

**İNSAN DERMAL FİBROBLAST VE KERATİNOSİTLERİNİ
İÇEREN KİTOSAN-JELATİN/FİBRİN YAPIŞTIRICI ESASLI
İKİ TABAKALI YAPAY DERİ SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF BILAYER ARTIFICIAL SKIN BASED
ON CHITOSAN-GELATIN/FIBRIN GLUE SYSTEM
CONTAINING HUMAN DERMAL FIBROBLASTS AND
KERATINOCYTES**

MÜŞRA ZEREN

Prof.Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2014

MÜŞRA ZEREN'in hazırladığı “İnsan Dermal Fibroblast ve Keratinositlerini İçeren Kitosan-Jelatin/Fibrin Yapıştırıcı Esaslı İki Tabakalı Yapay Deri Sisteminin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. S. İsmet Gürhan Deliloğlu)

Danışman

(Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu)

Üye

(Prof. Dr. Selma Mutlu)

Üye

(Doç. Dr. Dilek Keskin)

Üye

(Doç. Dr. Ayşe Karakeçili)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/02/2014

Müşra ZEREN

ÖZET

İNSAN DERMAL FİBROBLAST ve KERATİNOSİTLERİNİ İÇEREN KİTOSAN-JELATİN/FİBRİN YAPIŞTIRICI ESASLI İKİ TABAKALI YAPAY DERİ SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Müşra ZEREN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2014, 97 sayfa

Sunulan tez çalışmasında iki tabakalı yapay deri eşleniği oluşturulması amacıyla kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojel (SPH) doku iskelelerinde kültive edilen insan dermal fibroblast hücreleri (Detroit 551) ve TISSEEL®, fibrin yapıştırıcı içerisinde süspanse edilen insan keratinosit hücreleri (HS2) ile ko-kültür sistemi oluşturulmuştur.

Kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretimi mikrodalga-destekli gaz köpükleştirme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Gaz köpükleştirici ajan olarak NaHCO_3 , çapraz bağlayıcı olarak ise glioksal kullanılmıştır. Kitosan-jelatin hibrid doku iskelelerinin mikroyapısı SEM (taramalı elektron mikroskobu) kullanılarak incelenmiş ve ortalama gözenek çapları $509 \pm 101 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Sıkıştırma testi ile doku iskelelerinin elastik modül değeri 0.01 MPa olarak belirlenmiştir. Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi, şişme oranı ve denge şişme değerine ulaşma süresi sırasıyla; %48, 42.4 ± 2.9 ve 60 s olarak hesaplanmıştır. Boşluk kesri $0.22 \pm 0.08 \text{ mL/g}$ olarak bulunan hidrojellerin yoğunlukları $0.07 \pm 0.00 \text{ g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Kitosan-jelatin yapıya ait moleküler grupların gösterilmesi amacıyla Fourier dönüşümlü toplam yansımali azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) kullanılmıştır. Hidrojellerin termal davranışı termogravimetrik analiz ile belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada iki tabakalı yapay deri eşleniğinin oluşturulması amacıyla 4 farklı hücre kültür sistemi kurulup 28 gün sürdürülmüştür. İlk sistem olarak, kitosan-jelatin doku iskelelerine dermal fibroblast hücreleri ekilerek doku iskelesi-fibroblast etkileşimi araştırılmıştır. Kitosan-jelatin doku iskeleleriyle kurulan dermal fibroblast ve keratinosit ko-kültür sisteminde ise fibroblast-keratinosit etkileşimi görülmüştür. Üçüncü sistem olarak keratinosit hücreleri fibrin jel içerisinde kültive edilerek fibrin jelin keratinosit büyümesine etkisi incelenmiştir. Dördüncü sistemde, kitosan-jelatin doku iskeleleri dermal fibroblast hücreleri ile 7 gün boyunca kültive edildikten sonra keratinosit hücreleri ile süspanse edilen TISSEEL® fibrin yapıştırıcı doku iskelesi üzerinde bir tabaka halinde birleştirilmiştir. Hücre canlılığı ve çoğalması MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi ile gösterilip hücrelerin biyomalzeme üzerinde gösterdikleri morfolojik davranışlar SEM ile incelenmiştir. *kollajen 1 (COL1)*, *fibronektin (FN)*, *lorikrin (LOR)* ve *keratin 14 (KRT14)* gen ifadeleri RT qPCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak, HS2 ve Detroit 551 hücrelerinin ayrı iki tabakada kültive edilmesinin hücresel canlılığı ve aktiviteyi desteklediği, önerilen deri eşleniği sisteminin geliştirilerek deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere uygun bir deri modeli olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: deri doku mühendisliği, kitosan, jelatin, fibrin yapıştırıcı, dermal fibroblast hücre hattı, keratinosit hücre hattı.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BILAYER ARTIFICIAL SKIN BASED ON CHITOSAN-GELATIN/FIBRIN GLUE SYSTEM CONTAINING HUMAN DERMAL FIBROBLASTS AND KERATINOCYTES

Müşra ZEREN

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

February 2014, 97 pages

In this study, we aimed to obtain an artificial bilayer skin substitute by combining human dermal fibroblasts (Detroit 551) cultured on chitosan-gelatin superporous hydrogels (SPHs) as a dermal layer and human keratinocytes (HS2) suspended in fibrin gel as an epidermal layer.

A novel chitosan-gelatin scaffold was prepared in superporous hydrogel (SPH) form by microwave irradiation-supported gas foaming method. Sodium bicarbonate was used as gas blowing agent and crosslinking was achieved by means of glyoxal. Average pore diameters of the scaffolds were calculated from SEM (Scanning Electron Microscope) photographs as $509\pm101\ \mu\text{m}$ and elastic modulus determined by compression test was 0.01 MPa. The water uptake capacity, swelling ratio and time to reach equilibrium for chitosan-gelatin SPHs were found to be 48%, 42.42 ± 2.94 , and 60 sec, respectively. Void fraction and density of the SPHs were calculated as $0.22\pm0.08\ \text{mL/g}$, $0.07\pm0.00\ \text{g/mL}$, respectively. Molecular structure and interactions of chitosan-gelatin SPHs were characterized by attenuated total reflection Fourier transformed infrared spectroscopy (ATR-FTIR). Thermal characterization of SPHs were done by thermogravimetric analysis.

In cell culture studies, four types of cell culture systems were established and incubated for 28 days, *in vitro*. In the first group, chitosan-gelatin scaffolds were seeded with only Detroit 551 cells to determine the cell-material interactions and biocompatibility. In the second group, HS2 cells were inoculated into the chitosan-gelatin SPHs after 7 days culture of Detroit 551 cells on these scaffolds. In the third group, HS2 cells in fibrin glue were incubated on tissue culture plate. In the fourth group, HS2 cells suspended in fibrin glue were carried onto the scaffolds which were

seeded with Detroit 551 cells. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and morphological examination was carried out with scanning electron microscopy (SEM). *Collagen I (COL1)*, *fibronectin (FN)*, *loricrin (LOR)* and *keratin14 (KRT 14)* gene expressions were quantified by real time quantitative polymerase chain reaction (RT qPCR).

In conclusion, cultivation of HS2 and Detroit 551 cells in bilayer skin tissue substitute supported the cell viability and activity. Presented bilayer artificial skin system could be considered as a potential skin substitute in skin tissue engineering applications.

Keywords: skin tissue engineering, chitosan, gelatin, fibrin glue, dermal fibroblast cell line, keratinocyte cell line.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisi ve deneyimleriyle beni aydınlatan, akademik kişiliğiyle zihnime kazınan ve desteğini hep hissettiğim tez danışmanım, değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na** teşekkürlerimi sunarım.

Üniversitenin ilk yıllarından itibaren yoluma ışık tutan, bilgi ve tecrübesinin önünde eğildiğim, samimiyetine sığındığım pek kıymetli hocam **Sayın Prof. Dr. İsmet Gürhan Deliloğlu'na** defalarca teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, hayatımdaki düğümleri çözmeye çalışırken hep yanı başımda beliren sevgili dostlarım enerjisiyle başımı döndüren **Ar. Gör. Merve Çapkin Yurtsever'e** ve yol arkadaşım **Özge Ekin Tunçay'a** en samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmamın şekillenmesinde çok büyük emeği geçen, ortaya çıkan problemlerin çözümünde önemli katkıları bulunan çalışma arkadaşım **Tuğrul Tolga Demirtaş'a** teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıdığım ilk andan itibaren dostluklarıyla hayatımı zenginleştiren, değerli fikirlerini çok önemseyen ve sık sık bilgilerine başvurmadan çekinmediğim sevgili çalışma arkadaşlarım **Ar. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e**, **Ar. Gör. Soner Çakmak** ve **Anıl Sera Çakmak'a** çok teşekkür ederim.

İyi ki tanıştığım, neşesiyle yüzümü güldüren, tespitleriyle şaşırtan, heyecanı ile enerji veren sevgili çalışma arkadaşım **Ar. Gör. Damla Çetin Altında'a** çok teşekkür ederim.

Hayat tecrübesini ve bilgisini çekinmeden paylaşan, değerli arkadaşım ve abim **Dr. Murat Şimşek'e** en samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Arkadaşlığıyla hayatıma renk katan çalışma arkadaşım **Gökçe Kaynak'a** tez çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca arkadaşlıklarını çok sevdiğim, **Gülseren Irmak'a**, **Elif Sunal'a**, **Seher Davarpanah'a**, **İnci Şikhaliyeva'ya**, **Farzin Sana'ya** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın önemli bir kısmında bana laboratuvarlarının kapılarını açan **Sayın Prof. Dr. Dürdane Kolonkaya'ya** ve konuyla ilgili yardımlarını hiç esirgemeyen **Ar. Gör. Aysun Kılıç Süloğlu'na**, **Ar. Gör. Elif Kuş'a** teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında beni laboratuvarlarında misafir eden ve tez zamanda çok sevdiğim **Ar. Gör. Gözde Karabulut'a**, **Ar. Gör. Kürşat Şahin'e** ve **Aslı Kartal'a** teşekkür ederim.

Öğretisine, disiplinine ve spor ahlakına saygı duyduğum, hayat tecrübesini ve desteğini hiç esirgemeyen hocam **Sevkan Sarısaltıkoğlu'na** teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen **Dr. Özgür Hürkal'a** teşekkür ederim.

Beni başarılarımla ve hatalarımla kabul eden sevgili **anne ve babama** en derin sevgilerimi sunarım. Sırdaşım, kardeşim **Müge'ye** ve benim küçük neşe kaynağım **İlayda'ya** sadece varlıklarıyla bile mutlu ettikleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.İnsan Deri Dokusunun Histofizyolojisi	4
2.1.1.Epidermis	5
2.1.2.Dermis.....	8
2.1.3.Deri kayıpları ve yara iyileşmesi	10
2.1.3.1.Deri kayıpları	10
2.1.3.2.Yara iyileşmesi	12
2.1.3.3.Yara onarımı ve rejenerasyon arasındaki temel farklar.....	16
2.2.Deri Doku Kayıplarının Rejenerasyonuna Yönelik Tedavi Yöntemleri	17
2.2.1.Geleneksel tedavi yöntemleri	17
2.2.2.Doku mühendisliği ve bu yaklaşımla yapılan uygulamalar.....	19
2.2.2.1.Doku mühendisliği	19
2.2.2.2.Deri hasarları/kayıpları için klinik tedavi yaklaşımları.....	20
2.2.2.3.Deri doku mühendisliği	21
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1.Kullanılan Malzemeler	38
3.2.Kitosan-Jelatin Bazlı Süpergözenekli Hidrojellerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	40

3.2.1.Kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojellerin üretimi	40
3.2.2.Kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojellerin karakterizasyonu	41
3.2.2.1.Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)	41
3.2.2.2.Şişme testi.....	42
3.2.2.3.Termogravimetrik analiz (TGA)	42
3.2.2.4.Mekanik dayanım testi.....	42
3.2.2.5.Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi	43
3.2.2.6.Boşluk kesri analizi	43
3.2.2.7.Yoğunluk tayini.....	43
3.3.Hücre Kültürü Çalışmaları.....	43
3.3.1.İnsan dermal fibroblastlarının ve keratinositlerinin kültivasyonu	43
3.3.2.Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak kitosan-jelatin doku iskelelerinin sterilizasyonu.....	44
3.3.3.Hücre kültürü sistemlerinin hazırlanması.....	44
3.3.3.1.Kitosan-jelatin doku iskelelerinde dermal fibroblastların (Detroit 551) kültivasyonu.....	45
3.3.3.2.Kitosan-jelatin doku iskelelerinde dermal fibroblast ve keratinosit ko-kültürü.....	45
3.3.3.3.Fibrin yapıştırıcı içerisinde keratinosit kültivasyonu ve iki tabakalı deri modelinin hazırlanması	46
3.3.4.MTT analizi.....	47
3.3.5.Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	47
3.3.6.Histolojik boyama	48
3.3.7.Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)	49
3.4.İstatistiksel analiz	51
4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	52
4.1.Kitosan-Jelatin/Fibrin Yapıştırıcı ile Oluşturulan İki Tabakalı Deri Eşleniği	52
4.1.1.Kitosan-jelatin bazlı doku iskelelerinin üretilmesi.....	54

4.1.2.Kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojenlerin karakterizasyonu.....	58
4.1.2.1.Morfolojik analiz.....	59
4.1.2.2.Şişme testi sonuçları	59
4.1.2.3.Termogravimetrik analiz (TGA)	61
4.1.2.4.Mekanik dayanım testi.....	62
4.1.2.5.Fourier dönüşümlü toplam yansımali azaltılmış kızılötesi spektroskopisi.....	62
4.1.2.6.Boşluk kesri analizi	64
4.1.2.7.Yoğunluk tayini	65
4.2.Hücre Kültürü Çalışmaları.....	65
4.2.1.Çalışmada kullanılan hücreler ve özellikleri.....	65
4.2.2.Kitosan-jelatin SPH'ler ile yürütölen hücre kültürü çalışmaları.....	70
4.2.2.1.MTT analizi.....	70
4.2.2.2.Taramalı elektron mikroskopisi (SEM).....	72
4.2.2.3.Histolojik boyama	78
4.2.2.4.Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	81
5.KAYNAKLAR	88
EK.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.Deri dokusunun histolojik yapısı ve elemanları, yan kesit	4
Şekil 2.2.Epidermisin katmanlı yapısı ve keratinositlerin terminal farklılaşması.	5
Şekil 2.3.Yanığa bağlı deri hasarı, 1., 2. ve 3. derece yanık bölgeleri.	11
Şekil 2.4.Yara iyileşme sürecinde birbiri içine geçmiş iyileşme evreleri.....	13
Şekil 2.5.Yara iyileşmesi evreleri.....	15
Şekil 2.6.İnsan deri anatomisi ve otogreft tekniğinde inilen derinlikler.....	18
Şekil 2.7.Deri doku mühendisliği uygulamaları.	20
Şekil 2.8.1970'lerden 2000'li yıllara deri doku mühendisliğinin gelişimini gösteren zaman çizelgesi.....	22
Şekil 2.9.Kitosanın moleküler yapısı.....	25
Şekil 2.10.Kitosanın yara yatağındaki etkisi.	26
Şekil 2.11.Fibrinojenin yapısal görünümü ve fibrine dönüşümü.....	27
Şekil 2.12.Fibrin pıhtıya ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.	28
Şekil 2.13.Hücre enkapsüle edilmiş fibrin jel.	29
Şekil 2.14.Dermo-epidermal ideal deri eşleniği.	32
Şekil 2.15.İki tabakalı, dermo-epidermal deri eşleniği ürünü.	33
Şekil 3.1. Kitosan-jelatin hidrojellerin mikrodalga ısıma varlığında gaz köpükleştirme yöntemi ile sentezlenmesi.	41
Şekil 3.2. Dört farklı hücre kültürü sisteminin kurulumu ve takibi.....	45
Şekil 4.1.Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 ile oluşturulan iki tabakalı deri modeli.....	54
Şekil 4.2.Jel ve köpük oluşmunun bağlı kinetiği.	57
Şekil 4.3. Kitosan-jelatin doku iskelesinin gösteren SEM fotoğrafları.	59
Şekil 4.4.Kitosan-jelatin doku iskelelerine ait şişme profilini gösteren grafik	59
Şekil 4.5.Kitosan-jelatin doku iskelelerinin kuru ve şişmiş haldeki fotoğrafları.....	60
Şekil 4.6.Kitosan-jelatin SPH'lere ait termogram.	61

Şekil 4.7.Saf jelatin (mavi), saf kitosan (kırmızı), kitosan SPH (pembe) ve kitosan-jelatin SPH'lere ait (yeşil) ATR–FTIR spektrumları.....	63
Şekil 4.8. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HS2 hücrelerine ait faz kontrast ve Giemsa boyama fotoğrafları	66
Şekil 4.9.HS2 ve Detroit 551 hücrelerinin hemositometrik sayım yöntemi ile elde edilen büyüme eğrilerini gösteren grafiklerler..	67
Şekil 4.10. HS2 ve Detroit 551 hücrelerine ait MTT analiz sonuçları.....	69
Şekil 4.11. Hücre kültür gruplarına ait MTT analiz grafikleri.	71
Şekil 4.12. Kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde kültive edilen Detroit 551 hücrelerini gösteren SEM fotoğrafları..	74
Şekil 4.13. Kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde HS2 ve Detroit 551 hücrelerinin ko-kültivasyonuna ait SEM fotoğrafları.....	75
Şekil 4.14. Hücresiz fibrin yapıştırıcı ve fibrin yapıştırıcı içerisinde kültive edilen HS2 hücre kültürünü gösteren SEM fotoğrafları.....	76
Şekil 4.15. Kitosan-jelatin/Detroit 551 + fibrin yapıştırıcı/HS2 SEM fotoğrafları.....	77
Şekil 4.16. Hücre kültür gruplarına ait 21. gün H&E boyama görüntüleri.....	79
Şekil 4.17.Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemine ait. (a)7. (b)14. (c)21. ve (d)28. gün H&E boyama görüntüleri.	80
Şekil 4.18. Kitosan-jelatin/Detroit 551 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl FN ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi.	83
Şekil 4.19.Kitosan-jelatin/Detroit 551 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl COL1 gen ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi.	84
Şekil 4.20. Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl LOR ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi.....	85

Şekil 4.21. Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl KRT14 ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi. ...86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.Deri doku eşleniği ürünlerin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması. ...	31
Çizelge 2.2.Ticari olarak ulaşılabilen, klinik ve laboratuvar uygulamalarında kullanılan, epidermal deri eşlenikleri.....	34
Çizelge 2.3.Ticari olarak ulaşılabilen, klinik ve laboratuvar uygulamalarında etkili, dermal deri eşlenikleri.	36
Çizelge 3.1. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri.....	50
Çizelge 4.1.Kitosan-jelatin SPH hazırlama reçetesi.	58
Çizelge 4.2.Saf kitosan,saf jelatin, kitosan SPH ve kitosan-jelatin SPH yapılarına ait FTIR spektrumunda yer alan bantlar ve açıklamaları.	64
Çizelge 4.3.Kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojellerin temel özellikleri.	65
Çizelge 4.4. HS2 ve Detroit 551 özgül hücre büyüme hızı ve popülasyon ikilenme zamanı.	68
Çizelge 4.5.RT qPCR örnekleri RNA miktarları (NanoDrop Thermoscientific).....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikro
ρ	Çözelti yoğunluğu (g/mL)
t_d	Popülasyon ikilenme zamanı
μ	Özgül büyüme hızı
H&E	Hematoksilen ve eozin
IHC-P	İmmünohistokimya-parafin

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
ATR-FTIR	Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Hücre dışı matris
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	Fötal sıgır serumu
FDA	Food and Drug Administration
FN	Fibronektin
GAG	Glikozaminoglukan
HMDS	Hekzametildisilazan
IPN	Interpenetrating Network (İç içe geçmiş ağ yapı)
KIF	Keratinosit ara filamanları
KRT 14	Keratin 14

KOL-I	Kollajen Tip I
LOR	Lorikrin
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
RNA	Ribonükleik asit
RT qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPH	Süpergözenekli hidrojel
TCPS	Hücre kültür kabı
TGA	Termogravimetrik analiz
UVR	Ultraviyole radyasyon
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Deri, yaşamımız boyunca iç organ ve dokularımızı dış çevredeki potansiyel tehlikelerden korumak gibi zor bir görevi üstlenmiştir. Dış çevre ile vücut arasında bir ara yüzey görevi gören deri mikroorganizmaların, toksinlerin ve diğer zararlıların vücuda girmesini önlemekte, ultraviyole radyasyona karşı koruma sağlayarak, su ve elektrolit kaybını engellemektedir. Ayrıca vücutta ısı, basınç, titreşim ve acı gibi uyarımları algılayarak kan akışı ve terleme ile vücut sıcaklığını düzenlemektedir [1].

Deri hastalıkları veya yaralanmalarında deri bütünlüğüne zarar gelmesi, bazı deri fonksiyonlarının kaybedilmesine hatta ölüme bile yol açabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre yıllık 300,000 kişide yanıklara bağlı deri hasarları oluşmaktadır. Bununla birlikte 6.5 milyon bireyin ise bası ülserleri, venöz stasis, kronik deri ülserleri ve diyabetik ülserlerden etkilenecek deri bütünlüğü zarar görmektedir. Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri, işlev ve estetik görünüm ihtiyacını aynı anda karşılayamamaktadır [2].

Normal insan derisinin yerini alabilecek deri modelinin oluşturulması çok güç bir tasarımdır. Çünkü deri yapısal ve işlevsel olarak karmaşık bir organdır. Deri, farklı embriyonik kökenlere (nöroktoderm, mezoderm ve nöral krest) ait farklı hücre tiplerinden meydana gelmektedir. Epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarından oluşan katmanlı bir yapıya sahiptir. Epidermisteki hücrelerin %90'ını keratinositler oluşturmaktadır. Pigment içeren melanositler, antijenik özellikteki Langerhans hücreleri ve mekanik sensör olarak görev yapan Merkel hücreleri de epidermisin hücresel elemanları arasındadır [3]. Bağ dokusu olan dermis, derinin mekanik özelliklerini belirlemektedir ve mezoderm kökenli fibroblast hücrelerinden oluşmaktadır. ECM (hücre dışı matris) molekülleri, deri uzantıları ve duyu reseptörleri burada yer almaktadır. Hipodermis ise ısı kaybına karşı deriye izolasyon sağlayan subkutan (deri altı) yağ deposudur. Hipodermisin mezenkimal kök hücre kaynağı olduğu da bilinmektedir [4].

Deride farklı kalınlık, mekanik dayanım ve esnekliğe sahip epidermal ve dermal tabaka birbirinden farklı yapısal özellikleriyle bir araya gelerek derinin yukarıda bahsedilen fonksiyonlarını gerçekleştirmesini sağlar. Epidermis, dış çevre ile vücut arasında geçirgen olmayan bir bariyer oluşturmaktadır. Güçlü bağ dokusu dermis

zengin kollajen içeriğiyle deriye esneklik kazandırmaktadır. Bu iki tabaka bazal tabaka adı verilen ECM ile birbirinden ayrılmaktadır.

Deri doku mühendisliğine hakim olan genel yaklaşım deri eşleniklerinin anatomik ve işlevsel açıdan normal deriye en yakın modelinin oluşturulması üzerine kuruludur. Bugün, deri doku mühendisliği ürünleri arasında çok sayıda ve farklı potansiyelde deri doku eşleniği mevcuttur [5] .

İyi karakterize edilmiş deri eşleniği modellerinin elde edilebilmesi için hücresel elemanların 3 boyutlu bir matris içinde hücre-hücre etkileşiminde bulunarak deri dokusu oluşturması istenilmektedir [2].

Hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, hücre davranışını kontrol etmektedir. İki boyutlu monolayer modeller, karmaşık ve dinamik çevrenin oluşturulmasında yetersiz kalmakta ve hücrelerin yapay ve esnek olmayan bir düzlemde kültive edilmesi nedeniyle *in vivo* mikroçevredeki etkileşimleri taklit edememektedir. Üç boyutlu modellerde kültive edilen hücreler ise çeşitli yüzey reseptörlerini eksprese edebilmekte, hücre dışı matrisi sentezleyebilmekte ve çeşitli metabolik fonksiyonları yerine getirebilmektedir. *In vivo* çalışmalarda dermal fibroblastların sentezledikleri çözülebilir faktörlerin epidermise difüze olup burada yer alan keratinosit büyümesini ve bazal membran proteinlerinin oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Keratinositlerin monokültürde oluşturduğu ince epidermal tabaka 2 hafta içerisinde apoptoza (programlı hücre ölümü) uğramaktadır. Yapay insan deri eşleniklerinin 3 boyutlu ortamlarda oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar monolayer kültürlerden elde edilemeyen sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır.

Doğal polimerlerden olan kollajen, hidroksiapatit, aljinat, polipeptidler, glukozaminoglukanlar (hiyaluronan, fibronektin), kitosan, dekstran, jelatin, aljinat ve sentetik malzemelerden (polivinil klorür, polilaktid) dondurarak kurutma ve gaz köpükleştirme gibi çeşitli üretim teknikleriyle 3 boyutlu matrisler elde etmek mümkün olmaktadır [6]. Malzemelerde bulunması gereken en önemli özellik biyouyumluluktur. Doğal polimerler hücre tutunmasını desteklemenin yanında düşük toksisite ve düşük immünojenite gibi interaktif özelliklere sahiptir. Sentetik polimerler de kolay işlenebilir olduklarından geometrik, mekanik dayanım, biyobozunurluk ve geçirgenlik gibi özellikleri çeşitli parametrelerle kontrol edilebilmektedir [7]. Son yıllarda klinikte doku entegrasyonunu kolaylaştıran

malzemeler yaygınlaşmıştır. Siyanoakrilat, gluteraldehit-albumün ve fibrin yapıştırıcı bazlı adheziv malzemeler deri gibi yumuşak dokuların tedavisindeki eksiklikleri tamamlamak için yardımcı materyaller olarak kullanılmaktadır [8].

Deri doku mühendisliği ürünleri yapısal olarak; dermal deri eşlenikleri, epidermal deri eşlenikleri ve dermo-epidermal (kompozit) deri eşlenikleri olarak sınıflandırılabilir. Ticari olarak ulaşılabilen çok sayıda ve farklı özellikte yara örtü malzemesi ve deri eşleniği ürünü mevcuttur. Bunlar arasında deri bankalarında kadavradan alınan deri, Apligraf® ve Karoderm® iki tabakalı deri eşleniklerine örnek olarak verilebilir [9, 10].

Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri eşleniklerinde, dermal tabakanın dermal onarımı ve epidermal desteği sağlaması beklenmektedir. Epidermis, yaranın üzerini örterek su ve elektrolit kaybını önlemeli, derinin bariyer fonksiyonunu üstlenmelidir. İdeal deri eşleniği dokunun en az skar (yara izi) ile onarımını sağlamalıdır. Aktif hücresel bileşenler immün reaksiyona yol açmamalıdır. Kaybedilen dokuda yeterli mekanik destek oluşturulmalı ve klinik olarak manipüle edilir olmalıdır [11].

Deri doku mühendisliğindeki yeni gelişmelerle birlikte medikal pazarda da birçok yeni firma ve ürün ortaya çıkmaktadır. İstatistiklere göre gelecekte özellikle deri eşleniği ürünlere duyulan ihtiyaç artacaktır [2].

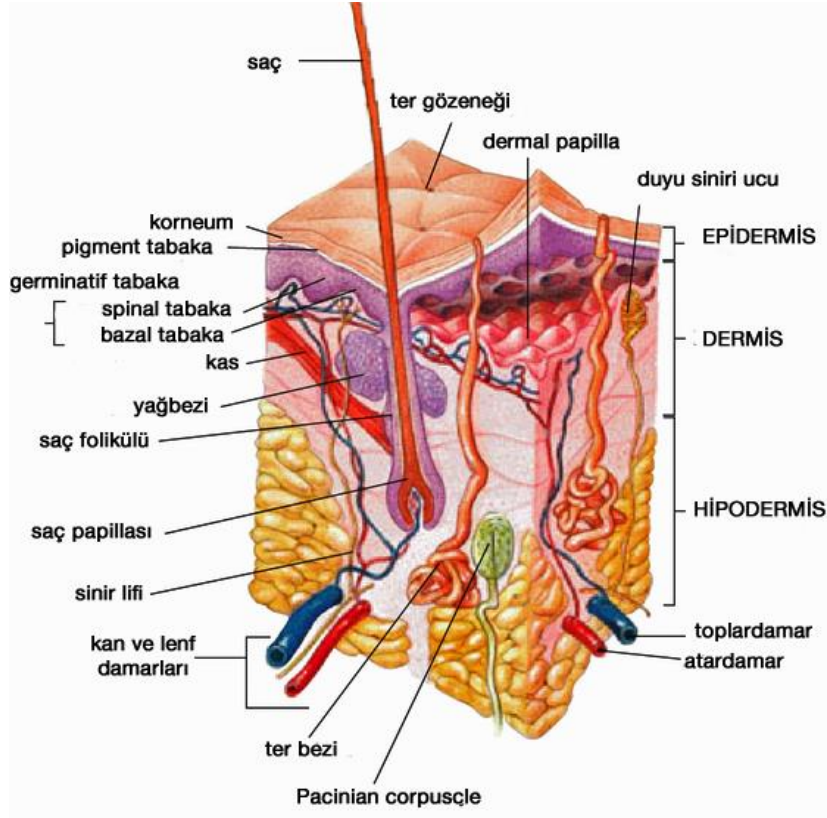
Sunulan tez çalışmasının amacı, deri doku rejenerasyonunu destekleyecek özellikte iki tabakalı yapay deri eşleniğinin oluşturulmasıdır. Bu amaçla mikrodalga destekli gaz köpükleştirme yöntemi ile üretilen kitosan-jelatin SPH'lerde (süpergözenekli hidrojel) insan dermal fibroblastları (Detroit 551) kültive edilmiştir. İki tabakalı yapıyı tamamlamak üzere insan keratinosit hücreleri (HS2) dermal fibroblastların kültive edildiği kitosan-jelatin doku iskelelerinin üzerine TISSEEL®, fibrin yapıştırıcı içerisinde taşınmıştır. Konu ile ilgili literatür özeti, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve elde edilen sonuçlar devam eden bölümlerde sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Deri Dokusunun Histofizyolojisi

Derimiz -en geniş organımız- konumu itibarıyla vücudumuzun iç ve dış çevresi arasında bir ara yüz olma özelliğindedir. Yetişkin bir insan derisinin yaklaşık 2 m² lik bir alanı kapladığı, ortalama 2.5 mm kalınlığında ve yaklaşık 1.1 g/cm³ yoğunluğunda olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte deri, vücut ağırlığının da yaklaşık % 6'sını oluşturmaktadır.

Stratejik açıdan çok önemli bir görev üstlenen derimiz, bir dizi stres etkenine karşı bariyer oluşturmanın yanı sıra çevresel bir algı sistemi olarak da davranır. Kimyasal, mekanik ve biyolojik birçok uyarana karşı yalıtım yapmaktadır. Bundan başka ultraviyole radyasyonu (UVR) absorblayan bir pigmentasyon sistemi bulunur. Doku mikroçevresinde bulunan anormal eksprese olmuş ve yabancı bileşenlere duyarlı, karmaşık bir immün-regülasyon sağlayarak vücuda ileri koruma sistemi kazandırır. Yapılan araştırmalarda derinin, vücutta homeostazın sağlanması açısından kritik bir görev üstlendiğini söylenmektedir [12, 13].



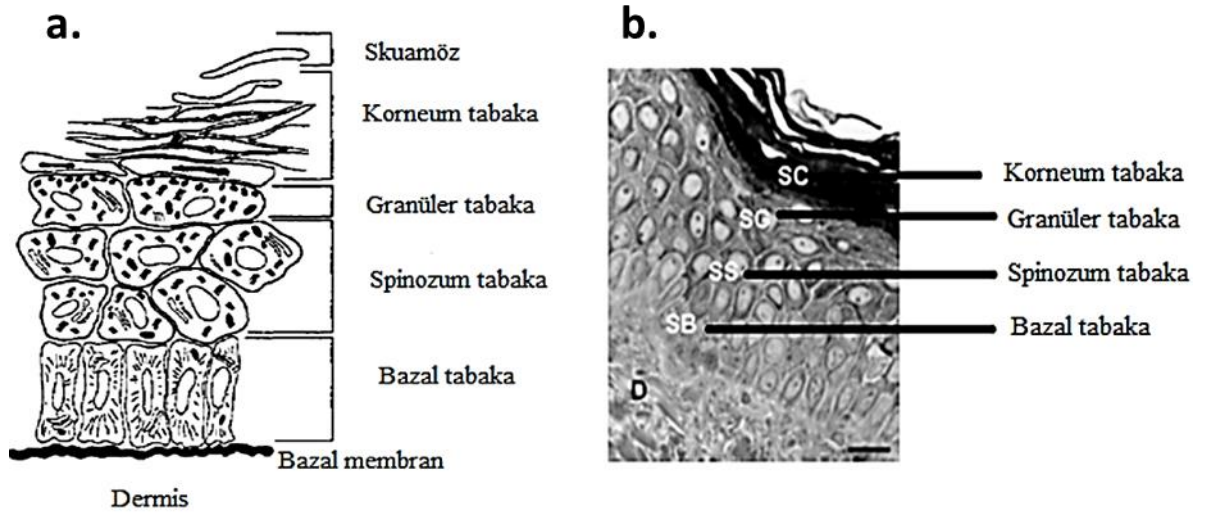
Şekil 2.1. Deri dokusunun histolojik yapısı ve elemanları, yan kesit [14].

İnsan derisi, 3 temel tabakadan meydana gelmektedir: epidermal tabaka, dermal tabaka ve hipodermis (veya sübkütan yağ tabakası) Şekil 2.1'de şematize edilmiştir. Epidermal tabaka yoğun olarak keratinosit hücresi içeren en dıştaki tabakadır. Bazal tabaka, epidermal ve dermal tabakayı birbirinden ayıran, yoğun ekstraselüler matris (ECM) içeren tabakadır. Bazal tabakanın altında ise dermal tabaka, dermis bulunur.

2.1.1. Epidermis

Epidermis, embriyonik ektodermden türevlenen ince deri tabakası olup bazal tabakada yer alan keratinositlerin proliferasyonu ile meydana gelmiştir [15]. Çok katlı, damar sistemi içermeyen yapısı ve ortalama 75 ila 150 μm 'lik kalınlığıyla (el ayası ve ayak tabanında bu kalınlık, 600 μm ' ya kadar varır) deri dokusunun dış kabuğunu oluşturur.

Epiderminin temel hücre tipi keratinositlerdir (%95-97). Bunun yanında melanositler, immün sistemin dentritik hücreleri (Langerhans hücreleri) ve Merkel hücreleri de epidermal hücrelerdendir [16]. Keratinosit farklılaşma süreçleri sonucunda epidermis, 4 ana katmandan (strata) oluşur ve buradaki devamlılık kornifikasyon (katmanlı skuamöz yapı oluşumu) olarak bilinir [17].



Şekil 2.2. Epiderminin katmanlı yapısı ve keratinositlerin terminal farklılaşması.

(a) Epidermiste terminal farklılaşma. Terminal farklılaşma ve keratin sentez dizileri. Bazal tabaka üzerindeki tüm hücreler için 'suprabazal' terimi kullanılır [18].
(b) Yüksek çözünürlüklü ışık mikroskopundan alınan normal insan deri örneğine ait

deri katmanlaşması görüntüsü. D, dermis; SC, korneum tabakası; SG, granüler tabaka; SS, spinoz tabaka; SB, bazal tabaka, ölçek: 30 µm, [12].

Katmanlar, dışarıdan içeriye doğru; korneum tabakası, granüler tabaka, spinozum tabakası ve bazal tabaka olarak sıralanır (Şekil 2.2). Bu katmanlarda yer alan hücreler, desmozom adı verilen membran bağımlı plaklar ile birbirlerine bağlanırlar. Desmozomlar, komşu epidermal hücrelerin hücre iskeletlerini birbirine tutturmaktadır. Kaderinler (desmogleinler ve desmokoliner) ise keratinosit-keratinosit bağlanmasında görev alan önemli proteinlerdendir.

En dıştaki korneum tabakası, üst üste dizilmiş 15–30 sıra cansız, fakat biyokimyasal olarak aktif, korneosit hücrelerinden meydana gelir ve dış çevreye karşı koruyucu bir tabaka oluşturur.

Korneum tabakasının hemen altında yer alan granüler tabaka, bölünme yeteneğini kaybetmiş 3–5 sıra keratinosit dizisinden meydana gelmiştir. Burada yer alan keratinositler, keratohyalin proteinini sentezlerken hücre organel ve çekirdekleri yıkılmış ve hücre membranları giderek geçirgenliğini yitirmiştir.

Granüler tabakanın ardından gelen spinozum tabakası, bölünme kapasitesi sınırlı, 8-10 sıra keratinosit dizilerinden oluşmaktadır. Ayrıca bu tabakada, immün sistemin kemik iliğinden türevlenmiş sentinel hücreleri olan, Langerhans hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücreler yabancı konuklara karşı sürekli alarm halinde bulunarak deri dokusunun güvenlik kamerası gibi davranırlar.

En altta epidermisin sınır tabakası, bazal tabaka bulunmaktadır. Buradaki hücreler, epidermisle dermisi birbirinden ayıran ve hücresel olmayan bir bazal membrana tutunurlar.

Çok düşük oranda ekstraselüler matrise sahip olan epidermis, daha çok karbonhidrat polimerleri ve stratum korneum lipidlerinin sıvı kristalleri halindeki organizasyonu ile hidrofilik akışkanlara karşı geçirgenlik bariyeri meydana getiren hidrofobik bir duvar yaratır [16].

Epidermisin temel hücre tipi olan keratinositler, keratin ara filamanları ailesine (KIF) dahil olan ve boyları 8-15 nm uzunluğundaki protein yapılar içermektedir. Keratin proteinlerinin asidik olanları Tip I ve nötral-bazik olanları da Tip II olarak adlandırılıp çiftler halinde sentezlenmektedirler. Moleküler genetik alanındaki

alışmalar, epiderminin farklı tabakalarının farklı miktarda keratin aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Antikor immnolokalizasyonu ve yüksek çözünürlükte elektron mikroskobu görüntüleri keratin filamanlarının hücre içerisindeki 3 boyutlu yerleşimini göstermektedir [12, 18]. Disülfid bağ yğunluğuna bağlı olarak keratinler yumuşak (deride) veya sert (sa ve tırnak) yapıda olabilmektedirler. Keratinizasyonu pekiştiren hücre-hücre bağlantıları sıvı kaybını önleyen ve potansiyel zararlı molekül ve organizmaların girişini engelleyen bir bariyer oluşturmaktadır. Keratinlerin alt birimleri; hücre tipi, embriyonik gelişme dönemi, histolojik farklılaşma basamağı, hücresel büyümenin gerçekleştiği ortam şartları ve hastalık durumuyla değişkenlik göstermektedir [19].

Keratinositler, bazı koruyucu immünojenik molekülleri de sentezlemektedirler. Bunlar arasında interlökinler, transforme edici büyüme faktörleri (TGF), platelet-benzeri büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tmor nekroz büyüme faktörü (TNF), interferonlar (IL-1, IL-6, IL-8) ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktörler (GM-CSF veya G-CSF) de bulunmaktadır.

Melanositler: Deri rengini belirleyen hücrelerdir. Bazal tabaka içerisinde rastgele dağılmışlardır. Derinin ultraviyole (UV) işığa maruz kalmasıyla sayıları artış göstermektedir. Böylece sentezledikleri melanin miktarında da bir artış meydana gelmektedir. Melanin, UV koruyucu bir pigmenttir. Melanin pigmenti keratinosit sitoplazması içerisine verildiğinde şemsiye gibi davranarak çekirdek etrafını UV işığının zararlı etkilerinden korur [17].

Langerhans hücreleri: (LCs), en çok orta-epidermiste bulunur ve hücresel immün yanıtı katılır. Kemik iliği kökenli bu hücreler, dendritik hücreler (DCs) olarak da bilinir. Langerhans hücreleri epidermal hücrelerin %2-4'n oluşturur.

Merkel hücreleri: Melanositler gibi, Merkel hücreleri de bazal hücre tabakasında yer alır. Bu hücreler, elektron mikroskobu ile gözlenebilen membran bağlantılı sitoplazmik nöroendokrin tipi granülleri içerir. Çevresel sinir uçlarıyla sinaptik bağlantılar oluştururlar ve yavaş adapte olan mekanoreseptörler olarak iş görürler [12].

Bazal Tabaka: Bazal membran aynı zamanda 'bazal tabaka' veya 'bazal lamina' olarak da bilinmektedir. Bazal tabaka, önemli miktarda kollajen tip IV içerir. Fiziksel olarak dermis ve epidermisi birbirinden ayırır ve heterojen bir bileşime sahiptir.

Lamina densa (kollajen IV'ten meydana gelen) ve lamina lucida (laminin ve diğer proteoglikanlardan oluşan) bileşenlerinden oluşur. Epidermal-dermal fibrilleri (kollajen VII) fiziksel olarak lamina densa'yı papiller dermise bağlamaktadır. Laminin, kollajen IV ve kollajen VII, keratinositlerin bazal membran üzerindeki ilerleyişini düzenler ve bu olay yara iyileşmesi sırasında büyük önem taşır [12]. Normal derideki epidermal mitotik aktivitelerin çoğu bazal hücre tabakasında gerçekleşir. Bu tabakanın homeostazında meydana gelecek bir bozulma, sağlam ve canlı bir derinin devamlılığına ciddi zararlar verebilir.

2.1.2. Dermis

Elastik fiberler ve destek yapılardan meydana gelen dermisin temel protein yapısını kollajen oluşturur. Epidermisin aksine dermis, daha az hücreye yataklık eder ve bağ dokusundan meydana gelir. Deriye yapısal bütünlük ve elastisite kazandırır [20]. Yoğun fibröz/elastik yapıdaki bileşenlerden meydana gelmiş olan dermis, vücudun bazı bölgelerinde epidermis'ten 15-40 kat daha kalın bir yapıdır. Kalınlığı 4 mm'yi (yetişkin insan sırt derisi) bulmakla birlikte, genellikle 2 mm'den daha incedir. Vasküler, lenfatik ve diğer yardımcı deri bileşenlerinin merkezidir. Derinin, boşaltım ve salgı bezleri (sebum, ekrin ve apokrin bezleri), keratinize yapılar (kıl folikülleri ve tırnaklar), duyu sinir reseptörü olan Meissner cisimciği (dokunma duyusu), Pacinian cisimciği (basınç), Pilo-Ruffini cisimciği (mekanoreseptör) ve kıl folikül uçları burada bulunur [12].

Dermis, papillar dermis ve retiküler dermis olmak üzere farklı gözenekliliğe sahip iki kısım içerir. Başlıca kollajen, glikozaminoglukan, elastin ve diğer matris proteinleriyle birlikte kan damar sistemini oluşturan kapiller ağın ördüğü dermis bölgesi, dermal pleksus olarak isimlendirilir. Buradaki damar sistemi, dermisin kendisini ve epidermisi beslemektedir. Normal fizyolojik durumda dermis; fibroblastlar, endotel hücreleri, monositler/makrofajlar, dentritik hücreleri (dermal dentrositler), mast hücreleri, lenfositler, Schwann hücreleri, aksonlar, özelleşmiş sinir uçları, perisitler ve mezenkimal kök hücreler olmak üzere geniş bir hücre grubunu içermektedir. Ancak, dermal tabakanın temel hücre bileşeni fibroblastlardır. Deriye, mekanik dayanım, elastisite ve duysal nitelikler kazandırır. Dermis, geminin çelik gövdesine benzetilirse epidermis de bu gövdenin kaplama malzemesi olarak algılanabilir.

Kollajen proteini, dermisin en önemli aselüler (hücresel olmayan) proteinidir. Kütlece kuru deri ağırlığının %70'ini oluşturur. Tip I ve Tip III kollajenler dermal kollajen miktarının sırasıyla %80 ve %15'ini temsil ederken, elastin fiberler sadece %2'lik bir orana sahiptirler. Glikozaminoglukanlar (GAG) ise dermisin üçüncü önemli aselüler bileşenleridir. Bunlar, asit mukopolisakkaritler, sülfatlanmış veya sülfatlanmamış formdaki glikozaminoglukanlar dır. Glikozaminoglukanlar kovalent bağlarla peptid zincirlerine bağlanarak proteoglukanları meydana getirir. Heparin ve heparan sülfatlar dermis glikozaminoglukanlarının en önemlileridir. Glikozaminoglukanlar aynı zamanda su bağlayan katyonik moleküllerdir. Enzim yollarında kofaktör işlevi görerek hücre tutunması ve bazal membranın yapısında önemli görevler üstlenirler. Glikozaminoglukanlar, kollajenler gibi rejenerasyonu teşvik etmek amacıyla biyoaktif doku iskelesi olarak kullanılmaktadırlar.

Tüm bu bileşenler, fibroblast hücreleri tarafından sentezlenmiştir ve dermis boyunca heterojen olarak yerleşmiştir. Papiller dermis, kollajen Tip III'ce zenginken retiküler dermiste en çok kollajen Tip I bulunmaktadır. İnsan derisinde, kollajen Tip I'in kollajen Tip III'e oranı, 4:1'dir. Ancak bu oran yara iyileşmesi sonrasında değişmektedir. Çünkü hasar görmüş bölgelerdeki boşluklar kollajen veya elastik fiberler yerine daha çok glikozaminoglukandan meydana gelmiş amorf yapılarla doldurulur.

Dermisin içine kadar nüfuz eden epidermal uzantılar: kıl folikülleri, ter bezleri ve sebum bezleri; derinin bariyer ve termoregülatör işlevini gerçekleştirirler. Prenatal (anne karnında) gelişim döneminde, ektoderm ve mezodermden türevlenen deri dokusu, doğumdan sonra dermis ve epidermis bileşenleriyle, (a) termoregülasyon, (b) mikrobiyal koruma, (c) desikasyon bariyeri, (d) mekanik koruma ve yara iyileşmesi, (e) estetik görünüm, pigmentasyon ve kasılma kontrolü görevlerini yerine getirir [15].

i.Uzantılar

İnsan deri yapısında, ekrin ter bezleri ve apokrin bezleri, 'filosebum aygıtı' kıl folikülleri, sebum bezleri ve erektör fili kası gibi uzantılar da yer almaktadır. Kıl folikülü mitotik olarak aktif germinatif hücreler içerirken ekrin ter bezleri termoregülasyonda işlev görürler. Deri dokusunda yer alan, apokrin bezleri koltuk

altı ve anogenital bölgelerdeki feromen olarak isimlendirilen koku moleküllerini sentezler [17].

ii.Hipodermis

Enerji absorblayan bir yastık gibi davranarak, deriyi mekanik etkilerin zararlarından korur. Lipid istifi yapısı sayesinde vücutta enerji sağlayan bir enerji rezervuarı olmasının yanı sıra izole edici bir tabaka olarak da termoregülasyonu sağlar [21].

2.1.3. Deri kayıpları ve yara iyileşmesi

2.1.3.1. Deri kayıpları

Derinin en önemli ve hayati görevi dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer oluşturmaktır. Deri bütünlüğünün bozulmasına neden olan deri hasarları ve hastalıkları vücutta kalıcı hasarlara, hatta ölüme bile yol açabilmektedir [22]. En yaygın deri kaybı nedenleri arasında termal yanıklar, venöz stasis ülserleri (toplardamardaki kan dolaşımının bozulmasına bağlı olarak gelişen ülserler), diyabetik ülserler, bası ülserleri, travmalar, cerrahi müdahaleler (ampütasyon gibi) ve genetik bozukluklar sayılabilir [13, 17].

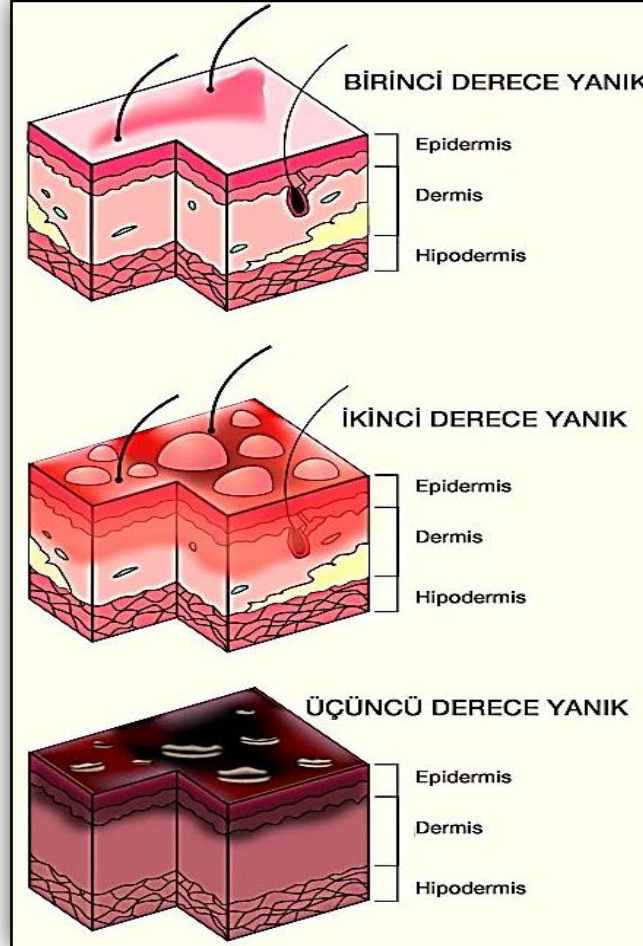
Akut ve Kronik Yaralar ve İyileşme Süreçleri

Akut yaralarda kemotaksis, hücre bölünmesi, yeniden damarlaşma, ekstraselüler matris sentezi, skar oluşumu ve şekillenmesi gibi birbiriyle bağlantılı bazı süreçler sonucu iyileşme görülmektedir. Tüm bu süreçler, plateletler, enflamatuar hücreler, sitokinler, büyüme faktörleri matris metalloproteinazlar ve onların inhibitörleri tarafından düzenlenmektedir. Buna karşın, bazı yaralarda zamanında iyileşme görülmez ki, bunlar kronik yaralar-iyileşmeyen yaralar olarak değerlendirilirler [23].

En sık rastlanan deri kaybı nedenlerinin başında termal yaralanmalar yani yanıklar gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yaklaşık olarak yılda bir milyon kişi bu sebeple hastanelerin acil servislerine başvurmaktadır.

Deri yanıkları, etkilediği derinliğe göre klinikte 3 sınıfta değerlendirilir ve uygun tedavi yöntemleri bu değerlendirmeye göre uygulanır (Şekil 2.3). Bunlardan;

1. derece yanıklar, epidermal kısmın zarar gördüğü,
2. derece yanıklar, epidermal kısım ile birlikte yüzeysel bir dermal kaybın söz konusu olduğu,
3. derece yanıklar ise dermal tabakanın tamamının veya tamamına yakınının kaybedildiği durumları anlatır.



Şekil 2.3.Yanığa bağlı deri hasarı, 1., 2. ve 3. derece yanık bölgeleri.

Diyabetik ülserler, kandaki glikoz konsantrasyonunun sinirler ve kılcal damarlar üzerindeki dejeneratif etkisine bağlı olarak gelişir. His kaybı ve dolaşım bozukluğunun birlikteliği bacak ve ayak gibi alt ekstremitelerde iyileşemeyen, kronik yaraların oluşmasına neden olur. Diyabetik hastalarda enfeksiyonlara karşı yeterli immün yanıt geliştirilememesi, zayıf kan dolaşımı ve nöropati gibi bozukluklar nedeniyle bu hastalar bacak ülserlerine yatkındırlar. Yalnızca ABD’de diyabetik ayak ülserlerinin yılda 50,000 amputasyona neden olduğu bilinmektedir.

Venöz stasis ülserler, toplardamar kapakçıklarının işlevini yitirmesiyle birlikte gelişir. Buna bağlı olarak toplardamarlarda ortaya çıkan tıkanıklık, kanın ve bazı makromoleküllerin dermise sızması, deri dokusunda oksijenin difüzyonuna ve besinlerin damar ağı yoluyla iletimine engel olur. Venöz ülserler genellikle obezite, diyabet, hareketsiz yaşam, kardiyovasküler veya renal (böbrekle ilgili) hastalıklarla birlikte meydana gelmektedir.

Bası ülserleri ise iskemi ve nekroz ile karakterizedir. Uzun süre yatakta bakım gören hastalarda yaygın olarak görülmektedir [20].

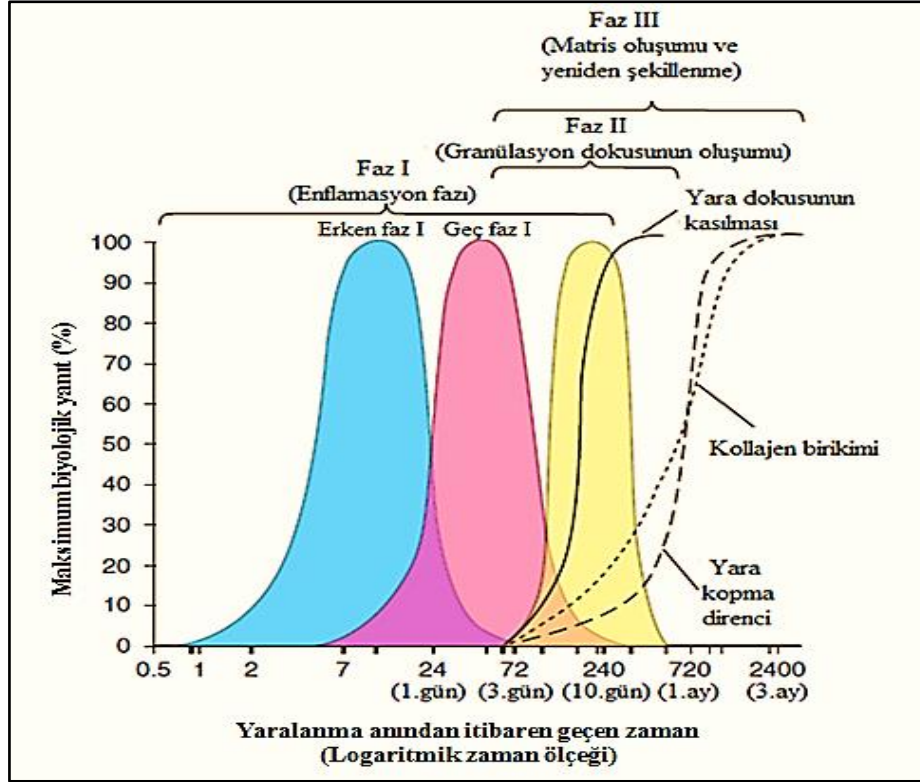
ABD'deki Hastalık Kontrolü ve Önleme Merkezinin raporuna göre, Birleşik Devletler nüfusunun %7'si veya 21 milyonu diyabetik hastalıklar taşımaktadır. Bu rakamın %10'u yani 2 milyonunda, kronik diyabetik ülserler görülmekte ve birçoğuna amputasyon uygulanmaktadır [24]. Bu istatistiğe dahil diğer 14 milyon hastanın da bası yaraları bulunduğu bilinmektedir. [25].

Kronik yaralar, genellikle geniş bir yüzey alanını kaplamaz. Ancak nüfusun büyük bir oranında görüldüğünden tıbbi ve ekonomik etkileri istatistiklerde önemli bir yer tutar [20].

2.1.3.2. Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi, çözünür ajanlar, kan hücreleri, ekstraselüler matris elemanları ve parenkimal hücrelerin birlikte rol aldığı dinamik ve interaktif bir süreçtir [23].

Hücrel ve moleküler düzeydeki olayların yürütüldüğü bu süreçte hasarlı dokuların onarımı gerçekleşir. Birbiri içine geçmiş fakat herbiri kendine özgü 3 basamakta gerçekleşir ve bu basamaklar (i) enflamasyon ve homeostaz, (ii) proliferasyon ve (iii) yeniden şekillenme (Şekil 2.4) adı altında incelenebilir [26].



Şekil 2.4.Yara iyileşme sürecinde birbiri içine geçmiş iyileşme evreleri [26].

i. Enflamasyon ve Homeostaz

Yara iyileşme sürecinin ilk evresi olan enflamasyon, doku hasarının hemen ardından meydana gelir. Koagülasyon kaskadı, enflamatuar yolizleri ve immün sistem elemanları süreçte görev alarak devam eden kan ve sıvı kaybı önlenir, canlılığını kaybetmiş dokular uzaklaştırılarak enfeksiyon riskinin önüne geçilir.

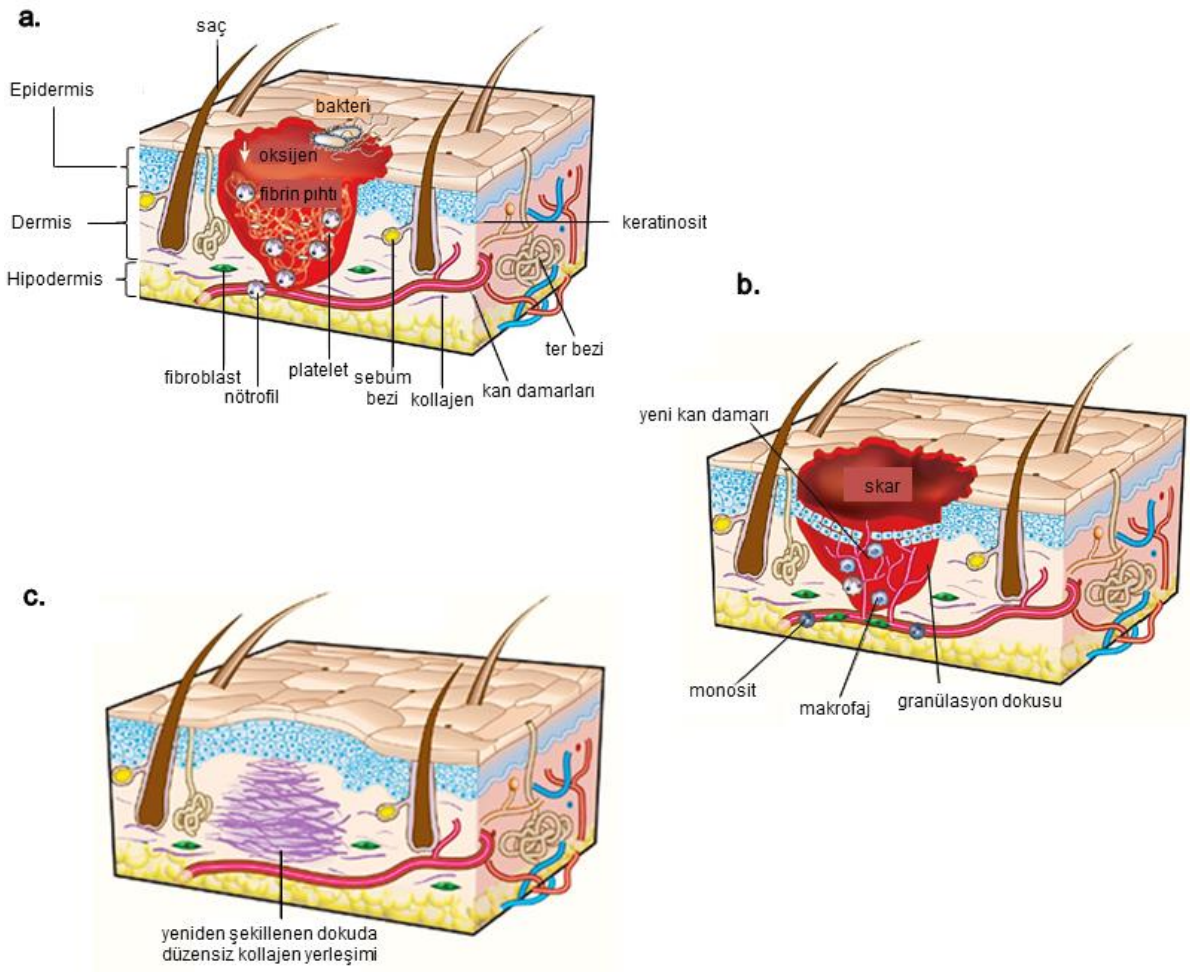
Homeostaz, platelet pıhtısının oluşumuyla sağlanmış olur. Bunu, bölgeye nüfuz ederek hücrelere yataklık edecek olan bir fibrin matris oluşumu izler. Kompleman aktivasyonu cevabı ile birlikte nötrofiller yara bölgesine çağrılarak plateletlerin ve bakteriyel degradasyon ürünlerinin degranülasyonunda görev alır (Şekil 2.5 a). 2 ila 3 gün içerisinde bölgede monositler de görülür. Bunlar daha sonra makrofajlara farklılaşırlar.

ii. Yeni Doku Oluşumu

Yeni doku, 2 ila 10 gün sonra oluşmaya başlar. Yeni doku oluşumu, hücresel proliferasyon (çoğalma) ve çeşitli hücre tiplerinin bölgeye göçüyle karakterize bir evredir. İlk olarak keratinosit hücreleri, hasar görmüş dermis üzerine göç ederler (Şekil 2.5 b) ve yara bölgesi sınırlarında yer alan keratinosit hücreleri çoğalarak

epitelyumun bariyer fonksiyonu tekrar sağlanmaya çalışılır. Yeni kan damarları oluşur (anjiyogeneze).

Bu evrenin sonlarına doğru, yaralı bölge civarından ya da kemik iliğinden makrofajların uyarmasıyla yara bölgesine gelen fibroblast hücrelerinin bir kısmı miyofibroblastlara farklılaşır. Miyofibroblastlar, zamanla yara kenarlarını bir araya getiren kontraktıl hücrelerdir. Fibroblast ve miyofibroblastlar etkileşerek daha çok kollajen içeren ve son olarak da olgun bir skar yığını, ekstraselüler matrisi meydana getirirler.



Şekil 2.5.Yara iyileşmesi evreleri.(a) Enflamasyon, yaralanmayı takiben 48 sa. devam eder. Hipoksik bir çevrede fibrin pıhtı oluşur. Yara bölgesinde bakteri, nötrofil ve plateletler görülür. (b) Yeni doku oluşum evresi yaralanmadan itibaren 5-10 gün içinde meydana gelir. Yara yüzeyinde skar oluşur. Enflamasyonda yer alan hücreler bölgeyi terk etmeye başlar ve yeniden damarlaşıma görülür. Skar doku altından epitel hücre göçü gerçekleşir. (c) Yeniden şekillenme evresi, 1 yıl kadar devam edebilir. Bölgeye göç eden fibroblastların sentezlediği kollajen, düzensiz bir şekilde burada birikir. Yara kenarlarından kontraksiyon gerçekleşir. Reepitelize olan yara dokusu devam eden deri yüzeyinden yüksekte kalır ve iyileşme sonrası uzantılar geri kazanılamaz [27].

iii. Yeniden Şekillenme

Yara iyileşmesinin üçüncü evresi yeniden şekillenme olarak bilinir ve doku hasarını takiben 2–3 hafta içinde başlayarak 1 yıl veya 1 yıldan da uzun sürebilir. Bu süreç içinde hasar oluşumuyla aktive olan tüm faaliyetler sonlanır. Endotel hücrelerinin birçoğu, makrofajlar ve miyofibroblastlar apoptoza (programlı hücre ölümü) uğrar veya büyük oranda kollajenden meydana gelmiş ekstraselüler matris içinde bir miktar hücre bırakarak yaralı bölgeyi terk ederler (Şekil 2.5 c). Epitelyal–mezenkimal etkileşimler deri bütünlüğünü ve homeostazı düzenler. Altı ila on iki ay sonrasında aselüler matris aktif olarak yeniden şekillenmiş olur. Yine de yeni doku hiçbir zaman eksiksiz bir biçimde hasar görmeden önceki haline geri dönemez.

Yaralanma sonrası onarım tamamlandığında yeni oluşan işlevsel doku yamalı bir bölge izlenimi verir. Hücrelerin (ağırlıklı olarak fibroblast hücreleri) tam organize olmamış bir ekstraselüler matris içerisindeki makroskopik yapısı ‘skar’ olarak adlandırılır [27]. İyileşme sürecinin bazı basamaklarında gelişen düzensizlikler sonucu yara yatağında aşırı kollajen birikimi ve anormal skar gelişimi görülebilmektedir. Bunlar atrofik, hipertrofik ve keloid skarlar olarak isimlendirilir [23].

2.1.3.3. Yara onarımı ve rejenerasyon arasındaki temel farklar

Şaşırtıcı bir biçimde bazı ökaryotik organizmaların yaralanma sonrası, moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamayan rejenerasyon yeteneğini göstererek orjinal doku yapısını yeniden inşa edebildiği biliniyor. İnsan dokuları ise rejenerasyon yeteneğine yalnızca prenatal gelişim sırasında (anne karnında) sahip oluyor, ancak rejenerasyonun tam olarak nasıl seyrettiği ve bu yeteneğin neden kaybedildiği bilinmiyor [27].

Yara iyileşme bölgesine bağlı olarak ‘onarım’ ve ‘rejenerasyon’ arasında çok belirgin farklar bulunmaktadır. Onarım daha belirgin olarak bir organın yaralanma sonrasında gösterdiği fizyolojik adaptasyonla açıklanabilir. Onarım mekanizmasında, mutlak bir geri kazanım gözetilmeden doku bütünlüğü yeniden yapılandırılmaya çalışılır. Gerçek bir doku rejenerasyonunda ise kaybedilen/hasara uğrayan doku, morfoloji ve işlev bakımından hasar görmemiş halinin tam bir kopyası ile yer değiştirir. Belirli organizmalar (ör. semender) dışında

memeli organları, anne karnından sonra kendiliğinden rejenere olamazlar. Fakat bazı durumlarda, deri gibi organların ekzojen ajanlar ve özel biyolojik matrisler yardımıyla 'kısmi rejenerasyon'u teşvik edilebilir. Halen, deneysel olarak teşvik edilmiş rejenere deri dokusu normal deri fonksiyonlarının çoğunu karşılayamamaktadır. [17].

Deri dokusu, önemli bir işlevsel tamir mekanizmasına sahiptir. Ancak kutanöz onarımın fetusta rejeneratif bir süreç olduğu da bilinmektedir. Fötal dokularda yara iyileşmesi sonrası skar veya fibrozis (hücre aralarındaki lifli bağ dokunun artması) görülmez. Fötal rejenerasyonda yetişkin dokularında meydana gelen yara tamirinden bazı belirgin farklılıklar göze çarpar [21]. Skar veya fibrozis görülmeyen fötal yara iyileşmesinde, zayıf immün yanıt ve normal kollajen birikimi görülmekte, ayrıca deri uzantıları da yerine gelmektedir. Bunlara ek olarak fötal iyileşmede gözlenen biyosinyal profili de yetişkin yara iyileşmesindekinden farklıdır [7]. Enflamasyon ve skar görülmesi, doğum sonrası etkili olmaya başlar ve iyileşme sürecinin seyrini değiştirir [28].

Yara iyileşme sürecinde hızlı bir şekilde oluşan skar dokusunun gözlenmesi yetişkin memeli derisindeki, enfeksiyöz mikroorganizmaları açık yaradan uzak tutmak amacıyla alınan yaşamsal bir önlem olarak algılanmalıdır. Ekstraselüler matris, skar dokusunda tam organize olamadan, epidermisin skar ile örtülmesi, deri uzantılarının oluşumuna fırsat tanıyamamaktadır. Böylece yara iyileşmesi de doku rejenerasyonundan çok doku onarımıyla sınırlı kalmaktadır [25].

Fötal ve yetişkin yara doku onarım mekanizmaları arasındaki farklılıklara odaklanıldığında rejenerasyonu teşvik etmek adına yeni nesil deri doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesi için yenilikçi yaklaşımlar önerilebilir.

2.2. Deri Doku Kayıplarının Rejenerasyonuna Yönelik Tedavi Yöntemleri

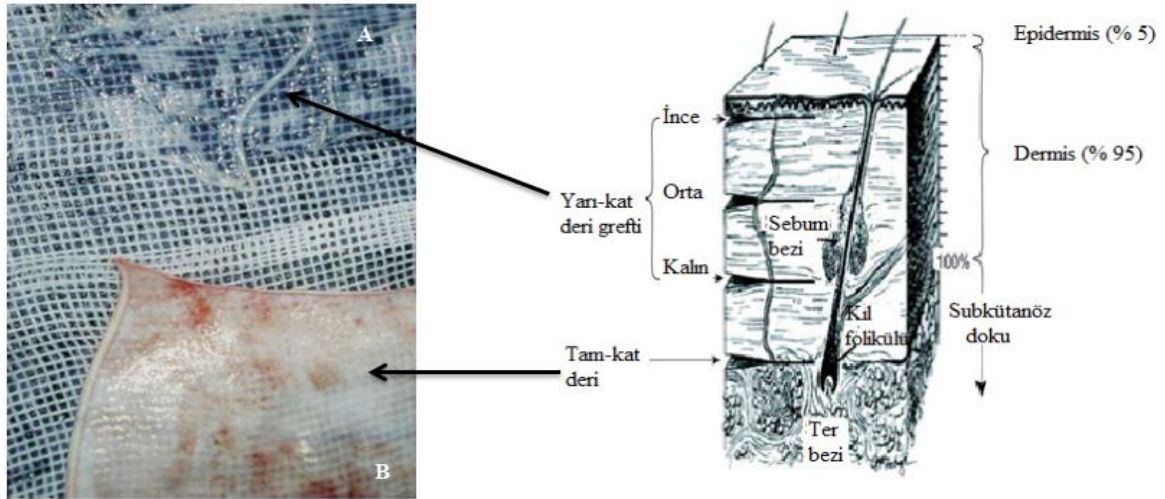
2.2.1. Geleneksel tedavi yöntemleri

Yara örtmek için kullanılacak en iyi malzeme, yine hastanın kendi derisinden elde edilen otogreftlerdir. Otogreftler, bunun için deri eşlenikleri içerisinde 'altın standart' olarak adlandırılırlar.

Otogreft uygulaması, hasarlı bölgeyi tedavi etmek için hastanın kendisine ait sağlıklı dokunun, onarımı istenen bölgeye nakil işlemidir. Otogreft kullanımına organ kayıplarında sıkça başvurulur ve yıllardır tam kat deri kaybı vakalarında

uygulanan etkili bir akut tedavi yöntemidir. Ancak bu uygulamada verici alan morbiditesi oluşturmak gibi bir kısıtlama bulunmaktadır.

Otolog deri greftleri, kalınlıklarına göre yarı kat veya tam kat olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.6). Tam kat deri greftleri, ince greftlerle karşılaştırıldığında daha iyi estetik sonuçlar alınması ve daha az büzülme yaratması bakımından daha iyidir. Ancak, daha çok damarlaşmış stromaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.6.İnsan deri anatomisi ve otogreft tekniğinde inilen derinlikler.(A)Yarı-kat ve (B) tam- kat deri greftleri [29].

Halen otogreftler en iyi deri eşleniği olma özelliğini korumaktadır. Ancak klinikte otogreft kullanımı her durumda mümkün olmamaktadır. Özellikle de toplam vücut yüzey alanının geniş bir bölümünü etkileyen yanık vakalarında, otogreftleme ile elde edilecek deri yeterli olmayacaktır [30]. Bu durumda akla ilk gelen biyolojik membranların kullanımı olmuştur.

İnsan Amniyotik Membranı 1910'dan beri yara örtü malzemesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle yanık kaynaklı deri kayıplarında çok etkili bir yöntem olduğu söylenmektedir. Yanık tedavisinde kullanımının protein, elektrolit, sıvı ve enerji kaybını azalttığı ve epitel rejenerasyonu hızlandığı tıbbi literatürde yer almaktadır.

İnsan kadavrasından alınan allogreftlerin geçici yara örtü malzemesi olarak kullanımı da başka bir seçenektir. Ancak uygulamadan 10-14 gün sonra vücut bu örtüyü reddetme eğilimindedir. Buna ilaveten kadavrik allogreftlerin kullanımı mikroorganizmaların ve bazı viral hastalıkların bulaşması riskini de taşımaktadır.

Öte yandan zenogreftler de çok uzun yıllardır geçici deri eşleniği olarak kullanılmıştır. Bu uygulamalarda genellikle kurbağa, kertenkele, tavşan, köpek ve domuzlar verici türler olmuşlardır. Zenogreftler, biyolojik olarak aktif bir dermal matris özelliği taşımasına rağmen insan derisi ile immünolojik farklar göstermesi sonucu doku reddi gibi istenmeyen durumlara yol açmaktadır [31].

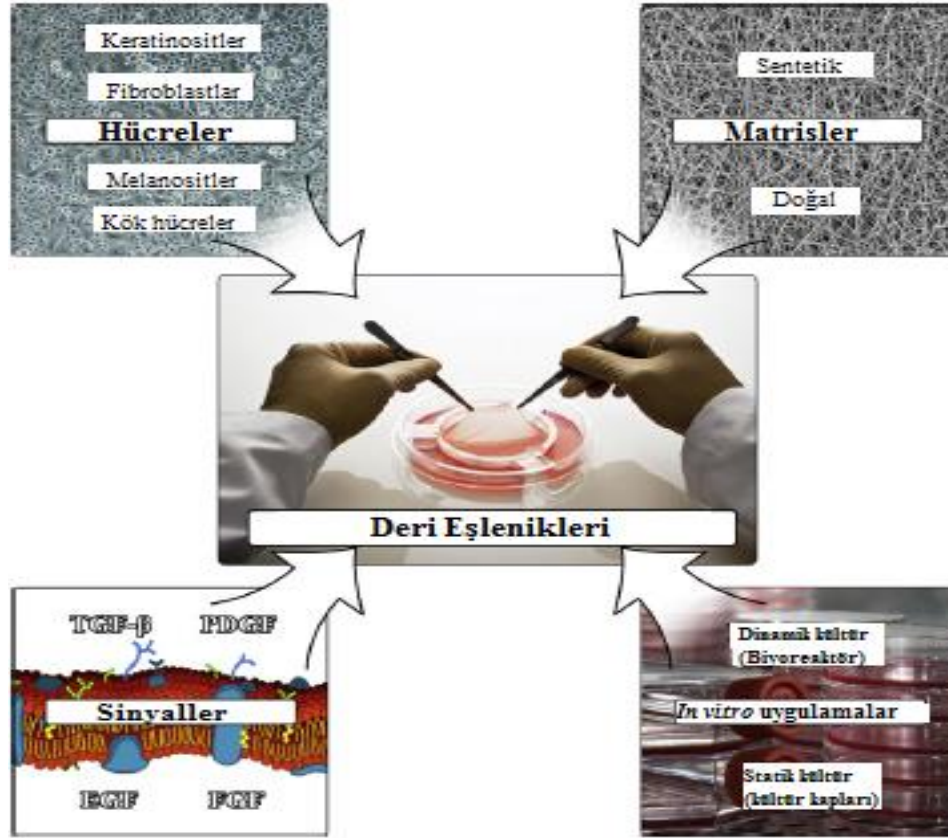
2.2.2. Doku mühendisliği ve bu yaklaşımla yapılan uygulamalar

2.2.2.1. Doku mühendisliği

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, gelişimsel biyoloji ve yaşam bilimlerinin bir arada ve mühendislik prensipleri ile birlikte kullanılmasıyla mevcut klinik sorunların çözümünü hedefler. İlk kez 1988’de mühendislik prensipleri kullanılarak yaşam bilimlerinin uygulaması olarak; normal ve patolojik memeli dokuların işlev ve yapı ilişkisini anlayabilmek ve normal doku işlevinin geliştirilmesi amacıyla tamamlayıcı biyolojik eşleniklerin geliştirilmesi şeklinde ifade edilmiştir [7].

Bu alanda çalışmalar yürüten araştırmacılar deriden yapay sinirlere ve kalp dokusuna kadar çok farklı vücut dokusu üzerinde çalışarak çeşitli derecelerde başarılar elde etmektedir. Doku mühendisliği alanında verilen ürünlerin ileri nesillerin gelecekte organ nakli ihtiyacını azaltacağı ve hatta ortadan kaldıracağı üzerinde durulmaktadır [32].

Deri doku mühendisliğinde, hücreler, destek materyali olarak kullanılan hücre matrisleri ve çeşitli biyosinyal moleküllerinin birarada etkileşim içinde bulunduğu sistemler oluşturularak *in vivo* ve *in vitro* dokular geliştirilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7.Deri doku mühendisliği uygulamaları [7].

Deri doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri doku eşlenikleri, yarayı kalıcı veya geçici olarak kapatarak enfeksiyonlara ve sıvı kaybına karşı mekanik bir bariyer oluşturmak üzere geliştirilmiştir [7].

2.2.2.2. Deri hasarları/kayıpları için klinik tedavi yaklaşımları

Klinik tedavide halen uygulanmakta olan otolog deri grefti kullanımının bazı kısıtları olduğu yukarıda belirtilmişti. Bunlardan ilki, deri hasarının toplam vücut yüzey alanının %50–60'ını aştığı durumlardır. Böyle durumlarda, deride verici alan üzerinden ilave hasarlı deri bölgesi meydana getirilmektedir [20]. İkincisi, geleneksel deri greftleme tekniğinin yalnızca yarı–kat deri sağlamasıdır. Yarı–kat deri, epidermin tamamını içermekte fakat dermin yalnızca çok az bir kısmını kapsamaktadır. Genellikle de skar oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca verici alan morbiditesi, hasarlı dokuyu ancak geçici bir süre kapatabilmesi, cerrahi uygulama basamaklarının fazlalığı ve hasta gözetim sürelerinin uzun olması gibi diğer problemler, deri kayıplarında uygulanan tedavinin yönünü doku mühendisliği yaklaşımlarına çevirmektedir [33].

Doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen yapay deri greftlerinin kullanılabilirliğinin artmasıyla geleneksel tedavi uygulamalarında yaşanan birtakım sıkıntılar da aşılmıştır. Tedavi imkan ve seçeneklerinin artması, deri grefti bulma ihtimali düşük hastalara iyileşme şansı vermekte; skar kaynaklı mortalite ve morbidite riskini azaltmakta ve genetik modifiye hücrelerin kullanımına da imkan tanımaktadır.

Akut veya kronik deri yaralarının tedavisi için son 30 yıldır geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen deri eşleniği uygulamaları hızla gelişmekte ve hayata geçmektedir. Henüz bu çalışmalar ve ürünleri altın standart olarak bilinen 'otolog deri greft'leri ile rekabet edebilecek düzeyde değildir. Günümüzde ulaşabileceğimiz hemen her deri eşleniğinde zayıf entegrasyon, yetersiz damarlaşma, greft hatlarında skar oluşumu gözlenmekte ve normal deri yapısında varolan farklılaşmış yapıları da içermemektedir. Deri doku mühendisliği çalışmalarının amacı da altın standarda olabildiğince yaklaşmak ve deriye hasar görmeden önce sahip olduğu tüm yapısal ve işlevsel özelliklerin tekrar kazandırılmasını sağlamaktır [21].

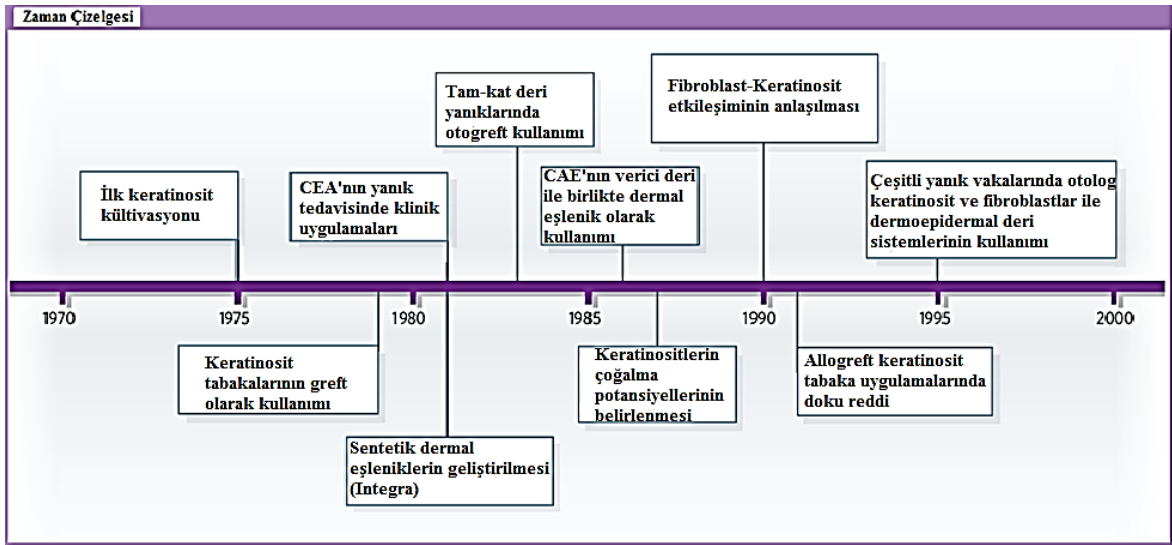
2.2.2.3. Deri doku mühendisliği

İlk olarak Rheinwald ve Green'in çalışmaları deri doku mühendisliğinde bir dönüm noktası olmuştur. O tarihten günümüze yenilenen teknolojiyle birlikte bu alanda çok çeşitli bakış açılarıyla kliniğe aktarılan ürünler geliştirilmiştir (Şekil 2.8).

1975'te Howard Green ve çalışma arkadaşı James Rheinwald [34] keratinosit hücre kültür tekniklerinde yeni bir dönem başlatmışlardır. 3T3 fare fibroblastları, radyasyona maruz bırakılarak üzerinde keratinositlerin kültive edileceği besleyici bir tabaka yaratılmıştır. Özel besi ortamları kullanılarak keratinosit hücrelerinin bu tabaka üzerinde katmanlı skuamöz epitelyum tabakası oluşturulmuştur. Bu teknik yardımıyla yanığa bağlı deri hasarı sonrası, normal insan derisinden alınan küçük bir biyopsi örneğinden yola çıkılarak, hızlı bir şekilde ve istenen miktarda kültive keratinosit tabakaları (CEA) elde etmek mümkün olmuştur. Öyle ki 1–5 cm²'lik deri biyopsi örneğinden elde edilen hücrelerle 3 haftalık bir kültivasyon sonucu toplam vücut yüzeyinin %70'i yanık nedeniyle hasar görmüş yetişkin deri yüzeyini örtecek miktarda epitel hücre tabakası elde edilebilmektedir [35].

İlk kez 1981'de O'Conner ve grubunun [36] yanığa bağlı ciddi şekilde deri hasarı bulunan iki küçük çocuğu bu tekniği kullanarak tedavi etmesi dikkatleri çekmiştir.

Ardından Cuono ve ark. (1986) [37] epidermal otogreftleri dermal allogreftlerle birlikte kullanarak tekniğe yeni bir boyut kazandırmışlardır. Bunu, Bell laboratuvarlarında geliştirilen yeni bir deri eşleniği izlemiştir. Fibroblast hücrelerini içeren kollajen bir matris üzerinde keratinosit kültürasyonu ile oluşturulan dermal tabaka, epidermal bir eşlenikle tamamlanarak iki-tabakalı (bilayer) bir model oluşturulmuştur [38]. Organogenesis firmasının girişi ile bu yöntem 'Apligraf' ticari adıyla diyabetik ayak ülserlerinin tedavisi için klinikte denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [39]. Bugün, kronik yaraların tedavisi için 'Apligraf' adı altında pazarlanan bu ürüne ulaşmak mümkündür. Bunu izleyen çalışmalarda Yannas ve Burke, (sığır kaynaklı) kollajen ve (köpekbalığı kıkırdağından elde edilen) kondroitin-6-sülfat içeren dermal bir eşlenik üzerinde silikon örtüye sahip yeni bir deri eşleniği oluşturmuştur. Yeni ürün, 'Integra Regeneration Template' adı altında klinikte kullanılarak [40, 41] başarılı sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 2.8.1970'lerden 2000'li yıllara deri doku mühendisliğinin gelişimini gösteren zaman çizelgesi [14].

Keratinosit tabakaların, klinik uygulamalarda kullanımı kırılganlığı ve greft reddi nedeniyle oldukça sınırlı kalmıştır. İşte bu yüzden uygun bir biyomalzemede kültive edilmiş fibroblast hücrelerinin üzerinde keratinosit tabakalar oluşturularak daha umut verici sonuçlar elde edilmiştir [35].

Keratinosit hücre teknolojisi kültive epitel otogreftleri üretmek üzere sürekli olarak gelişmektedir. Son olarak hücre süspansiyonlarının fibrin içerisinde veya fibrinsiz

olarak (ör:CellSprays) yaralı yüzeye püskürtülmesine yönelik uygulamalar yapılmaktadır. Myskin® ticari ürününde olduğu gibi hücre süspansiyonları kimyasal olarak tanımlanmış polimer taşıyıcılar üzerinde de yaralı bölgeye iletilmektedir [42]. Bundan başka kıl foliküllerinden elde edilen hücrelerin kültivasyonu da küçük tabakalar (EpiDexs) elde edilmektedir. MacNeil ve arkadaşları, hala kronik yaraların iyileşmesine yönelik bu tür uygulamalar üzerinde çalışmaktadırlar [43].

Deri doku mühendisliği ürünlerinden beklenen özellikler arasında, yara üzerini kapatarak yara yatağının enfeksiyonlara karşı korunması, sıvı kaybını kontrol etmesi, skar oluşumunu en aza indirmesi, immün yanıtı neden olmaması, damarlaşmayı teşvik etmesi, uygun mekanik dayanıma sahip olması, yara iyileşme sürecini hızlandırması, greftin hızlı kabul edilmesi, hastanın acısını azaltması ve maliyetinin ulaşılabilir olması sayılabilir. Belirtilen kriterler, geçici ve kalıcı yara örtü malzemelerinin hepsi için geçerlidir [9, 44]. Artık ideal bir deri eşleniğinden yalnızca epidermis ve dermisi ikame etmesi değil, aynı zamanda deri pigmentasyonu, sinirsel algı, vasküler pleksus (damarlaşma ağı) ve çeşitli deri uzantılarının (salgı bezleri, kıl folikülleri) oluşumu gibi işlevlerin de yerine getirilmesi beklenir.

Maalesef normal insan derisinin karmaşık yapısını tamamen karşılayan bir deri doku mühendisliği ürünü henüz mevcut değildir. Yine de birçok deri eşleniğinin deri dokusunu kısmen ikame ettiği bilinmektedir [20].

Deri doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri

Deri doku mühendisliği en az 35 yıllık araştırma ve bilgi birikimine sahip bir alandır. Malzeme teknolojisi ile hücre ve moleküler biyoloji bilgisine dayanan bir disiplin olan deri doku mühendisliğinin en büyük hedefi karmaşık dermo–epidermal deri eşleniklerinin geliştirilmesidir.

Ticari olarak ulaşılabilen deri doku mühendisliği ürünleri, iki boyutlu (2B) veya üç boyutlu (3B) biyomalzemeler üzerinde hücre veya biyosinyal molekül taşıyabilmektedir. Bu biyomalzemeler dermisi ve/veya epidermisi taklit ederek tedavide onarım tamamlanıncaya kadar yapısal ve işlevsel açıdan ekstraselüler matrisin yerini doldurabilmektedir. Bu açıdan öncelikle deri doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin hangi özelliklere sahip olması gerektiğini belirlemek gerekecektir [14, 45].

Lie Ma ve arkadaşları, [46] deri doku mühendisliğinde kullanılan en yaygın yaklaşım, 3B biyobozunur doku iskelelerinin kayıp doku şekline uygun üretilmesi ve implantasyon sonrası damarlaşma sağlanıncaya kadar etkinlik göstermesi gerektiğini belirtmişlerdir. Biyomalzemelerin modifiye edilmesiyle istenilen fiziksel özellikler kazanılmaktadır. Elektroeğirme, fiber bağlama, biyobaskılama, liyofilizasyon, gaz köpükleştirme, yöntemleri ile uygun biyomekanik özelliklere sahip 3B doku iskeleleri ve 2B membranların üretimleri gerçekleştirilmektedir [47]. Deri doku mühendisliğinde kullanılacak ideal bir doku iskelesi mutlak bir biyoyumluluk göstermeli, birbirine bağlı gözeneklerin, gözeneklilikleri %90 ve üzeri oranına sahip olmalıdır. Bunun yanında kontrol edilebilir bir biyobozunurluk profili sergilemeli ve uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır [46].

Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Deri dokusu, hücrelerin yanı sıra çözünemeyen ve difüze olmayan ekstraselüler matris elemanlarını da içermektedir. Bunlar kollajen, elastin, fibronektin, laminin ve kondronektin gibi glikoproteinler ile hiyaluronik asit, kondroitin-6-sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat gibi glukozaminoglukanlardır [48]. Alternatif doku eşleniği ürünleri oluşturmaya yönelik birçok çalışmada ekstraselüler matris elemanlarından yola çıkılarak hangi tür biyomalzemelerin kullanılabileceğine karar verilmiştir. Kollajen, fibrin ve hiyaluronik asit bunlar arasında en çok kullanılanlardandır [33]. Kollajen, deri doku mühendisliği uygulamalarında mükemmel biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri dolayısıyla en çok tercih edilen biyomalzemeler listesinin başında gelmektedir. Ancak biyolojik ortamda hızlı bozunması ve zayıf mekanik özellikte olması nedeniyle bazı modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden doku iskelelerinde daha çok çapraz bağlı kollajen biyomalzemeler tercih edilmektedir [46]. Kollajenin immünojenik potansiyeli ve yüksek maliyeti de unutulmamalıdır [49]. Dermagraft®, Apligraf® ve Integra®, kollajen içerdiği bilinen deri eşlenikleri arasında sayılabilir.

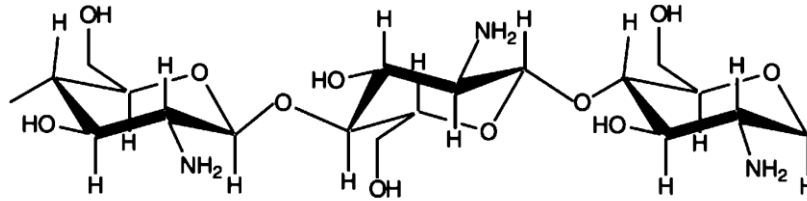
Deri dokusu ekstraselüler matris bileşenlerinden olan hiyaluronik asit, yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Hücre göçünü, çoğalmasını, granülasyon dokusunda matris oluşumunu ve reepitelizasyonu desteklediği de bilinmektedir [50, 51]. Laserskin®, Hyalomatrix® ve Hyalograft® gibi deri doku mühendisliği ürünlerinin yapısında da hiyaluronik asit olduğu bilinmektedir.

Hidroojeller

Deri yaralarına uygun ve acil müdahalede esas olan mikrobiyal enfeksiyonların ve trans-epidermal su kaybının önlenmesiyle yara onarımını destekleyen bir yol izlenmesidir. Yapılan çalışmalar, su tutma kapasitesine sahip biyomalzemelerin yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir. Fibrin, kollajen, kitosan, jelatin, aljinat gibi doğal biyopolimerlerden ve poli(akrilik) asit, poli(etilen oksit), poli(vinil alkol) ve polifosfazen gibi sentetik polimerlerden hidroojeller hazırlanabilmekte [49] ve bu malzemeler deri doku mühendisliğinde kullanılmaktadır.

Kitosan ve kitosan bazlı doku iskeleleri

Kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir polisakkarittir. Kitin, deniz kabuklularının ve böceklerin kabuklarında, mantarların hücre duvarında bulunmaktadır ve β -(1 $\rightarrow$ 4) ile bağlanmış 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz birimlerini içermektedir (Şekil 2.9).



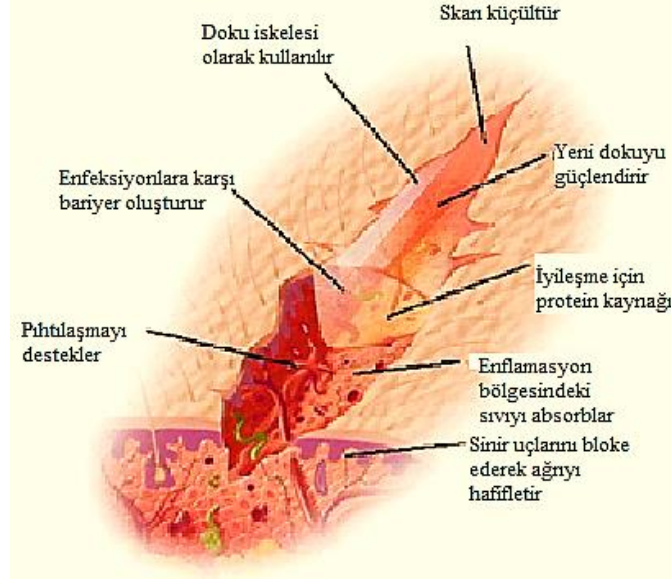
Şekil 2.9.Kitosanın moleküler yapısı [52].

Kitosanın antifungal ve bakterisidal karakteri, oksijen geçirgen özelliği, yara-yanık tedavisi ile ilgili çalışmalarda neden bu kadar yaygın olarak tercih edildiğini açıklamaktadır. Kitosan, fiber, membran, doku iskelesi ve sünger formlarında hazırlanarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [52, 53].

Kitosanın biyouyumluluğu ve yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu çalışmalarda, kitosan bazlı yara örtü malzemelerinin, farklı dokuların onarımını hızlandığı, yara kontraksiyonunu kolaylaştırdığı ve interlökin-8, prostaglandin gibi çeşitli enflamatuar ajanların salımını düzenlediğine işaret edilmiştir [52] (Şekil 2.10).

Antimikrobiyal, antifungal ve yara iyileşmesini tetikleyen özellikleriyle kitosan, hasarlı deri dokusunun tedavisinde kullanılan bandajlarda ve yara örtü malzemelerinin yapısında yer almıştır. Bunlar arasında; Chitodine®, Chitoflex®,

Chitopack®, Chitopoly®, Chitosan Skin®, Chitoseal®, Clo-Sur®, Crabyon®, HemCon®, Tegaserb®, TraumaStat® ve Vulnosorb® ticari isimleriyle bilinen ürünler de bulunmaktadır.



Şekil 2.10.Kitosanın yara yatağındaki etkisi [54].

Kitosanın kollajen, hidroksiapatit ve jelatin gibi doğal polimerlerle olan karışımları malzemenin biyolojik aktivitesini arttırmaktadır [53].

Kitosan bazlı malzemeler; elektroeğirme, liyofilizasyon, gaz köpükleştirme ve mikrodalga temelli fabrikasyon yöntemleriyle fiber, membran ve 3 boyutlu doku iskesi formlarında üretilerek doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [46, 55-57].

Jelatin ve jelatin bazlı doku iskeleleri

Kollajenin üçlü-heliks yapısının kırılmasıyla elde edilen jelatin, sıcaklık değişimiyle birlikte kolayca jel halini alabilmektedir. Jelatin Tip A ve Jelatin Tip B olmak üzere iki tip jelatin bulunmaktadır. Jelatin Tip A formu termal denatürasyon öncesi asidik muamele ile hazırlanırken Tip B formu, alkali muamelesi ile elde edilip yüksek karboksilik özelliğe sahiptir [49].

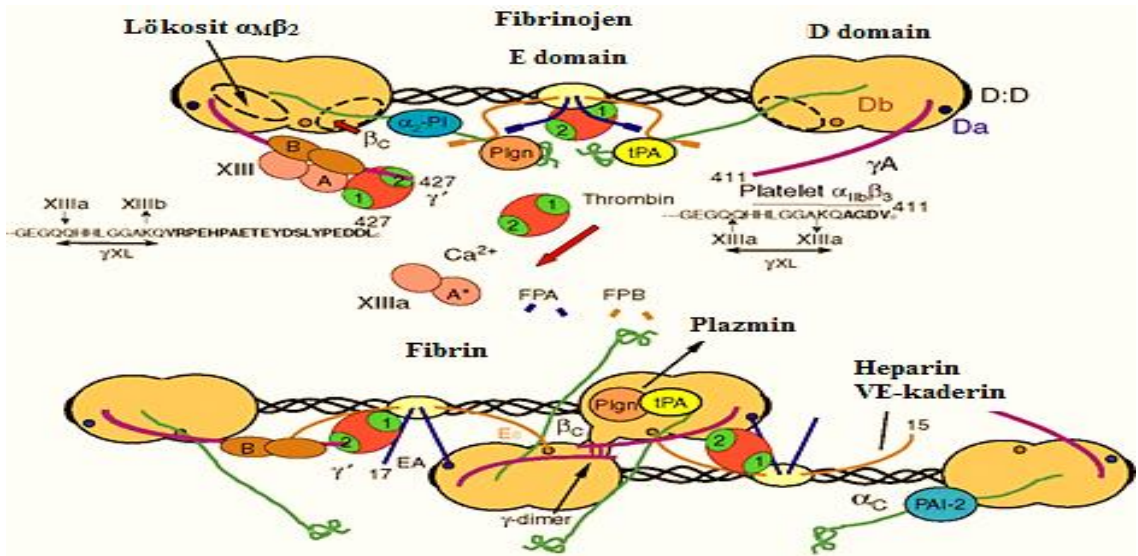
Jelatini, doku mühendisliğinde çok sık tercih edilen bir biyomalzeme yapan özellikleri; düşük maliyeti, yüksek biyouyumluluğu, hücre yapışmasını arttırması, hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasını desteklemesi olarak sıralanabilir [58].

Kollajen, derinin en önemli bileşenlerinden olmasına rağmen kollajenden türevlenen jelatin immünojenik reaksiyona yol açmaması ve daha ucuz bir malzeme olması nedeniyle deri doku mühendisliği uygulamalarında daha çok tercih edilmektedir [48].

Jelatin birçok kez kitosan bazlı malzemelere katılarak biyolojik aktiviteyi arttırmıştır. Yapısında bulunan Arg-Gly-Asp (RGD) benzeri aminoasit dizisi ile hücre yapışmasını teşvik etmekte, hücre göçünü desteklemekte ve kitosan-jelatin polimer karışımlarının biyolojik özelliklerini zenginleştirmektedir. Jelatinin yapısında bulunan serbest karboksil grupları katyonik yapıdaki kitosan ile hidrojen bağı oluşturarak ağsı bir yapı meydana getirmektedir [58].

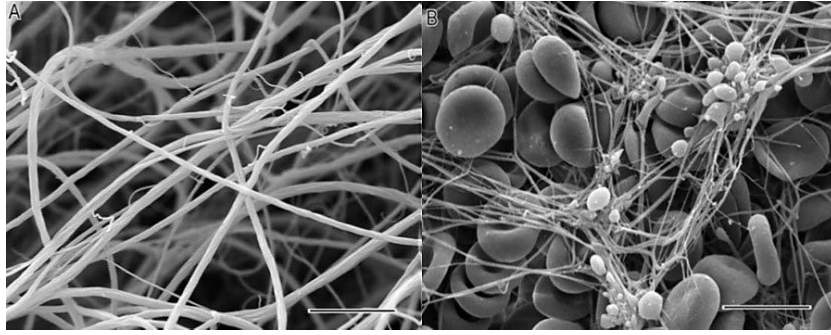
Fibrin ve fibrin bazlı doku iskeleleri

Fibrin, öncülü fibrinojen monomerinin meydana getirdiği bir biyopolimerdir. Kırkbeş nm uzunluğunda ve 340 kDa ağırlığında olan fibrinojen normalde insan kan plazmasında 1.5–3 mg/mL konsantrasyonunda bulunan fibröz bir glikoproteindir. Üç çift polipeptid zincirden (α , β , γ) meydana gelmektedir. A ve B polipeptidi 29 disülfid bağı ile biraraya gelmiştir. Protein yapı birbirine bağlı 3 nodül üzerine kuruludur (Şekil 2.11). Merkezi nodül E bölgesi olarak isimlendirilerek 6 zincire ait N terminal uçlarının kökenini oluşturmaktadır. Zincirler iki set halinde ve heliks sarmal yapıda D bölgesi olarak isimlendirilen uç nodüle bağlanırlar [59].



Şekil 2.11.Fibrinojenin yapısal görünümü ve fibrine dönüşümü [60].

Fibrin, fibrinojen ve trombin olmak üzere iki bileşenden meydana gelir. Fibrinojen, koagülasyon kaskadının hedef proteinidir. Kanda çözünür bir makromolekül olan fibrinojen, proteolitik bir enzim olan trombinin etkisiyle fibrin formunu alarak kanda çözünmez bir jel (pıhtı) oluşturmaktadır (Şekil 2.12). Yüksek mekanik dayanımı ve proteaz direnci sayesinde, kan kaybının önlenmesi ve yara iyileşmesini teşviki bakımından gereklidir [61]. Vasküler yaralanmanın ardından fibrin, hemostatik pıhtının temel proteinini oluşturan fibrin homeostaz, yara iyileşmesi, enflamasyon, anjiyogenez ve bazı biyolojik fonksiyonlar açısından da önemli bir proteindir [62].



Şekil 2.12.Fibrin pıhtıya ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. (A) Saflaştırılmış fibrinojene trombin eklenmesiyle elde edilmiş pıhtı. Ölçek, 5 μ m. (B) Kan pıhtısına ait alektron mikroskopisi. Platelet agregatları, eritrositler, lökositler ağ yapısı içerisinde hapsolmuş durumda. Ölçek, 10 5 μ m [62].

Oluşan fibrin jelin yapısı polimerizasyon koşullarıyla doğrudan ilişkilidir. Fibrin ipliklerin kalınlığı, dalların uzanışı ve jelin gözenek boyutu polimerizasyon değişkenlerine bağlıdır. Örneğin trombin konsantrasyonunun düşmesiyle fibrin ipliklerin kalınlığı artmakta ve ipliklerin kesişme noktalarıyla birlikte gözenek boyutları da azalmaktadır [61].

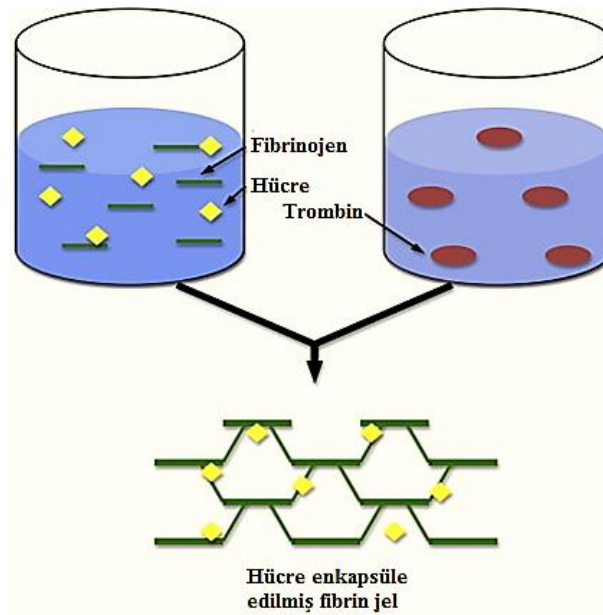
Fibrin yapıştırıcı yapımında kullanılacak kan, bir kan havuzundan temin ediliyorsa her zaman için bulaşıcı hastalık taşınma riskini taşımaktadır. Ancak verici taraması, ısı işlemler, kandan taşınabilecek virüslerin inaktivasyonu için kullanılan deterjan çözeltileri ile bu ürünler daha güvenli hale getirilmektedir [63]. Bulaşıcı hastalık riskini tamamen ortadan kaldırmak amacıyla da Vivostat® veya Croyoseal® -FS® gibi sistemler kullanılarak otolog kandan fibrinojen üretilabilmektedir.

Fibrinin kullanım alanları

1998'de FDA (Food and Drug Administration) tarafından onay olarak etkin bir şekilde öncelikle klinikte tamamlayıcı tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kanamayı durdurmak için, cerrahide dokuları yapıştırmak amacıyla (sütür yerine) ve deri greftelerinin, yerine entegre edilebilmesi için kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda fibrin yapıştırıcıların, lenfatik yapıştırıcı olarak [64] kullanımının yanında, doku mühendisliğinde ve ilaç iletiminde de kullanılmaya başlanmıştır [65].

Doku mühendisliğinde, fibrin iskelelerin en sık kullanılan formları; fibrin hidrojeller, fibrin yapıştırıcılar ve fibrin mikroboncuklardır (fibrin micro bead) [35, 66].

Fibrin yapıştırıcılar, fibrin hidrojellerden farklı olarak, yüksek saflıkta fibrin ve trombin çözeltisi ile hazırlanmaktadır [67].



Şekil 2.13.Hücre enkapsüle edilmiş fibrin jel [68].

Fibrin–fibrinojen dönüşümlerinin fizyolojik doğası endojen faktörlerin oluşan jelin içerisine hapsolmasına izin vermektedir [68] (Şekil 2.13). Keratinositlerin fibrin içerisinde süspanse edilerek hasarlı bölgede kullanılması tam–kat deri yaralarının tedavisinde etkili bir yöntemdir.

Vücutta hasarlı bölgelerin onarımında, doku–spesifik büyüme faktörlerinin kontrollü bir şekilde hedef bölgeye verilmesinde de fibrin malzemelerden yararlanılmaktadır.

In situ enjekte edilebilir bir jel olması, biyobozunur özelliği ve doğal yara iyileşme sürecini tetiklemesi bakımından fibrin, çok cazip bir malzemedir. Ayrıca, fibrin yapıştırıcıların *in vivo* ve *in vitro* fibroblast ve keratinosit büyümesini de desteklediği bilinmektedir [63, 69]. Hücre tutunmasını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve göçünü destekleyen fibrin yapıştırıcı, biyomimetik bir yara yatağı gibi davranmaktadır [68].

Fibrin tek başına veya başka malzemelerle karıştırılarak doku iskelesi olarak kullanılıp kök hücre veya primer hücreler yağ dokusu, kemik, kalp, kıkırdak, karaciğer, sinir doku, tendon ve ligamentlerin yenilenmesinde kullanılmaktadır [67].

Ticari olarak bulunabilen BioSeed-S® [70], AcuDres®, Allox® ve Cyzact® gibi bazı deri doku mühendisliği ürünlerinin yapısında fibrin bulunmaktadır.

Deri doku mühendisliğinde kullanılan hücre tipleri

Hücreler, doku mühendisliğinin birincil elemanlarıdır. Doku iskeleleri ile birlikte hücre, biyosinyal molekülleri ve mikroçevre etkileşimi doku mühendisliği kavramını oluşturmaktadır. Buradaki en önemli soru, doğru hücre tiplerinin hangi kaynaktan sağlanacağıdır. Doku mühendisliği çalışmalarında çeşitli hücre hatları kullanılabildiği gibi, kök hücreler veya farklılaşmış somatik hücreler de hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Hücre popülasyonları, lokal, sistemik veya progenitör (öncül) hücreler olarak sınıflandırılabilir. Deri doku mühendisliği çalışmalarında, keratinosit hücreleri, fibroblastlar, melanositler, kıl folikülü kökenli hücreler ve çeşitli öncül hücreler kullanılmaktadır. Halen kullanılabilen birçok deri eşleniğinde ağırlıklı olarak keratinosit ve fibroblastlar kullanılmaktadır. Ancak ileri nesil biyomühendislik ürünü, deri eşleniklerinin içeriğinde deri dokusunda yer alan diğer hücre tiplerinin kullanılması da söz konusudur [7].

Deri doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilmiş ticari ürünler

İdeal bir deri eşleniğinin, yara iç yüzeyini nemli tutması, gaz değişimine izin vermesi, mikroorganizmalara karşı koruyucu bir bariyer gibi davranması beklenir. Bunların yanında kullanılan biyomalzemenin toksik ve allerjen olmaması da istenir [52].

Klinisyenlerin deri doku hasarlarının tedavisinde kullanabileceği çok sayıda deri doku mühendisliği ürünü mevcuttur ve bunların her biri çok çeşitli özelliklere sahiptir. Deri eşlenikleri, Çizelge 2.1’de bileşenlerine ve uygulama özelliklerine göre sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2.1.Deri doku eşleniği ürünlerin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması.

Özellik	Sınıflandırma
Anatomik Yapısına Göre	▪ Epidermal ▪ Dermal ▪ Dermo-epidermal (kompozit)
Dokuda kalış süresine göre	▪ Geçici ▪ Kalıcı ▪ Kısmen kalıcı
Biyomalzeme türüne göre	▪ Biyolojik: Otolog, allojenik, zenojenik ▪ Sentetik: Biyobozunur, biyobozunmaz
Hücrel bileşenine göre	▪ Hücreli ▪ Hücresiz

Epidermal örtü olarak kullanılan ticari ürünler

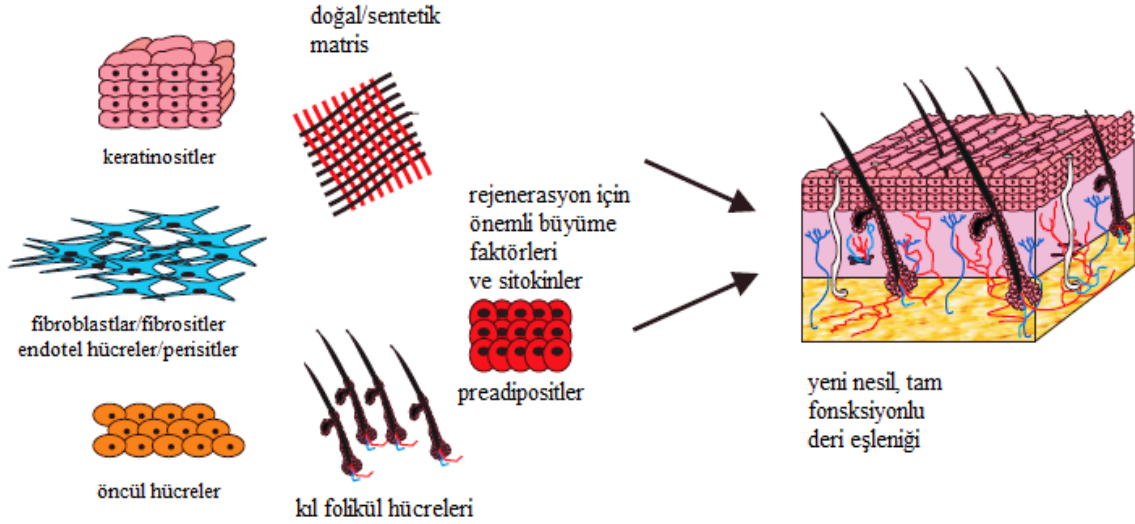
Rheinwald ve Green’in (1975) [34], keratinosit kültürü teknikleri hızlı bir şekilde geliştirilerek klinik uygulamalara transfer edilmiştir. Küçük bir deri biyopsisi örneğinden izole edilen keratinositler 2 ila 3 hafta içerisinde çoğaltılarak vücut yüzeyinin büyük bir kısmını örtebilecek miktarda hücre tabakası elde edilebilmektedir. Çizelge 2.2’de mevcut epidermal örtülerin özellikleri ile birlikte bir listesi görülmektedir.

Dermal örtü olarak kullanılan ticari ürünler

Tam-kat deri kayıplarının tedavisinde hem epidermal bileşene hem de dermal bileşene ihtiyaç vardır ve bu bileşenler sırasıyla biraraya getirilmelidir. Yara yatağında damarlaşmaya ihtiyaç olduğundan öncelikli olarak dermal eşleniğin uygulanması beklenir [9]. Çizelge 2.3’te mevcut dermal deri eşlenikleri listelenmiştir.

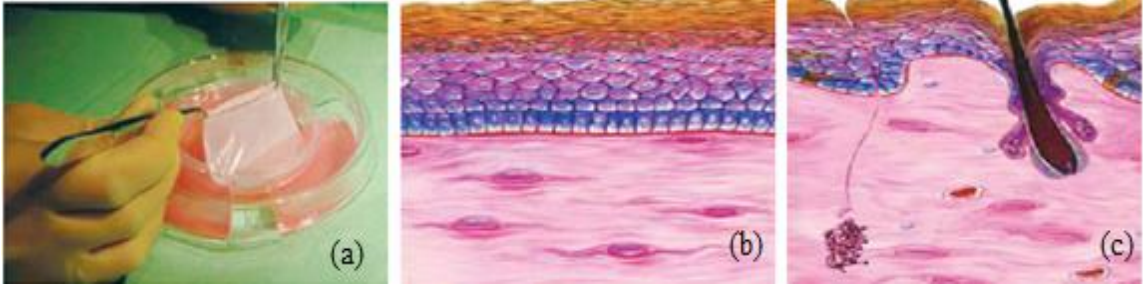
Dermo-epidermal örtü olarak kullanılan ticari ürünler

Hücreler, polimerler ve çözülebilir ajanların organize olmasıyla insan derisinin anatomi ve fizyolojisi taklit edilmektedir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14.Dermo-epidermal ideal deri eşleniği [21].

Epidermal bariyerin görevi sıvı kaybını ve enfeksiyonu önlemektir ve epidermisin parenkimal hücreleri keratinositler tarafından oluşturulmaktadır. Ancak birçok araştırmacının ortak görüşü; kültive keratinosit tabakalarının tam-kat deri kayıplarında tek başına yeterli olmadığı, beraberinde bağ dokuyu tamamlayacak bir bileşene de ihtiyaç duyulduğu yönündedir. Fibrovasküler doku, yapıya mekanik dayanım kazandırır, epidermisi beslemek üzere damar ağı içerir. Dermo-epidermal kompozitler, normal dokunun histolojik yapısını taklit ederek epidermis ve dermis eşleniklerini bir araya getirir. Yapısal benzerlik aynı zamanda işlevsel benzerliği de getirir. Ancak ayrı ayrı epidermal ve dermal eşleniklerle karşılaştırıldığında bu sistemlerin maliyetinin çok daha fazla olduğunu kabul etmek gerekir [13]. Halihazırda ticari olarak ulaşılabilen en önemli dermo-epidermal deri eşleniği Apligraf® (Şekil 2.15) adı altında Organogenesis firması tarafından üretilmektedir [9].



Şekil 2.15.İki tabakalı, dermo-epidermal deri eşleniği ürünü (a) Histolojik yapısı (b) ve normal deri doku histolojisi ile benzerliği (c).

Çizelge 2.2.Ticari olarak ulaşılabilen, klinik ve laboratuvar uygulamalarında kullanılan, epidermal deri eşlenikleri [7].

Ticari İsim	Üretici	Greft Tipi	Hücre Kaynağı	Biyomalzeme	İskele	Hücre Kültürü	Kullanım ömrü
CellSpray	Clinical Cell Culture	Hücre solüsyonu	Kültive veya kültive olmayan keratinosit	-	-	-	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Aktif keratinosit hücreleriyle desteklenmiş erken dönem yara örtüsü						
Kısıtları	Yalnızca yarı kat deri kayıplarında veya verici alanı desteklemek için kullanılır						
Epipel	Genzyme Biosurgery	Hücre tabakası	Konfluent kültive otolog keratinositler	Gazlı bez desteği ile	Sentetik	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Minimum doku reddi riski, geniş bir alana uygulama imkanı						
Kısıtları	Üretimi zaman alır, büllere neden olabilir, dermal desteğe ihtiyaç vardır, yüksek maliyet, kısa raf ömrü						
Epidex	Modex Therapeutiques	Hücre tabakası	Konfluent kültive otolog kıl folikülü hücreleri	Silikon membran	Sentetik	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Kronik ülser tedavisinde etkili, hücre çoğalma kapasitesi yüksek						
Kısıtları	Kırılgan bir ürün, hazır olması 6 hafta alır, kullanımı ve uygulaması zor						
EpiBase	Laboratoires Genevrier, Sophia Antipolis	Hücre tabakası	Konfluent kültive otolog keratinositler	-	-	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Kalsifilaksid* etkin bir şekilde kullanılmaktadır						
Kısıtları	Derin dermal kayıplarda kullanımı etkili değildir						
MySkin	Cell Tran Ltd	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Kültive otolog keratinositler	Sentetik silikon destek tabakası ve özel bir örtü	Sentetik	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Nöropatik, bazı ve diyabetik ülser tedavisinde etkin kullanım						
Kısıtları	Hücre büyümesi yaklaşık 2 haftayı bulur, uygulama tekrarı gerekebilir, derin yaraların tedavisinde tek başına kullanımı yeterli değildir						
BioSeed-S	Bio Tissue Technologies	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Fibrin matris üzerinde kültive otolog keratinositler	Fibrin yapıştırıcı	Allojenik	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Rekalsitrant venöz ülser tedavisinde etkili, geleneksel tedaviye göre yara iyileşmesinde neredeyse %50 etkinlik artışı						
Kısıtları	Yan etkileri tam olarak bilinmiyor						
LaserSkin	Fidia Advanced Biopolymers	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Konfluent kültive otolog keratinositler	Hiyaluronik asit esterlerinden üretilmiş matris	Rekombinant	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Hiyaluronik asit, mekanik dayanımı artırır ve keratinositlerin yara yatağına göçünü teşvik eder, iyi greft tutunması, düşük enfeksiyon riski						
Kısıtları	Hücre çoğaltmak 3 haftayı bulabilir, büyük ölçekte klinik denemelere ihtiyaç vardır						

Çizelge 2.2. (devamı)

Ticari İsim	Üretici	Greft Tipi	Hücre Kaynağı	Biyomalzeme	İskele	Hücre Kültürü	Kullanım ömrü
Cryo Skin	Altrika Ltd.	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Kryoprezerve monolayer keratinositler	Silikon destek	Sentetik	<i>İn vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Bacak ülserlerinde etkin kullanım						
Kısıtları	Uygulama tekrarı gerektirir, iyileşme 24 haftayı bulabilir, yara enfeksiyon riski vardır						
LyphoDerm	Cell Tran Ltd.	Hücre	Liyofilize edilmiş kültive allojenik keratinositler	Hidrofilik jel	-	<i>İn vitro</i>	Geçici
Kullanımı/Üstünlükleri	Lizat, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler içerir						
Kısıtları	Geliştirilmesi gerekir						
ReCell	Avita Medical Ltd	Hücre	Kültive değil	-	-	-	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Skarın rengini normal deri rengine eşitlemek amacıyla melanositler içerir						
Kısıtları	Çocuklarda %2, yetişkinde %4'ten az vücut yüzey alanının tedavisinde kullanılabilir						
Suprathel	Bio Med Sciences	Hücresiz	-	DL laktik asit bazlı yara örtüsü	Sentetik	-	Geçici
Kullanımı/Üstünlükleri	Yarı- kat deri yanıklarında, soğuk yanmaları ve Lyell sendromunda etkin kullanım, uzun raf ömrü, üstün antiseptik özellik						
Kısıtları	Uygulama öncesi bekletildiğinde ve derin yanıklarda başarı oranı düşer						
EpiSkin	SkinEthic Laboratories	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Allojenik kültive keratinositler	Kollajen matris	Sentetik	<i>İn vitro</i>	-
Kullanımı/Üstünlükleri	Deri irritasyon testlerinde hayvan modellerin yerine ve <i>in vitro</i> fototoksik potansiyelin değerlendirilmesinde kullanım						
Kısıtları	Tüm toksisite testleri için geçerliliği yoktur						

Çizelge 2.3.Ticari olarak ulaşılabilen, klinik ve laboratuvar uygulamalarında etkili, dermal deri eşlenikleri [7].

Ticari İsim	Üretici	Greft Tipi	Hücre Kaynağı	Biyomalzeme	İskele	Hücre Kültürü	Kullanım ömrü
Alloderm	Life Cell Corporation	Hücresiz	-	İnsan kadavra kaynaklı selüler, liyofilize, dermis	Allojenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	İmmünojenitesi düşük , 2 yıl raf ömrü, tam-kat deri yanıklarında başarılı uygulamalar, rekonstrüksiyon, rinoplasti, periodontal cerrahi, subkütanoz mastektomi ve çeşitli fiztür rekonstrüksiyonlarında kullanım						
Kısıtları	Hastalık bulaşma riski, doku reddi riski, öngörülemeyen sürelerde damarlaşma görülmesi, etik kısıtlar, bazı klinisyen ve hastalar tarafından tercih edilmeyebilir						
Dermagraft	Advanced BioHealing Inc.	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Kültive allojenik neonatal fibroblastlar	Silikon film, naylon meş, GAGlar ve domuz dermal kollajeni ile 3D doku iskelesi	Zenojenik sentetik ve	<i>In vitro</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Neonatal fibroblastlar hızlıca çoğalıp kollajen ve GAG sentezleyerek yara iyileşmesini desteklerler ve diyabetik yaralarda kullanım						
Kısıtları	Hastalık bulaşma riski ve doku reddi riski, çok basamaklı uygulama ve yüksek maliyet						
Permacol	Tissue Scence Laboratories plc	Hücresiz	-	Domuz kaynaklı aselüler matris	Zenojenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Fibroblast çoğalmasını destekler, immünojenik değildir ve abdominal duvar rekonstrüksiyonunda kullanım						
Kısıtları	Uygulamada epidermal grefte ihtiyacı, bazı durumlarda damarlaşma gelişmeyebilir						
Transcyte	Advanced BioHealing Inc.	Hücre ekilmiş doku iskelesi	Allojenik neonatal insan demal fibroblastları	Domuz kollajeni ile kaplı naylon meş silikon bir membran üzerine tutturulmuş	Zenojenik Sentetik ve	<i>In vivo</i>	Geçici
Kullanımı /Üstünlüğü	2. ve 3. derece yanıklarda başarılı sonuçlar, dondurulmuş olarak 1,5 yıl raf ömrü						
Kısıtları	Doku reddi riski, fibroblast kaynaklı deride hastalık riski, meş biyobozunur özellikte değildir						
Integra	Integra Neuro Sciences	Hücresiz	-	Polisiloksan yalancı epidermis, çapraz bağlı sığır tendon kollajen Tip I, köpekbalığı kaynaklı kondroitin sülfat ve GAG	Zenojenik sentetik ve	<i>In vivo</i>	Kısmen kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Polisiloksan membran yerine 2 hafta sonra otogreft koyulur, dermal bileşen fibroblast ve keratinosit çoğalmasını destekler, şimdiye kadar >10000 kişide kullanılmıştır, estetik sonuçları başarılı, iyi bariyer fonksiyonu ve çok kısa olmayan raf ömrü						
Kısıtları	Hazır olması 3 hafta alır, tedavinin başansı yara yatağının titiz bir şekilde temizlenmesine bağlıdır						
SureDerm	HANS BIOMED Corporation	Hücresiz	-	Liyofilize İnsan yarı-meş dermis	Allojenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Hipertrofik skar ve yanık gibi hasarlı yumuşak dokuların tedavisinde kullanım, uzun raf ömrü(yaklaşık 2 yıl)						
Kısıtları	Sonradan deri grefti gerektirir, uygulama öncesi nemlendirilmeli						

Çizelge 2.3. (devamı)

Ticari İsim	Üretici	Greft Tipi	Hücre Kaynağı	Biyomalzeme	İskele	Hücre Kültürü	Kullanım ömrü
KaroDerm	Karocell Tissue Engineering AB	Hücresiz	-	İnsan aselüler dermis	Allojenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Deri grefti ile birlikte dermal eşlenik olarak kullanılabilir						
Kısıtları	Hastalık bulaşma riski, doku reddi riski, sonradan deri grefti gerekir						
GraftJacket	Wright Medical Technology	Hücresiz	-	İnsan aselüler yarı-meş dermis	Allojenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Tendon ve alt ekstremitelerin (yüzeysel veya derin)yara iyileşmesinde kullanım						
Kısıtları	Yanıklarda kullanımı az olduğundan istatiki bir verim oranı bilinmiyor						
Terudermis	Olympus Terumo Biomaterial Corp.	Hücresiz	-	Liyofilize çapraz bağlı (sığır) kollajen sünger ve silikon	Zenogenik ve sentetik	<i>In vivo</i>	Kısmen kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Derin yanıklarda etkili, deri fleplerinde verici alanın rejenerasyonunda kullanım						
Kısıtları	Tammalayıcı olarak yarı-kat deri grefti gerekir						
EZDerm	Brennen Medical, Inc.	Hücresiz	-	Çapraz bağlı (aldehit ile) kollajen (domuz derisi)	Zenogenik	<i>In vivo</i>	Geçici
Kullanımı/Üstünlükleri	Yarı-kat deri yanıklarının tedavisinde biyoaktif örtü olarak kullanım						
Kısıtları	Etkisi sentetik örtü malzemelerinden çok farklı değildir						
Matriderm	Dr. Suwelack Skin and HealthCare AG	Hücresiz	-	Kollajen tip I,III ve V liyofilize (α elastin hidrolizatı ile kaplı sığır demisi kaynaklı)	Zenogenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Yarı-kat deri grefti ile birlikte kullanımı oldukça etkili, tek basamaklı cerrahi uygulama, nekroza uğramış defektlerde kullanım, aşil tendonu onarımında kullanım						
Kısıtları	Otogreft gerekir						
Srattice	LifeCELL Corporation	Hücresiz	-	Domuz dermisi ve polisorbata	Zenogenik ve sentetik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Meme rekonstrüksiyonunda kullanım, ventral hernida potansiyel kullanım,enfekte bölgelerin tedavisinde etkili, Alloderme göre etik olarak daha tartışmasız, fasiyal defektlerin onarımında uygun gerilme özellikleri						
Kısıtları	Rejenerasyonun gerçekleşmesi için hasarsız doku ile temasta bulunmalı						
OASISWound Matrix	Cook Biotech Inc.	Hücresiz	-	Kolajen matris (liyofilize domuz incebağırsak mukozası)	Zenogenik	<i>In vivo</i>	Kalıcı
Kullanımı/Üstünlükleri	Kronik yaralarda etkili kullanım, hızlı iyileşme profili, <i>in vitro</i> epidermal farklılaşmayı ve bazal membran oluşumunu destekler, minimal kas kontraksiyonu						
Kısıtları							

*HA, hyaluronik as

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarla ilgili ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir. Çalışmada kullanılan kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojenlerin üretim basamakları açıklanmış ve elde edilen ürünlerin fizikokimyasal karakteri; SEM, TGA, FTIR, mekanik dayanım, şişme kapasitesi, yoğunluk analizi ve boşluk kesri çalışmaları ile belirlenmiştir. Son olarak kitosan-jelatin bazlı doku iskeleleri ve fibrin yapıştırıcı kullanılarak oluşturulan asimetrik deri sisteminin hazırlanışına ve bu sistemde yer alan keratinosit-fibroblast ko-kültürüne yönelik deneysel çalışmalara yer verilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Kitosan-jelatin hidrojenlerin üretiminde kullanılan %85 ve üzeri deasetilasyon derecesine sahip, orta molekül ağırlıklı kitosan Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından ve kitosani çözmek için kullanılan asetik asit, Riedel de Haen (ABD) firmasından temin edilmiştir. Süpergözenekli hidrojenlerin üretiminde kullanılan jelatin, domuz derisinden üretilmiş olup tip A jelatindir ve Sigma (ABD) firmasından alınmıştır. Çapraz bağlama işlemi için kullanılan glioksal Sigma-Aldrich (Almanya), gaz köpükletirmek amacıyla kullanılan sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ise British Drug Houses Ltd (İngiltere) firmasının ürünüdür. Kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojenlerin sterilizasyonunda ve iskelelerin kararlılığının sağlanmasında kullanılan etil alkol (%96) Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskopisi öncesi hücrelerin sabitleştirilmesi (fiksasyon) amacıyla kullanılan glüteraldehit çözeltisi, Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, örneklerin dehidre edilmesi amacıyla kullanılan hekzametildisilazan (HMDS) Sigma (Almanya) firmasından sağlanmıştır. Şişme testinde kullanılan PBS (fosfat tampon çözeltisi) Lonza (Belçika) firmasından alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmasında kullanılan Detroit 551 dermal fibroblast hücreleri ATCC (American Type Culture Collection, ABD) hücre bankasından tedarik edilmiştir. Ko-kültür çalışmasında kullanılan insan keratinosit hücre hattı, HS2 ise karakterize edilmiş olarak Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın Hayvan Hücre ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

Detroit 551, dermal fibroblast hücrelerinin çoğaltılması ve kùltive edilmesi için kullanılan Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ve HS2 hücrelerinin çoğaltılması ve kùltivasyonu için kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium:Ham's F12 Mixture (DMEM:Ham's F12, (1:1)) isimli besi ortamları Lonza (Belçika) firmasından alınmıştır.

Hücre besi ortamlarına eklenen FBS (fötal sığır serumu) Sigma (ABD) firmasından, penisilin/streptomisin çözeltisi ise Biological Industries (İsrail)'den tedarik edilmiştir. Hücrelerin tripsinizasyonu için Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Sigma (ABD) firmasından sağlanmıştır.

Hücre canlılığını ve aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan MTT analizinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, izopropil alkol Aklar Kimya (Türkiye) ve HCl (%37) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Keratinosit hücrelerinin doku iskelesi üzerine hücre tabakası halinde taşınması amacıyla kullanılan fibrin yapıştırıcı, TISSEEL® Baxter (İngiltere) firmasından tedarik edilmiştir.

İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılan formaldehit Merck (Almanya), ksilen ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

RT-qPCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) analizi için RNA izolasyonunda kullanılan Trizol Invitrogen (ABD) firmasından tedarik edilmiştir.

3.2. Kitosan-Jelatin Bazlı Süpergözenekli Hidrojellerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışması kapsamında iki tabakalı deri eşleniği sistemini oluşturmak üzere kullanılan kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojeller (SPH), mikrodalga ısıma ve gaz köpükleştirme yöntemlerinin eş zamanlı kullanılmasıyla sentezlenmiştir.

3.2.1. Kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojellerin üretimi

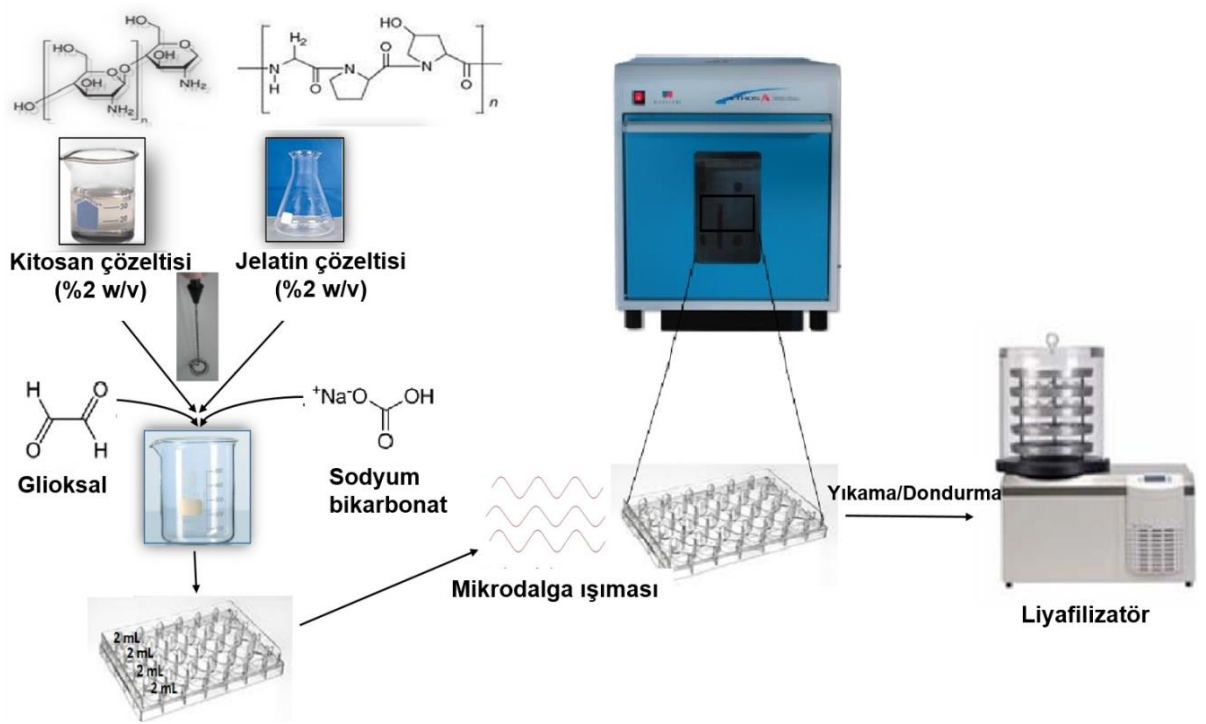
Kitosan-jelatin SPH'lerin üretim reçetesinin oluşturulmasında, Beşkardeş ve ark., [71] tarafından üretilen süpergözenekli kitosan hidrojellerin üretim yöntemi esas alınmıştır.

Kitosan-jelatin bazlı hidrojellerin sentezi için, 0.2 g kitosan, 0.1 M asetik asit çözeltisi içerisinde yaklaşık bir gün boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözündürülmüştür. %2 (w/v) oranında hazırlanan kitosan çözeltisi kaba filtrasyonla filtre edilerek çözelti içerisinde kirlilik oluşturabilecek büyük partiküller uzaklaştırılmıştır.

Jelatin çözeltisi %2 (w/v) oranında distile su içerisinde hazırlanıp yaklaşık 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. En uygun kitosan-jelatin oranının belirlenmesi amacıyla kitosan:jelatin içeriği sırasıyla 1:3, 1:1 ve 3:1 (v/v) oranlarında denenerek en kararlı jelleşmenin 3:1 oranında kullanılan kitosan-jelatin çözeltisi ile sağlandığına karar verilmiştir.

Ayrı ayrı hazırlanan kitosan ve jelatin çözeltileri 3:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Polimer karışımı içerisine gözenekliliği sağlamak amacıyla NaHCO_3 ve çapraz bağlayıcı ajan olarak da glioksal eklenip çözelti karışımı hızlıca homojenize edilmiştir. 4 mL kitosan-jelatin çözeltisi için 4 μL glioksal (%40 wt) ve 12 mg NaHCO_3 kullanılmıştır. 24 gözlü hücre kültür kaplarının her bir gözüne (1.6 cm çap) 2 mL hacminde dökülen karışım 120 s boyunca 90 Watt gücündeki mikrodalga ısıma (Milestone, İtalya) etkisine maruz bırakılmıştır. Eş zamanlı olarak jelasyon ve çapraz bağlanma gerçekleştiğinde, 24 gözlü hücre kültür kabının kalıp olarak kullanılmasıyla silindirik formda hidrojeller elde edilmiştir. Hidrojeller 1 dk'dan daha kısa bir süre etil alkol (%100) içerisinde bekletilerek kararlılıkları sağlanmıştır. Bu sırada alkol ve su moleküllerinin yer değiştirmesiyle hidrojel hacminde azalma gözlenmiştir. Etil alkol ortamından alınan hidrojeller, distile su içerisinde yaklaşık 2 dk bekletilerek yapıdaki safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Distile

su içerisinde şişirilen hidrojeller -20°C 'de 3-4 saat bekletilip yapısındaki su, dondurularak kristalize edilmiştir. -20°C 'de bekletilen hidrojeller -80°C 'de çalışan liyofilizatörde (Christ, Almanya) 1 gün boyunca liyofilize edilmiştir (Şekil 3.1). Hidrojel yapısındaki gözeneklerin çökmesini engellemek amacıyla %96'lık etil alkolde 6 saat bekletilerek kararlılıkları sağlanmış, etil alkolün tamamen uzaklaştırılması amacıyla da 1 gece boyunca yeniden liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Kitosan-jelatin hidrojellerin mikrodalga ısıtma varlığında gaz köpükleştirme yöntemi ile sentezlenmesi.

3.2.2. Kitosan-jelatin bazlı süpergözenekli hidrojellerin karakterizasyonu

Kitosan-jelatin hidrojellerin fizikokimyasal açıdan karakterize edilmesi için gerçekleştirilen analizler aşağıda ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır.

3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Kitosan-jelatin doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri, Carl-Zeiss EVO 506P (Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile Hacettepe Üniversitesi, Jeoloji Bölümü, Elektron Mikroskopisi Laboratuvarı'nda incelenmiştir. SEM ile görüntüleme öncesi, kitosan-jelatin iskele örnekleri altın-paladyum ile kaplanmıştır. İskele gözenek çapı,

SEM görüntüleri üzerinden Wayne Rasband tarafından geliştirilen Image J programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2.2. Şişme testi

Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan-jelatin hidrojellerin dinamik şişme deneyleri fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) ve 37°C'deki etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) gerçekleştirilmiştir.

Şişme testi için kuru ağırlıkları bilinen 9 mm çap ve 2 mm kalınlığındaki hidrojel diskleri belirli zaman aralıklarında ortamdan uzaklaştırılıp yüzey nemi alınarak hassas terazide Precisa 205 A SCS (± 0.0001 g duyarlılık, İsviçre) tartılmıştır.

Dinamik şişme denemeleri 3 paralel örnek kullanılarak gravimetrik tayin yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Polimerlerin şişme oranları (Q), kuru ağırlıkları W_0 , ve t zamanındaki ağırlığı, W_t ile Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır.

$$Q = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \quad \text{Eşitlik (3.1)}$$

3.2.2.3. Termogravimetrik analiz (TGA)

Çalışmada kullanılan hidrojellerin termal davranışı, termogravimetrik analizör (TG/DTA 6300 SII EXSTAR 6000, Seiko Instruments Inc., ABD) ile incelenmiştir. TGA çalışması; 25-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüştür.

3.2.2.4. Mekanik dayanım testi

Kitosan-jelatin hidrojellerin mekanik dayanım testleri için 9 mm çap ve 4 mm kalınlıktaki örnekler, 37°C'de PBS (pH=7.4) içerisinde şişirilerek, kullanılmıştır.

Sıkıştırma testleri, 2 mm/dk sabit çapraz başlık hızında, 0.02 N yük ile gerçekleştirilmiştir (Zwick/Roell Z250, Almanya). Her bir doku iskelesi için başlangıç sıkıştırma modülü, gerilim-gerinim eğrilerinin doğrusal bölgesinin eğimi alınarak hesaplanmıştır.

3.2.2.5. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Kitosan-jelatin iskelelerde -OH, -CH₂, -CH₃, -NH, -C-O, -C=O grupları ve amid II bandı 400–4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) ile belirlenmiştir.

3.2.2.6. Boşluk kesri analizi

Kitosan-jelatin hidrojellere ait boşluk kesri analizi, 37°C sabit sıcaklıkta ve PBS (pH 7.4) ile gerçekleştirilmiştir. Kuru hidrojellerin yapısına aldığı PBS hacmini belirlemek için Bürette Digital III aparatı (Brand, Almanya) kullanılmış ve boşluk kesri Eşitlik 3.2’de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Buna göre; D, iskelelerin şişmiş haldeki çapını (cm); L, kalınlığı (cm); V, kuru iskelenin absorpladığı çözelti hacmini (mL); ρ ise çözelti yoğunluğunu (g/mL) ifade etmektedir.

$$\text{Boşluk kesri} = [\pi D^2 / 4] L / V \cdot \rho \quad \text{Eşitlik (3.2)}$$

3.2.2.7. Yoğunluk tayini

Yoğunluk tayini için 10 mm çapa ve 2 mm kalınlığa sahip disk formundaki kuru hidrojeller kullanılmıştır. Kuru hidrojelin kütesinin belirlenmesi için analitik terazi ile tartımları yapılmıştır. Hidrojelin hacmi ise çözücü yer değiştirme metoduyla belirlenmiştir. Bu amaçla hidrojel tarafından absorplanmayan oldukça hidrofobik bir organik çözücü olan n-hekzan kullanılmıştır. Hidrojel disk, pens yardımıyla n-hekzana daldırılmış ve daldırmadan önce ve sonra okunan hacim değerleri arasındaki fark alınarak kuru hidrojel diskin hacmi belirlenmiştir. Üç paralel örnek ile yürütülen çalışmada, hidrojellerin yoğunluğu, kuru hidrojelin kütesinin, hacmine bölünmesi ile hesaplanmıştır [72].

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. İnsan dermal fibroblastlarının ve keratinositlerinin kültivasyonu

ATCC’den alınan insan derisi kaynaklı Detroit 551 hücrelerinin kültivasyonunda, Eagle’s Modified Essential Medium (EMEM) besi ortamı, %10 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin ile zenginleştirilerek kullanılmıştır. Hücre

kültür çalışmaları için insan kaynaklı immortalize keratinosit, HS2 hücre hattı Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. HS2 hücreleri, %5 FBS (v/v) ve 100 U/mL penisilin + 100 mg/mL streptomisin katkılı DMEM:Ham's F12 (1:1) ile kültive edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin inkübasyonu %5 CO₂'li 37°C'deki inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak kitosan-jelatin doku iskelelerinin sterilizasyonu

Kitosan-jelatin bazlı doku iskeleleri, ultra saf su ile hazırlanan %70'lik etil alkol içerisinde vakum etkisiyle çöktürülerek etil alkolün doku iskelelerinin gözenekleri içerisine nüfuz etmesi sağlanmıştır. İki saat % 70'lik etil alkolde bekletilen örnekler, hücrelerin TCPS (tissue culture polystyrene) yüzeyine yapışmasını engellemek amacıyla önceden Parafilm® ile kaplanmış 24 gözlü steril hücre kültür kaplarına yerleştirilerek 45 dk UV (ultraviyole) ışığa maruz bırakılmıştır. Doku iskelelerin yapısında kalan etil alkolün uzaklaştırılması için steril PBS ile 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Doku iskeleleri hücre ekimi öncesi, inkübatörde %10 (v/v) FBS katkılı EMEM ortamında bir gece bekletilmiştir.

3.3.3. Hücre kültürü sistemlerinin hazırlanması

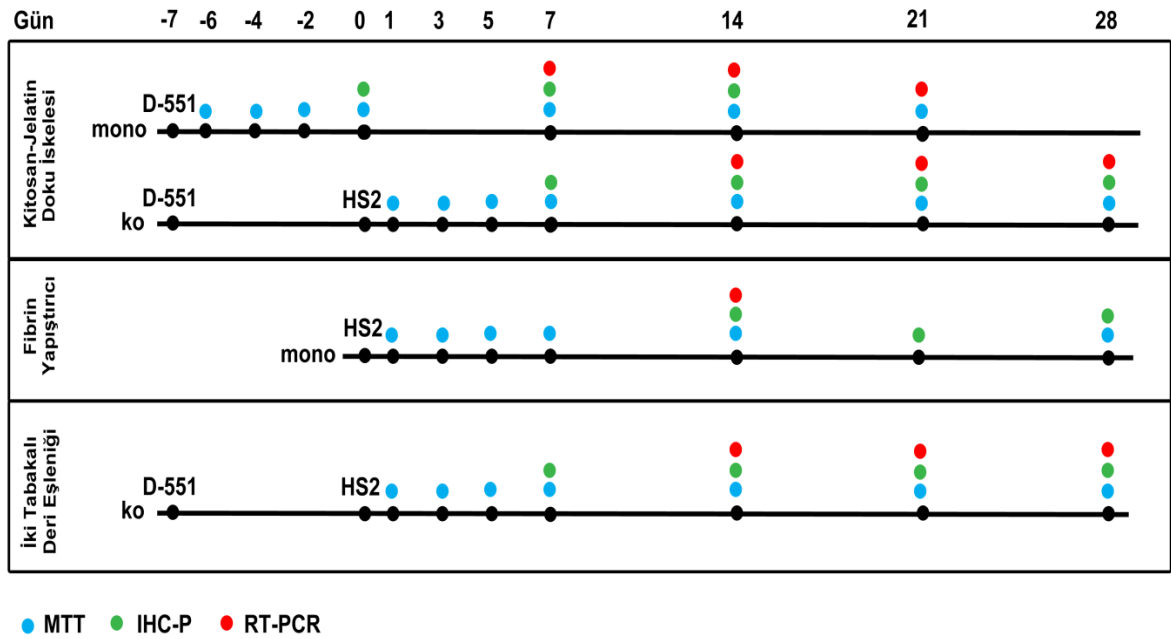
Hücre kültürü çalışmaları 4 farklı kültür grubu üzerinden yürütülmüştür. Bunlar;

1. Kitosan-jelatin hidrojellerde Detroit 551 kültürü
2. Kitosan-jelatin hidrojellerde Detroit 551 ve HS2 ko-kültürü
3. Fibrin yapıştırıcı içerisinde HS2 kültürü
4. Detroit 551 hücreleri ekilmiş kitosan-jelatin hidrojelleri üzerinde HS2 içeren fibrin yapıştırıcı tabakasından oluşan asimetric kültür sistemi.

Her bir gruba 7, 14 ve 21. günlerde MTT analizi, SEM yöntemi ile görüntüleme, immünohistokimya ve RT-PCR analizleri uygulanarak 28 gün boyunca hücre-malzeme ve hücre-hücre etkileşimleri incelenmiştir. Kültür sisteminin her bir grup için kurulumu ve takibi Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmiş ve aşağıda açıklanmıştır.

3.3.3.1. Kitosan-jelatin doku iskelelerinde dermal fibroblastların (Detroit 551) kültivasyonu

Kitosan-jelatin doku iskelelerine Detroit 551 hücreleri, 1.3×10^5 hücre/iskele yoğunluğunda (30 μ L'lik hücre süspansiyonları ile) ekilmiştir. Hücre kültivasyonunda %10 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin içeren EMEM besi ortamı kullanılmıştır. İnkübasyon %5 CO₂'li 37°C'deki inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) 28 gün boyunca devam etmiş ve besi ortamları iki günde bir %50 oranında yenilenmiştir.



Şekil 3.2. Dört farklı hücre kültür sisteminin kurulumu ve takibi.

3.3.3.2. Kitosan-jelatin doku iskelelerinde dermal fibroblast ve keratinosit ko-kültürü

İnsan dermal fibroblast hücreleri, Detroit 551 ve keratinosit hücreleri, HS2 kitosan-jelatin SPH doku iskelelerinde kültive edilerek 28 gün boyunca takip edilmiştir. Dokuz mm çap ve 2mm yükseklikte olan doku iskeleleri üzerine 1.3×10^5 hücre/iskele yoğunluğunda dermal fibroblast hücresi ekilmiştir. Yedi gün boyunca %10 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin içeren EMEM besi ortamı ile %5 CO₂'li 37°C'deki inkübatörde kültive edilmiştir. Bir haftalık dermal fibroblast kültivasyonunun ardından HS2 hücreleri 1×10^6 hücre/iskele yoğunluğunda, dermal fibroblast içeren doku iskelelerine ekilmiştir. Ko-kültürün kültivasyonunda %5 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin

katkılı DMEM: Ham's F12 (1:1) besi ortamı (HS2 besi ortamı) ile %10 FBS (v/v) ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin katkı EMEM besi ortamı (Detroit 551 besi ortamı) 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Kültivasyon %5 CO₂'li 37°C'deki inkübatörde 28 gün daha devam ettirilmiş ve besi ortamları gūnaşırı %50 oranında tazelenmiştir.

3.3.3.3. Fibrin yapıştırıcı içerisinde keratinosit kültivasyonu ve iki tabakalı deri modelinin hazırlanması

Çalışmada TISSEEL® isimli fibrin yapıştırıcı kullanılmıştır. Baxter (ABD) firmasından temin edilen fibrin yapıştırıcı kit, liyofilize fibrin proteini, fibrinoliz inhibitörü (aprotinin), liyofilize trombin çözeltisi ve CaCl₂ çözeltisi olmak üzere 4 flakon içermektedir. Liyofilize yapıştırıcı protein çözeltisi ve trombin çözeltisi aşağıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

i. Liyofilize yapıştırıcı protein konsantresi'nin (Fibrinojen çözeltisi) hazırlanması

1. Yapıştırıcı protein çözeltisi ve fibrinoliz inhibitör çözeltisi 37°C' ye kadar ısıtılır.
2. Fibrinoliz inhibitör çözeltisi, yapıştırıcı protein konsantresi içeren flakon içerisine aktararak 1 dk, 37°C' de tutulur.
3. Flakon köpürtmeden çalkalanır.

ii. Trombin çözeltisinin hazırlanması

1. CaCl₂ çözeltisi, trombin içeren flakon içerisine transfer edilir. Kısa bir süre çalkalanır.
2. Karışım, kullanılıncaya kadar 37°C'de bekletilir.

Fibrinojen ve trombin çözeltileri PBS ile süspanse edilen HS2 hücreleri ile karıştırılmıştır. Çalışma, 1x10⁶ hücre/iskele yoğunluğunda hücre ile yapılmıştır.

Yirmi beş µL fibrinojen ile karıştırılan 5x10⁵ HS2 hücresi ve 25 µL trombin çözeltisi içerisinde süspanse edilen 5x10⁵ HS2 hücresi doku iskeleleri üzerinde birleştirilmiştir. Ardından, fibrin yapıştırıcı içindeki HS2 hücreleri, 7 gün önce 3x10⁵ hücre/iskele yoğunluğunda dermal fibroblast (Detroit 551) ekilerek kültive edilen kitosan-jelatin doku iskeleleri üzerine taşınmıştır. %5 CO₂'li 37°C'deki inkübatörde 28 gün devam eden kültivasyon için HS2 besi ortamı ile Detroit 551 besi ortamı

1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Besi ortamları g na ır  %50 oranında yenilenmiştir.

Fibrin yapıştırıcı içerisindeki keratinositlerin kitosan-jelatin doku iskelelerinin üzerine taşınmasının yanında ayrı bir kültivasyon grubunda da fibrin yapıştırıcı içerisinde keratinosit hücreleri hücre kültür kaplarında 28 gün boyunca takip edilmiştir. Fibrin jel içerisinde keratinosit kültivasyonu yapılacak hücre kültür kaplarının yüzeyi p r zlendirilerek fibrin jelin büzülmesi engellenmiştir. %5 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin katkılı DMEM: Ham's F12 (1:1) besi ortam  ile %5 CO₂'li 37 C'de inkübe edilen keratinosit içeren fibrin yapıştırıcı örneklerinin besi ortamları g na ır  % 50 oranında tazelenmi tir.

3.3.4. MTT analizi

Doku iskeleleri içerisindeki Detroit 551 hücreleri ile fibrin yapıştırıcı içerisindeki HS2 hücrelerinin canlılık ve mitokondriyal aktiviteleri MTT tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan MTT analizi ile belirlenmiştir. 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT)  z ltisi hücre mitokondrisinde, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Meydana gelen formazan kristallerinin yoğunluğu hücre canlılık ve aktivitesi ile ilişkilidir.

Hücre kültür gruplarında 1., 3., 5., 7., 21. ve 28., günlerde MTT analizleri 3 paralel örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, hücre kültür örnekleri üzerindeki besi ortamları uzaklaştırılıp MTT  z ltisi (2.5 mg/mL PBS) ve serum katkısız besi ortam  1:10 oranında eklenerek 37 C'de inkübe edilmiştir. Dört saat inkübasyonun ardından doku iskeleleri ve fibrin yapıştırıcı örneklerinin üzerindeki ortamlar uzaklaştırılıp 400  L (0.04 M HCl içeren) izopropil alkol  z ltisi eklenerek formazan kristallerinin  z nmesi sa lanm tır. Elde edilen  z ltiden 200  L çekilerek 96-gözlü kültür kaplarına aktarılm  ve 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) olarak  l l rek optik yoğunluk belirlenmiştir.

3.3.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Hücrelerin doku iskelesi ve fibrin jel içerisinde gösterdiği morfolojik değişimleri, hücre-hücre, hücre-doku iskelesi ve hücre-fibrin yapıştırıcı etkileşimlerini belirleyen

mikroyapıları incelemek amacıyla hücre kültürünün 7., 14., ve 21. günlerinde, SEM (ZeissEvo 50, Almanya) ile görüntülemeleri yapılmıştır.

SEM görüntüleme için alınan örneklerin fiksasyonunda, ilk olarak üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Örnekler iki kez PBS (pH=7.4) ile yıkanarak %2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde +4°C'de 30 dk bekletilmiştir. Fiksasyonun ardından örnekler, PBS içerisinde +4°C'de saklanmıştır. SEM'de görüntüleme öncesi incelenecek örnekler dehidrasyon işlemi için 2'şer dk süre ile ve sırasıyla %30, %50, %70, %90, %100, (v/v) etanol çözeltilerinden geçirilip hekzametildisilazan (HMDS) içerisine alınarak burada 5 dk bekletilmiş ve dehidrasyon işlemi tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler, altın-paladyum ile kaplanarak SEM ile görüntülenmiştir.

3.3.6. Histolojik boyama çalışmaları

Detroit 551 ve HS2 ekilmiş doku iskelesi örnekleri ve fibrin yapıştırıcı içerisinde HS2 ile kültive edilen örnekler 7., 14., 21. ve 28. günlerde; %4'lük formalin çözeltisi ile 2 saat fikse edilmiştir. Formalini uzaklaştırmak için 1 gece durgun suda bekletilen örnekler, alkol tespiti ile dehidre edilmiştir. Dehidrasyon aşamasında örnekler, 1'er saat sırasıyla %70, %80, %95 ve %100 etil alkol serilerinden geçirilip ksilen içerisinde 1.5 saat bekletilmiştir. Parafinin süper gözenekli doku iskeleleri içerisine nüfuz etmesi için vakum etüvünde 1 saat 60–65°C'de bekletildikten sonra örnekler parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Mikrotom cihazında (Leica, ABD) 10 µm'lik parafin kesitler lam yüzeyine alınmıştır.

Histolojik ve immün boyama için preparatlara önce deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Deparafinizasyon basamağında preparatlar 5'er dk, olmak üzere sırasıyla ksilen, %100, %96, %80, %70 etil alkol ve distile su serilerinden geçirilerek PBS içerisine alınmıştır.

Histolojik boyama için hematoksilin ve eozin boyaları (H&E) kullanılmıştır. Boyama işleminde standart H&E boyama protokolü uygulanmıştır [73]. Ancak kitosanın asitte çözündüğü bilindiğinden kitosan-jelatin bazlı doku iskeleleri için asit-alkol muamelesi basamağı atlanmıştır.

3.3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Kitosan-jelatin ve/veya fibrin jel ile oluşturulan kültür sistemlerinde mono ve ko-kültür olarak çoğaltılan Detroit 551 ve HS2 hücrelerinin farklılaşmaları kollajen1 (*COL1*), fibronektin (*FN*), lorikrin (*LOR*) ve keratin14 (*KRT14*) gen ifade düzeylerine bakılarak incelenmiştir.

RNA izolasyonu

Hücre kültürlerinin 7., 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri ve fibrin jel örnekleri RT-PCR analizleri için -80°C'ye kaldırılmıştır. Örneklerden RNA izole edileceği zaman her bir tüpe 1000 µL Trizol eklenerek 25-30 s vortekslenmiş ve 2 sa +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 200 µL kloroform eklenerek 15-20 kez aşağı yukarı çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda örnekler, +4°C'de 10 dk 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üstte toplanan sulu RNA fazı yeni bir Eppendorf tüpe aktararak üzerine eşit miktarda %70 etanol çözeltisi eklenmiştir. Etanol ile karıştırılan sulu RNA fazı RNeasy spin kolona aktarılmış ve 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiştir. Bu aşamada elde edilecek RNA'daki, DNA kontaminasyonunu azaltmak için Qiagen RNase Free DNase Set kullanılarak kolon üzerinde DNase uygulaması yapılmıştır. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırılarak kolon üzerine 350 µL RW1 (guanidin tiyosiyonat içeren tampon çözeltisi) çözeltisi eklenmiştir. 13,000 rpm'de 15 s santrifügasyon uygulandıktan sonra tüpte toplanan sıvı yeniden uzaklaştırılmıştır. Her bir örnek için 10 µL DNase stok solüsyonu 70 µL RDD (tampon çözelti) çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanan karışım doğrudan spin kolon membran üzerine gelecek şekilde bırakılarak oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından 350 µL RW1 çözeltisi spin kolona eklenerek 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiştir. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolona 500 µL RPE (yıkama çözeltisi) çözeltisi eklenerek 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiştir. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve spin kolona tekrar 500 µL RPE çözeltisi eklenerek 13,000 rpm'de 15 s santrifüjlenmiştir. Bu aşamadan sonra spin kolonda yıkama çözeltisinin tamamen uzaklaştırılması için toplama tüpü atılıp yenisi kullanılmış ve 13,000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra kolonlar 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine yerleştirilerek membran üzerine en az 30 µL olacak şekilde beklenen RNA miktarına bağlı olarak, RNase-DNase içermeyen steril su eklenerek 13,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon membranında tutunan

RNA, su ile birlikte membrandan çekilerek santrifüj tüpünde toplanmıştır. Santrifüj tüpünde toplanan bu pellet, RT-PCR için kullanılacak saf RNA izolatıdır. Elde edilen RNA miktarını belirlemek için NanoDrop 2000 cihazı ile ölçüm yapılmıştır.

cDNA Sentezi ve Reverse Transcriptase qPCR Analizi

RT-PCR analizi, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne 5 HotFirePol® EvaGreen® qPCRMixPlus (Estonya) kitleri ile LightCycler® NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 40°C'de 120 dk'da gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları ise 95°C'de 900 s denatürasyon, 95°C'de 15 s, 60°C'de 20 s ve 72°C'de 20 s olmak üzere 45 döngü ve son olarak 60°C'de 20 s ve 95°C 'de 0.1°C/s artışla 20 s olacak şekilde erime döngüsü şeklinde uygulanmıştır.

Korunmuş gen olarak β -actin kullanılmış ve COL 1, FN, LOR, KRT14 genlerinin primer dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Analiz sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Alınan veriler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR'da kullanılan primer dizileri.

Sembol	Gen	Primer dizisi (5'→3')	Gen Bankası Accession No
β -Actin	Beta Aktin	F:5'-TCCTGTGGCATCCAC-3' R:5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'	NM_001101
COL1	Kollajen 1	F:5'-TGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3' R:5'-TTGGTGGGATGTCTTCGTCT-3'	NM_000088
FN	Fibronektin	F:5'-CAAGTATGAGAAGCCTGGGTCT-3' R:5'-TGAAGATTGGGGTGTGGAAG-3'	NM_212482
LOR	Lorikrin	F:5'-CTACCTGGCCGTCCAAATAG-3' R:5'-CAGCATTCTCCAGACATC-3'	NM_000427
KRT14	Keratin 14	F:5'-CTCAGCATGAAAGCATCCC-3' R:5'-TCCAGCAGGATCTTGACTC-3'	NM_000526

F:Forward, R: Reverse

3.4.İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında elde edilen veriler istatistiksel olarak olarak GraphPad Software Instant programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilip farklı grupların istatistiksel karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu başlık altında, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait sonuçlar sunularak, elde edilen verilere ilişkin tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak iki tabakalı asimetrik deri eşleniği sisteminde kullanılan kitosan-jelatin doku iskelelerine ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Ardından, deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılması amaçlanan deri eşleniği modeli değerlendirilmek üzere insan kaynaklı HS2 ve Detroit 551 hücreleriyle *in vitro* ve durgun koşullarda yürütülen hücre kültürü çalışmalarının sonuçları paylaşılmıştır.

4.1. Kitosan-Jelatin/Fibrin Yapıştırıcı ile Oluşturulan İki Tabakalı Deri Eşleniği

Deri kayıplarının tedavisinde yarı-kat otogreftler çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu malzemeler derin yanıkların tedavisinde yeterli olamamaktadır. Sunulan çalışmada, kaybedilen dermis yatağını doldurarak buradaki doku rejenerasyonuna yardımcı olmak için polimerik bir doku iskelesi hazırlanmıştır. Bu amaçla kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojellerin iki tabakalı deri modelinin dermis tabakasını oluşturması öngörülmüştür.

Deri dokusunun organize ve katmanlı yapısında birçok hücre tipi yer almaktadır. Ancak deri dokuda en çok bulunan hücreler; epidermal tabakaya hakim olan keratinositler ve dermiste bulunan temel hücre tipi olan fibroblastlardır. Çalışmada, kitosan-jelatin doku iskelelerinde insan kaynaklı dermal fibroblast (Detroit 551) hücreleri kültive edilirken, üzerini örtecek fibrin yapıştırıcı tabakanın içerisinde ise yine insan kaynaklı keratinositler (HS2) kültive edilmiştir.

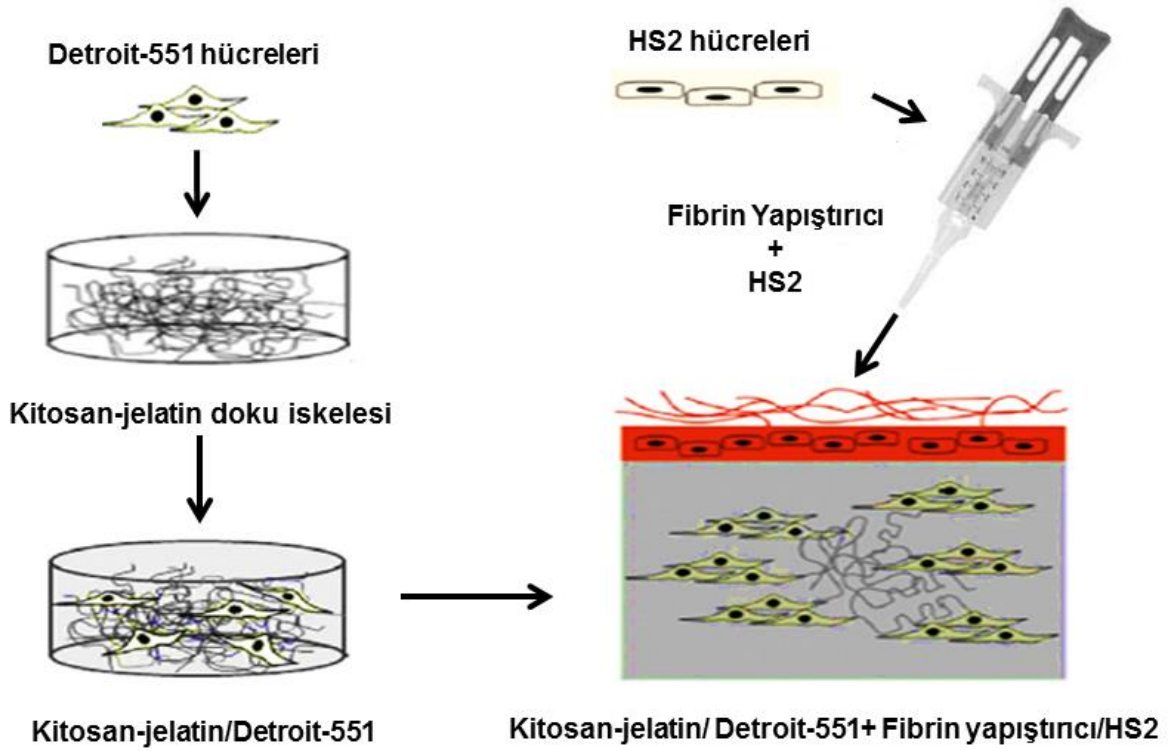
Bugüne kadar yapılan transplantasyon denemelerinin literatüre kazandırdığı en önemli bilgi, epidermis ve dermis eşleşmesinde epidermal büyüme ve farklılaşmanın epitelyal-mezenkimal etkileşimlerle kontrol edilebildiğidir [17]. Doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen deri eşlenikleri için de aradaki bazal tabakanın önemsenmesi gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla önerilen deri modelinde epidermis-dermis temasının sağlanması için etkileşime izin verecek bir keratinosit taşıyıcı malzeme olan fibrin yapıştırıcı kullanılmıştır.

Fibrin yapıştırıcının deri greftlerinin transplantasyonunda ve doku mühendisliği ürünlerinin bileşiminde yaygın kullanıma sahip olduğu ilgili literatürde de yer almaktadır [35, 63, 65, 74]. Sunulan tez çalışmasında da, bu bilgilerin ışığında, iki

tabakalı deri eşleniği modelinin tamamlanması için keratinosit hücre tabakası, kitosan-jelatin doku iskelesinde kültive edilen Detroit 551 hücrelerinin oluşturduğu dermal tabaka üzerine fibrin yapıştırıcı içerisinde taşınmıştır.

Oluşturulan deri modelinde keratinosit hücre kültürü dermal bileşen üzerinde fibroblast kültivasyonu ile eş zamanlı olarak devam ettirilmiştir. Böylece, kültive keratinosit tabakalarının taşınması ile ilgili kısıtlar ortadan kaldırılmıştır. Bu yöntemle, keratinosit tabakalarının laboratuvarında önceden doyumluğa ulaşmaları (tabaka oluşturmaları) için gereken zaman kazanılmıştır ki bu süre genellikle 3 haftayı bulmaktadır. Keratinosit tabakalarının kırılma olmaları nedeniyle taşınmaları sırasında yapı bütünlükleri bozulabilmektedir, fakat uygulanan yöntem bu riski ortadan kaldırmaktadır [75].

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında, deri doku mühendisliğine yönelik iki tabakalı deri dokusu eşleniğinin oluşturulması hedeflenmiştir. Kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojeller, Detroit 551 hücreleri için doku iskelesi olarak kullanılarak deri dokusunun dermal tabakası oluşturulmuştur. Keratinosit hücreleri ise fibrin yapıştırıcı içerisinde kitosan-jelatin/Detroit 551 hücrelerinden oluşan kültür sistemi üzerine taşınarak iki tabakalı asimetrik yapı elde edilmiştir. Şekil 4.1 ile yöntemin yolizi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1.Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 ile oluşturulan iki tabakalı deri modeli.

4.1.1. Kitosan-jelatin bazlı doku iskelelerinin üretilmesi

Malzeme bilimi ve mühendislik prensipleriyle yaklaşıncı doku, hücre ve hücre dışı matrisin (ECM) bir arada bulunduğu bir yapı olarak görülebilir. Glikoproteinler, kollajen ve glukozaminoglukanlardan (GAG) meydana gelen bir ağ oluşturan ECM, doku mühendisliği uygulamalarında yapay bir iskele tarafından taklit edilmektedir. İskelenin amacı, hücre tutunmasını teşvik eden bir yapı olarak hücre çoğalmasını engellemeden farklılaşmaya olanak sağlayarak yeni dokunun şekillenmesine rehberlik etmektir. Bu nedenle hücre dışı matris materyallerini taklit eden biyopolimerler kullanarak uygun bir deri eşleniği modeline ulaşmak mümkün olacaktır [76].

Malzeme seçimi

Doğal bir polisakkarit olan kitinden türevlenen kitosan, düşük maliyetli ve büyük ölçekte üretilebilir olmasının yanı sıra yüksek biyoyumluluğu ve anti-mikrobiyal özellikleri sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında büyük bir ilgi görmektedir. Yapısal olarak glukozaminoglukanlara benzer olması da biyoyumluluğunu arttırmaktadır.

İdeal bir deri eşleniğinin antijenik özelliğinin olmaması, su kaybını engellemesi ve bakteriyel çevreye karşı direnç göstermesi beklenmektedir [15]. Kitosan, yüksek oranda su tutabilme kapasitesi, antibakteriyel yapısı ve hemostatik özellikleri ile ideal bir deri eşleniği malzemesidir [77]. Bu nedenle çalışma kapsamında doku iskelelerinin hazırlanması için kitosan polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Kitosan, lizozim enzimiyle hidrolize uğrarken yapısında bulunan amino şekerlerini salmaktadır. Bozunma hızı deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişen kristalinitesiyle ilişkilidir. Yüksek deasetilasyon derecesine (>%85) sahip kitosan düşük bozunma hızına sahiptir. Tıgılı ve ark.[78] tarafından yapılan çalışmada yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın düşük deasetilasyon (<%85) derecesine sahip kitosana göre hücre yapışmasını ve çoğalmasını daha iyi desteklediği gösterilmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma kapsamında yüksek deasetilasyon derecesine (>%85) sahip kitosan kullanılması tercih edilmiştir.

Kitosanın mekanik ve biyolojik özelliklerini geliştirmek için, diğer polimerlerle oluşturduğu karışımlar da biyomühendislik uygulamalarında araştırma konusu olmuştur. Özellikle de jelatin ile birlikte kullanımı, jelatin yapısındaki arjinin-glisin-aspartik asit (Arg-Gly-Asp) gibi RGD-benzeri aminoasit dizileri sayesinde hücre yapışmasını ve göçünü desteklemektedir. Jelatin, uygun pH değerinde kitosan ile biraraya geldiğinde polielektrolit bir kompleks ortaya çıkmaktadır [79].

Kitosan-jelatin malzemelerden doku mühendisliği uygulamalarında başarılı sonuçlar [77, 80] alınması nedeniyle sunulan çalışmada da kitosan-jelatin malzemenin kullanılması tercih edilmiştir.

Deri, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği gibi çeşitli uygulamalarda kitosan-jelatin bazlı doku iskeleleri glutraldehit gibi ajanlarla çapraz bağlanarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretiminde çapraz bağlayıcı olarak glutraldehite göre daha az toksik olduğu bilinen glioksal [48, 81-85] kullanılmıştır.

Kitosan ve glioksal arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu, kitosanda bulunan serbest amino grupları ile glioksalin aldehit grupları arasında meydana gelen Schiff baz reaksiyonu ile gerçekleşmektedir [56, 86]. Glioksal aynı zamanda jelatinin yapısında da bulunan amin gruplarına kolayca bağlanmaktadır [87].

İki ya da daha fazla sayıdaki çapraz bağlı polimerin fiziksel olarak birleşmesi ile meydana gelen yapılar IPN yapı (interpenetrating polymer network) olarak bilinmektedir [88]. Sunulan çalışmada da kitosan ve jelatinin eş zamanlı olarak çapraz bağlanmasıyla kitosan-jelatin IPN yapı elde edilmiştir.

Fabrikasyon yöntemi

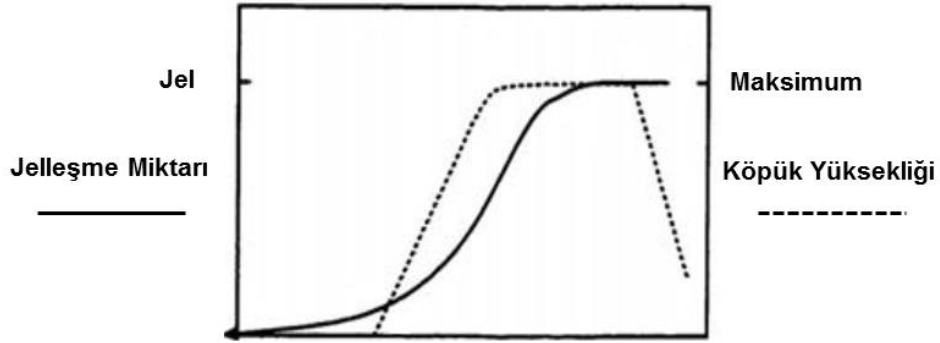
Doku mühendisliği uygulamalarında uygun bir deri doku eşleniği oluşturmak için biyouyumlu özellikteki polimerlerden çeşitli fabrikasyon teknikleriyle doku iskeleleri hazırlanmaktadır. Böylelikle hidrojellerden açık gözenekli yapılara ve fibröz matrislere kadar çok geniş bir yelpazede doku iskeleleri üretilebilmektedir [52, 89, 90].

Gaz köpükleştirme yöntemi kullanılarak hızlı şişme özelliğine ve içsel bağlantılı gözeneklere sahip süper gözenekli hidrojeller (SPH) üretilebilmektedir [88]. Gözenek boyutları 10-1000 µm arasında değişen SPH'ler yüksek gözenek çapları ve şişme oranları sayesinde besin maddelerinin, metabolitlerin ve büyüme faktörlerinin geçişi, hücrelerin doku iskelesinin içlerine kadar nüfuz ederek çoğalmasa gibi doku mühendisliği açısından oldukça fazla avantaja sahiptirler [91].

Mikrodalga tekniği, polimerizasyon reaksiyonlarında; hızlı, homojen ve etkin bir ısı transferi sağlayan bir yöntem olarak reaksiyon koşullarına çok kısa sürelerde ulaşılmasına olanak sağlar [92]. Bu nedenle, polimer teknolojisinde mikrodalga ısıtma yönteminden yararlanılmaktadır [93, 94]. Sunulan çalışmada mikrodalga ısıtma yöntemi kullanılarak çapraz bağlanma reaksiyonu sırasında, ısınmanın moleküler düzeyde olması, tüm moleküllerin eşit derecede ısınması, reaksiyon karışımının, çapraz bağlanmanın başlayacağı sıcaklık ve pH koşullarına daha kısa sürelerde ulaşması sağlanmıştır.

Deri doku mühendisliğinde kullanılmak üzere uygun bir deri eşleniği tasarlanması amaçlanan bu çalışmada, kitosan-jelatin karışımı ile süpergözenekli hidrojellerin sentezlenebilmesi için eşzamanlı mikrodalga ısıtma ile çapraz bağlama ve gaz köpükleştirme yöntemleri birlikte kullanılmıştır. Bu yöntem daha önce çalışma grubumuz (Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu) tarafından kitosan doku iskelelerinin hazırlanması için geliştirilmiştir [56]. Köpükleşme süreci ve çapraz bağlanma reaksiyonunun bağlı olduğu pH ve sıcaklıktan etkilenmektedir.

Reaksiyon çözeltisine mikrodalga ısıma uygulandığında çözeltinin sıcaklığı oda sıcaklığından yaklaşık olarak 65°C'ye hızla yükselmektedir. Gaz köpükleşme reaksiyonu, ortamın sıcaklığının ve pH'sının değişmesi ile ivme kazanmaktadır. Aynı zamanda, ortamın başlangıç pH'sı NaHCO_3 'ün CO_2 'e hızla ayrışması nedeniyle 4.0'ten 6.5'e yükselmektedir. Kitosanın glioksal ile çapraz bağlanma eğilimi, pH 7'ye ulaştığı zaman artmaktadır. Mikrodalga ısıma ile oluşan hızlı ısınma NaHCO_3 'ün bozunması ile hızlanan gaz köpükleşme prosesini ve pH artışını desteklemektedir. Bu sayede çapraz bağlanma sonucu oluşan jelasyon ve gaz köpükleşme reaksiyonu birbiri ile korele olarak gerçekleşmektedir. Jelleşme ve köpük oluşumu arasındaki ilişki Şekil 4.2'de gösterilmiştir [88].



Şekil 4.2. Jel ve köpük oluşumunun bağıl kinetiği [56].

Sunulan çalışmada farklı olarak kitosan yapısına jelatin katkısı yapılmış ve söz konusu üretim yöntemi küçük değişikliklerle bu karışıma uyarlanmıştır.

Kitosan doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin (özellikle kırılgenliğinin) iyileştirilmesi ve jelatinin yapısındaki RGD sekanslarıyla biyouyumluluğunun artırılması amacıyla yapılan jelatin katkısının optimum miktarı çalışma kapsamında belirlenmiştir. Kitosan-jelatin doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılmasına karar verilen reçete ve hazırlama koşulları Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1.Kitosan-jelatin SPH hazırlama reçetesi.

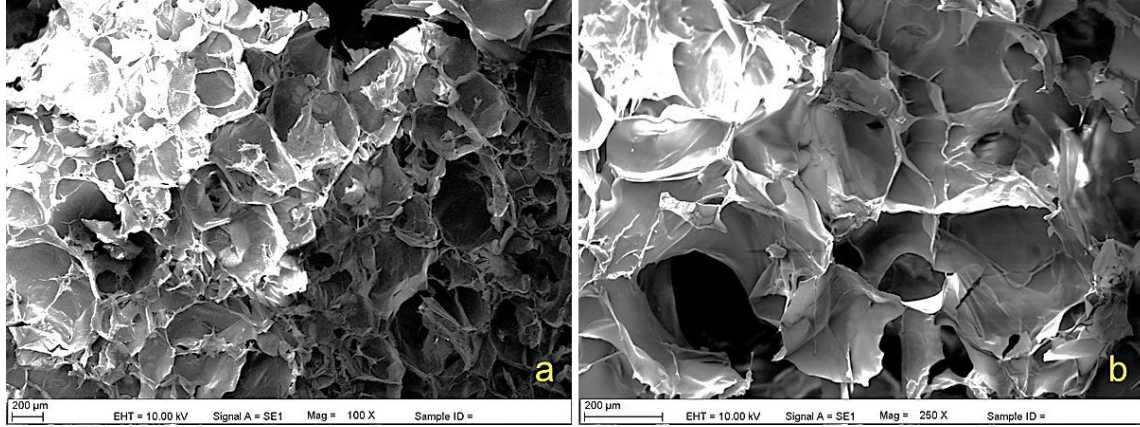
Mikrodalga üretim koşulları	Kullanılan malzemeler	Kullanım amacı	Katılım oranı (1mL polimer karışımında)
90 Watt 120s	Kitosan >%85 deasetillenmiş 0.1 M asetik asitte, %2 (w/v)	Biyopolimer	0.75 mL
	JelatinTip A (domuz jelatini) Distile suda, %2'lik (w/v) çözelti	Biyopolimer	0.25 mL
	NaHCO ₃ (Sodyum bikarbonat)	Köpükleştirici ajan	3 mg
	Glioksal %40 (wt)	Çapraz bağlayıcı	2 µL

4.1.2. Kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojenlerin karakterizasyonu

Kitosan-jelatin SPH'lerin SEM görüntüleme, şişme testi, termogravimetrik analiz, mekanik dayanım testi, ATR-FTIR analizi, yoğunluk tayini ve boşluk kesrinin belirlenmesi ile tamamlanan karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına aşağıda ayrıntılı bir şekilde yer verilmiş olup alınan sonuçlar Çizelge 4.3'te topluca sunulmuştur.

4.1.2.1. Morfolojik analiz

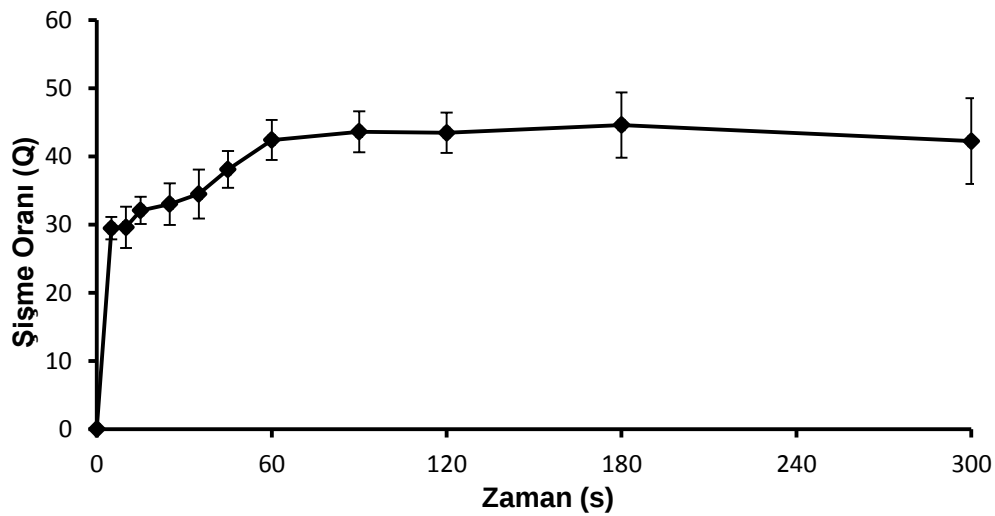
Süpergözenekli hidrojenlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Hidrojellerin gözenek çapı, ortalama $509 \pm 101 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Kitosan-jelatin doku iskelesinin gösteren SEM fotoğrafları. (a)100X, (b)250X.

4.1.2.2. Şişme testi sonuçları

Kitosan-jelatin SPH’lerin yapılarına alabileceği maksimum su miktarının belirlenmesi için 37°C ’deki PBS (pH 7.4) ortamında gravimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Disk şeklindeki ve $2 \times 9 \text{ mm}$ boyutlarındaki hidrojenlerin şişme testi 3 paralel örnek kullanılarak yapılmış ve şişme oranlarının hesaplanmasında Eşitlik 3.1 kullanılmıştır. Şekil 4.3’te verilen grafikte kitosan-jelatin SPH’lerin zamana bağlı şişme oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.4.Kitosan-jelatin doku iskelelerine ait şişme profilini gösteren grafik

Test sonuçları değerlendirildiğinde kitosan-jelatin hidrojellerin çok hızlı bir başlangıç şişme davranışı gösterdiği ve 5 saniyede şişme oranı değerinin 30'a ulaştığı görülmektedir. Bu durum, hidrojellerin içsel bağlantılı süpergözeneklerinin oluşturduğu kapiler etki ile açıklanabilir. Ardından şişme hızı bir miktar azalarak 60'ıncı saniyede $Q = 42.4$ değerine ulaşılmıştır. Hidrojellerin denge şişme oranı $Q = 42.4 \pm 2.9$ olarak hesaplanmış olup 60. saniyeden sonra yapı, alabileceği maksimum suyu absorplamış olduğundan, hidrojellerin şişme değerinde belirgin bir değişim görülmemiştir.

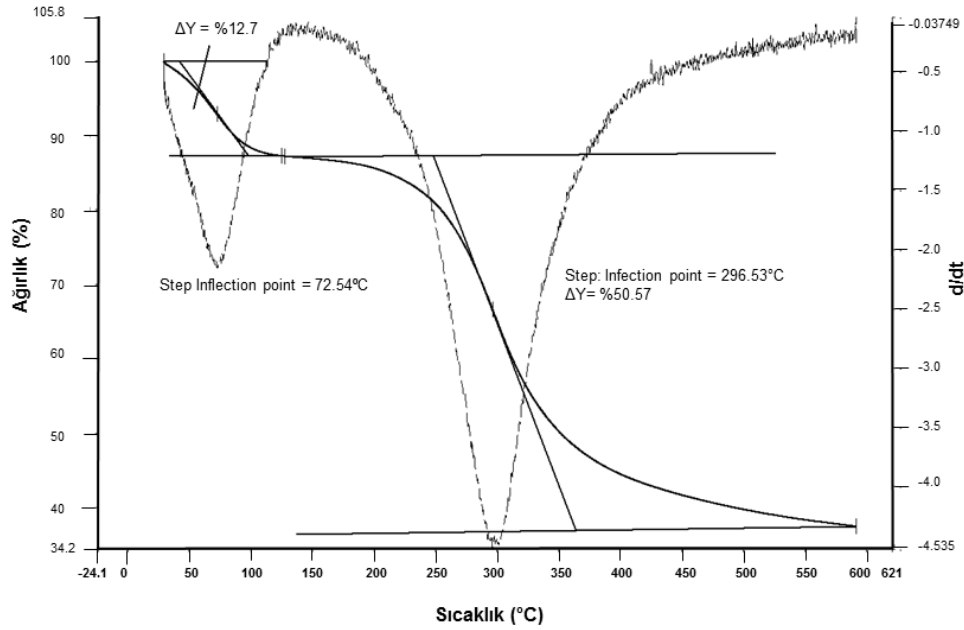
Şekil 4.5'te doku iskelelerinin kuru haldeki ve şişme sonrası fotoğrafları görülmektedir. Su absorpsiyonuna bağlı olarak doku iskelelerinin çaplarında %11, yüksekliklerinde %20 ve hacimlerinde ise yaklaşık %48 oranında artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.5.Kitosan-jelatin doku iskelelerinin kuru ve şişmiş haldeki fotoğrafları(sol: kuru hidrojel; sağ: şişmiş hidrojel).

4.1.2.3. Termogravimetrik analiz (TGA)

Kitosan-jelatin SPH'lerin sıcaklık artışına bağlı olarak kütle kaybının incelendiği termal analiz çalışmaları, 25-600°C aralığında ve 10°C/dk ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüş ve Şekil 4.6'daki termogram elde edilmiştir.



Şekil 4.6.Kitosan-jelatin SPH'lere ait termogram.

Kitosan-jelatin hidrojelde su; bağlı su, içsel yapıya katılan su ve serbest haldeki su olmak üzere üç durumda bulunmaktadır ve yalnızca serbest haldeki su kristalize olarak porojen görevi yapmaktadır. Kristalize olan su ise liyofilizasyon sırasında süblimleşerek yapıyı terketmektedir. Termogramda ilk olarak 72°C'lerde meydana gelen %12 oranındaki kütle kaybı yapıda varolan nemin buharlaşarak uzaklaştığını göstermektedir.

Şekil 4.6'daki termogramdan polimer kütlelerinde ikinci belirgin kaybın 300°C civarında meydana geldiği görülmektedir. Kitosan-jelatin hidrojel 296°C'de ağırlıkça %50 oranında yapısal bozunma göstermektedir ki buradaki kaybın amin gruplarının bozunmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir [95]. Kitosan-jelatin polimerlerinin 600°C sıcaklıkta geride hiçbir kalıntı bırakmadan %100 kütle kaybına uğradığı termogravimetrik analiz ile belirlenmiştir.

Aynı üretim yöntemiyle üretilmiş saf kitosan SPH'lerde ilk ağırlık kaybının 80°C'de görülmesi ve %50 kütle kaybının gerçekleştiği sıcaklığın 230°C'ye gerilemesi [56]

yapıda bulunan jelatin karışımın kitosanla oluşturduğu çapraz bağlanmanın etkisini göstermektedir.

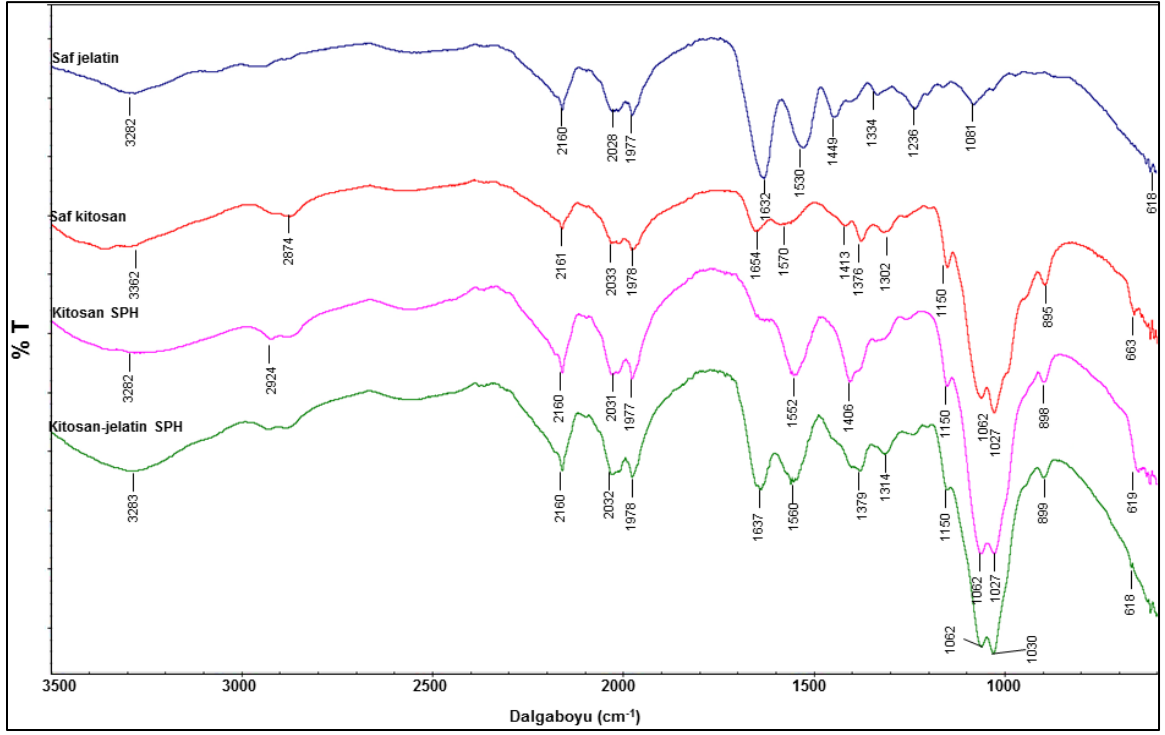
Sunulan çalışmada üretilen kitosan-jelatin hidrojeller öncelikle %70 etil alkol ile muamele edilmiş ve ardından UV ışınım uygulanarak steril edilmiştir. Ancak kitosan-jelatin karışımı malzemenin 121°C sıcaklık altında belirgin bir yapısal kayba uğramadığı gözönünde bulundurulduğunda otoklav ile sterilizasyonun da rahatlıkla uygulanabileceği düşünülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir. Kathuria ve ark., [96] kitosan-jelatin kriyojellerde hücre kültürü çalışması öncesinde kriyojellerin sterilizasyonunu 121°C’de otoklav ile gerçekleştirmişlerdir.

4.1.2.4. Mekanik dayanım testi

Deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak bir biyomalzemenin mekanik özelliklerinin de deri dokusuyla uyum sağlaması beklenmektedir. Çalışmada kullanılan kitosan-jelatin doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının belirlenmesi amacıyla 2 mm/dk sıkıştırma hızı ile uygulanan test sonucunda Elastik modül değeri 0.01 MPa olarak belirlenmiştir. Hidrojellere sıkıştırma testinde uygulanan $F_{max}=8$ kPa kuvvetinde %60 oranında deformasyon belirlenmiştir. Mekanik dayanımın belirlenmesi için yapılan sıkıştırma testi sonucu Ek-1’de yer almaktadır.

4.1.2.5. Fourier dönüşümlü toplam yansımali azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR)

Tez çalışması kapsamında doku iskelesi olarak kullanılan kitosan-jelatin SPH’ler ATR-FTIR ile analiz edilmiştir. Bileşenlerin yapıya katılım oranlarının anlaşılması için saf kitosan ve jelatine ait spektroskopik analiz sonuçları da kitosan-jelatin SPH’leriyle karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Ayrıca çapraz bağlı kitosan-jelatin SPH’lerle aynı üretim yöntemi kullanılarak elde edilen çapraz bağlı kitosan SPH’lere ait spektrum da çapraz bağlanmanın moleküler yapıya etkisini göstermek için karşılaştırmaya dahil edilmiştir (Şekil 4.7). Kitosan, jelatin ve kitosan-jelatin karışımında görülen FTIR bantları Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.7.Saf jelatin (mavi), saf kitosan (kırmızı), kitosan SPH (pembe) ve kitosan-jelatin SPH'lere ait (yeşil) ATR-FTIR spektrumları.

Çizelge 4.2.Saf kitosan,saf jelatin, kitosan SPH ve kitosan-jelatin SPH yapılarına ait FTIR spektrumunda yer alan bantlar ve açıklamaları.

Absorpsiyon bantları (cm ⁻¹)	Kitosan	Jelatin	Kitosan SPH	Kitosan-jelatin SPH
3450-3200	-OH, -NH	-NH	-NH (3382)	-NH (3283)
2918	-CH ₂	-CH ₂	-CH ₂ (2924)	
2865	-CH ₃ (2874)	-CH ₃		
1654-1640	-C=O (1654)	-C=O (1654)		-C=O (1637)
1580-1534	Amid II (1570)	Amid II		Amid II (1560)
1150,1062, 1072,1406	C-O gerilimi (ν(C-O-C))			C-O gerilimi (ν(C-O-C))
1234	-C-O	-C=N bükülme, -C-O		
897	Amid V, -CN (895)	Amid V, -CN		Amid V, -CN (899)
628	-CH ₃ (663)			
618		-N-H bükülme		-N-H bükülme

Kitosan, çapraz bağlandığında ve jelatinle bir karışım oluşturduğunda FTIR spektrumunda absorpsiyon bantları maskelenmekte, yer değiştirmekte veya piklerin şiddeti artmaktadır. Örneğin, kitosanın çapraz bağlanmasıyla saf kitosanda görülen bantlarda, -C=O grubuna ait pikin şiddeti azalmıştır. Kitosan ve jelatinde bulunan ortak -N-H titreşimi kitosan-jelatin yapıda daha şiddetli görülmektedir. 2924 cm⁻¹ ve 2874 cm⁻¹ de görülen saf kitosana ait pikler kitosan-jelatin karışımında jelatin tarafından maskelenmiş ve 1654 cm⁻¹'deki -C=O bandının pozisyonu yapıya jelatinin katılımıyla birlikte daha düşük bir absorpsiyon bandına gerileyerek 1637 cm⁻¹'de görülmüştür. Tüm bu değerlendirmeler, jelatinin yapıya katıldığını ve kitosanın çapraz bağlandığını kanıtlamaktadır.

4.1.2.6. Boşluk kesri analizi

Doku iskelelerinin boşluk kesri analizinde 3 paralel örnek ile çalışılmıştır. Analiz 37°C sabit sıcaklıkta PBS (pH=7.4) ile yapılmıştır. Eşitlik 3.2 kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda iskelelerinin boşluk kesri, 0.22±0.08 mL/g olarak bulunmuştur. Beşkardeş ve ark. [56]. tarafından aynı üretim yöntemiyle elde edilen kitosan SPH'lere ait boşluk kesrinin 0.96±0.25 mL/g değerinde olduğu belirtilmiştir.

4.1.2.7. Yoğunluk tayini

Doku iskelelerine ait yoğunluk tayini n-hekzan çözeltisi kullanılarak, 3 paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre kitosan-jelatin iskelenin yoğunluğu, 0.07 ± 0.00 g/mL olarak hesaplanmıştır. Grubumuzca daha önce yapılan çalışmada kitosan SPH'lerin yoğunluğu, 0.06 ± 0.00 olarak belirlenmiştir [56].

Çizelge 4.3.Kitosan-jelatin süpergözenekli hidrojenlerin temel özellikleri.

Denge şişme oranı (Q) ve Dengeye ulaşma süresi (s)	Ort. gözenek çapı (μm)	Elastik Modül (MPa)	Termal bozunmanın başlangıcı ($^{\circ}\text{C}$)	Yoğunluk (g/mL)	Boşluk kesri (mL/g)
42.4 $\pm$ 2.9;60 s	509 $\pm$ 101	0.01	296	0.07 $\pm$ 0.00	0.22 $\pm$ 0.08

4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

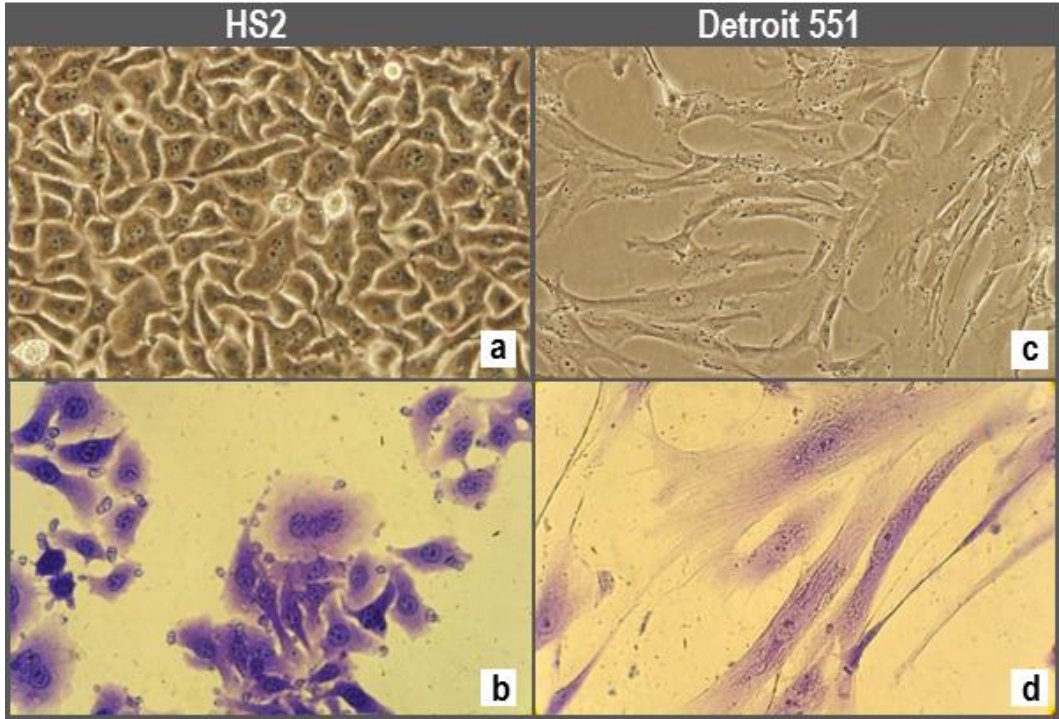
4.2.1. Çalışmada kullanılan hücreler ve özellikleri

Bu başlık altında hücre kültür çalışmaları için kullanılan Detroit 551, insan dermal fibroblast hücreleri ve HS2, insan keratinosit hücreleri için yapılan karakterizasyon çalışmalarına ait bilgilere yer verilmiştir. Hücre büyüme profilini gösteren hücre büyüme eğrileri Şekil 4.8'de verilmiştir. HS2 ve Detroit 551 hücrelerine ait özgül hücre büyüme hızı, μ ve popülasyon ikilenme zamanını, t_d gösteren veriler her iki hücre kültürü için Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

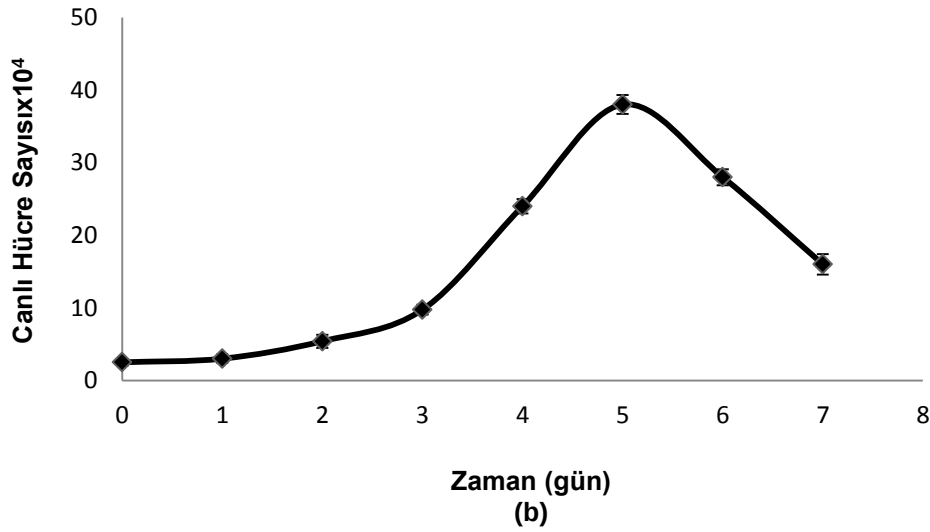
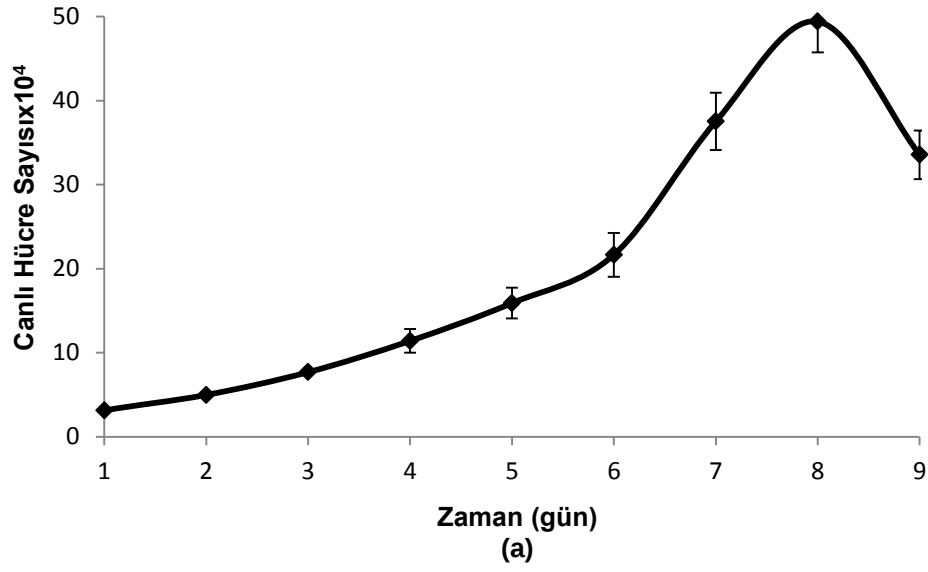
HS2 hücreleri, kendiliğinden transforme olmuş keratinosit hücre hattıdır ve karakterizasyonları yapılmış olarak Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. HS2 hücre hattı 40'lı yaşlarındaki bir kadının karın derisinden izole edilen keratinosit hücrelerinden oluşturulmuştur. Karakterizasyon çalışmaları dahilinde yapılan karyotip analizi ile hücrelerin, 74–76 kromozom sayısına sahip, anöploid hücreler olduğu belirlenmiştir. Hücre hattı keratin reaktivitesi yönünden araştırıldığında, Keratin 8 ile Keratin 14'ü eksprese ettikleri immünişaretleme yöntemiyle gösterilmiştir [97].

Detroit 551 hücreleri ise ATCC (American Type Culture Collection) isimli hücre bankasından alınmış olup, insan fetusundan izole edilen dermal fibroblast hücreleridir. ATCC tarafından Detroit 551 hücrelerinin yüzeye bağımlı ve diploid karakterde olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte Detroit 551 hücre hattının en fazla 25. pasaj seviyesine kadar devam ettirilebileceği belirlenmiş ve devamsız bir hücre hattı olduğu açıklanmıştır.

HS2 hücre hattının epiteloid morfolojisi Şekil 4.8.a ve b, insan derisinden izole edilmiş Detroit 551 hücre hattının içsi, fibroblastik morfolojisi ise Şekil 4.8. c ve d'deki faz kontrast, Giemsa (HS2) ve kristal viyole (Detroit 551) boyama fotoğraflarında gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HS2 hücrelerine ait faz kontrast (a) ve Giemsa boyama (b) fotoğrafları, 21. pasaj, 32X; Detroit 551 hücrelerine ait faz kontrast (c) ve kristal viyole boyama (d) fotoğrafları, 4. Pasaj, 20X, 32X.



Şekil 4.9.HS2 ve Detroit 551 hücrelerinin hemositometrik sayım yöntemi ile elde edilen büyüme eğrilerini gösteren grafiklerler. (a) HS2 hücrelerinin 24. pasajına ait büyüme eğrisi. (b) Detroit 551 hücrelerinin 6. pasajına ait büyüme eğrisi.

HS2 hücrelerine ait büyüme eğrisinde, hücrelerin 2 günlük adaptasyon fazından sonra 2. günün sonunda logaritmik fazdan geçtiği görülmektedir (Şekil 4.9.a). Daha sonra doğrusal büyüme fazına giren HS2 hücreleri, 7. günün sonunda plato fazına girmektedir. Belirgin bir plato fazı yaşamayan HS2 hücrelerinin 8. günle birlikte ölüm fazına girdiği görülmektedir. Şekil 4.9.a'daki büyüme eğrisi üzerinden

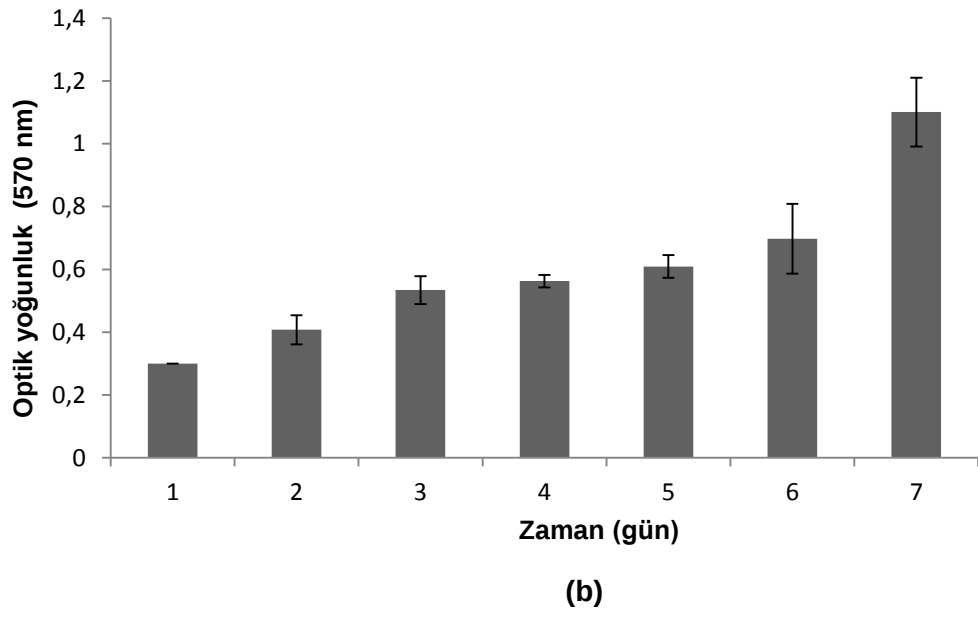
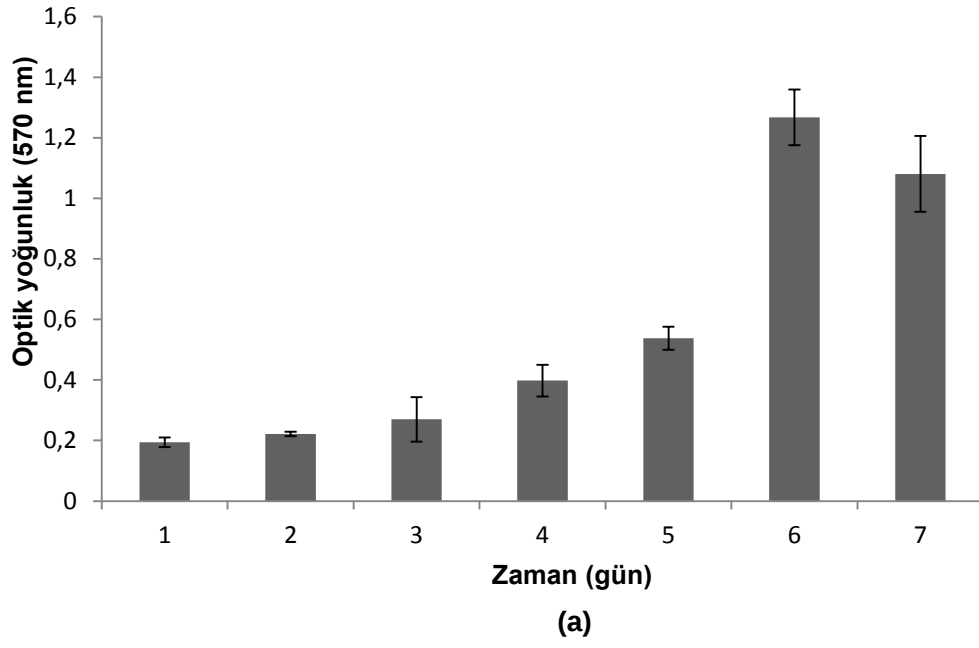
HS2 hücrelerinin özgül büyüme hızı, $0.87 \text{ (gün}^{-1}\text{)}$ olarak belirlenmiştir. Buna bağlı olarak popülasyon ikilenme hızı 18.9 sa olarak belirlenmiştir. Literatürde transforme olmuş keratinosit hücrelerine verilebilecek en bilinen örnek HaCaT hücre hattıdır. Zulfakar ve ark. [98] tarafından yapılan çalışmada HaCaT hücre hattının popülasyon ikilenme hızının 22.1 sa olduğu belirtilmiştir.

Detroit 551 hücrelerinin ise kültürde yaklaşık 20 sa'lık bir adaptasyon fazı yaşadığı, 2. günün sonuna gelindiğinde hücrelerin logaritmik büyüme fazına girdiği Şekil 4.8.b'de görülmektedir. Üçüncü ve 5. günler arasında lineer büyüme fazı görülmektedir. Beşinci günde hücreler, çok kısa bir plato fazının ardından ölüm fazına girmektedir. Detroit 551 hücrelerinin $0.59 \text{ (gün}^{-1}\text{)}$ özgül büyüme hızıyla çoğaldığı ve 28.1 sa gibi bir popülasyon ikilenme zamanına sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. HS2 ve Detroit 551 özgül hücre büyüme hızı ve popülasyon ikilenme zamanı.

Hücre	Özgül büyüme hızı, μ (gün^{-1})	Popülasyon ikilenme zamanı, td (sa)
HS2	0.87	18.9
Detroit 551	0.59	28.1

HS2 hücre kültürü (Şekil 4.10.a) ve Detroit 551 hücre kültürü (Şekil 4.10.b) için 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. günlerde MTT analizleri yapılarak kültür kabındaki hücre sayısı, canlılığı ve aktivitesine bağlı olarak takip edilmiştir. Şekil 4.9.a'daki MTT grafiğine göre HS2 hücreleri 7 günlük bir sürede büyüme döngüsünü tamamlamaktadır. Hücre kültüründe 5. günün sonunda hücre aktivitesinde hızlı bir artış görülerek 7. güne gelindiğinde aktivite düşmektedir. Detroit 551 hücre kültürü için Şekil 4.10'da gösterilen MTT analiz grafiğinde ise hücresel aktivitenin 7 gün boyunca sürekli bir artış gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.10. HS2 (a) ve Detroit 551 (b) hücrelerine ait MTT analiz sonuçları.

4.2.2. Kitosan-jelatin SPH'ler ile yürütülen hücre kültürü çalışmaları

4.2.2.1. MTT analizi

Bölüm 3.3.3'te açıklanan 4 farklı hücre kültür grubu üzerinden yürütülen hücre kültür sistemlerindeki 6 haftalık çalışma sürecinde tüm gruplar için 1., 3., 5., 7., 14., 21. ve 28. günlerde MTT analizi 3 paralel örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerleri Şekil 4.10'da karşılaştırılmıştır.

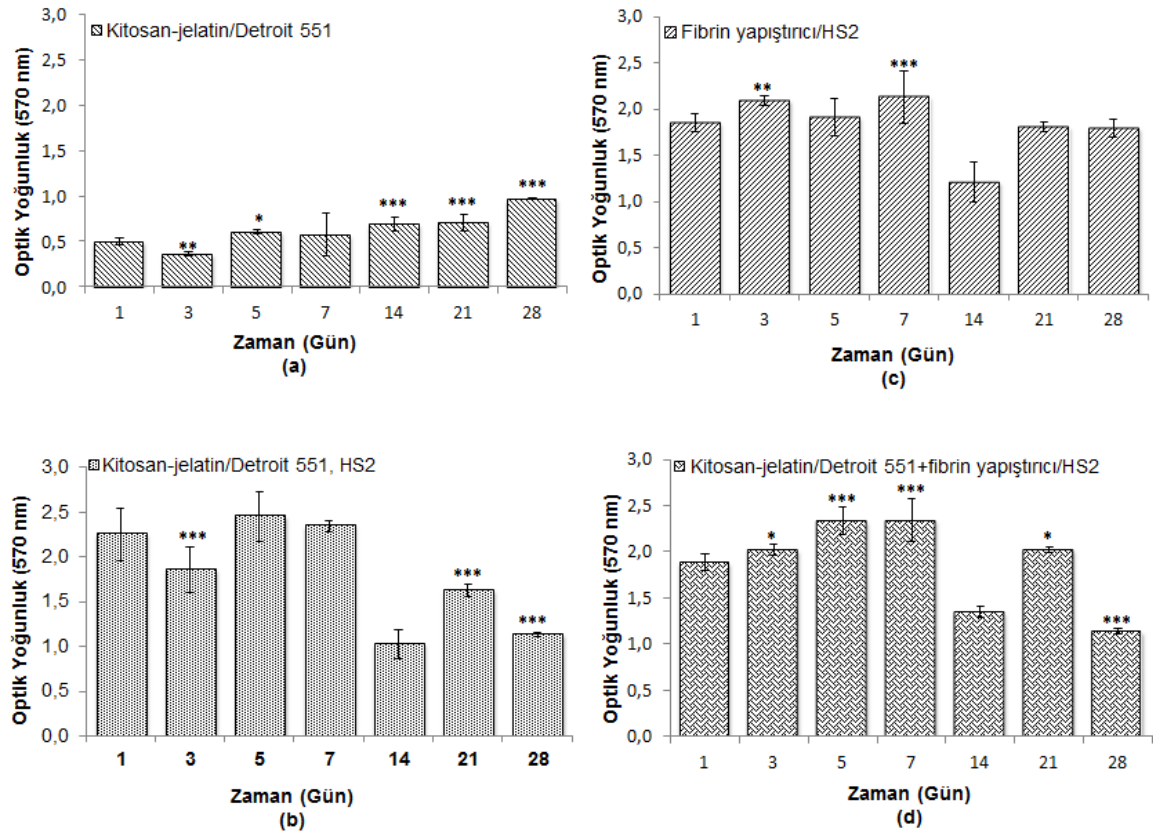
Birinci grupta kitosan-jelatin doku iskelelerine Detroit 551 hücreleri 1.3×10^5 hücre/iskele yoğunluğunda ekilmiş ve bu kültür 28 gün boyunca takip edilmiştir. Detroit 551, dermal fibroblast hücreleri ile kitosan-jelatin doku iskeleleri arasındaki biyouyumluluğun anlaşılmasını amaçlayan bu kültür sistemi yalnızca Detroit 551 hücreleri ile kurulduğu için optik yoğunluk değerleri diğer gruplara göre düşük bulunmuştur (Şekil 4.11.a). Hücre ekimi için kullanılan toplam hücre sayısı bu grupta diğerlerine göre daha azdır. Devam eden kültürde hücre aktivitesinde 3. günde bir azalma görülmesine rağmen hücre canlılığı korunmuş ve ilerleyen günlerde hücre aktivitesinde artış gözlenmiştir.

İkinci grup olarak değerlendirilen kitosan-jelatin doku iskeleleri üzerinde, Detroit 551 ve HS2 hücrelerinin bir arada çoğaltıldığı kültür grubunda hücre aktivitesi ve canlılığı 28 gün boyunca korunmuştur (Şekil 4.11.c).

Fibrin yapıştırıcı içerisinde örnek başına 1×10^6 sayıda HS2 hücresi ile başlatılan kültüre ait MTT analiz sonuçları incelendiğinde, fibrin jelin HS2 hücre canlılığını desteklediği söylenebilir (Şekil 4.11.b).

İki tabakalı deri modeli oluşturmayı amaçlayan kitosan-jelatin/Detroit 551+Fibrin yapıştırıcı/HS2 kültür sistemine ait MTT analiz sonuçları kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 kültürü ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.11.d).

İstatistiki değerlendirmeler yapıldığında bütün gruplar için 1. gün değerleri kontrol olarak alınıp kendi içerisinde karşılaştırılmış ve hücre canlılığının tüm kültür sistemlerinde korunduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.11. Hücre kültür gruplarına ait MTT analiz grafikleri. (a) Kitosan-jelatin/Detroit 551 hücre kültürü, (b) Kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü (c) Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü (d) Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu birinci gün iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

4.2.2.2. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Tez kapsamında sentezlenen kitosan-jelatin doku iskeleleri üzerinde kültive edilen Detroit 551 ve HS2 hücrelerinin ve fibrin yapıştırıcı içerisinde kültive edilen HS2 hücrelerinin hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-malzeme etkileşimlerinin anlaşılması açısından taramalı elektron mikroskopisi yönteminden yararlanılmıştır.

Kitosan-jelatin doku iskelelerinde kültive edilen Detroit 551 hücrelerine ait SEM görüntüleri 7., 14. ve 21. günlerde alınmış ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Yedinci güne ait görüntüler Detroit 551 hücrelerinin iskele yüzeyine tutunarak tipik fibroblastik morfolojilerini sergilediğini göstermektedir (Şekil 4.12.a ve b). On dördüncü gün örneklerinden alınan SEM görüntülerinde (Şekil 4.12.c ve d) ise dermal fibroblastların kendi ekstraselüler matrisini oluşturduğu görülmektedir. Yirmibirinci güne gelindiğinde ise hücre dışı matrisin oldukça yoğun olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.12.e ve f). Kollajen fiberlerin ilk haftadan itibaren daha yoğun olarak gözlenmesi dermal fibroblast hücrelerinin doku iskelesinin yerini alacak kendi hücre dışı matrisini oluşturduğunu göstermektedir.

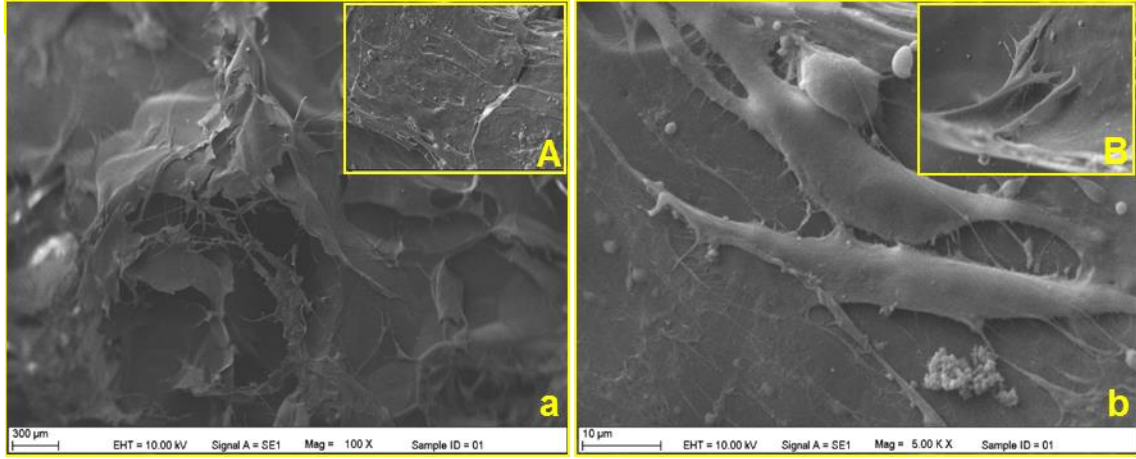
Kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde Detroit 551 ve HS2 hücreleri ile yapılan ko-kültürden alınan örneklerle ait SEM görüntüleri Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Buna göre HS2 ve Detroit 551 hücre morfolojisi belirgin bir biçimde birbirlerinden ayırdedilebilmektedir. Yedinci günden itibaren yüzeye yayılan HS2 hücreleri, ilk haftaki görüntülerde (Şekil 4.13.a ve b) daha küresel bir morfoloji gösterirken ko-kültürün 14. gününde karakteristik epiteloid morfolojilerini kazandıkları görülmektedir (Şekil 4.13.c ve d).

Hücretsiz fibrin yapıştırıcı ve HS2 hücrelerini içeren fibrin yapıştırıcı tabakasını gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.14'te verilmiştir. Hücretsiz fibrin yapıştırıcı örneklerin üzerinde görülen küresel çökeltilerin CaCl_2 kalıntıları olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.14.a ve d). HS2 hücrelerini içeren fibrin yapıştırıcı tabakalarının 7. gününde alınan örneklerde hücrelerin fibrin jel yüzeyinin hemen altında kabartı oluşturduğu görülürken (Şekil 4.14.b ve c) 14. güne ait SEM görüntülerinde keratinosit hücreleri fibrin yapıştırıcı tabakanın yüzeyinde belirlemektedir (Şekil 4.14.d ve e).

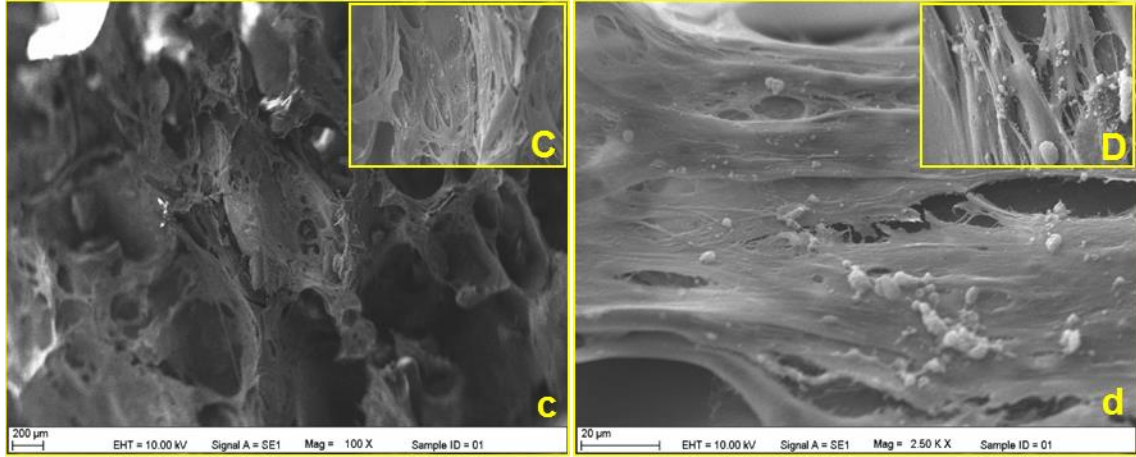
İki tabakalı deri eşleniği modelinin SEM görüntülerine Şekil 4.15'te yer verilmiştir. Şekil 4.15 A, a, B, b ile yan kesitleri alınan modelin her iki tabakasının da aynı

fotoğrafta incelenmesi mümkün olmuştur. Şekil 4.15.a'da kitosan-jelatin doku iskelesi üzerinde yer alan fibrin yapıştırıcı tabaka yaklaşık olarak 200 µm kalınlığı görülmüştür. Üst tabakayı oluşturan HS2 hücrelerinin kültive edildiği fibrin yapıştırıcı tabaka, alt tabakayı oluşturan kitosan-jelatin doku iskelesinin üzerini tamamen kaplamıştır (Şekil 4.15.a ve A). Şekil 4.15.d ve D'de keratinosit tabakanın 14. günde fibrin yapıştırıcının yüzeyine çıktığı görülmektedir. Şekil 4.15.a ve A'da fibrin yapıştırıcı tabakanın 200 µm kalınlıkta bir örtü olarak kitosan-jelatin doku iskelesinin üst yüzeyini kapladığı belirlenmiştir. Fibrin yapıştırıcının doku iskelesinin gözeneklerine nüfuz etmesi istenmemektedir. Ancak Şekil 4.15.a'da bir miktar fibrin jelin iskele gözeneklerine sızmasının engellenemediği görülmektedir. Bu da histolojik çalışma sonuçlarında kitosan-jelatin doku iskelesi kesitlerinin neden fibrin yapıştırıcı ile bir yığın halinde görüldüğünü açıklamaktadır.

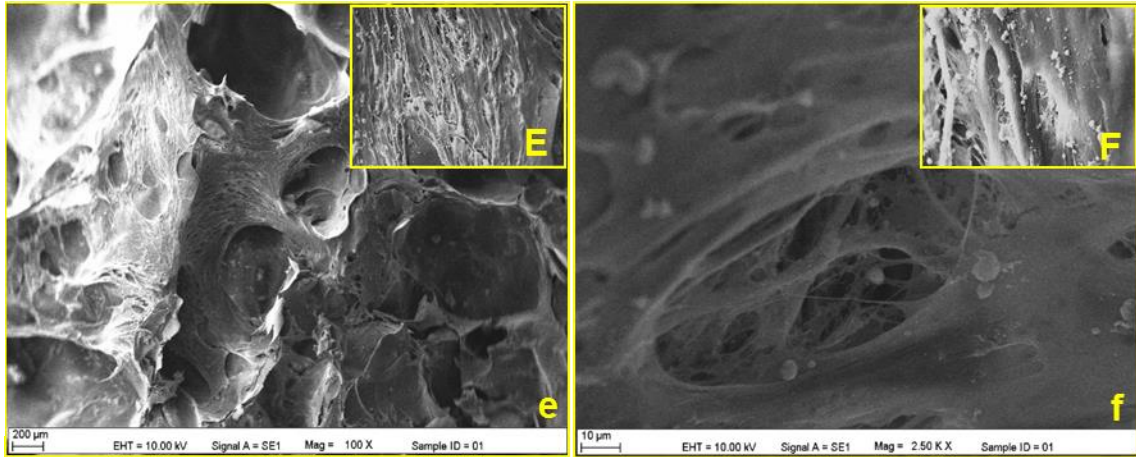
7.gün



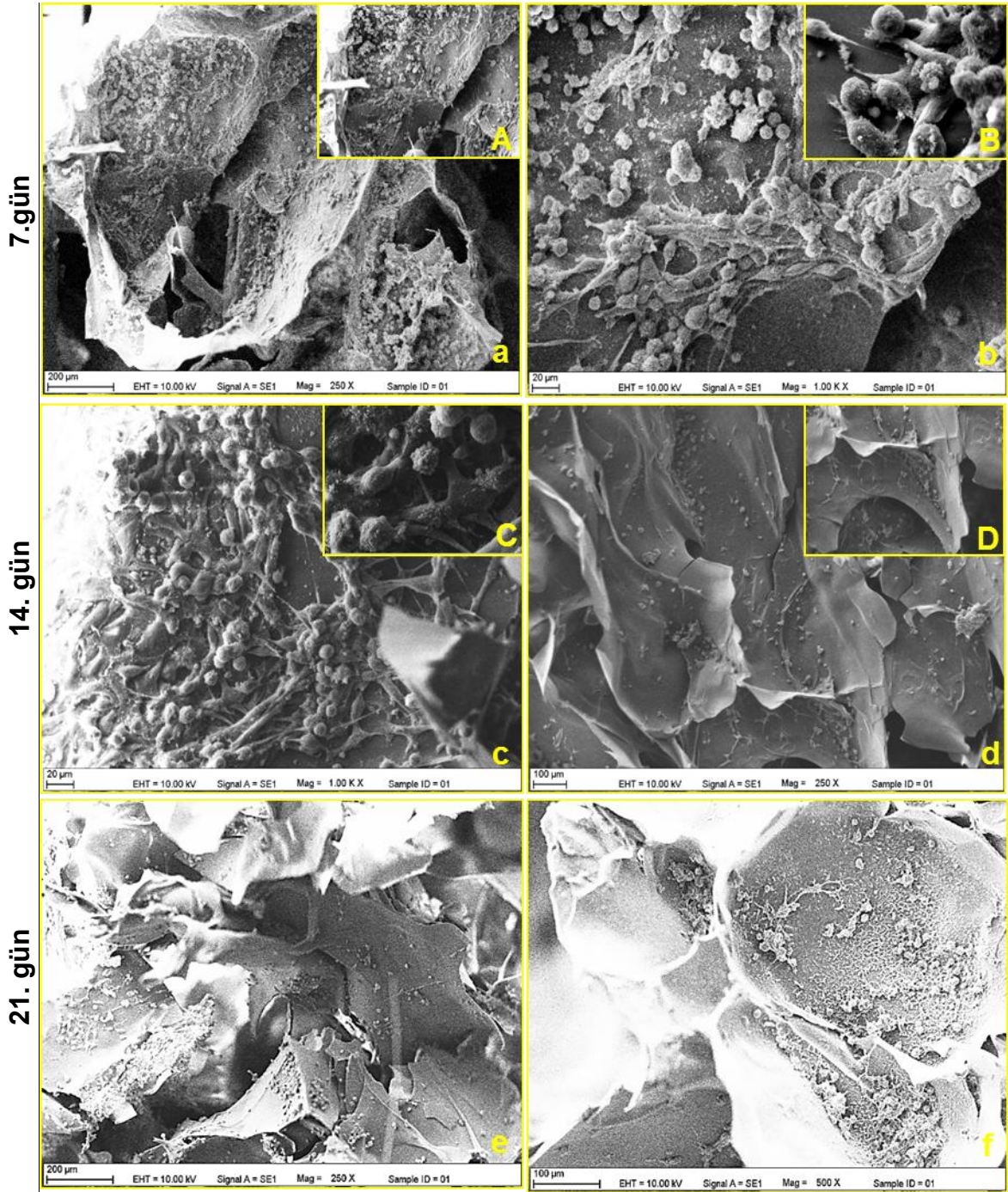
14. gün



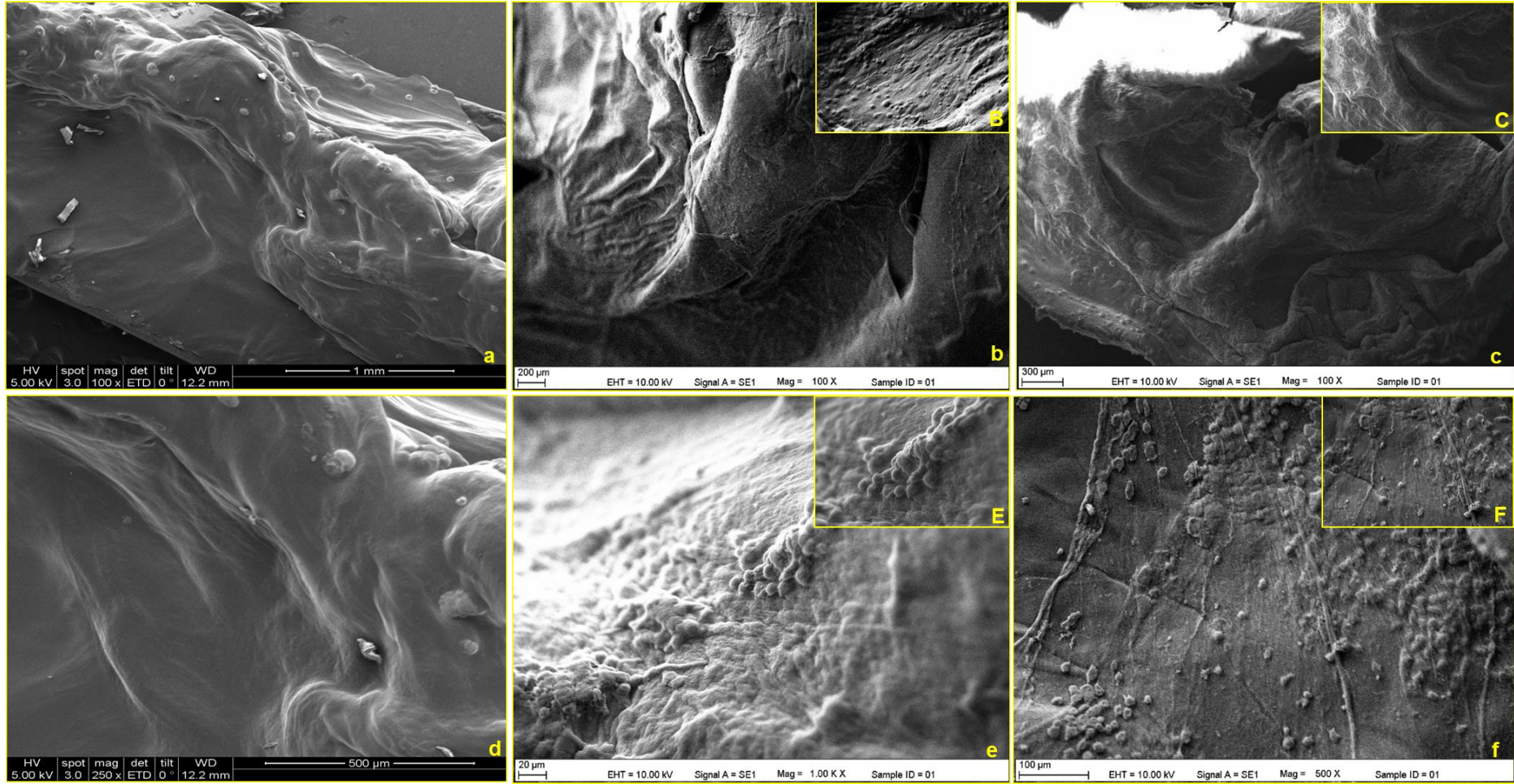
21. gün



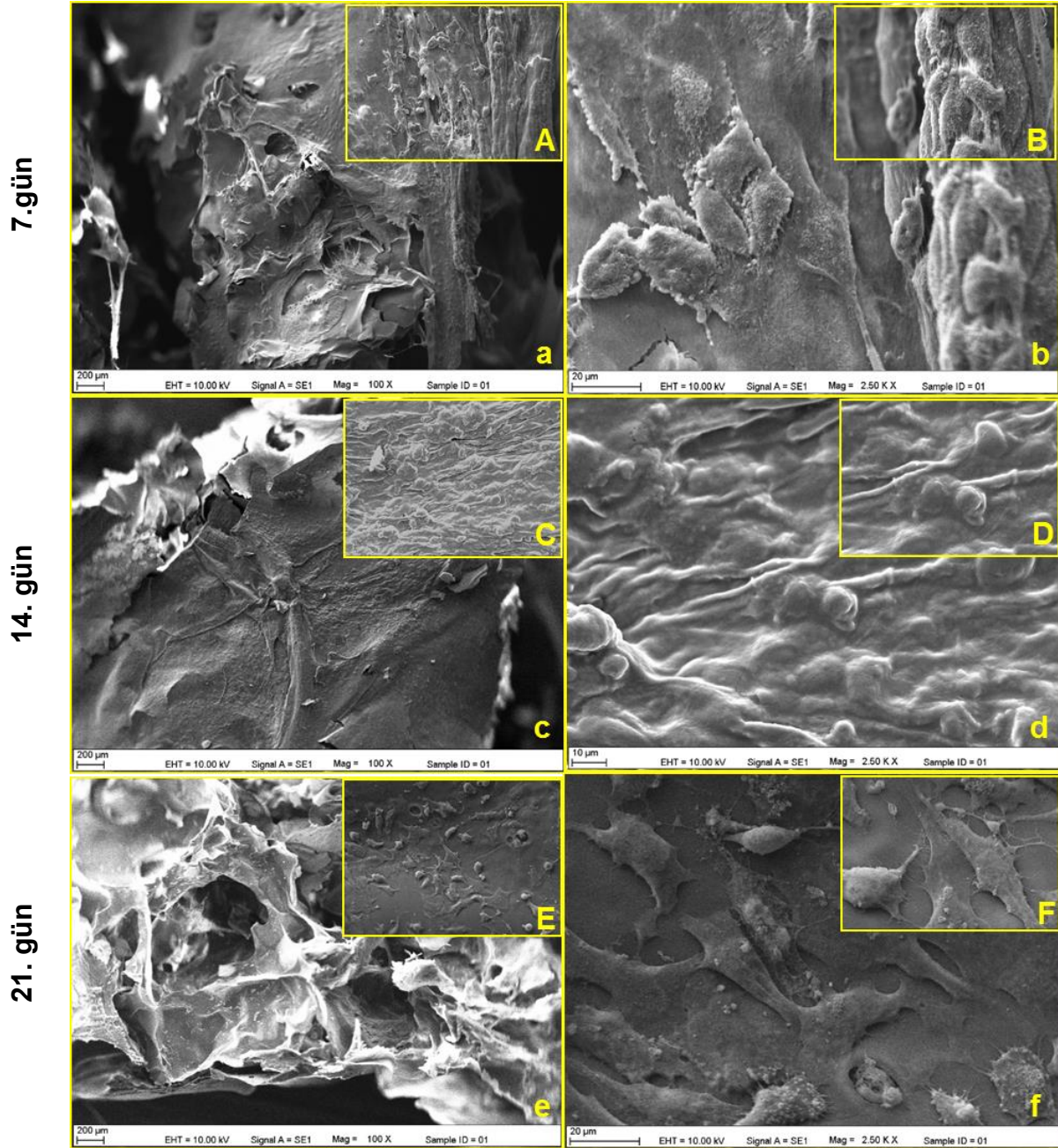
Şekil 4.12. Kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde kültüre edilen Detroit 551 hücrelerini gösteren SEM fotoğrafları.(7. gün) (a)100x, (A)1000X, (b)5000X, (B)2500X; (14. gün) (c)100X, (C)1000X, (d)2500X, (D)5000X; (21. gün) (e)100X, (E)1000X, (f)250X, (F)5000X.



Şekil 4.13. Kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde HS2 ve Detroit 551 hücrelerinin ko-kültivasyonuna ait SEM fotoğrafları. (7. gün) (a)250X, (A)500X (b)1000X, (B)5000X; (14. gün) (c)1000X, (C)5000X, (d)250X, (D)500X; (21.gün) (e)250X, (f)500X.



Şekil 4.14. Hüresiz fibrin yapıştırıcı ve fibrin yapıştırıcı içerisinde kültüre edilen HS2 hücre kültürünü gösteren SEM fotoğrafları. (Hüresiz fibrin yapıştırıcı) (a)100X, (d)250X; (7.gün) (b)100X, (B)250X, (c)100X (C)250X; (14. gün) (e)1000X, (E)2500X, (f)500X, (F)1000X.

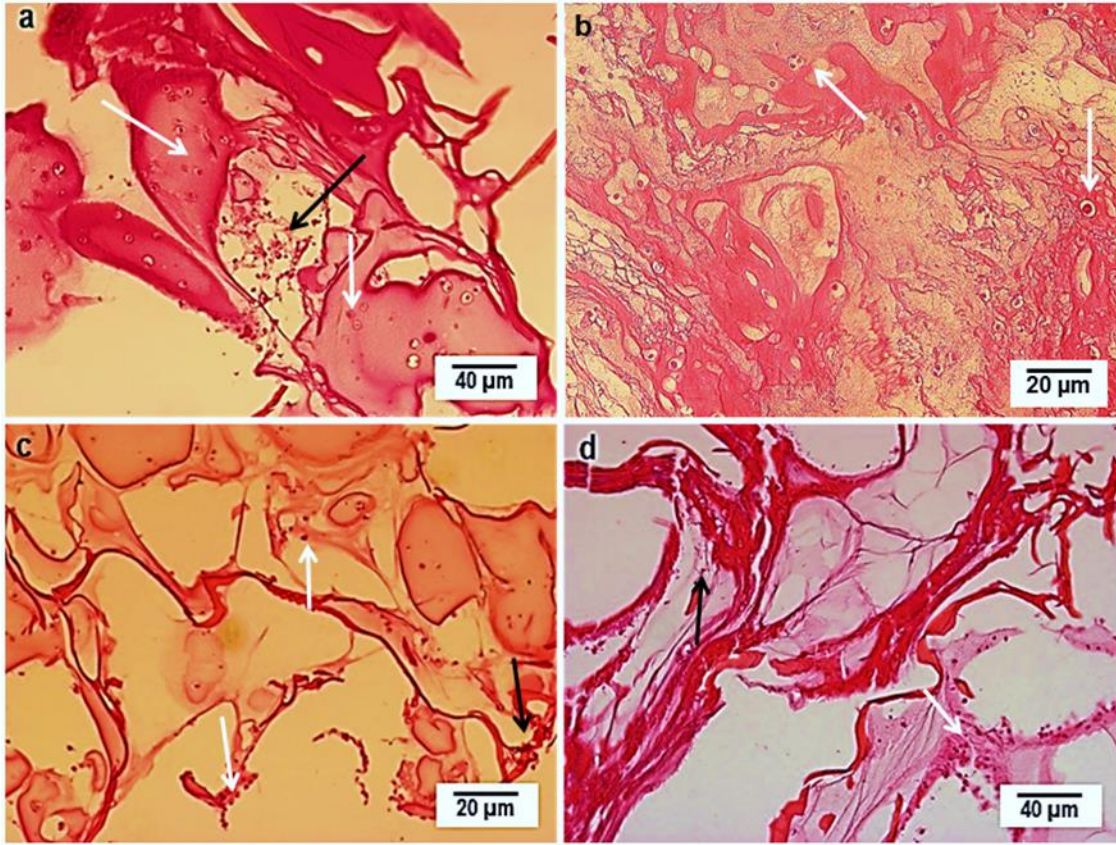


Şekil 4.15. Kitosan-jelatin/Detroit 551 + fibrin yapıştırıcı/HS2 SEM fotoğrafları. (7.gün, yan kesit) (a) (yan kesit)100X, (A)1000X, (b)2500X, (B)5000X; (14.gün) (c)100X, (C)1000X, (d)2500X, (D)5000X; (21.gün) (e, yan kesit)100X, (E)1000X, (f)2500X, (F)5000.

4.2.2.3. Histolojik boyama

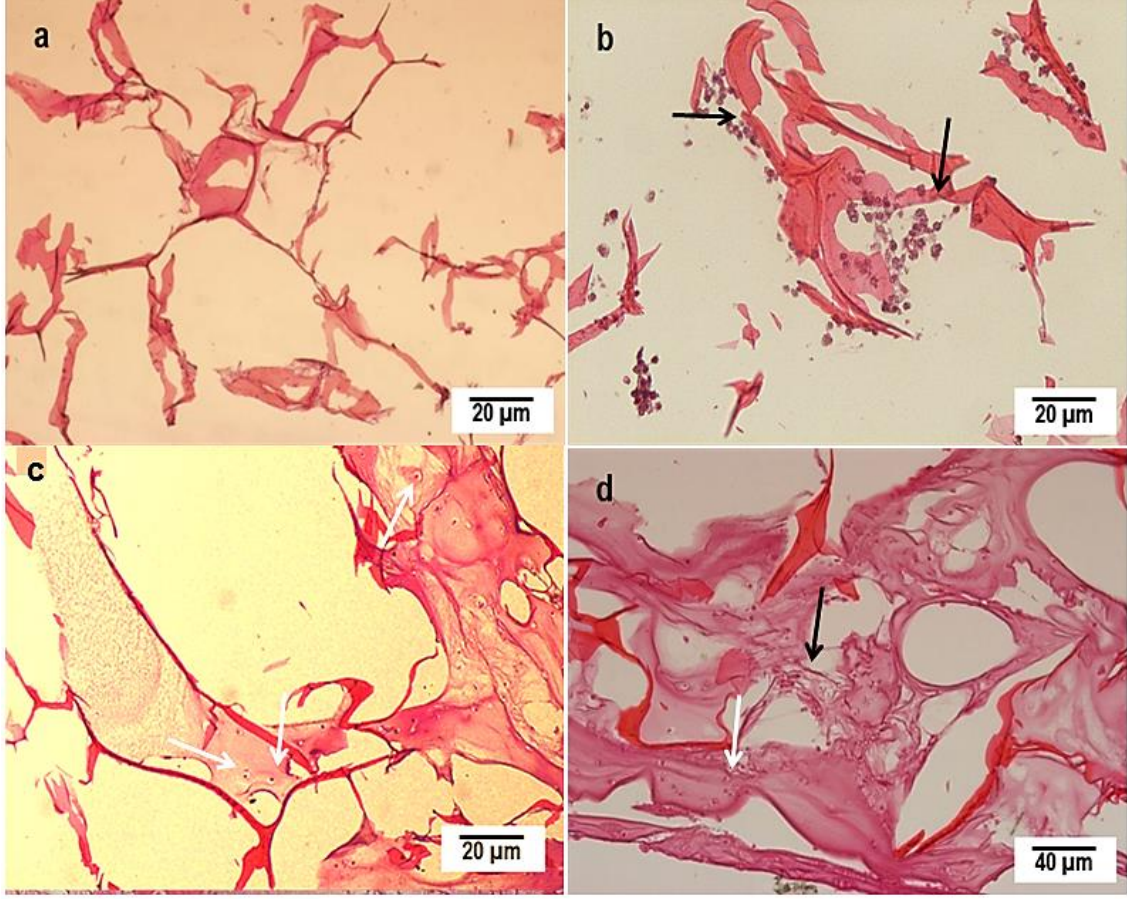
Histolojik boyama denemeleri için kitosan-jelatin doku iskelesi ve fibrin yapıştırıcı sisteminde parafin gömme metodu uygulanmış ve doku iskelesinin parçalanmasını önlemek için en uygun olduğu belirlenen 10 µm kalınlığındaki kesitler mikrotom ile elde edilmiştir. H&E boyama, iskelelerdeki hücre yoğunluğunun belirlenmesi için uygulanmıştır. Hematoksilen yüksek pH değerlerinde olan çekirdeği boyayarak koyu pembe-mor renk verirken eozin düşük pH değerlerinde olan sitoplazmik proteinleri boyamakta ve açık pembe bir renk vermektedir.

Şekil 4.16'da 4 farklı kültür grubundan 21. günde alınan örneklerle ait histolojik kesitlerdeki H&E boyamaları görülmektedir. Şekil 4.16.b'deki fotoğrafta fibrin jel içerisinde bulunan HS2 hücreleri beyaz oklarla gösterilmiştir. Bunun yanında fibrin jel yapısının 21. günde tamamen bozunmadığı ve HS2 hücrelerinin hala jel içerisinde bulunduğu görülmektedir. Kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültür sistemini gösteren Şekil 4.16.c'de fibroblast ve keratinosit hücrelerinin histolojik kesitlerde keratinosit hücreleri fibrin jel içerisinde, fibroblastlar ise doku iskelesi içerisinde görülmektedir. Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sisteminde, Şekil 4.16.d'de 21. günde fibroblast hücrelerinin hücre dışı matrislerini oluşturdukları fotoğraf üzerinde oklarla gösterilmiştir. İncelenen kesitlerde, asidik özellik gösteren kitosan-jelatin doku iskelesinin de eozin ile boyanarak pembe renk aldığı görülmektedir. Benzer sonuçlar Mao ve ark [76] tarafından kitosan-jelatin doku iskelesi ile oluşturulan deri eşleniği modelinde de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Hücre kültür gruplarına ait 21. gün H&E boyama görüntüleri. (a)Kitosan-jelatin/Detroit 551 hücre kültürü, (b)Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü (c)Kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü (d)Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 ko-kültürü (siyah oklar Detroit 551, beyaz oklar HS2 hücrelerini işaret etmektedir).

İki tabakalı kitosan-jelatin/Detroit 551 ve fibrin yapıştırıcı/HS2 ko-kültüründen 7., 14., 21. ve 28. günlerde alınan histolojik kesitlerin H&E boyamalarını gösteren fotoğraflar Şekil 4.17'de verilmiştir. Fibroblast hücreleri ve keratinositler şekilde oklarla işaretlenmiştir. Fibroblast hücrelerinin 14. günde hücre dışı matrislerini oluşturdukları görülmektedir. Ronfard ve ark. [99] fibrin matris içerisinde keratinosit göçünü takip ettikleri çalışmada gösterildiği gibi keratinosit hücreleri, Şekil 4.17.c'de oklarla gösterildiği üzere tüneller içerisinde canlılıklarını devam ettirmektedirler.



Şekil 4.17.Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemine ait. (a)7. (b)14. (c)21. ve (d)28. gün H&E boyama görüntüleri (siyah oklar Detroit 551, beyaz oklar HS2 hücrelerini işaret etmektedir).

4.2.2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Kitosan-jelatin ve/veya fibrin jel ile oluşturulan kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde alınan örneklerle ait RT qPCR sonuçları Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'daki grafiklerde vermiştir. Seçilen günlerde alınan örneklerden izole edilen toplam RNA miktarları NanoDrop Thermoscientific cihazı ile ölçülmüş ve sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

NanoDrop ölçümlerinden elde edilen RNA miktarları ve RNA'nın ne kadar saf izole edildiğini gösteren bir değer olan 260/280 oranları incelendiğinde, tüm örneklerden RT qPCR analizleri için oldukça yüksek saflıkta (260/280~1.8) RNA elde edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. RT qPCR örnekleri RNA miktarları (NanoDrop Thermoscientific).

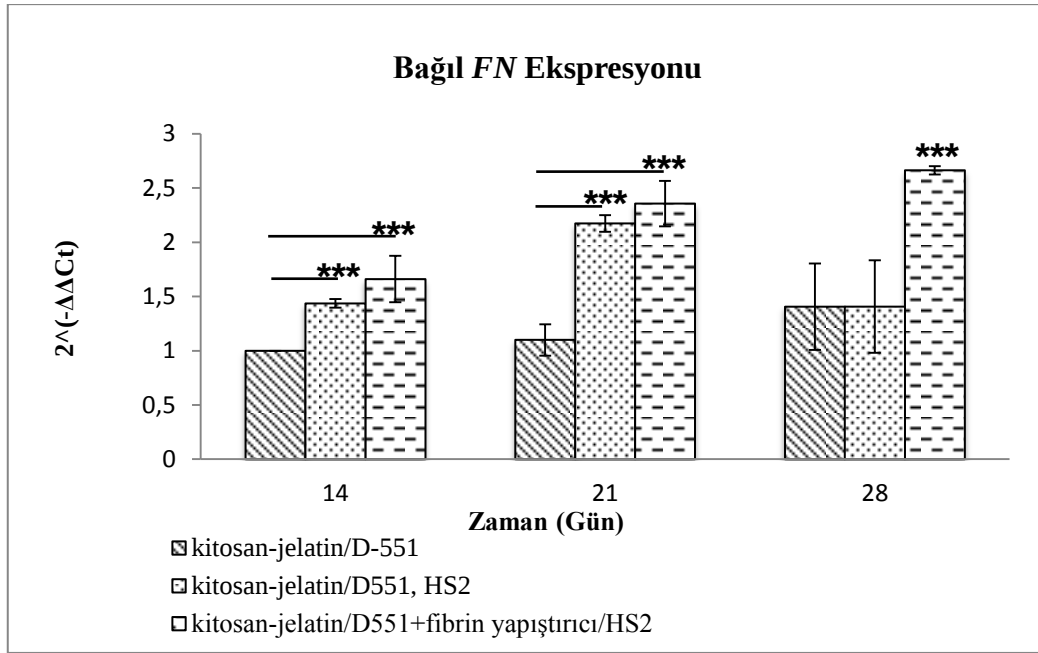
Gün	Kültür Sistemi	RNA Miktarı (ng/μL)	260/280
14	Kitosan-jelatin/Detroit 551	63.0±11.8	1.84±0.03
	Kitosan-jelatin/Detroit 551+HS2	36.0±12.7	1.79±0.05
	Fibrin yapıştırıcı/HS2	46.4±21.0	1.73±0.10
	Kitosan-jelatin/Detroit 551fibrin yapıştırıcı/HS2	43.4±9.1	1.79±0.09
21	Kitosan-jelatin/Detroit 551	34.3±12.6	1.70±0.03
	Kitosan-jelatin/Detroit 551+HS2	30.5±20.1	1.74±0.17
	Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2	26.4±0.1	1.74±0.01
28	Kitosan-jelatin/Detroit 551	61.7±25.3	1.86±0.10
	Kitosan-jelatin/Detroit 551+HS2	27.1±4.8	1.81±0.06
	Kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2	22.9±1.8	1.68±0.04

Detroit 551 hücrelerinde incelenen bağıl fibronektin geni (*FN*) ve kollajenTipli geni (*COL1*) ekspresyonları, kitosan-jelatin süpergözenekli doku iskelelerinde kültüre edilen Detroit 551 hücrelerinin 14. gündeki *FN* ve *COL1* ekspresyonları 1 kabul edilerek kat olarak verilmiştir. HS2 hücrelerinin olduğu kültür sistemlerinde incelenen bağıl lorikrin geni (*LOR*) ve keratin14 geni (*KRT14*) ekspresyonları ise

fibrin yapıştırıcı jel içerisinde kültive edilen HS2 hücrelerinin 14. gündeki *LOR* ve *KRT14* ekspresyonları 1 kabul edilerek kat olarak değerlendirilmiştir.

Fibronektin, önemli bir hücre dışı matris proteinidir ve fibroblast hücre yüzeyinde bulunan spesifik bölgelerle etkileşim halindedir. Fibronektinin hücre tutunmasını ve yayılmasını *in vivo* ve *in vitro* olarak arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [100, 101]. Hücresel morfoloji, hücre iskeletinin düzenlenmesi, fagositoz, homeostaz, embriyonik farklılaşma ve yara iyileşmesinde rol aldığı bilinmektedir [102]. Bazal membranda ve bağ doku stromasında bulunan fibronektin proteininin, sunulan çalışmada Detroit 551 hücreleri tarafından sentezlemesi hücre dışı matris oluşumunu göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Detroit 551 hücreleri tarafından sentezlenmesi beklenen diğer bir hücre dışı matris proteini olan kollajen Tip I, derminin temel yapısını oluşturmaktadır [103]. Sunulan  alışmada Detroit 551 hücrelerinin kitosan-jelatin doku iskelesi içerisinde gösterdiği aktivasyonu izlemek üzere *COL1* gen ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile analiz edilmiştir.

Terminal farklılaşma evresindeki keratinosit hücreleri tarafından eksprese edilen *LOR*, plazma membran proteinidir [104]. Derinin epidermal bütünlüğünü ve bariyer fonksiyonunu sağlayan kornifiye zarfın çapraz bağlanması rol almaktadır [105]. Oluşturulan deri modelinde fibrin jel içerisinde kültive edilen HS2 hücrelerinde geç dönem farklılaşmanın göstergesi olarak *LOR* ekspresyonu incelenmiştir. Bazal keratinositler tarafından eksprese edilen *KRT14* geni ise epidermal hücre-hücre etkileşimlerinin değerlendirilmesi amacıyla incelenmiştir [106].



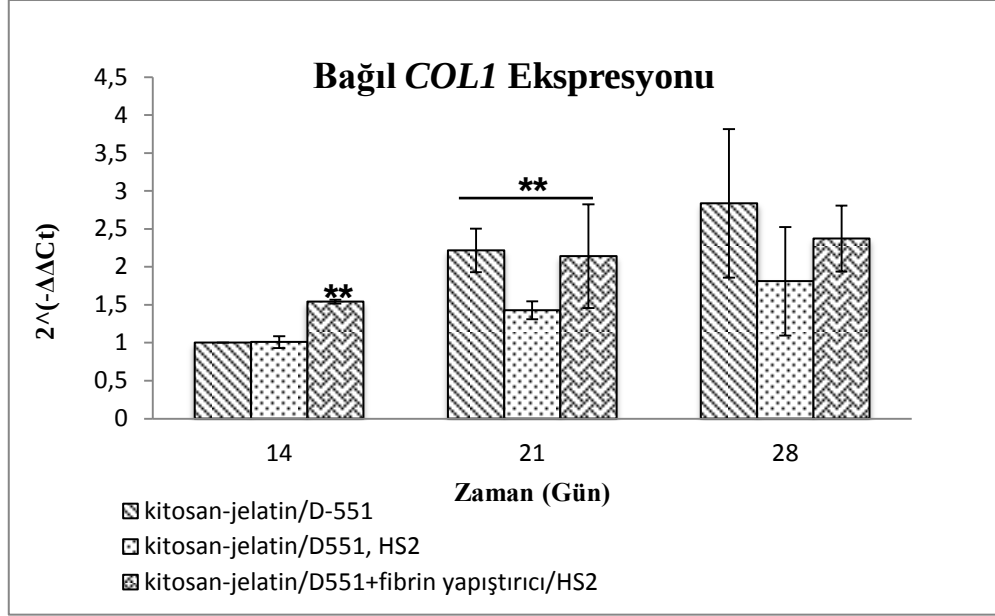
Şekil 4.18. Kitosan-jelatin/Detroit 551 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcısı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl FN ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

FN ve *COL1* ekspresyonu Detroit 551 hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle yapılan analizlerde HS2 hücrelerinin fibrin yapıştırıcısı ile kültive edildiği sistemde fibroblast hücresi bulunmadığından bu gruptaki *FN* ve *COL1* ekspresyonu araştırılmamıştır.

HS2 hücreleri ile yapılan ko-kültür sisteminde Detroit 551 hücrelerinin *FN* ve *COL1* gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi amacıyla Detroit 551 hücrelerinin kitosan-jelatin iskelede kültive edildiği grup kontrol grubu olarak seçilmiştir.

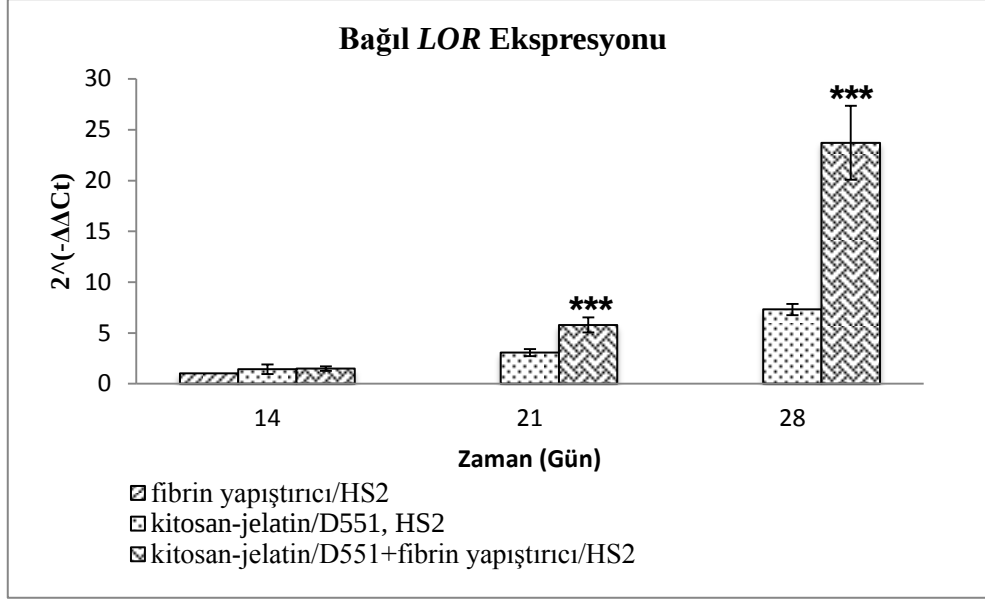
Fibroblast hücrelerinin deri doku rejenerasyonu sırasında geçici bir yara matrisi sentezledikleri ve hücre dışı matris, kollajen Tip I ve Tip III ile organize bir yapı oluşturmadan önce deri dokusunda fibronektin ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir [107]. Yapılan analizlerde, Detroit 551 hücrelerinin HS2 hücreleri ile kitosan-jelatin doku iskelesindeki ko-kültürlerinde veya doku iskelesi ve fibrin jel içerisinde farklı tabakalarda kültive edildiklerinde *FN* ekspresyonunun 14. ve 21. günlerde arttığı gösterilmiştir (p>0.001). 28. güne gelindiğinde ise, yalnızca kitosan-jelatin/Detroit 551 + fibrin yapıştırıcısı/HS2 hücre kültür sisteminde *FN*

ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18). Bu durum, Detroit 551 hücrelerinin HS2 hücreleri ile, hücreler jel içerisinde olsa da etkileşimde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19.Kitosan-jelatin/Detroit 551hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağli COL1 gen ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi(İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Şekil 4.19'da üç kültür sisteminde de 14., 21. ve 28. günlerde COL1 ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Buna dayanarak dermal fibroblastların kollajen Tip I sentezleyerek fibröz bir hücre dışı matris oluşturduğu düşünülmektedir. İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde, COL1 ekspresyonunun 14. günde kitosan-jelatin/Detroit 551 + fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sisteminde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p>0.01).



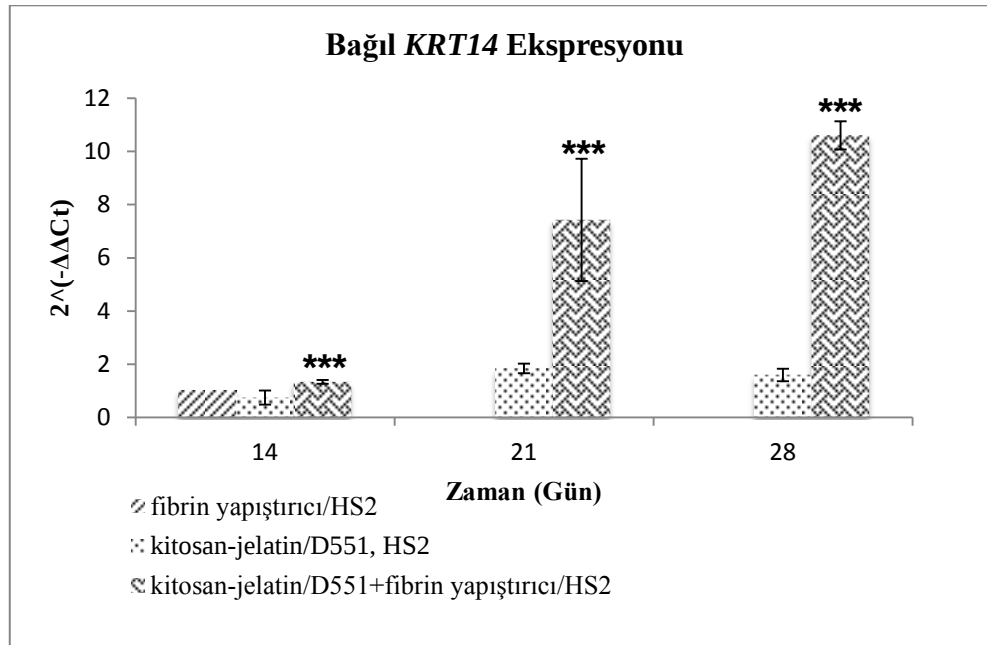
Şekil 4.20. Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl LOR ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

LOR ve *KRT14* gen ekspresyonu HS2 hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle yapılan analizlerde Detroit 551 hücrelerinin kitosan-jelatin doku iskelesinde kültive edildiği grupta inceleme yapılmamıştır.

Detroit 551 hücreleri ile yapılan ko-kültivasyonu Detroit 551 hücrelerinin *LOR* ve *KRT14* gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi için HS2 hücrelerinin fibrin yapıştırıcı içerisinde kültive edildiği grup kontrol grubu olarak seçilmiştir. Hücre kültür sistemlerindeki 14., 21. ve 28. günlerde *LOR* ve *KRT14* ekspresyonları sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

LOR, kornifiye zarf öncülü bir geç dönem farklılaşma proteindir. *LOR* ekspresyonunun artması keratinositlerin farklılaşma yönünde uyarıldığını göstermektedir [108]. RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, *LOR* ekspresyonunun 21. ve 28. günlerde belirgin olarak kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 deri eşleniği sisteminde diğer kültür sistemlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Keratinositler yalnızca fibrin yapıştırıcı tabaka içerisinde kültive edildiğinde ise, 14. gün dışında *LOR* ifadesi görülmemiştir. Kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 kültür sisteminde de zamanla artan bir *LOR*

ekspresyonu gerçekleşmektedir (Şekil 4.20). Kültür sistemleri kurulurken aynı sayıda keratinosit hücresi ile kültürasyonun başlatıldığı göz önünde bulundurulursa burada fibroblast hücrelerinin etkisinin olmaması *LOR* ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılığı açıklamaktadır. Fibrin jelin keratinositlerin doku iskelesine doğru göçetmesine izin vermemesi ve epidermal eşleniği sadece keratinosit-keratinosit etkileşimiyle sınırlı tutmasının *LOR* ekspresyonundaki artışın neden diğer gruptakinden daha fazla olduğunu açıklamaktadır. Yalnızca fibrin yapıştırıcıdaki HS2 monokültüründe *LOR* ekspresyonunun kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 kokültüründen düşük olması sistemde dermal fibroblast hücrelerinin varlığı ile indüklenen HS2 aktivasyonunu göstermektedir.



Şekil 4.21. Fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültürü, kitosan-jelatin/Detroit 551, HS2 ko-kültürü ve kitosan-jelatin/Detroit 551+fibrin yapıştırıcı/HS2 hücre kültür sistemlerinde 14., 21. ve 28. günlerde bağıl KRT14 ekspresyonunun RT qPCR ile incelenmesi (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

KRT14, daha çok katmanlaşmış skuamöz epitelyumun bazal tabakasında farklılaşmamış keratinositler tarafından eksprese olmakta hücre farklılaşması sırasında ise down-regülasyona uğramaktadır [35, 41, 109].

Erken dönem farklılaşma evresinde eksprese edilen *KRT14* geni ile geç dönem farklılaşma evresinde eksprese edilen *LOR* geninin hücre kültür sistemlerinde aynı

anda ekspresyonunun görölmesi tüm hücrelerin aynı farklılaşma evresinde olmadıklarını düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasında literatüre ek olarak fibroblast ve keratinosit hücrelerini içeren iki tabakalı deri eşleniği modeli önerilmiştir. Kitosan-jelatin SPH'lerin Detroit 551 hücrelerini, fibrin yapıştırıcının ise HS2 hücrelerinin canlılığını ve çoğalmasını desteklediği MTT analizi, SEM görüntüleri, RT-PCR sonuçları ve histolojik kesitlerde yapılan H&E boyamalar ile gösterilmiştir. Kültür süresince Detroit 551 hücrelerinin kendi hücre dışı matrislerini oluşturdukları da yine SEM fotoğraflarında görölmektedir.

İki tabakalı deri modeli oluşturulmak üzere gerçekleştirilen çalışmada doku iskelesinde kültive edilen Detroit 551 hücreleri ile fibrin jel içerisindeki HS2 hücrelerinin 28 günlük kültür sürecinde bir etkileşimde bulunacağı öngörölmüş, fakat fibrin jelin yeterince bozunmaması keratinosit hücrelerinin fibroblast hücreleri ile etkileşimde bulunamamalarına neden olmuştur. Sonuçlar, 4 haftalık sürenin bazal membranın oluşumu için yeterli olmadığını göstermiştir.

Detroit 551 ve HS2 hücreleri aynı kültür ortamında ayrı tabakalarda kültive edildiklerinde hücrelere spesifik gen ekspresyonları hücrelerin bir arada kültive edildiği kültür sistemine göre anlamlı bir şekilde fazladır. Bu durum, iki tabakalı modelin hem fibroblast hem de keratinosit hücre aktivitelerini olumlu yönde desteklediğini göstermektedir.

Önerilen iki tabakalı deri eşleniği modeli geliştirilerek in vitro toksikoloji, kütanöz fizyoloji incelemeleri ve *in vivo* yara iyileşmesinin anlaşılması amacıyla kullanılması mümkündür.

KAYNAKLAR

- [1] Falanga, V., Faria, K., Bollenbach, T. Chapter 77 - Bioengineered Skin Constructs. Principles of Tissue Engineering Fourth Edition (eds: Lanza R, Vacanti J.), Boston: *Academic Press*; 1619-43, **2014**.
- [2] Brohem, C.A., da Silva Cardeal, L.B., Tiago, M., Soengas, M.S., de Moraes Barros, S.B., Maria-Engler, S.S., Artificial skin in perspective: concepts and applications, *Pigment cell & melanoma research*, 24, 35-50, **2011**.
- [3] Wong, D.J., Chang, H.Y., Skin tissue engineering, *Harvard Stem Cell Institute*, **2009**.
- [4] Zeng, Q., Macri, L.K., Prasad, A., Clark, R.A.F., Zeugolis, D.I., Hanley, C., et al. 5.534 - Skin Tissue Engineering. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier; 467-99. **2011**.
- [5] Yildirimer, L., Thanh, N.T., Seifalian, A.M., Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach, *Trends in biotechnology*, 30, 638-648 **2012**.
- [6] MacNeil, S., Biomaterials for tissue engineering of skin, *Materials Today*, 11, 26-35, **2008**.
- [7] Kamel, R.A., Ong, J.F., Eriksson, E., Junker, J.P.E., Caterson, E.J., Tissue Engineering of Skin, *Journal of the American College of Surgeons*, 217, 533-55, **2013**.
- [8] Moroni, L., Elisseeff, J.H., Biomaterials engineered for integration, *Materials Today*, 11, 44-51, **2008**.
- [9] Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., Schenke-Layland, K., Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 352-66, **2011**.
- [10] Límová, M., Active Wound Coverings: Bioengineered skin and dermal substitutes, *Surgical Clinics of North America*, 90, 1237-55, **2010**.
- [11] Mansbridge, J. Chapter 81 - *Tissue-Engineered Skin Products*. Principles of Tissue Engineering Fifth Edition (eds: Lanza R, Langer R, Vacanti J.) Boston: Academic Press; 1697-715. **2014**.
- [12] Tobin, D.J., Biochemistry of human skin—our brain on the outside, *Chemical Society Reviews*, 35, 52-67, **2006**.
- [13] Shevchenko, R.V., James, S.L., James, S.E., A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *Journal of the Royal Society Interface*, 7, 229-58, **2010**.
- [14] MacNeil, S., Progress and opportunities for tissue-engineered skin, *Nature*, 445, 874-80, **2007**.
- [15] Schulz Iii, J., Tompkins, R., Burke, J., Artificial skin, *Annual review of medicine*, 51, 231-44, **2000**.
- [16] BURN, M.C.I.L.F., SHEEP, W.I., Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes, *Burns*, 27, 523-33, **2001**.

- [17] Orgill, D., Blanco, D.C. Biomaterials for treating skin loss: CRC; **2009**.
- [18] Fuchs, E., Keratins and the skin, *Annual review of cell and developmental biology*, 11, 123-54, **1995**.
- [19] Harris, A. Epithelial Cell Culture: Cambridge University Press; 1996.
- [20] Supp, D.M., Boyce, S.T., Engineered skin substitutes: practices and potentials, *Clinics in Dermatology*, 23, 403-12, **2005**.
- [21] Metcalfe, A.D., Ferguson, M.W., Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair, *Biomaterials*, 28, 5100-13, **2007**.
- [22] Singer, A.J., Clark, R., Cutaneous wound healing, *N Engl J Med*, 341, 738-46, **1999**.
- [23] Enoch, S., Leaper, D.J., Basic science of wound healing, *Surgery (Oxford)*, 23, 37-42, **2005**.
- [24] Ehrenreich, M., Ruszczak, Z., Update on tissue-engineered biological dressings, *Tissue engineering*, 12, 2407-24, **2006**.
- [25] Clark, R.A., Ghosh, K., Tonnesen, M.G., Tissue engineering for cutaneous wounds, *J Invest Dermatol*, 127, 1018-29, **2007**.
- [26] Le, A.D., Brown, J.J. Chapter 2 - Wound Healing: Repair biology and wound and scar treatment. Current therapy in oral and maxillofacial surgery. (eds:Saint Louis: W.B. Saunders),. p. 6-10. **2012**.
- [27] Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., Wound repair and regeneration, *Nature*, 453, 314-21, **2008**.
- [28] Theoret, C., Tissue engineering in wound repair: the three “R” s—repair, replace, regenerate, *Veterinary Surgery*, 38, 905-13, **2009**.
- [29] Papini, R., ABC of burns: Management of burn injuries of various depths, *BMJ: British Medical Journal*, 329, 158, **2004**.
- [30] Pham, C., Greenwood, J., Cleland, H., Woodruff, P., Maddern, G., Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review, *Burns*, 33, 946-57, **2007**.
- [31] Atiyeh, B.S., Hayek, S.N., Gunn, S.W., New technologies for burn wound closure and healing—Review of the literature, *Burns*, 31, 944-56, **2005**.
- [32] Priya, S.G., Jungvid, H., Kumar, A., Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14, 105-18, **2008**.
- [33] Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T., Reichmann, E., Tissue engineering of skin, *Burns*, 36, 450-60, **2010**.
- [34] Rheinwald, J.G., Green, H., Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma, *Cell*, 6, 317-30, **1975**.
- [35] Mazlyzam, A., Aminuddin, B., Fuzina, N., Norhayati, M., Fauziah, O., Isa, M., et al., Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold, *Burns*, 33, 355-63, **2007**.

- [36] Gallico, G.r., ÓCONNOR, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O., Green, H., Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *The New England journal of medicine*, 311, 448-51, **1984**.
- [37] Cuono, C., Langdon, R., McGuire, J., Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury, *The Lancet*, 327, 1123-4, **1986**.
- [38] Bell, E., Ehrlich, H.P., Sher, S., Merrill, C., Sarber, R., Hull, B., et al., Development and use of a living skin equivalent, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 67, 386-92, **1981**.
- [39] Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D.G., Sabolinski, M.L., Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers a prospective randomized multicenter clinical trial, *Diabetes Care*, 24, 290-5, **2001**.
- [40] Heimbach, D.M., Warden, G.D., Luterman, A., Jordan, M.H., Ozobia, N., Ryan, C.M., et al., Multicenter postapproval clinical trial of Integra® dermal Regeneration template for burn treatment, *Journal of Burn Care & Research*, 24, 42-8, **2003**.
- [41] Moiemmen, N.S., Vlachou, E., Staiano, J.J., Thawy, Y., Frame, J.D., Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 160S-74S, 10.1097/01.prs.0000222609.40461.68, **2006**.
- [42] Zweifel, C.J., Contaldo, C., Köhler, C., Jandali, A., Künzi, W., Giovanoli, P., Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for burn wound closure, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 61, e1-e4, **2008**.
- [43] Renner, R., Harth, W., Simon, J.C., Transplantation of chronic wounds with epidermal sheets derived from autologous hair follicles—the Leipzig experience, *International Wound Journal*, 6, 226-32, **2009**.
- [44] Boyce, S.T., Cultured skin substitutes: a review, *Tissue engineering*, 2, 255-66, **1996**.
- [45] Warren, S.M., Fong, K.D., Nacamuli, R.P., Song, H.M., Fang, T.D., Longaker, M.T., Biomaterials for skin and bone replacement and repair in plastic surgery, *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, 9, 10-5, **2003**.
- [46] Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., et al., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4833-41, **2003**.
- [47] Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P. Principles of Tissue Engineering: Elsevier Science; **2011**.
- [48] Liu, H., Mao, J., Yao, K., Yang, G., Cui, L., Cao, Y., A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15, 25-40, **2004**.

- [49] Lee, K.Y., Mooney, D.J., Hydrogels for tissue engineering, *Chemical reviews*, 101, 1869-80, **2001**.
- [50] Wang, H.-M., Chou, Y.-T., Wen, Z.-H., Wang, Z.-R., Chen, C.-H., Ho, M.-L., Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration, *PLoS ONE*, 8, e56330, **2013**.
- [51] Wang, T.-W., Wu, H.-C., Huang, Y.-C., Sun, J.-S., Lin, F.-H., Biomimetic bilayered gelatin-chondroitin 6 sulfate-hyaluronic acid biopolymer as a scaffold for skin equivalent tissue engineering, *Artificial Organs*, 30, 141-9, **2006**.
- [52] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P.T., Nair, S.V., Tamura, H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*, 29, 322-37, **2011**.
- [53] Saravanan, S., Nethala, S., Pattnaik, S., Tripathi, A., Moorthi, A., Selvamurugan, N., Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 188-93, **2011**.
- [54] Paul, W., Sharma, C.P., Chitosan and alginate wound dressings: a short review, *Trends Biomater Artif Organs*, 18, 18-23, **2004**.
- [55] Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J., A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials*, 22, 331-6, **2001**.
- [56] Beskardes, I.G., Demirtas, T.T., Durukan, M.D., Gumusderelioglu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 151-160, **2012**.
- [57] Mao, J., Zhao, L., De Yao, K., Shang, Q., Yang, G., Cao, Y., Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 64, 301-8, **2003**.
- [58] Thein-Han, W.W., Saikhun, J., Pholpramoo, C., Misra, R.D.K., Kitiyanant, Y., Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells, *Acta Biomaterialia*, 5, 3453-66, **2009**.
- [59] Lord, S.T., Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis, *Current opinion in hematology*, 14, 236-41, **2007**.
- [60] Mosesson, M.W., Fibrinogen and fibrin structure and functions, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 1894-904, **2005**.
- [61] Janmey, P.A., Winer, J.P., Weisel, J.W., Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications, *Journal of the Royal Society Interface*, 6, 1-10, **2009**.
- [62] Weisel, J.W. Fibrinogen and Fibrin. In: David ADP, John MS, editors. *Advances in Protein Chemistry*: Academic Press; 247-99. **2005**.

- [63] Currie, L.J., Sharpe, J.R., Martin, R., The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review, *Plastic and reconstructive surgery*, 108, 1713-26, **2001**.
- [64] Carlson, J.W., Kauderer, J., Walker, J.L., Gold, M.A., O'Malley, D., Tuller, E., et al., A randomized phase III trial of VH fibrin sealant to reduce lymphedema after inguinal lymph node dissection: a gynecologic oncology group study, *Gynecologic Oncology*, 110, 76-82, **2008**.
- [65] Spotnitz, W., Fibrin Sealant: Past, Present, and Future: A Brief Review, *World J Surg*, 34, 632-4, **2010**.
- [66] Gorodetsky, R., Clark, R.A., An, J., Gailit, J., Levdansky, L., Vexler, A., et al., Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing¹, *J Invest Dermatol*, 112, 866-72, **1999**.
- [67] Ahmed, T.A., Dare, E.V., Hincke, M., Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14, 199-215, **2008**.
- [68] Spicer, P.P., Mikos, A.G., Fibrin glue as a drug delivery system, *Journal of controlled release*, 148, 49-55, **2010**.
- [69] Cox, S., Cole, M., Tawil, B., Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration, *Tissue engineering*, 10, 942-54, **2004**.
- [70] Johnsen, S., Ermuth, T., Tanczos, E., Bannasch, H., Horch, R., Zschocke, I., et al., Treatment of therapy-refractive ulcers of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant, *Vasa*, 34, 25-9, **2005**.
- [71] Beşkardeş, I.G., Demirtaş, T.T., Durukan, M.D., Gümüşderelioğlu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, n/a-n/a, **2012**.
- [72] Chen, J., Park, H., Park, K., Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 44, 53-62, **1999**.
- [73] Demir, R. Histolojik boyama teknikleri: Palme; 2001.
- [74] Kamolz, L., Luegmair, M., Wick, N., Eisenbock, B., Burjak, S., Koller, R., et al., The Viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels, *Burns*, 31, 25-9, **2005**.
- [75] Bannasch, H., Föhn, M., Unterberg, T., Bach, A.D., Weyand, B., Stark, G.B., Skin tissue engineering, *Clinics in plastic surgery*, 30, 573-9, **2003**.
- [76] Mao, J.S., Zhao, L.G., Yin, Y.J., Yao, K.D., Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds, *Biomaterials*, 24, 1067-74, **2003**.
- [77] Deng, C.-M., He, L.-Z., Zhao, M., Yang, D., Liu, Y., Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing, *Carbohydrate Polymers*, 69, 583-9, **2007**.

- [78] Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioǧlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-74, **2007**.
- [79] Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihally, S.V., In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 7616-27, **2005**.
- [80] Dhandayuthapani, B., Krishnan, U.M., Sethuraman, S., Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94B, 264-72, **2010**.
- [81] Whu, S.W., Hung, K.-C., Hsieh, K.-H., Chen, C.-H., Tsai, C.-L., Hsu, S.-h., In vitro and in vivo evaluation of chitosan–gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2855-63, **2013**.
- [82] Miranda, S.C.C.C., Silva, G.A.B., Hell, R.C.R., Martins, M.D., Alves, J.B., Goes, A.M., Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction, *Archives of Oral Biology*, 56, 1-15, **2011**.
- [83] Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Furuike, T., Tamura, H., et al., Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications, *Carbohydrate Polymers*, 80, 687-94, **2010**.
- [84] Sarem, M., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Shastri, V.P., Optimization strategies on the structural modeling of gelatin/chitosan scaffolds to mimic human meniscus tissue, *Materials Science and Engineering: C*, 33, 4777-85, **2013**.
- [85] Cui, L., Jia, J., Guo, Y., Liu, Y., Zhu, P., Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin, *Carbohydrate Polymers*, 99, 31-8, **2014**.
- [86] Monier, M., Ayad, D.M., Wei, Y., Sarhan, A.A., Preparation of cross-linked chitosan/glyoxal molecularly imprinted resin for efficient chiral resolution of aspartic acid isomers, *Biochemical Engineering Journal*, 51, 140-6, **2010**.
- [87] de Carvalho, R.A., Grosso, C.R.F., Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde, *Food Hydrocolloids*, 18, 717-26, **2004**.
- [88] Çetin, D., Kahraman, A.S., Gümüşderelioǧlu, M., Novel pHEMA-gelatin SPHs as bone scaffolds in dynamic cultures, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2803-12, **2012**.
- [89] Zhong, S., Zhang, Y., Lim, C., Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 510-25, **2010**.

- [90] Tıǧlı, R.S., Kazaroǧlu, N.M., Maviş, B., Gümüşderelioǧlu, M., Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22, 207-23, **2011**.
- [91] Demirtaş, T.T., Karakeçili, A.G., Gümüşderelioǧlu, M., Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 729-35, **2008**.
- [92] Sinnwell, S., Ritter, H., Recent advances in microwave-assisted polymer synthesis, *Australian Journal of Chemistry*, 60, 729-43, **2007**.
- [93] Kretschmann, O., Schmitz, S., Ritter, H., Microwave-Assisted Synthesis of Associative Hydrogels, *Macromolecular Rapid Communications*, 28, 1265-9, **2007**.
- [94] Hoogenboom, R., Schubert, U.S., Microwave-Assisted Polymer Synthesis: Recent Developments in a Rapidly Expanding Field of Research, *Macromolecular Rapid Communications*, 28, 368-86, **2007**.
- [95] Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerra-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodriguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., et al., Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, 82, 305-15, **2010**.
- [96] Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K.K., Kumar, A., Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5, 406-18, **2009**.
- [97] Zeren, M., HS2 hücrelerinin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, **2010**.
- [98] Zulfakar, M.H., Ong, C.M.Y., Heard, C.M., The effects of betamethasone dipropionate and fish oil on HaCaT proliferation and apoptosis, *International Journal of Pharmaceutics*, 434, 399-405, **2012**.
- [99] Ronfard, V., Barrandon, Y., Migration of keratinocytes through tunnels of digested fibrin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 4504-9, **2001**.
- [100] Stenman, S., Vaheri, A., Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues, *The Journal of experimental medicine*, 147, 1054-64, **1978**.
- [101] Clark, R.A., Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin, *J Invest Dermatol*, 94, 128s-34s, **1990**.
- [102] Ghosh, K., Ren, X.-D., Shu, X.Z., Prestwich, G.D., Clark, R.A., Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing, *Tissue engineering*, 12, 601-13, **2006**.
- [103] Tajima, S., Pinnell, S.R., Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis, *J Invest Dermatol*, 77, 410-2, **1981**.

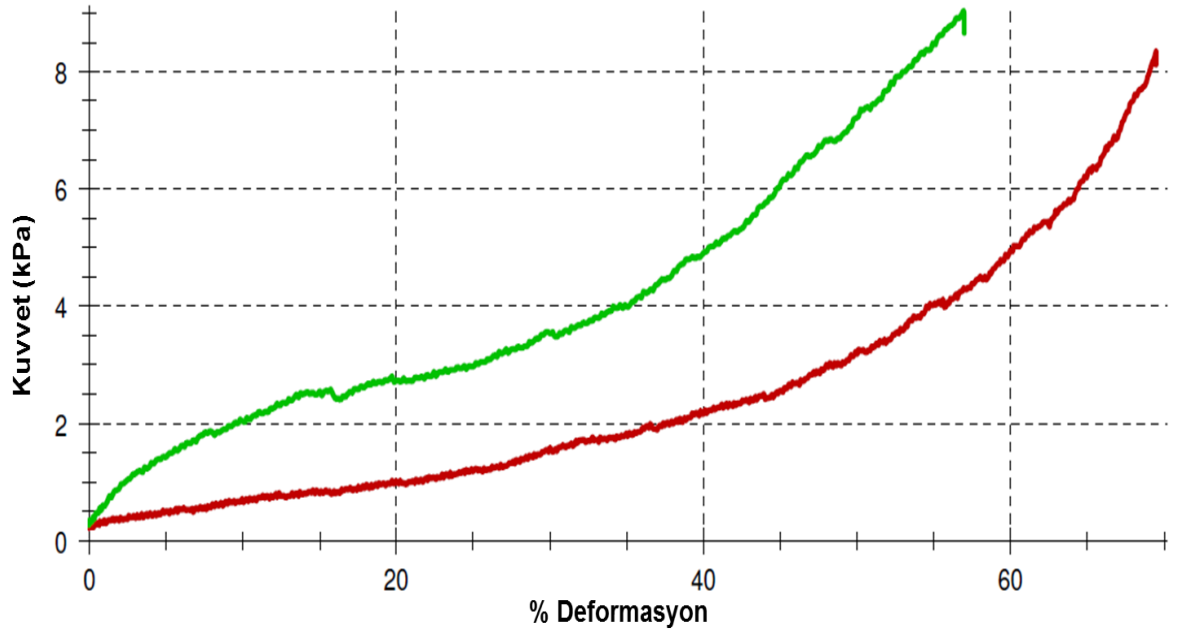
- [104] Ishida-Yamamoto, A., Loricrin keratoderma: a novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin, *Journal of Dermatological Science*, 31, 3-8, **2003**.
- [105] Hohl, D., Olano, B.R., de Viragh, P.A., Huber, M., Detrisac, C.J., Schnyder, U.W., et al., Expression patterns of loricrin in various species and tissues, *Differentiation*, 54, 25-34, **1993**.
- [106] Alam, H., Sehgal, L., Kundu, S.T., Dalal, S.N., Vaidya, M.M., Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells, *Molecular biology of the cell*, 22, 4068-78, **2011**.
- [107] Stark, H.-J., Willhauck, M.J., Mirancea, N., Boehnke, K., Nord, I., Breitkreutz, D., et al., Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermo-epidermal junction in organotypic co-culture, *European Journal of Cell Biology*, 83, 631-45, **2004**.
- [108] Stark, H.-J., Boehnke, K., Mirancea, N., Willhauck, M.J., Pavesio, A., Fusenig, N.E., et al. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*: Nature Publishing Group; 2006. p. 93-105.
- [109] Moll, R., Divo, M., Langbein, L., The human keratins: biology and pathology, *Histochemistry and cell biology*, 129, 705-33, **2008**.

EK

MEKANİK DAYANIM TESTİNE AİT SIKIŞTIRMA DAYANIM EĞRİLERİ

Bölüm 3.2.2.4'te anlatılan yöntemle gerçekleştirilen mekanik dayanım testi sonucunda 2 paralel örnekten elde edilen grafik aşağıda verilmiştir.

PBS'te şişirilmiş kitosan-jelatin bazlı SPH'lere ait sıkıştırma grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Müşra ZEREN

Doğum Yeri : Adana / TÜRKİYE

Medeni Hali : Bekâr

E-posta : zeren.musra@gmail.com

Adresi : Kıbrıs Cad. Altay Sok. No:46/3 Çankaya/ANKARA

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Gazi Mağusa, Türk Maarif Koleji (2004)

Lisans : Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü (2010)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora:–

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri Düzey), Fransızca (Orta Düzey)

İş Deneyimi:

ÖZTAR, AR&GE, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı, 30 iş günü, Stajyer (2007)

Genkord Kordon Kanı ve Kök Hücre Merkezi, 30 iş günü, Stajyer (2008)

Dr. Burhan Nalbantoğlu Hastanesi, Talasemi Merkezi, 30 iş günü, Stajyer (2009)

ALFARES Pharmaceuticals, 45 iş günü, IAESTE Stajyeri (2009)

Bilim&Ütopya Dergisi Yazı Kurulu Üyesi, Raportör (2011-Halen)

Kimya Mühendisleri Odası, YK Üyesi (2012- Halen)

Deneyim Alanları

Doku mühendisliği, biyomalzemeler, hayvan hücre kültürleri.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-