vardır. Tip A jelatin asidik işlemle üretilirken, tip-B jelatin alkali işlem görmüş malzemedir (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. Jelatin malzemelerin karakteristik özellikleri (Tomıhata ve Ikada, 1997'den uyarlanmıştır)

Karakteristik özellikler	**Tip-A**	**Tip-B**
Jel Kuvveti	240-300	200-250
Vizkozite mp	44-55	45-60
pH	4,5-5,5	5,3-6,5

Jelatinin mekanik özelliklerinin, bozunma hızı gibi özelliklerinin arttırılması için genellikle çapraz bağlıyıcılar kullanılmaktadır. Jelatin biyolojik ortamlarda biyouyumlu ve biyobozunurdur, toksik değildir, çapraz bağlamada kullanılan kimyasallar jelatini toksik yapmaktadır (Ulubayram ve diğ., 2002). Bu sebeple malzeme tasarımı yapılırken kullanılan kimyasalın oranına dikkat etmek en önemli noktalardan birisidir.

Hyaluronik asit (HA) ise, biyolojik dokuların hücre dışı ortamında (ECM) bulunan glikozaminoglikanlardandır. Özellike tıp alanında ve kozmetik sektöründe fizyolojik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak HA'nın su içerisinde kolay çözünmesi ve biyolojik ortamlarda hızlı bozunması biyoteknoloji uygulamalarında sınırlamalar getirmektedir. Dolayısıyla daha etkili ve kalıcı uygulamalarda kullanılabilinmesi için kimyasal modifikasyonlarla desteklenmesi gerekmektedir. İlk sırada kullanılan kimyasal modifikasyon HA moleküllerini çapraz bağlamadır. Gluteraldehit (GA) gibi 2 aldehit grubu içeren kimyasal ile çapraz bağlandığında, HA'nın hidroksil grupları ile arada hemiasetalizasyon reaksiyonu oluşur (Şekil 1.1.). Sonuçlar incelendiğinde, çapraz bağlanmış HA'nın 37 °C' de 2 hafta sonunda tamamen bozunduğu gözlenmiştir (Tomihata ve Ikada, 1997).



Şekil 1.1. Hyaluronik asitin gluteraldehit ile çapraz bağlanması (Tomihata ve Ikada, 1997'den uyarlanmıştır)

Deri yaralarının yönetiminde kullanılan kollajen temelli iskeleler son yıllarda popüler olmaya başlamıştır. Özellikle transforme edici büyüme faktörü (TGF) yara iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır ve yara iyileşmelerinde kullanılan iskelelerin büyüme faktörlerini kendi bünyelerinde bulundurması yara iyileşmesini daha etkili bir biçimde desteklemelerine yardımcı olmaktadır. Çalışmada kullanılan ince bağırsak submukozası doğal bir biyomalzeme olup, kollojen, proteoglikan, glikosaminoglikan, glikoprotein ve birçok büyüme faktörünü barındırması sebebiyle, klinik uygulamalar ve doku mühendisliği uygulamalarında ideal bir biyomalzeme olmaya adaydır.

SIS'in yararları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Hasarlı doku yeniden onarılırken, doku için iskele görevi yapar,
- Hücresel uyarı ile konakçı hücrelerin gelişimini, yeni damar oluşumunu, farklılaşmayı ve bölgeye özgü doku yenilenmesine katkıda bulunmaktadır.

Domuz SIS'i sıçanlarda yara bölgesine transplante edildiğinde düşük immünojenisite gösterdiği saptanmış ve enflamatuar hücrelerin artışına neden olacak reaksiyonlar gözlemlenmemiştir. Günümüzde SIS iskeleler doku mühendisliği uygulamalarında arter, mesane, bağırsak sistemleri ve tendon tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Luo ve diğ., 2011).

1.1.1.3. Çapraz bağlayıcılar

Çapraz bağlama, iki veya daha fazla molekülü kovalent bağ ile kimyasal yolla ekleme yöntemidir. Çapraz bağlama ajanları protein veya diğer moleküllerde spesifik fonksiyonel gruplara tepkisel uç gruplar içerirler. Reaksiyon için hedef olabilen

protein ve peptitlerde birkaç kimyasal grubun kullanılabilirliğinden dolayı protein ve peptitler kolayca konjuge olurlar.

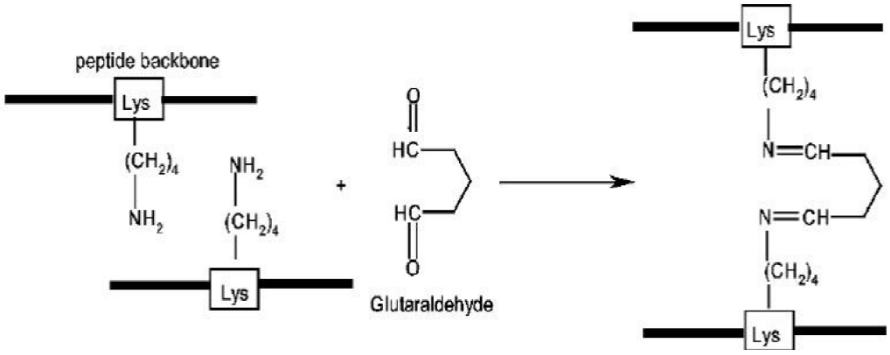
Çapraz bağlama ajanları proteinlerin üç boyutlu yapısı, katı faz immobilizasyonu, antijen taşıyıcı proteinlerin konjugasyonu ve hücre zarındaki moleküler birleşmede yakın molekül etkileşimlerinin belirlenmesinde de yardımcı rol oynarlar. (Cross-Linking Technical Hanbook, 2009).

1.1.1.4. Çapraz bağlayıcı seçimi

Çapraz bağlayıcılar kimyasal reaktivitelerine göre seçilirler (spesifik fonksiyonel gruplar gibi) ve reaksiyonun uyuşabilirliği önemlidir. Özel uygulamalar için en iyi çapraz bağlayıcı deneylerle desteklenmelidir.

Çapraz bağlayıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar;
• Kimyasal özellik
• Ara zincir uzunluğu
• Suda çözünürlük ve hücre zar geçirgenliği
• Aynı (homobifonksiyonel) veya farklı (heterobifonksiyonel) reaktif gruplar
• Kendiliğinden veya foto reaktif gruplar
• Yarılanabilirlik

Çapraz bağlayıcılar en az iki reaktif grup içerirler ve hedeflenen fonksiyonel gruplar; primer aminler, sülfhidriller, karboniller, karbohidratlar, karboksilik asitler'i kapsar. Günümüzde en çok kullanılan malzemelerden biri olan jelatinin gluteraldehit ile çapraz bağlanması Şekil 1.2.' de gösterilmiştir (Ulubayram ve diğ., 2002).

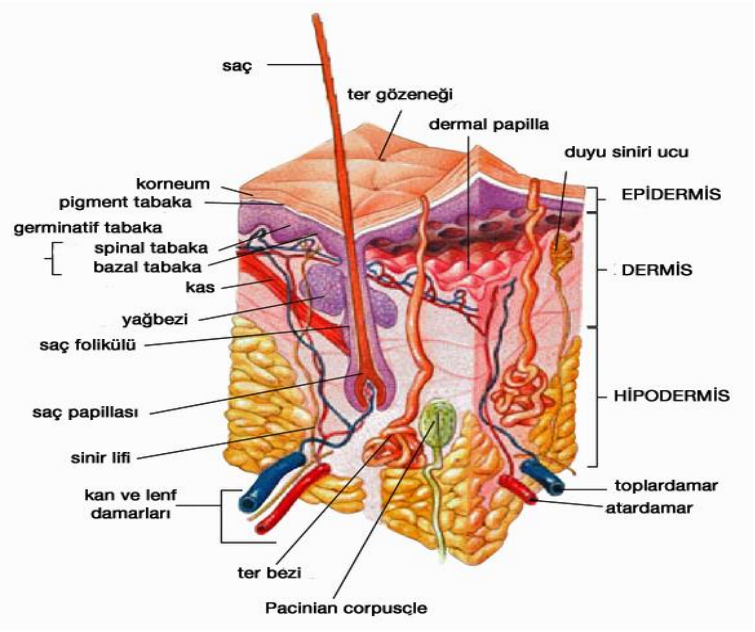


Şekil 1.2. Jelatinin çapraz bağlanmasının şematik gösterimi (Ulubayram ve diğ., 2002'den uyarlanmıştır)

Çalışmamızda kullandığımız gluteraldehitin çapraz bağlama şekli moleküller arası ve moleküller içi çapraz bağlamadır. Gough ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, gluteraldehitin sitotoksik bir kimyasal olduğu belirtilmiş fakat hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin yaşadığı ve gluteraldehitin herhangi bir apoptotik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Gough ve diğ., 2002).

1.2. Derinin Yapısı ve İşlevi

Deri (integument) vücudumuzun dışını kaplayan tabakayı oluşturmaktadır ve toplam kütlemizin %15-20'sini meydana getiren en büyük organımızdır. Deri, ektoderm kökenli epidermis ve mezoderm kökenli bağ dokusu katmanı olan dermisten oluşmaktadır. Epidermis tabakası sürekli büyümesine rağmen deskuamasyon yoluyla normal kalınlığını korumaktadır. Dermis ise deriye mekanik destek, dayanıklılık ve kalınlık kazandırmaktadır.



Şekil 1.3. Derinin tabakaları

Deri, vücudumuzu sarması ve dış çevreye direk temasından dolayı hayati fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Deri birçok farklı hücreyi bünyesinde bulunduran kompleks bir organdır. Bu hücrelerin çeşitlilikleri ve birlikte organize bir şekilde çalışmaları, bireyin ortama uyumunu sağlamakta ve dış çevreyle baş edebilmesine olanak sağlayan birçok fonksiyonu yerine getirmektedir (Temel Histoloji Text & Atlas, 2006).

1.2.1. Derinin yapısı

1.2.1.1. Epidermis

Epidermis esas olarak çok katlı yassı epitelden oluşmaktadır ve birbirinden farklı dört tabaka ile tanımlanmaktadır. Bu dört tabakadan staratum bazale, epidermal hücrelerin yenilenmesini sağlamaktadır, staratum spinozum'un hücreleri karakteristik olarak spinöz uzantılar sergiler, stratum granülozum'un hücreleri keratohiyalin granüller içerirken, stratum korneum, keratin filamentleri ile dolu çekirdeksiz yassı hücrelerden oluşmaktadır. Epidermis kan damarlarından yoksundur. (Temel Histoloji Text & Atlas, 2006).

1.2.1.2. Dermis

Dermis, epidermisi destekleyen ve deri altı dokusunu bağlayan bağ dokudan oluşmaktadır. Dermisin kalınlığı bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermektedir ve kesin olarak kalınlığı ölçülememektedir çünkü hipodermise kesin bir sınır olmadan uzanmaktadır.

Dermisin yüzeyi düzensizdir ve epidermisin uzantıları ile iç içe geçen çok sayıda uzantılara yani dermal papillalara sahiptir. Dermal papilla özellikle basınca sık olarak maruz kalan deri bölgelerinde bulunur ve dermis-epidermis bağlantı yüzeyini arttırır. Ayak tabanından alınan dermis, epitel hücrelerinin köken aldığı bölgeden bağımsız olarak daima aşırı derecede keratinize bir epidermis oluşmasını uyarmaktadır.

Dermis sınırları pek ayırt edilmeyen iki tabaka içermektedir. Bunlardan birincisi papiller tabaka diğeri ise daha derinde bulunan retiküler tabakadır. İnce papiller tabaka gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır ve fibroblast, makrofaj ve mast hücreleri bulunmaktadır. Papiller tabaka adını dermal papillanın büyük kısmını oluşturduğundan dolayı almıştır ve bu tabakadan bazal laminaya özel kollajen fibriller girmekte ve dermise kadar uzanmaktadır. Bu yapılar dermisi epidermise bağlar ve tutturucu fibriller olarak adlandırılmaktadır. Retiküler tabaka daha kalın olup, düzensiz bağ dokusundan oluşur ve bu nedenle papiller tabakaya göre daha bol life sahiptir. Bu yüzden de bu tabaka daha az hücre sayısına sahiptir. Lifler bazal laminaya doğru giderek amorf elastin bileşenini kaybeder ve bazal laminaya sadece mikrofibriler bileşeni sokulur, bu elastik ağ derinin esnekliğinden sorumludur.

Dermiste kıl folükülleri, ter ve sebase bezleri değişik konumlarda yer almaktadır. Ayrıca zengin kan ve lenf damar ağları da bu yapıda yerini almaktadır. Hipodermis yani subkutanöz katman ise gevşek bağ dokusunu içermektedir ve dermisin daha derin tabakalarını oluşturmaktadır (Temel Histoloji Text & Atlas, 2006).

1.2.2. Derinin işlevi

Derinin ana işlevleri aşağıda sıralanmıştır;

• Dış çevredeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlara karşı bir bariyer gibi davranır.

• Antijeni işleme sırasında elde edilen immünolojik bilgiyi lenfoid dokudaki uygun hücrelere aktarır.
• Homeostaz görevi vardır. (sıcaklık ve su kaybını düzenleme)
• Duyusal bilgileri sinir sistemine iletir.
• Hormonlar, sitokinlerle birlikte büyüme faktörlerini salgılayarak ve öncül moleküllerini hormonal olarak aktif moleküllere (D vitamini) dönüştürerek endokrin fonksiyonları gerçekleştirir.
• Ter bezlerinin ve apokrin bezlerin yaptığı ekzokrin salgılarıyla boşaltımda görev yapar.

Deri pH'sı 5,6'dır ve bu yüzden mikroorganizmaların yaşaması zordur. Ayrıca derideki skuamöz epitel hücreleri dökülerek mikroorganizmaları beraberinde sürükler. Deri hücreleri ayrıca melanin pigmenti yapar ve UV'ye karşı koruma sağlamaktadır (Temel Histoloji Text & Atlas, 2006).

1.3. Deri Yaralanmaları

Yara en genel tanımıyla, fiziksel yaralanma nedeniyle vücudun herhangi bir dokusuna ait yapıların anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulmasıdır. Yaralar doku kaybı olup olmamasına göre sınıflandırılır. Doku kaybı olmayan yaralar birincil iyileşmeyle granülasyon doku oluşumu ile düzelirler.

Doku kaybı olan yaralanmalar ise, deri katmanının bir kısmının veya tümünün zarar gördüğü veya kaybedildiği yaralanmalardır. Genellikle bu tür yaralarda iyileşme altta gelişen granülasyon dokunun defekti doldurması şeklinde ikincil iyileşme olarak gözlemlenir. Doku kaybı olan yaralanmalar, kaybedilen dokunun kalınlığına göre iki gruba ayrılmaktadır. İlki olan parsiyel kalınlıktaki yaralar, epidermisin tamamının, dermisin ise papiller tabakasının ortadan kalktığı yaralardır. Tam kalınlıktaki yaralar ise epidermis, dermisin tüm katlarının hatta subkutanöz dokunun harabiyetinin olduğu yaralardır.

Yaralar, fizyolojik durumlarına göre ise renk kodları altında 5 gruba ayrılmaktadır. Bunlar:
• Nekrotik (çürüyen) yaralar siyah renkte
• Kabuklu yaralar sarı renkte

• Granüle yaralar kırmızı renkte
• Epitelleşen yaralar pembe renkte
• İltihaplı yaralar yeşil renkte olmaktadır.

Bu beş grup fiziksel görünüşleri, mikrobik kontaminasyon seviyesi ve salgı miktarları bakımından farklılıklar göstermektedir. Nekrotik yaralarda, dokunun salgıladığı enzimlerle dokuyu eritmesi engellenmekte ve çürüyen hasarlı dokunun ayrılması gecikmektedir. Nekrotik yaralarda su kaybını önlemek önemlidir.

Kabuklu yaralarda, yara yüzeyine yapışan sarı bir örtü gözlemlenmektedir. Bu örtü seruma benzer salgılar, fibrin, protein, akyuvar ve bakterilerin bir bölümüdür. Bu tip yara tedavisinde öncelikle kabuk kısmı temizlenmeli veya uzaklaştırılmalıdır.

Granüle yaralarda ise, yara üzerinin kollajen ve proteoglikandan meydana gelen doku ile kaplanması yaranın normal iyileşme sürecine girdiğinin göstergesidir. Bu tip yaralar bol miktarda damar içerdiğinden dolayı kırmızı renktedir.

Yara iyileşmesinin son fazı, yara yüzeyinin epitelleşmesidir. Yüzeysel ve epitelleşen yaralar, daha az salgı üretmeye meyillidirler. Bu aşamada doku yumuşak ve hassastır.

Son olarak iltihaplı yaralarda ise, yara salgısı üretimi fazladır ve kötü kokular meydana gelmektedir. Burda önemli olan iltihabı kurutmak ve üremesini engelleyerek kontrol altına alabilmektir (Langenhove ve diğ., 2007).

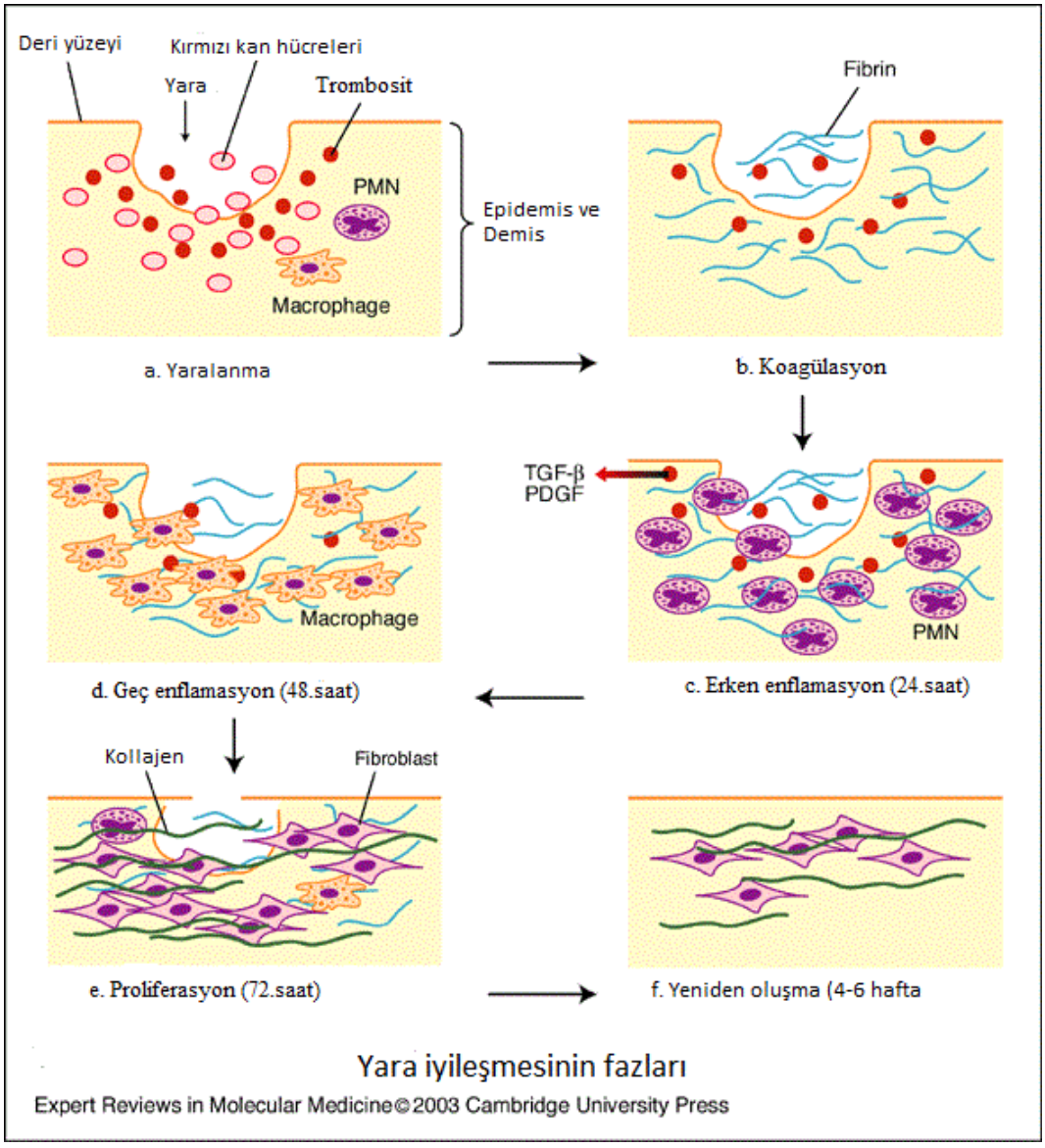
1.4. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, yaralanma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar sürecidir. Yara iyileşmesi, yaralanmaya karşı oluşan doğal bir yenilenme ve tamir cevabıdır (Ersöz ve diğ., 2008).

Yara iyileşmesi sistematik olarak üç temel bölümde incelenmektedir:
a) Enflamatuar evre
b) Proliferatif evre (Fibroblastik evre)
c) Maturasyon evresi (yeniden oluşma basamağı)

Enflamasyon basamağı 72 saat sürmekte olup, bu süre içerisinde kan pıhtılaşma sistemi aktive edilmekte ve trombositlerden PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü), PAF (trombosit aktivasyon faktörü), serotonin, adrenalin, tromboksan salımı sağlanmaktadır. Yara oluşumundan 14. güne kadar süren proliferatif basamakta, vaskülarizasyon oluşmaktadır. Bu sırada, lökositlere ek olarak histiositler, fibrositler, fibroblastlar, plazma hücreleri, mast hücreleri, anjiyoblastlar ve miyoblastlar yara olan bölgeye taşınır. Bununla birlikte aktive edilmiş lökositler endotel hücrelere tutunur ve mast hücrelerinden salgılanan bradikinin sonucunda vaskülarizasyon artar ve yüksek molekül ağırlıktaki maddeler hücre dışı boşluğa yayılır. Bunların sonucunda yara bölgesinde sıvı birikimi olur. Biriken sıvı fibrositlerin, fibroblastlara dönüşümünden kaynaklıdır. Bununla birlikte hücre proliferasyonu başlatılır ve granülasyon dokusunun oluşumu hızlanır. Bu dinamik doku değişikliği epitelizasyon için temel olup fibroblastlar gördüğümüz gibi bütün iyileşme basamağı boyunca yer değiştirir ve kan pıhtılarından elde ettiği aminoasitleri substrat olarak kullanıp sayıca çoğalırlar (Schwartz's Principles Of Surgery, 2005).

Yara iyileşmesinin son aşaması olan matürasyon basamağında bağ dokunun oluşumu çok önemlidir ve fibroblastların kollajen fibrillerini sentezlemesi ile mitotik aktivite durur. Bu evrede fibroblastların azalması ve kollajen fibrillerinin dengeye ulaşması ile birlikte, damarlı yapıya sahip granülasyon dokusu, yavaş yavaş şekil ve yapı değiştirerek skar dokuya dönüşür. Bu süreçte farklı formdaki kollajen yapılar ve protein molekülleri arasındaki çapraz bağlar sağlamlaşır ve skar dokusunun direncini arttırır (Ersöz ve diğ., 2008; Karasu ve diğ., 2008; Hanna ve diğ., 1997; Senol, 1995).



Şekil 1.4. Yara iyileşmesinin fazları (Cambridge Üniversitesi, 2003'den uyarlanmıştır)

1.5. Kronik Yaralar: Diyabetik Yaralara Giriş

Normal şartlar altında yaralar vücudun kendi onarım mekanizmaları aracılığıyla dışarıdan müdahale gerekmeden belli ölçülerde iyileşebilir. Ancak kendi haline bırakıldığında iyileşmeyecek, aksine daha da kötü duruma gidecek yaralar da vardır. Kronik yaralar olarak da belirtebileceğimiz bu yaraların etkin bir yara bakımı olmadan iyileşme imkânı yoktur.

Varis yaraları, arteriyel damar hastalıklarına bağlı yaralar, diyabetik yaralar, fiziksel travmalara bağlı yaralar, ikinci ve üçüncü dereceden yanıklar başlıca kronik

yaralardır. Çalışmamızda, diyabet hastalığı sonucu gelişen diyabetik ayak yaraları ele alınacaktır.

Diyabetis Mellitus'un (DM) kısaca tarihine bakacak olursak, diyabet hastalığı antik çağlarda karşımıza ciddi bir sağlık problemi olarak çıkmaktadır. DM ile ilgili en eski kayıt Milattan Önce 1550 yıllarında Mısır'da yazılmış olan papirüste bulunmuştur (Ebers papirusu M.Ö.1550). Bu kayıtlarda DM 'a benzer çok idrara çıkma ile seyreden bir durumdan bahsedilmektedir (Hatemi, 1996; Bağrıacık, 1997). Günümüzde tıp literatüründe kullanılmakta olan Diabetes ve Mellitus kelimeleri Yunanca 'akıp gitmek' anlamına gelen 'dia-betes' ve 'bal kadar tatlı' anlamına gelen 'mellitus' kelimelerinden türetilmiştir. Milattan Sonra (M.S) 2.yüzyılda Eski Roma uygarlığı döneminde, Anadolu topraklarında (Kapodakya; M.S 150) Areateus tarafından ilk defa Diabetes kelimesi kullanılmıştır. 17. yüzyılda İngiliz Doktor Thomas Willis tarafından DM hastalarının idrarlarının tatlı olduğu tekrar keşfedilmiştir ve vücudumuzun su dengesini ayarlayan hormon eksikliğini farkederek Diabetes İnsipidus ile Diabetes Mellitus'un ayrımını yapmıştır. Yirminci yüzyılın başında Zuelzer ve çalışma arkadaşları pankreastan kan şekerini düşüren bir çözelti elde etmişlerdir, ancak saf olmadığından dolayı istenmeyen sonuçlar doğurmuş ve kullanılamamıştır (Bağrıacık, 1997).

Banting ve arkadaşları 1921 yılında insülini izole etmişlerdir ve diyabet yapılmış köpekte denendiğinde kan şekerinin düştüğünü görmüşlerdir. İlk kez 1 Ocak 1922 tarihinde Collip, elde edilen insülini daha da saflaştırarak diyabetik hasta olan Leonard Thompson üzerinde denemiş ve DM hastalığını tedavi etmiştir (Bağrıacık, 1997). Dünya çapında diyabet hastalığı prevalansına bakıldığında oldukça büyük bir artış gözlenmekte ve diyabetik komplikasyonlar ciddi bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Diayabetes mellitus 2010 yılının en yaygın kronik hastalıklarından olup, 285 milyon yetişkin dünya çapında diyabetiktir. 2030 yılındaki tahminlere göre dünya çapında 439 milyon insanın diyabet olması beklenmektedir. Özellikle diyabetik hasta sayısının artmasının başında gelen sebepler, sağlıksız büyüme ve fast-food tarzı beslenmedir (Moura ve diğ., 2013). Avrupa ülkeleri arasında Türkiye, Diyabetin görülme sıklığı açısından % 14,8 ile birinci sıradadır. Uluslararası diyabet federasyonunun (IDF) 2013 verilerinde Türkiye'de tespit edilen diyabetik hasta sayısı yedi milyondan fazla olarak görülmektedir. Hastaların yaklaşık

olarak yarısı 40-60 yaş aralığındadır ve 18 bin 190 çocukta diyabet hastalığı olduğu vurgulanmıştır. Türkiye'de 2008-2013 yılları arasında yapılan çalışmada diyabetik hasta sayısı 5 milyon 217 bin 709 kişi olarak tesbit edilmiştir. IDF'in 2035 tahminlerine göre ise diyabetli hasta sayısı ile Türkiye, Avrupa ülkeleri arasında ilk 10 da yerini alacaktır (Tablo 1.2.) (IDF Diabetes Atlas Sixth edition, 2013).

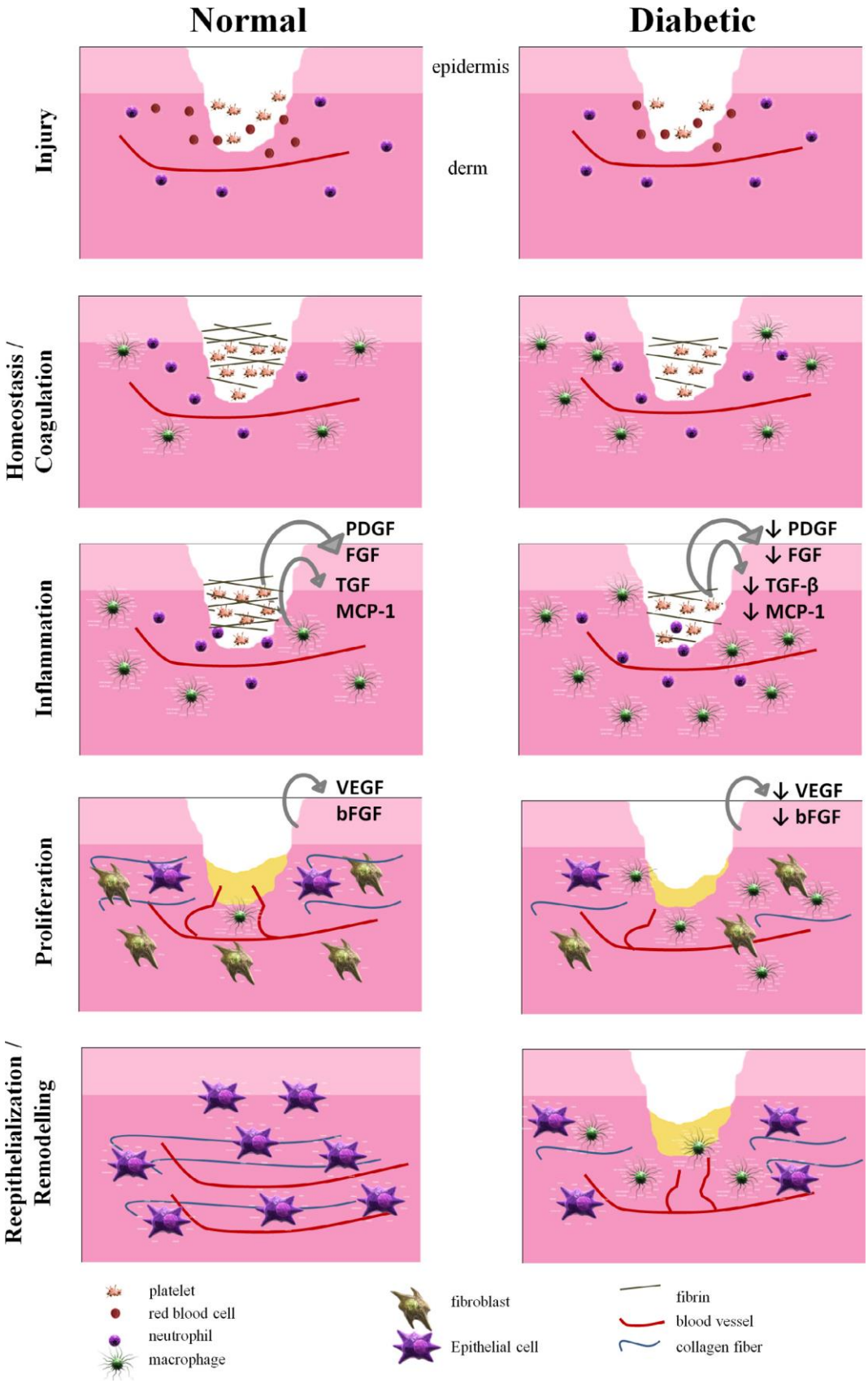
Tablo 1.2. Dünyada 2013 yılında gerçekleşmiş ve 2035 de beklenen Diyabet hastası sayıları: ilk 10 ülke (IDF Diabetes Atlas altıncı basım, 34.sayfadan uyarlanmıştır)

Ülke	**2013 Milyon Kişi**	**Ülke**	**2035 Milyon Kişi**
Çin	98,4	Çin	142,7
Hindistan	65,1	Hindistan	109,0
Amerika	24,4	Amerika	29,7
Brezilya	11,9	Brezilya	19,2
Rusya Federasyonu	10,9	Meksika	15,7
Meksika	8,7	Endonezya	14,1
Endonezya	8,5	Mısır	13,1
Almanya	7,6	Pakistan	12,8
Mısır	7,5	Türkiye	11,8
Japonya	7,2	Rusya	11,2

Diyabetes mellitus metabolik düzensizlik olarak karakterize edilip, kan serumunda yüksek glukoz seviyesi, karbonhidrat, lipid değişimi, insülin sekresyonu, insülin aktivasyonu ve bütün bu süreçleri etkilemektedir. Bu etkilerden birisi de diyabetik hastalardaki iyileşmeyen yaralardır (Moura ve diğ., 2013). Normal yara

iyileşmesinde, granülasyon doku oluşumu, epitelizasyon ve yeniden oluşma basamakları görülmektedir, fakat diyabetik hastalarda hücresel ve moleküler sinyaller yetersiz olduğundan yara iyileşmesi zayıftır (Blakytny ve diğ., 2000; Blakytny ve diğ., 2006; Brem ve Tomic-Canic, 2007).

Sitokinler ve özellikle çeşitli büyüme faktörleri, yara iyileşme basamağında gerekli hücresel ve moleküler sinyali sağlar, ancak diyabetik yaralarda yetersizdir (Blakytny ve diğ., 2000) (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. Normal ve diyabetik yara iyileşme fazları (Moura ve diğ., 2013'den uyarlanmıştır)

Özellikle diyabetik ayak (DA) yaralarını inceleyecek olursak, DA yaralarında prevalans ve insidans konusunda kesin veriler elde etmek çok zor olsa da yapılan çalışmalar, diyabetik hastaların % 15'inin hayatları boyunca ayak yarası komplikasyonlarıyla karşılacağını göstermektedir (Mayfield ve diğ., 1998). İngiltere'de yapılmış olan bir ankette, diyabetik hastaların % 5,3 ile % 7,4' ünde aktif ayak yarası veya eskiden ayak yarası öyküsü tesbit edilmiştir (Jeffcoate ve Jarding, 2003). Yapılan çalışmalar incelendiğinde yılda yaklaşık 5700 alt ekstremite amputasyonu yapıldığı belirlenmiştir ve bunlar nontravmatik nedenlerle yapılan amputasyonlardır. Bu amputasyonların % 80'i diyabete bağlı gelişen ayak komplikasyonları sonucunda yapılan amputasyonlardır (Green ve diğ., 2002). Diyabette görülen komplikasyonlardan özellikle nöropati ve vaskülopati sıklığı, sonuçları bakımından risk oluşturdukları için diyabetik ayak yaralarının sıklığını da etkilemektedir. Amputasyonların % 38'i diz altı, % 24'ü topuk, % 21,4'ü diz üstü, % 5,8'i bilek altı ve geri kalanı da kalça, pelvis, diz gibi diğer anatomik bölgelerdendir (Levin, 2002). Yaygın olarak kullanılan bir sınıflandırma olan Wagner sınıflandırması (Tablo 1.3.), lezyonun derinliğine dayanan ve yaranın bulunmadığı fakat diyabetik ayak yarası için risk taşıyan ayaktan, ayağın gangrene kadar değişen altı basamağını içermektedir (Wagner, 1981).

Tablo 1.3. Diyabetik ayak yaralarında wagner sınıflandırması

DERECE	ÖZELLİKLER
EVRE 0	Sağlam deri ile birlikte kemik çıkıntısı veya kallus oluşumu (DA yarası için risk)
EVRE 1	Derin dokulara yayılımın olmadığı yüzeysel yara
EVRE 2	Tendon, kemik, ligament veya eklemi içeren derin yara
EVRE 3	Apse ve/veya osteomiyeliti içeren derin yara
EVRE 4	Parmakları ve/veya metatarsı kapsayan gangren
EVRE 5	Kurtarılamayacak düzeyde ve amputasyon gerektiren parmak ve/veya ayağın bütününün gangreni

Wagner sınıflandırması dışında günümüzde birçok sınıflandırma yapılmıştır. Uluslararası Diyabetik Ayak Çalışma Grubu (The international working group on the

Diabetic Foot) tarafından 2003 yılında yapılan çalışmaya göre, doku beslenmesi, yaygınlık/büyüklük, derinlik/doku kaybı, enfeksiyon ve duyu değerlendirmeleri sonucu ile skorlama yapılan PEDIS sınıflandırması önerilmiştir (The international working group on the diabetic foot. International Consensus on Diagnosing and Treating the Infected Diabetic Foot, 2003).

Sonuç olarak, diyabetik ayağı tedavi etmek çok pahalı ve kompleks bir süreçtir, diyabetik ayak yaralarının tedavisinde karşılaşılan birçok zorluk mevcuttur ve tedavide doğru yöntemi seçmek çok önemlidir.

1.6. Yara İyileşmesinde Kullanılan Yara Örtüleri

Doğal derimiz mükemmel bir yara örtüsüdür ve ideal yara örtüsü de bu özellikleri taklit edebilmelidir. Yara örtülerinin ilk olarak tarihte yanlızca pasif ve koruyucu rolü olduğu düşünülmüştür. Ancak son yıllarda yara iyileşmesinde, yara bölgesini saran ve hızlı iyileştiren nemli yara örtüleri iyileşmeye yardımcı olmuştur. Nemli yara örtüleri yaranın nemini sağlarken, proliferasyon ve migrasyon açısından önemli bir faktör olup, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin zengin kollajen sentezini arttırır ve skar doku oluşumunu azaltır. Yara çevresinin optimal nemde olması için, genellikle yara örtüsü aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır;

• Bölgenin sıcaklık yalıtımı, hava geçirmesi ve oluşan doku harabiyeti sonrasında çıkan sıvıların emilmesinde yardımcı olmalıdır.

• Dışarıdan gelebilecek ikinci bir enfeksiyona karşı korumalıdır.

• Biyouyumlu olmalı, herhangi bir alerjik veya immün tepkiye yol açmamalıdır.

• Travma bölgesinden kolayca alınabilmelidir (geçici yara örtüleri için geçerlidir) (Moura ve diğ., 2013).

Tablo 1.4. Günümüzde diyabetik ayak yaralarının tedavisinde kullanılan ticari ürünler (Moura ve diğ., 2013)

Ticari yara örtüsü	Şirket	Birleşimi	Ana özellikleri
Tergaderm High Gelling Alginate Dressing	3M Health Care	Aljinat içerikli poliüretan yara örtüsü	Yumuşak bir iyileşme ortamı sağlar. Yüksek emici ve uyumlu
Calcium Alginate Dressing	Smith& Nephew, Inc.	Kalsiyum- Aljinat	Yara bölgesinin hava almasını sağlar, geri çıkarması kolay. Skar doku oluşumunu önlemektedir.
BGC matrix	Mölnlycke Health Care US, LLC	Kollajen ve beta-glukan	Hemostazisi sağlar Enfeksiyona karşı korumaktadır, esnek ve uyumlu
Aquacel Hydrofiber Wound dressing	ConvaTec	İyonik gümüşlü karboksimetil selüloz	Kullanmı kolay Yara yüzeyinin şekillenmesini sağlar
Sorbalgon	Hartman USA, Inc	Kalsiyum aljinat	Yüksek emici, Çıkarması kolay
Biatain Heel Foam Dressing	Coloplast Corp.	3-D yapışmaz poliüreten köpük	Nem dengesini koruyan Kolay değiştirilebilir yüzey
Oasis wound matrix	Smith & Nephew, Inc.	Domuz ince bağırsak submukozası	Kolay değişebilir Biyouyumlu

Yukarıdaki Tablo 1.4.'de verilen ticari yara örtülerinde de görüldüğü gibi, kullanılan malzemeler ya doğal bir polimer ya da yapay bir polimerdir.

Doğal polimerler, mikrobiyal, hayvansal veya bitkisel kaynaklı olup, protein veya polisakkarit yapıdadır. Doğal polimerler hücresel çevreyi ve hücre dışı ortamı etkilemekle birlikte, bu biyomalzemeler doğal bir süreç olan bozunmayı ve heterojeniteyi kontrol eder.

Doğal polimerlerin dayanıksızlığı ve zayıf mekanik performansları dezavantaj olarak gösterilir ve bu nedenle doğal polimerlerin uygulamaları sınırlıdır. Ancak, çeşitli kimyasal sentezlerinde ve/veya farklı süreçlerle bu dezavantaj ortadan

kaldırılmaktadır. Karışım malzemelerle birlikte polimerik malzemeler diğer alanlarda kullanım için alternatif olmaktadır. Gelecekte doğal polimerler ile yara örtülerinin hazırlanması ve bu sayede de özellikle diyabetik ayak yaralarının hızlı iyileştirilmesi üzerine çalışmalar çok daha fazla önem teşkil edecektir.

1.7. Deri Doku Mühendisliği Ürünleri

Geleneksel ve modern yara örtüleri yara iyileşmesinde etkili olmaktadır, ancak kaybedilen dokunun yerine konması ve yanıklarda kaybedilen dermis tabakasının tekrar oluşumunda ne yazık ki yetersizdirler. Hücre taşıyan matrikslerin geliştirilmesi ve bu matrikslerin üzerinde deri hücrelerinin çoğaltılması ile yeni jenerasyon doku mühendisliği ürünü deri greftleri ortaya çıkmıştır (Horch ve diğ., 2005).

Tablo 1.5. Kronik yaralarda kullanılan ticari deri greftleri (Moura ve diğ., 2013)

Ticari yara örtüsü	Şirket	Birleşimi	Ana özellikleri
Integra ™	Integra Lifescience (Plainsborough, NJ)	İnce silikon tabaka ile kaplı kollajen/kondroitin-6-sülfat matriksi	Yapay deri
Biobrane ™	Smith & Nephew Healthcare, UK	Silikon, naylon ağ, çapraz bağlanmış domuz tip-1 kollajeni	Biyosentetik Deri yedeği
Alloderm™	Lifecell Corporation (Branchberg, NJ)	Tüm hücresel materyalleri çıkarılmış insan dermişi	Aselüler deri grefti
Dermagraft™	Advanced Tissue Sciences (LaJolla, CA)	Biyobozunabilir poliglikolik asit ve poliglaktin ağ üzerinde çoğaltılmış insan fibroblastları	Deri yedeği
Apligraf™	Organogenesis (Canton, MA)	Epidermal tabaka insan keratinositleri, dermal tabaka ise sığır tipi kollajen (tip 1) matriksinde insan fibroblastları içermektedir	Epidermal ve dermal deri yedekleri
Epicel™	Genzyme Biosurgery (Cambridge, MA)	Otolog insan keratin hücresi kültürü	Epidermal deri yedeği

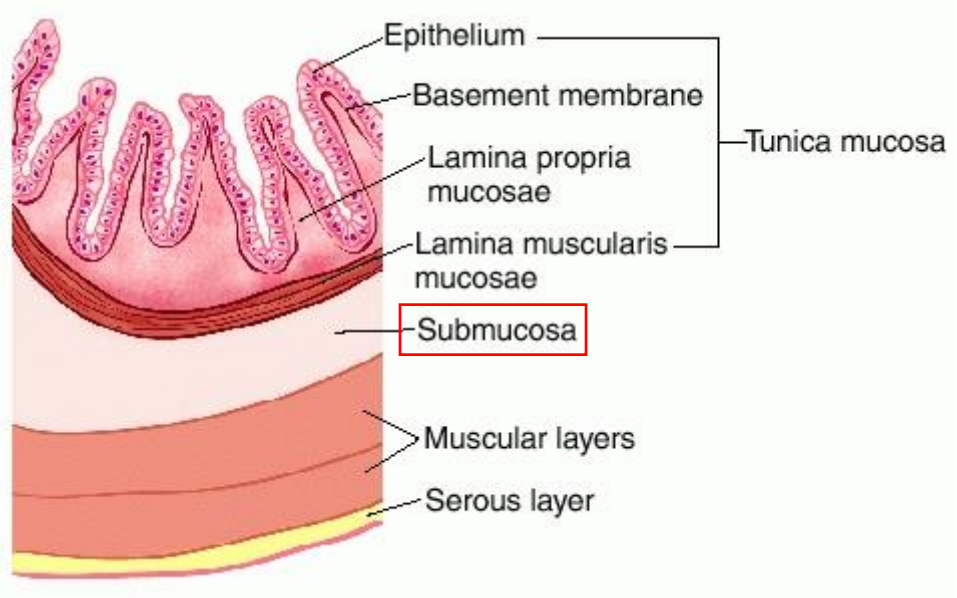
Tablo 1.5.'te özellikleri verilen yara örtüleri kronik yaralar ve 3. dereceden yanık yaralarında kullanıma daha uygundur.

Fakat pahalı olmaları, enfeksiyon taşıma riskleri ve antijenik özelliklerinden dolayı hastanın canlı dokuları tarafından reddedilmesi sonucu ikinci bir yara oluşturma ihtimali dolayısıyla yara iyileşmesinde kullanımları sınırlıdır (Stewart, 2002).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. İnce bağırsak Submukozasının (SIS) Hücrelerinden Arındırılması ve Karakterizasyonu

Çalışmada, kuzu ince bağırsak submukozası (SIS) 6-9 aylık kuzulardan izole edildi. Satın alınan kuzu ince bağırsağı, temizlemek amacıyla % 0,9'luk tuzlu sudan geçirildi. Submukozayı çıkarmak için kuzu bağırsağı yaklaşık 5 cm uzunluğunda kesildi. İşlem sırasında SIS bekletilirken, % 1 antibiyotik (Pen/Strep) içeren tuzlu suda +4°C'de muhafaza edildi. Bağırsak tabakaları Şekil 2.1.' deki görselde gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İnce bağırsak tabakaları

Şekil 2.1. 'de gösterilen Tunica mucosa ve Muscular layer tabakaları kazınarak arada bulunan submukoza çıkartıldı. Submukoza çıkarıldıktan sonra petri kap içine koyularak -20°C 'ye kaldırıldı.

2.1.1. İnce bağırsak submukozasının (SIS) hücrelerinden arındırılması

Kuzu ince bağırsak submukozası çıkarıldıktan sonra hücrelerinden arındırma işlemine geçildi. -20 °C'de bekletilen SIS, hücrelerinden arındırma işlemi için uygun bir kaba alındı. Kuzu ince bağırsak submukozası (SIS) % 1 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinde 2 gün, sonra da % 1 Triton X-100 çözeltisinde 1 gün çalkalanarak hücrelerinden arındırıldı. SDS ve Triton X-100 kalıntılarını uzaklaştırmak için 1 gün boyunca doku parçaları % 1 antibiyotikli (Pen/Strep) fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı (Ay, 2012'den uyarlanmıştır). Yıkama yapıldıktan sonra, SIS (Şekil 2.2.) -20 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 2.2. Doğal SIS'in görünümü

SIS'i çalışmalarda kullanabilmek için liyofilizatörde (SCANVAC® Cool Safe) kurutma işlemi yapıldı. Kurutulan SIS, Şekil 2.3.' deki IKA® A10 öğütücü yardımıyla 3-4 dk boyunca öğütülerek petri kaplarına alınıp vakum ortamında muhafaza edildi.



Şekil 2.3. A. IKA® A10 öğütücü, B. Öğütülmüş stok SIS

2.1.2. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozasının hematoksilen & eozin (H&E) ve Masson trikrom boyaması

Hücrelerinden arındırılan membran formdaki SIS'in yapısında var olan kollajenleri görmek için Masson trikrom ve submukozada bulunan hücrelerin arındığını görmek için H&E boyama Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

2.1.3. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukoza membranların DNA içeriğinin belirlenmesi

SIS malzemesindeki DNA içeriğini belirlemek amacıyla ekstraksiyon protokolü uygulandı. Literatürdeki çalışmalara göre (Gilbert ve diğ.,) , SIS'den 0,005 oranında tartım yapıldı ve 5 ayrı eppendorf hazırlandı. Malzeme ekstraksiyonu için proteinaz K'dan 1mg/ml olacak şekilde % 0,1 sodyum azid içeren PBS içerisinde çözüldü ve SIS üzerine 1 ml olacak şekilde eklendi ve 72 saat 37 ˚C çalkalamalı su banyosunda 50 rpm'de bırakıldı. Süre sonunda 2980 g'de 30 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant ayrı eppendorflara alındı. Süpernatantta bulunan DNA'yı saflaştırmak için protein çöktürme işlemi yapıldı (Roche, Protein precipitation soln.). Süpernatantta bulunan DNA'yı çöktürmek için üzerine % 99,5 saf etanol (Sigma Aldrich, USA) eklendi ve 12000 g'de 10 dk santrifüj yapıldı. Peletin üzerine tekrardan +4˚C'deki etanolden eklenip 10000 g'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen saf DNA'ya 200 µl TE (1X) tampon çözelti eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra her örnekten 20 µl alınıp üzerine Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit'den 180 µl eklendi ve 5 dk oda

sıcaklığında bekletildikten sonra 485 nm'de uyarma sonrası 535 nm'de floresan emisyon ölçümü yapıldı.

2.1.4. Hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozasının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi

Hücrelerinden arındırılmış SIS, Jeol JSM 6060 taramalı elektron mikroskobu ile yapısının belirlenmesi amacıyla incelenmiştir.

2.2. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.1. Hücre kültürü

Endotel (HUVEC) ve insan deri fibroblast hücreleri Kocaeli Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Diyabet ve Obezite Araştırma laboratuvarından temin edilmiştir.

İnsan deri kaynaklı fibroblast hücrelerinin çoğaltılması; fibroblast hücreleri, kültürde % 5 insan plazması ve % 1 Pen/Strep, % 0,1 Primocin, % 8 heparin, % 1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) besiyerinde büyütüldü.

Sıvı azotta kullanılmak üzere hazır bulunan fibroblast hücrelerine ilk olarak çözme işlemi yapıldı. Dondurulmuş örnek 37°C su banyosunda çözdükten sonra üzerine besiyeri ilave edildi. Hücreler T75 flaska alınarak kültürü başlatıldı. Üç günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi ve hücreler flaskın % 70'ini kapladıktan sonra % 0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanılarak yüzeyden kaldırıldı. Hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra onbeşbin hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekildi.

2-3 haftalık inkübasyon sonunda hücreler metanol (Merck, Almanya) ile 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. İnkübasyon sonunda fibroblast hücreleri, aktin filamentlerini görüntüleme amacıyla, falloidin (Phalloidin-FITC, Sigma) ile boyandı. Hücreler blok serum içindei, oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. % 0,1 sığır serum albümin'de (BSA'da) hazırlanan FITC işaretli falloidin kuyucuklara eklendi ve 37 °C' de bir saat inkübatörde bekletildi. Ardından hücreler % 0,1 BSA ile yıkandı ve

hücre çekirdeklerinin boyanması için DAPI ile muamele edildi (oda sıcaklığında 10 dk) ve floresan mikroskopta incelendi.

İnsan göbek bağı veni kaynaklı endotel hücrelerin çoğaltılması ve karakterizasyonu; Sıvı azottan alınan endotel hücrelere çözme işlemi yapıldı. Dondurulmuş örnek 37°C su banyosunda çözüldükten sonra % 10 insan plazması içeren endotel hücre büyüme besiyerinde (EGM-2 Bullet Kit, Lonza) süspanse edildi ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet kısmı yeni besiyerine alınarak T75 flaskta kültürü başlatıldı. Hücreler % 5 CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Üç günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi ve hücreler flaskın % 70'ini kapladıktan sonra üzerine % 0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu uygulandı. Tripsin yardımıyla flasktan ayrılan hücreler toplandı ve Thoma lamında sayıldıktan sonra onbeşbin hücre/kuyucuk olacak şekilde altı kuyucuklu plakalara ekildi. Karakterizasyon amacıyla hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisindeki % 4 Paraformaldehit (PFA) (Merck) ile 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. % 0,1 Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Almanya) ile hücre zarı geçirgenliği sağlanan hücreler spesifik olmayan boyanmaya karşı serum ile bloke edildikten sonra (30 dk, 37 °C) bir gece boyunca 4 °C' de 1:100 seyreltilmiş endotel hücre belirteci olan CD 31'e karşı geliştirilmiş (Santa Cruz Biotechnology) birincil antikor çözeltisi içinde bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra hücreler FITC işaretli ikincil antikor (1:100, Santa Cruz Biotechnology) ile muamele edildi (45 dk, oda sıcaklığı). Çekirdeklerin boyanması için hücreler DAPI ile muamele edilip 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkama sonrası hücreler floresan mikroskopta incelendi.

2.2.2. Sitotoksisite testleri: WST-1 ve ölü/canlı hücre boyaması

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde genelde 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT), Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sul fofenil)-2H-tet razolyum (MTS), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Temel olarak bu yöntem proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST-1:kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin abzorbans olarak spektrofotometrik ölçülmesine

dayalıdır. Tetrazolyumların içinde en iyi alternatif WST-1'dir, diğer tuzlara kıyasla daha verimli tüketilmekte ve daha çabuk renk değişimi göstermektedir. XTT'nin hücreler tarafından yavaş indirgendiği, MTT 'de ise kültür ortamında çözünemez ve ek olarak indirgenme ürünlerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerin kullanılma zorunluluğundan dolayı bu dezavantajlar göz önünde bulundurulmalıdır. XTT ve WST-1 kitlerinde elektron eşleyici reaktif bulunurken, MTT'de elektron eşleyici ajan bulunmamaktadır (Demirel ve diğ., 2013).

2.2.3. İnsan endotel (HUVEC) ve deri fibroblast hücrelerinin hücrelerinden arındırılmış SIS membranlar üzerinde kültürü ve kılcal damar ağı oluşumunun belirlenmesi

Hücrelerinden arındırılmış SIS membranlar, hücre kültüründe kullanılmak üzere UV altında sterilize edildi (15 dk ön yüz 15 dk arka yüz). Endotel ve fibroblast hücreleri Thoma lamında sayılarak 1:1 oranında, altı kuyucuklu plakalarda bulunan kurutulmuş ve sterilize edilmiş SIS örnekleri üzerine toplamda $6x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Fibroblast + endotel hücrelerini farklılaştırmak (damar ağı oluşturmaları) için, % 5 insan serumu ve EGM-2 besiyeri ve DMEM besiyeri hazırlandı. Endotel ve fibroblast hücreleri % 1 Pen/Strep, % 0,1 Primocin, % 8 heparin içeren DMEM/EGM-2 (Life Technologies/ Lonza) besiyerinde 2-3 haftalık inkübasyon sonunda damar ağı oluşturma potansiyeli açısından değerlendirildi. İnkübasyon sonunda endotel hücreli dokular endotel hücre belirteci olan Von Willebrand faktörü için ve ayrıca falloidin ile boyandı ve damar ağı varlığının saptanması için floresan mikroskopta incelendi.

2.3. Sünger Yapıların Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan malzemeleri incelediğimizde, doğal polimer olan malzemelerimizin zayıf mekanik özellikleri ön plana çıkmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı kullanılan doğal polimerler ya yapay ve/veya yarı yapay polimer karışım olarak kullanılırlar ya da kimyasal bağlayıcı ajanlar ile çapraz bağlanılarak, mekanik özellikleri arttırılır ve suda çözünen doğal polimerlerin sıvı ortamda hemen çözünüp gitmesi engellenmiş olur.

Çalışmamızda kullanılması için toplamda 3 grup malzeme hazırlandı. Malzemeler son konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde hazırlanan gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlandı. Su içerisinde jelatin: hyaluronik asit:SIS (G:HA:SIS, 115:1:50 w/w/w)'in % 8 çözeltisi hazırlandı ve aynı konsantrasyonda jelatin ve jelatin:hyaluronik asit (G:HA, 115:1 w/w) karışımları da hazırlandı.

Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan malzemeler 500 rpm' de oda sıcaklığında jelatin ve hyaluronik asit çözünene kadar (15 dk) karıştırıldı. Çözünen karışımların üzerine hazırlanmış olan % 1'lik GA'dan eklendi ve 15 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışımlar petri kaplarına dökülüp – 20 °C'ye kaldırıldı ve sünger haline getirmek için liyofilizatör cihazında 24 saat, -110 °C' de bekletildi. Süre sonunda sünger haline gelen malzemeler, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda 25 kGy dozunda ışıma ile gama sterilizsyonuna maruz bırakıldı.

Sterilize edilen malzemeler hayvan deneylerinde kullanılmak üzere uygun formda kesildi.

2.3.1. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskopisi: gözenek çapı hesaplaması

G:HA:SIS, G:HA ve G süngerlerin yüzeyi ve kesiti morfolojik olarak taramalı elektron mikroskobu altında incelendi. Malzemeler incelenmeden önce altın (Au) ile kaplandı. Sünger formdaki malzemelerin yüzeyi ve kesitleri, Jeol JSM 6060 taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

2.3.2. Sünger yapıların su tutma kapasitelerinin belirlenmesi ve şişme oranın hesaplanması

Çapraz bağlanmış G:HA:SIS, G:HA ve G sünger malzemelerin su tutma kapasitelerini ölçmek için her malzeme grubundan 6'şar örnek alınarak deney gerçekleştirildi. Su tutma kapasitesini belirlemek için Denklem (2.1)'deki gibi;

$$W(kat) = [(W - W_0)/ W_0] \quad (2.1)$$

W: yaş ağırlık, W_0: kuru ağırlık şeklinde olacaktır.

Öncelikle sünger malzemelerin tek tek kuru ağırlıkları tartıldı ve malzemeler 24 saat boyunca 37 °C sıcaklık koşullarında % 0,1 sodyum azidli (Sigma Aldrich, USA) PBS içerisinde bekletildi. 6 saat sonunda malzemeler kurutma kâğıdının üzerine alınarak fazla sıvı uzaklaştırıldı ve yaş ağırlıklarının belirlenmesi için tartıldı.

2.3.3. Sünger yapıların erozyon oranlarının hesaplanması

Çapraz bağlanmış G:HA:SIS, G:HA ve G sünger malzemelerden her grup için 10 numune kullanıldı. Her grup ayrı tüpler içerisinde ve % 0,1 sodyum azidli PBS içerisinde 37 °C çalkalamalı su banyosunda, 50 rpm'de protokole tabi tutuldu (Kenar, 2008). Malzemeler deneye başlamadan önce tartılarak kuru ağırlıkları not edildi.

Numuneler her 24 saatte bir sıvı ortamdan alınarak kurutuldu, kuru ağırlıkları tekrar ölçüldü ve tekrar aynı protokole tabi tutuldu. Elde edilen ağırlık değişimleri hesaplanarak erozyon oranları Denklem (2.2)' deki gibi;

$$W\ (\%) = [(W_0 - W)/ W_0] \times 100 \qquad (2.2)$$

W: kuru ağırlık, W_0: ilk ağırlık şeklinde olacaktır.

2.3.4. Sünger yapıların mekanik özelliklerinin belirlenmesi

Hazırlanan sünger yapıların mekaniksel davranışlarını belirlemek amacıyla vücut içi ortam simulasyonu ile basma testi yapılmıştır. Vücut içi ortamına uygun olması amacıyla su banyosu % 0,9'luk tuzlu su ile doldurudu. Mekanik test cihazı (Tinius Olsen H5KT) "ASTM D695-10 Plastic Compression" standardı ile 1mm/dk hızında, %10 sıkıştırma yapacak şekilde çalıştırıldı. Üç grup test malzemesi (G:HA:SIS, G:HA ve G sünger grupları) disk şeklinde hazırlanıp teste tabi tutuldu (8 mm çap, 3 mm yükseklik).

2.4. In Vivo Çalışmalar

Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izniyle in vivo çalışmalar yapılmıştır.

2.4.1. Diyabetik sıçan modelinin oluşturulması

Bu çalışmada 3-4 aylık, 250-300 g ağırlığında, diyabetik (*Wistar albino*) sıçanlar üzerinde, kuzu bağırsak submukozasından elde ettiğimiz ve geliştirdiğimiz biyomalzeme temelli yara örtüsü test edildi. Bu çalışma için, sıçanların adacık beta hücrelerine streptozosin (60 mg/kg) ile hasar verildi. Yedinci günün sonunda sıçanların açlık kan şekerlerinin ölçümü yapıldı ve diyabetli oldukları kanıtlandı.

2.4.2. Sünger yapıların tam kalınlık yara modeline uygulanması ve takibi

Çalışmaya başlamadan önce diyabetik sıçanların şeker seviyeleri minimum 250 mg/dL olarak ölçüldü. Cerrahi işlem uygulamak için deney hayvanlarına Xylazine (20 mg/kg) intramuskuler yoldan uygulandı ve ardından ketamine (10 mg/kg) ile anestezi uygulandı ve cerrahi işleme geçildi. İşlem yapılacak bölgenin temiz olması ve herhangi bir irritasyona sebep olmamak için çalışılan deri bölgesi kıllarından temizlendi. Cerrahi işlem öncesi %70' lik alkol ve iodid ile bölgenin temizliği sağlandı ve ardından yara örtüsünün uygulandığı bölgeye deri biyopsi pançı (Acupunch, Acuderm Inc., Louderdale, FL, USA) ile yaklaşık olarak 8 mm çapında tam kalınlık yara (dermis + epidermis) açıldı. Aynı çapta hazırlanmış olan G:HA:SIS, G:HA, G sünger malzemeler PBS ile ıslatılarak pançı ile açılan bölgeye nakledildi (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Diyabetik sıçan modelinde tam kalınlık yara modeli

Sıçanlar yedinci ve onikinci günlerde takibe alındı ve yara iyileşmesinin gözlemsel olarak takibi yapıldı. Onikinci günün sonunda yara örtüsünün uygulandığı bölge kesilip çıkarıldıktan sonra %10 'luk formalin içinde patoloji çalışmasına geçilene kadar bekletildi.

Çalışmada test hayvanları toplamda her grupta 10 adet sıçan olmak üzere 4 grup altında toplandı. İlk test grubu sıçanlar kontrol grubunu (sham) oluşturdu, ikinci test grubu sıçanlara çapraz bağlanmış jelatin sünger uygulandı, üçüncü test grubu sıçanlara çapraz bağlanmış hyaluronik asit ve jelatinden oluşan sünger uygulandı ve dördüncü test grubu sıçanlara çapraz bağlanmış hyaluronik asit, jelatin ve SIS' den oluşan sünger uygulandı.

2.5. Patoloji Çalışmaları

Patoloji çalışması için alınan dokulardan uygun kesitler hazırlanarak Hemotoksilen-Eosin ve Mason trikrom boyaması yapılmıştır. Kesitler yara iyileşme histopatolojisi açısından, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin, 10X, 20X ve 40X büyütme altında, aynı patolog tarafından, ödem, kollajen varlığı, fibroblast varlığı, granülasyon doku kalınlığı, lökosit infiltrasyonu, yabancı cisim reaksiyonu, nötrofil/lenfosit/histiyosit

hakimiyeti, kapiller proliferasyon ve epidermal rejenerasyon kriterleri göz önüne alınarak değerlendirildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

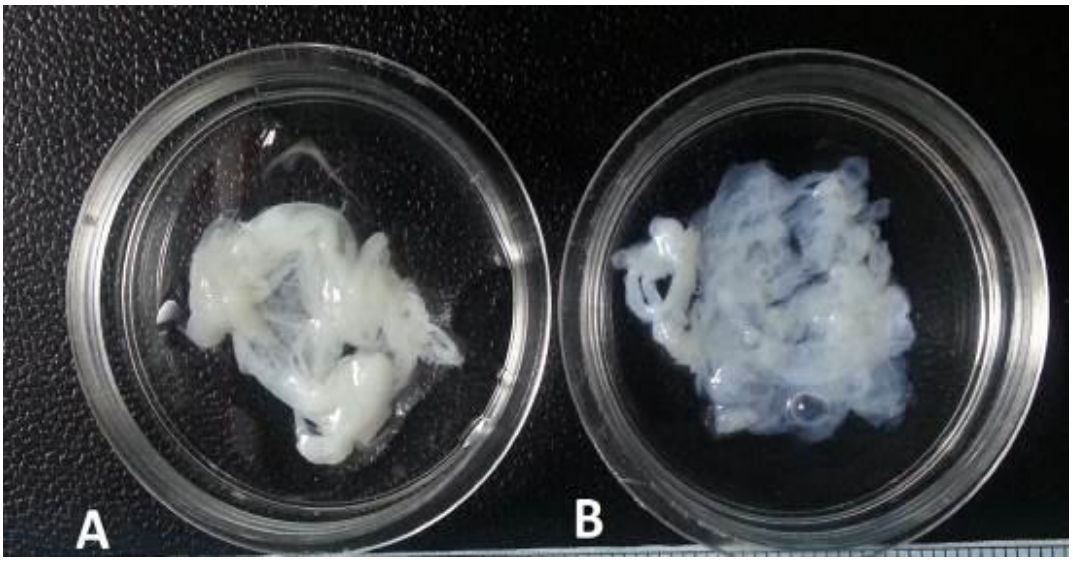
İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Nümerik değişkenler ortalama +/- standart sapma ve medyan (25. persantil - 75. persantil) ve frekans (yüzdelikler) olarak verildi.

Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenlerde Student t testi ve Tek yönlü varyans analizi ve Tukey Post Hoc Test ile kategorik değişkenler için Monte Carlo Kikare analizi ile değerlendirildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Hücrelerinden Arındırılmış Ince Bağırsak Submukozası (SIS) Bileşenleri ve Biyouyumluluk Bulguları

Kuzu ince bağırsak submukozasını hücrelerinden arındırmak için deterjan türevli bir madde olan SDS kullanılmıştır. Hücrelerin uzaklaştırılmasıyla biyomalzeme hazırlanışında kullanılacak hücrelerinden arındırılmış SIS elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Kuzu ince bağırsak submukozası A. Kuzu ince bağırsak submukozasının doğal hali, B. Kuzu ince bağırsak submukozasının hücrelerinden arındırıldıktan sonraki hali

Makroskobik görüntü incelendiğinde, SDS ile muamele edilen SIS parçalarının renginin giderek saydamlaştığı gözlemlendi (Şekil 3.1.). Syed ve arkadaşları doku mühendisliği uygulamaları için geliştirdikleri yemek borusu çalışması için domuz ince bağırsak submukozasının hücrelerinden arındırma tekniğini kullanmışlardır. Hücrelerinden arındırma sonrası submukozanın saydamlaştığı belirtilmiştir ve bu bulgu çalışmamızı desteklemektedir (Syed ve diğ., 2014).

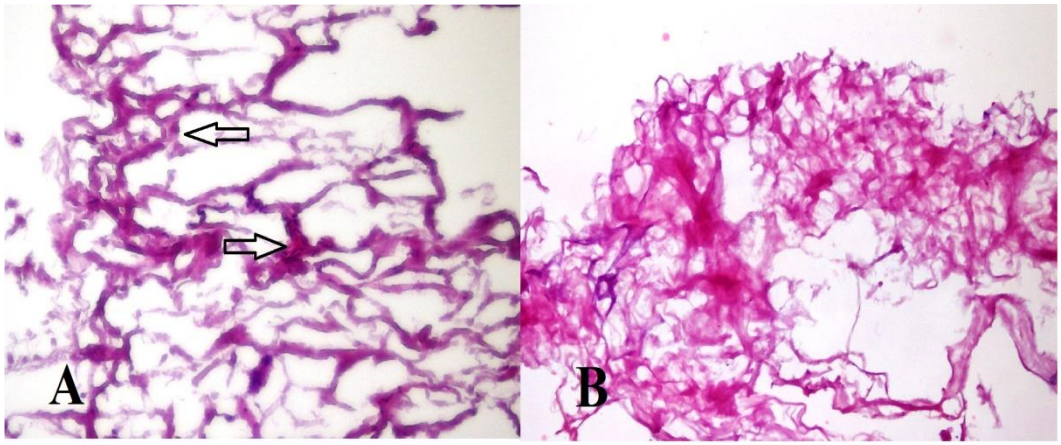
3.1.1. DNA içeriği

Floresan ölçümle belirlenen DNA miktarı 62 ng/mg kuru ağılık olarak bulundu. Literatürde domuz bağırsağı ile yapılan çalışmalarda hücrelerinden arındırma sonrasında SIS' deki DNA miktarı 6 ng/mg olarak belirtilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış dokudaki DNA miktarının fazla olması yabancı cisim tepkisine neden olmaktadır. Literatürde ticari biyomalzemelerle yapılan araştırmalarda DNA miktarının fazla olmasının yabancı cisim reaksiyonunu oluşturduğu tespit edilmiştir (Luo ve diğ., 2011).

3.1.2. H&E boyama

SIS doku kesitlerinde hematoksilen boya ile boyanmış çekirdekler gözlemlenirken (Şekil 3.2.-A), hücrelerinden arındırılmış SIS doku örneklerinde hücre çekirdekleri görülmemiştir (Şekil 3.2.-B).

Luo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, özellikle kimyasal ile hücrelerinden arındırılma işleminden sonra H&E boyamasında en iyi sonuç bu çalışmada uygulamış olduğumuz protokolden elde edilmiştir (Luo ve diğ., 2011).

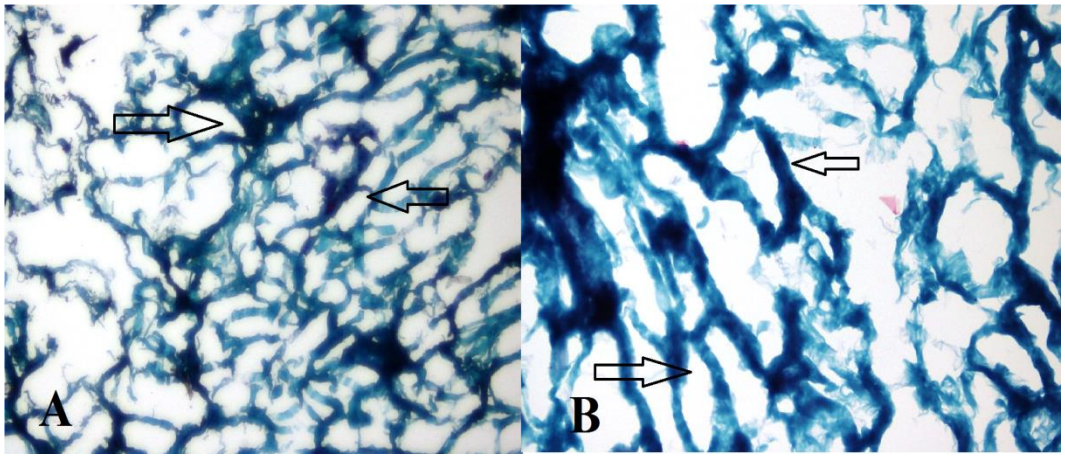


Şekil 3.2. İzole edilen SIS katmanının H&E boyaması. A. SIS, B. hücrelerinden arındırılmış SIS (Orjinal büyütme 20X)

3.1.3. Kollajen içeriği (Masson trikrom boyama)

SIS dokusunda Masson trikrom boyaması ile mavi boyanmış kısımlarda doğal yapıdaki kollajen varlığı gösterildi (Şekil 3.3.-A). Hücrelerinden arındırılmış SIS'de

gözlenen mavi kısımlar kollajenin hücrelerden arındırma işleminden sonra da yapıda varlığını koruduğunu gösterdi (Şekil 3.3.-B).

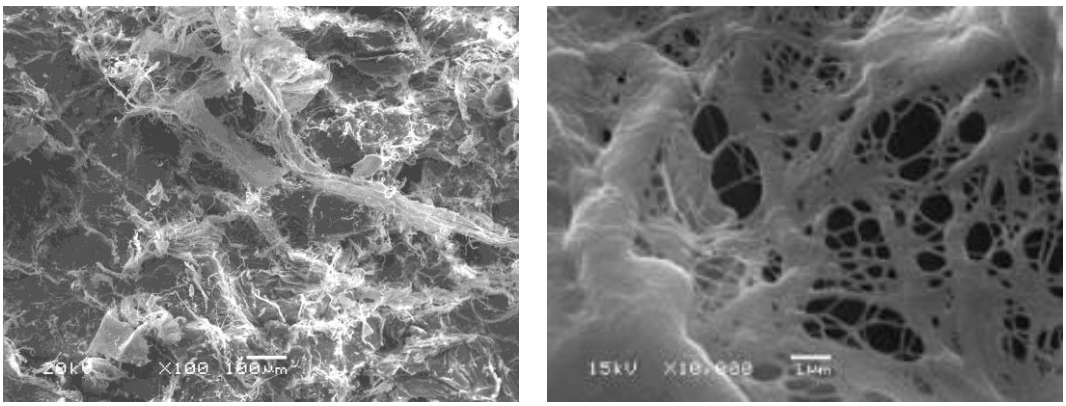


Şekil 3.3. Masson trikrom boyaması. A. SIS (Orjinal büyütme 20X), B. Hücrelerinden arındırılmış SIS (Orjinal büyütme 40X)

3.1.4. Taramalı elektron mikroskobu analizi

Taramalı elektron mikroskobu ile hücrelerinden arındırılmış submukozanın yapısı incelenmiştir (Şekil 3.4.).

SEM ile yapılan incelemede submukozanın hücrelerden arındırılması sonucu ekstra gözenkli bir hal aldığı saptanmıştır. Fakat bu gözeneklerin büyüklüğü göz önünde bulundurulduğunda, yapının hücre penetrasyonuna elverişli olmadığı sonucuna varılmıştır.

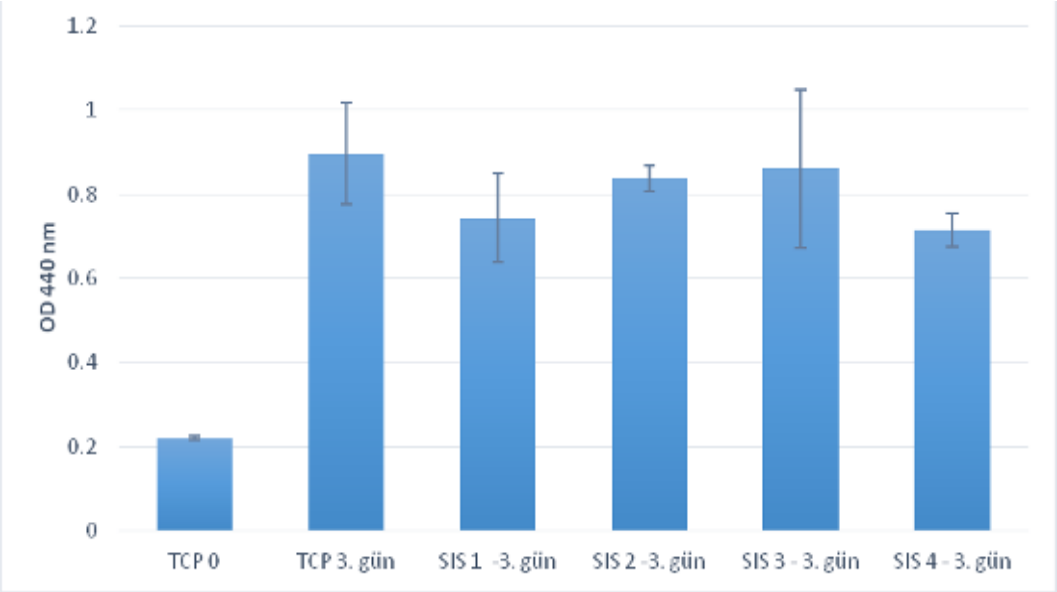


Şekil 3.4. Hücrelerinden arındırılmış SIS'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

3.1.5. Sitotoksisite bulguları

Sitotoksisite testi (WST-1) için gramajları aynı olan SIS membranlar insan deri fibroblastları ekilmiş kuyucuklarda, besiyerinde yüzer durumda inkübe edilmiştir. Sıfırıncı gün ve üçüncü gün sonlarında spektrofotometrik ölçüm ile hücre canlılığı belirlendiğinde malzemenin sitotoksik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Şekil 3.5.).

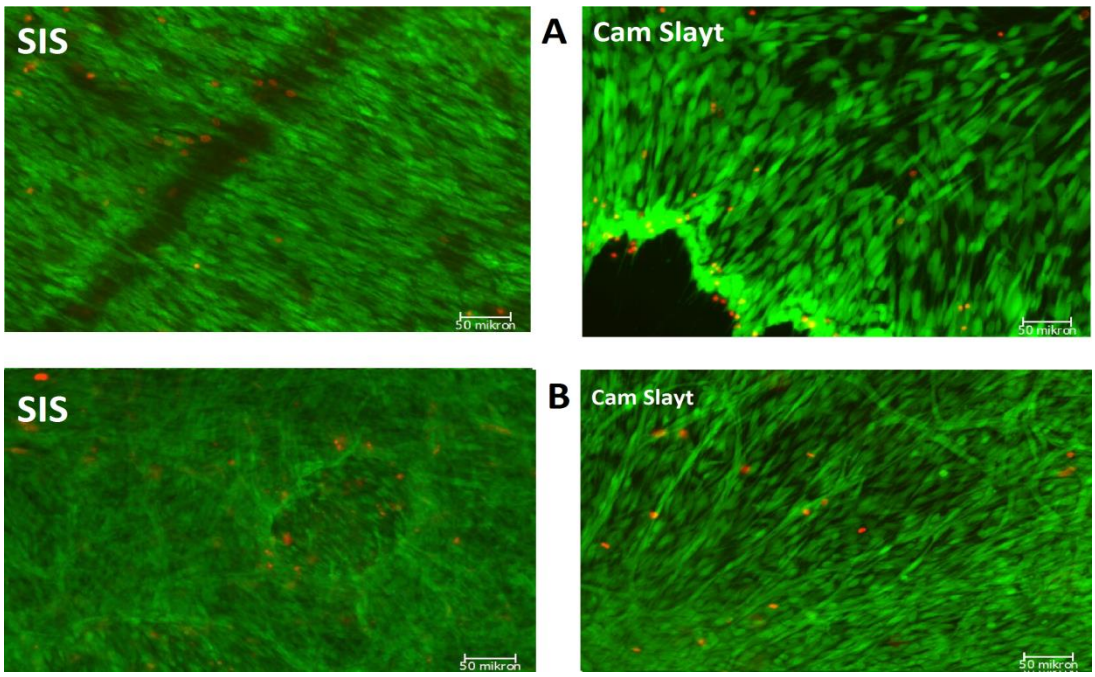
Biyomalzeme varlığında görülen hücre sayısı artışı daha az olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir. Literatürde, özellikle SDS gibi sitotoksik, deterjan türevli bir malzeme ile yapılan hücrelerinden arındırma protokolü sonrası elde edilen dokuların hücre kültüründeki testinde negatif bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Syed ve diğ., 2014).



Şekil 3.5. WST-1 testi sıfırıncı ve üçüncü gün abzorbans ölçüm değerleri. TCP: doku kültürü polistireni (pozitif kontrol), SIS: hücrelerinden arındırılmış ince bağırsak submukozası

Biyouyumluluk testi için biyomalzeme üzerine insan deri fibroblastları ve endotel hücreleri ekildi ve 14 günlük kültür sonunda ölü/canlı hücre boyaması yapıldı. İnsan fibroblast hücrelerinin SIS üzerindeki etkileri incelendiğinde, cam slayt üzerine ekilmiş hücrelerin ölüm oranının daha fazla olduğu, SIS üzerine ekilen hücrelerdeki ölü hücrelerin ise daha az olduğu gösterildi (Şekil 3.6-A). Endotel ve fibroblast hücrelerinin SIS üzerindeki kültürü incelendiğinde, SIS üzerindeki ölü hücre

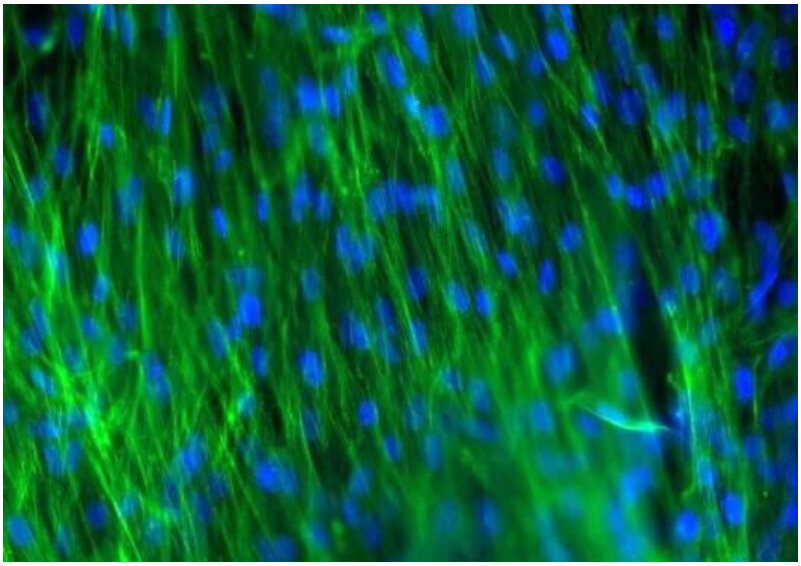
sayısının cam slaytdaki ölü hücre sayısına göre daha az olduğu Şekil 3.6-B' de gösterildi.



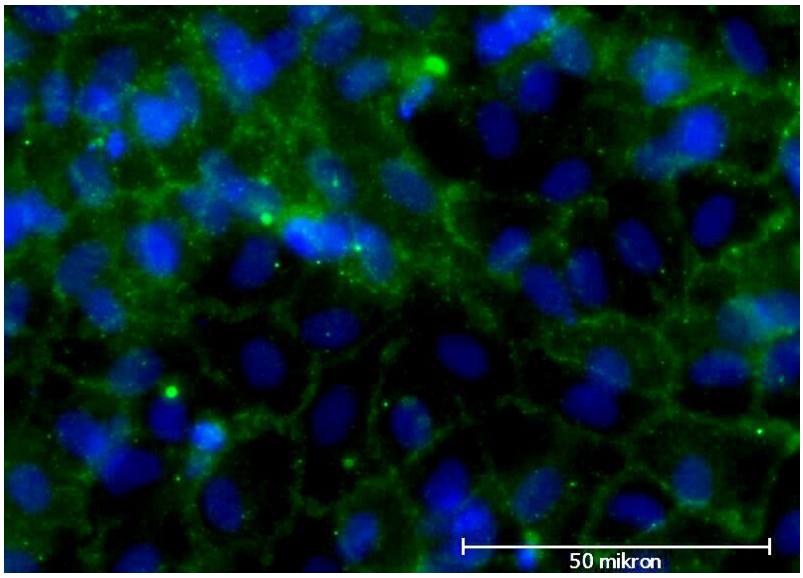
Şekil 3.6. Hücrelerinden arındırılmış SIS üzerindeki hücrelerin canlı-ölü boyama floresan mikroskop görüntüleri. A. Fibroblast hücreleri B. Fibroblast-endotel hücre ko-kültürü (Orjinal büyütme: 10X) Yeşil: canlı hücre, kırmızı: ölü hücre

3.1.6. İnce bağırsak submukozası üzerinde kılcal damar ağı oluşumu

Çalışmamızda kullanılan endotel hücrelerin morfolojik analizi immünfloresan (İF) boyama ile yapılırken, fibroblast hücreler floresan boyama ile değerlendirilmiştir. Hücreler ilk pasajda slayt üzerine ekilerek fibroblast hücrelerinin aktin filamentlerini falloidin ile (Şekil 3.7.) ve endotel hücreleri anti-CD 31 antikoru ile işaretlenerek immünfloresan boyandı (Şekil 3.8.).

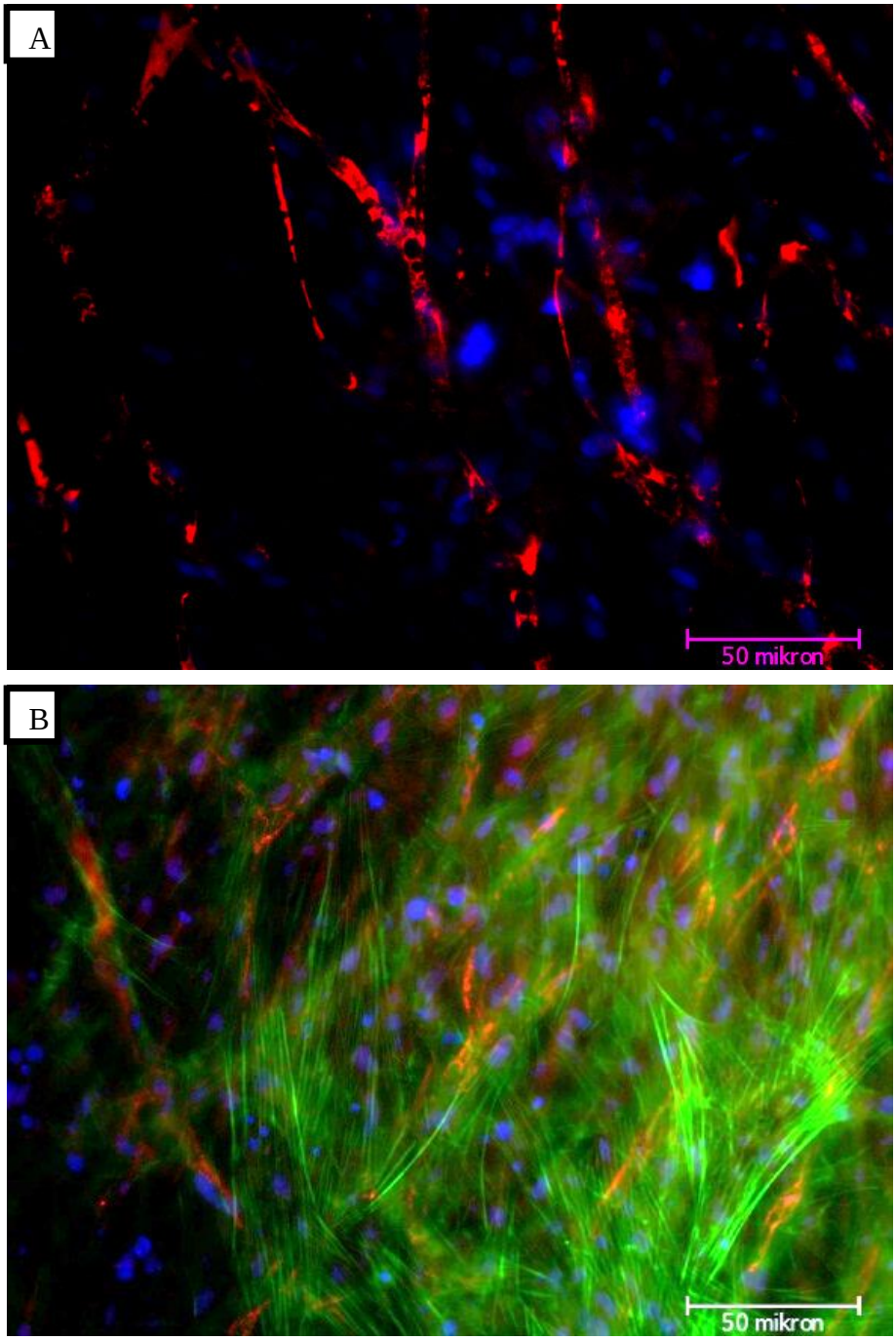


Şekil 3.7. Fibroblast hücrelerin falloidin-FITC boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri (Orjinal büyütme:20X)



Şekil 3.8. Endotel hücrelerin (HUVEC) anti-CD31 FITC immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri (Orjinal büyütme:20X)

Fibroblast ve endotel hücreler bir hafta boyunca flasklarında çoğaltıldıktan sonra SIS üzerinde damar ağı oluşturma çalışmasına geçildi. Deselülarize edilmiş SIS üzerine ko-kültür olarak ekilen hücrelerin damar ağı yapma potansiyeli araştırıldı. Hücreler DMEM/EGM-2 besiyerinde inkübe edilmiş ve SIS'e tutundukları ve 14 gün sonunda damar ağı yaptıkları gözlendi (Şekil 3.9).



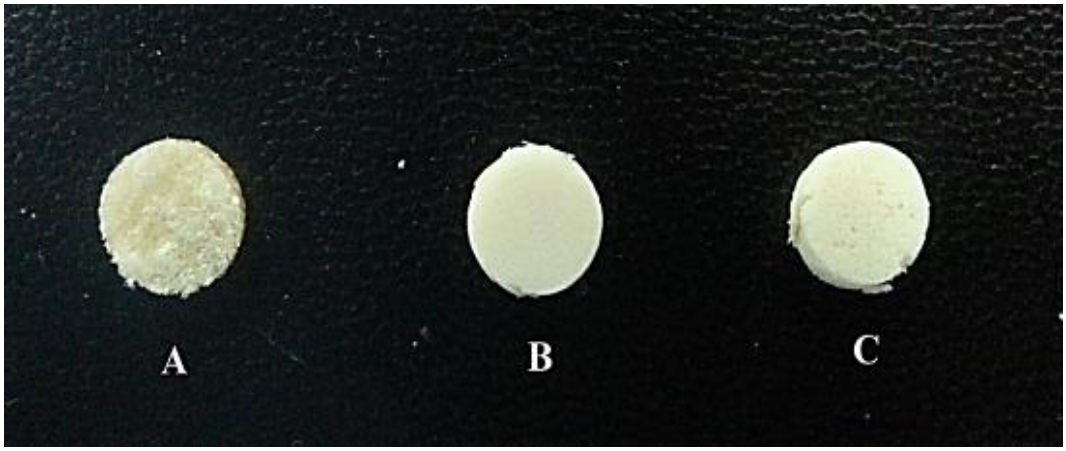
Şekil 3.9. Fibroblast ve endotel hücrelerin SIS üzerinde 14 gün sonunda oluşturduğu kılcal damar ağının floresan mikroskop görüntüleri A. Anti-von Willebrand-Texas Red ile immünfloresan boyanmış kılcal damar ağı, 10X, B. Anti-von Willebrand-Texas Red ile immünfloresan boyanmış kılcal damar ağı ve falloidin-FITC ile floresan boyama, 20X. Kırmızı: kılcal damar ağı, yeşil: aktin filamanlar, mavi: hücre çekirdekleri (DAPI)

İn vitro kültür şartlarında besiyerlerinde kullanılan büyüme faktörleri damar oluşumunu uyarmaktadır. Çalışmamızda da doğal doku kaynaklı SIS'in avantajı

yapısında büyüme faktörlerini barındırmasıdır. Voytik-Harbin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada domuz bağırsağının yapısında fibroblast büyüme faktörü (FGF-2), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-ß), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü'nün (PDGF) bulunması, damar oluşumunu desteklemektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda domuz ince bağırsağında bulunan büyüme faktörlerinin hücrelerin hızlı gelişimini indüklediği ve erken yeni damar oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Voytik-Harbin ve diğ., 1997).

3.2. Sünger Yapıların Fiziksel Özellikleri

Hazırlanan yapılar, çapraz bağlanmış jelatin (GS) sünger, çapraz bağlanmış jelatin-hyaluronik asit (GS:HA) karışımlı sünger, çapraz bağlanmış jelatin-hyaluronik asit-hücrelerinden arındırılmış kuzu ince bağırsak submukozası (GS:HA:SIS) karışımlı süngerlerdir. Hazırlanan bu karışımlar fiziksel olarak homojen karıştırıldıktan sonra, daha kararlı bir yapıya getirmek için malzemeler % 0,1'lik konsantrasyonda gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlanmış ve sonrasında ideal gözenekliliği kazandırmak için -20°C 'ye kaldırılmıştır. Sünger yapıdaki malzemeleri elde etmek için yapılar liyofilizatörde kurutularak Şekil 3.10'daki forma getirildi (Bilgiç ve diğ., 2013).



Şekil 3.10. Elde edilen sünger yapıların makroskobik görüntüleri. A. G:HA:SIS sünger B. G:HA sünger C. G sünger

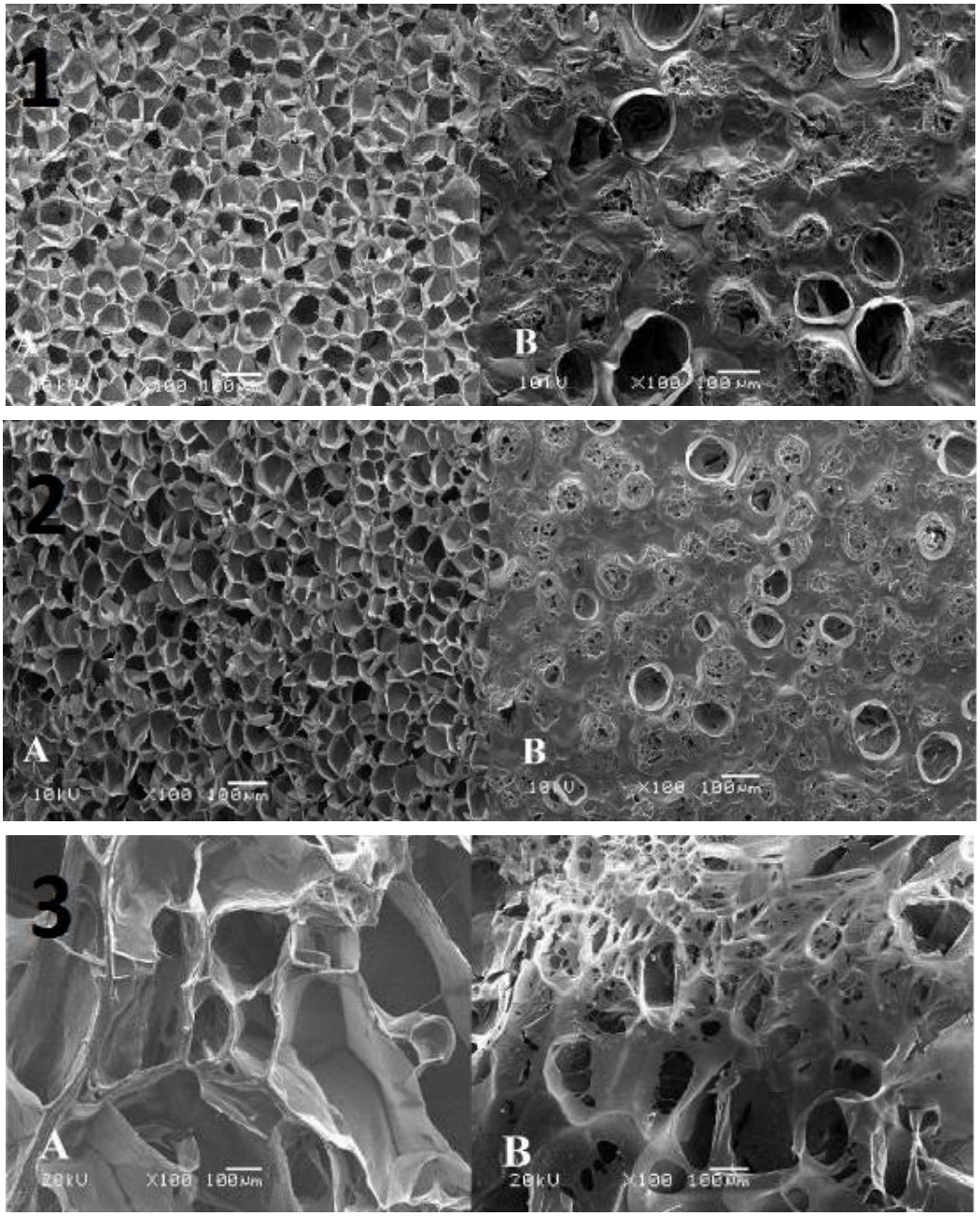
Mevcut çalışmalarda, gluteraldehitin sitotoksik olduğu vurgulanmaktadır. Fakat, Ulubayram ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada % 0,5 oranında gluteraldehit ile çapraz bağlanan sünger ile yapılan çalışmada hücre morfolojisi ve hücre

canlılığının EDAC ile çapraz bağlanmış sünger malzemeden daha iyi olduğu gösterilmiştir (Ulubayram ve diğ., 2002).

Bilgiç ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2013) ise, % 0,1 oranında kullanılan gluteraldehitin in vitro koşullarda sitotoksik etkisinin olmadığı vurgulanmıştır (Bilgiç ve diğ., 2013).

3.2.1. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskobu analizi

Optimizasyon çalışmaları sonrası malzemenin gözenek dağılımı ve gözenek çapı taramalı elektron mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. Üretilen süngerlerin gözenek çapları G, G:HA, ve G:HA:SIS süngerler için sırasıyla 83µm, 75 µm ve 240 µm olarak ölçülmüştür. Mikroskobik görüntü incelendiğinde, örneğin gözenek şekli, yapısı ve fiziksel dağılımı Şekil 3.11-A' da görüldüğü gibi kesitlerde homojen bir yapı mevcuttur. Süngerlerin üst yüzeyinin de gözenekli olduğu ve sıvı ve madde geçişine elverişli olduğu ve özellikle G:HA:SIS sünger yüzeyinin hücre geçişine daha elverişli olduğu görülmüştür (Şekil 3.11-B).



Şekil 3.11. Sünger yapıların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. 1A. G sünger kesit görüntüsü, 1B. G sünger yüzey görüntüsü, 2A. G:HA sünger kesit görüntüsü, 2B. G:HA sünger yüzey görüntüsü, 3A. G:HA:SIS sünger kesit görüntüsü, 3B. G:HA:SIS sünger yüzey görüntüsü (Ölçek çubuğu: 100 mikron)

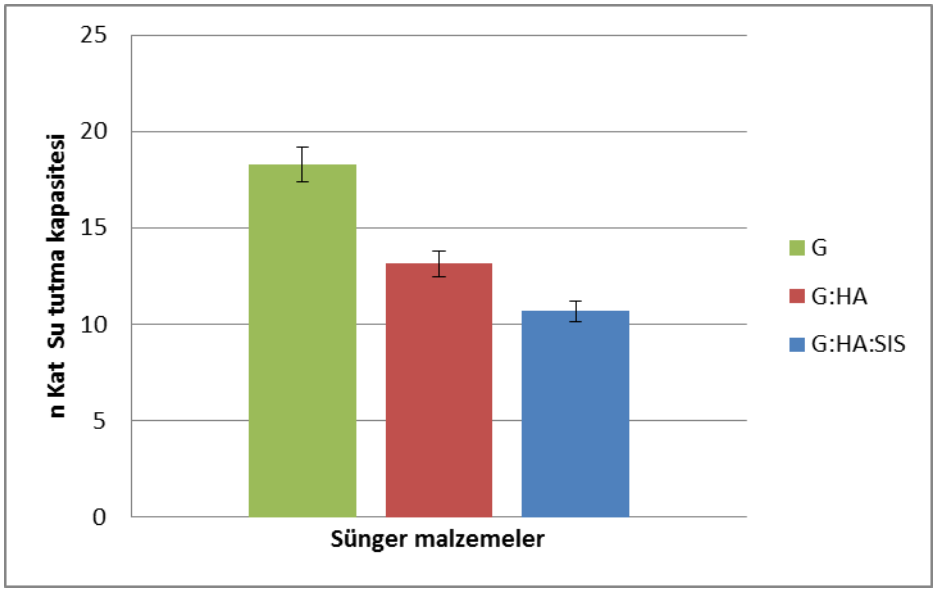
Malzeme hazırlanırken dondurma aşamasında uygun sıcaklık seçimi malzemenin gözenek yapısını etkilemektedir. Imani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada -10 °C ve -25 °C arasında hazırlanmış olan jelatin sünger malzemenin anlamlı olacak şekilde geniş gözeneklere sahip olduğu gösterilmiştir.

Kontrollü dondurma koşullarında, elde edilen sünger malzemelerin kalitesi geliştirilebilir (Imani ve diğ., 2013). İdeal gözenek çapı doku ve hücre çeşidine göre farklılık göstermektedir. İdeal gözenekli malzemeler, spesifik gözenek çapı, kristalinite, yüzey alanı-hacim oranı ve gözeneklilik özellikleri dikkate alınarak üretilebilir.

Literatüre göre, doku rejenerasyonu için gözenek çapının optimum değeri 5 µm, fibroblast hücrelerinin gelişimi için 5-15 µm, yetişkin memelilerin deri rejenerasyonu için 20-125 µm aralığı uygundur. Ancak dokuların hem beslenmesi hem de oksijenlenmesi için 200 µm uygun bir gözenek çapıdır (Dhandayuthapani ve diğ., 2011).

3.2.2. Sünger yapıların su tutma kapasiteleri ve şişme oranı bulguları

G, G:HA ve G:HA:SIS sünger malzemelerin su tutma kapasiteleri (n kat) sırasıyla 10,68 ± 0,005, 13,12 ± 0,03, 18,27 ± 0,02 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.12). Üç malzemeyi değerlendirecek olursak, jelatin sünger diğer gruplara göre daha fazla su tutarken, G:HA:SIS'de su tutma kapasitesi biraz daha düşüktür.



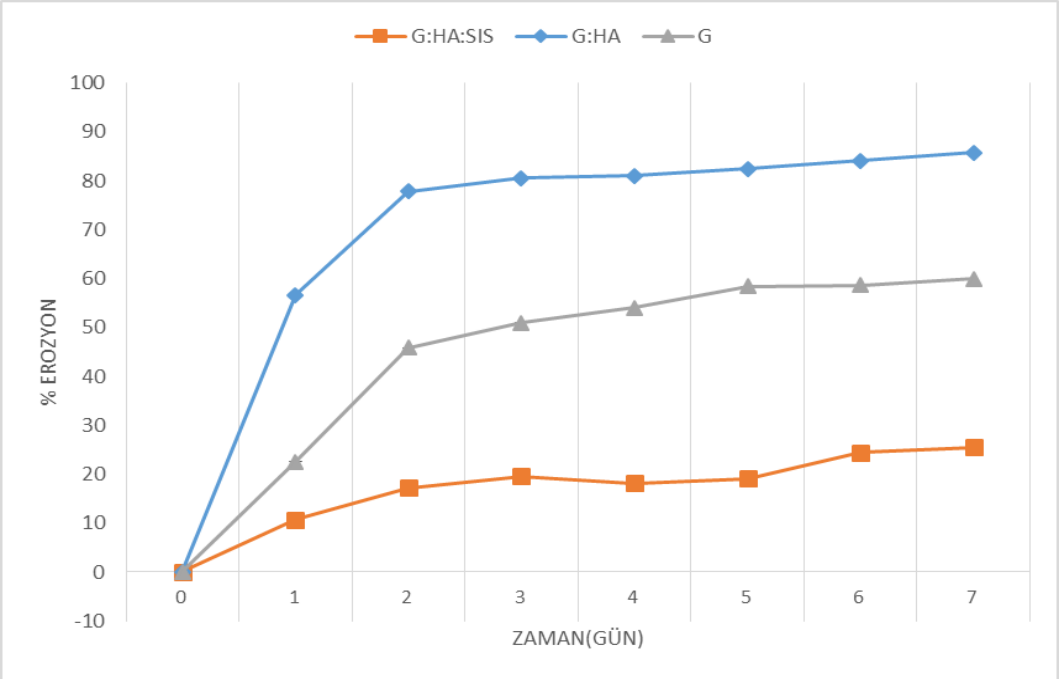
Şekil 3.12. G, G:HA ve G:HA:SIS sünger malzemelerin su tutma kapasiteleri

Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi gerçek dokuya benzemesi yönünden ve çeşitli moleküllerin bağlanmasına yardımcı olması açısından önemlidir ve buna ek olarak

hücre tutunmasını desteklemekte, gerekli mikroçevreyi ve hücrenin bulunduğu ortamda daha az stres ile mücadelesini sağlamaktadır (Vacanti, 2007).

3.2.3. Sünger yapıların erozyon oranları

Çapraz bağlanmış G, G:HA ve G:HA:SIS sünger malzemelerin uygun şartlarda, yüzde erozyon oranları belirlenmiştir. Yedinci gündeki erozyon yüzdeleri sırasıyla; % 59,93 ± 0,0005 , % 85,79 ± 0,0019 ve % 25,50 ± 0,0012 olarak bulunmuştur. Şekil 3.13'de 0 ile 7. günler arasındaki erozyon oranları gösterilmiştir.



Şekil 3.13. G, G:HA ve G:HA:SIS sünger yapıların erozyon grafiği

Biyomalzeme tasarımı yapılırken, parçalanma hızı ve yerine hücrelerin kendi hücre dışı ortamını oluşturma zamanı dikkate alınmalıdır. Sünger malzemenin hızlı erozyonu veya yavaş erozyonu, uygulamada karşımıza çıkan sorunlardandır. Dolayısıyla, üretilen sünger malzemenin ideal erozyon süresine sahip olması gerekmektedir (Dumlu, 2013).

Malzemeleri çapraz bağlamanın amacı erozyon süresini uzatmaktır. Özellikle suda çözünen bir polimerden üretilen malzemeler için çapraz bağlama zorunluluktur. Bu çalışmada kullanılan jelatin ve hyaluronik asit suda çözündüğü için çapraz

bağlayarak kullanmamızdaki amaç, vücut sıvıları ile temas ettiğinde süngersi yapısını korumasını sağlamak ve erozyon süresini yavaşlatmaktır.

Çapraz bağlanmış jelatin sünger 7. günün sonunda % 60 oranında erozyona uğramıştır. Literatürde hyaluronik asit (HA)'in gluteraldehit ile çapraz bağlanması karşımıza çıkmaktadır, fakat çalışmamızda 7. günde yüzde ağılık kaybı en fazla HA olan grupta gözlenmiştir. Çapraz bağlanmış jelatin süngerde ise 7.gün sonunda G:HA'ya göre yüzde ağırlık kaybı daha azdır. Son olarak G:HA:SIS grubuna bakıldığında SIS normalde suda çözünmeyen bir yapıya sahip olduğu için erozyon oranı yedinci gün sonunda % 25 ile sınırlı kalmıştır. Ağırlığındaki az da olsa azalış, karışımda bulunan jelatin ve hyaluronik asitin yapıdan uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır.

G:HA:SIS sünger malzeme, zamana bağlı erozyonunun minimal olduğu ve hacminde ve dolayısıyla gözenek çapında değişme görülmediği için klinik uygulamalarda yeni dokunun bu yapının içinde herhangi bir şekil değişikliği olmadan gelişmesi mümkün olacağından yara iyileşmesinde kullanılabilecek ideal bir yapı olarak değerlendirilebilir.

3.2.4. Sünger yapıların mekanik özellikleri

G, G:HA ve G:HA:SIS sünger malzemelerin basma testi bulguları ve basma verileri tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Basma testi bulguları

Sünger malzeme çeşidi	Maksimum gerilim (kPa)	Young Modülü (kPa)
G	5,95 ± 0,23	3,43 ± 0,03
G:HA	5,84 ± 0,22	4,07 ± 0,02
G:HA:SIS	5,96 ± 0,09	5,00 ± 0,04

Sünger malzemelerin basma testi incelendiğinde, G, G:HA ve G:HA:SIS gruplarının sonuçları birbirine yakın çıkmıştır. Basma testinde Young modülünü, karışımdaki malzemelerin konsantrasyonu, çapraz bağlama ajanının konsantrasyonu ve dondurma sıcaklığı etkilemektedir. Jelatin konsantrasyonunun düşük olması malzemeye

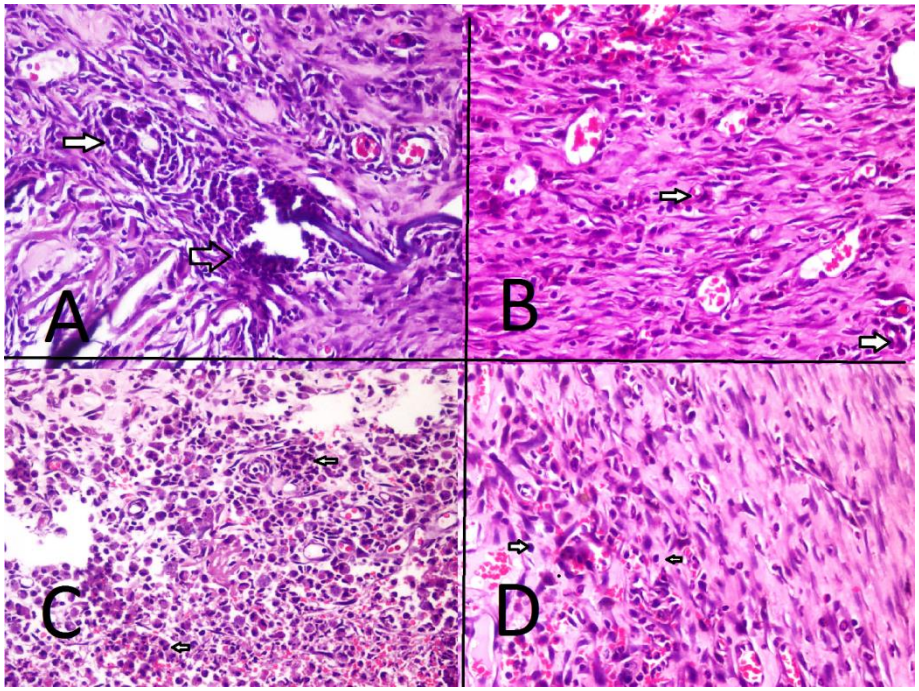
yumuşak ve esnek bir özellik kazandırmaktadır. Malzemeler arasında kıyaslama yaptığımızda G:HA:SIS'in diğer gruplara göre biraz daha yüksek bir young modülüne sahip olduğunu görmekteyiz.

3.3. Sünger Yapıların In Vivo Bulguları

Sünger malzemeler hayvan deneylerinde test edildikten sonra parafin bloklara gömülüp kesiti alınmıştır. Kesit alınan örneklerin hematoksilen&eozin ve Masson trikrom boyama ile patolojik incelemeleri yapılmıştır. Gruplardaki örnek sayıları; kontrol grubunda 10 adet, G grubunda 22 adet, G:HA grubunda 17 adet ve G:HA:SIS grubunda 19 adet örnek olup istatistiksel değerlendirmeler bu sayılar üzerinden yapılmıştır.

PMNL hücreleri, iyileşmenin ilk basamağında ortama gelen ilk hücrelerdir ve yaralanan bölgeden yabancı cisimleri ve bakterileri uzaklaştırmak ana görevleridir, yani enfeksiyonun kontrolünden sorumludurlar.

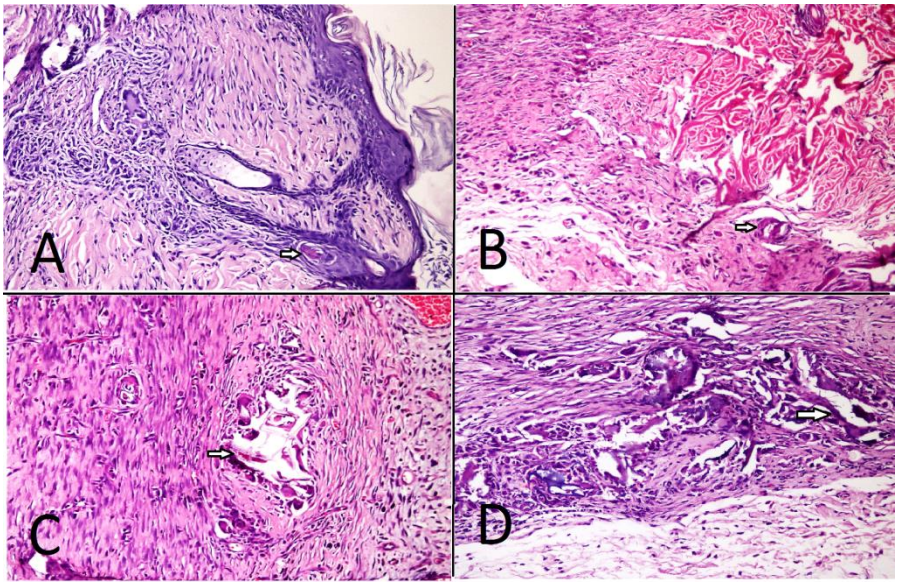
Patolojik değerlendirme sonuçları incelendiğinde Şekil 3.14'de PMNL varlığı en fazla kontrol grubunda (3.14-A) gözlemlenirken, G:HA:SIS grubunda (Şekil 3.14-D) hafiflemiş olarak görülmektedir.



Şekil 3.14. Diyabetik sıçan modelinde patolojik kesitlerden alınan H&E boyalı örneklerde PMNL hücrelerinin incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 40X)

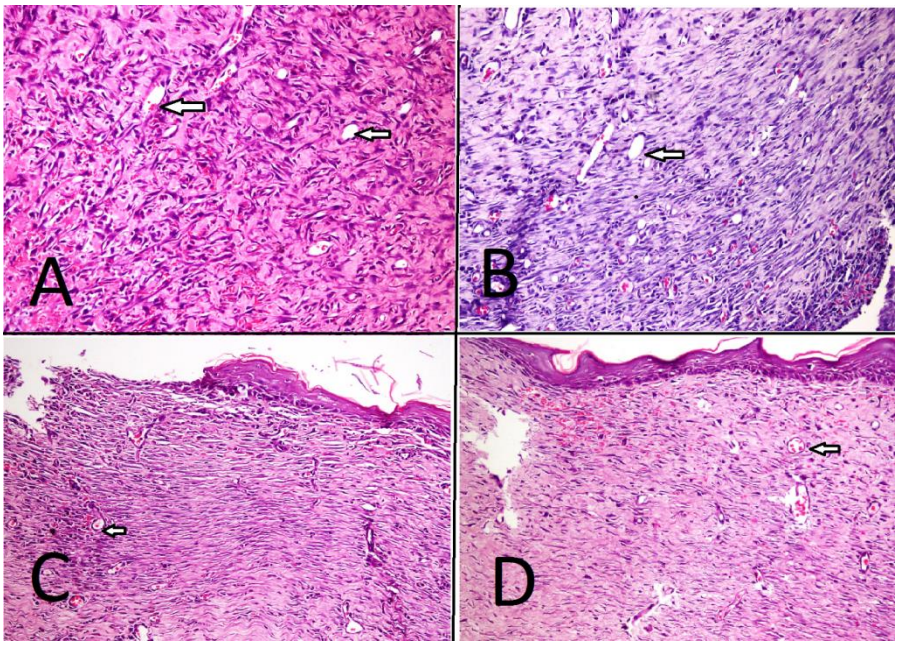
Biyoistatistik sonuçları incelendiğinde, kontrol grubunda PMNL varlığı örneklerin % 20'sinde gözlemlenirken, G:HA:SIS sünger malzeme grubunda bu oran % 15,8 olarak görülmektedir.

Yabancı cisim yanıtı varlığı istatistiksel olarak incelendiğinde (Şekil 3.15), kontrol grubunda % 50, G grubunda % 45,5, G:HA grubunda % 52,9, G:HA:SIS grubunda ise bu oran % 84,2'dür. Yara iyileşmesi için kullanılan polimer malzemeler sentetik hatta doğal bile olsa bir miktar yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaktadır ve bu reaksiyon malzeme ortamdan tamamen atılana kadar devam etmektedir. G:HA:SIS sünger yapıdaki SIS en geç bozunacak olan malzeme olduğu için ve ayrıca yapısında DNA da içerdiği için bu gruptaki yabancı cisim reaksiyonu diğerlerine göre biraz daha fazla olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.15. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde yabancı cisim reaksiyonu varlığının incelenmesi A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 20X)

Şekil 3.16'da görüldüğü gibi kapiller proliferasyon incelendiğinde, damar oluşumunun en fazla kontrol grubunda, diğer gruplarda ise daha az olduğu gözlenmiştir.



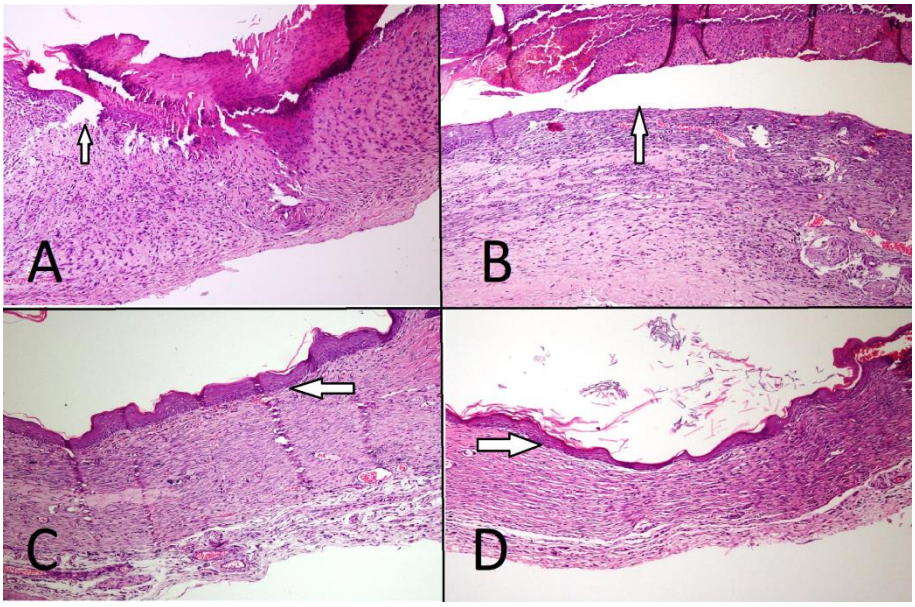
Şekil 3.16. Diyabetik sıçan modelinde patolojik kesitlerden alınan örneklerde kapiller proliferasyonun incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 20X)

Baltzis ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, yara oluştuktan sonra ilk üç gün boyunca yeni damar oluşumları gözlemlenmiştir ve bu basamak yeniden modellenmeye kadar devam etmiştir. Yara bölgesinde yeniden modellenme başladığında damar oluşumunda azalma gözlemlenirken, kollajen sentezinde artış gözlenmektedir (Baltzis ve diğ., 2014).

İstatistiksel sonuçları inceleyecek olursak, kontrol grubunda % 40, G grubunda % 18,2, G:HA grubunda % 17,6 kapiller prolifersayon gözlemlenirken, G:HA:SIS malzeme grubunda bu oran % 21 olarak belirlenmiştir.

Yara bölgesinde epitelizasyonun tamamlanması yara bölgesinin iyileştiğini ve yeniden modellenmenin oluştuğunu göstermektedir. Yeniden oluşma basamağı yaklaşık olarak 2-3 haftalık bir süreçtir fakat diyabetik yaralarda bu zaman daha da uzamaktadır. Diyabet ve benzeri sistemik hastalıklarda ateroskleroz ve venöz drenaj gibi damar bozuklukları yara iyileşmesini geciktirmektedir (Baltzis ve diğ., 2014).

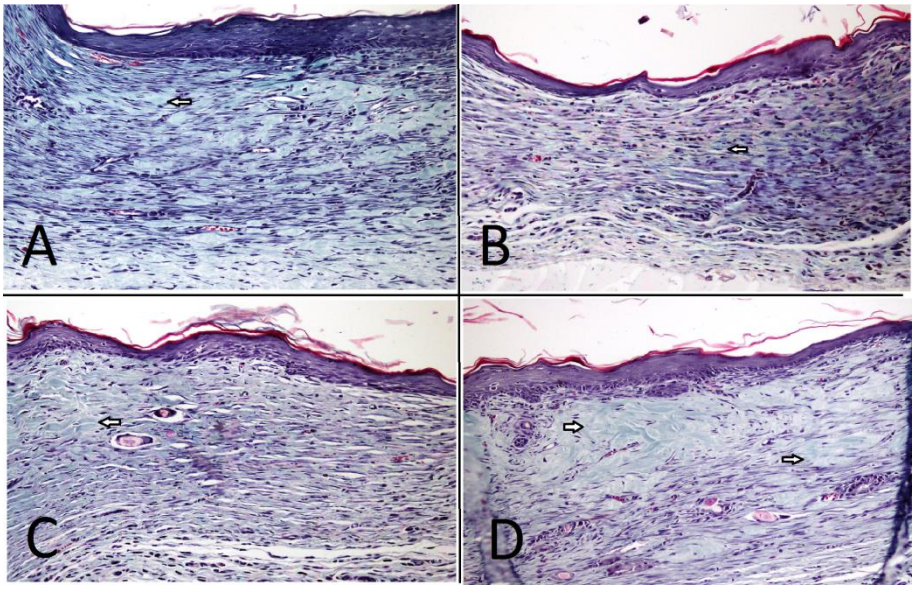
Epitel oluşumunu değerlendiren patoloji sonuçlarına göre kontrol grubunda epitel oluşumu tamamlanmazken diğer gruplarda epitelizasyon oluşumu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.17). Epitel tabakanın tamamlanma oranları kontrol grubunda % 30,0, G grubunda % 45,5, G:HA grubunda % 64,7 ve G:HA:SIS grubunda ise % 78,9 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda sadece G:HA:SIS grubu epitelizasyonun tamamlanması açısından kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı tesbit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.17. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde epidermis oluşumunun incelenmesi. A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA: SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 10X). Ok yönü: A ve B: epitel tabaka eksikliği, C ve D: tamamlanmış epitel tabaka

Yeniden oluşma basamağında yara bölgesinde kan damarı oluşumu azalmaktadır, yeni kollajen sentezi ve kollajen yıkımı sürekli devam eder, fakat kollajen sentezi ve yıkımı denge halindedir. Epitelizasyon oluştuktan sonra yara bölgesi tamamen kapanmaktadır fakat tam bir doku bütünlüğünün kazanılması yıllarca bile sürebilir (Baltzis ve diğ., 2014).

Kollajen oluşumu değerlendirildiğinde, şekil 3.18'de açık mavi renkte gözlemlenen bölgeler kollajen varlığını göstermektedir. Gruplar karşılaştırıldığında (belirgin olarak gözlemlenen oranlar) kontrol grubunda kollajen oluşumu % 20'lerde iken, G grubunda bu oran % 18,2'lerde, G:HA grubunda % 11,8, G:HA:SIS grubunda ise % 36,8 oran ile en fazla miktardadır.



Şekil 3.18. Diyabetik sıçan modelinin patolojik kesitlerinde kollajen varlığının incelenmesi, A. Kontrol grubu, B. G sünger grubu, C. G:HA sünger grubu, D. G:HA:SIS sünger grubu (Orjinal büyütme 10X)

Fibroblast hücreleri tarafından sentezlenen protein ve glikoproteinler kollajen oluşumunu sağlar ve bu süreçte kollajen miktarı artmaktadır. Kollajen varlığının da yapının yeniden modellenmesi ve organizasyonunda önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.

Granülasyon doku kalınlığı, histiyosit, lenfosit değerlendirmeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda diyabetik ayak yaralarının iyileşmesini hızlandırıcı, biyouyumlu ve biyobozunur malzeme üretimi amaçlanmıştır. Son yıllarda hücrelerinden arındırma yöntemiyle doğal iskele elde edilmesi güncel konulardan olup, hücrelerinden arındırılmış doku ve organların elde edilmesi açısından oldukça başarılı bir yöntemdir.

Literatürde yaygın olarak geçen domuz ince bağırsağı uygulanabilirlik açısından etkili bir biyomalzeme olması nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir. Kuzu ince bağırsak submukozasının yara iyileşmesinde kullanımına dair literatürde bir bilginin yer almaması, ülkemizde genç yaştaki kuzu bağırsağının kolay bulunabilir olması ve yapısında bulunan büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinde etkili olması çalışmamızın çıkış noktası olmuştur. Yara iyileşmesindeki olumlu etkilerine rağmen klinik uygulamalarda dokulardan hücrelerin tamamen arındırılmaması implantasyon sonrası bazı yan etkilere sebep olmaktadır. Literatürde bu konuda alternatif yöntemler aranmaya başlanmıştır.

Hücrelerinden arındırma tekniklerinden biri olan SDS/Triton X-100 kullanımı ile submukozada bulunan büyüme faktörleri, kollajen ve buna benzer yapıların hala korunduğu gösterilmiştir ve çalışmamızda bu yöntemi seçmemizdeki nedenlerdendir. Hematoksilen & eozin ve Masson trikrom boyaması sonrasında hücrelerinden arındırılmış SIS'te hücre çekirdeklerinin bulunmaması ve yapısındaki kollajenin varlığını devam ettirmesi kullanılan protokolün başarılı bir hücrelerinden arındırma protokolü olduğunu kanıtlamaktadır.

Literatürde SIS özellikle hücrelerinden arındırılmasından sonra etkin bir klinik uygulama malzemesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Syed ve diğ., 2014; Luo ve diğ., 2011). DNA içeriği değerleri incelendiğinde, ticari ürünlere göre malzememizdeki DNA miktarı bir miktar fazla çıkmıştır fakat in vivo testlerde herhangi bir yan etkiye rastlanılmamıştır. Hücrelerden arındırma protokolüne DNaz I enziminin de eklenmesi bu sorunun da ortadan kalkmasına bir çözüm olabilir.

SEM görüntüleri değerlendirildiğinde malzemenin lifli bir yapıda olduğu görülmüştür ki hücre tutunması açısından bu önemli bir özelliktir. İn vitro ve in vivo testlerde malzeme üzerinde fibroblast ve endotel hücrelerinin damar ağı yapma davranışını desteklediği ve malzemenin yapısında bulunan büyüme faktörlerinin de bunda etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Aynı zamanda sitotoksisite testlerinde, malzemede kimyasal bir işlem uygulanarak yapılan hücrelerinden arındırma protokolü sonucunda malzemenin deterjan türevli kimyasal malzemelerden iyice arındığı görülmüştür çünkü ölü/canlı hücre boyamada malzeme üzerinde yapılan hücre kültüründe ölü hücrelerin çok az olduğu bulunmuştur. Kuzu ince bağırsak submukozasından elde edilen doğal polimer ile jelatin ve hyaluronik asit karıştırılıp gluteraldehit ile çapraz bağlama işlemi sonrasında sünger malzemeler hazırlanmıştır.

Karışımı hazırlarken, SIS içermesi önceliği temel alınarak, jelatin ve hyaluronik asit uygun bir yoğunluk oluşturacak miktarda kullanılmış ve diğer hazırlanan malzemelerde de bu miktarlar ölçülerek standart hazırlanmıştır. SIS'in gözenek çapının 1 μm'nin altında olduğundan dolayı hücre geçirgenliği için elverişli değildir. Hücre geçirgenliğini ve yapı içinde doku oluşumunu kolaylaştırmak için SIS sünger formuna getirilmiştir. Karışımda hyaluronik asit ve jelatin kullanmamızın nedeni SIS parçacıkları arasında bağlantı kurmaktır.

Doğal polimer malzemeleri çapraz bağlamak için kullanılan birçok çapraz bağlama ajanı vardır. Gluteraldehit, gentamisin, tannik asit, carbodiimide 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) biyomalzemeleri çapraz bağlamada kullanılan başlıca kimyasallardır. Günümüzde biyomalzemeleri çapraz bağlamada yaygın olarak GA kullanılmaktadır. GA'nın avantajı hızlı reaksiyona girmesi, ucuz olması, su içerisinde kolay çözünebilmesi ve birçok proteinlerin amino grupları ile etkileşime girmesidir (Ulubayram ve diğ., 2002; Damink ve diğ., 1995).

Çapraz bağlama işlemi, sünger yapılardaki erozyon süresini uzatmak amacıyla yapılmıştır ve bu işlem sonucunda hem mekanik özelliklerin hem de sünger formunun korunmasıyla olumlu etkileri gözlenmiştir. Basma testi sonuçları incelendiğinde her 3 malzeme içinde en yüksek Young modülü G:HA:SIS grubunda bulunmuştur. Şişme testi sonuçlarında ise sünger gruplarının su tutma kapasitelerinin

yüksek olduğu görülmüştür. Malzemenin su tutma kapasitesi, nakledilen bölgede doku bütünlüğünü sağlaması açısından önemlidir ve hücrelerin tutunmasını desteleyerek hücrenin doğal ortamına benzer bir çevrede olmasını sağlar.

Ek olarak su tutma kapasitesinin fazla olması malzemenin erozyon sürecini hızlandırmaktadır. Sonuç olarak G:HA:SIS grubunun diğer malzemelerle kıyaslandığında erozyon hızının daha yavaş olması ve başlangıçtaki hacim ve dolayısıyla gözenek çapını koruyabilmesi nedeniyle daha iyi bir uygulama materyali olduğu gösterilmiştir.

İn vivo deney sonrası patolojik kesitler istatistiksel olarak kollajen birikimi, fibroblast varlığı, granülasyon doku kalınlığı, lökosit infiltrasyonu, yabancı cisim reaksiyonu, kapiller proliferasyon ve epidermal rejenerasyon kriterleri açısından incelenmiştir. SIS içeren grupta epidermis tabakasının gruptaki deneklerin % 78,9'inde tamamlandığı ve istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kapiller proliferasyonda gerileme olduğu ve kollajen birikiminin arttığı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$), fakat yüzde olarak değerlendirildiğinde yara iyileşmesinin bu grupta en hızlı seyrettiği görülmüştür.

Hayvan deneyleri etik açıdan değerlendirildiğinde, deney tasarımı yapılacağı zaman olabildiğince deney hayvanı sayısı minimum tutulmalıdır. Bu sebepten dolayı oluşturulan gruplardaki hayvan sayısının arttırılması ile sonuçların anlamlı düzeyde farklı çıkacağı kanısındayız.

Çalışmamızda doğal doku kaynaklı malzememiz preklinik uygulamada test edilmiş olup elde edilen sonuçlar bağırsak submukozasındaki hücre dışı ortamın (ECM) yara iyileşmesinde etkin bir biyomalzeme olabileceğini göstermiştir.

Piyasada bulunan benzer ürünler kıyaslandığında, pahalı olmaları, canlı hücre barındıranlarda raf ömrünün çok kısa olması, çevre koşullarından fazlasıyla etkilenmesi ve yurtdışına olan bağımlılık nedeniyle yerli üretime ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirdiğimiz yara örtüsü hem doğal doku kaynaklı olduğu için hem yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörlerini güvenli dozda içermesi nedeniyle avantajlı bir kompozittir. Geliştirmiş olduğumuz sünger yapıyı klinik denemelerle

destekleyip ticari ürün kategorisine dahil etmek ve yurt dışına olan bağımlılığı azaltmak gelecekteki planlarımızdandır.

KAYNAKLAR

Akbuğa J., Aral C., Özbaş-Turan S., Kabasakal L., Keyer-Uysal M., Transfectionefficiency of chitosan microspheres: Effect of DNA topology, *STP Pharm Sci*, 2005, **13**, 99-103.

Ay B., İnsan Miyoblast Ve Mezenkimal Kök Hücre Yüklenmiş Aselüler Çizgili Kas Kaynaklı Doğal ve Yarı-Yapay İskelelerin Çizgili Kas Dokusu Oluşturma Potansiyeli, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012, 311210.

Bağrıacık N., Dibetes Mellitus tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı., *İ.U. Cerrahpaşa Tıp Fakultesi Surekli Tıp Eğitim Sempozyumu*, İstanbul, 18-19 Aralık 1997.

Baltzis D., Eleftheriadou I., Veves A., Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: New insights, *Adv Ther*., 2014, **31**(8), 817-36.

Bilgic H., Demiriz M., Ozler M., Ide T, Dogan Y., Gumus S., Kiziltay A., Endogan T., Hasirci V., Hasirci N., Effects of EGF Containing Gelatin Sponges as Wound Healing Scaffolds, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2013, **3**(2), 205-211.

Blakytny R., Jude E., The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes, *Diabetic Medicine*, 2006, **23**(6), 594-608.

Blakytny R., Jude E .B., Martin Gibson J., Boulton A .J., Ferguson M. W., Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers, *Journal of Pathology*, 2000, **190**(5), 589–594.

Brem H., Tomic-Canic M., Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, **117**(5), 1219–1222.

Brunicardi C. F., Seymour I., Wound Care and Wound Healing, Editors: Brunicardi C. F., Andersen D. K., Billiar R. T., Dunn L. D., MD, Hunter G. J., Pollock E. R., *Schwartz's Principles Of Surgery*, 8th edition, Mc Graw-Hill, Newyork, 165-182, 2005.

Chen I. K., Diegelman R. F., Lindbald E. J., Wound healing: biochemical & clinical aspect, *Plastic & amp Reconstructive Surgery Philadelphia*, 1992, **90**(5), 926.

Damink L. H., Dijkstra P. J., Luyn M. J. A. V., Wachem P .B. V., Feijen N .J., Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , 1995, **6**(8), 460-472.

Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa, T., Kumar S. D., Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *International Journal of Polymer Science*, 2011, 19.

Dumlu C., Elektroeğirme yöntemiyle yumuşak doku mühendisliğinde kullanıma uygun yönlenmiş yarısentetik polimer taşıyıcı üretimi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversiesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2013, 354557.

Ersöz N., Özerhan D. H., Zor F., Birinci Basamakta Yara Bakımı, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 2008, **7**(0).

Fergal J. O., Biometrials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 2011, **14**(3), 88-90.

Freed L. E., Marquis J. C., Vunjak-Novakovic G., Emmanual J., Langer, R., Composition of cell-polymer cartilage implants, *Biotechonology and Bioengineering*, 1994, **43**, 605-614.

Gelatin Manufacturers, http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_ Manual_2012.pdf Amerika, 2012, (Ziyaret tarihi: 18 Ocak 2015).

Gough E. J., Scotchford C. A., Downes S., Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis, *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater*, 2002, **61**, 121–122.

Grande D. A., Halberstadt C., Naughton G., Scwartz R., Manji R., Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts, *J Biomed Mat Res*, 1997, **24**, 211-220.

Green M. F, Aliabadi Z., Green B. T., Diabetic Foot: Evaluation and Management, *South Med J*., 2002, **95**, 95-101.

Gutrine D., *History of medicine*, 5th edition, T. Nelson, London, 1964.

Hanna J. R., Giacopelli J. A., A Review of Wound Healing and Wound Dressing Products, *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 1997, **36**(1), 2-14.

Hatemi H., *Diabetes Mellitus Tarihcesi*, *Aktuel Tıp Dergisi*, 1996, **7**, 497-499.

Horch R. E., Kopp J., Kneser U., Beier J., Bach AD., Tissue engineering of cultured skin substitutes, *J Cell Mol Med*, 2005, **9**, 592–608.

International Diabetes Fedaration, http://www.mtd.de/cms/images /exklusiv /14_ januar/14_01-06_diabetesatlas%20s001-017.pdf , (Ziyaret tarihi: 25 Mart 2015).

Imani R., Rafienia M., Emami S. H., Synthesis and characterization of glutaraldehyde - based crosslinked gelatin as a local hemostat sponge in surgery: An in vitro study, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2013, **23**, 211–224.

Jeffcoate W., Jarding K. G., Diabetic Foot Ulcers, *The lancet*., 2003, **361**, 1545-1551.

Karasu A., Bakır B., Yara ve Yara İyilesmesi, *Veteriner Cerrahi Dergisi,* 2008, **14** (1), 36-43.

Kenar H., 3D patterned cardiac tissue construct formation using biodegradable materials, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008, 238274.

Langenhove L. V., Smart Textiles For Medicine and Healtcare, *Materials, Systems and Applications*, 2007, 27-47.

Levin M. E., Management of Diabetic Foot: Preventing Amputation, *South Med J*., 2002, **95**, 10-20.

Lipsky B. A., A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot, *Wiley InterScience*, 2003, **20**(1), 68–77.

Luo J-C., Chen W., Chen X. H., Qin T. W., Huang Y. C, Xie H. Q., Li X. Q., Qian Z. Y., Yang Z. M., A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS), *Biomaterials*, 2011, **32**, 706-713.

Mayfield J. A., Reiber G. E., Sanders L. J., Preventive foot care in people with diabetes, *Diabetes Care*, 1998, **21**, 2161-2177.

Moura I. F. L., Dias A. M. A., Carvalho E., Sousa H. C., Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review, *Acta Biomaterialia 9*, 2013, 7093–7114.

O'Brien F. J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materialstoday*, 2011, **14**(3), 88–95.

Pasinli A., Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Biyomalzemeler, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2004, **4**, 25-35.

Ratner B. D., Hoffman S. A., Schoen J. F., Lemons E. J., *Biomaterials Science - An introduction to materials in medicine,* 3rd ed., Elsevier, USA, 2012.

Reinholz G. G., Lu L., Saris D. B. F., Yaszemski M. J., O'Driscoll S. W., Animal model for cartilage reconstruction, *Biomaterials*, 2003, 1-11.

Senol M., Yara iyilesmesi, *T Klin J Dermatol 5*, 1995, 49-53.

Sittenger M., Bujia, J., Rotter N., Reitzel D., Minuth W. W., Burmester G. R., Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches and new cell culture tecniques, *Biomaterials*, 1996, **17**, 237-242.

Stashak T. S., Farstvedt E., Othic A., Update on Wound Dressings: Indications and Best Use, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2004, 148-163.

Stewart J., Next generation products for wound management, *Surgical Materials Worldwide wounds*, 2002, **11**(9), 341-355.

Syed O., Walters N. J., Day R. M., Kim H. W., Knowles C. J., Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 2014, 1742-7061.

Temel Histoloji Text & Atlas 2006, *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*, 6.baskı, Ankara, 2014.

Terzioğlu G., Keskin A. Ü., Yanıkkaya Demirel G., Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits, *Turk J Immunol*, 2013, **1**(3), 74-89.

Thermo Scientific, http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/ Images/ integration/1602163CrosslinkingHB_lores.pdf, (Ziyaret tarihi: 12 Kasım 2014).

Tomıhata K., and Ikada Y., Crosslinking of Hyaluronic Acid with Glutaraldehyde, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1997, **35**, 3553–3559.

Ulubayram K., Aksu E., Delilоglugurhan I., Serbetci K., Hasirci N., Cytotoxicity Evaluation Of Gelatin Sponges Prepared With Different Cross-Linking Agents, J. *Biomater. Sci. Polymer Edn*, 2002, **13**(11), 1203–1219.

Ulubayram K., Eroglu I., Hasirci N., Gelatin Microspheres and Sponges for Delivery of Macromolecules, *J Biomater Applicatıons*, 2002, **16**, 227.

Vacanti C. A., *The history of tissue engineering*, 3rd ed., Journal Of Cellular And Molecular Medicine, Century Press, London, 2007.

Vacanti C. A., Vacanti, J. P., *Principles of Tissue Engineering*, 3rd ed., Landes Company, China, 1997.

Voytik-Harbin S. L., Sherry L., Brightman A. O., Kraine M. R., Waisner B., Badylak S. F., Identification of Extractable Growth Factors From Small Intestinal Submucosa, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997, **67**, 478–491.

Wagner W. F., The Dysvascular Foot: A System for Diagnosis and Treatment, *Foot Ankle*, 1981, **2**, 62-122.

Whipple A. O, *The story of healing and wound repair*, 3rd ed., Springfield, C. Thomas (ED), US, 1963.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Kara G., Kenar H., Kuzu İnce Bağırsak Submukozasından Hücrelerınden Arındırma Yöntemı İle Biyouyumlu Yara Örtüsü Eldesi, *11.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, Eskişehir, 2-5 Eylül 2014.

Kara G., Yılmaz C., Kenar H., Doğal Doku Kaynaklı Yara Örtüleri, *Kocaeli Üniversitesi Ar-Ge Proje Pazarı 2014*, Kocaeli, 25-28 Eylül 2014.

Kara G., Vural Ç., Bayrak Y. B., Yılmaz C., Kenar H., Decellularized sheep SIS sponges for treatment of diabetic wounds, *The 21st International Biomedical Science and Technology Symposium*, Antalya, 22-24 Ekim 2015.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Elazığ'da doğdu. Orta öğretimini Malatya 20 Mayıs Vakfı Turgut Özal Lisesi'nde 2004 yılında tamamladı. Aynı yıl Kadir Has Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar ve Teknikerliği Bölümü'nü kazandı. 2006 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı. Üniversitede okuduğu yıllarda aktif olarak Doğa Sporları Kulübü'nde bulundu ve Mağaracılık alanında eğitmenlik yaptı. 2011 yılında biyolog olarak mezun oldu. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı.