**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

# DİYABETİK YARA TEDAVİSİ İÇİN FOTOTERAPİ, BİYOPOLİMER VE HÜCRESEL UYGULAMALARIN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

**CANDAN YILMAZ ÖZDOĞAN**

**KOCAELİ 2019**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

# DİYABETİK YARA TEDAVİSİ İÇİN FOTOTERAPİ, BİYOPOLİMER ve HÜCRESEL UYGULAMALARIN GELİŞTİRİLMESİ ve İN VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

**Candan YILMAZ ÖZDOĞAN**

| | | |
|---|---|---|
| **Doç.Dr. Halime KENAR** | | |
| **Danışman,** | **Kocaeli Üniversitesi** | ..... |
| **Prof.Dr. Aynur KARADENİZLİ** | | |
| **Jüri Üyesi,** | **Kocaeli Üniversitesi** | ..... |
| **Prof.Dr. Gamze TORUN KÖSE** | | |
| **Jüri Üyesi,** | **Yeditepe Üniversitesi** | ..... |
| **Doç.Dr. Canan SEVİMLİ GÜR** | | |
| **Jüri Üyesi,** | **Kocaeli Üniversitesi** | ..... |
| **Dr. Öğr.Üyesi Deniz YÜCEL** | | |
| **Jüri Üyesi,** | **Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Ü.** | ..... |

**Tezin Savunulduğu Tarih: 19.02.2019**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim ve öğretimimde bilgi, beceri ve deneyimleriyle yanımda olan, her zor anımda beni yalnız bırakmayarak benden manevi desteğini hiç eksik etmeyen, eğitimim süresince bana hocalığın yanı sıra aynı zamanda bir abla olan değerli Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Halime KENAR'a,

Tez çalışmamda örneklerimin konfokal mikrokosbu görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Deniz YÜCEL'e, bitki özütlerinin hazırlanmasında yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR, Doç Dr. Halim Aytekin ERGÜL ve Arş. Gör. Serdar AKSAN'a, hücre izolasyonları için gerekli olan dokuların temininde benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emek DOĞER, Prof. Dr. Murat Şahin ALAGÖZ ve Arş. Gör. Kıvanç Emre DAVUN'a, mikrobiyoloji çalışmalarımda bilgi ve deneyimiyle bana destek olan Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ ve Arş. Gör. Hüseyin UZUNER'e, deneylerim esnasında her ihtiyacım olduğunda bana laboratuvarlarını açan Prof. Dr. Murat KASAP ve Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a,

Bu uzun ve zor süreçte her anımda benimle olan, bana olan inancını bir an olsun kaybetmeyen manevi kardeşim Ayşe SAN ve en iyi dostum Gamze KARA MAĞDEN'e, benden manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen en yakın arkadaşlarım Mehmet SARIHAN, Levent AYDIN, Sertan ARKAN, Vildan KÜÇÜKOĞLU, Tuğçe EROL'a,

Beni bugünlere getiren, dualarını benden esirgemeyen, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim babam Mustafa YILMAZ'a, annem Nazmiye YILMAZ'a, her zaman yanımda olan ikiz kardeşim Can YILMAZ'a, ablam Canan TOPALOĞLU'na,

Tezim süresince haftasonları, geç saatlere kadar benimle laboratuvarda saatlerini geçiren, her vazgeçtiğimde benim tekrar ayağa kalkmamı sağlayan, en büyük destekçim, en büyük şansım birtanecik eşim Emin ÖZDOĞAN'a,
Teşekkür ederim.

Şubat-2019 Candan YILMAZ ÖZDOĞAN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR....i
İÇİNDEKİLER.... ii
ŞEKİLLER DİZİNİ....v
TABLOLAR DİZİNİ....ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ....x
ÖZET....xii
ABSTRACT....xiii
GİRİŞ....1
1. GENEL BİLGİLER....5
1.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi....5
1.2. Diabetes Mellitus Nedir?....7
1.2.1. Tip 1 diyabet....8
1.2.2. Tip 2 diyabet....9
1.2.3. Gebelik diyabeti (Gestasyonel diyabet)....9
1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Diyabet....10
1.4. Diyabetin Komplikasyonları....11
1.4.1. Diyabetin akut komplikasyonları....11
1.4.2. Diyabetin kronik komplikasyonları....12
1.5. Diyabet ve Yara İyileşmesi....13
1.5.1. Derinin yapısı ve işlevi....13
1.5.2. Derinin tabakaları....14
1.5.2.1. Epidermis....14
1.5.2.2. Dermis....16
1.5.3. Yara ve yara iyileşmesi....17
1.5.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler....22
1.5.5. Yara iyileşmesinde kullanılan yöntemler....23
1.5.5.1. Yara örtülerinin kullanımı....23
1.5.5.2. Düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT)....25
1.5.5.3. Yara iyileşmesinde bitkisel tedavi....31
2. MALZEME VE YÖNTEM....34
2.1. İnsan Fibroblast, Endotel ve Keratinosit Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü....34
2.1.1. İnsan dermal fibroblast hücre izolasyonu ve karakterizasyonu....34
2.1.2. İnsan göbek bağı veninden endotel hücre (HUVEC) izolasyonu ve karakterizasyonu....36
2.1.3. Meme derisinden keratinosit hücre izolasyonu ve karakterizasyonu....36
2.2. Tedavi Amaçlı Hidrojel Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu....39
2.2.1. Sığır aşil tendonundan kollajen izolasyonu....39

2.2.2. İnsan plasentasından kollajen izolasyonu....40
2.2.3. Kollajenli hidrojel optimizasyonu....40
2.2.3.1. Hücresiz kollajenli hidrojelin hazırlanması....40
2.2.3.2. Kollajenli hidrojelin biyouyumluluğunun belirlenmesi....43
2.3. *Cotinus coggygria* Özütlerinin Hazırlanması, Sitotoksik ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi....45
2.3.1. Farklı *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı) özüt ve konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi....46
2.3.2. *C.coggygria* özütlerinin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin belirlenmesi....47
2.4. Fototerapi....48
2.4.1. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi....48
2.4.2. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisinin belirlenmesi....48
2.5. *İn vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modelinin Geliştirilmesi....50
2.5.1. Metakrilatlanmış jelatin (GelMA) sentezi....50
2.5.2. Hücresiz GelMA hidrojelin hazırlanması....51
2.5.3. Hücreli GelMA hidrojelin hazırlanması....52
2.5.3.1. UV ışımanın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi....52
2.5.3.2. GelMA hidrojel içerisinde hücre uzanmasının değerlendirilmesi....52
2.5.4. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modeli....53
2.5.4.1. Dermis tabakasının optimizasyonu....53
2.5.4.2. Dermis ve epidermis tabakalarının birlikte optimizasyonu....54
2.6. Hücresel ve Bitkisel Tedavinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin *in vitro* 3- Boyutlu İnsan Deri Modelinde Belirlenmesi....60
3. BULGULAR VE TARTIŞMA....63
3.1. İnsan Fibroblast, Endotel ve Keratinosit Hücre Kültürü....63
3.1.1. İnsan deri kaynaklı fibroblast karakterizasyonu....63
3.1.2. İnsan göbek bağı veni kaynaklı endotel hücre (HUVEC) karakterizasyonu....65
3.1.3. Meme derisi kaynaklı keratinosit hücre karakterizasyonu....66
3.2. Tedavi Amaçlı Geliştirilen Hidrojelin Karakterizasyonu....70
3.2.1. Sığır aşil tendon kaynaklı kollajenin karakterizasyonu....70
3.2.2. Kollajenli hidrojel karakterizasyonu....73
3.2.2.1. Hücresiz kollajenli hidrojel karakterizasyonu....73
3.2.2.2. Hücreli kollajenli hidrojel karakterizasyonu....75
3.3. *Cotinus coggygria* Özütlerinin Sitotoksik ve Antimikrobiyal Özellikleri....83
3.3.1. Farklı *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı) özüt ve konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri....83
3.3.2. *C.coggygria* özütlerinin antibakteriyel ve antifungal etkileri....88
3.4. Fototerapi....90
3.4.1. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücre canlılığına etkisi....90

3.4.2. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisi....94
3.5. *İn vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modeli....102
3.5.1. Metakrilatlanmış jelatin (GelMA) karakterizasyonu....102
3.5.2. Hücresiz GelMA hidrojelin makroskopik özellikleri....104
3.5.3. Hücreli GelMA hidrojelin biyouyumluluğu....106
3.5.3.1. UV ışımanın hücre canlılığına etkisi....106
3.5.3.2. GelMA hidrojel içerisinde hücre uzanması....107
3.5.4. Dermis tabakası....109
3.5.5. Dermis ve epidermis tabakalarının birlikte kültürü....112
3.6. Hücresel ve Bitkisel Tedavinin *İn Vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modelindeki Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi....121
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....127
KAYNAKLAR....130
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER....137
ÖZGEÇMİŞ....139

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Deri tabakalarının gösterimi.....15
Şekil 1.2. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi.....19
Şekil 1.3. Normal ve diyabetik bireylerde yara iyileşmesi.....20
Şekil 1.4. Lazerin hücreye etkisinin şematik görünümü.....27
Şekil 1.5. Fototerapide etkili olan bazı faktörler.....30
Şekil 1.6. *Cotinus coggygria* görüntüsü.....32
Şekil 2.1. Metakrilatlanmış jelatin sentezi.....50
Şekil 2.2. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin şematik görüntüsü.....61
Şekil 2.3. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modeline suni yaranın açılmasının ve tedavi amaçlı kollajen hidrojelin uygulanmasının şematik görüntüsü.....61
Şekil 3.1. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....63
Şekil 3.2. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin anti-vimentin FITC ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri.....64
Şekil 3.3. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin üreme eğrileri.....64
Şekil 3.4. İzole edilmiş HUVEC hücrelerinin IF boyama öncesi görüntüsü.....65
Şekil 3.5. HUVEC hücrelerinin anti-CD31 FITC ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri.....66
Şekil 3.6. Keratinosit hücrelerinin anti-sitokeratin 5 TXRED ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri.....66
Şekil 3.7. Farklı yüzeylere ekilmiş olan keratinosit hücrelerinin 11 günlük inkübasyon sonundaki ışık mikroskobu görüntüleri.....67
Şekil 3.8. İnsan keratinosit hücrelerinin 4 gün inkübasyon sonunda ışık mikroskobu görüntüleri.....68
Şekil 3.9. İnsan keratinosit hücrelerinin 7 gün inkübasyon sonunda ışık mikroskobu görüntüleri.....69
Şekil 3.10. İnsan keratinosit hücrelerinin 7 gün inkübasyon sonunda floresan mikroskobu görüntüleri.....70
Şekil 3.11. Sığır aşil tendonundan izole edilip liyofilize edilmiş kollajen.....71
Şekil 3.12. Kollajen örneklerinin SDS-PAGE sonuçları.....71
Şekil 3.13. Kollajen örneklerinin 2-merkaptoetanollü SDS-PAGE sonuçları.....71
Şekil 3.14. Kollajen örneklerinin SDS-PAGE ve merkaptoetanollü SDS-PAGE analizleri sonucundaki 139 kDa / 129 kDa bant yoğunluk oranları.....72
Şekil 3.15. Oluşturulan hücreli hidrojel formülasyonlarının makroskobik görüntüsü.....76

Şekil 3.16. Farklı hidrojel formülasyonları ile kültüre edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin 9. gün sonundaki canlı/ölü hücre boyaması görüntüleri.....77
Şekil 3.17. Aynı hidrojel formülasyonuna gömülen farklı hücre konsantrasyonlarının 9 gün sonunda hidrojelde meydana getirdiği hacimsel değişim.....80
Şekil 3.18. Hücreli hidrojel formülasyonuna gömülen farklı konsantrasyonlarındaki insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün inkübasyon sonundaki falloidin boyama görüntüleri.....81
Şekil 3.19. Aynı hidrojel formülasyonuna gömülen farklı hücre konsantrasyonlarının 9 gün sonunda hidrojel üzerinde meydana getirdikleri değişim.....81
Şekil 3.20. Hücreli hidrojel formülasyonuna gömülen farklı konsantrasyonlardaki insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün inkübasyon sonundaki falloidin boyama görüntüleri.....82
Şekil 3.21. Farklı hücre konsantrasyonlarında kollajen hidrojeller içerisine gömülmüş olan insan dermal fibroblast hücrelerinin 1. ve 9. gün sonundaki DNA miktarları.....83
Şekil 3.22. Farklı boyacı sumağı özütlerinin tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....86
Şekil 3.23. Farklı boyacı sumağı özütlerinin normoglisemik insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....87
Şekil 3.24. 9 gün süresince farklı sürelerde uygulanmış olan 980 nm dalga boyundaki lazerin dermal fibroblast hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....91
Şekil 3.25. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücre canlılığına etkisi: canlı/ölü hücre boyaması.....92
Şekil 3.26. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda normoglisemik insan dermal fibroblast hücre canlılığına etkisi: canlı/ölü hücre boyaması.....93
Şekil 3.27. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün diyot lazer uygulamasından sonraki ışık mikroskobu görüntüleri.....95
Şekil 3.28. Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün diyot lazer uygulamasından sonraki ışık mikroskobu görüntüleri.....96
Şekil 3.29. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde kollajen sentezine olan etkisi: Masson trikrom boyaması.....97
Şekil 3.30. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde kollajen sentezine etkisi: Masson trikrom boyaması.....98
Şekil 3.31. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde 9 gün diyot lazer uygulamasından sonra sentezlenen tip I kollajenin immünfloresan görüntüleri.....100
Şekil 3.32. Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde 9 gün diyot lazer uygulamasından sonra sentezlenen tip I kollajenin immünfloresan görüntüleri.....101

Şekil 3.33. Jelatin ve GelMA'nın NMR görüntüleri.....103
Şekil 3.34. İrgacure kullanılarak 6, 7 ve 8 dakika UV ışıması sonucunda elde edilmiş GelMA hidrojelinin makroskobik görüntüsü.....104
Şekil 3.35. Farklı UV ışıma sürelerinde, suda veya metanolde çözünmüş VA 086 foto-başlatıcısı ile elde edilmiş GelMA- hidrojellerin makroskobik görüntüleri.....105
Şekil 3.36. Farklı UV ışıma sürelerine maruz kalan normoglisemik dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı.....106
Şekil 3.37. Farklı foto-başlatıcılı GelMA hidrojelindeki insan dermal fibroblast hücrelerin10 günlük inkübasyon sonucundaki canlı/ölü hücre boyaması.....107
Şekil 3.38. Farklı foto-başlatıcılı GelMA hidrojelindeki insan dermal fibroblast hücrelerin10 günlük inkübasyonu sonunda falloidin boyama ile elde edilmiş floresan mikroskop görüntüleri.....108
Şekil 3.39. GelMA içerisine tutuklanmış $5x10^4$ hücre/100 µL hidrojel konsantrasyonundaki insan dermal fibroblast hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü.....110
Şekil 3.40. GelMA içerisine farklı konsantrasyonlarda gömülmüş insan dermal fibroblast hücrelerinin 34 gün inkübasyonu sonundaki hücre canlılığı: canlı/ölü hücre boyaması.....111
Şekil 3.41. GelMA hidrojeller içerisinde farklı besiyerlerinde kültürlenmiş insan dermal fibroblastların anti-vimentin ile immünfloresan boyanması ile elde edilmiş florasan mikroskop görüntüleri.....112
Şekil 3.42. GelMA hidrojellerdeki farklı besiyerlerinde inkübe edilmiş insan keratinosit hücrelerinin DAPI çekirdek immünfloresans boyaması.....113
Şekil 3.43. 3-boyutlu *in vitro* insan deri modelindeki hücrelerin falloidin boyaması sonucu konfokal mikroskobu görüntüsü.....115
Şekil 3.44. İnsert içerisinde oluşturulmuş 3-boyutlu *in vitro* insan deri modelindeki hücrelerin 5 gün sonundaki falloidin boyaması sonucunda elde edilmiş konfokal mikroskobu görüntüleri.....116
Şekil 3.45. Farklı besiyerlerinde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modellerinin epidermis tabakalarının konfokal mikroskobu görüntüsü.....117
Şekil 3.46. Farklı besiyerlerinde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modellerinin dermis tabakalarının konfokal mikroskobu görüntüsü.....118
Şekil 3.47. % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM:% 5 HP içeren EGM-2 (1:1:1) besiyerinde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modelinin konfokal mikroskobu görüntüsü.....119
Şekil 3.48. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis tabakasının konfokal mikroskop görüntüsü.....120
Şekil 3.49. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis ve dermis tabakalarının konfokal mikroskop görüntüsü.....120
Şekil 3.50. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaranın makroskobik görüntüsü.....121

Şekil 3.51. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki yara iyileşmesi konfokal görüntüsü.....122
Şekil 3.52. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki yara iyileşmesi konfokal görüntüsü.....123
Şekil 3.53. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki damar ağı.....124
Şekil 3.54. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 günlük yara iyileşmesinin floresan mikroskop görüntüleri.....126

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Glisemi bozukluklarının sınıflaması.....8
Tablo 1.2. Dünya'da 2013 yılında görülmüş olan ve 2035 yılında olması beklenen diyabet tablosu. AFR: Afrika, EUR: Avrupa, MENA: Orta Doğu ve Kuzey Afrika, NAC: Kuzey Amerika ve Karayip, SACA: Güney ve Orta Amerika, SEA: Güney-Doğu Asya, WP: Batı Pasifik.....10
Tablo 1.3. Yara iyileşmesinde görev alan hücreler.....18
Tablo 1.4. Yara iyileşmesinde görev yapan büyüme faktörleri.....22
Tablo 2.1. Hücresiz hidrojel formülasyonları.....41
Tablo 2.2. Hücreli hidrojel formülasyonları.....44
Tablo 2.3. Hidrojel formülasyonları.....51
Tablo 2.4. 3-Boyutlu *in vitro* insan deri modeli içerikleri.....56
Tablo 2.5. *İn vitro* 3-boyutlu deri modellerindeki yaralara uygulanan tedavi yaklaşımları.....62
Tablo 3.1. Farklı hidrojel formülasyonlarının belirli koşullarda hidrojel oluşturma özellikleri.....73
Tablo 3.2. Farklı boyacı sumağı özütlerinin mikroorganizmalar üzerindeki inhibe edici konsantrasyonları.....88

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

A : Sodium Alginate (Sodyum Aljinat)
ADA : American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Derneği)
AFR : Africa (Afrika)
ASK : Ascorbic Acid (Askorbik Asit)
ASK a : Sigma A8960 L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Sesquimagnesium Salt Hydrate (Sigma A8960 L-Askorbik Asit 2-Fosfat Seskimagnezyum Tuz Hidrat)
ASK b : Sigma A7506 L-Ascorbic Acid (Sigma A7506 L-Askorbik Asit)
$CH_3COOH$ : Acetic Acid (Asetik Asit)
D : *Cotinus coggygria*'s Dichloromethane Extract (Boyacı Sumağı Diklorometan Özütü)
DAPI : 4′,6-Diamidino-2-Phenylindole (4′,6-Diamidino-2-Fenilindol)
D:M : *Cotinus coggygria*'s Dichloromethane:Methanol Extract (Boyacı Sumağı Diklorometan:Metanol Özütü)
DMEM-F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO : Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Dulbecco'nun Fosfat Çözeltisi)
DS : *Cotinus coggygria*'s Distilled Water Extract (Boyacı Sumağı Distile Su Özütü)
DSO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
ECM : Extracellular Matrix (Hücredışı Matriks, Ekstraselüler Matriks)
EGF : Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
EGM-2 : Endothelial Cell Growth Medium (Endotel Hücre Büyütme Besiyeri)
EUR : European (Avrupa)
FBS : Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDA : Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FGF : Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
G : *Cotinus coggygria*'s Traditional Extract (Boyacı Sumağı Geleneksel Özütü)
GelMA : Gelatin Methacrylate (Metakrilatlanmış Jelatin)
H : *Cotinus coggygria*'s hexane Extract (Boyacı Sumağı Hekzan Özütü)
HA : Hyaluronic Acid (Hyaluronik Asit)
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution (Hank'in Tampon Tuz Çözeltisi)
HGF : Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
HKGS : Human Keratinocyte Growth Supplement (İnsan Keratinosit Büyüme Katkısı)
HP : Human Plasma (İnsan Plazması)

| | |
|---|---|
| IDF | : International Diabetes Federation (Uluslar arası Diyabet Federasyonu) |
| IF | : Immunofluorescence (İmmünfloresan) |
| Irgacure | : 2-Hydroxy-4′-(2-Hydroxyethoxy)-2-Methylpropiophenone |
| İP Kol | : Human Placenta's Collagen (İnsan Plasenta Kollajeni) |
| Kol | : Collagen (Kollajen) |
| LLLT | : Low Level Laser Therapy (Düşük Seviyeli Lazer Terapisi) |
| MENA | : Middle East and North Africa (Orta Doğu ve Kuzey Afrika) |
| MMP | : Metalloproteinase (Metalloproteinaz) |
| MTT | : (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Metiltiazol Difenil Tetrazolyum) |
| NAC | : North America and the Caribbean (Kuzey Amerika ve Karayip) |
| NaCI | : Sodium Chloride (Sodyum Klorür) |
| PA | : Plasminogen Activator (Plazminojen Aktivatörü) |
| PDGF | : Platelet-Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü) |
| PFA | : Paraformaldehyde (Paraformaldehit) |
| SACA | : South and Central America (Güney ve Orta Amerika) |
| SEA | : South-East Asia (Güney-Doğu Asya) |
| sn | : Second (Saniye) |
| TE | : Tris-EDTA (Tris-EDTA Tampon Çözeltisi) |
| TGF-β | : Transforming Growth Factor Beta (Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta) |
| TÜİK | : Türkiye İstatistik Kurumu |
| VA086 | : 2,2′Azobis[2-Methyl-N-(2-Hydroxyethyl) Propionamide] |
| VEGF | : Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) |
| WP | : Western Pacific (Batı Pasifik) |
| WST-1 | : 2-(4-İodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2,4 Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium (2-(4-İyodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4 Disulfofenil)-2H-Tetrazolyum) |

**DİYABETİK YARA TEDAVİSİ İÇİN FOTOTERAPİ, BİYOPOLİMER VE HÜCRESEL UYGULAMALARIN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

## ÖZET

Son yıllarda dünyada en yaygın görülen hastalıklardan birisi olan diyabet, özellikle iyileşme süreci zorlu kronik yara ülserleri gibi komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu yaraların iyileşme sürecini kısaltma yönünde yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

Çalışmamızda diyabetik yaraları iyileştirmek amacıyla yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirildi. Askorbik asitli atelokollajen hidrojel, *Cotinus coggygria* özütü ve 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi ve etkinliği görülen tedavi yaklaşımlarının geliştirilen *in vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modeli üzerinde açılan suni yaralarda yarayı iyileştirme kapasiteleri araştırıldı. Hidrojelin fibroblast hücre kültüründe sitotoksik bir etkiye sebep olmadığı, hücre göçü için uygun olduğu görüldü. Lazerin fibroblast hücrelerinin kollajen sentezi, hücre proliferasyonu ve canlılığına etkilerine bakıldığında, optimum uygulama süresi normoglisemik insan dermal fibroblast hücreleri için 30 saniye, tip 2 diyabetikler için 10 saniye olarak tespit edildi. Hücre çoğalması ve antimikrobiyal analizler göz önüne alındığında en uygun konsantrasyon ve özütün 7,81 µg/mL geleneksel özütü olduğu bulundu. Diyabetik modelde, uygulanan tüm tedavi yaklaşımlarında keratinosit ve fibroblast göçünün olmasına ve gruplar arasındaki farkın görülebilecek düzeyde olmasına rağmen 9 günlük kültür süresinin tam yara kapanması için yeterli olmadığı saptandı. Geleneksel özütü içeren hücre yüklenmiş kollajen hidrojelin yaraya en fazla keratinosit ve fibroblast göçünü sağlayan, modeldeki damar oluşumunu destekleyen grup olduğu belirlendi. Geliştirilen tedavi yaklaşımının ileride klinikte diyabetik yaraların iyileşmesi için kullanılabilecek güçlü bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** 980 nm Diyot Lazer, Atelokollajen, *Cotinus coggygria*, Diyabetik Yara İyileşmesi, *İn vitro* 3-Boyutlu Tip 2 Diyabetik İnsan Deri Modeli.

**DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF PHOTOTHERAPY, BIOPOLIMER AND CELLULAR APPLICATIONS FOR DIABETIC WOUND TREATMENT**

## ABSTRACT

Diabetes, one of the most common diseases in world in recent years, particularly causes complications such as chronic wound ulcers which are difficult to cure. New treatment methods have been investigated to shorten the wound healing process.

In our study, a new diabetic wound treatment approach was developed . Effects of atelocollagen hydrogel with ascorbic acid, *Cotinus coggygria* and 980 nm diode laser treatments on cell proliferation were investigated. Artificial wounds were generated on the developed *in vitro* 3-dimensional type 2 diabetic human skin model. In the model, the capacity of predetermined treatment approaches to improve wound healing was examined. The hydrogel was not cytotoxic to fibroblasts and was suitable for cell migration. Considering the effects of laser on the fibroblasts' proliferation, viability and collagen synthesis, optimum application times were found as 30 seconds for normoglycemic fibroblasts and 10 seconds for type 2 diabetic fibroblasts. Traditional extract at concentration of 7.81 μg/mL was found to be the best antimicrobial and proliferation promoting extract. Although migration of fibroblasts and keratinocytes was present and the difference between the treatment groups was evident in the diabetic model, 9-day culture period was not suffient for complete wound closure. The cell-laden hydrogel containing the traditional extract was the group that promoted the most the fibroblast and keratinocyte migration to the wound, and supported the vascular growth in the model. It is thought that the developed treatment approach may be a powerful alternative to improve diabetic wound healing in clinical practice in the future.

**Keywords:** 980 nm Diode Laser, Atelocollagen, *Cotinus coggygria*, Diabetic Wound Healing, *In vitro* 3-Dimensional Type 2 Diabetic Human Skin Model.

## GİRİŞ

Diyabet (Diabetes mellitus), pek çok organ ve sistemi etkileyen kompleks, metabolik bir anomalidir. Elde edilen veriler 2010 yılı sonunda dünya çapında yaklaşık 285 milyon insanın diyabet hastası olduğunu, 2030 yılına kadar ise bu sayısının 439 milyona çıkacağını göstermektedir. Bu hastaların % 51,9'u erkek iken % 48,1'i ise kadın hastadır. Diyabet, iyileşme süreci önemli problemlere yol açan kronik yara ülserleri gibi komplikasyonlara sebep olur. Diyabet hastalarının % 15'inde ayak ülserleri ve yaraları oluşurken bu yaraların % 50-70'i uzuv ampütasyonlarıyla sonuçlanmaktadır. İyileşmeyen ülserler finansal yükün yanı sıra hareket kabiliyeti ve performansını da azaltarak hastanın yaşam kalitesini etkiler. Diyabet hastalarında oluşan bu kronik yaraların standart yöntemlerle tedavisi oldukça zordur (Ayuk ve diğ., 2018; Chung ve diğ., 2010).

Deri yarası, dış ortama karşı savunma işlevini gerçekleştiren koruyucu bariyerde meydana gelen yara olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi ise vücudun koruyucu deri bariyerin restorasyonunu sağlayan, yara sonrasındaki süreçtir (McCarthy ve ark., 2018). Yara iyileşmesi; enflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma basamağı olmak üzere üç temel aşamadan oluşan dinamik bir süreçtir. Enflamasyon fazı süresince fagositik hücreler yara almış dokuyu debride ederler. Proliferasyon fazında ise epitelizasyon, fibroplazi ve anjiogenez meydana gelir. Bu arada olgun granülasyon dokusu oluşur ve yara küçülmeye başlar. Son olarak, olgunlaşma fazında kollajen skar doku dayanıklılığını arttıran protein molekülleri ve diğer kollajenlerle sıkı bağlar yapar (Gökalp Özkorkmaz ve Özay, 2013; Emilia de Abreu Chaves, 2014; Osman ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 1997; Posten ve diğ., 2005; Colombo ve diğ., 2013; Brett, 2008).

Yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve yarada enfeksiyon riskini ortadan kaldırabilmek adına yıllardır pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birisi yara örtülerinin kullanımıdır. Eskiden, yara iyileşmesinde doğal veya sentetik sargılar, pamuk ve gazlı bez gibi geleneksel örtüler tercih edilirken gelişen teknoloji ve artan talep ile birlikte alternatif yara örtülerine doğru yönelim artmıştır. Bu yaklaşımla,

yara iyileşme sürecine katkısı olan pasif yara örtülerinden interaktif ya da biyoaktif yara örtülerine kadar çok çeşitli yara örtüleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu alanda kullanılan malzemelerin bir kısmının amacı sadece yarayı ileri harabiyetten korumak iken diğer bir kısmı yaranın kapanmasının temel öğeleri olan kontraksiyon (kapanma), neovaskülarizasyon(damar yapısının restorasyonu) ve epitelizasyon mekanizmalarının bir ya da birden fazlasına etki ederek yaranın kendiliğinden iyileşmesini sağlamaya yöneliktir (Khill ve diğ., 2003; Gürsoy, 2007; Özkaynak ve diğ., 2005). Ülkemizde de bu tür malzemeler ameliyatlarda kanamaların durdurulmasında (Brown ve diğ., 2009; Wedmore ve diğ., 2006), diş ve diş eti hastalıklarının tedavisinde (Matthew, 1993) diyabetik ayak yaraları (Moura ve diğ., 2013; Shi ve Ronfard, 2013; Merrell ve diğ., 2009) ve deri hasarlarının onarılmasında (Niiyama ve Kuroyanagi, 2014) sıklıkla kullanılmaktadır.

Yara iyileşmesi, birçok basamaktan geçen dinamik bir olay olduğundan, iyileşmede cildin devamlılığının korunması esastır. Vücudumuzda yaygın olarak bulunan proteinlerden biri olan kollajen, yara iyileşme sürecinin tüm aşamalarında hayati öneme sahiptir (Chu ve diğ., 2018; Ambati ve diğ., 2013; Ibusuki ve diğ., 2007). Fibroblast çoğalması ve endotel hücrelerin göçünü hızlandırma ve yaralanmış dokunun iyileşmesine yardımcı olma gibi etkileri vardır (Grunert ve diğ., 2015; Takayama ve diğ., 2009). Bu etkilerine rağmen zayıf mekanik özelliklerinden dolayı kollajenin tek başına biyomalzeme olarak kullanımı yeterli değildir. Bu yüzden yara örtüsü geliştirilmesinde kollajenin vücuttaki biyobozunma hızını yavaşlatacak ve mekanik özelliklerini iyileştirecek yöntemlerin kullanımı gündeme gelmiştir (Ambati ve diğ., 2013). Bu yöntemlerden biri olan çapraz bağlama yönteminde ajan olarak birçok kimyasal malzeme kullanılmış fakat kullanılan kimyasalların toksik etkisinden dolayı çapraz bağlamanın termal olarak yapılmasının daha uygun olduğu görüşü belirmeye başlamıştır (Shi ve Ronfard, 2013; Ibusuki ve diğ., 2007; Tan ve Marra, 2010).

Geçmişten günümüze yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılan uygulamalardan birisi de bitkisel tedavidir. Dünya Sağlık Örgütü hastaların yaklaşık % 80'inin bitkilere dayalı ilaçları kullandığını belirtmektedir. Bazı bitkiler akut yaraların tedavisinde kullanılırken diğerleri kronikleşmiş olanlara uygulanmaktadır. Yara iyileşmesinin koagülasyon, enflamasyon, kollajen yapımı, epitel oluşumu gibi çeşitli

evrelerine etki eden tıbbi bitkilerin varlığı bilinmektedir. İsrail'de bulunan *Ajuga* türünün hipoglisemik ve antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmişken Filistin, İsrail ve İtalya'da *İnula* türü, enfeksiyon ve deri hastalıklarında ve yara iyileşmesinde antifungal ve antienflamatuvar olarak kullanılmaktadır. *Aloe vera*'nın da yanık tedavisinde iyileşme ve epitel oluşum hızını arttırdığı tespit edilmiştir. Türkiye'de bulunan *Onosma* cinsinin bazı türlerinden de yara iyileşmesi ve yanıklar için yararlanılmaktadır (Gökalp Özkorkmaz ve Özay, 2013). Bu tıbbi bitkilerden birisi de antiseptik, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antihemorajik ve yara iyileştirici özellikleriyle *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı)'dır (Demirci ve diğ., 2003).

Fototerapi (Düşük Seviyeli Lazer Terapisi) de kronik yara iyileşmesi ve ağrı kontrolü gibi bazı ciddi medikal problemlerin tanı ve tedavisinde kullanılan önemli uygulamalar arasında yerini almıştır. Düşük seviyeli lazer terapisinin ağrı ve enflamasyon süreciyle ilgili çeşitli hücresel kimyasallar ve enzimlerin sayısını azaltarak enflamasyon reaksiyonunu azalttığı düşünülmektedir. Diğer yandan düşük seviyeli lazer terapisi hücre gelişimini etkileyen belirli enzimleri üreten fagositik hücrelerin uyarılmasıyla da ilişkili olabilir. Yara iyileşme sürecinde özellikle yüksek glukoz konsantrasyonunun olduğu diyabetik yaralarda kollajen biyosentezindeki artış ve keratinosit ve fibroblastların proliferasyon hızı üzerinde düşük seviyeli lazer terapisinin uyarıcı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Emilia de Abreu Chaves, 2014; Osman ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 1997; Colombo ve diğ., 2013; Hawkins, D., Abrahamse, 2007; Kawalec ve diğ., 2004; Medrado ve diğ., 2003; Basso ve diğ., 2012; Almeida-Lopes ve diğ., 2001; Capon ve diğ., 2001; Houreld ve Abrahamse, 2008; Hakki ve Bozkurt, 2012; Wang ve diğ., 2014; Houreld ve diğ., 2018; Esmaeelinejad ve diğ., 2014).

Oksidatif stres diyabetin sebep olduğu durumlardan birisidir. Diyabette proteinin artan, enzimatik olmayan glikozilasyonu ve lipid peroksidasyonu ve azalan glutasyon derinin zararlı maddelere karşı direncini azaltabilir. Askorbik asit (C vitamini), oksijenden kaynaklı serbest radikalleri kapabilen, insanlardaki önemli bir antioksidandır. Yapısal olarak glukoza benzer ve birçok reaksiyonda onun yerini alabilir. Pek çok çalışma diyabetik hastalarda bazal askorbik asit seviyesinin azaldığını ve oksidatif stresin arttığını göstermiştir. Askorbik asit deri, kıkırdak,

tendon ve kan damarlarının yapımında ihtiyaç duyulan bir protein olan kollajenin oluşumu için de gereklidir (Akbay ve diğ., 2010).

Günümüzde iyileşme süreci zor olan diyabetik yaraların tedavisinde cerrahi yöntemler, diyet ve insülin tedavisi, çeşitli ortopedik önlemler ve hiperbarik $O_2$ tedavisi gibi pek çok uygulamanın denenmesine rağmen çok etkili bir yöntem bulunamamıştır. Bu çalışmada, diyabetik yaraları iyileştirmek amacıyla yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışıldı. Öncelikle askorbik asitli sığır aşil tendon kollajeni (atelokollajen), *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı) özütleri ve 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulamalarının hücre çoğalması üzerine etkileri incelendi. Ardından *in vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modeli geliştirilip bu model üzerinde suni yaralar açıldı, önceden kararlaştırılmış tedavi yaklaşımlarının yarayı iyileştirme kapasiteleri araştırıldı.

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi

Diabetes mellitus'un ilk tarifi 1500 yıl önce bol su içme ve bol idrardan bahseden Ebers papirüslerinde yapılmıştır. Hippokrates, Galen, Bharadwajne Atreya adlı ünlü hekimlerin öğretileri 'Charak Samhita' isimli tıp kitabında M.Ö. 600 yıllarında toplanmış ve burada 'Madhumeh' adlı bir hastalıktan bahsedilmiştir. Diyabet (tatlı idrar) tanımına çok uyan bu hastalıkla ilgili olarak, hastaların genelde şişman insanlar oldukları, çok su içip çok idrara çıktıkları, hızla zayıfladıkları ve idrarlarına karıncaların toplandığı yazılmaktadır. Aynı zamanda hastaların kuruyarak ve ağızlarının kokarak öldükleri belirtilmiştir.

1674 yılında, Thomas Willis ilk kez diyabetik hastaların idrarlarının tatlı olduğunu göstermiştir. Ancak Willis, idrara tatlılığını veren maddenin kimyasal yapısını tam olarak tespit edememiştir. 1776 yılında Matthew Dobsoy ilk kez idrarla şeker atıldığını kanıtlamıştır. Dobson'un bu tespiti diğer bilim insanlarını diyabetin neden olabileceği muhtemel organ hasarlarını araştırmaya yöneltmiştir. Pool 1777'de ve Cawley 1778'de kimyasal olarak idrarda şeker bulmuş ve idrardaki şekerin glukoz olduğunu kanıtlamışlardır.

Cawley 1788'de ölen bir hastadaki değişiklikleri tanımlamıştır. Diyabetik hastanın otopsisinde, taş ile birlikte genişlemiş pankreas gözlemlemişlerdir. Bu insanlarda görülen diyabet ile ilgili olarak, pankreas referans gösterilen çalışmalar ilk yayın olarak kabul edilmektedir.

Fehling 1850 yılında idrarda kantitatif olarak şeker arama metodunu geliştirmiştir. Diyabetik komada idrarda aseton bulunduğuna ilk kez Prague'den Lerch ardından da 1857 yılında Williams Paters tanımlamıştır. Kavlich 1860 yılında, diyabet komasından aseton maddesini sorumlu tutmuştur. Gerhardt 1865'te, idrarda keton cisimciklerinin aranmasını kolaylaştıran bir yöntem geliştirmiştir. Von Jacks

tarafından 1880 yılında asetoasetik asit, 1884 yılında ise hidroksibütirik asit bulunmuştur. XIX. yüzyılın sonunda Naunyn ve Kussmaul, komanın klinik belirtilerini tanımlamış ve asidoz terimini yerleştirmiştir. 1877 yılında McKenzie göz komplikasyonlarını sınıflandırmıştır. Nörolojik komplikasyonların görülme sıklığı ve sınıflaması 1864 yılında Marchal de Calvi tarafından yapılmıştır. 1936'da Kimmelstiel ve Wilson'un interkapiller glomerülosklerozu tarif etmeleriyle; albüminüri, hipertansiyon ve retinopatiyi bir araya getiren diyabetik nefropati tablosu tanınmış olmuştur.

John Rollo ilk kez diyabetik hastalar için diyet tedavisi önermiştir. Rollo ve Meredith meyvelerin ve sebzelerin idrarla glukoz atımını arttırdığını, hayvansal gıdaların ise; idrarla glukoz atımını azalttığını gözlemlediler.

Claude Fransa'da, diyabetik hastalardaki pankreasa ait muhtemel fonksiyonları ve bulguları değerlendirmişlerdir. Köpeklerdeki deneyler sonucunda dönüm noktası sayılabilecek bir hipotez kurmuşlardır. Pankreatik kanalları bağlayarak veya kanallara yağ veya parafin enjekte ederek tüm sekresyonları engelleyebileceğini ve organın da atrofiye uğrayacağını göstermiş, ancak glikozüriyi ve diyabetin diğer belirtilerini tarif edememiştir. 1990 yılında benzer bir deneyde Rus Svobolev, pankreasın atrofiye uğradığını ve Langerhans adacıklarının sağlam olduğunu bulmuştur.

Bouchardet araştırmaları sırasında, diyabetin en az iki farklı tipinin olabileceğini, gençlerde daha ciddi seyirli diyabet olduğunu ve kendi uyguladığı tedavilere daha zor cevap verdiğini; ileri yaşlarda ortaya çıkan diyabet tipinin ise, şişman insanlarda ortaya çıktığını, diyet ve egzersizle tedavi edilebileceğini savunmuştur. Lancereaux ve öğrencileri, diyabetik hastaları, zayıf diyabetliler (Diabete maigne) ve şişman diyabetliler (Diabete gras) olarak ikiye ayırmıştır.

1893 yılında Laguesse, Langerhans'ın bahsettiği adacıkların insülin salgıladığını düşünerek bu adacıklara 'Langerhans adacıkları' ismini vermiştir. 1889'da Von Mering ve Minkowski, iki köpeği ameliyat ederek pankreatektomi yapmışlar, bir günden daha kısa bir sürede, köpeklerde beklenmedik davranışlar ile idrar yapma sıklığında ve miktarında farklılıklar tespit etmişlerdir.

Hayvan modelleri üzerinde yaptığı çalışmalarda Minkowski, pankreasın bir iç salgı bezi olduğunu göstermiş ve pankreası alınmış köpeklerde cilt altına implante edilmiş küçük bir pankreas dokusunun hiperglisemi belirtilerini önlediğini ve implante edilen doku parçası çıkarıldığında da aynı belirtilerin tekrar ortaya çıktığını görmüşlerdir.

Frederick Banting ve Charles Best terapötik olarak aktif insülini ilk kez üreten ve diyabetik hastalar için kullanma kriterlerini ortaya atan bilim insanlarıdır. Leonard Thompson ise insülini ilk kez bir insanda kullanmıştır. 1926 yılında Frank Synthalini (bugünkü oral antidiyabetiklerin atası), 1942'de de Laubatier sulfonamidlerin hipoglisemik etkisini bulmuştur. İnsülini ilk saflaştıran kişi Collip'tir. Ely Lilly fabrikası laboratuvarlarında insülin saflaştırılması ve çöktürülmesi yöntemleri keşfedilmiştir. İnsülin diyabet tedavisinde ve araştırmalarında büyük bir çığır açmıştır. Hızlı ve kısa tesirli insülinlerin kullanılması ve koma tedavisi, asidoz tedavisi ve diyabetiklerde cerrahi girişimler gerçekleştirilmiştir.

Hagedorn 1936'da kristalize insüline protamin ilave ederek ilk defa etkili insülinlerden birini bulmuştur. 1946-1950 yılları arasında uzun etkili insülinler bulundu, 1972'de Lilly saf insülinleri piyasaya sürdü.

1982 yılında yapay pankreas icat edilirken 1966-1998 yılları arasında pankreas transplantasyon sayısı 1400'e ulaşmıştır. Geçmişten günümüze bu gelişimlerin hepsi diyabetik hastaların yaşam süre ve kalitesini yükseltmeye yöneliktir (Yenigün ve Ener, 2001).

### 1.2. Diabetes Mellitus Nedir?

Diabetes mellitus insülin sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin azlığı sonucu karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan, kronik hiperglisemik, bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet hem diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperozmolar koma gibi akut komplikasyonlar hem de kronik vasküler komplikasyonlar nedeniyle ampütasyonlara ve ölümlere yol açabilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 1998 yılında yaptığı diyabet sınıflamasına göre 'insüline bağımlı diyabet' ve 'insüline bağımlı olmayan diyabet' tanımlaması karışıklığa yol açtığı için yerine Tip 1 ve Tip 2 diyabet tanımları kullanılmaktadır.

Tip 1 diyabet ketoasidoza eğilimli, idiyopatik ya da otoimmün kaynaklı beta hücre hasarı sonucu gelişen diyabet vakalarını kapsarken Tip 2 diyabet daha yaygın, insülin sekresyon eksikliği ile insülin direncinin bir arada etkili olduğu diyabet formlarının dahil olduğu diyabet grubudur. 'Bozulmuş açlık glukozu' tanımı ise açlık kan glukoz düzeyi normalin üzerinde, ancak diyabet tanı sınırının altında bulunan olgular için kullanılmaktadır.

DSÖ tarafından 1998 yılında hazırlanmış glisemi bozukluklarının etyolojik ve klinik açıdan sınıflaması tablosu Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Tablo 1.1. Glisemi bozukluklarının sınıflaması

| |
|---|
| 1. Tip 1 Diyabet |
| *İmmün nedenli |
| *Nedeni bilinmeyen |
| 2. Tip 2 Diyabet |
| *Periferik insülin direnci ön planda |
| *İnsülin sekresyon yetmezliği ön planda |
| 3. Diğer Tipler |
| *Beta hücre fonksiyonunda genetik bozukluklar |
| *İnsülin fonksiyonunda genetik bozukluklar |
| *Pankreas hastalıkları |
| *Endokrin hastalıkları |
| *İlaç ve kimyasal maddeler |
| *İnfeksiyonlar |
| 4. Gebelik Diyabeti |

### 1.2.1. Tip 1 diyabet

Pankreasta ilerleyen beta hücre yıkımına yol açan bir dizi olay sonucu insüline bağımlı diyabetin ortaya çıktığı otoimmün kaynaklı olarak gelişen diyabet tipidir. Çoğunlukla çocukluk döneminde ve genç erişkin yaşlarda ortaya çıktığı bilinen tip 1 diyabet sürecini otoantikor ölçümü ile metabolik anormallikler henüz başlamadan erken dönemde ortaya çıkarmak mümkündür.

Dünya nüfusunun % 5'inin tüm diyabetlilerin ise % 5-10'unun tip 1 diyabet hastası olduğu belirlenmiştir. Bu hastalık genellikle 30 yaşından önce başlar ve polidipsi, poliüri, kilo kaybı gibi diyabet belirtileri şiddetlidir. Ayrıca ketoasidoz koması, hipoglisemi gibi akut komplikasyonlar sıklıkla yaşanır. Bazı virüs hastalıkları (kabakulak, konjenital rubella gibi), beslenme özellikleri (bebekleri inek sütü ile besleme), toksinler ve stres hastalığın ortaya çıkışını hızlandıran faktörler arasındadır.

### 1.2.2. Tip 2 diyabet

Tüm diyabetlilerin yaklaşık % 90'ınını oluşturan tip 2 diyabet çocukluk dönemi dahil her yaş grubunda görülmektedir. Tip 2 diyabet, diyabet belirtilerinin hafif olduğu, bazen de hiç olmadığı, kronik komplikasyonların sık görüldüğü, genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkan, yaş arttıkça görülme sıklığı artan bir diyabet tipidir. Tip 2 diyabet obezite, dokularda insülin direnci ve insülin sekresyon bozukluğu ile karakterizedir. Son zamanlarda dünya çapında özellikle hareketsiz yaşam ve obezitenin artması tip 2 diyabet görülme sıklığını arttırmıştır (Durna, 2018).

### 1.2.3. Gebelik diyabeti (Gestasyonel diyabet)

Diyabeti olmayan bir kadında ilk kez gebelik esnasında ortaya çıkan glukoz intoleransıdır. Amerikan Diyabet Derneği (ADA) gebelerin % 7'sinin gestasyonel diyabet olduğunu tespit etmiştir.

Gestasyonel diyabetli kadınlarda pankreas rezervi yetersiz olup insülin salımında tamamlayıcı bir artışa rastlanmaz. Beta hücre disfonksiyonun temel defektleri otoimmünite, monogenik patolojiler ve altta yatan insülin direncidir. Bu faktörlerden en sık rastlananı insülin direncidir. Gestasyonel diyabetik kadınların ortalama 5,7 yıllık takipleri sonucunda % 4,6'sında tip 1 diyabet, % 5,3'ünde ise tip 2 diyabet geliştiği gözlemlenmiştir. Aynı zamanda çeşitli MODY (maturity-onset diabetes of the young) mutasyonları da bu hastalarda görülmüştür. Bu monogenik formlar hastaların % 10'undan azını oluşturmaktadır.

Beta hücre disfonksiyonu ve erken faz insülin yanıtındaki bozulma akabinde postprandiyal hiperglisemi gelişirken, hepatik glukoz üretiminin baskılanamaması

açlık hiperglisemisiyle sonuçlanır. Böylece anne ve fetüste hiperglisemi gelişir. Fetal hiperglisemi, fetal hiperinsülinemiye ve insülinin anabolik etkileri sonucunda makrozomiye sebep olur (Özuğuz ve diğ., 2010).

### 1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Diyabet

Diyabet Dünya'da özellikle az gelişmiş ülkelerde sıkça görülen bir hastalıktır. Hatta Afrika'da 2013 yılında diyabetten dolayı yaklaşık 522600 insanın öldüğü tahmin edilmektedir. Diyabetik hastaların % 80'i az ve orta gelirli ülkelerde yaşamasına rağmen bu ülkelerdeki diyabet tedavisi için harcanan para miktarı dünya çapındaki sağlık harcamalarının sadece % 20'sini kapsamaktadır.

Diyabetin en çok görüldüğü bölge olan Batı Pasifik'te diyabetik hastaların yaklaşık olarak sayısı 138 milyondur. 19,8 milyon insanı etkilemesiyle Afrika şu anda diyabetin en az görüldüğü bölgedir ancak bu sayının 2035 yılında iki katına çıkacağı düşünülmektedir. Diyabetin yetişkinlerde görülme sıklığına bakıldığında Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgesi % 10,9 ile başı çekmektedir. Güney ve Orta Amerika bölgelerindeki yetişkinlerin % 8,2'sinde diyabet görülürken Kuzey Amerika ve Karayip bölgesinde bu oran % 9,6'dır (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Dünya'da 2013 yılında görülmüş olan ve 2035 yılında olması beklenen diyabet tablosu, AFR: Afrika, EUR: Avrupa, MENA: Orta Doğu ve Kuzey Afrika, NAC: Kuzey Amerika ve Karayip, SACA: Güney ve Orta Amerika, SEA: Güney-Doğu Asya, WP: Batı Pasifik (IDF Diabetes Atlas Sixth edition, 2013)

| | 2013 | | | 2035 | | | Diyabetli insan sayısındaki artış (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bölge | Popülasyon (milyon) | Diyabetli İnsan Sayısı (milyon) | Diyabet Görülme Sıklığı (%) | Popülasyon (milyon) | Diyabetli İnsan Sayısı (milyon) | Diyabet Görülme Sıklığı (%) | |
| AFR | 407,9 | 19,8 | 5,7 | 775,5 | 41,5 | 6,0 | 109,6 |
| EUR | 658,7 | 56,3 | 6,8 | 668,7 | 68,9 | 7,1 | 22,4 |
| MENA | 374,5 | 34,6 | 10,9 | 583,7 | 67,9 | 11,3 | 96,2 |
| NAC | 334,9 | 36,8 | 9,6 | 404,5 | 50,4 | 9,9 | 37,3 |
| SACA | 300,5 | 24,1 | 8,2 | 394,2 | 38,5 | 8,2 | 59,8 |
| SEA | 883,2 | 72,1 | 8,7 | 1216,9 | 123,0 | 9,4 | 70,6 |
| WP | 1613,2 | 138,2 | 8,1 | 1818,2 | 201,8 | 8,4 | 46,0 |
| Dünya | 4572,9 | 381,8 | 8,3 | 5861,8 | 591,9 | 8,8 | 55,0 |

Diyabet dünya çapında önemli bir ölüm sebebidir. Afrika bölgesinde 20-70 yaş arasındaki yetişkinlerde görülen ölümün yaklaşık % 8,6'sının sebebi diyabettir. Batı

Pasifik bölgesinde bu oran % 15,8'dir. Diyabet kaynaklı ölümlerin neredeyse yarısı 60 yaşın altındaki insanlarda görülmektedir.

Dünya çapında diyabet hastalığı için yapılan harcamalara bakıldığında ülkeler arasında diyabete ayrılabilen bütçenin farklı olduğu görülür. Kuzey Amerika ve Karayip bölgesi 263 milyar dolar harcayarak dünyada diyabet için harcanan miktarın yaklaşık % 48'ini oluşturmaktadır. Avrupa 147 milyar dolar harcamıştır. Bu bölgeler diyabet için dünyadaki diğer bölgelere göre daha fazla maliyet ayırmaktadır. En fazla diyabetik hasta Batı Pasifik bölgesinde olmasına rağmen bu bölge diyabet için sadece 88 milyar dolar harcamıştır. Güney-Doğu Asya ve Afrika bölgeleri % 1'den, Güney ve Orta Amerika, Orta doğu ve Kuzey Afrika bölgeleri ise dünyadaki sağlık giderlerinin sadece % 5'inden azını diyabete ayırmıştır (IDF Diabetes Atlas Sixth edition, 2013).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2012 yılında elde edilen Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi verileri, nüfusun % 11'inin (yaklaşık 8,4 milyon kişi) 65 yaş ve üstü olduğunu ve bu yaş grubunda diyabetin görülme sıklığının % 34,8 (yaklaşık 2,4 milyon kişi) olduğunu göstermiştir (URL-1). IDF diyabet atlasına göre Türkiye'nin 2035 yılında diyabetik hasta sayısının en fazla olduğu 10 ülke arasına gireceği tahmin edilmektedir (IDF Diabetes Atlas Sixth edition, 2013).

### 1.4. Diyabetin Komplikasyonları

Diyabet nedeniyle kan şekeri kontrolünün sağlanamaması, kısa veya uzun dönemde sağlık sorunları oluşturur. Diyabet küçük ve büyük damarlarla birlikte sinirlerin de hasar görmesine sebep olabilir. Diyabetin neden olduğu tüm bu hasarlara komplikasyon adı verilir. Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik olarak ikiye ayrılır.

#### 1.4.1. Diyabetin akut komplikasyonları

Düşük kan şekeri (hipoglisemi): İnsülin kullanan diyabetik hastalarda kan şekeri fazla düştüğünde (çok fazla insülin, çok fazla egzersiz ya da yetersiz enerji alımı sonucu) kişi normal fonksiyonlarını yapamaz duruma gelir.

Ketoasidoz (Diyabetik koma): İnsülin yokluğuna bağlı ağır bir durumdur. Esas olarak sıklıkla tip 1 diyabetli kişilerde görülür.

Laktik asidoz: Hücreler enerji olarak glukoz dışı yakıt kullandıklarında laktik asit yaparlar ve eğer çok fazla laktik asit vücutta kalırsa denge bozulur, kişi kendini rahatsız hissetmeye başlar. Esas olarak tip 2 diyabetli kişilerde görülen bu durum daha az sıklıkla görülür.

Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar: Diyabetik hastalar çoğunlukla cilt ve tırnaklarda olmak üzere tüm organlarda bakteriyel ve fungal kaynaklı enfeksiyonlara daha açık hastalardır (URL-2).

### 1.4.2. Diyabetin kronik komplikasyonları

Uzun bir süre kan şekerinin yüksek olması, büyük ve küçük damarları ve sinirleri tahrip eder ve tahrip ettiği organda o organa ait sorunlar görülür.

Kardiyovasküler hastalık: Pekçok ülkede, kardiovasküler hastalık ya da dolaşım sistemi hastalığı diyabetli kişiler arasında en başta gelen ölüm sebebidir. Diyabetli kişilerde kalp hastası olma riski 2-5 kat daha fazladır. Eğer bacaklardaki damarları da etkilerse nöropati ve beraberinde ampütasyona yol açabilir.

Retinopati (Gözlerin hasar görmesi): Yetişkinlerde rastlanan görme bozukluklarının önde gelen sebebi diyabettir. Diyabetik hastaların % 2'si kör olurken, % 10'unda ağır görme bozukluğu gelişir.

Nefropati (Böbreklerin hasar görmesi): Diyabetli kişiler için büyük bir tehdit olan nefropati tip 1 diyabetik hastaların % 40'ında 50 yaşına geldiklerinde diyaliz veya böbrek nakli gerektirebilecek bir durumdur ve ağır böbrek hastalıkları gelişebilir.
Nöropati (Sinirlerin hasar görmesi): Diyabetik hastalarda en sık rastlanan komplikasyondur. Diyabetik sinir hastalığı, bacaklarda, ayak ve diğer uzuvlarda duyu kaybına yol açıp ayak yarası ve bacak kesilmesi ile (ampütasyon) sonuçlanabilir. Bacak ampütasyonlarında kaza dışı nedenlerin başında diyabet gelmektedir (URL-2).

## 1.5. Diyabet ve Yara İyileşmesi

### 1.5.1. Derinin yapısı ve işlevi

Deri ve türevleri örtü sistemini meydana getirmektedir. Deri vücudun dışını kaplayan, vücudun toplam kütlesinin % 15-20'sini meydana getiren en büyük organdır. Deri epidermis ve dermis olmak üzere iki ana tabakadan oluşmaktadır. Epidermis keratinize çok katlı yassı epitelden meydana gelen, sürekli olarak büyümesine rağmen deskuamasyon yoluyla normal kalınlığını koruyan bir tabakadır. Bu tabaka ektodermden köken almaktadır. Dermis ise yoğun bir bağ tabakasından oluşan, deriye mekanik destek, dayanıklılık ve kalınlık kazandıran tabakadır. Dermis kökenini mezodermden almaktadır. Bağ dokusu yapısındaki septumlar ile birbirinden ayrılmış lobüller şeklinde düzenlenmiş, değişken miktarlarda adipoz doku içeren hipodermis, dermisin derinlerinde bulunmaktadır. Soğuk iklimlerde yaşayan ve iyi beslenmiş kişilerde adipoz doku oldukça kalın olabilir. Kıl folikülleri ve kıl, ter bezleri, sebase bezler, tırnaklar ve meme bezleri derinin epidermal türevlerini oluşturmaktadır.

Deri, pek çok farklı hücre tipinden meydana gelen kompleks bir organdır. Deriyi meydana getiren hücrelerin çeşitlilikleri ve birlikte çalışma yetenekleri, kişinin dış çevreyle baş edebilmesine olanak sağlayan birçok fonksiyonu yerine getirmesini sağlamaktadır. Derinin ana işlevleri aşağıdakileri içermektedir:

- Dış çevredeki kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanlara karşı bir bariyerdir.
- İmmünolojik bilgiyi lenfoid dokudaki uygun efektör hücrelere aktarır.
- Su kaybını ve vücut sıcaklığını düzenleyerek homeostazda rol oynar.
- Dış çevreden gelen duyusal bilgiyi sinir sistemine aktarır.
- Hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörlerini salgılar, öncül molekülleri hormonal olarak aktif moleküllere dönüştürür. Böylece endokrin fonksiyonları gerçekleştirir.
- Apokrin bezlerin, ter bezlerinin ve sebase bezlerin ekzokrin salgı yoluyla boşaltımda işlev görür.

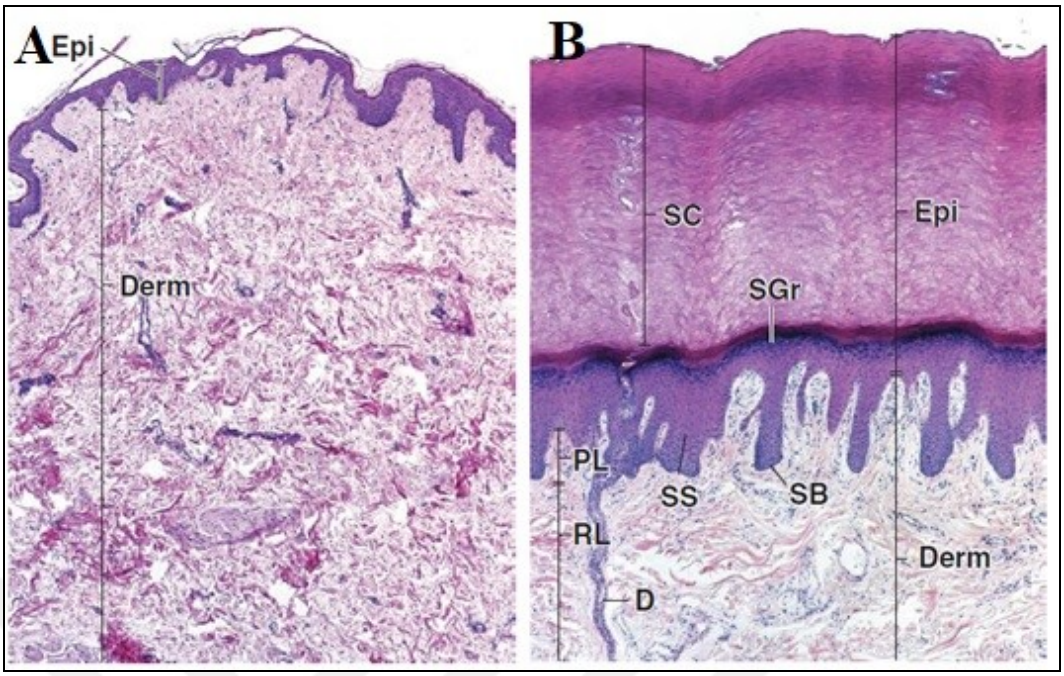
Derinin kalınlığı bulunduğu bölgeye göre ince ve kalın olarak sınıflandırılmaktadır. Deri kalınlığı bazı bölgelerde 1 mm'den ince olup bazı bölgelerde 5 mm'den daha kalındır. Avuç içleri ve ayak tabanları olmak üzere farklı iki konumda, makroskobik

ve histolojik olarak belirgin şekilde farklılık göstermektedir. Bu bölgeler abrazyona en fazla maruz kalan kısımlar olup kılsızdırlar ve diğer herhangi bir alandaki deriye kıyasla daha kalın bir epidermal tabakaya sahiptirler. Bu kılsız deri, kalın deri olarak ifade edilmektedir. Çok daha ince bir epidermise sahip alandaki deri ise ince deri olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla ince deride kıl folikülleri bulunmaktadır.

### 1.5.2. Derinin tabakaları

#### 1.5.2.1. Epidermis

Epidermis çok katlı yassı epitelden oluşan, birbirinden farklı dört tabakadan meydana gelmektedir. Kalın deride ise fazladan bir tabaka daha mevcuttur (Şekil 1.1). En derindeki tabaka aktif hücreler olan epidermis kök hücrelerinin bulunduğu stratum bazale (stratum germinativum) tabakasıdır. Bazal lamina üzerinde bulunan tek katlı hücre tabakası ile temsil edilen bu tabakanın içerdiği kök hücrelerin mitotik bölünmesiyle yeni hücreler olan keratinositler ortaya çıkar. Stratum bazaledeki hücreler küçüktür, şekilleri kübik ya da alçak prizmatiktir. Üst tabakadaki hücrelere kıyasla bu hücreler daha az sitoplazma içerirler bu yüzden de çekirdekleri birbirine daha yakın görünmektedir. Bazal hücreler sitoplazmalarında belirli miktarlarda melanin içermektedir. Melanin, bu tabakada bulunan hücrelerin aralarında yer alan komşu melanositlerden aktarılmaktadır. Bazal hücreler birbirlerine ve keratinositlere desmozomlar aracılığıyla, altta yatan bazal laminaya hemidesmozomlar aracılığıyla bağlanmaktadır. Bazal tabakada mitotik bölünme yoluyla oluşan keratinositler bir üst tabakaya doğru ilerleyerek yukarıya doğru göç ederler. Bu göç, hücre olgun keratinize bir hücre olunca sona erer ve hücre deri yüzeyinden dökülür.




Şekil 1.1. Deri tabakalarının gösterimi, A) İnce deri, B) Kalın deri, Epi: Epidermis, Derm: Dermis, SB: Stratum bazale, SC: Stratum korneum, SGr: Stratum granülozum, PL: Papiller tabaka, RL: Retiküler tabaka, D: Ter bezi kanalı (Ross ve Pawlina, 2014)

Epidermisin stratum basale tabakasının bir üstündeki tabaka en az birkaç hücre kalınlığındaki stratum spinozum tabakasıdır. Buradaki keratinositler stratum bazaledekilerden daha büyük olup birçok sitoplazmik uzantı ya da dikensi yapı sergilemektedirler. Bu dikensi uzantılar komşu hücrelerin benzer uzantılarına desmozomlar aracılığıyla bağlanmaktadırlar. Desmozom bölgesi ışık mikroskobunda Bizzozero düğümü olarak isimlendirilen hafif bir kalınlaşma olarak görülmektedir. Bu tabakadaki dikensi hücreler olgunlaşıp yüzeye doğru ilerledikçe boyutları artar ve yüzeye paralel bir düzlemde yassılaşırlar. Buradaki hücrelerin çekirdekleri, oval şekil yerine yassılaşıp uzamaya başlayarak skuamöz hücre şekli kazanırlar.

Epidermisin en yüzeydeki keratinize olmamış tabakası olan stratum granülozum, 1-3 hücre arasında değişen kalınlıktadır. Bu tabakadaki keratinositler çok sayıda keratohiyalin granülü içerir. Bu granüller sistin ve histidin bakımından zengin proteinler içermekte olup bu proteinler, stratum korneumun boynuzsu hücrelerinde bulunan keratin filamentlerini küme haline getiren filagrin proteininin prekürsörleridir.

Stratum granülozumun çekirdekli hücreleri ve stratum korneumun yassı, suyunu ve çekirdeğini kaybetmiş hücreleri arasında genellikle ani bir geçiş olmaktadır. Deride en fazla farklılaşmış hücrenin bulunduğu tabaka stratum korneumdur. Bu tabakadaki hücreler çekirdeklerini ve sitoplazmik organallerini kaybederek neredeyse tamamen keratin filamentlerinden oluşmaktadırlar. Buradaki boynuzsu keratinize hücrelerin kalın plazma membranları, bu tabakanın derin kısmında bir ekstraselüler lipid tabakası ile kaplanır. Bu lipid tabakası epidermisteki su bariyerinin temel bileşenini meydana getirmektedir. Stratum korneumun kalınlığı, ince ve kalın derinin epidermisi arasındaki temel farklılığı oluşturmaktadır.

Bazı histologlar tarafından stratum korneumun bir alt tabakası olarak kabul edilen stratum lusidum sadece kalın deride belirgindir. Bu tabaka keratinizasyon sürecinin çok ilerlemiş olduğu eozinofilik hücreleri içermektedir. Aşamalı olarak bu tabakadaki hücreler keratinle dolarken, çekirdek ve sitoplazmik organelleri parçalanıp ortadan kalkar.

#### 1.5.2.2. Dermis

Epidermis tabakasının hemen altında dermis tabakası bulunmaktadır (Şekil 1.1). Epidermis tabakasının dermise tutunması iki doku arasındaki arayüzün genişlemesi ile arttırılmaktadır. Dermis papiller tabaka ve retiküler tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Papiller tabaka en yüzeydeki tabakadır ve epidermisin hemen altındaki gevşek bağ dokusundan meydana gelmektedir. Papiller tabakada bulunan kollajen fiberleri retikular tabakada bulunanlar kadar kalın değildir. Bu ince ağ temel olarak tip I ve tip III kollajen moleküllerini içermektedir. Elastik fiberler de iplik gibi ince olup düzensiz bir ağ oluşturmaktadır. Papiller tabaka dermal papillar, dermal çıkıntıları ve epidermisi destekleyen, fakat içine girmeyen kan damarlarını içermektedir. Bu tabaka aynı zamanda dermiste sonlanan ya da epitel yapıya girmek için bazal laminayı penetre eden sinir uzantılarını da içermektedir.

Papiller tabakanın derinlerinde bulunan retiküler tabakanın kalınlığı vücudun farklı bölümlerinde değişkenlik gösterir, buna rağmen daima papiller tabakaya göre kalındır ve daha az hücre içermektedir. Bu tabaka çoğunlukla kalın ve düzensiz olan tip I kollajen demetleri ve kalın elastik fiberlerden meydana gelmektedir. Kollajen ve elastik fiberler Langer çizgileri olarak adlandırılan düzenli gerilim çizgileri

oluşturmaktadırlar. Langer çizgilerine paralel yapılan deri kesilerinin en az skar oluşumu ile iyileştiği bilinmektedir.

Retikular tabakanın altında adipoz doku tabakaları, düz kas tabakaları ve bazı bölgelerde çizgili kas tabakaları yer almaktadır. Retikular tabakada bulunan adipoz doku tabakası olan pannikulus adipozus tabakası ana enerji deposu olarak hizmet etmekte ve aynı zamanda ısı yalıtımını da sağlamaktadır. Pannikulus adipozus tabakası özellikle soğuk iklimlerde yaşayan kişilerde kalındır. Adipoz dokusu ve beraberindeki gevşek bağ dokusu birlikte hipodermisi (subkutan fasiya) meydana getirmektedir.

Kıl foliküllerinin derin kısımlarını yüzeyel dermise bağlayan arrektör pili kasları dermisten kaynaklanan düz kas hücreleri ya da küçük düz kas hücre demetlerinden oluşmaktadır. İnsanlarda bu kasların kasılması, kılların ereksiyonuna ve deri buruşukluğuna (kaz derisi) yol açmaktadır.

Birçok hayvanda subkutan fasiyanın derinlerinde bulunan pannikulus karnozus çizgili kaslardan oluşan ince bir tabakadır. Bu ince tabaka insanlarda büyük oranda körelmiş olmasına rağmen boyun, yüz derisi ve saçlı deride belirgin olarak bulunmaktadır, bu bölgelerde platisma kası ile diğer yüz ifadesi kaslarını oluşturmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

### 1.5.3. Yara ve yara iyileşmesi

Yara çok sayıda hastayı etkileyen ve yaşam kalitesini düşüren bir etmendir. Dünya'da yaklaşık 6 milyon kişinin özellikle kronik yaralardan şikayetçi olduğu tahmin edilmektedir (Özkorkmaz ve Özay, 2009; Emilia de Abreu Chaves ve diğ., 2014). Yara, vücut dokusu sürekliliğindeki bir çeşit kesinti olarak ifade edilebilir. Çeşitli fiziksel, kimyasal ve mekanik travmalarla ya da tıbbi müdahalelerle meydana gelebilir. Deri yaraları yetişkinlerde nispeten yaygındır ve popülasyonda görülme oranı yaşam beklentisindeki gelişmelerle paralel olarak artar (Emilia de Abreu Chaves ve diğ., 2014).

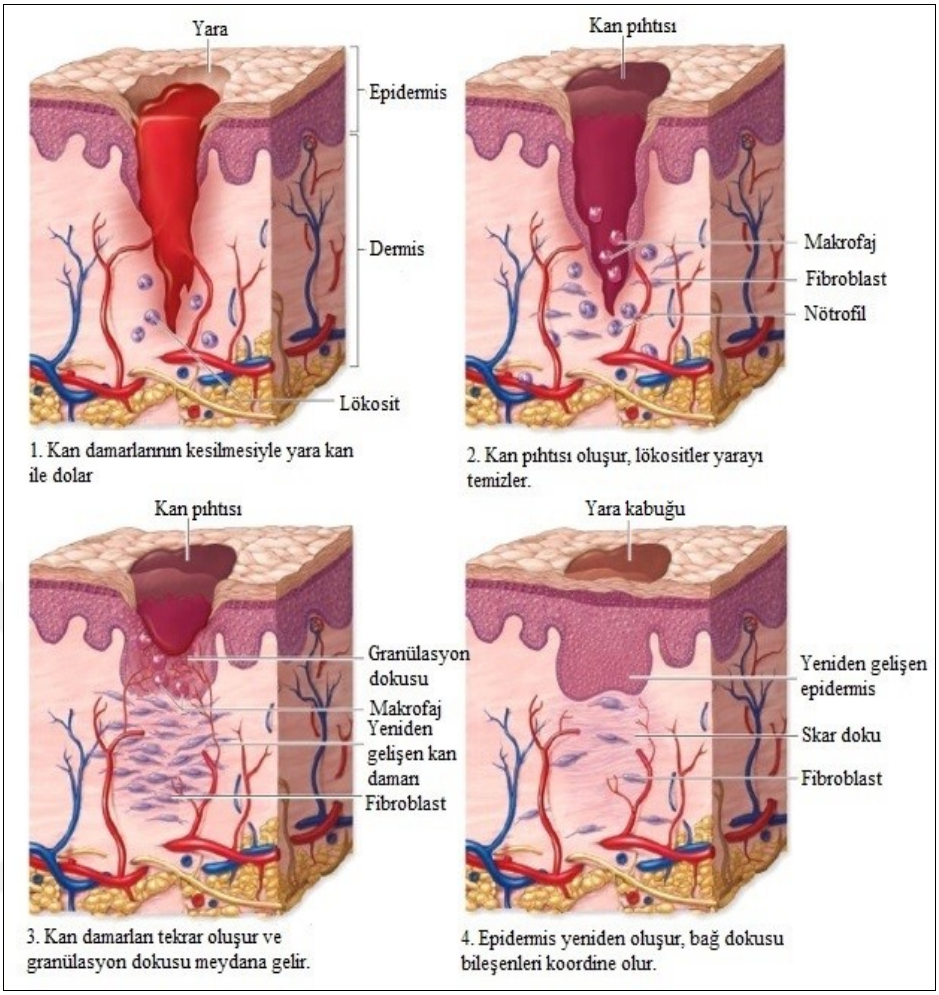
Yara iyileşmesi enflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (remodeling) olmak üzere üç klasik fazda ifade edilen ve birçok hücrenin görev aldığı sistematik bir süreçtir

(Tablo 1.3). Enflamasyon fazı süresince fagositik hücreler yara almış dokuyu debride ederler. Proliferasyon fazında ise epitelizasyon, fibroplazi ve anjiogenez meydana gelir. Bu arada olgun granülasyon dokusu oluşur ve yara küçülmeye başlar. Son olarak, olgunlaşma fazında kollajen skar doku dayanıklılığını arttıran protein molekülleri ve diğer kollajenlerle sıkı bağlar yapar ve yara iyileşme aşaması tamamlanır (Şekil 1.2) (Özkorkmaz ve Özay, 2009; Emilia de Abreu Chaves ve diğ., 2014; Osman ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 1997; Posten ve diğ., 2005; Colombo ve diğ., 2013; Brett ve diğ., 2008).

Tablo 1.3. Yara iyileşmesinde görev alan hücreler (Özkorkmaz ve Özay, 2009)

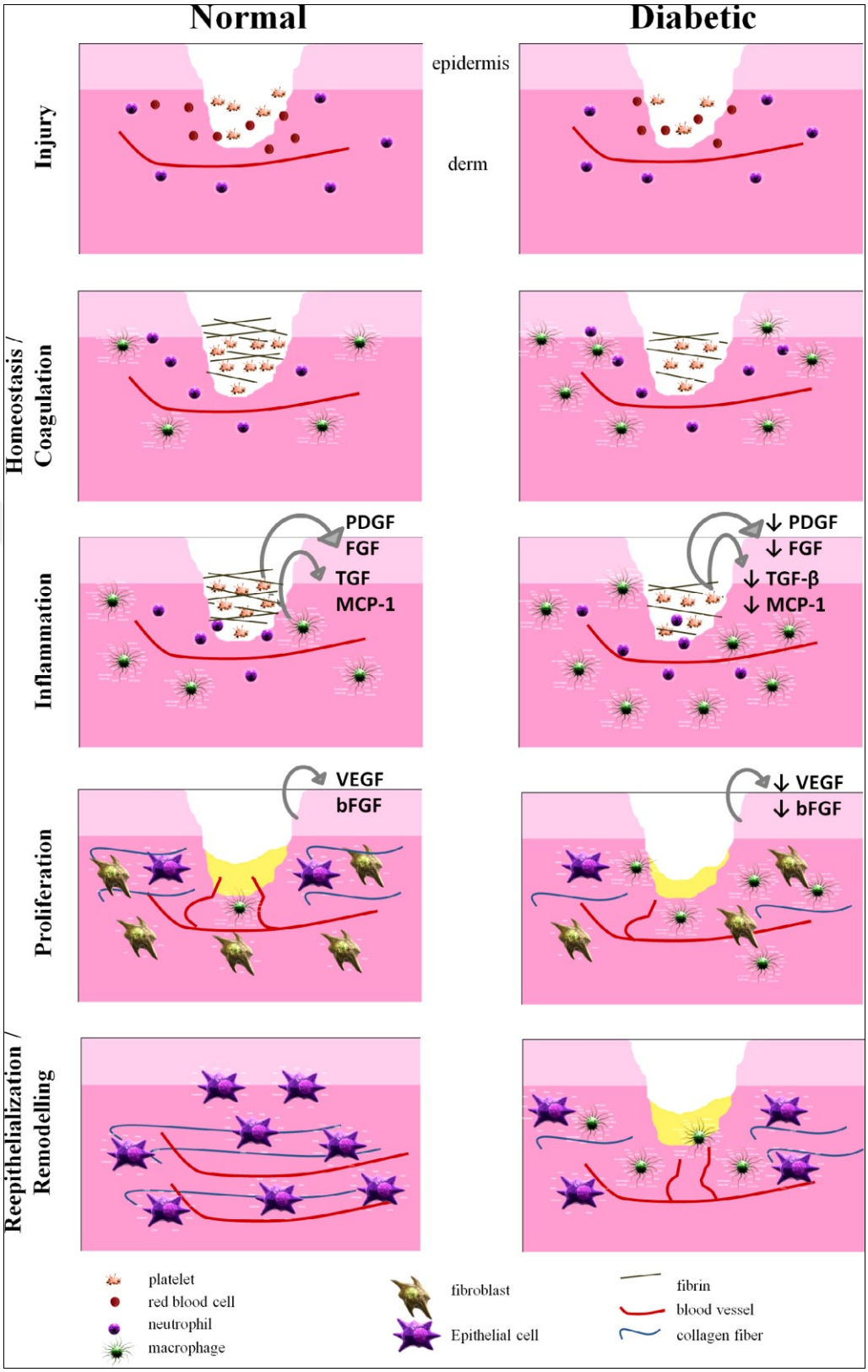
| Yara iyileşmesinde evreler | Yaralanmadan sonraki günler | Görev alan hücreler |
|---|---|---|
| Homeostaz | Hemen | Trombositler |
| Enflamasyon | 1-4 gün | Nötrofiller-makrofajlar |
| Proliferasyon | 4-21.gün | Makrofaj, lenfosit, fibroblastlar, |
| Granülasyon | | nörositler, keratinositler |
| Kasılma | | |
| Olgunlaşma | 21.gün-2 yıl | Fibrositler |

Vasokonstriksiyon (damar büzülmesi) periyodu, doku yaralanmasından sonra gözlemlenen kızarıklık, ödem ve ateşe sebep olan vasodilasyon (damar genişlemesi) periyoduyla devam eder. Vasodilasyon, kan akışını hızlandırarak cansız yara dokusunu parçalayan ve enfeksiyonla savaşan enflamasyon hücreleri ve faktörlerin gelişini kolaylaştırmaktadır. Enflamasyon fazı yara oluşumundan saatler sonra başlar. Nötrofiller yara oluşumundan sonraki ilk 48 saat içerisinde en çok bulunan hücre tipleridir. Yara iyileşmesinde en gerekli hücrelerden biri de bakteri ve kalıntıları fagosite eden makrofaj hücreleridir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) gibi çeşitli peptit-büyüme faktörlerinin hücresel proliferasyonu ve hücre dışı matriks sentezini uyardığı gözlemlenmiştir. Sitokinler de fibroblast ve düz kas hücrelerinin gelişimini ve kemotaksisi uyarırlar. Son olarak makrofajlar yaraya endotel hücrelerini yönlendiren maddeleri salgılar ve anjiyogenez için bu hücrelerin gelişimine katkıda bulunurlar.




Şekil 1.2. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi (URL-3)

Granülasyon dokusunun oluşumu yara iyileşmesinin en temel basamağıdır. Proliferasyon fazı boyunca fibronektin, kollajen, glikozaminoglikanlar ve proteoglikandan oluşan matriksте enflamasyon hücreleri, fibroblastlar ve yeni oluşmuş kılcal damarlar görülür. Granülasyon doku oluşumu yara oluşumunu izleyen 3-5 günde gerçekleşir ve enflamasyon fazından hemen önce meydana gelir. Yeni damar oluşumu vasküler endotel büyüme faktörü, anjiyogenin ve anjiyotropin gibi çeşitli anjiyogenik faktörlere bağlıdır. Fibroblast granülasyon dokusunun en kritik bileşenidir. Enflamasyon hücrelerinin sayısı azalırken yarada fibroblastlar büyümeye başlar. Fibroplazi yara oluşumundan sonraki 3-5 günde başlar ve 14 gün boyunca sürer. Yarada doku eksikliğinin kapanmasını kolaylaştıran kontraksiyon yara oluşumundan sonra maksimum 5-15 gün sürer.




Şekil 1.3. Normal ve diyabetik bireylerde yara iyileşmesi (Moura ve diğ., 2013)

Epitelizasyon; çıplak yüzey üzerinde epitel oluşumudur. Bu epitel tabaka yara üzeri ve etrafındaki çevre arasındaki bağı sağlar. Bu basamak dokuda yara oluştuktan saatler sonra başlar. Yara kenarındaki epitel hücreler, diğer epidermal ve bazal membran bağlantılarından onları ayıran yapısal değişiklikler meydana getirir. Olgunlaşma fazı süresince oluşan kollajenin tekrar düzenlenmesi devam eden kollajen sentezine bağlıdır. Bu aşama süresince kollajen organize olur ve fibronektin, hyaluronik asit ve glikozaminoglikanlar büyük ölçüde ortadan kaybolurken yerini proteoglikanlar alır. Bu olanlar kollajen fibrillerinin birbirleriyle çapraz bağlar yapmasını sağlarken skar doku kalınlığının azalmasına sebep olur. Olgunlaşma fazı yaralanma öncesi doku bütünlüğü sağlanıncaya kadar, hatta yıllar boyunca sürebilir (Özkorkmaz ve Özay, 2009; Osman ve diğ., 2013).

Akut yaralar genellikle farklı iyileşme basamakları aracılığıyla düzenli olarak ilerlerken diyabetik hastalardaki iyileşme sürecindeki bir ya da birden fazla basamak aksadığı için bu zaman çizelgesi izlenemez. Geçici ya da kalıcı sinir doku hasarı olarak tanımlanan kronik diyabetik nöropati, azalan kan akışı ve yüksek glisemik seviyesinden dolayı oluşan periferik sinir fibrillerinin ilerleyici kaybıyla karakterize edilen genel diyabet komplikasyonlarındandır. Hiperglisemiye maruz kalma süresi ve yoğunluğu nöropati şiddetini önemli derecede etkiler. Diyabetik nöropati etkilediği vücut kısmına göre periferal, otonomik, proksimal veya fokal olarak sınıflandırılabilir. Tip 1 ve tip 2 diyabetlilerin her ikisinde de görülen bir durumdur ve özellikle yaşlı bireylerde sıkça görülür. Bazı hastalarda nöropati çok erken evrelerde görülürken bazılarında hiç görülmeyebilir. Ortalama olarak nöropati semptomları diyabet tedavisinin 10-20. yılında görülmeye başlar ve diyabetik hastaların % 50'sinde bazı uzuvlarda sinir hasarı gelişir.

Diyabetik nöropati ve periferal vasküler hastalıklar diyabetik ayak ülserlerinin temel sebebidir. Bu iki faktör tek başına ya da birlikte ya da eklem hareketliliğini sınırlandıran ve enfeksiyona karşı hassasiyeti arttıran mikrovasküler hastalıklar ve biyokimyasal anomaliler ile birlikte rol oynayabilir. Yapılan bazı araştırmalar diyabetik ayak ülserlerinin iyileşmesiyle ilgili zorlukların metalloproteinazların (MMPs) aşırı ve sürekli aktivitesinden dolayı ve/veya MMP inhibitör seviyesinin azlığından kaynaklanabileceğini göstermiştir. Ayrıca iskemi ve vasküler hastalıklar çoğunlukla yara bölgesine oksijen ve besin sağlanmasını azalttığı için iyileşme

kapasitesini azaltır. Bu durum da bozuk granulositik, kemotaksis ve makrofaj fonksiyonuna sebep olduğu gibi enflamasyonun uzamasına ve neovaskülarizasyon fazının düzensizliğine de neden olur. Bu konular özellikle VEGF ve PDGF gibi büyüme ve anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunda bozuklukların oluşumuna yol açar. Sonuç olarak, nitrik oksit anomalileri, kollajen birikmesi, fibroblastların ve keratinositlerin anormal göç ve proliferasyonu, MMP tarafından hücre dışı matriks proteinlerinin birikiminin ve düzenlenmesinde problemler meydana gelebilir (Şekil 1.3) (Moura ve diğ., 2013).

### 1.5.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yara iyileşme sürecini etkileyen faktörlerden biri büyüme faktörleridir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4. Yara iyileşmesinde görev yapan büyüme faktörleri (Özkorkmaz ve Özay, 2009)

| Büyüme Faktörü | Kaynağı | Görevleri |
|---|---|---|
| Trombositlerce salınan büyüme faktörü (PDGF) | Trombositler, makrofajlar, endotel hücrelerle, fibroblastlar | Fibroblast proliferasyonu, nötrofil ve makrofaj kemotaksisi |
| Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) | Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofajlar | Fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez |
| Epidermal büyüme faktörü (EGF) | Trombositler, tükrük, idrar, anne sütü, plazma | Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, granülasyonun uyarılması |
| İnterlökinler (IL-1, IL-2) | Makrofajlar, lenfosit, birçok doku ve hücre | Fibroblast proliferasyonu, nötrofil kemotaksisi |
| Tümör nekroz faktör alfa (TNF α) | Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler | Fibroblast proliferasyonu |
| Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) | Aktif makrofajlar, trombosit, keratinosit | EGF'ye benzer |

Yara iyileşmesi için vücudun proteinler, karbohidratlar, lipitlerin yanı sıra çinko, A, E, C, D ve K vitaminlerine de ihtiyacı vardır.

Yarada doku gerilimi azsa yara çok daha çabuk iyileşir. Kollajen sentezinde görev yapan prolin ve lizinin hidroksilasyonu için oksijene ihtiyaç vardır. Reaktif oksijen türleri hücre ve dokular üzerindeki etkilerinden dolayı yaralara da zarar verir. Bu reaktifleri deaktive eden serbest radikal süpürücü enzimler yara iyileşmesi sürecininin düzenlenmesinde görev almaktadırlar. Enflamasyon esnasında nötrofiller yara bölgesine hücum etmektedirler. Fakat bu hücrelerde solunum hızlandığından serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Bir yandan fagositik olmayan hücreler de

$NADPH^+$ oksidaz mekanizması ile serbest radikalleri meydana getirirler. Bu yüzden de yara bölgesinde oksijen ve azot içeren reaktif türlerin konsantrasyonu artar. Artan radikaller oksidatif stresten kaynaklı DNA'da kırılmalara ve bazı enzimlerin inaktivasyonuna neden olur.

Radyoterapi ve kemoterapi sırasında protein sentezinin inhibisyonu fibroblast proliferasyonunda azalmaya neden olarak yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Steroid kullanımı da protein sentez hızını azaltarak, enflamatuvar cevabı yavaşlatmakta, anjiyogenezi inhibe etmekte, fibroblast proliferasyonu ve epitelizasyon hızını yavaşlatmaktadır. Ehler-Danlos ve Marfan sendromu gibi bazı genetik ve immunolojik bozukluklar da kollajen yapısında bozukluğa yol açarak yara iyileşmesi sürecini olumsuz yönde etkiler. Son olarak yara gerilimi ve hidroksiprolin düzeyini azaltıcı etkisi olan diyabet hastalığına sahip bireylerde de yaralar zor iyileşmektedir (Özkorkmaz ve Özay, 2009).

### 1.5.5. Yara iyileşmesinde kullanılan yöntemler

#### 1.5.5.1. Yara örtülerinin kullanımı

Yara örtüleri, koruma, iltihapların ve mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi ve iyileşme sürecine katkıda bulunma gibi birçok işlevde kullanılmaktadır (Khil ve diğ., 2003). Yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalar M.Ö. 3000-2500 yıllarında başlamıştır. Bu amaçla ilk olarak bitkilerden yararlanılmış, daha sonra yapışkan eklenen kumaşlarla yaralar sarılmıştır. 1800'lü yıllarda ise gazlı beze yumuşak parafin veya yağ eklenerek yaraya yapışmayan sargılar üretilmiştir. Ancak gazlı bez, ısının yara yüzeyinde korunmasında etkili değildir. Yara yüzeyinde ısının düşmesi lokal vazokonstrüksiyona, hipoksiye, lökosit hareketliliğinin ve fagositik fonksiyonun azalmasına neden olmaktadır. Gazlı bez mikroorganizmaların geçişini de engelleyememektedir. 1969 yılında polietilen film sargı kullanılırken 1980'li yılların başında polimerlerin yara örtüsü olarak kullanımı yaygınlaşmaya başlamış ve son yıllarda da sentetik ve yarı-sentetik ürünlerin sayısı hızla artmıştır (Gürsoy, 2007; Özkaynak ve diğ., 2005). Ülkemizde de bu tür malzemeler kanamaların durdurulmasında (Brown ve diğ., 2009; Wedmore ve diğ., 2006), diş ve diş eti hastalıklarının tedavisinde (Matthew ve diğ., 1993), diyabetik ayak yaraları (Moura

ve diğ., 2013; Merrell ve diğ., 2009; Shi ve Ronfard, 2013) ve deri hasarlarının onarılmasında (Niiyama ve Kuroyanagi, 2014) sıklıkla kullanılmaktadır.

Yara iyileşme süreci birçok basamaktan oluşan kompleks bir mekanizmadır. Vücudumuzdaki en bol proteinlerden biri olan kollajen bu süreçteki en etkin moleküllerden birisidir. Kollajen, biyouyumluluk ve biyobozunur özelliklerinden dolayı yıllardır doku mühendisliği ve ilaç salımında kullanılmaktadır (Ambati ve diğ., 2013; Ibusuki ve diğ., 2007). Kollajenin modern bir biyomalzeme olarak kullanımı koyun ince bağırsağından hazırlanmış kollajence zengin bir biyomalzeme olan biyobozunur dikiş ipinin üretilmesiyle başlamıştır (Chattopadhyay ve Raines, 2014). Kollajenin yapısal destek olarak görev aldığı düşünülmüş ve kollajen ve kollajen-temelli fragmentlerin hücre şekli ve farklılaşması, hücre göçü ve çeşitli proteinlerin sentezi gibi birçok hücresel işlevi kontrol ettiği ispatlanmıştır (Brett, 2008). Kollajen aynı zamanda hücre dışı matriksin biyolojik ve yapısal bütünlüğünün devamlılığında rol oynar ve hücresel davranış ve doku fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlayan dinamik ve esnek bir malzemedir. Biyobozunur olan ve toksik etkisi olmayan ekzojen kollajen, diğer doğal polimerlere göre daha fazla biyouyumludur ve çok az miktarlarda antijeniktir (Chattopadhyay ve Raines, 2014). Bu olumlu özelliklerine rağmen zayıf mekanik özelliklerinden dolayı kollajenin uygulama alanları sınırlıdır. Kollajenin doku mühendisliği ve ilaç salımı ile ilgili uygulamalarını arttırmak için stabilite ve biyouyumluluk özelliklerini kaybetmeden fizikokimyasal özelliklerini geliştirecek yeni metotların bulunması gerekmektedir (Ambati ve diğ., 2013).

Kollajenin proteolitik direncini ve gerilme kuvvetini arttırmada kullanılan en etkili yöntem kollajenin çapraz bağlanmasıdır. Bu yöntemle *in vivo*'da kollajenin bozunma hızı da kontrol altında tutulur. Kollajenin çapraz bağlanması kimyasal, fiziksel ve enzimatik yollarla yapılabilir. Kollajen kimyasal olarak formaldehit, gluteraldehit, karbodiimitler, poliepoksi bileşikler, asil azidler ve hekzametilen diisosiyanat gibi bileşiklerle çapraz bağlanabilir. Kimyasal olarak çapraz bağlama yöntemiyle stabilite arttırılabilmesine rağmen *in vivo*'da yıkımı sonucunda oluşan elektrofilik ayıraçlar ve bileşikler toksik olabilmektedir. Fiziksel çapraz bağlama metodu ile 254 nm dalga boyundaki ışığa ya da 150°C'de dehidrotermal uygulamaya maruz bırakılarak da kollajenin mekanik özellikleri geliştirilebilir. Son zamanlarda vitaminlerle ($B_2$ ve C

vitamini) kollajenin çapraz bağlanabileceğine dair çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır. Askorbik asit ve türevlerinin, dermal-epidermal bölgedeki tip IV ve VII kollajen, prokollajen I ve III ve tenascin C gibi çeşitli bazal membran proteinlerinin depolanmasını hızlandırdığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi büyüme faktörleriyle birlikte kullanımı fibroblastlardan hepatosit büyüme faktörü (HGF) salımını da arttırmaktadır. Salgılanan HGF de yapıda damarlanmayı sağlamaktadır. Askorbik asit ve türevlerinin doku tamirine de etkisi vardır (Shi ve Ronfard, 2013; Zhang ve diğ., 2003). Bu derece yararlı bir vitaminin son zamanlarda hücrelere zararı olmayan mavi ışık ile birlikte kullanımı sayesinde kollajeni çapraz bağlayabildiği saptanmış ve literatürde de bu yönteme yer verilmiştir. Hem askorbik asitin hem de mavi ışığın canlı hücrelere zarar vermemesi, kollajenin hücreler ile birlikte, hücreleri doğal dokudaki gibi çevreleyerek çapraz bağlanmasına olanak vermektedir. Bu yöntemle derinin dermis tabakasında yer alan fibroblastların kollajen jel içinde hapsedilmesi ile deri iyileşmesinde bir problem olarak görülen büzüşmenin gerçekleşmediği saptanmıştır (Ibusuki ve diğ., 2007). Çapraz bağlama sayesinde kollajenin zaten az olan antijenisitesi daha da azaltılabilmektedir.

#### 1.5.5.2. Düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT)

1960'lardan beri fototerapi ya da Düşük Seviyeli Lazer Terapisi (LLLT) romatoid artrit, korneal ektazi, dental hastalıklar, yara iyileşmesinin hızlandırılması ve ağrıların giderilmesi gibi birçok farklı tıp uygulamasında kullanılmaktadır (Emilia de Abreu Chaves ve diğ., 2014; Osman ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 1997; Colombo ve diğ., 2013; Hawkins ve Abrahamse, 2007; Kawalec ve diğ., 2004; Medrado ve diğ., 2003; Basso ve diğ., 2012; Almeida-Lopes ve diğ., 2001; Capon ve diğ., 2001; Houreld ve Abrahamse, 2008; Hakki ve Bozkurt, 2012; Wang ve diğ., 2014). Fototerapi aynı zamanda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, yaraların ödem boyutunun azalmasında, enflamasyon hücreleri ve lizozomal enzimlerin salımında etkili olduğu gibi kalıntıların atımını da kolaylaştırarak yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynar (Basso ve diğ., 2012). Düşük seviyeli lazer uygulaması, geniş kullanımından beri FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından doku

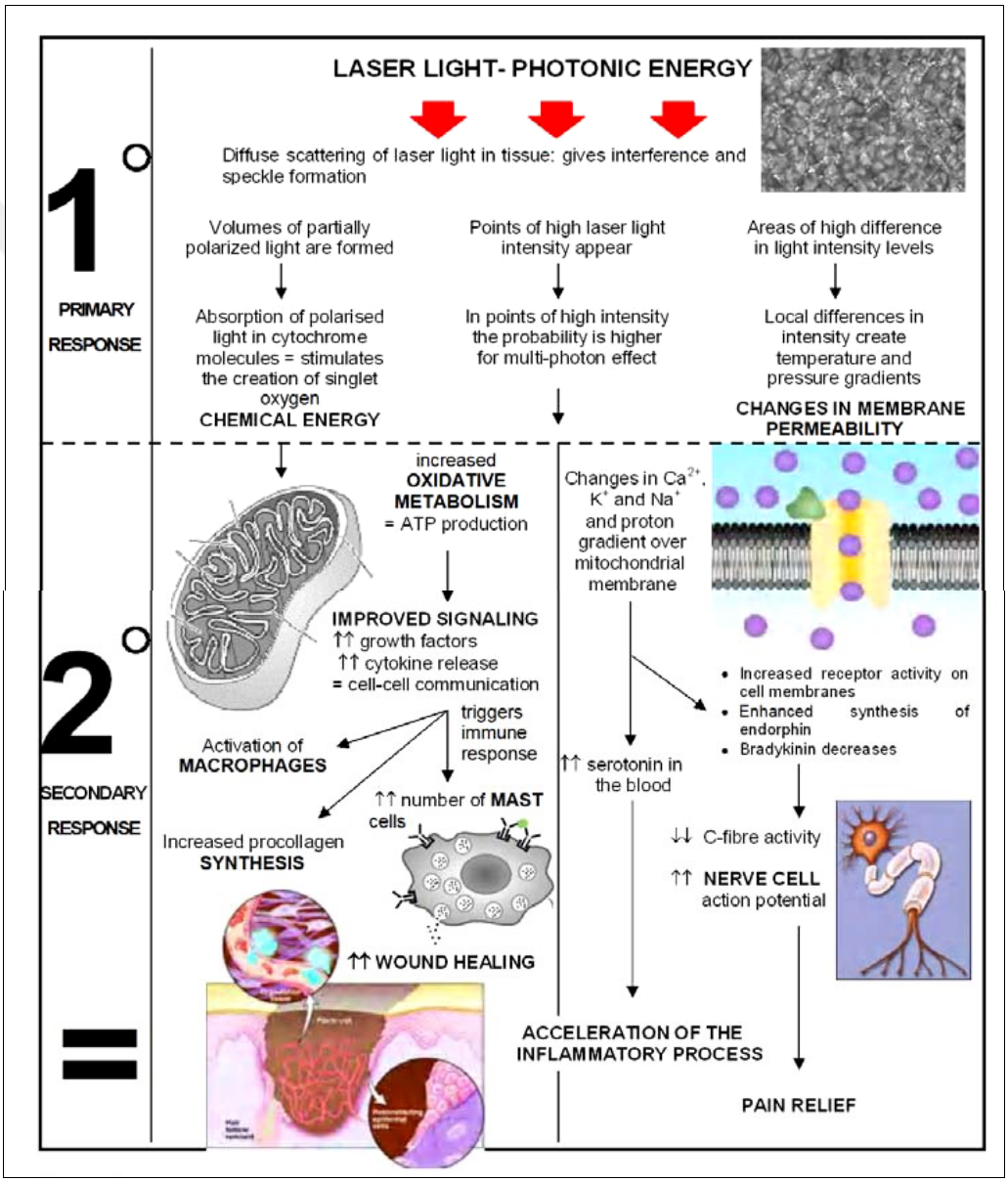
onarımında kullanılan etkili kimyasal uygulamalardan biri olarak kabul edilmiştir (Osman ve diğ., 2013).

Genel olarak lazerler rezonans optik kavite ve katı, sıvı ve gaz malzemeler gibi farklı aktif ortamlardan meydana gelir. Bu lazerler helyum-neon, galyum-arsenit, galyum-alüminyum-arsenit (GaAlAs), Nd:YAG, $CO_2$, yakut ve argon lazerleridir (Kawalec ve diğ., 2004). Lazerde kullanılan dalga boyları 300 -10.600 nm, güç $10^{-3}$-$10^{-1}$ W, atım sıklığı 0-500 Hz, atım süresi ve atım aralığı 1-500 milisaniye, toplam ışıma 10-3000 saniye, yoğunluğu $10^{-2}$-100 $Wcm^{-2}$ ve doz aralığı $10^{-2}$-$10^{2}$ $Jcm^{-2}$'dır. Yara iyileşme sürecinde en çok kullanılan lazerlerin dalga boyu aralığı ise 532-1064 nm arasında değişirken uygulama dozu 0.09-90 $J/cm^2$'dir (Emilia de Abreu Chaves ve diğ., 2014). Bu lazerlerden genellikle fibroblast ve keratinosit çoğalması için 780 nm dalga boyundaki lazerler kullanılırken (Basso ve diğ., 2012; Grossman ve diğ., 1998) anjiyogenez için 660 nm dalga boyundaki lazerler (Colombo ve diğ., 2013) tercih edilir.

Fototerapinin hücresel etkileri birincil (ışık-kaynaklı), ikincil (birincil etkilere tepki olarak) ve üçüncül etkiler olarak sınıflandırılabilir. Birincil reaksiyonlar genellikle fotonların absorpsiyonuyla sınırlıyken ikincil etkiler hücrelerin hassasiyetine bağlı olarak gerçekleştiğinden birincil etkilere göre daha az tahmin edilebilir sonuçlar yaratmaktadır. Üçüncül etkiler ise hücreler arası etkileşimler ve iç ve dış çevrenin etkilediği tepkilerle alakalıdır. Üçüncül etki sistemik tepki olarak da bilinir ve bir lezyona yapılan uygulamanın niçin hastadaki diğer lezyonlar ve bu lezyonun iyileşmesini uyardığını da açıklar (Şekil 1.4).

Birincil etkilerde lazerden yayılan fotonlar, fotonik enerjinin kromoforlar (mitokondriyal kromoforlar, porfirin ve flavoproteinler) tarafından absorplandığı yer olan hücre (fibroblast, keratinosit ve endotel hücreler) membranlarına ve mitokondrilere ulaşır. Bu fotonik enerji burada kimyasal kinetik enerjiye dönüştürülür. Bu durum membran geçirgenliğinde değişime, mitokondri, nükleus ve sitozol arasındaki sinyalin gelişmesine, nitrik asit oluşumuna ve oksidatif metabolizmanın artmasına sebep olarak daha fazla ATP üretilmesini sağlar. Üretilen bu fazladan enerji de hücre fonksiyonlarının gerçekleşmesi, ağrıların giderilmesi ve yara iyileşmesi süreçleri için harcanır.

İkincil reaksiyonlar birincil fotoreaksiyonların amplifikasyonlarına yol açar. Ardı ardına gelen metabolik etkiler hücre membran geçirgenliğinde değişiklik gibi hücresel seviyede çeşitli fizyolojik değişimlere neden olur. Hücre göçü, protein salımı ve hücre gelişimi gibi yara iyileşmesinde ihtiyaç duyulan önemli olaylardan sorumlu sinyal basamaklarının düzenlenmesi ve hücre metabolizmasını uyaran hücre içi kalsiyum seviyesindeki değişikliklerle mitokondriden sitoplazmaya kalsiyum salınır.




Şekil 1.4. Lazerin hücreye etkisinin şematik görünümü (Hawkins ve Abrahamse, 2007)

Üçüncül etkiler ikincil olayların olduğu hücrelerden uzaktaki hücrelerde meydana gelir. Işınlanmış ya da enerji seviyesi yükselmiş hücreler, sitokin ya da büyüme seviyesinin artmasıyla ışınlanmamış hücrelerle ve diğer hücrelerle iletişime geçer. T-lenfositler, makrofajlar ve mast hücrelerinin aktivasyonuyla bağışıklık tepkisinde bir artış olur. Endorfin sentezindeki artış ve bradikinin azalışı ağrıların giderilmesini sağlar.

Sitokrom c oksidazın absorpsiyon spektrumuyla biyostimülasyonun aktif olduğu spektrum arasındaki ilişki değerlendirildiğinde kızıl ve kızılötesi (IR) bölgelerde önemli derecede benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Sitokrom c oksidaz enziminin tüm oksidasyon durumları, farklı absorpsiyon spektrumuna sahiptir ve bu da düşük seviyeli lazer terapisinin etkin olduğu spektrumdaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Fototerapi için önemli olan dalga boyu aralığı (600-860 nm) 4 aktif bölgeye sahiptir ancak pik pozisyonları tüm aktivite spektrumları için tam olarak aynı değildir. Kızıl bölgedeki pik pozisyonları 613,5 ve 623,5 nm arasındadır (tek bir spektrum seçilecekse 606 nm). Kızılötesinde 750,0-772,3 nm ve 812,5-846,0 nm olarak iki pik bölgesi bulunurken kızıl ve kızılötesi bölgedeki spektrum aralığı 667,5 ve 683,7 nm'dir.

Düşük seviyeli lazer terapisinde etkili olan başka mekanizmalar da olabilir. Porfirin gibi belirli moleküller foton absorpsiyonundan sonra uzun-ömürlü üçlü duruma dönüştürülebilir. Bu üçlü durum reaktif oksijen türevlerinin üretimine yol açarak enerji transferiyle temel enerji düzeyindeki oksijenle etkileşime geçebilir. Diğer önerilen mekanizmada ise, mitokondriyal metabolizmanın değişimi ve süperoksit anyonları olan $O_2$'nin üretimini de arttıran solunum zincirinin aktivasyonu söz konusudur. Lazer ışımasının nitrik oksit aracılığıyla sitokrom c oksidazın inhibisyonunu tersine çevirebildiği ve böylece solunumla daha fazla ATP sentezinin olmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Fototerapiyi etkileyen bazı kilit faktörler yüzeysel yaralar ya da deri yaraları ve kas-iskelet yaralanmalarında daha etkili bir tedavinin olmasına yardımcıdır (Şekil 1.5). Bu faktörlerden bazıları aşağıdaki gibidir;

Lazerler: Diyot lazerler Helyum-Neon (HeNe, 632,8 nm) lazerlerinden daha kısa bağdaşım boylu ışığı yayar ve 633 nm diyot lazerden ışığın biyolojik etkileri HeNe

lazerinkinden daha belirgindir. Diyot lazer daha yüksek güç çıkışı (25-50 mW) ve daha yüksek dozlar kullanarak benzer sonuçları elde edebilir.

Dalga boyu: Dalga boyu; dalganın iki piki arasındaki uzaklığa denir. Dalga boyunun sembolü λ (lambda)'dır ve ölçüm birimi nanometre (nm)'dir. Lazer ışığının penetrasyonu kullanılan uygulama tekniğine, çıkış gücüne ve dalga boyuna bağlıdır.
Güç: Gücün birimi watt (W)'tır ve lazerin çıkış gücü düşük olduğundan miliwat (mW) olarak ifade edilir. Doku yüzeyindeki huzmenin güç yoğunluğu ya da ışık yoğunluğu, lazer ışığının aydınlattığı hedef dokunun alanına bölünmesiyle elde edilen güç olan mW/cm2 olarak bilinir. Daha güçlü güç çıkışı (mW) uygulama zamanın kısalmasını sağlar.

Enerji yoğunluğu (doz ya da akış): Spot boyu başına (cm2) güç (mW) ve zamanın oranını veren Joules/cm2 (J/cm2) olarak ifade edilir. Güç, zaman, güç yoğunluğu ve uygulama aralıkları uygulanan dozu etkiler, ancak ihtiyaç duyulan doz dalga boyu, doku tipi, hedef dokunun derinliği ve durumu, kronik ya da akut problemler, pigmentasyon ve uygulama tekniğine de bağlıdır. Kızılötesi ışığın etkili dozları özellikle derin yaralar için 10 J/$cm^2$'den yüksek olmasına rağmen biyostimülasyon çalışmalarında 0,001-10 J/$cm^2$ arasındaki dozlar kullanılmıştır. Çok düşük olan dozlar gözlemlenemeyecek kadar zayıf etkiler göstermektedir. En yüksek dozun üzerindeki uygulamalar negatif ya da düşük etkiler göstermiştir. Uygulamada doz çoğunlukla 5 mm ya da daha az çaptaki (0,2 $cm^2$) Joule sayısı olarak tanımlanmaktadır.

Sürekli ve atımlı dalga teknolojisi: Sabit yoğunluktaki ışığı yayan ışık kaynağı sürekli dalga (CW) yayılımı olarak bilinirken atımlı ışıkta yoğunluk değişkendir. Lazer atımlı çalıştırıldığında lazer ışık yoğunluğu, atım pik çıkış gücü ve sıfır arasında değişir. Sürekli dalga lazerleri çıkış gücünü (mW) kullanırken ortalama güç dozu hesaplamak için kullanılır.

Temas ve temassızlık: Lazer, tarama modunda kullanılabildiği gibi basınçlı ya da basınçsız, cilde karşı düz ya da eğimli tutarak, cildin yüzeyiyle temas halinde de kullanılabilir. Lazer sisteminin cilde optimum girişini sağlamak için 90 derece açıyla ciltle temas halinde olmalıdır (Hawkins ve Abrahamse, 2007)

| | MİNİMUM UYGULAMA | MAKSİMUM UYGULAMA |
|---|---|---|
| Doz ya da Enerji Yoğunluğu | Yüzeysel yaralar | Kas-iskelet sistemi ağrısı |
| | Açık yara J/cm$^2$<br>HeNe, 632,8 nm 0,5-1,5<br>630 nm-700 nm diyot 0,5-1,5<br>904 nm GaAs 0,01-0,2<br>Yara çevresi<br>HeNe, 632,8 nm 1-4<br>630 nm-700 nm diyot 2-6<br>904 nm GaAs 1-4<br>Yüzeysel ağrılar<br>HeNe, 632,8 nm 0,5-2<br>630 nm-700 nm diyot 1-4<br>904 nm GaAs 2-4 | Kronik yara J/cm$^2$<br>HeNe, 632,8 nm 3-4<br>Yara çevresi<br>HeNe, 632,8 nm 0,5<br>Derin yalancı ağrı<br>904 nm GaAs 2-5<br>870 nm GaAlAs 4-10 |
| Sürekli vs atımlı | HeNe 632,8 nm–sürekli<br>GaAs 904 nm- atımlı<br>Atımlı: dozu hesaplamak için ortalama çıkış gücünü kullan | GaAlAs 780, 820, 870 nm-sürekli<br>Sürekli: dozu hesaplamak için çıkış gücünü kullan |
| Probun dalga boyu | Yüzeysel yara, <penetrasyon, görünür ışık probu (632,8 nm, 660 nm) | Derin yara, >penetrasyon, kas-iskelet sistemi yarası, kızılötesi prob (904 nm) |
| Temaslı vs temassız | Yara çevresine ve yaradan 1-2 cm 'lik mesafeden uygulanır.<br>Yüzeysel problemler için prob ciltle hafif temas halinde tutulur. | Orta ya da derin problemler için penetrasyon derinliğini arttırmak için prob cilde doğrudan temas halinde basınç uygulayacak şekilde tutulur. |
| Pigmentasyon | Açık ten- daha iyi penetrasyon | Koyu ten- ışığı absorbe eder ve penetrasyonu azaltır. |
| Uygulama alanı | Kas, kemik, bağ-daha iyi penetrasyon | Yağ ya da yüksek oranda damarlı doku-penetrasyonu azaltır. Daha derindeki dokuların daha fazla uygulamaya ihtiyacı vardır. |
| Uygulama aralığı | Akut yaralar ya da kas-kemik yaraları-ilk iki hafta üç günde bir, ardından bir süre haftada bir. | Kronik yaralar-haftada 1-2 kez<br>Enfekte ülserler-enfeksiyon temizlenene kadar haftada 2 kez. |

Şekil 1.5. Fototerapide etkili olan bazı faktörler (Hawkins ve Abrahamse, 2007)

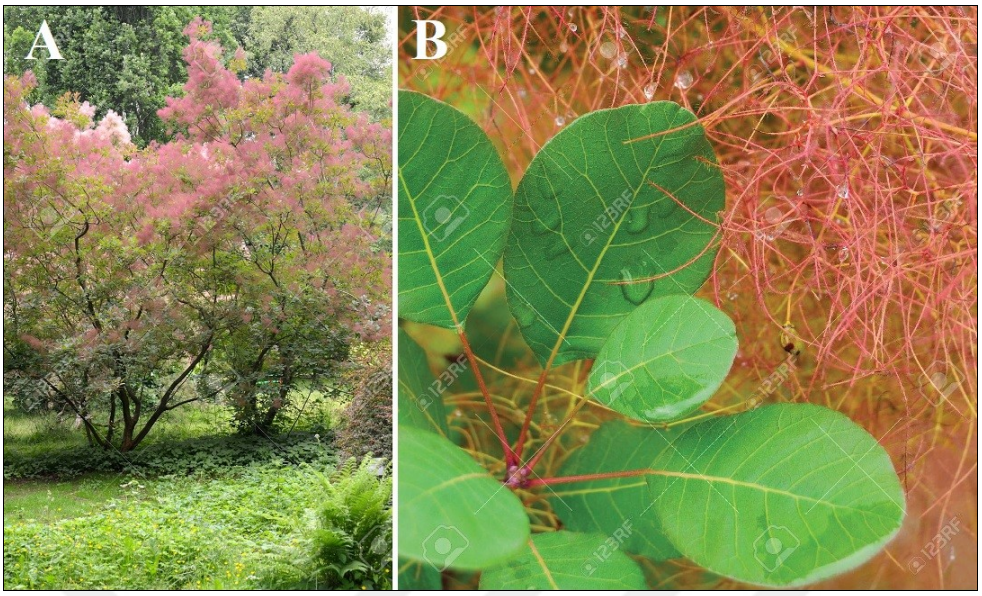
### 1.5.5.3. Yara iyileşmesinde bitkisel tedavi

Yara iyileşmesi ve dokuların oksidatif hasardan korunması için antioksidan içerikli maddelerin kullanımının yararlı olacağı yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır (Özkorkmaz E., Özay, 2009; Singh ve diğ., 2014; Ivanova ve diğ., 2005).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) hasta bireylerin yaklaşık olarak % 80'nin bitkilere dayalı ilaçları kullandığını tahmin etmektedir. Kullanılan bu bitkilerin bir kısmı akut yaraların diğerleri ise kronikleşmiş yaraların tedavisi için uygulanmaktadır (Özkorkmaz ve Özay, 2009).

Yaraların tedavisinde kullanılan birçok bitki vardır. Bunlardan bazıları; *Alternanthera sessilis, Morinda citrifolia, Lycopodium serratum, Sesamum indicum, Catharanthus roseus, Cecropia peltata, Euphorbia hirta, Ginkgo biloba, Clerodendrum serratum, Pterocarpus santalinus, Lawsonia alba, Napoleona imperialis, Kaempferia galangal, Radix paeoniae, Prosopis cineraria* ve *Trigonella foenum-graecum'*dur (Singh ve diğ., 2014).

Tıbbi bitkiler yara iyileşmesinin koagülasyon, enflamasyon, kollajen yapımı, epitel oluşumu gibi çeşitli aşamalarına etki eder (Özkorkmaz ve Özay, 2009). Adetutu ve arkadaşları *Bridelia ferruginea* yaprağından hazırladıkları özütün yarada *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarını engellediğini ve insan dermal fibroblastların gelişimini uyararak hidrojen peroksitin oluşturduğu zararları önlediğini göstermişlerdir (Adetutu ve diğ., 2011). *Astragali radix*'in diyabetik yara modelinde anti-enflamatuvar ve fibroblastları uyarıcı etkiye sahip olduğu, *Rehmanniae radix*'in ise yarada anjiyogenez oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Lau ve diğ., 2012). Fenolik asit, flavonoid ve tannin gibi fenolik bileşikler diyabetik yara iyileşmesinde etkili olan önemli bitki metabolitleridir. Tannin serbest radikal yakalayıcı olarak, flavonoid ve triterpenoidler kanamayı durdurucu ve antimikrobiyal etkileriyle, saponinler de antioksidan ve antimikrobiyal özellikleriyle yara kapanması ve epitelizasyon hızının arttırılmasına yardımcı olurlar. Flavonoidler aynı zamanda antioksidan ve serbest radikal yakalama özellikleriyle granülasyon dokusundaki antioksidan enzimlerinin seviyesini de arttırırlar (Singh ve diğ., 2014).




Şekil 1.6. *Cotinus coggygria* görüntüsü, A) *C. coggygria* ağacının görüntüsü (URL-4), B) *C. coggygria*'nın yaprak ve çiçeğinin görüntüsü (URL-5)

*Cotinus coggygria* da kullanılan tıbbı bitkiler arasındadır. Bu bitki çoğunlukla 5 m yüksekliğe kadar büyüyebilen bir çalı ya da ağaç türüdür. Mayıs'tan Haziran'a kadar çiçek açar. Çiçekler sarımsı-pembe ile pembemsi-mor tüylü, geniş salkım şeklindedir. Toplu halde bakıldığında çiçekler ince duman benzeri bir görünüme sahiptir (Şekil 1.6). *C. coggygria* doğrudan güneş ışığı altında ve ılık koşullarda iyi büyür, neme karşı toleransı yoktur. Daha önce yapılan bir filocoğrafik çalışma, *C.coggygria*'nın yerel adaptasyonla uzun süre hayatta kaldığını göstermiştir (Lei ve diğ., 2015). Ağırlıklı olarak Güney ve Orta Avrupa, Güney Rusya, Kırım, Kafkasya, Lazkiye ve Türkiye'de yetişir. *C. coggygria*'nın Türkiye'deki yerel isimleri; boyacı sumağı, tetre, sarı boya ağacı, sarıcan, sarı yaprak, pamuklu sumak ve duman ağacıdır. Yaprakları, antiseptik, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antihemorajik, yara iyileştirici ve diyareyi önleyici özellikleriyle halk arasında kullanılmaktadır. Özellikle Bulgaristan'da genç dalları ve yaprakları parfüm yapımında kullanılmak üzere terpenik kokulu uçucu yağ üretiminde yararlanılmaktadır. Kökleri deri ve kıyafetlerin sarımsı olarak boyanmasında kullanılır. Farklı deri anomalilerin tedavisi için de pek çok ülkede kullanılmaktadır. Sırp halk hekimliğinde bu bitkinin kaynatılmış kabuğundan kanser tedavisi için faydalanılmaktadır (Marčetić ve diğ., 2013; Matić ve diğ., 2011; Demirci ve diğ., 2003).

*C. coggygria,* başlıca monoterpenler, yüksek oranda hidrolizlenebilir tannin, gallik asit, metil galat, pentagalloyil glukoz, flavonoidler, mirisetin glikositleri, quercetin

ve kaempferol içeren esansiyal yağlardan oluşur. Üç aurone (disulfuretin, sulfuretin ve sulfurein) antioksidan aktiviteye sahiptir (Marčetić ve diğ., 2013).

# 2. MALZEME VE YÖNTEM

## 2.1. İnsan Fibroblast, Endotel ve Keratinosit Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

### 2.1.1.İnsan dermal fibroblast hücre izolasyonu ve karakterizasyonu

Sezeryan ameliyatı sonrası biyolojik atık olarak değerlendirilen, normoglisemik ve tip 2 diyabet donörlerin deri skar dokusu Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun verdiği izinle (Araştırma Protokolünün Kodu: KOÜ KAEK 2015/236) alındı. Dokular laboratuvara % 2 penisilin/streptomisin içeren HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) içerisinde getirildi. Doku steril koşullar altında yağ ve epidermis tabakasından ayrılıp neşter yardımıyla küçük parçalara bölündü. Bölünen doku parçaları 6 kuyucuklu plakalarda eksplant olarak besiyeri (% 5 insan kanı plazması [HP], 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 [DMEM-F12, Gibco]) içinde, 37ºC ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde (N-Biotek NB-203XL) kültüre edildi. Her 3 günde bir besiyeri yenilendi ve yeterli sayıda hücre dokudan çıktıktan sonra % 0,05 tripsin-EDTA (Gibco) kullanılarak kaldırılan hücreler T25 flaska pasajlandı. Yapılacak çalışmalar için pasaj 2-4'teki hücreler tercih edildi. İkinci pasaja gelen fibroblast hücreleri anti-vimentin ile floresan olarak boyanarak görüntülendi. % 4 paraformaldehit (PFA) ile sabitlenen hücreler DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra % 0,1 triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) ile 15 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten sonra hücreler 1 gece boyunca 4°C'de 1:100 seyreltilmiş anti-vimentin birincil antikor çözeltisi (Abcam anti-vimentin antibody [RV203] (ab8979) mouse monoclonal) içerisinde bekletildi. DPBS ile yıkanan hücreler 1:400 seyreltilmiş FITC işaretli ikincil antikor (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG) ile işaretlenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyaması için 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher

Scientific) (1:1000 DPBS içerisinde) ile oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi, DPBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta (Olympus IX53) incelenip fotoğrafları çekildi.

Normoglisemik ve tip 2 diyabetik bireylerin derilerinden izole edilmiş olan dermal fibroblast hücrelerinin ikilenme zamanları da belirlendi. Bunun için pasaj 2-6'daki insan dermal fibroblast hücreleri $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler % 5 insan kanı plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$'li etüvde inkübe edildi. Her bir örnek üç kopya şeklinde çalışıldı. Normoglisemik ve tip 2 diyabetik dermal fibroblast hücrelerinin hücre çoğalması 10 gün süresince her gün WST-1 (Roche, cell proliferation reagent) metabolizma testi yapılarak değerlendirildi. Her bir örnek üç kopya şeklinde çalışıldı. Süre sonlarında insan dermal fibroblast hücreleri % 10 oranında WST-1 solüsyonu, % 5 insan plazması, % 0,1 primosin, 2 U/mL heparin içeren ve fenol kırmızı içermeyen DMEM besiyeri içerisinde 2,5 saat 37°C sıcaklıkta karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 440 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Absorbans sonuçlarıyla hücrelerin üreme eğrileri çizildi. Önceden hazırlanmış kalibrasyon eğrisindeki değerlerle absorbans sonuçları kıyaslandı ve hücre miktarları belirlendi. Ardından ikilenme zamanı Denklem (2.1) ve (2.2) kullanılarak hesaplandı (Madigan ve Martinko, 2012);

$$n = 3{,}3\ [\log N - \log N_0] \quad (2.1)$$

$$g = t/n \quad (2.2)$$

n: Jenerasyonların sayısı

N: Son hücre sayısı

$N_0$: Başlangıç hücre sayısı

t: Bitiş ve başlangıç arasındaki süre

g: İkilenme (jenerasyon) zamanı

### 2.1.2. İnsan göbek bağı veninden endotel hücre (HUVEC) izolasyonu ve karakterizasyonu

Doğum sonrasında, normoglisemik ve tip 2 diyabet donörlerin insan göbek bağı Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun verdiği izinle (Araştırma Protokolünün Kodu: KOÜ KAEK 2015/236) alındı. Dokular % 2 penisilin/streptomisin içeren HBSS içerisinde laboratuvara getirildi. Dokunun dış yüzeyi DPBS tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra ven (toplardamar) içinden HBSS geçirilip pıhtılaşmış kan damar içinden uzaklaştırıldı. Göbek bağının bir ucu göbek klempi ile bağlanıp içine % 0,1 konsantrasyonunda kollajenaz I (Gibco) içeren HBSS çözeltisi dolduruldu ve diğer ucu göbek klempi ile kapatıldı. Bu aşamadan sonra göbek bağı DPBS içeren falkon tüpe yerleştirildi ve çalkalamalı su banyosunda (Wisebath WSB-18) 37°C sıcaklıkta 25 dakika bekletildikten sonra göbek bağının bir ucu kesilerek ven içindeki enzim ve endotel hücreleri bir falkon tüpe alındı. 1500 rpm devirde 20°C'de 5 dakika santrifüj sonrası pellet % 5 insan plazması içeren EGM-2 besiyerinde (2 U/mL heparin, % 0,1 primosin ve % 1 penisilin/streptomisin içeren Lonza EGM-2 Bullet Kit CC-3162) pipetaj ile homojen dağıtılarak bir adet jelatin kaplı T25 flaska aktarıldı ve 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ etüvünde inkübasyona alındı. Her 3 günde bir besiyeri yenilendi. Hücreler 96 kuyucuklu plakaya ekilerek CD31 için immünfloresan (IF) olarak boyandı. % 4 PFA ile sabitlenen hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra % 0,1 triton X-100 ile 10 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten sonra hücreler 1 saat 37°C sıcaklıkta 1:50 seyreltilmiş anti-CD31 birincil antikor çözeltisi (Dako monoclonal mouse anti-human CD31) içerisinde bekletildi. DPBS ile yıkanan hücreler 1:200 oranında seyreltilmiş FITC işaretli ikincil antikor (Alexa fluor 488) ile işaretlenip 1 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyanması için DAPI (1:1000 DPBS içerisinde) ile oda sıcaklığında 5 dakika muamele edildi ve floresan mikroskopta incelendi.

### 2.1.3. Meme derisinden keratinosit hücre izolasyonu ve karakterizasyonu

Normoglisemik ve tip 2 diyabet donörlerin meme derileri Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun verdiği izinle (Araştırma Protokolünün Kodu: KOÜ KAEK 2015/236) alındı. Deriler % 2

penisilin/streptomisin içeren HBSS içerisinde laboratuvara getirildi ve % 2 penisilin/streptomisin içeren DPBS ile temizlenip neşter aracılığıyla yağlarından arındırıldı. Deriler 10 mm genişliğinde kesilerek içerisinde antibiyotikli DPBS olan bir petriye alındı. Epidermis ve dermis tabakasını ayırmak için deri parçaları 50 mL'lik falkon tüplere alınıp üzerine 20 mL % 0,25 tripsin/EDTA (Gibco) ilave edilip 4°C sıcaklıkta bir gece bekletildi. Süre sonunda meme derileri 37°C sıcaklıkta 135 rpm devirde 2 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda dermis ve epidermis kısmı birbirinden ayrılıp epidermis kısmı Cascade besiyerine (Gibco MEPI500CA) alınıp 1 saat 37°C sıcaklıkta 135 rpm devirde inkübe edildi. Ardından hücre solüsyonu 100 µm'lik süzgeçten geçirilip 1500 rpm devirde santrifüj edildi. Keratinosit hücreleri daha önceden HUVEC hücrelerinin salgıladığı hücre dışı ortamı içeren T75 flaska ekildi. HUVEC hücrelerinin ekstraselüler matriksi sayesinde keratinosit hücreleri yüzeye daha kolay tutunabildi. Keratinosit hücreleri % 10 insan plazması içeren Cascade besiyerinde (% 10 insan insan plazması , 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 insan keratinosit büyüme katkısı [Thermo scientific HKGS S0015] içeren) 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatöre kaldırıldı. Her iki günde bir besiyeri tazelendi. İzole edilmiş olan hücrelerin keratinosit hücresi olduğunu kanıtlayabilmek için pasaj 1'deki hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekildi, hücrelere keratinosit hücreleri için spesifik olan anti-sitokeratin 5 immünfloresan boyaması yapıldı. Tutunmuş ve yeterli yoğunluğa gelmiş olan hücreler % 4 PFA ile sabitlenip DPBS ile yıkandı ve % 0,1 triton X-100 ile 15 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten sonra 1:500 oranında anti-sitokeratin 5 birincil antikor çözeltisi (STJ 92636) içerisinde bir gece 4°C sıcaklıkta bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar DPBS ile yıkandıktan sonra 1:200 oranında ikincil antikorda (Alexa fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L), A11036) 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyaması için DAPI içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi, DPBS ile yıkandıktan sonra örnekler floresan mikroskopta incelendi.

İnsan keratinosit hücrelerinin büyüyebileceği en iyi ekstraselüler matriksi belirleyebilmek adına hücreler farklı yüzeylere ekildi. Bunun için 24 kuyucuklu plakaların bir kısmına insan dermal fibroblast hücreleri diğer bir kısmına ise HUVEC

hücreleri ekildi ve kuyucuklardaki hücreler tüm kuyucukları kaplayana kadar hücreler 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ ortamında inkübe edildi. İnsan dermal fibroblast hücreleri için % 5 insan plazması , 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri kullanılırken HUVEC hücreleri için % 5 insan plazması , 2 U/mL heparin ve % 0,1 primosin içeren EGM-2 besiyeri kullanıldı. Kuyucuklar hücreler tarafından tamamen kaplandıktan sonra bir kısım insan dermal fibroblast ve HUVEC hücreleri üzerine laminin 511 kaplaması yapıldı. Sadece laminin 511'in hücreler üzerindeki etkisini inceleyebilmek için boş kuyucuklara da kaplama yapıldı. 37°C sıcaklıkta 1 saat yapılan kaplama sonucunda kuyucuklar 2 kez DPBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa $2x10^4$ keratinosit hücresi ekildi. Hücreler keratinosit büyüme besiyeri (HKGS içeren Cascade medium) içerisinde 37°C sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde 11 gün kültüre edildi. Her 3 günde bir besiyerleri yenilendi. Süre sonunda hücreler % 4 PFA içerisinde sabitlenip ışık mikroskobundan görüntüleri alındı.

İnsan keratinosit hücrelerinin tutunup büyüyebildiği en iyi besiyeri koşullarını belirleyebilmek adına ise hücreler farklı serum ve konsantrasyonlarını içeren besiyerlerinde inkübe edildi. Bunun için 24 kuyucuklu plakalara $2x10^4$ HUVEC/kuyucuk ekilip hücreler tüm kuyucukları kaplayana kadar % 5 insan plazması içeren EGM-2 besiyerinde % 5 $CO_2$ ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklara 1X tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi ilave edilip tüm hücreler patlayana kadar beklendi. Hücreler patladıktan ve kuyucuklar DPBS ile iyice yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 3. pasajdaki $2x10^4$ insan keratinosit hücresi ekildi. Hücrelerin bir kısmı % 5 insan plazması, bir kısmı % 10 fetal sığır serumu (FBS), geriye kalanı ise serumsuz Cascade besiyeri içerisinde 1 hafta süresince inkübe edildi. Her iki günde bir besiyeri yenilendi. İnkübasyonun 4. ve 7. gününde hücrelerin ışık mikroskobunda görüntüleri çekilerek keratinosit hücrelerinin gelişim durumları değerlendirildi. Ayrıca inkübasyonun 7. gününde hücreler % 4 PFA ile sabitlenip anti-sitokeratin 5 için immunfloresan boyama yapılıp örneklerin floresan mikroskopta görüntüleri çekildi.

## 2.2. Tedavi Amaçlı Hidrojel Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

### 2.2.1. Sığır aşil tendonundan kollajen izolasyonu

Hücresel ve bitkisel tedavide kullanılacak olan kollajenli hidrojel içerisindeki atelokollajen sığır aşil tendonundan izole edildi. Öncelikle sığır aşil tendonu fasia dokusundan mekanik olarak temizlendi ve doku parçaları demineralize suda yıkandı, donduruldu ve denatürasyonu önlemek için buz parçaları ile birlikte blendırda daha küçük parçalara ayrıldı. Doku parçacıklarına 1 mg/mL pepsin (Sigma P7125 Pepsin from porcine gastric mucosa) ihtiva eden 0,2 M asetik asit (Merck, $CH_3COOH$) eklendi ve 4ºC'de 90 rpm devirde sürekli çalkalanarak üç gün boyunca bekletildi. Süre sonunda tendonlar süzgeçten geçirildi ve santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınıp 1,8 M sodyum klorür (Sigma, NaCI) çözeltisi eklenerek kollajen çöktürüldü. Elde edilen fibriler kollajen santrifüj sonrası toplandı ve çökelti kısmı diyaliz için alındı. Çöken kollajen 0,5 M asetik asit ($CH_3COOH$) içerisinde çözünüp diyaliz tüplerine (MWCO: 10 kDa) transfer edildi. Devamında diyaliz tüpleri 0,1 M asetik asit içeren çözelti içerisinde 3 gün 4°C sıcaklıkta bekletildi. Süre sonunda 0,1 M asetik asit çözeltisi yerine distile su kullanılıp 4°C'de bir gece bekletildi. Gece sonunda diyaliz tüpleri etrafındaki distile su tazelenerek 8 saat manyetik karıştırıcıda (WiseStir MSH-20D) karıştırıldı. Diyaliz sonunda elde edilen kollajen petri kaplarında toplandı, -80ºC'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde (SCANVAC® Cool Safe) kurutuldu. İzole edilen kollajenin saflığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Bio-Rad Protean System (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) kullanılarak belirlendi. 3 farklı izolasyondan elde edilen kollajenler 2 µg/µL olacak şekilde % 0,02 asetik asit içerisinde çözündü. Kollajenler 2-merkaptoetanollü ve 2-merkaptoetanolsüz olarak hazırlandı. Sığır tendon kollajeni % 90 tip I kollajen ve % 10 tip III kollajenden oluşmaktadır (Zeugolis ve diğ., 2008). Kollajen α1(III) zincirini saptamak için 2-merkaptoetanol eklenerek peptidler arasındaki disülfit bağları koparıldı. 95°C sıcaklıkta 4 dakika denatüre edilen kollajen çözeltileri % 8 poliakrilamid jelde 180 V 55 dakika yürütüldü ve tip I ve tip III kollajenlere özgü bantların varlığı saptandı ve çözelti saflık açısından değerlendirildi.

### 2.2.2. İnsan plasentasından kollajen izolasyonu

Kollajenli hidrojel yapımında denenecek olan kollajenlerden birisi de literatürde (Shah ve Manekar, 2012) belirtildiği şekilde insan plasentasından izole edildi. Öncelikle insan plasentası küçük parçalara ayrılarak DPBS ile yıkandı. Yıkanan plasenta parçaları asitte çözünen proteinleri ekstrakte etmek için 0,5 M asetik asit içerisinde 4°C sıcaklıkta 48 saat bekletildi. Ardından plasenta daha küçük parçalara ayrıldı. Elde edilen karışım 1:1 oranında 0,5 M asetik asit ile sulandırıldı ve 4°C sıcaklıkta 48 saat % 2 pepsin çözeltisiyle muamele edildi. 10 000 rpm devirde 30 dakika santrifüjlenme sonunda elde edilen çökelti içerisine son konsantrasyonu 1,5 M olacak şekilde NaCl ilave edilip çökelti 10 000 rpm devirde 30 dakika santrifüjlendi. Çöktürülen kollajen örnekleri donduruldu. Liyofilize edildikten sonra vakum altında saklandı.

### 2.2.3. Kollajenli hidrojel optimizasyonu

#### 2.2.3.1. Hücresiz kollajenli hidrojelin hazırlanması

Sığır aşil tendonundan ve insan plasentasından izole edilen atelokollajen % 0,05 asetik asit içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanıp farklı hücresiz hidrojel formülasyonları Tablo 2.1.'deki oranlarıyla hazırlanıp solüsyonların pH'ı NaOH ile 7'ye ayarlandı, hidrojel oluşumu makroskopik olarak değerlendirildi. Hücreli hidrojel denemeleri için uygun hidrojel formülasyon ve uygulamaları seçildi.

Tablo 2.1. Hücresiz hidrojel formülasyonları

| Örnek No | Sığır Aşil Tendon Kollajeni (mg/mL) | Hyaluronik Asit (mg/mL) | Askorbik asit (L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Sesquimagnesium Salt Hydrate) (mg/mL) | Askorbik asit (L-Ascorbic Acid) (mg/mL) | Sodyum Aljinat (mg/mL) | İnsan Plasenta Kollajeni (mg/mL) | Uygulama |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1,2 | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 2 | 1,6 | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 3 | 2,4 | 0,1 | - | - | - | - | 15 dk 37°C, 5 dk UV |
| 4 | 4 | 0,1 | - | - | - | - | 15 dk 37°C, 5 dk UV |
| 5 | 6,4 | 0,1 | - | - | - | - | 15 dk 37°C, 5 dk UV |
| 6 | 2 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 15 dk 37°C, 10 dk UV |
| 7 | 3,33 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 15 dk 37°C, 10 dk UV |
| 8 | 5,33 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 15 dk 37°C, 10 dk UV |
| 9 | 5,33 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 120 dk 37°C |

Tablo 2.1. (Devam) Hücresiz hidrojel formülasyonları

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 4 | 0,063 | - | 5 | 1,25 | 1,25 | 15 dk 37°C |
| 11 | 4,57 | 0,071 | - | 5,71 | - | 1,43 | 15 dk 37°C |
| 12 | 5,33 | 0,083 | - | - | - | 1,67 | 150 dk 37°C |
| 13 | 6,4 | - | - | - | - | 2 | 150 dk 37°C |
| 14 | 6,4 | - | - | - | 2 | - | 150 dk 37°C |
| 15 | 5,33 | 0,083 | - | 6,67 | - | - | 150 dk 37°C |
| 16 | 8 | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 17 | 10 | - | - | - | - | - | 10 dk 405 nm diyot lazer, 20 dk 37°C |
| 18 | 5 | 0,0625 | - | 5 | 1,25 | 1,25 | 150 dk 37°C |
| 19 | 5,71 | 0,071 | - | 5,71 | - | 1,43 | 150 dk 37°C |
| 20 | 5,71 | 0,071 | - | 5,71 | 1,43 | - | 150 dk 37°C |
| 21 | 5,71 | 0,071 | 5,71 | - | 1,43 | - | 150 dk 37°C |
| 22 | 6,67 | - | - | 6,67 | 1,67 | - | 150 dk 37°C |
| 23 | 6,67 | - | 6,67 | - | 1,67 | - | 150 dk 37°C |
| 24 | 6,67 | 0,083 | - | 6,67 | - | - | 150 dk 37°C |
| 25 | 6,67 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 150 dk 37°C |

### 2.2.3.2. Kollajenli hidrojelin biyouyumluluğunun belirlenmesi

Hücresiz hidrojel denemeleri sonucunda bulunan en iyi hidrojel formülasyon ve uygulamaları içerisine (Tablo 2.2) insan dermal fibroblast hücreleri gömülerek hidrojellerin hücre üzerine etkileri incelendi. Deneylerde pasaj 2-5 arasındaki insan dermal fibroblast hücreleri kullanıldı, hücre konsantrasyonu 3,3x $10^5$ hücre/mL olarak tercih edildi. Hücreli hidrojel formülasyonları 24 kuyucuklu plakalarda oluşturulduktan sonra hidrojellerin üzerine % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri ilave edildi, 9 gün boyunca kültüre edildi. Hidrojellerin bütünlüğü süre sonunda fotoğraflandı. 9 gün sonunda canlı/ölü hücre boyama testi (Molecular Probes Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells L3224) de yapılarak hidrojel içerisindeki hücrelerin hücre canlılıkları değerlendirildi. Bu testi yapmak için öncelikle hidrojellerin üzerindeki besiyerleri çekilerek hidrojeller 1 kez DPBS ile yıkandı. Ardından hidrojeller 2 mM ethidyum homodimer-1 ve 4 mM calcein AM içeren fenol kırmızısız DMEM besiyerinde, karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Süre sonunda hidrojeller bir kez DPBS ile yıkandı, hidrojel içerisindeki hücrelerin floresan mikroskopta fotoğrafları çekildi.

Hücreli hidrojel denemeleri sonucunda en iyi hücre canlılığının sağlandığı hidrojel formülasyon ve uygulaması kullanılarak farklı hücre konsantrasyonlarının (2,5x$10^5$, 5x$10^5$ ve 7,5x$10^5$ hücre/300 µL) hidrojel bütünlüğüne etkisi incelendi. Pasaj 2-5 arasındaki insan dermal fibroblast hücreleri uygun hidrojel formülasyonuna gömülerek hücreler % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$'li inkübatörde 9 gün süreyle inkübe edildi. 9 günlük inkübasyon sonunda hidrojellerin fotoğrafları çekilip çapları ölçüldü böylece hidrojel bütünlükleri ve yapıda büzüşme morfolojik olarak değerlendirildi. Hidrojel içerisindeki hücre yoğunluğu falloidin (Phalloidin-FITC, Sigma) boyama ile de gözlemlendi. Falloidin boyama için 9. gün % 4 PFA ile sabitlenen hücreli hidrojeller DPBS ile yıkandıktan sonra % 0,1 triton X-100 ile permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten sonra hücreler % 0,1 sığır serum albumini (BSA) içerisinde hazırlanan FITC işaretli falloidin içerinde 1 saat 37°C

Tablo 2.2. Hücreli hidrojel formülasyonları

| Örnek No | Sığır Aşil Tendon Kollajeni (mg/mL) | Hyaluronik Asit (mg/mL) | Askorbik asit (L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Sesquimagnesium Salt Hydrate) (mg/mL) | Askorbik asit (L-Ascorbic Acid) (mg/mL) | Sodyum Aljinat (mg/mL) | İnsan Plasenta Kollajeni (mg/mL) | Uygulama |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 0,0625 | - | 5 | 1,25 | 1,25 | 150 dk 37°C |
| 2 | 5,71 | 0,071 | - | 5,71 | - | 1,43 | 150 dk 37°C |
| 3 | 5,71 | 0,071 | - | 5,71 | 1,43 | - | 150 dk 37°C |
| 4 | 5,71 | 0,071 | 5,71 | - | 1,43 | - | 150 dk 37°C |
| 5 | 6,67 | - | - | 6,67 | 1,67 | - | 150 dk 37°C |
| 6 | 6,67 | - | 6,67 | - | 1,67 | - | 150 dk 37°C |
| 7 | 6,67 | 0,083 | - | 6,67 | - | - | 150 dk 37°C |
| 8 | 6,67 | 0,083 | 6,67 | - | - | - | 150 dk 37°C |

sıcaklıkta bekletildi. Süre sonunda % 0,1 BSA ile yıkanan hücreler çekirdek boyanması için DAPI (1:1000 DPBS'te) içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi ve floresan mikroskopta incelendi.

Farklı hücre konsantrasyonlarının hidrojelin ilk şeklini ve boyutunu korumasına olan etkisinin morfolojik olarak değerlendirilmesinin ardından en uygun hücre konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla hidrojeller içerisine $1x10^5$, $2x10^5$ ve $2,5x10^5$ hücre/300 µL konsantrasyonlarında insan dermal fibroblast hücresi gömüldü. Hücreler 9 gün boyunca DMEM-F12 besiyerinde inkübe edildikten sonra hidrojellerin boyutundaki değişim çekilen fotoğraflarla gözlemlendi. Aynı zamanda hücre morfolojileri de daha önce yapıldığı şekilde falloidin boyama ile, hücre çoğalması ise DNA miktarı tayini için nanodrop cihazı (Thermo Scientific Nanodrop 1000 spectrophotometer) kullanılarak değerlendirildi. Hücre çoğalmasını tespit etmek amacıyla ilk gün ve 9. gün sonunda hidrojeller 50 µg/mL proteinaz K içerisine alındı ve 2 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi (Zhao ve diğ., 2017). Süre sonunda örnekler 13 000 g devirde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar atılarak her bir pelletin üzerine 1 mL % 0,1 kollajenaz solüsyonu ilave edilip 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 3,5 saat bekletildi. Örnekler 13 000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pellet üzerine 100 µL 1X TE tampon çözeltisi ilave edildi. Hidrojel örneklerinin DNA konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçülerek 1.gün ve 9.gün sonundaki hücre sayıları değerlendirildi.

### 2.3. *Cotinus coggygria* Özütlerinin Hazırlanması, Sitotoksik ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Ağaç çiçek açtıktan sonra toplanmış olan *Cotinus coggygria* yaprakları karanlıkta oda sıcaklığında kurutuldu. Tamamen kurutulan yapraklar öğütülerek küçük parçalara ayrıldı ve kullanılana kadar 4°C sıcaklıkta karanlıkta bekletildi.

*C. coggygria*'nın hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol (1:1), metanol ve distile su özütlerini hazırlamak için öğütülmüş kuru bitki yaprakları ilk önce 6,67 g/L konsantrasyonunda olacak şekilde hekzan (N-hexane for liquid chromatography, Merck) ile karıştırıldı ve 24 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda çözelti filtre kağıdından geçirildi, süzüntü alınıp evaporatörde (Buchi rotavapor RII) çözücüsünden ayrılıp liyofilizatörde kurutuldu (hekzan özütü). Süzülen öğütülmüş

kurutulmuş yapraklar iki kez daha aynı çözücüyle muamele edildi. Hekzanla muamele edildikten sonra *C. coggygria* yaprakları tamamen kurutuldu. Aynı işlemler sırasıyla diklorometan (dichloromethane for liquid chromatography, Merck) (diklorometan özütü), diklorometan:metanol (1:1) (methanol gradient grade for liquid chromatography, Merck) (diklorometan:metanol özütü), metanol (metanol özütü) ve distile su (distile su özütü) ile de yapıldı. Her bir çözücüyle muamele üç kez 24 saat oda sıcaklığında karanlıkta gerçekleştirildi. Geleneksel yöntemle hazırlanan özüt (geleneksel özüt) ise halk arasında kompres için kullanılan ekstraksiyon yöntemiyle hazırlandı. Bunun için kurutulmuş *C. coggygria* yaprakları 25 g/L kuru bitki yaprağı distile suda 20 dakika kaynatıldı. Elde edilen özüt filtre kağıdından geçirilip -20°C sıcaklıkta dondurulup liyofilizatörde kurutuldu. Liyofilizasyon sonunda toplanan özütler kullanılana kadar vakum altında saklandı.

### 2.3.1. Farklı *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı) özüt ve konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Farklı *C. coggygria* özütlerinin (hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol, metanol, distile su, geleneksel) normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla hekzan, diklorometan:metanol ve metanol özütleri dimetil sülfoksit (DMSO), geleneksel ve distile su özütleri DMEM-F12 besiyerinde, diklorometan özütü ise etanol içerisinde çözüldü. Bu özütlerin 2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 7,81 µg/mL, 6 µg/mL ve 3 µg/mL konsantrasyonları uygun çözücülerde hazırlandı. İnsan dermal fibroblast hücreleri besiyerinde (% 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri) 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. Her 3. günde besiyeri yenilendi ve yeterli yoğunluğa geldikten sonra hücreler % 0,25 tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakaya $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücrelerin ekilmesinden yaklaşık 24 saat sonra farklı konsantrasyonlardaki boyacı sumağı içeren besiyerleri kuyucuklara eklendi. Kontrol grupları olarak özüt içermeyen DMEM-F12 besiyeri, DMEM-F12 besiyeri içerisinde etanol ve DMEM-F12 besiyeri içerisinde DMSO'nun uygulandığı hücreler kullanıldı. Boyacı sumağı özütleri

eklenmeden ve özütler ilave edildikten 4 gün sonra MTT testi (Roche (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yapıldı. MTT testi için tüm hücreler % 10 MTT solüsyonu içeren DMEM-F12 besiyerinde 4 saat 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ içeren inkübatörde bekletildi. Süre sonunda besiyerleri atıldı ve tüm kuyucuklara 200 µL DMSO ilave edildi. 96 kuyucuklu plakalar 5 dakika boyunca orbital karıştırıcıda (Heidolph Titramax 101) 300 rpm devirde çalkalandı. Kuyucuklarda renk değişiminin homojen olduğu gözlendiğinde 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alındı.

### 2.3.2. *C. coggygria* özütlerinin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin belirlenmesi

Hücre kültüründe kullanılan *C. coggygria* (Boyacı sumağı) özütlerinin (hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol, metanol, distile su ve geleneksel) farklı konsantrasyonlarının (2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,625 µg/mL ve 7,81 µg/mL) *Staphylococcus aureus ATCC 29213, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Candida albicans ATCC 90028* üzerindeki antimikrobiyal etkilerine bakıldı. *S.aureus* ve *E. faecalis* % 5 koyun kanlı agarda (RTA Laboratuvarları), *E. coli* ve *P. aeruginosa* Eosin Methylene-Blue agarda (EMB, Merck 1.01347.0500) ve *C. albicans* ise saboraud dekstroz agarda büyütüldü. Bir gece önce taze pasajlanmış olan mikroorganizmalara yapılacak olan antibiyogram testi için Mueller Hinton besiyerinde üreyen bakteri ve RPMI besiyerinde üreyen mantar kolonilerden McFarland'a denk konsantrasyon hazırlandı. Maya için bu konsantrasyon $1x10^6$ c.f.u/mL iken bakteriler için $1x10^8$ c.f.u/mL idi. Bakteri ve maya konsantrasyonları 0,5 McFarland standardına göre ayarlandıktan sonra *C. albicans* için 1/100, bakteriler için ise 1/10 oranlarında dilüsyonlar hazırlandı. Verilen boyacı sumağı konsantrasyonları mikroorganizmalarla karıştırılarak U tabanlı 96 kuyucuklu plakalara ekilip 37°C sıcaklıktaki inkübatörde (FINEPCR Hybridization incubator combi-SV120) 24 saat inkübe edildi. Her bir deney grubu 3 kopya şeklinde çalışıldı. İnkübasyon sonunda boyacı sumağı özütlerinin mikroorganizmalar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) belirlendi.

## 2.4. Fototerapi

### 2.4.1. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

980 nm dalga boyundaki diyot lazerin diyabetik yaraların iyileşmesinde etkili olduğunu belirten literatür ışığında (Kawalec ve diğ., 2004) 5 W gücündeki 980 nm dalga boyundaki diyot lazer farklı sürelerde denenerek diyot lazerin normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılığına etkisi canlı/ölü hücre boyaması ve WST-1 testi ile değerlendirildi. İzole edilmiş dermal fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu plakaya $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücreler % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$'li etüvde inkübe edildi. 5 W gücündeki 980 nm dalga boyundaki diyot lazer 9 gün boyunca iki günde bir 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 saniye süreyle hücrelere uygulandı. Kontrol grubu olarak lazer uygulanmamış normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri tercih edildi. Her bir örnek üç kopya şeklinde çalışıldı.

Diyot lazerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için 1. gün ve son lazer uygulamasının ertesi gününde Bölüm 2.4.1'deki gibi WST-1 analizi yapılıp 440 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alındı.

Lazerin hücre canlılığına olan etkisi 1. gün ve son lazer uygulamasının ertesi gününde Bölüm 2.2.3.2.'de anlatıldığı şekilde canlı/ölü hücre boyaması ile değerlendirildi. Boyama sonunda hücrelerin durumu floresan mikroskop ile incelendi.

### 2.4.2. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisinin belirlenmesi

5 W gücündeki 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücrelerde kollajen sentezine olan etkisini değerlendirmek için diyot lazer normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine 9 gün süresince iki günde bir 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 saniye uygulandı. Kontrol grubu olarak lazer uygulanmamış

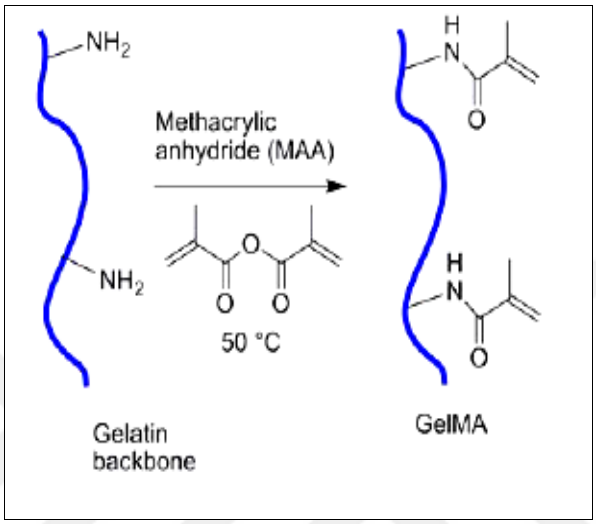
normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri ve 24 saat sonunda hiçbir lazer uygulamasına maruz bırakılmamış hücreler tercih edildi. Her bir örnek üç kopya şeklinde çalışıldı. Süre sonunda her bir uygulamaya ait hücrelerin ışık mikroskobunda görüntüleri çekildi.

Hücrelerin kollajen sentezi immunfloresan ve masson trikrom boyama ile kıyaslandı. İmmunfloresan boyama için % 4 PFA ile sabitlenen hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra yüzey serum ile oda sıcaklığında 30 dakika bloke edildi. Ardından hücreler 1:100 olacak şekilde % 0,1 BSA içerisinde hazırlanmış olan birincil antikor (Santa Cruz COL1A Antibody sc-59772) içerisinde 1 gece 4°C sıcaklıkta inkübe edildi. Hücreler 3 kez DPBS (Capricorn Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca&Mg, w/o phenol red) ile yıkandıktan sonra 1:200 oranından ikincil antikor (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)) içerisinde 37°C sıcaklıkta 1 saat daha inkübe edildi. Süre sonunda antikorlar çekilip örnekler 3 kez DPBS içerisinde yıkandıktan sonra floresan mikroskop kullanılarak hücrelerin görüntüleri alındı. Masson trikrom boyaması (GBL Masson Trikrom Boyama Kiti, 5022) için ise % 4 PFA ile sabitlenen hücreler kullanıldı. Ayrı bir ependorf tüp içerisinde 2 damla weigert demirli hematoksilin A çözeltisi ve 2 damla weigert demirli hematoksilin B çözeltisi homojen olarak karıştırılıp her bir kuyucuğu kaplayacak şekilde hücreler üzerine koyulup 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda boyalar çekilip 1 saat oda sıcaklığında kuyucukların kuruması sağlandı. Kuyucuktaki örneklerin üzeri örtülecek şekilde pikrik asit alkol çözeltisi ilave edilip 4 dakika oda sıcaklığında beklendi. Distile suyla 2 kez yıkama yapıldıktan sonra kuyucuklara gelincik kızılı fuksin çözeltisi koyulup 4 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyalar çekildikten sonra kuyucuklar 2 kez distile suyla yıkandı ve 10 dakika oda sıcaklığında fosfomolibdik asitte bekletildi. Kuyucuklar 5 dakika oda sıcaklığında kurutulduktan sonra masson anilin mavisi çözeltisiyle 5 dakika oda sıcaklığında muamele edildi. Bir kez daha distile suyla yıkanan kuyucuklar önce % 30 ardından % 70 etanolden geçirilip örnekler ışık mikroskobunda incelendi.

## 2.5. *İn vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modelinin Geliştirilmesi

### 2.5.1. Metakrilatlanmış jelatin (GelMA) sentezi

Metakrilatlanmış jelatin (GelMA) sentezi literatürde mevcut olan yöntem kulanılarak gerçekleştirildi (Occhetta ve diğ., 2015) (Şekil 2.1).




Şekil 2.1. Metakrilatlanmış jelatin sentezi (Occhetta ve diğ., 2015)

Jelatin (Sigma, Gelatin from porcine skin, bloom 300) % 10 konsantrasyonda olacak şekilde 1X DPBS içerisinde 50°C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda 450 rpm devirde çözündü. Jelatin tamamen çözündükten sonra üzerine 0,1 mL/dakika hızla 1 mL metakrilik anhidrit (Sigma) damlatıldı. Reaksiyona 3 saat 50°C sıcaklıkta 600 rpm karıştırma hızında devam edildi. Süre sonunda çözeltiye başlangıç hacminin 5 katı, önceden 50°C sıcaklığa getirilmiş 1X DPBS ilave edildi. Çözeltide homojen karışım elde edildikten sonra reaksiyona girmeyen metakrilik anhidratin ortamdan uzaklaştırılması için karışım 10 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edildi. Süre sonunda hazırlanan GelMA -80°C sıcaklıkta dondurulduktan sonra liyofilize edildi. Kurutulmuş GelMA vakum altında saklandı.

Liyolofilize edilmiş olan jelatinin metakrilasyon derecesi sıvı Yüksek Rezolüsyon Nükleer Manyetik Rezonans ($^1$H NMR, Bruker AVANCE, 300 MHz) cihazı ile ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda tespit edildi. Metakrilatlanmış biyopolimer örnekleri $D_2O$ içerisinde çözündü (20 mg/mL). Jelatinin metakrilasyon derecesi Denklem (2.3) kullanılarak hesaplandı (Eke ve diğ., 2017):

$$\text{Metakrilasyon derecesi \%} = \frac{\text{Metakrile grup sayısı}}{\text{Reaksiyona girmemiş polimerdeki amin grubu sayısı}} \text{ X } 100 \qquad (2.3)$$

### 2.5.2. Hücresiz GelMA hidrojelin hazırlanması

GelMA hidrojeller, 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambasıyla (Sylvania Blacklight F15WT8\BL368) foto-başlatıcı varlığında metakrilatlanmış jelatinin çapraz bağlanmasıyla elde edildi. GelMA'nın fotopolimerizasyonunda literatürde en çok tercih edilen foto-başlatıcılar olan 2-hydroxy-4′-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (irgacure, Sigma) (Bertassoni ve diğ., 2014; Schuurman ve diğ., 2013; Bertassoni ve diğ., 2014; Occhetta ve diğ., 2013) ve 2,2′azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl) propionamide] (VA 086, Wako) (Occhetta ve diğ., 2015; Occhetta ve diğ., 2013) kullanılmaya karar verildi. Önceden liyofilize edilmiş olan GelMA, sodyum aljınat, irgacure ve VA 086 Tablo 2.3'teki konsantrasyonlarda hazırlandı. VA 086 hariç tüm çözeltiler DMEM-F12 besiyeri içerisinde çözündü. VA 086 foto-başlatıcısı metanol ve distile su olmak üzere 2 farklı çözücüde çözünerek çalışıldı. Hidrojel yapımı için kullanılacak olan karışımlar Tablo 2.3.'te gösterildiği şekilde hazırlandı ve 96 kuyucuklu plakalara alınıp 5,8 cm uzaklıktan UV ışığına maruz bırakılarak süre optimizasyonu yapıldı.

Tablo 2.3. Hidrojel formülasyonları

| Örnek No | GelMA (mg/mL) | Sodyum aljinat (mg/mL) | İrgacure (mg/mL) | VA 086 ($CH_3OH$) (mg/mL) | VA 086 ($dH_2O$)(mg/mL) | Süre (dakika) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 44 | 1,5 | 3 | - | - | 8 |
| 2 | 44 | 1,5 | 3 | - | - | 7 |
| 3 | 44 | 1,5 | 3 | - | - | 6 |
| 4 | 44 | 1,5 | 3 | - | - | 5 |
| 5 | 75 | - | - | 3,65 | - | 5 |
| 6 | 75 | - | - | 3,65 | - | 10 |
| 7 | 75 | - | - | 3,65 | - | 11 |
| 8 | 75 | - | - | 3,65 | - | 12 |
| 9 | 75 | - | - | 3,65 | - | 15 |
| 10 | 75 | - | - | - | 3,65 | 5 |
| 11 | 75 | - | - | - | 3,65 | 10 |
| 12 | 75 | - | - | - | 3,65 | 11 |
| 13 | 75 | - | - | - | 3,65 | 12 |
| 14 | 75 | - | - | - | 3,65 | 15 |

### 2.5.3. Hücreli GelMA hidrojelin hazırlanması

#### 2.5.3.1. UV ışımanın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

Hücresiz hidrojel fotopolimerizasyon çalışması sonucunda mekanik sağlamlılığı en iyi olan irgacure ve VA 086 foto-başlatıcı konsantrasyonlu ve süreli hidrojeller kullanılarak UV ışımasının hücre canlılığına etkisine bakıldı. Bunun için normoglisemik insan derisinden izole edilen pasaj 2-5 arasındaki dermal fibroblast hücreleri tercih edildi. Belirtilen pasajlardaki insan dermal fibroblast hücreleri besiyerinde (% 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12) 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. Her 3 günde 1 besiyeri yenilendi ve yeterli yoğunluğa geldikten sonra hücreler % 0,25 tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Optimize edilmiş olan hidrojeller 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde hazırlandı. İnsan dermal fibroblast hücreleri $5x10^4$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında hidrojellerle karıştırılıp 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambasıyla foto-başlatıcı olarak VA 086 kullanıldığında 11 ve 22 dakika, irgacure kullanıldığında ise 6 dakika ışımaya maruz bırakıldı. Kontrol grubu olarak ışıma uygulanmamış karışımlar kullanıldı. Her bir örnek iki kopya şeklinde çalışıldı. UV ışımanın insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkisini değerlendirmek için Bölüm 2.2.3.2.'de anlatıldığı şekilde canlı/ölü hücre boyaması yapılıp örneklerin floresan mikroskopta görüntüleri alındı.

#### 2.5.3.2. GelMA hidrojel içerisinde hücre uzanmasının değerlendirilmesi

Hücresiz hidrojel fotopolimerizasyon çalışması sonucunda mekanik sağlamlılığı en iyi olan irgacure ve VA 086 foto-başlatıcı konsantrasyonlu ve süreli hidrojeller kullanılarak hidrojellerin hücre uzanmasına olan etkisi incelendi. Bunun için normoglisemik insan derisinden izole edilen pasaj 2-5 arasındaki dermal fibroblast hücreleri tercih edildi. Optimize edilmiş olan hidrojeller 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde hazırlandı. İnsan dermal fibroblast hücreleri $1,0x10^5$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında hidrojellerle karıştırılıp 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambasıyla optimize edilmiş sürelerde ışımaya maruz bırakıldı. Fotopolimerizasyon sağlandıktan sonra hidrojeller içerisine gömülmüş olan

insan dermal fibroblast hücreleri 10 gün DMEM-F12 besiyerinde 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. Süre sonunda hidrojel içerisindeki hücreler hem falloidin boyama hem de canlı/ölü hücre boyaması ile gözlemlendi. Falloidin boyama için her bir grup 3 kopya, canlı/ölü hücre boyaması için ise her bir grup 2 kopya şeklinde çalışıldı. Falloidin ve canlı/ölü hücre boyamaları Bölüm 2.2.3.2.'de verildiği şekilde uygulandı ve hidrojeldeki hücrelerin görüntüleri floresan mikroskopta çekildi.

### 2.5.4. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modeli

#### 2.5.4.1. Dermis tabakasının optimizasyonu

3-boyutlu insan deri modelinin dermis tabakasındaki uygun hücre konsantrasyonu ve tabakanın inkübasyon süresinin belirlenmesi için pasaj 2-4 arasındaki normoglisemik insan dermal fibroblast hücreleri kullanıldı. İlk deneme için optimize edilmiş olan VA 086 foto-başlatıcılı GelMA hidrojeller 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde hazırlandı. İnsan dermal fibroblast hücreleri $5{,}0x10^4$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında hidrojellerle karıştırılıp 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A ile 11 dakika süresince ışımaya maruz bırakıldı. Hücreli hidrojeller 14 gün boyunca DMEM-F12 besiyeri besiyerinde (% 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12) içerisinde 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$'li etüvde inkübe edildi. Süre sonunda hidrojeller içerisindeki hücreler % 4 PFA ile sabitlenip Bölüm 2.2.3.2'deki gibi falloidin boyamaya maruz bırakılıp konfokal mikroskopta (Zeis Ism700) görüntüleri çekildi.

İkinci deneme olarak insan dermal fibroblast hücreleri $2{,}0x10^5$ hücre/hidrojel, $3{,}0x10^5$ hücre/hidrojel ve $4{,}0x10^5$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında GelMA ve VA 086 karışımı iler karıştırılıp 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambası ile 11 dakika süresince ışımaya maruz bırakıldı. Ardından hidrojeller 34 gün boyunca % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B, % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$'li etüvde inkübe edildi. Süre sonunda hidrojeller içerisindeki hücrelerin canlılıklarını inceleyebilmek için hücrelere Bölüm 2.2.3.2.'de

anlatıldığı şekilde canlı/ölü hücre boyaması yapıldı. Boyama sonrasında hücrelerin floresan mikroskopta görüntüleri çekildi.

### 2.5.4.2. Dermis ve epidermis tabakalarının birlikte optimizasyonu

3-boyutlu *in vitro* insan deri modelinin dermis tabakasının öncelikle sadece fibroblast hücrelerinden oluşturulmasına karar verildi. Bu karar doğrultusunda insan derisinden izole edilen pasaj 2-5 arasındaki dermal fibroblast hücreleri ve keratinosit hücreleri (Lonza) tercih edildi. Belirtilen pasajlardaki insan dermal fibroblast hücreleri besiyerinde (% 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B, % 1 L-glutamin içeren DMEM-F12) 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. Keratinosit hücreleri için ise öncelikle başka bir flaska HUVEC ekilip EGM-2 besiyeri içerisinde konfluent olana kadar inkübe edildi. 1X TE ile hücreler patlatıldıktan sonra tampon çözeltiden tamamen arındırılmış hücre dışı matriks üzerine keratinosit hücreleri ekildi. Bu hücreler de keratinosit büyüme besiyeri (Gibco Cascade medium ve insan keratinosit büyüme katkısı [HKGS]) içerisinde 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. Her 3 günde bir besiyerleri yenilendi. Yeterli yoğunluğa gelmiş olan insan dermal fibroblast hücreleri % 0,25 tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. GelMA hidrojeller 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde hazırlandı. Foto-başlatıcı olarak VA 086 kullanıldı. İnsan dermal fibroblast hücreleri $5{,}0x10^4$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında hazırlanıp 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambasıyla 11 dakika boyunca ışımaya maruz bırakıldı. Fotopolimerizasyon sağlandıktan sonra hidrojellerin bir kısmının üzerine $5{,}0x10^4$ hücre daha ekilip 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda her bir hidrojel üzerine DMEM-F12 besiyeri ilave edildi. Bu ekimden 16 gün sonra hidrojeller üzerine başka bir yerde büyütülmüş olan keratinosit hücreleri % 0,25 tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılıp her bir hidrojele $5{,}0x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Hidrojeller 2 saat 37°C sıcaklıkta bekletildikten sonra üzerlerine DMEM-F12, Cascade besiyeri (HKGS'li) ya da DMEM-F12: Cascade besiyeri (HKGS'li) (1:1) besiyerlerinde 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültüre edildi. İki haftalık inkübasyon sonunda hidrojeller içerisindeki hücreler % 4 PFA ile sabitlendi ve DPBS ile yıkandıktan sonra % 0,1 triton X-100 ile 15 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten

sonra deri modeli içindeki insan dermal fibroblast hücreleri 1:100 oranında anti-vimentin birincil antikor (Santa Cruz Vimentin C-20 sc-7557 goat polyclonal IgG) ile 37°C sıcaklıkta 1 saat süre ile işaretlendi. Keratinositler için spesifik bir antikor kullanılmadı. DPBS ile yıkanan hücreler 1:200 seyreltilmiş FITC işaretli ikincil antikor (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG) ile işaretlenip 1 saat 37°C sıcaklıkta bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyanması için DAPI (1:1000 DPBS'te) içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi. Çekirdeği boyanıp sitoplazması boyanmayan hücreler keratinosit olarak değerlendirildi. Hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta incelendi.

Modelin mümkün olduğunca insan derisini taklit etmesi amaçlandığından dermis tabakasına endotel hücrelerinin de eklenmesiyle deri modeli geliştirildi. Bu amaçla dermis ve epidermis optimizasyonu için denemeler yapıldı. İnsan derisinden izole edilen pasaj 2-5 arasındaki dermal fibroblast hücreleri, insan göbek bağından izole edilen HUVEC hücreleri ve keratinosit hücreleri (Lonza) tercih edildi. GelMA ve VA 086 karışımı 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde hazırlandı. Tablo 2.4'te verildiği üzere sadece insan dermal fibroblast hücreleri veya insan dermal fibroblast hücreleriyle birlikte HUVEC hücreleri $3{,}0x10^5$ hücre/hidrojel konsantrasyonlarında hazırlanıp kullanıldı. Hücre karışımlarının bir kısmı hidrojele gömülmeden önce sığır tendon kollajeni ile kaplandı. Bunun için hücre solüsyonuna 0,3 mg/mL sığır tendon kollajen çözeltisi eklenip 20 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre solüsyonları santrifüjlenip besiyeri ile seyreltildi. GelMA ile karışım halindeki tüm hücre süspansiyonları 15 W gücünde 368 nm dalga boyundaki UV A lambasıyla 11 dakika boyunca ışımaya maruz bırakıldı.

Tablo 2.4. 3-Boyutlu *in vitro* insan deri modeli dermis tabakası içerikleri

| Örnek No | Fibroblast (hücre/mL) | HUVEC (hücre/mL) | Sığır Tendon Kollajeni (mg/mL) | GelMA (mg/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | $1,5x10^6$ | - | - | 75 |
| 2 | $1,5x10^6$ | - | 2,5 | 55 |
| 3 | $1,5x10^6$ | - | 2,5 (hücre kaplamada kullanılan) | 55 |
| 4 | $1,5x10^6$ | - | - | 75 |
| 5 | $1,5x10^6$ | $1,5x10^6$ | - | 55 |
| 6 | $1,5x10^6$ | $1,5x10^6$ | 2,5 | 55 |
| 7 | $1,5x10^6$ | $1,5x10^6$ | 2,5 (hücre kaplamada kullanılan) | 55 |
| 8 | $1,5x10^6$ | $1,5x10^6$ | - | 75 |

Hidrojellerden sadece insan dermal fibroblast hücresi içerenler % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren DMEM-F12 besiyerinde, insan dermal fibroblast ve HUVEC hücrelerini içerenler % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve EGM-2 (1:1) besiyerinde inkübe edildi. Her iki hücreyi içeren ya da sadece fibroblast içeren hidrojellerin bir kısmına da 50 µg/mL konsantrasyonunda L-askorbik asit ilave edildi. 17 gün inkübasyon sonunda hidrojeller üzerine $3,0x10^5$ keratinosit hücresi ilave edildi. Keratinosit hücreleri ilave edildikten sonra önce kullanılan besiyerleri 1:1 oranında keratinosit büyüme besiyeri (Gibco Cascade besiyeri ve insan keratinosit büyüme katkısı [HKGS]) ile karıştırılarak hücreler üzerine uygulandı. Kontrol grubu olarak her örnekten ikisine keratinosit ekimi yapılmadı. Hidrojeller 8 gün daha inkübe edildikten sonra % 4 PFA ile sabitlenip % 0,1 triton X-100 ile permeabilize edildi. Yüzey serum ile bloke edildikten sonra HUVEC içeren hidrojeller 1:100 oranında anti-CD31 birincil antikor çözeltisi (ab76533) içerisinde 2 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. DPBS ile yıkanan hücreler 1:200 seyreltilmiş TXRED işaretli ikincil antikor (Alexa fluor 568 goat anti-rabbit IgG) ve 1:100 oranında falloidin içerisinde 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübe

edildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyanması için DAPI içerisinde muamele edildi. Boyama sonrası hücrelerin konfokal mikroskopta görüntüleri çekildi.

Hücrelerin kollajen kaplanmasının su kaybını en aza indirdiğini belirten literatür ışığında (Liu ve diğ., 2016) UV ışımanın hücrelere zarar vermesini önlemek amacıyla modelin dermis tabakasını oluştururken fibroblast ve endotel hücrelerinin sığır aşil tendonundan izole edilen atelokollajen ile muamele edilmesine karar verildi. Böylece UV ışıma esnasında hücre canlılığının daha da iyi korunabileceği düşünüldü. 3-boyutlu *in vitro* insan deri modelini geliştirmek için 3 µm gözenek çaplı fibronektin kaplı insertler (ECM557/QCM$^{RM}$ Leukocyte Transendothelial Migration Assay, 24-well plate) kullanıldı. İlk olarak 2 ayrı insert tabanına 22,5x10$^3$ HUVEC hücresi ekilip 1 gece 37°C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde kültürlendi. Her bir insert içerisine 1,35x10$^6$ insan dermal fibroblast hücresi ve 6,75x10$^5$ HUVEC hücresi hidrojel içinde ekildi. İnsertlerden birisi için belirlenen sayılarda insan dermal fibroblast hücreleri ve HUVEC hücreleri alınıp 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanmış 0,3 mg/mL sığır tendon kollajen çözeltisi eklenip 20 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip hücreler üzerine 100 µL GelMA ve VA 086 karışımı koyulup 22 dakika UV A lambasına maruz bırakıldı. Diğer insert için ise belirlenen sayılarda insan dermal fibroblast hücreleri ve HUVEC hücreleri alınıp 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler üzerine 200 µL GelMA, sığır aşil tendon kollajeni ve VA 086 karışımı koyulup 33 dakika UV A lambasına maruz bırakıldı. Ardından iki insert üzerine 22,5x10$^3$ HUVEC hücresi ekilip % 5 insan plazması, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve EGM-2 (1:1) besiyeri karışımında 2 gün inkübe edildi. Süre sonunda iki insert üzerine de 2,0x10$^5$ keratinosit hücresi ekilip keratinosit büyüme besiyeri (Gibco insan keratinosit büyüme katkısı [HKGS] içeren Cascade besiyeri) içerisinde 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde 3 gün kültüre edildi. İnkübasyon sonunda sabitlenen hücreler HUVEC için anti-CD31 antikoru, fibroblast ve keratinosit için ise falloidin boyama ile tespit edildi. Hücre çekirdekleri ise DAPI ile

boyandı. Dermis ve epidermis tabakalarındaki hücrelerin görüntüleri konfokal mikroskop ile alındı.

İnsan deri modelinin dermis tabakasındaki hücre konsantrasyonunu arttırarak modelin farklı besiyerlerinde kültüre edilmesine karar verildi. Bunun için 96 kuyucuklu plaka içerisine $6{,}0x10^5$ insan dermal fibroblast/hidrojel ve $3{,}0x10^5$ HUVEC/hidrojel ekilmesine karar verildi. Belirlenen sayılarda insan dermal fibroblast hücreleri ve HUVEC hücreleri alınıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanmış 0,3 mg/mL sığır tendon kollajen çözeltisi koyulup 20 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüjlenen hücreler üzerine 100 µL GelMA ve VA 086 karışımı koyulup 22 dakika UV A lambasına maruz bırakıldı. Ardından hidrojeller üzerine $2{,}0x10^4$ HUVEC hücresi ekilip 1 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Süre sonunda kuyucukların besiyeri % 5 HP, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve EGM-2 (1:1) besiyeri karışımı ile tamamlandı. Hidrojeller bir gece inkübe edildikten sonra 24 kuyucuklu plakalara alınarak 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde 26 gün bekletildi. Süre sonunda hidrojeller üzerine meme derisinden izole edilmiş olan insan keratinosit hücresi ($2{,}0x10^5$ hücre) ekilip 1 gece % 5 insan plazması içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve cascade besiyeri karışımında inkübe edildi. Hücre tutunması sağlandıktan sonra her bir hidrojel 4 ayrı besiyerinde (1- % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri, 2- % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri: % 5 insan plazmalı düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM besiyeri [1:1], 3- % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri : % 5 insan plazmalı EGM-2 besiyeri [1:1], 4- % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri: % 5 insan plazmalı düşük glukoz içeren DMEM besiyeri : % 5 insan plazmalı EGM-2 besiyeri [1:1:1]) 24-kuyucuklu plakalarda iki hafta inkübe edildi. Süre sonunda hidrojeller % 4 PFA ile sabitlenip % 0,1 triton X-100 ile permeabilize edildi. Hidrojeller yüzey serum ile bloke edildikten sonra keratinosit hücreleri için 1:500 oranında anti-sitokeratin 5 birincil antikor çözeltisi (STJ 92636), fibroblast hücreleri için 1:100 anti-vimentin birincil antikor çözeltisi (Abcam anti-vimentin mouse monoclonal [ab8978]) ve HUVEC hücreleri için ise 1:50 anti-CD31 birincil antikor çözeltisi (Dako monoclonal mouse anti-

human CD31 [M0823]) içerisinde bir gece 4°C sıcaklıkta bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar 1:200 oranında ikincil antikorda (Alexa fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L) [TXRED], A11036 ve Alexa fluor 488 goat anti-mosue IgG [FITC]) 37°C sıcaklıkta 60 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyaması için DAPI ile muamele edilip konfokal mikroskopta incelendi.

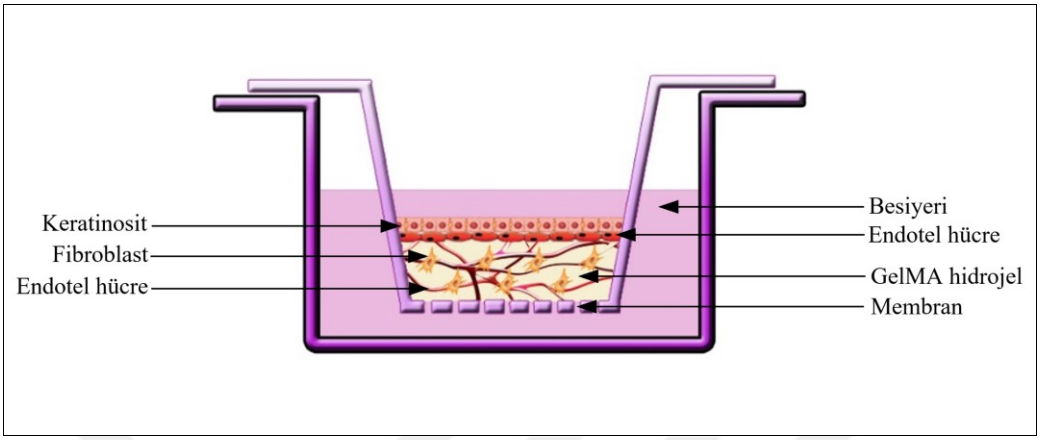
*İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis tabakasının normal dokuya benzerliğini arttırmak amacıyla bu tabakadaki keratinositlerin normal epidermal morfolojilerini koruması için besiyeri optimizasyonu çalışmaları yapıldı. İnsan dermal fibroblast ($6{,}0x10^5$) ve HUVEC ($3{,}0x10^5$) hücreleri daha önce belirtildiği şekilde tip I kollajen ile kaplandı. Kaplama sonrasında hücreler GelMA ve VA 086 karışımı içerisinde 22 dakika UV A lambasına maruz bırakıldı. Ardından hidrojeller üzerine $4{,}0x10^4$ HUVEC hücresi ekilip 1 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Süre sonunda kuyucukların besiyeri % 5 HP, 50 µg/mL askorbik asit, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve EGM-2 besiyeri karışımı ile tamamlandı. Hidrojeller bir gece inkübe edildikten sonra 24 kuyucuklu plakalara alınarak 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde 10 gün bekletildi. Süre sonunda hidrojeller üzerine $2{,}0x10^5$ insan keratinosit hücresi ekilip 2 gün boyunca % 5 HP ve 50 µg/mL askorbik asit içeren cascade besiyerinde inkübe edildi. Ardından hidrojellere verilen besiyeri miktarı azaltılarak hidrojel yüzeyi havaya kaldırıldı ve besiyeri 8 mg/mL BSA, 0,4 µg/mL hidrokortizon, 0,12 IU/mL insülin, 50 µg/mL askorbik asit ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve DMEM-F12 (3:1) besiyeri karışımı ile değiştirilip 14 gün daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hidrojel içerisindeki hücreler % 4 PFA ile sabitlenip % 0,1 triton X-100 ile 15 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. Hidrojellerin yüzey serum ile bloke edildikten sonra keratinosit hücreleri için 1:500 oranında anti-sitokeratin 5 birincil antikor çözeltisi (STJ 92636) ve 1:200 anti-involucrin (sc-56555), fibroblast hücreleri için 1:100 anti-vimentin birincil antikor çözeltisi (Abcam anti-vimentin mouse monoclonal [ab8978]) içerisinde bir gece 4°C sıcaklıkta bekletildi. Ardından hidrojeller 1:200 oranında ikincil antikorda (Alexa fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L) [TXRED], A11036 ve Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG [FITC] ab150113, Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG [FITC]) 37°C

sıcaklıkta 60 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyaması için DAPI ile muamele edilip konfokal ve floresan mikroskopta görüntüleri çekildi.

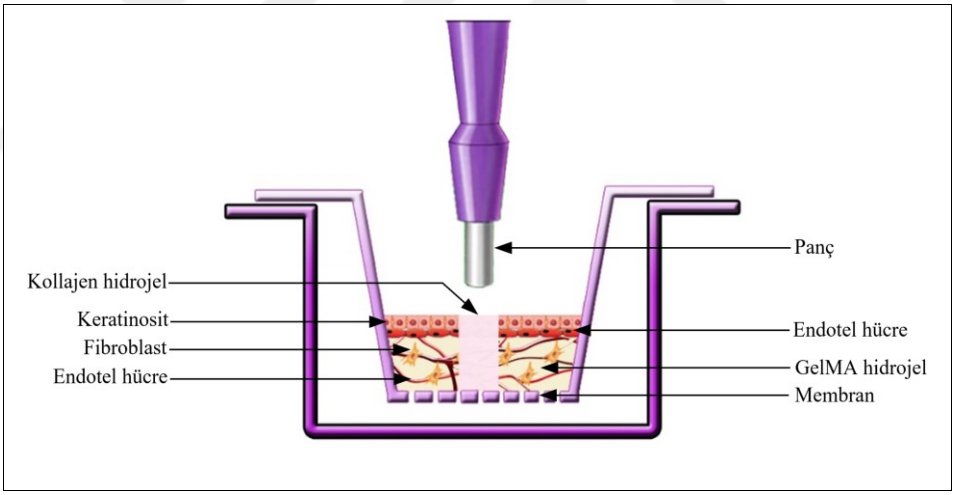
### 2.6. Hücresel ve Bitkisel Tedavinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin *İn Vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modelinde Belirlenmesi

*İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaralar üzerine hücresel ve bitkisel tedavi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen tedavi yaklaşımları uygulandı. Bu amaçla öncelikle *in vitro* tip 2 diyabetik insan deri modeli oluşturuldu (Şekil 2.2). Modeller 12 kuyucuklu plakaya uyumlu 3 µm gözenek çaplı insertlerde (Millicell hanging cell culture inserts MCSP12H48) oluşturuldu. Tip 2 diyabetik insan derisinden izole edilen pasaj 2-5 arasındaki dermal fibroblast hücreleri ve insan göbek bağı veninden izole edilen HUVEC hücreleri ve meme derisinden izole edilen pasaj 1-2 arasındaki keratinosit hücreleri tercih edildi. Hidrojel başına $9{,}0x10^5$ insan dermal fibroblast ve $4{,}5x10^5$ HUVEC kullanıldı. Belirlenen sayılarda insan dermal fibroblast hücreleri ve HUVEC hücreleri alınıp 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanmış 0,3 mg/mL sığır tendon kollajen çözeltisi koyulup 20 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenen hücreler üzerine 200 µL GelMA ve VA 086 karışımı koyulup 22 dakika UV A lambasına maruz bırakıldı. Ardından hidrojeller üzerine $1{,}35x10^5$ HUVEC hücresi ekilip % 5 HP, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve EGM-2 besiyeri karışımında 37ºC sıcaklık ve % 5 $CO_2$ ihtiva eden inkübatörde 24 gün bekletildi. Süre sonunda dermis tabakaları üzerine epidermis tabakasını oluşturmak için $5{,}5x10^5$ tip 2 diyabetik insan keratinosit hücresi ekilip 7 gün % 5 HP, 2 U/mL heparin, % 0,1 primosin, % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B, 1 ng/mL bFGF, 50 µg/mL L-askorbik asit (L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate) ve % 1 HKGS içeren Cascade besiyerinde inkübe edildi. 7 gün sonunda besiyeri % 5 HP, 1 ng/mL bFGF ve 50 µg/mL L-askorbik asit içeren DMEM:DMEM-F12 (1:1) besiyeri ile değiştirildi. 4 günlük inkübasyon sonunda 4 mm çapındaki panç ile deri modellerine suni yaralar açıldı (Şekil 2.3). Açılan yaraların iyileşmesini sağlamak amacıyla Tablo 2.5'teki şekilde yaralara hidrojel içinde hücresel tedavi, bitkisel tedavi (boyacı

sumağının geleneksel ve distile su özütleri) ve hücresel ve bitkisel tedaviler birlikte uygulandı. Her bir grup 3 kopya şeklinde çalışıldı.




Şekil 2.2. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin şematik görüntüsü




Şekil 2.3. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modeline suni yaranın açılmasının ve tedavi amaçlı kollajen hidrojelin uygulanmasının şematik görüntüsü

Tablo 2.5. *İn vitro* 3-boyutlu deri modellerindeki yaralara uygulanan tedavi yaklaşımları

| Grup Adı | Uygulama |
|---|---|
| Kontrol Grubu (Yara açılmış model) | - |
| Hücresiz kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat |
| Boyacı sumağı distile su özütlü kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat, 7,81 µg/mL boyacı sumağı distile su özütü |
| Boyacı sumağı geleneksel özütlü kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat, 7,81 µg/mL boyacı sumağı geleneksel özütü |
| Hücreli kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat, $8,3x10^5$ fibroblast/ml |
| Boyacı sumağı distile su özütlü, hücreli kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat, 7,81 µg/mL boyacı sumağı distile su özütü, $8,3x10^5$ fibroblast/mL |
| Boyacı sumağı geleneksel özütlü, hücreli kollajenli hidrojel | 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit, 1,67 mg/mL sodyum aljinat, 7,81 µg/mL boyacı sumağı geleneksel özütü, $8,3x10^5$ fibroblast/mL |

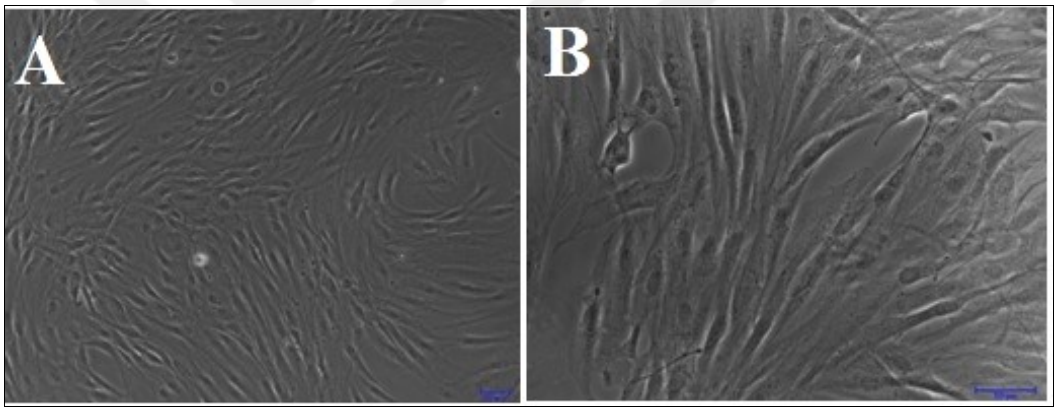
Suni yaralar açıldıktan sonra modeller % 5 HP, 1 ng/mL bFGF ve 50 µg/mL L-askorbik asit ve 25 mM konsantrasyonunda glukoz içeren DMEM:DMEM-F12 (1:1) besiyerinde 9 gün inkübe edildi. Süre sonunda modeller % 4 PFA ile fikse edildi. Fikse edilen modellerin bir kısmı daha önce yapıldığı şekilde keratinosit hücreleri için anti-sitokeratin-5, fibroblast hücreleri için anti-vimentin ve HUVEC hücreleri için ise anti-CD31 ile işaretlenip konfokal mikroskopta görüntüleri çekildi. Modellerin bir kısmından ise 60 µm kalınlığında kriyokesitler alındı. Kesitlere anti-sitokeratin-5, anti-vimentin, anti-CD31 boyaması yapılıp kesitlerin floresan mikroskopta görüntüleri çekildi.

# 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 3.1. İnsan Fibroblast, Endotel ve Keratinosit Hücre Kültürü

### 3.1.1.İnsan deri kaynaklı fibroblast karakterizasyonu

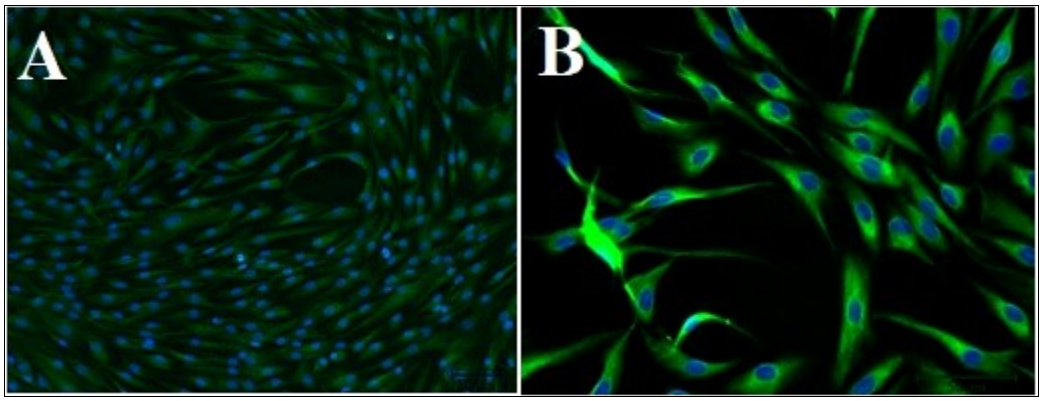
Ameliyat sonrası biyolojik atık olan deri skar doku etrafındaki deriden izole edilen hücrelerin dermal fibroblast hücreleri olduğunu tespit etmek amacıyla ikinci pasajdaki hücrelere anti-vimentin immünfloresan (IF) boyama yapıldı. Hücrelerin boyama öncesi görüntüleri ışık mikroskobunda ve boyama sonrası görüntüleri floresan mikroskobu ile incelendi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



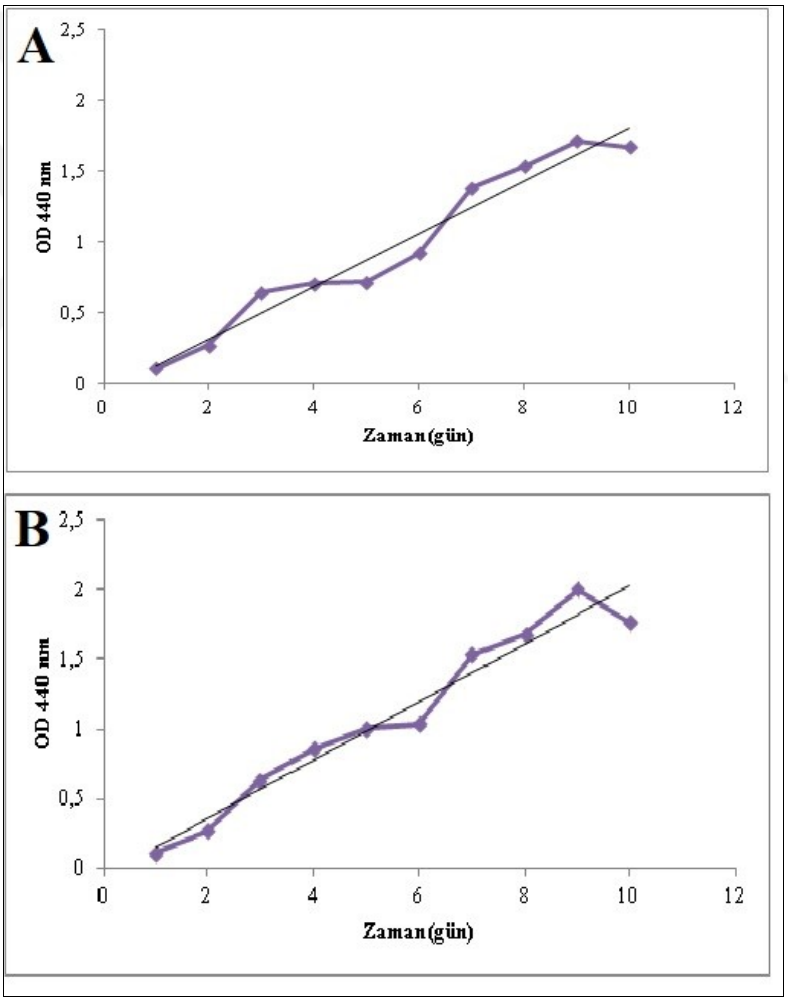

Şekil 3.1. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri, A) 10X büyütme, B) 20X büyütme, Skala: 50 μm

Mikroskop görüntüleri hücrelerin iğ-benzeri morfolojiye sahip olduğunu gösterdi. İzole edilen hücre popülasyonunun tümünün bir fibroblast belirteci olan vimentin için pozitif olması ise bu hücrelerin kültüründe dermis tabakasından herhangi bir hücre kontaminasyonunun olmadığını kanıtlamıştır (Alt ve diğ., 2011).

Çoğalma döngüsü içindeki bir hücrenin bütün yapısal bileşenleri iki misline çıkar. Bir hücreden iki hücre oluşması için gereken aralık jenerasyon olarak tanımlanırken bunun gerçekleşmesi için gerekli olan zaman ikilenme zamanı (jenerasyon zamanı) olarak ifade edilir (Madigan ve Martinko, 2012).




Şekil 3.2. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin anti-vimentin FITC ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri, A) 10X büyütme, B) 20X büyütme, Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI, Skala: 50 µm

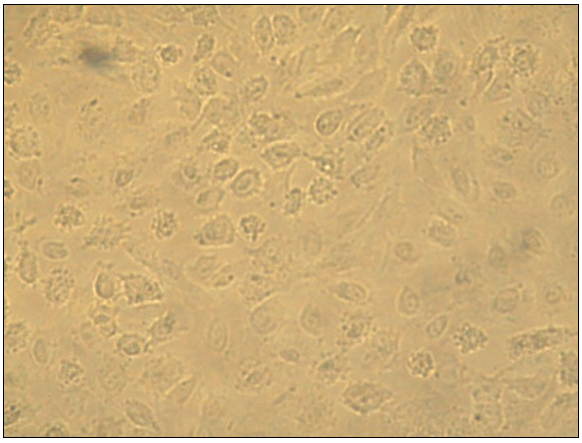



Şekil 3.3. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin üreme eğrileri, A) Tip 2 diyabetik, B) Normoglisemik

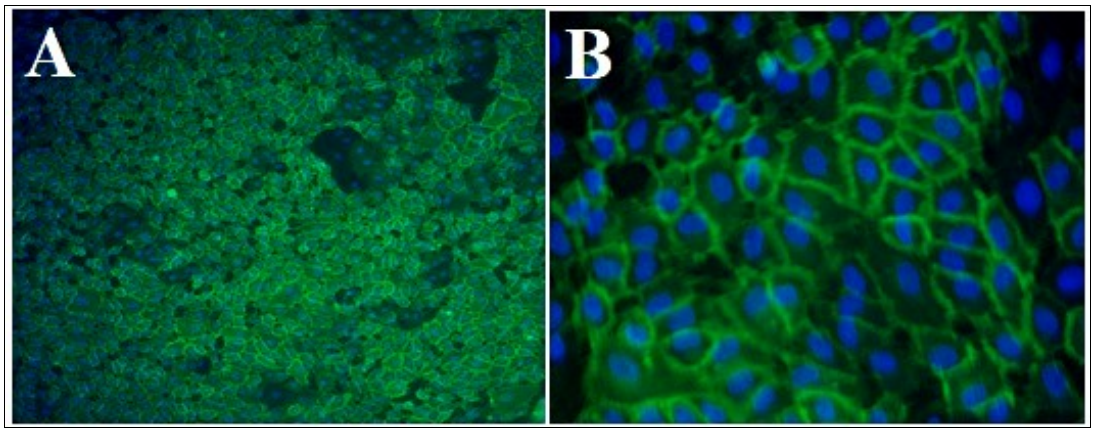
Herhangi bir hücre türünün gelişimi üzerine yapılan denemelerin kıyaslanması için bu hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi gerekir. Bu tezde de kullanılan normoglisemik ve tip 2 diyabetik bireylerin derilerinden izole edilen fibroblast hücrelerinin öncelikle ikilenme zamanları belirlendi. 10 gün boyunca hücre canlılık testi (WST-1) ile takip edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin üreme eğrileri çizilip (Şekil 3.3) ikilenme zamanları daha önce hazırlanmış olan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak hesaplandı. İkilenme zamanı formülü kullanılarak tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin ikilenme zamanı 18,18 saat olarak tespit edilirken normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin aynı değeri 19,05 saat olarak hesaplandı. Bizim bulduğumuz sonuca paralel olarak ticari olarak satışı yapılan insan dermal fibroblast hücreleri için de bu hücrelerin 18-24 saat arasında olduğu ve bu sürenin vericiden vericiye göre değiştiği belirtilmiştir (URL-6).

### 3.1.2. İnsan göbek bağı veni kaynaklı endotel hücre (HUVEC) karakterizasyonu

İnsan göbek bağı veni endetol hücreleri (HUVEC) enzimatik yollarla izole edilip pasaj 2'deki hücreler ışık mikroskobuyla görüntülendi (Şekil 3.4). Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilerek CD31 için immünfloresan olarak boyanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. İzole edilmiş HUVEC hücrelerinin IF boyama öncesi görüntüsü (Orijinal Büyütme: 20X)

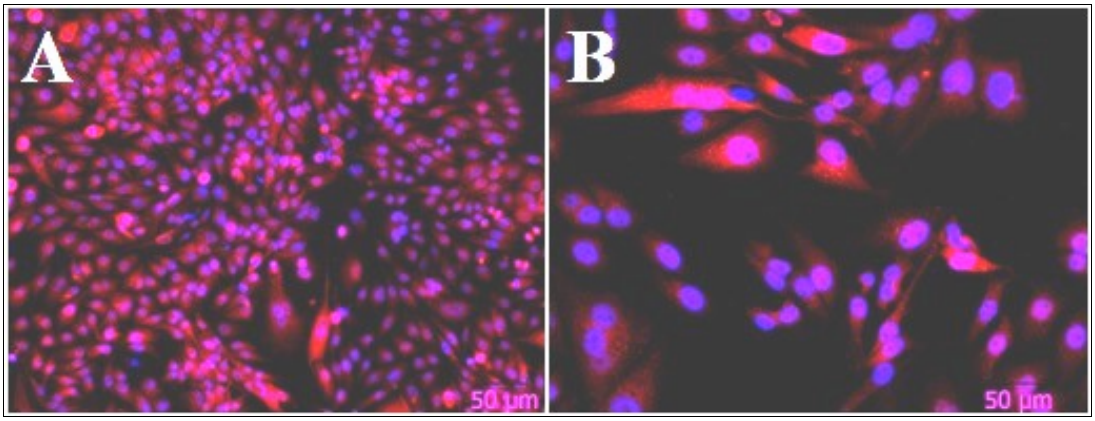



Şekil 3.5. HUVEC hücrelerinin anti-CD31 FITC ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri, A) 10X büyütme, B) 40X büyütme, Yeşil: CD31, Mavi: DAPI

İzole edilen hücrelerin endotel hücreler için özel bir yüzey antikoru olan CD31 (Ikuno ve diğ., 2017) için pozitif oluşu, bu hücrelerin endotel hücre olduğunu ve tümünün boyanması da kültürün saf olduğunu kanıtlamaktadır.

### 3.1.3. Meme derisi kaynaklı keratinosit hücre karakterizasyonu

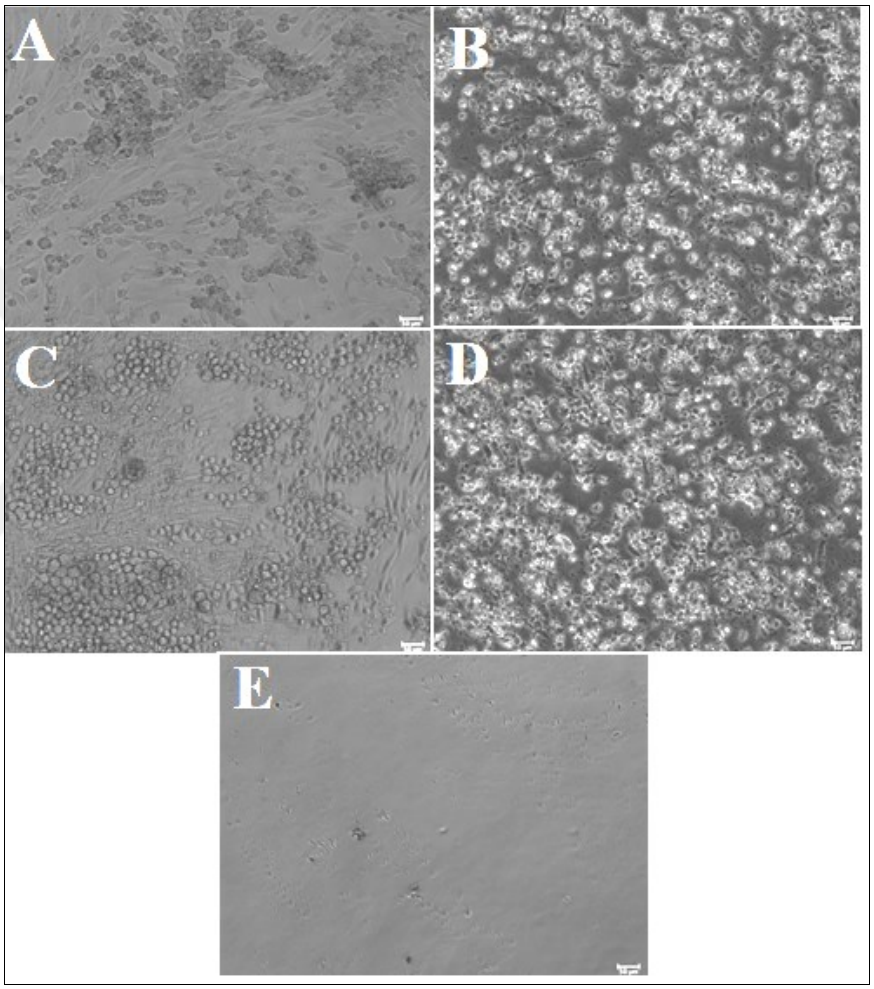
Meme derisinden izole edilen keratinosit hücrelerinin karakterizasyonu için pasaj 1'deki hücrelere anti-sitokeratin 5 immünfloresan boyaması yapıldı (Şekil 3.6).




Şekil 3.6. Keratinosit hücrelerinin anti-sitokeratin 5 TXRED ile immünfloresan boyanmış preparatlarının floresan mikroskobu görüntüleri, A) 10X büyütme, B) 20X büyütme, Kırmızı: Sitokeratin 5, Mavi: DAPI, Skala: 50µm

İzole edilen hücrelerin derinin epitel tabakasının bazal hücreleri tarafından eksprese edilen sitokeratin 5 antikorunca pozitif olması (Hynds ve diğ., 2018) bu hücrelerin keratinosit hücresi olduğunu kanıtlamıştır.

*İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelindeki epidermis tabakasını oluşturacak keratinosit hücrelerinin tutunmasını arttıracak bir yöntem bulmak amacıyla hücreler sadece insan dermal fibroblast, sadece HUVEC, insan dermal fibroblast üzerine laminin 511 kaplanmış, HUVEC üzerine laminin 511 kaplanmış ve sadece laminin 511 kaplanmış yüzeylerin üzerine ekildi ve tutunma durumları değerlendirildi (Şekil 3.7).

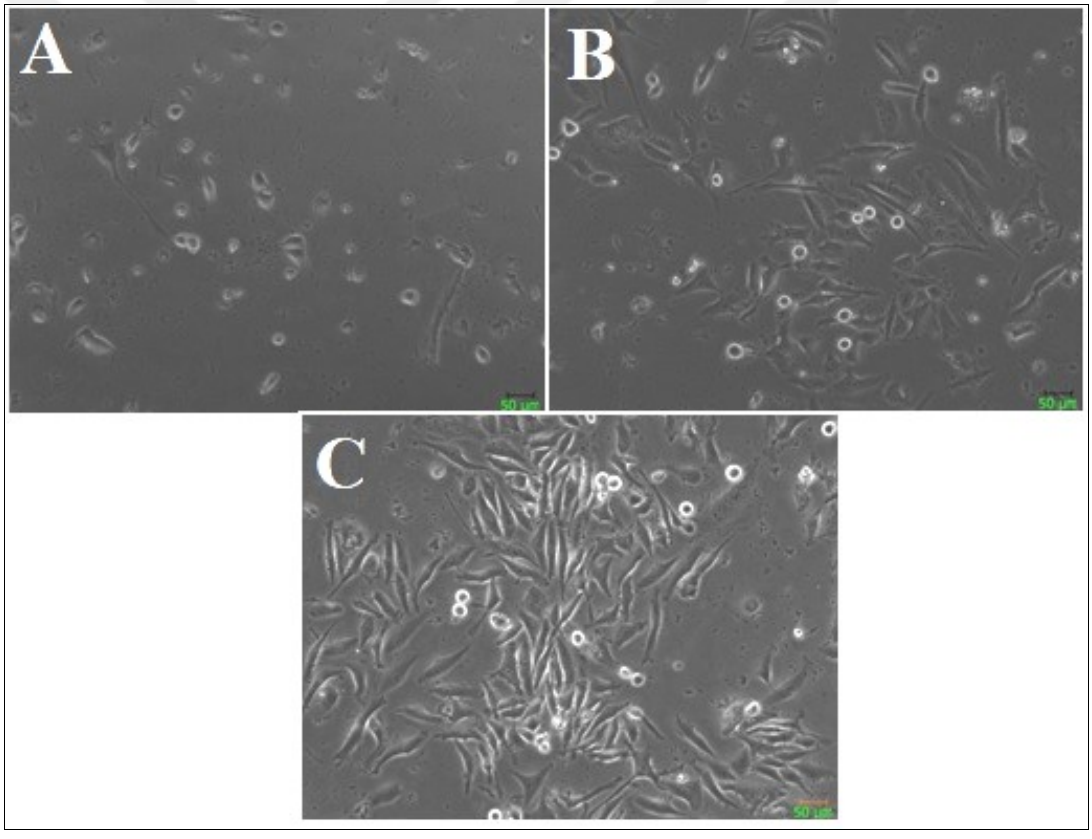



Şekil 3.7. Farklı yüzeylere ekilmiş olan keratinosit hücrelerinin 11 günlük inkübasyon sonundaki ışık mikroskobu görüntüleri, A) Sadece insan dermal fibroblast, B) Sadece HUVEC, C) İnsan dermal fibroblast üzerine laminin 511, D) HUVEC üzerine laminin 511, E) Sadece laminin 511 üzerinde büyütülmüş keratinositler (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 μm)

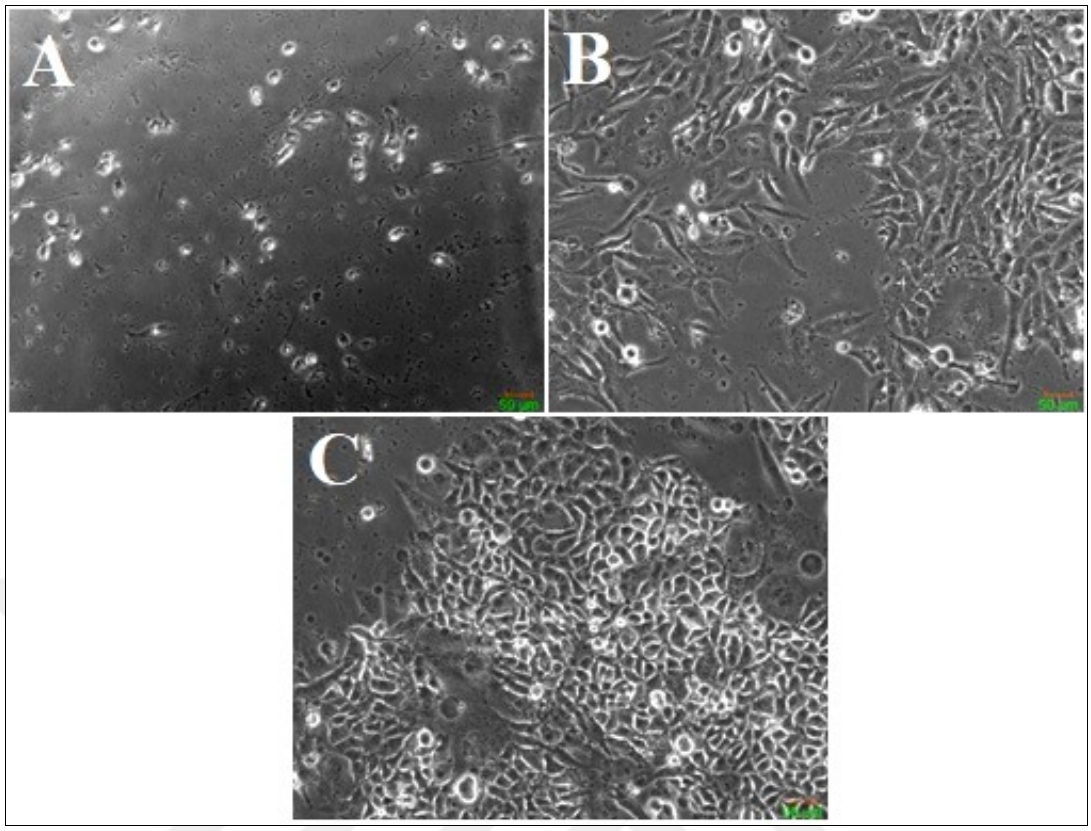
Keratinosit hücreleri farklı kaplamalar üzerine ekildikten 11 gün sonra ışık mikroskobuyla incelendiğinde hücrelerin sadece laminin 511 kaplamasına tutunmadığı görüldü. Keratinositlerin en iyi HUVEC hücreleri üzerine tutunduğu ve

bu tutunmada laminin 511 kaplamasının bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Bunun sebebi HUVEC hücreleri yüzeyi tamamen kapladıktan sonra keratinosit hücreleri ekildiği için HUVEC hücrelerinin ortama yeterli miktarda hücre dışı matriks salgılayabilmesi olabilir. Bu doğrultuda *in vitro* modelde epidermis tabakası için keratinositlerin ekilmesinden önce HUVEC hücrelerinin dermis yüzeyine ekilmesine karar verildi.

3-boyutlu insan deri modelinde kullanılacak keratinositlerin büyütüleceği besiyerine karar vermek amacıyla hücreler farklı besiyeri ortamlarında büyütülüp 4 ve 7 gün inkübasyon sonunda hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri çekildi (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



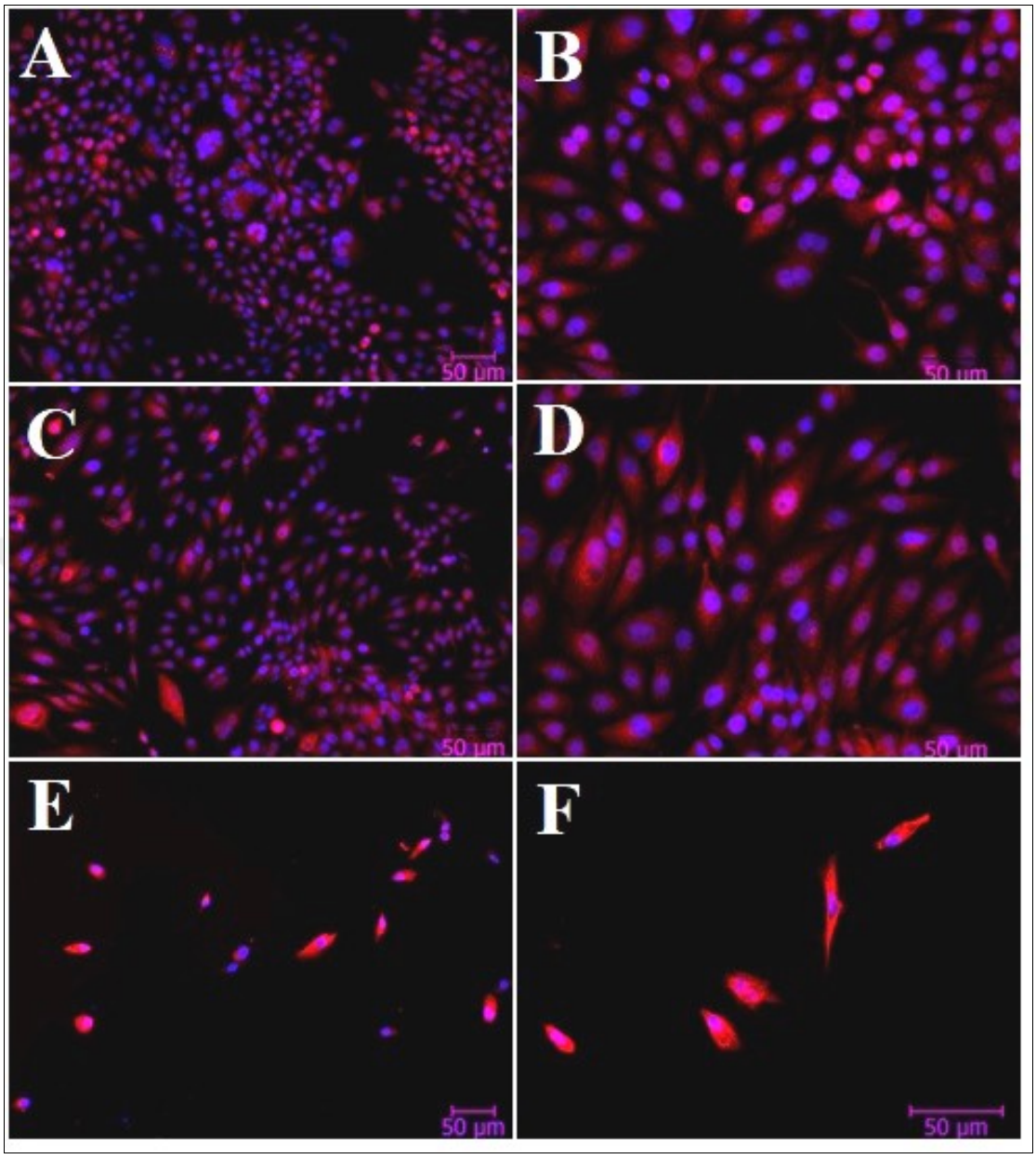

Şekil 3.8. İnsan keratinosit hücrelerinin 4 gün inkübasyon sonunda ışık mikroskobu görüntüleri, A) Serumsuz cascade besiyerinde, B) Fetal sığır serumu içeren cascade besiyerinde, C) İnsan plazması içeren cascade besiyerinde (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)




Şekil 3.9. İnsan keratinosit hücrelerinin 7 gün inkübasyon sonunda ışık mikroskobu görüntüleri, A) Serumsuz cascade besiyerinde, B) Fetal sığır serumu içeren cascade besiyerinde, C) İnsan plazması içeren cascade besiyerinde (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 μm)

Farklı besiyerlerinde 7 gün inkübe edilmiş insan keratinosit hücrelerinin karakterizasyonu anti-sitokeratin 5 immunfloresan boyama ile yapıldı (Şekil 3.10).

İnsan keratinosit hücrelerinin farklı besiyeri içerikleriyle 7 gün boyunca inkübe edilmesi sonucunda en iyi hücre gelişiminin insan plazması içeren Cascade besiyerinde olduğu görüldü. Bu sebeple de *in vitro* modelde kullanılacak keratinosit hücrelerini büyütmek için bu besiyerinin kullanılmasına karar verildi.



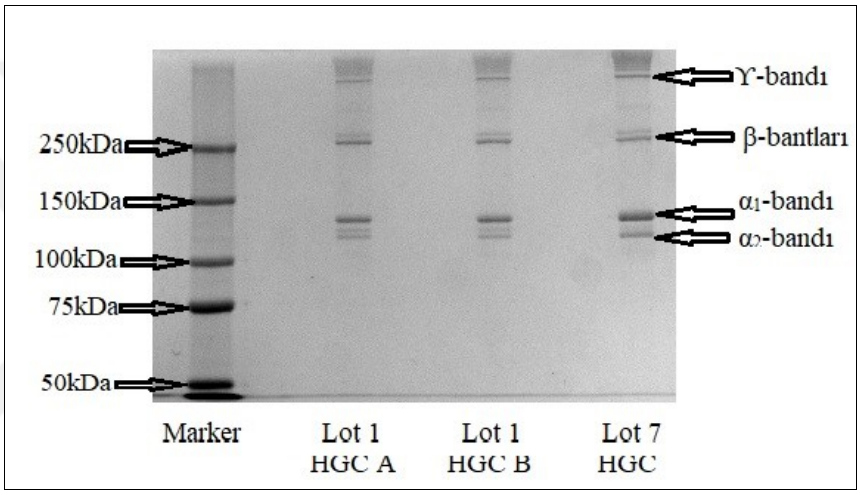

Şekil 3.10. İnsan keratinosit hücrelerinin 7 gün inkübasyon sonunda floresan mikroskobu görüntüleri, A-B) İnsan plazması içeren cascade besiyerinde, C-D) Fetal sığır serumu içeren cascade besiyerinde, E-F) Serumsuz cascade besiyerinde (A, C, E: 10X büyütme; B.D, F: 20X büyütme), Kırmızı: Sitokeratin 5, Mavi: DAPI, Skala: 50 µm

## 3.2. Tedavi Amaçlı Geliştirilen Hidrojelin Karakterizasyonu

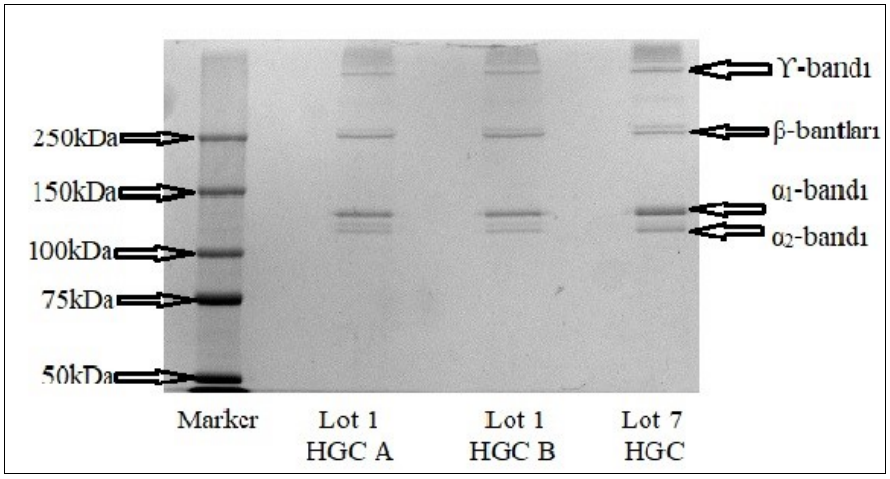
### 3.2.1.Sığır aşil tendon kaynaklı kollajenin karakterizasyonu

Kollajen, sığır aşil tendonunun mekanik ve enzimatik olarak parçalanıp NaCl ile çöktürülmesiyle elde edildi. Diyaliz sonrasında ise kollajen liyofilizasyon ile kurutulup kollajenin görüntüleri alındı (Şekil 3.11).

Şekil 3.11. Sığır aşil tendonundan izole edilip liyofilize edilmiş kollajen



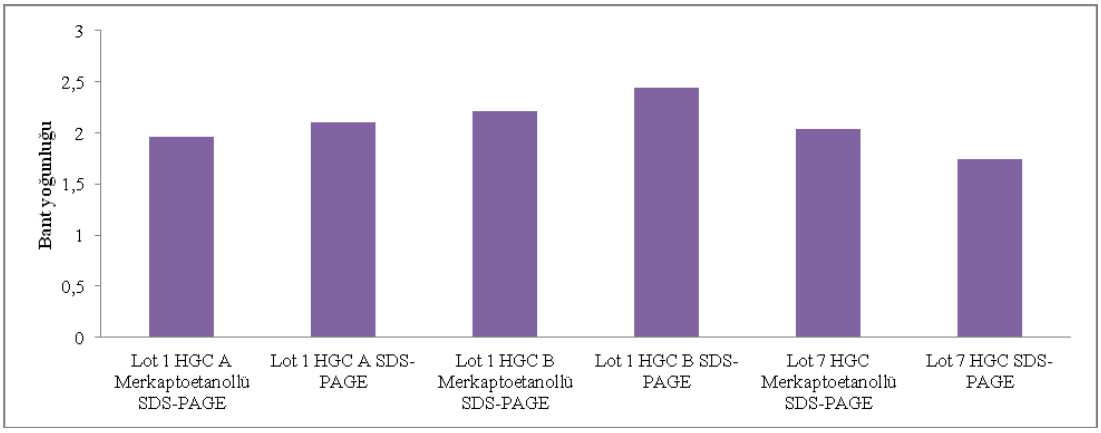

Şekil 3.12. Kollajen örneklerinin SDS-PAGE sonuçları




Şekil 3.13. Kollajen örneklerinin 2-merkaptoetanollü SDS-PAGE sonuçları

İzole edilen kollajenin saflığını değerlendirmek için SDS-PAGE kullanıldı (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Kollajen örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda tip I

kollajeni işaret eden, sırasıyla 139 kDa ve 129 kDa moleküler ağırlığa sahip $\alpha_1$ ve $\alpha_2$ zincirleri tespit edildi. Tip I kollajeni ifade eden bantlar arasında $\alpha_1$ ve $\alpha_2$ zincirlerinin yanı sıra β ve γ-bantlarının olduğu da kanıtlanmıştır. Tip I kollajenin β-bandının 250 kDa moleküler ağırlığa sahip, $\alpha_1$ ve $\alpha_2$ zincirlerinin birlikte ya da iki $\alpha_1$ zincirini gösteren bir dimer olduğu literatürde (Rabotyagova ve diğ., 2008) de var olduğu gibi iki bant şeklinde bizim çalışmamızda da görülmüştür. 250 kDa moleküler ağırlığın üzerinde görülen bantların da tip I kollajenin γ-bandı olduğu düşünülmektedir. Kollajenin ısı ile denatürasyonu sağlanamadığından üçlü heliks yapısı bozulmamış ve bu durum da jelde β-bantlarının üzerinde γ-bandının yer almasına neden olmuştur. Sığır aşil tendonunda tip I kollajenin yanı sıra bir miktar da tip III kollajenin olduğu bilindiğinden (Zeugolis ve diğ., 2008) 2-merkaptoetanollü (Şekil 3.12) ve 2-merkaptoetanol eklenmemiş örneklerde (Şekil 3.13) tip III kollajen varlığına da bakıldı. Tip III kollajen, üç α1 zincirinden oluşmaktadır ve ancak zincirler arasındaki disülfit bağları merkaptoetanol ile kırıldıktan sonra α1 zinciri jelde görüntülenebilmektedir. 139 kDa/ 129 kDa bant yoğunluk oranları örneklere merkaptoetanol ilave edildiğinde, Lot 1 HGC A, Lot 1 HGC B ve Lot 7 HGC örnekleri için sırasıyla 1,96; 2,22; 2,04 iken, merkaptoetanol ilavesiz örneklerde yine aynı sırayla 2,10; 2,44; 1,74 olarak elde edildi (Şekil 3.14). Elde edilen bu sonuçlar Lot 1 HGC A ve Lot 1 HGC B örneklerinde tip III kollajen olmadığını Lot 7 HGC örneğinde ise tip III kollajen (% 15 oranında) varlığını göstermektedir.




Şekil 3.14. Kollajen örneklerinin SDS-PAGE ve merkaptoetanollü SDS-PAGE analizleri sonucundaki 139 kDa / 129 kDa bant yoğunluk oranları

İzole edilen tüm kollajen örneklerinde tip I kollajenin varlığı yapılan SDS-PAGE analiziyle ispatlanmıştır. Kollajenin zayıf mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla,

derinin de mukavemetini arttıran tip III kollajeni de (Cen ve diğ., 2008) içeren Lot 7 HGC'den hidrojel yapılmasına karar verildi.

### 3.2.2. Kollajenli hidrojel karakterizasyonu

#### 3.2.2.1. Hücresiz kollajenli hidrojel karakterizasyonu

Uygulanan farklı hidrojel formülasyonları sonucunda hidrojel oluşturan en iyi formülasyonlar belirlenip hücreli olarak denenmek üzere ayrıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Farklı hidrojel formülasyonlarının belirli koşullarda hidrojel oluşturma özellikleri **(**Kol: Kollajen; HA: Hyaluronik asit; ASK (askorbik asit) a: Sigma A8960 L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate; ASK b: Sigma A7506 L-ascorbic acid; A: Sodyum aljinat; İP Kol: İnsan plasenta kollajeni)

| **Örnek No** | **İçerik** | **Uygulama** | **Hidrojel Oluşumu** |
|---|---|---|---|
| 1 | 1,2 mg/mL KOL+0,1 mg/mL HA | - | Gözlenmedi |
| 2 | 1,6 mg/mL Kol+0,1 mg/mL HA | - | Gözlenmedi |
| 3 | 2,4 mg/mL Kol+0,1 mg/mL HA | 15 dk 37°C, 5 dk UV | Gözlenmedi |
| 4 | 4 mg/mL Kol+0,1 mg/mL HA | 15 dk 37°C, 5 dk UV | Gözlenmedi |
| 5 | 6,4 mg/mL Kol+0,1 mg/mL HA | 15 dk 37°C, 5 dk UV | Gözlenmedi |
| 6 | 2 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK a | 15 dk 37°C, 10 dk UV | Gözenmedi |
| 7 | 3,33 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK a | 15 dk 37°C, 10 dk UV | Gözlenmedi |
| 8 | 5,33 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK a | 15 dk 37°C, 10 dk UV | Gözlenmedi |
| 9 | 5,33 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK a | 120 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 10 | 4 mg/mL Kol+0,063 mg/mL HA+5 mg/mL ASK b+1,25 mg/mL A+1,25 mg/mL İP Kol | 15 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 11 | 4,57 mg/mL Kol+0,071 mg/mL HA+5,71 mg/mL ASK b+1,43 mg/mL İP Kol | 15 dk 37°C | Gözlenmedi |

Tablo 3.1. (Devam) Farklı hidrojel formülasyonlarının belirli koşullarda hidrojel oluşturma özellikleri **(**Kol: Kollajen; HA: Hyaluronik asit; ASK (askorbik asit) a: Sigma A8960 L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate; ASK b: Sigma A7506 L-ascorbic acid; A: Sodyum aljinat; İP Kol: İnsan plasenta kollajeni)

| **Örnek No** | **İçerik** | **Uygulama** | **Hidrojel Oluşumu** |
|---|---|---|---|
| 12 | 5,33 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+1,67 mg/mL İP Kol | 150 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 13 | 6,4 mg/mL Kol+2 mg/mL İP Kol | 150 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 14 | 6,4 mg/mL Kol+2 mg/mL A | 150 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 15 | 5,33 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK b | 150 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 16 | 8 mg/mL Kol+0,1 mg/mL HA | - | Gözlenmedi |
| 17 | 10 mg/mL Kol | 10 dk 405 nm diyot lazer, 20 dk 37°C | Gözlenmedi |
| 18 | 5 mg/mL Kol+0,0625 mg/mL HA+5 mg/mL ASK b+1,25 mg/mL A+1,25 mg/mL İP Kol | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 19 | 5,71 mg/mL Kol+0,071 mg/mL HA+5,71 mg/mL ASK b+1,43 mg/mL İP Kol | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 20 | 5,71 mg/mL Kol+0,071 mg/mL HA+5,71 mg/mL ASK b+1,43 mg/mL A | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 21 | 5,71 mg/mL Kol+0,071 mg/mL HA+5,71 mg/mL ASK a+1,43 mg/mL A | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 22 | 6,67 mg/mL Kol+6,67 mg/mL ASK b+1,67 mg/mL A | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 23 | 6,67 mg/mL Kol+6,67 mg/mL ASK a+1,67 mg/mL A | 150 dk 37°C | Gözlendi |

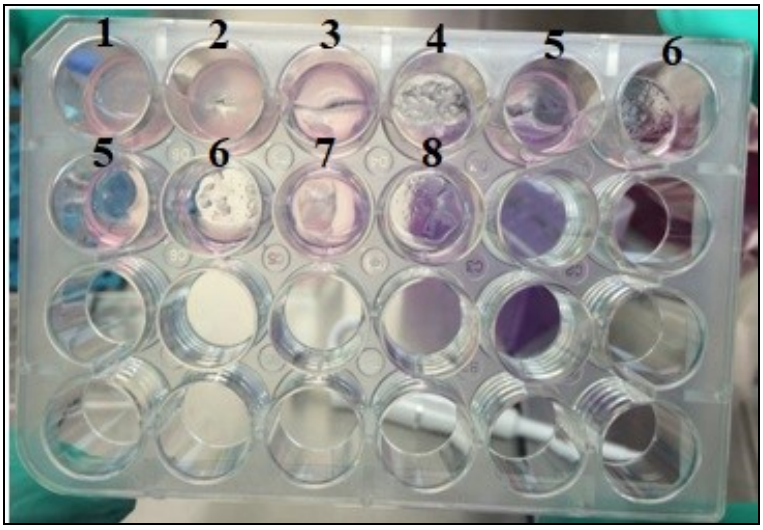
Tablo 3.1. (Devam) Farklı hidrojel formülasyonlarının belirli koşullarda hidrojel oluşturma özellikleri **(**Kol: Kollajen; HA: Hyaluronik asit; ASK (askorbik asit) a: Sigma A8960 L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate; ASK b: Sigma A7506 L-ascorbic acid; A: Sodyum aljinat; İP Kol: İnsan plasenta kollajeni)

| Örnek No | İçerik | Uygulama | Hidrojel Oluşumu |
|---|---|---|---|
| 24 | 6,67 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK b | 150 dk 37°C | Gözlendi |
| 25 | 6,67 mg/mL Kol+0,083 mg/mL HA+6,67 mg/mL ASK a | 150 dk 37°C | Gözlendi |

Hidrojel oluşturma denemeleri sonucunda jelleşmenin en iyi 22-29. karışımlarda olduğu görüldü. Bu karışımlardaki son kollajen konsantrasyonları 5-6,67 mg/mL arasındaydı. Grunert ve arkadaşları da düşük yoğunluktaki tip I kollajen jelin dermal doldurucu olarak kolaylıkla klinik uygulamalarda kullanıldığını ve doku onarımı ya da yenilenmesinde hücre iskelesi olarak kullanımının da söz konusu olduğunu vurgulamışlardır (Grunert ve diğ., 2015).

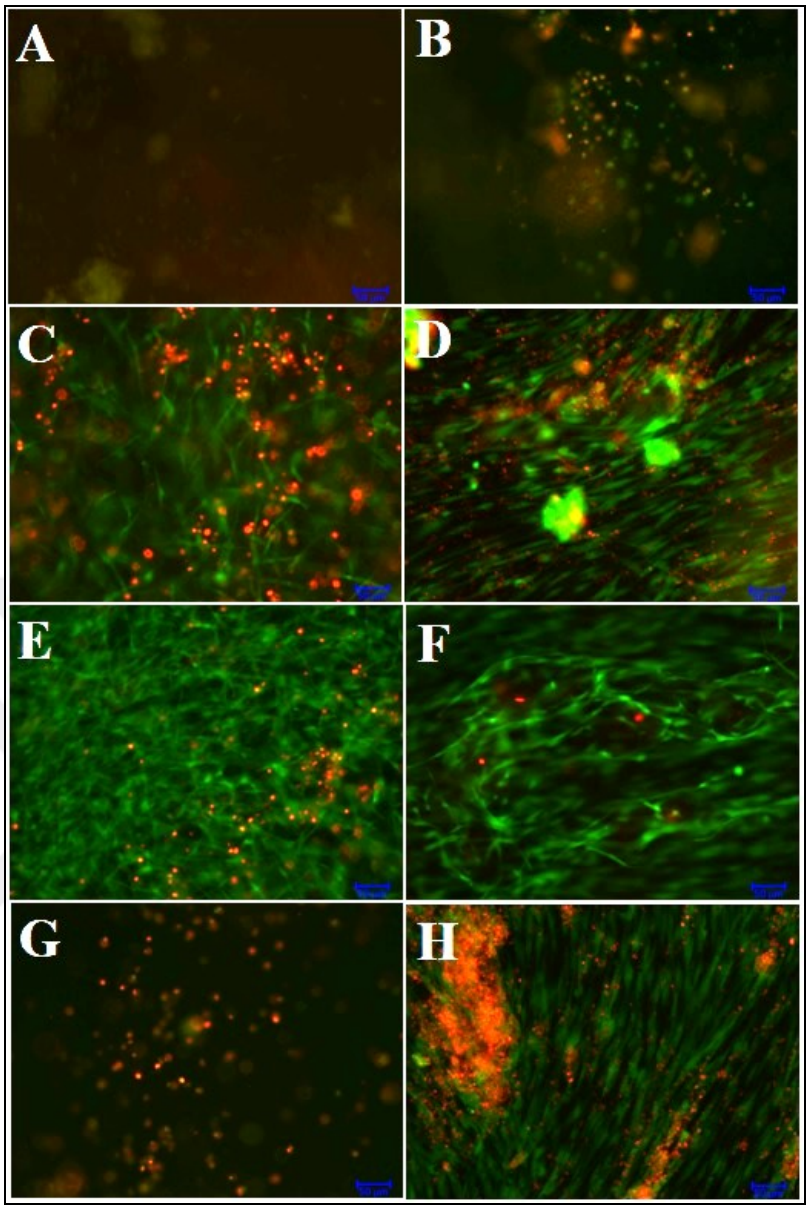
### 3.2.2.2. Hücreli kollajenli hidrojel karakterizasyonu

Hücresiz hidrojel denemeleri sonucunda elde edilen en iyi hidrojel formülasyon ve uygulamaları seçilerek hücreli hidrojel denemelerine geçildi. Hücre olarak normoglisemik insan dermal fibroblast hücreleri kullanıldı. Öncelikle hücreli hidrojel oluşumları morfolojik olarak değerlendirildi. 1., 2., 3. ve 5. hidrojel formülasyon ve uygulamalarında hidrojel bütünlüğü korunurken diğer hidrojel formülasyonlarında jel bütünlüğü korunamamıştır (Şekil 3.15).




Şekil 3.15. Oluşturulan hücreli hidrojel formülasyonlarının makroskobik görüntüsü

Farklı hidrojel formülasyonlarında inkübe edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin hücre canlılıkları canlı/ölü hücre boyama testi ile değerlendirildi (Şekil 3.16 A-H). Canlı/ölü hücre boyaması sonucunda 1. uygulamadaki hücrelerin tamamen ölü olduğu görüldü. 2. uygulamada ölü hücrelere de canlı hücrelere de rastlandı ancak hücrelerde herhangi bir uzantı görülmedi. 3. ve 5. uygulamalardaki hücrelerin hidrojel içerisinde uzandığı görüldü ancak 5. uygulamada daha fazla canlı hücre mevcuttu. 4. uygulamadaki hidrojel tamamen dağıldığı için hücreler plakanın tabanına tutunmuştu fakat hidrojel kalıntılarının olduğu bölgelerdeki ölü hücre sayısı çok fazla idi. 6. uygulamadaki hidrojelin de büyük çoğunluğu dağıldığı için hücreler çoğunlukla plaka tabanına tutunmuştu ancak hidrojel kalıntılarının hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı görüldü. 7. uygulamadaki hücrelerin tamamen öldüğü tespit edildi. 8. uygulamada da hidrojelin çoğu dağıldığı için hücreler plakanın tabanına tutunmuş olmasına rağmen hidrojel kalıntılarının olduğu bölgelerde yoğun hücre ölümlerine rastlandı.




Şekil 3.16. Farklı hidrojel formülasyonları ile kültüre edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin 9. gün sonundaki canlı/ölü hücre boyaması floresan görüntüleri, A) 1. Uygulama, B) 2. Uygulama, C) 3. Uygulama, D) 4. Uygulama, E) 5. Uygulama, F) 6. Uygulama, G) 7. Uygulama, H) 8. Uygulama, Yeşil: Canlı hücre, Kırmızı: Ölü hücre (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

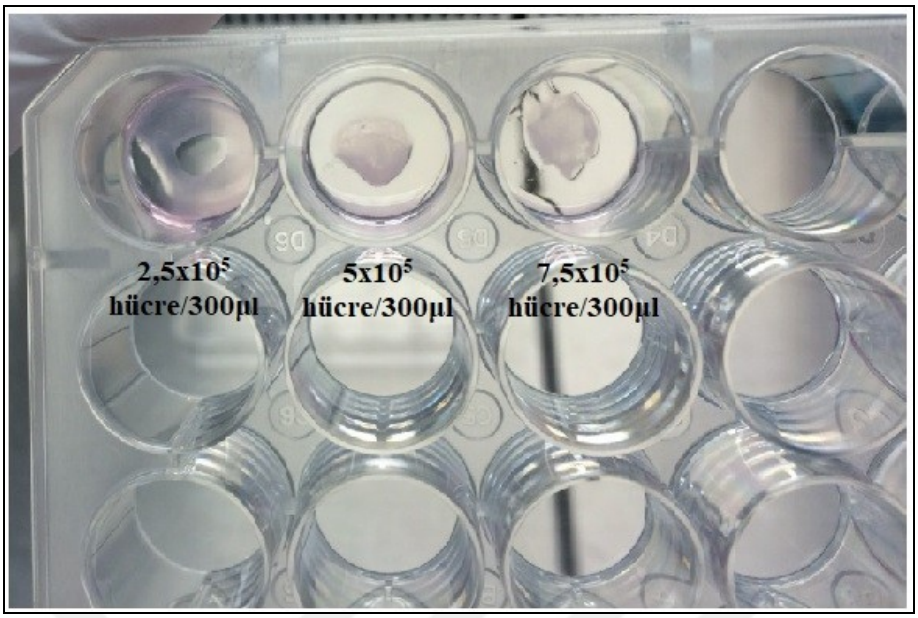
Hücreli hidrojellerin bütünlüklerini koruma ve hücre canlılıkları göz önüne alındığında en iyi hidrojel formülasyon ve uygulamasının 5. uygulamadaki hidrojel olduğu sonucuna varıldı. Bu hidrojeldeki temel malzeme sığır aşil tendonundan izole edilen atelokollajendir. Kollajenin, hücre dışı matriksin başlıca bileşeni ve memeli dokularında en bol bulunan protein olması (Tan ve Marra, 2010), fibroblast

hücrelerinin çoğalması ve yaralanmış dokunun iyileşmesine yardımcı olma (Grunert ve diğ., 2015; Takayama ve diğ., 2009) gibi etkilerinin yanı sıra jel içerisinde hücrelerin damar oluşturmasına da katkıda bulunduğu literatürle desteklenmiştir. Neovaskülarizasyonda vasküler duvar hücreleri için adhezif olan kısımlar hidrojelin polimer ağında bol miktarda bulunmalıdır. Hücre-hücre dışı matriks tutunmasının doğal mekanizmasında integrinler hücre yüzey reseptörleri olarak önemli bir rol oynarlar ve α1β1 ve α2β1 gibi bazı integrinler kollajene doğrudan bağlanabilirler. Ayrıca kollajen, neovaskülarizasyon ve granülasyon oluşumunda kritik integrinler olan αvβ3 ve αvβ5'in potansiyel ligandı olan fibronektine de bağlanabilir. Vücut sıvıları *in vivo*'da fibronektince zengin olduğundan kollajen bu koşullarda fibronektin aracılığıyla kritik integrinlerle etkileşime geçer. Damar oluşumu için kullanılacak hücre iskelesi malzemesinin damarların gelişmesi ve uzamasına elverişli olması gerekmektedir. *İn vivo* neovaskülarizasyonda vasküler hücreler ve onlarla ilişkili hücreler genellikle, etrafındaki hücre dışı matriksi parçalayan matriks metalloproteinazları ve plazminojen aktivatörleri (PAs) gibi çeşitli proteazları salar ve yeni oluşacak damarların yeniden modellenmesi için hücre dışı matriksi geliştiren matriks moleküllerini sentezler. Planlanmış malzemenin moleküler yapısının proteaz-sindirici kısımlarının olması gerekir ve bu tarz sindirici kısımların kollajen moleküllerinde bolca bulunduğu bilinmektedir (Takayama ve diğ., 2009). Bu çalışmada da yara modelini oluşturan GelMA hidrojel içerisine damar oluşturan hücreler eklendi. Ayrıca açılan yaraya tedavi amaçlı yerleştirilen kollajen hidrojel içerisindeki kollajenin damar oluşumunu destekleyebileceği düşünülmektedir. En iyi hidrojel formülasyonu olan 5. uygulamadaki hidrojelin bir diğer malzemesi de kalsiyum varlığında çapraz bağlana ve düşük toksik özelliklerinden dolayı hücre tutuklanması, doku mühendisliği ve ilaç salımı gibi çeşitli medikal uygulamalarda kullanılan bir polisakkarit olan aljinattır (Takayama ve diğ., 2009). Aljinatın yanı sıra hidrojel yapımında kullanılan son malzeme ise askorbik asittir. Askorbik asite tepki olarak kollajen sentezinin arttığı bilinmektedir (Akbay ve diğ., 2010; Davidson ve diğ., 1997; Michel ve diğ., 1999). Askorbik asitin kollajen sentezini uyarmasıyla ilgili mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Bir hipoteze göre askorbik asitin bu etkisinin, prolinin enzimatik hidroksilasyonunda kofaktör olarak rol oynamasından kaynaklı olduğuna dairdir. Prokollajen genleri normal olarak ifade edilir ve oluşan mRNA'lar prokollajen polipeptitlerini oluştururlar. Askorbik asit varlığında bu

polipeptitler hidroksile edilir ve hücreden hızlıca salınan fonksiyonel prokollajen molekülünü oluştururlar. Ortamda askorbik asit olmadığında ise hücrede hidroksile edilmemiş prokollejenler birikir ve bu da translasyonun inhibe olmasına yol açar. Bu sisteme bu anda askorbik asit ilave edilmesi hücrede birikmiş prokollajenin hidroksillenerek fonksiyonel prokollajen molekülünün oluşmasını ve oluşan prokollajen molekülünün hızlıca hücre dışına salımına yol açar. Böylece inhibisyon kaynağı ortadan kalkarken normal prokollajen sentezi de devam etmiş olur. Yapılan son çalışmalar askorbik asitin, prokollajen mRNA sentezini arttırarak ya da yıkımını azaltarak ya da her iki durumu da gerçekleştirerek doğrudan kollajen sentezini arttırdığı yönündedir (Geesin ve diğ., 1988). Bu tezde de yara iyileşmesini uyarmak için hazırlanan kollajenli hidrojel içerisindeki askorbik asitin hem kollajen sentezini arttırabileceği hem de damar oluşumunu hızlandırarak yara kapanmasını tetikleyebileceği öngörülmüştür.

Kollajenli hidrojel optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi hücre canlılığı ve bütünlüğünü koruma özelliği olan hidrojel formülasyonu 6,67 mg/mL sığır aşil tendon kollajeni, 6,67 mg/mL L-askorbik asit ve 1,67 mg/mL sodyum aljinat karışımı olarak tespit edildi. Bu hidrojel formülasyonuna en uygun hücre konsantrasyonunu tayin etmek amacıyla öncelikle $2{,}5x10^5$, $5x10^5$ ve $7{,}5x10^5$ hücre/350 µL konsantrasyonlarında fibroblast hücresi hidrojel çözeltisine karıştırılıp jelleşme için 150 dakika 37°C sıcaklıkta bekletildi. Hidrojel içerisindeki hücreler 9 gün inkübe edildikten sonra hidrojel bütünlükleri çekilen fotoğraflarla değerlendirildi.

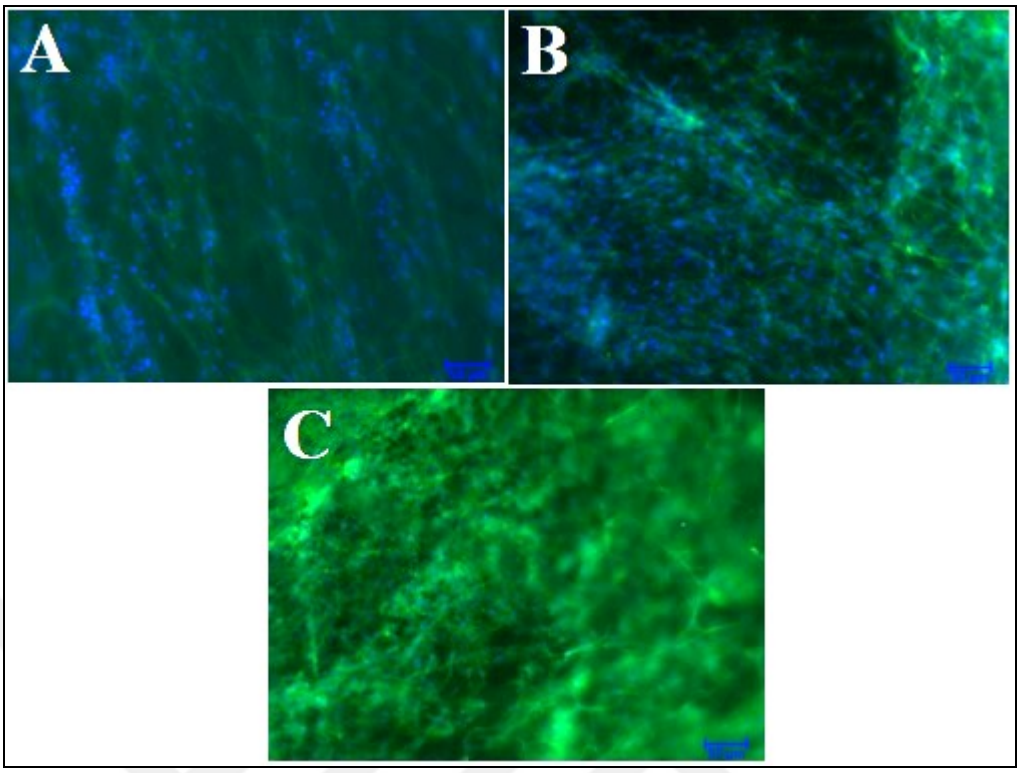
Hücrelerin 9 gün inkübasyonu sonucunda $2{,}5x10^5$ hücre/300 µL hücre içeren hidrojelin ortasından yırtıldığı, diğer iki hücre konsantrasyonundaki hidrojellerin ise hücre yoğunluğundan kaynaklı olarak hacminin küçüldüğü görüldü (Şekil 3.17).




Şekil 3.17. Aynı hidrojel formülasyonuna gömülen farklı hücre konsantrasyonlarının 9 gün sonunda hidrojelde meydana getirdiği hacimsel değişim

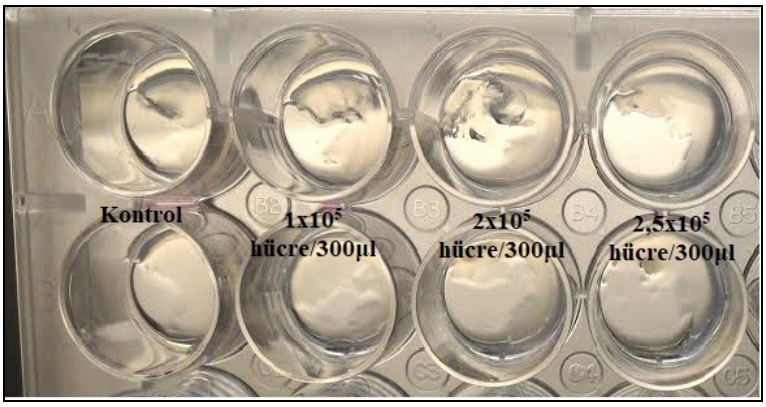
Hücreli hidrojellerin çapları ölçüldüğünde $2,5x10^5$ hücre/300 µL hücre konsantrasyonu olan hidrojelin çapında % 18,55, $5x10^5$ hücre/300 µL hücre konsantrasyonu olan hidrojelin çapında % 63,80 ve $7,5x10^5$ hücre/300 µL hücre konsantrasyonu olan hidrojelin çapında ise % 68,33 oranında azalma saptandı.

Hücreli hidrojellerdeki hücre yoğunluklarının belirlenmesi için hidrojellere falloidin boyama yapıldı (Şekil 3.18 A-C).



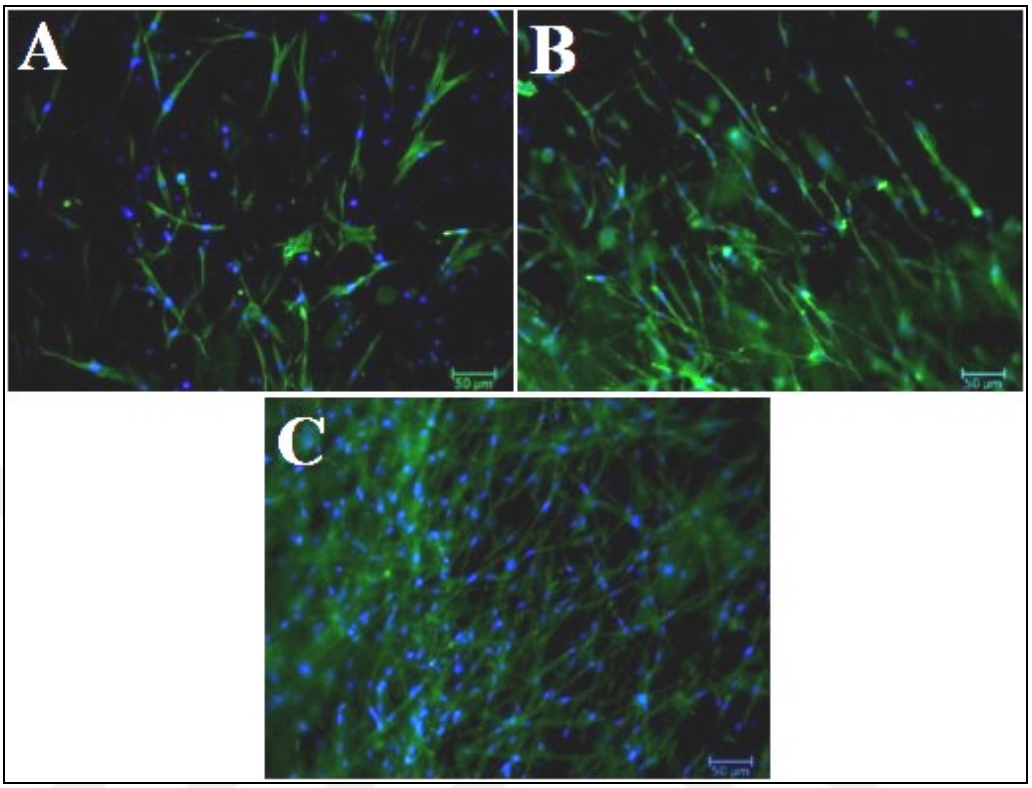

Şekil 3.18. Hücreli hidrojel formülasyonuna gömülen farklı konsantrasyonlarındaki insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün inkübasyon sonundaki falloidin boyama görüntüleri, A) 2,5x$10^5$ hücre/300 Ml, B) 5x$10^5$ hücre/300 µL, C) 7,5x$10^5$ hücre/300 µL, Yeşil: Falloidin Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

Kollajenli hidrojel içerisine entegre edilecek fibroblast konsantrasyonunu belirleyebilmek amacıyla daha az hücre konsantrasyonları (1x$10^5$, 2x$10^5$ ve 2,5x$10^5$ hücre/300 µL) da hidrojel içerisine gömüldü. Hücreli hidrojellerin 9 gün inkübasyonu sonunda hücresiz hidrojel olan kontrol grubu dahil tüm hidrojellerde yırtılma olduğu görüldü (Şekil 3.19).




Şekil 3.19. Aynı hidrojel formülasyonuna gömülen farklı hücre konsantrasyonlarının 9 gün sonunda hidrojel üzerinde meydana getirdikleri değişim

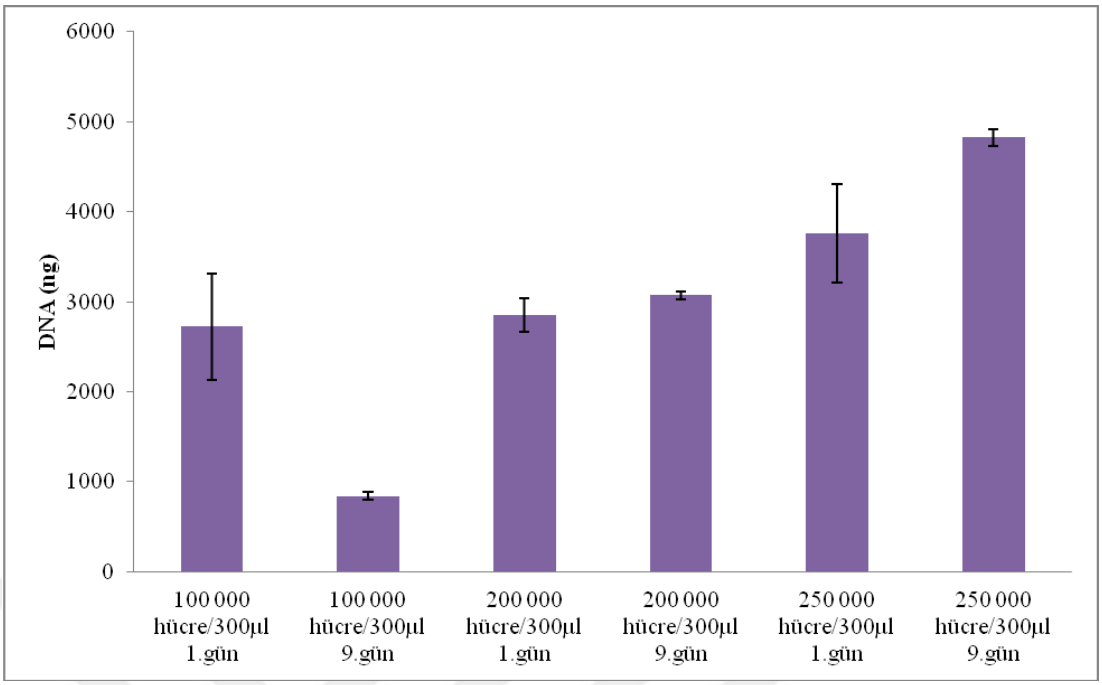
Hidrojellerdeki hücrelerin yoğunluklarının belirlenmesi için hidrojellere falloidin boyama yapıldı (Şekil 3.20 A-C).




Şekil 3.20. Hücreli hidrojel formülasyonuna gömülen farklı konsantrasyonlardaki insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün inkübasyon sonundaki falloidin boyama görüntüleri, A) $1x10^5$ hücre/300 µL, B) $2x10^5$ hücre/300 µL, C) $2,5x10^5$ hücre/300 µL, Yeşil: Falloidin Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

$1x10^5$ hücre/300 µL konsantrasyonundaki hidrojelde hücre yoğunluğu diğer gruplara göre çok daha azdı. En fazla uzanmış hücre konsantrasyonuna $2,5x10^5$ hücre/300 µL konsantrasyonundaki örnekte görüldü.

İlk gün ve 9. gündeki hücre çoğalmalarını kıyaslamak amacıyla süre sonlarında hidrojeller proteinaz K ile parçalanıp DNA konsantrasyonları nanodrop cihazı ile ölçüldü. Bu prosedürde kollajenaz kullanılmamış mıydı?




Şekil 3.21. Farklı konsantrasyonlarda kollajen hidrojeller içerisine gömülmüş olan insan dermal fibroblast hücrelerinin 1. ve 9. gün sonundaki DNA miktarları

$1x10^5$ hücre/300 µL hücre konsantrasyonu hariç diğer tüm hidrojellerdeki hücre sayılarının 9 gün sonra arttığı görüldü (Şekil 3.21). $1x10^5$ hücre/300 µL konsantrasyonundaki hidrojellerdeki bu anormal sonucun sebebi hidrojelin uygulamalar sonucunda tamamen parçalanamaması ve sonuç olarak da hücrelerin hidrojel dışına çıkarılamaması olabilir.

Hidrojellerin bütünlüğünü koruyabilmesi, hidrojel içerisindeki hücrelerin durumu ve hücre canlılıklarıyla ilgili yapılan optimizasyonlar sonucunda hidrojel içinde hücresel tedavi olarak kullanılacak olan kollajenli hidrojel içerisine $2,5x10^5$ hücre/300 µL konsantrasyonunda fibroblast hücresi gömülmesine karar verildi.

## 3.3. *Cotinus coggygria* Özütlerinin Sitotoksik ve Antimikrobiyal Özellikleri

### 3.3.1. Farklı *Cotinus coggygria* (boyacı sumağı) özüt ve konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri

Farklı boyacı sumağı özütlerinin (hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol, metanol, distile su kullanılarak elde edilmiş ve geleneksel yöntemle elde edilmiş) farklı konsantrasyonlarının normoglisemik ve tip 2 diyabetik bireylerden izole edilen dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla farklı boyacı sumağı konsantrasyonları 4 gün boyunca fibroblast hücrelerine uygulandı. Süre

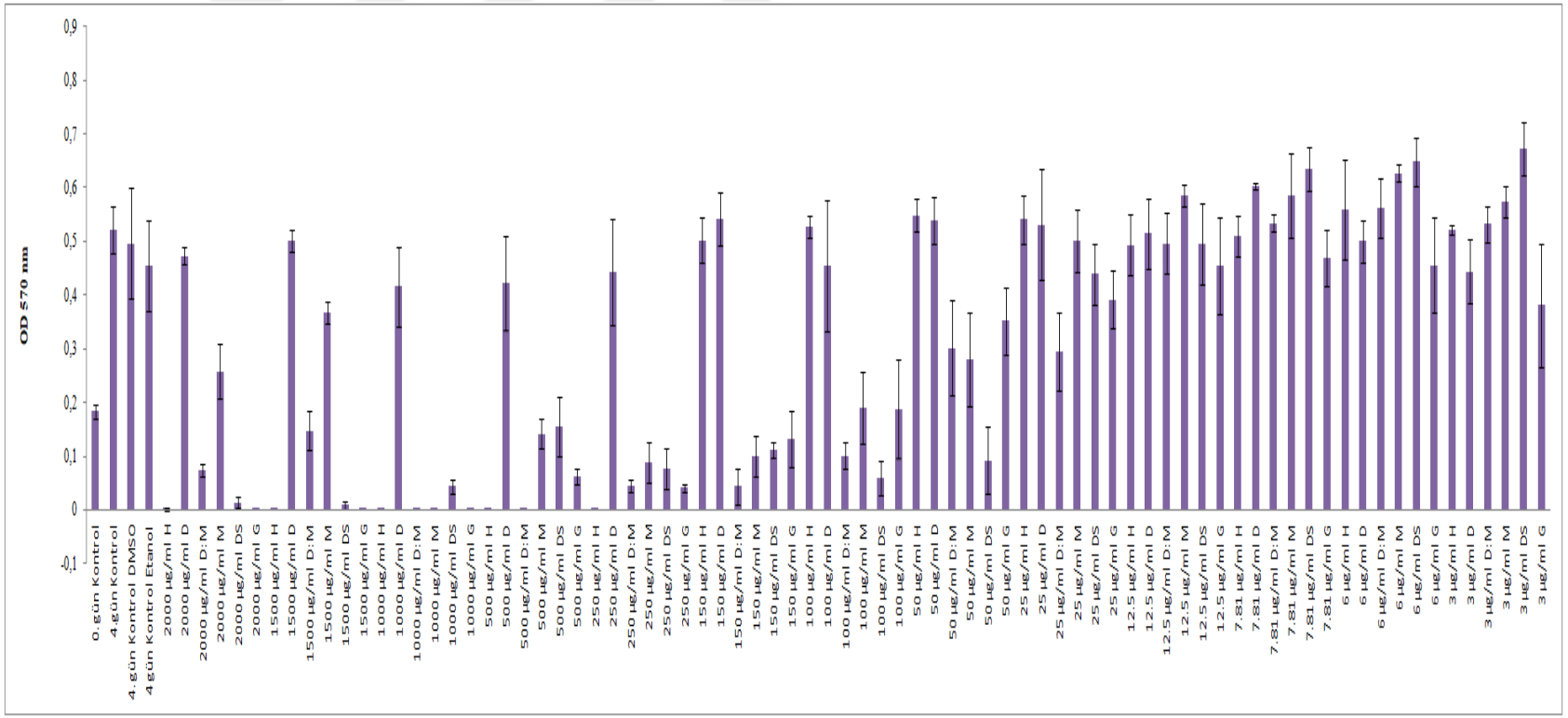
sonunda yapılan MTT testi ile bu konsantrasyonların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirildi.

Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesinin, boyacı sumağının diklorometan ve metanol özütlerinin 2000 ve 1500 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan özütünün 1000, 500 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan ve diklorometan özütlerinin 150 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan, diklorometan, metanol özütlerinin 100 µg/mL konsantrasyonlarında, distile su özütü hariç tüm özütlerin 50 µg/mL konsantrasyonlarında ve tüm özütlerin 25-3 µg/mL konsantrasyonları arasında 0. gün kontrol grubundan daha yüksek olması bu konsantrasyonların hücre ölümüne sebep olmadığını göstermiştir. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesinin, boyacı sumağının diklorometan özütünün 2000 ve 1500 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan ve diklorometan özütlerinin 150 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan özütünün 100 µg/mL konsantrasyonunda, hekzan ve diklorometan özütlerinin 50 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan, diklorometan ve metanol özütlerinin 25 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan ve metanol özütlerinin 12,5 µg/mL konsantrasyonlarında, geleneksel özüt hariç diğer özütlerin 7,81 ve 6 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan, diklorometan:metanol, metanol ve distile su özütlerinin 3 µg/mL konsantrasyonlarında 4. gün kontrol grubundan daha yüksek olması bu konsantrasyonların hücre çoğalmasını sağladığını kanıtlamıştır (Şekil 3.22).

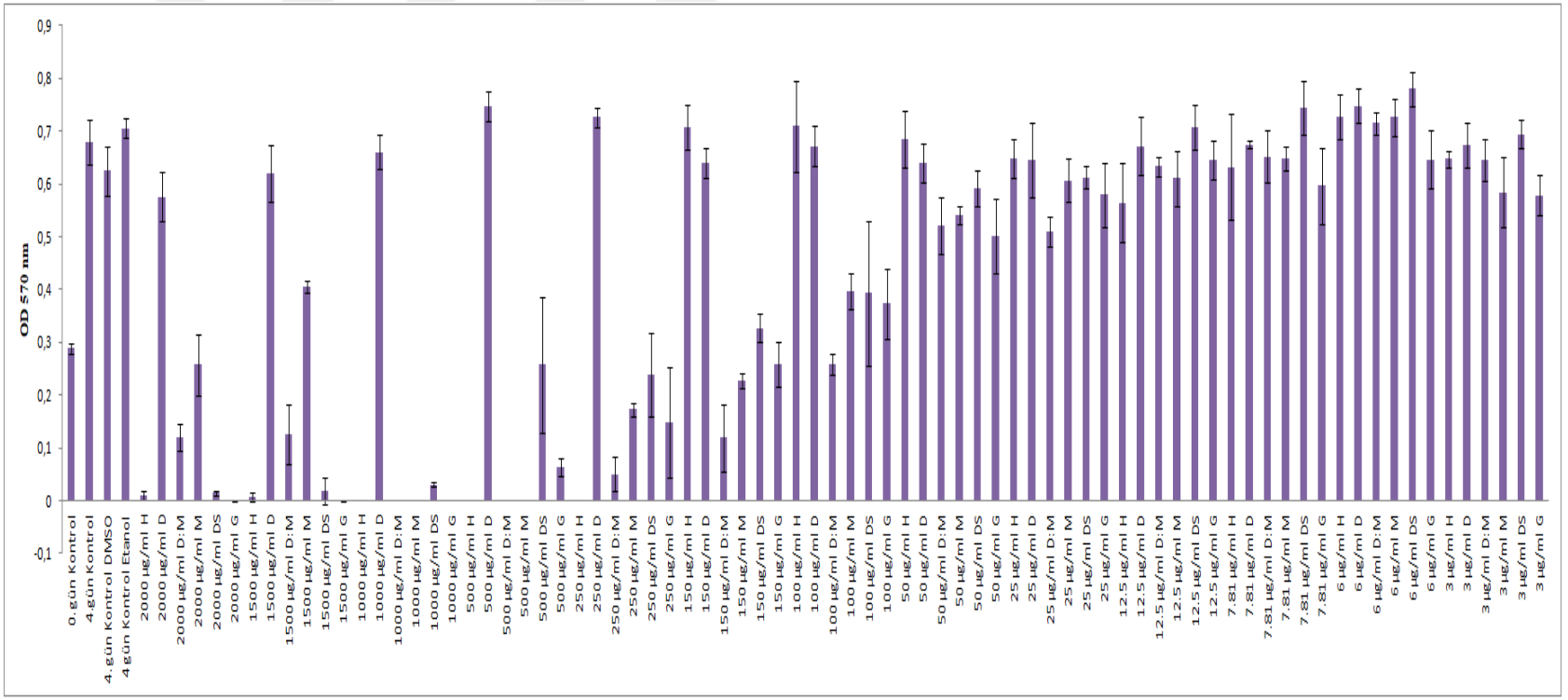
Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesinin, boyacı sumağının diklorometan özütünün 2000 µg/mL konsantrasyonunda, diklorometan ve metanol özütlerinin 1500 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan özütünün 1000, 500 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan, diklorometan ve distile su özütlerinin 150 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan:metanol özütü hariç diğer tüm özütlerin 100 µg/mL konsantrasyonlarında, tüm özütlerin 3-50 µg/mL konsantrasyonları arasında 0. gün kontrol grubundan daha yüksek olması bu konsantrasyonların hücre ölümüne yol açmadığını ispatlamıştır. Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesinin boyacı sumağının diklorometan özütünün 500 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan özütünün 150, 100, 50 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan:metanol ve distile su

özütlerinin 12,5 µg/mL konsantrasyonlarında, diklorometan ve geleneksel özüt hariç diğer özütlerin 7,81 µg/mL konsantrasyonlarında, geleneksel özüt hariç tüm özütlerin 6 µg/mL konsantrasyonlarında, hekzan, diklorometan:metanol ve distile su özütlerinin 3 µg/mL konsantrasyonlarında 4. gün kontrol grubundan yüksek olması bu konsantrasyonların hücre çoğalmasını tetiklediğini göstermiştir (Şekil 3.23).

Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerini çoğaltan ilk üç boyacı sumağı özütü sırasıyla 6 µg/mL distile su, 6 µg/mL diklorometan ve 7,81 µg/mL distile su özütleriyken normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerini prolifere eden özütler 3 µg/mL distile su, 6 µg/mL distile su ve 7,81 µg/mL distile su özütü olarak tespit edilmiştir. Genel olarak her iki tip fibroblast hücresi çoğalmasını pozitif yönde etkileyen konsantrasyonlar boyacı sumağı özütlerinin düşük konsantrasyonlarıyken diklorometan özütünün yüksek konsantrasyonlarının da sitotoksik olmadığı görülmüştür. Šavikin ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 12,5 µg/mL konsantrasyonlarındaki boyacı sumağının metanol özütlerinin tümör hücreleri için toksik olmasına rağmen karides yumurtalarına herhangi bir toksik etkisinin olmadığını göstermişlerdir (Šavikin ve diğ., 2009).




Şekil 3.22. Farklı boyacı sumağı özütlerinin tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. H: Hekzan özütü, D: Diklorometan özütü, D:M: Diklorometan:Metanol özütü, M: Metanol özütü, DS: Distile su özütü, G: Geleneksel özüt




Şekil 3.23. Farklı boyacı sumağı özütlerinin normoglisemik insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. H: Hekzan özütü, D: Diklorometan özütü, D:M: Diklorometan:Metanol özütü, M: Metanol özütü, DS: Distile su özütü, G: Geleneksel özüt

### 3.3.2. *C. coggygria* özütlerinin antibakteriyel ve antifungal etkileri

Hücre kültüründe kullanılan *C. coggygria* (Boyacı sumağı) özütlerinin (hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol, metanol, distile su ve geleneksel) farklı konsantrasyonlarının (2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15,625 µg/mL ve 7,81 µg/mL) *Staphylococcus aureus ATCC 29213, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Candida albicans ATCC 90028* üzerindeki antimikrobiyal etkilerine bakıldı. Belirtilen konsantrasyonlarda boyacı sumağı özütlerine maruz bırakılan mikroorganizmalarda üreme inhibisyonuna sebep olan konsantrasyonlar belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Farklı boyacı sumağı özütlerinin mikroorganizmalar üzerindeki inhibe edici konsantrasyonları (+: İnhibisyon var; -: İnhibisyon yok)

| Örnek Adı | | Mikroorganizmalar | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Konsantrasyon | Boyacı sumağı özütü | *S.aureus* | *E.coli* | *P.aeruginosa* | *E.faecalis* | *C.albicans* |
| 2000 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | + |
| | Diklorometan | - | - | - | - | + |
| | Diklorometan:Metanol | + | - | - | - | + |
| | Metanol | + | - | - | + | + |
| | Distile su | + | - | - | - | + |
| | Geleneksel | + | - | - | + | + |
| 1500 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | + | - | - | - | + |
| | Metanol | + | - | - | + | + |
| | Distile su | - | - | - | - | + |
| | Geleneksel | + | - | - | + | + |
| 1000 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | + | - | - | - | - |
| | Metanol | + | - | - | + | - |
| | Distile su | - | - | - | - | + |
| | Geleneksel | + | - | - | + | + |
| 500 µg/ml | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | + | - | - | - | - |
| | Metanol | + | - | - | + | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | + | - | - | - | + |
| 250 µg/ml | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | + | - | - | - | + |

Tablo 3.2. (Devam) Farklı boyacı sumağı özütlerinin mikroorganizmalar üzerindeki inhibe edici konsantrasyonları (+: İnhibisyon var; -: İnhibisyon yok)

| Örnek Adı | | Mikroorganizmalar | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Konsantrasyon | Boyacı sumağı özütü | *S.aureus* | *E.coli* | *P.aeruginosa* | *E.faecalis* | *C.albicans* |
| 125 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | - | - | - | - | + |
| 62,5 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | - | - | - | - | + |
| 31,25 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | - | - | - | - | + |
| 15,625 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | - | - | - | - | + |
| 7,81 µg/mL | Hekzan | - | - | - | - | - |
| | Diklorometan | - | - | - | | - |
| | Diklorometan:Metanol | - | - | - | - | - |
| | Metanol | - | - | - | - | - |
| | Distile su | - | - | - | - | - |
| | Geleneksel | - | - | - | - | + |

*S.aureus* için minimum inhibisyon konsantrasyonları boyacı sumağının diklorometan:metanol ve metanol özütlerinin 500 µg/mL, distile su özütünün 2000 µg/mL ve geleneksel özütün 250 µg/mL konsantrasyonudur. *E. faecalis*'in üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyonlar ise boyacı sumağının metanol özütünün 500 µg/mL ve geleneksel özütün 1000 µg/mL konsantrasyonu olarak bulunmuştur. *C.albicans* için MIC değerleri ise boyacı sumağının hekzan ve diklorometan özütlerinin 2000 µg/mL, diklorometan:metanol ve metanol özütlerinin 1500 µg/mL, distile su özütünün 1000 µg/mL ve geleneksel özütün 7,81 µg/mL konsantrasyonları olarak tespit edilmiştir. Hiçbir boyacı sumağı özütünün *E. coli* ve *P. aeruginosa* üremesi üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Sonuçlar boyacı sumağı özütlerinin özellikle maya ve gram pozitif bakterilerin üremesi üzerine etkisinin olduğunu ancak gram negatif bakterilere herhangi bir etkisinin olmadığını kanıtlamıştır.

Boyacı sumağının farklı özütleriyle yapılan sitotoksisite ve mikrobiyal testlerin sonucunda normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmaması ve *C. albicans* üremesini inhibe etmesinden dolayı 7,81 µg/mL konsantrasyonundaki boyacı sumağı geleneksel özütünün *in vitro* 3-boyutlu insan deri modelinde oluşturulacak yarayı tedavi etmek amacıyla kullanılmasına karar verildi. Bunun yanı sıra 7,81 µg/mL konsantrasyonundaki distile su özütünden de normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücre çoğalmasına pozitif etkisinden dolayı yara tedavisinde denenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

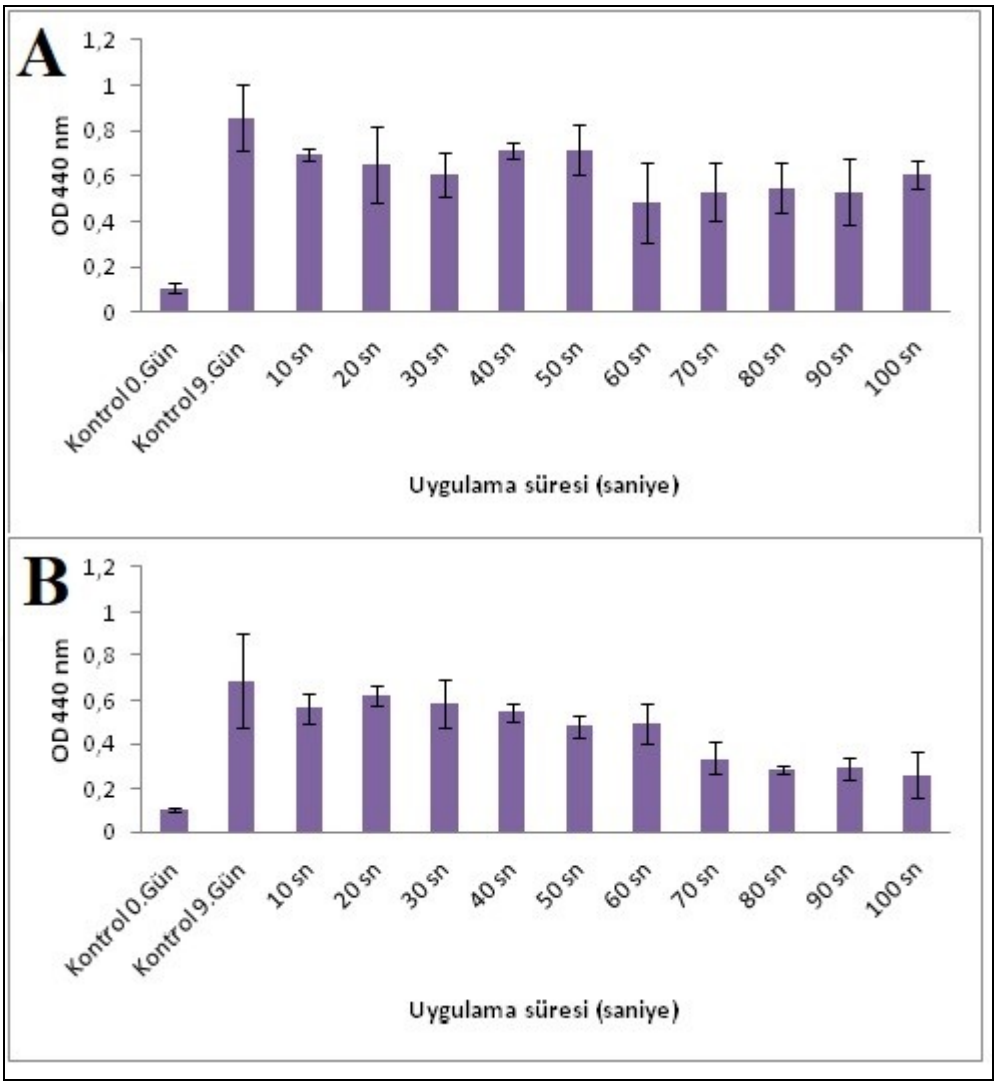
## 3.4. Fototerapi

### 3.4.1. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücre canlılığına etkisi

5 W gücünde ve 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla hücrelere 9 gün boyunca iki günde bir belirli sürelerde diyot lazer uygulandı, 10. günde yapılan WST-1 analiziyle bu uygulamanın hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerine bakıldı.

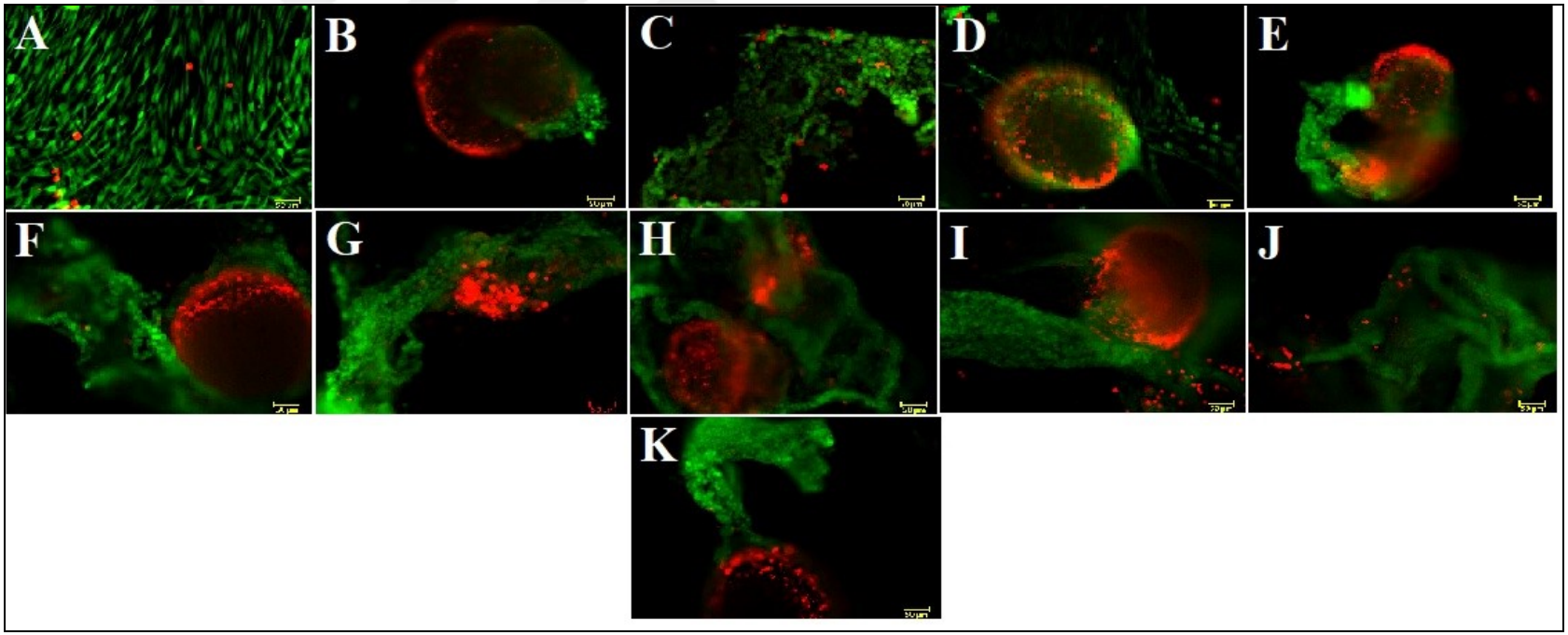
Farklı sürelerde normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine uygulanan diyot lazer gruplarındaki hücre sayısının 0. gün kontrol gruplarından yüksek olması 10-100 saniye arasında uygulanan 980 nm dalga boyundaki lazerin bu hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmadığını kanıtlamıştır. Ancak hiçbir grupta 9. gün kontrol gruplarındakinden fazla hücre sayısına rastlanmaması bu lazerin hücre çoğalmasını hızlandırıcı etkisinin olmadığını göstermiştir. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine uygulanan lazerin özellikle 50 saniyeden, normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerine ise 60 saniyeden fazla uygulanmasının hücre çoğalmasında ciddi bir yavaşlamaya yol açtığı görülmüştür (Şekil 3.24). Çalışmamızın aksine Kawalec ve arkadaşları diyabetik farelerle yaptıkları araştırmada 5 W gücündeki 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin yara iyileşmesinde yararlı etkiler gösterdiğini tespit etmişlerdir (Kawalec ve diğ., 2004). Bu farkın sebebi araştırmacıların *in vivo* bizim ise *in vitro* koşullarda çalışıyor olmamız olabilir, dolayısıyla bu dalga boyundaki lazerin hücrelere uygulanması

doğrudan hücre proliferasyonuna yol açmamış olabilir. Ayrıca literatürdeki düşük seviyeli lazerlerin insan deri fibroblast kültürlerinde proliferasyonda etkisi yokken prokollajen üretimini uyardığı (Abergel ve diğ., 1984) bilgisine dayanarak 980 nm dalga boyundaki lazerin yara iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için aynı uygulamada hücrelerdeki kollajen içeriklerinin de belirlenmesine karar verildi.

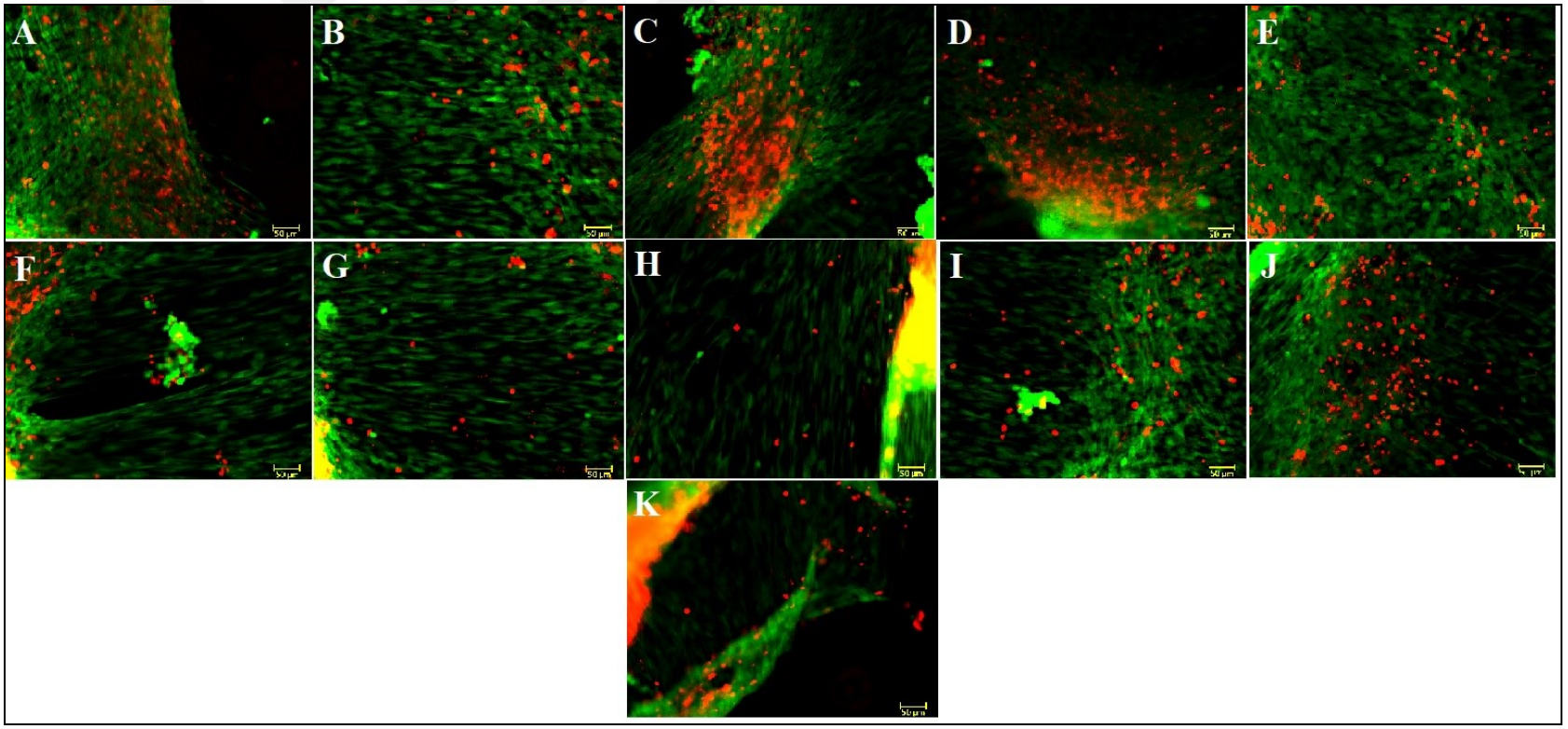



Şekil 3.24. 9 gün süresince farklı sürelerde uygulanmış olan 980 nm dalga boyundaki lazerin dermal fibroblast hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi, A) Tip 2 diyabetik, B) Normoglisemik

980 nm dalga boyunda diyot lazerin normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılığına etkisini inceleyebilmek için 9 gün boyunca iki günde bir lazer uygulamasından sonra hücrelere canlı/ölü hücre boyaması da yapıldı (Şekil 3.25 ve Şekil 3.26).




Şekil 3.25. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücre canlılığına etkisi: canlı/ölü hücre boyaması, A) Kontrol, B) 10 sn, C) 20 sn, D) 30 sn, E) 40 sn, F) 50 sn, G) 60 sn, H) 70 sn, I) 80 sn, J) 90 sn, K) 100 sn, Yeşil: Canlı hücre, Kırmızı: Ölü hücre (Orijinal Büyütme: 10X)




Şekil 3.26. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda normoglisemik insan dermal fibroblast hücre canlılığına etkisi: canlı/ölü hücre boyaması, A) Kontrol, B) 10 sn, C) 20 sn, D) 30 sn, E) 40 sn, F) 50 sn, G) 60 sn, H) 70 sn, I) 80 sn, J) 90 sn, K) 100 sn, Yeşil: Canlı hücre, Kırmızı: Ölü hücre (Orijinal Büyütme: 10X)

Yapılan canlı/ölü hücre boyaması tip 2 diyabetik bireylerin derilerinden izole edilen fibroblast hücrelerine 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulanmasının normoglisemik bireylerden izole edilenlere kıyasla daha fazla hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Özellikle tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin lazer uygulamasıyla hücrelerin bir araya gelerek sferoid bir yapı oluşturduğu görülmüştür.

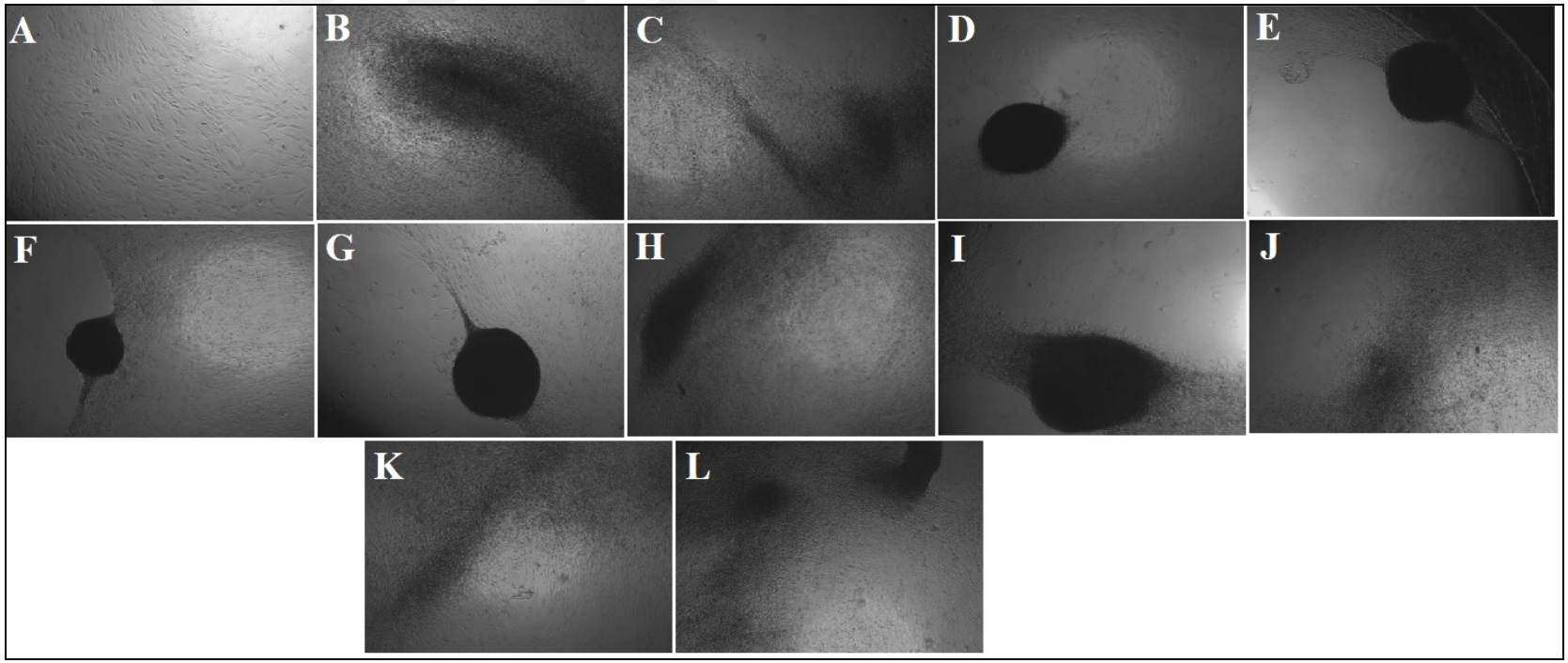
### 3.4.2. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisi

980 nm dalga boyunda diyot lazerin normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerindeki kollajen sentezine etkisini tespit etmek için 9 gün süresince iki günde bir lazer uygulamasına maruz bırakılmış hücrelerin süre sonunda ışık mikroskobunda görüntüleri çekildi.

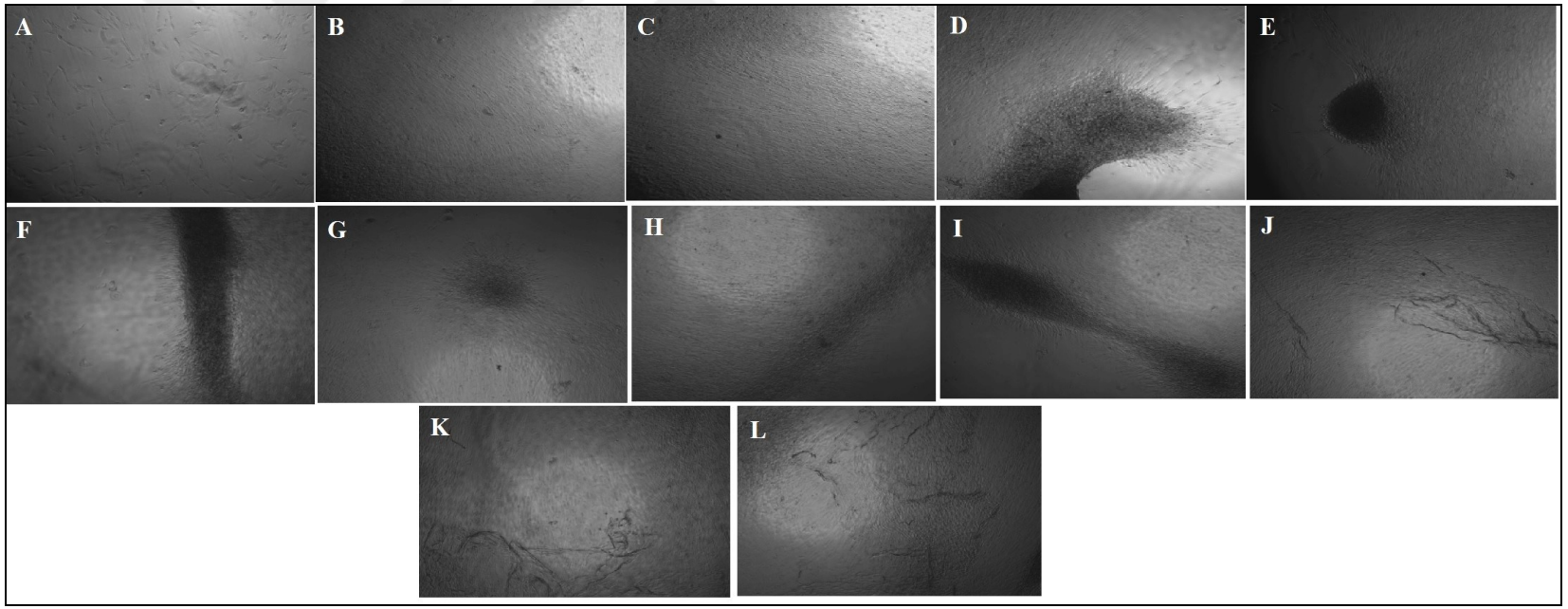
Işık mikroskobu görüntüleri hem normoglisemik hem de tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine uygulanan diyot lazerin *in vitro*'da hücrelerin bir araya gelerek toplanmasına sebep olduğunu, bunun yüksek dozda daha fazla olduğunu gösterdi. Bu durum özellikle tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde daha belirgin olarak izlendi (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28).

Işık mikroskobunda görüntülenen hücreler fikse edilerek hücrelerin salgılamış oldukları tip I kollajen varlığını belirlemek amacıyla immünfloresan ve Masson trikrom boyamaları yapılıp görüntüleri alındı.

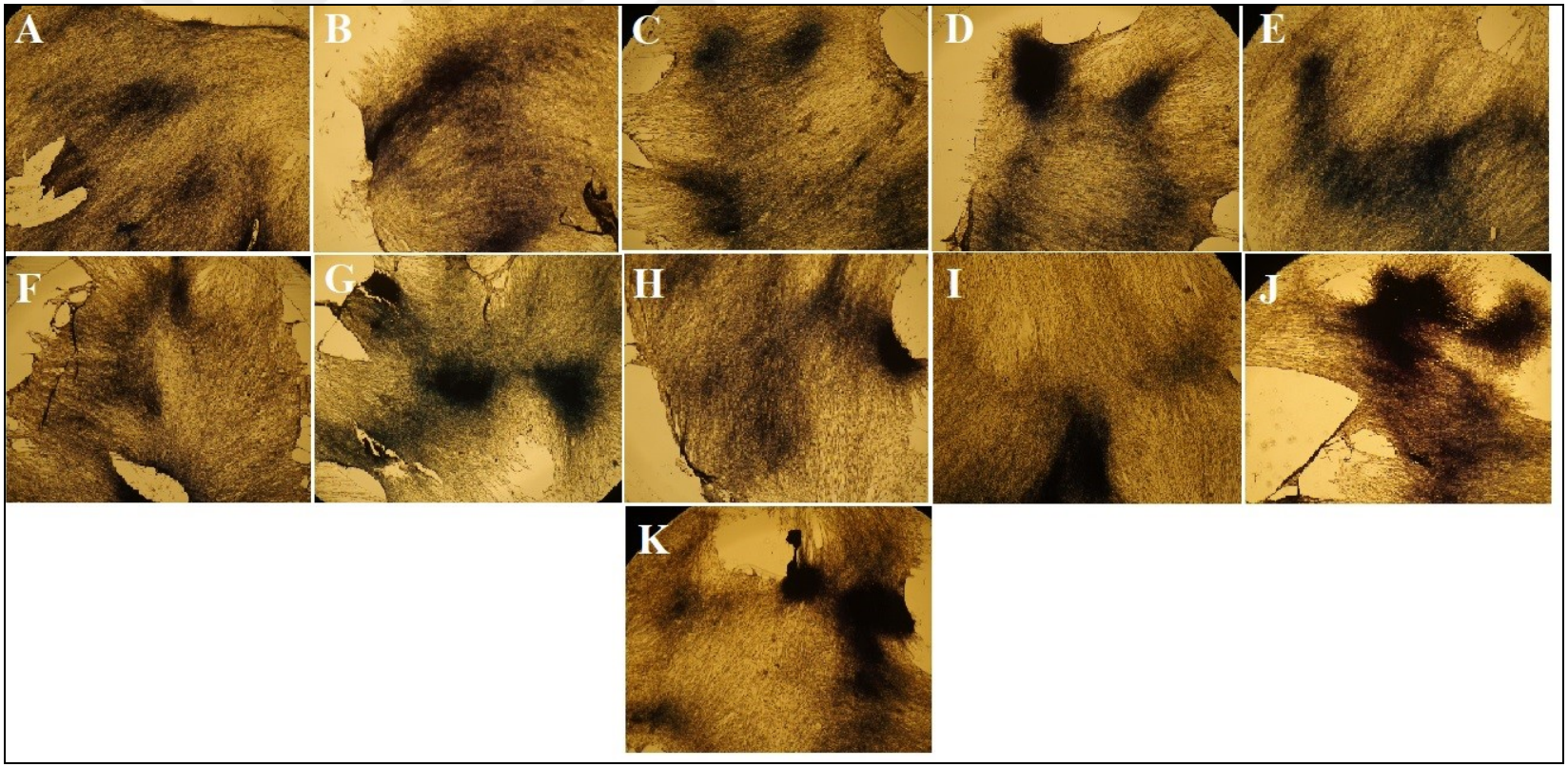
980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücrelerdeki kollajen sentezine olan etkisi Masson trikrom boyaması ile değerlendirildiğinde boyama sonucunda belirgin ayırt edici bir farkın olmadığı görülmüştür (Şekil 3.29 ve 3.30). Bu yüzden de diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisine immunfloresan boyama ile bakılmasının doğru olduğuna karar verildi.



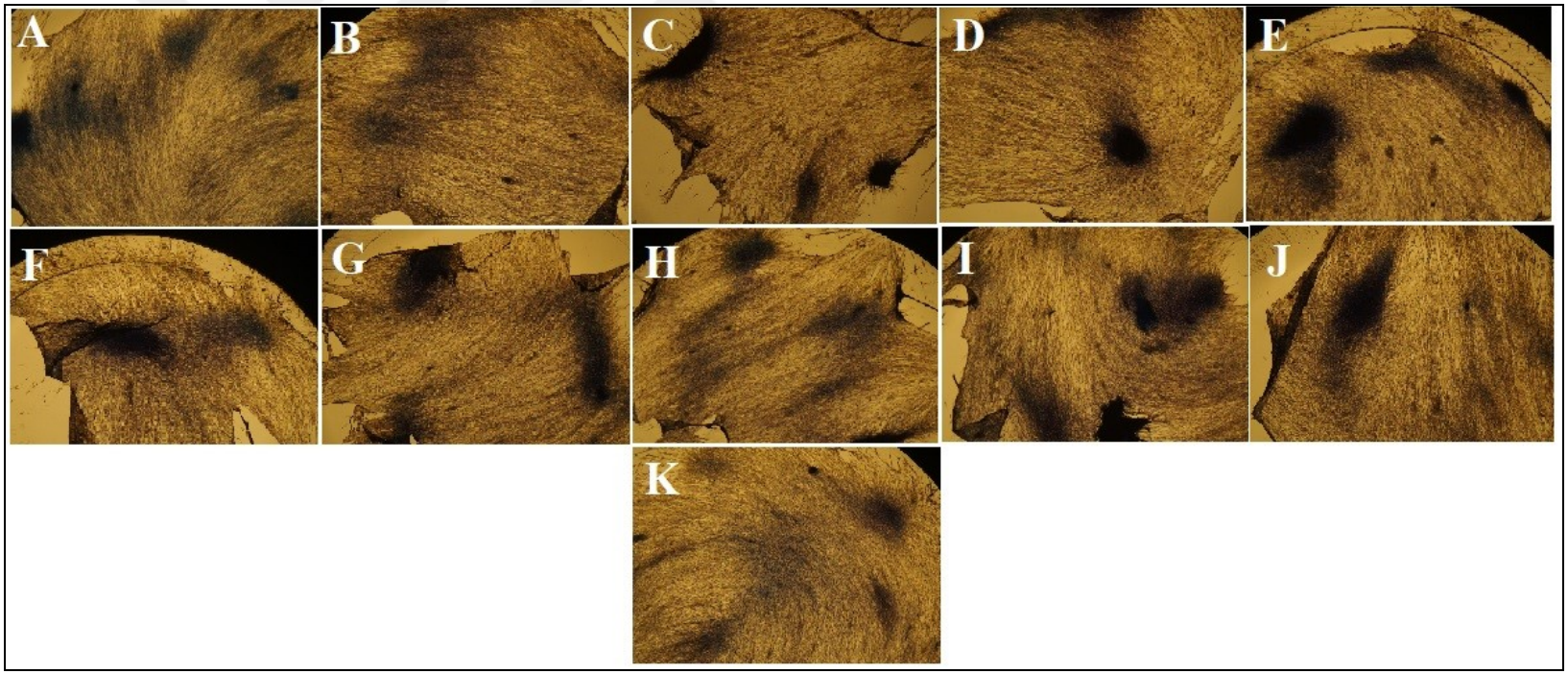

Şekil 3.27. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün diyot lazer uygulamasından sonraki ışık mikroskobu görüntüleri. A) 24. saat kontrol, B) 9. gün kontrol, C) 10 sn lazer uygulaması, D) 20 sn lazer uygulaması, E) 30 sn lazer uygulaması, F) 40 sn lazer uygulaması, G) 50 sn lazer uygulaması, H) 60 sn lazer uygulaması, I) 70 sn lazer uygulaması, J) 80 sn lazer uygulaması, K) 90 sn lazer uygulaması, L) 100 sn lazer uygulaması (Orijinal büyütme: 4X)




Şekil 3.28. Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin 9 gün diyot lazer uygulamasından sonraki ışık mikroskobu görüntüleri. A) 24. saat kontrol, B) 9. gün kontrol, C) 10 sn lazer uygulaması, D) 20 sn lazer uygulaması, E) 30 sn lazer uygulaması, F) 40 sn lazer uygulaması, G) 50 sn lazer uygulaması, H) 60 sn lazer uygulaması, I) 70 sn lazer uygulaması, J) 80 sn lazer uygulaması, K) 90 sn lazer uygulaması, L) 100 sn lazer uygulaması (Orijinal büyütme: 4X)

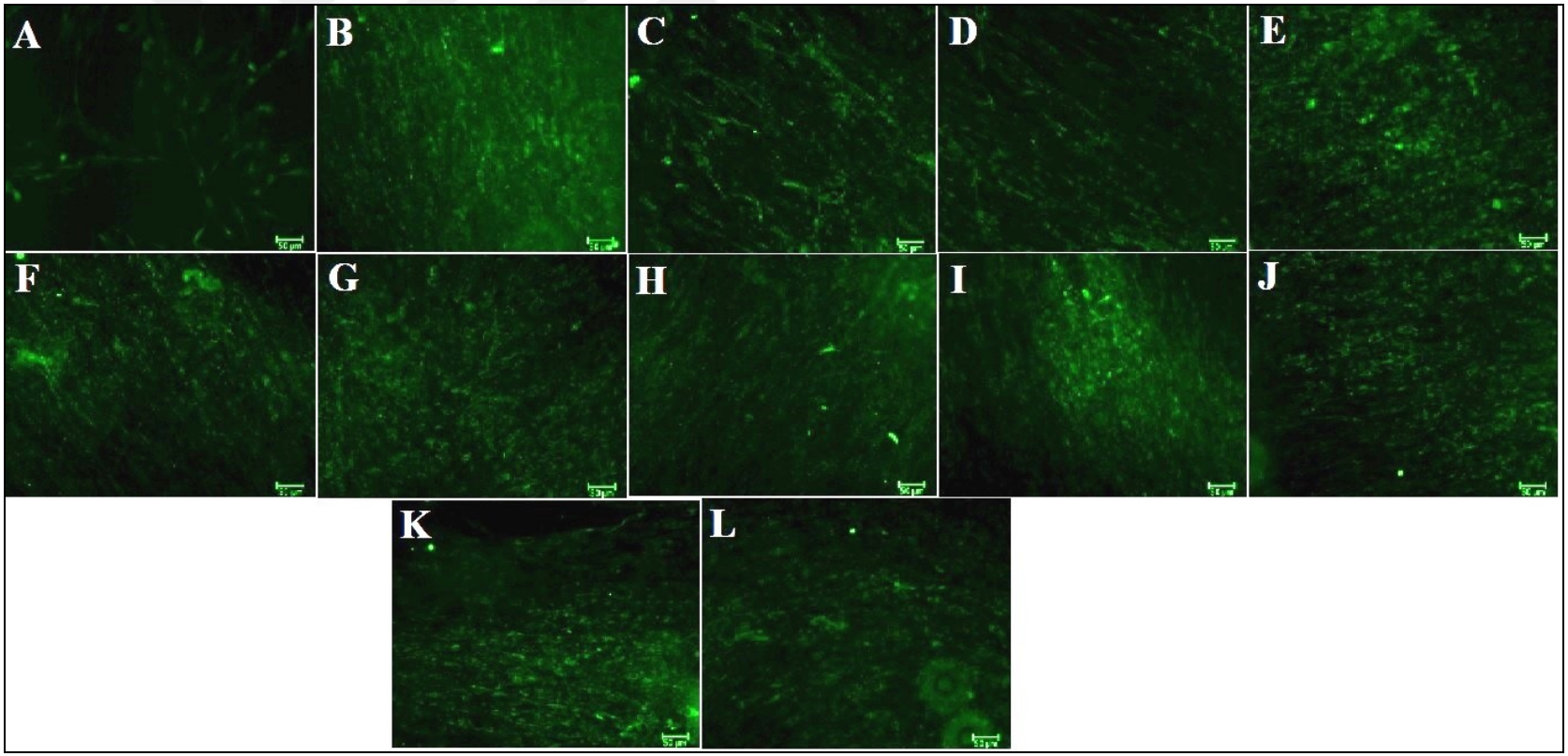



Şekil 3.29. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde kollajen sentezine olan etkisi: Masson trikrom boyaması, A) Kontrol, B) 10 sn, C) 20 sn, D) 30 sn, E) 40 sn, F) 50 sn, G) 60 sn, H) 70 sn, I) 80 sn, J) 90 sn, K) 100 sn, Siyah: Nukleus, Kırmızı: Sitoplazma, Mavi: Kollajen (Orijinal Büyütme: 4X)

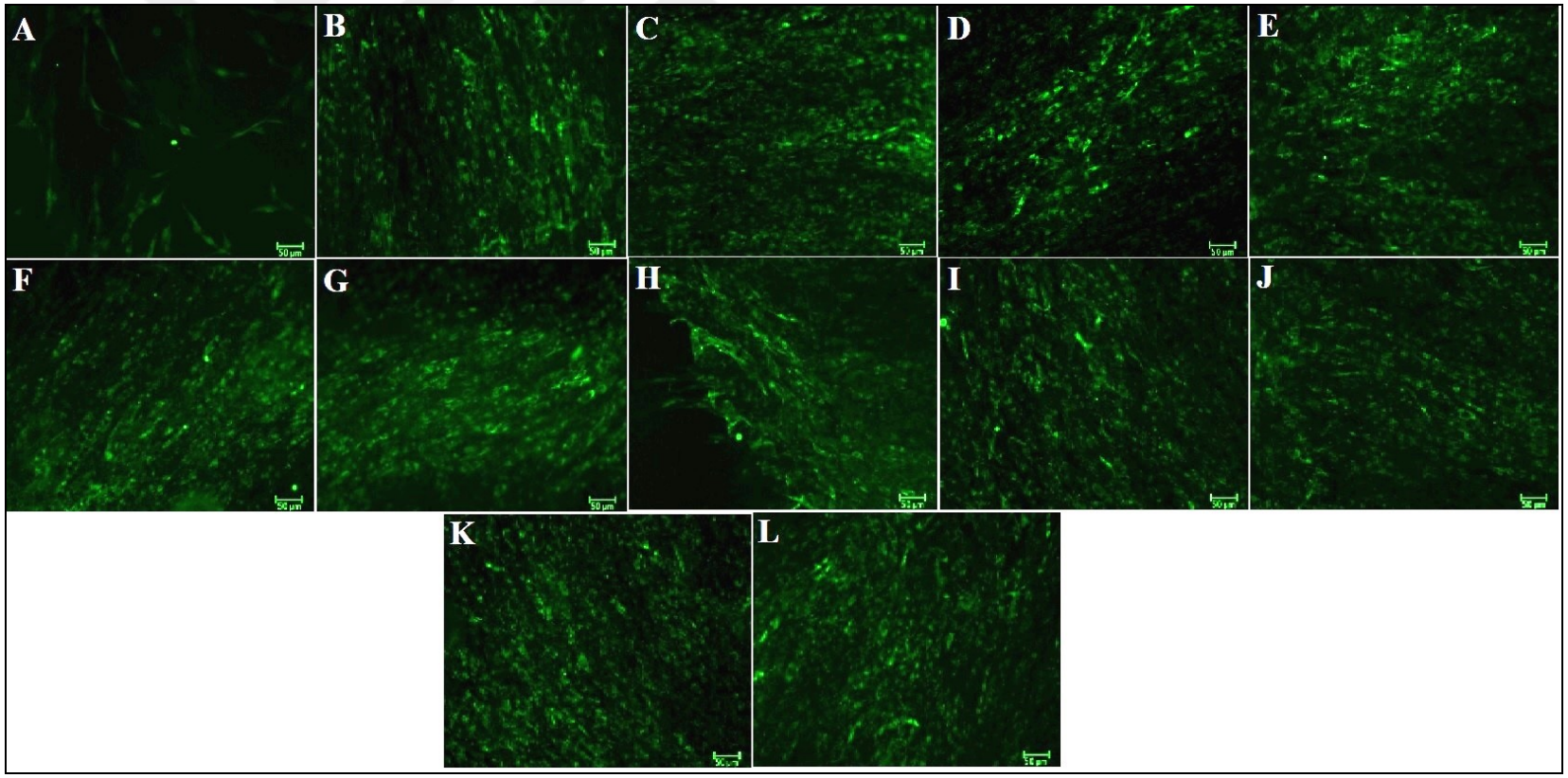



Şekil 3.30. 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 9 gün sonunda normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde kollajen sentezine etkisi: Masson trikrom boyaması, A) Kontrol, B) 10 sn, C) 20 sn, D) 30 sn, E) 40 sn, F) 50 sn, G) 60 sn, H) 70 sn, I) 80 sn, J) 90 sn, K) 100 sn, Siyah: Nukleus, Kırmızı: Sitoplazma, Mavi: Kollajen (Orijinal Büyütme: 4X)

Hücreler tarafından salgılanan kollajen miktarını belirlemek amacıyla yapılan immünfloresan boyamayla normoglisemik ve tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerindeki tip I kollajen varlıkları kıyaslandığında normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde daha fazla ışıma olduğu, dolayısıyla da daha fazla miktarda kollajen varlığının olduğu tespit edildi (Şekil 3.31 ve Şekil 3.32). Bu farkın sebebi diyabetik hücrelerdeki aşırı metalloproteinaz aktivitesi ya da MMP inhibitör seviyesinin azlığı nedeniyle sentezlenen tip I kollajenin bir kısmının parçalanıyor olması olabilir (Moura ve diğ., 2013). Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında normoglisemik grubun hücrelerinde 9 gün sonundaki kontrol grubu ve 980 nm dalga boyundaki lazer uygulanmış tüm gruplardaki tip I kollajen varlığı lazer uygulanmamış ilk 24 saat sonunda fikse edilmiş hücrelerden daha fazlaydı. 9 günlük inkübasyon sonunda ise kontrol grubu ve lazer uygulanmış gruplardaki tip I kollajen miktarları arasında belirgin bir farka rastlanmadı. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde de 9 gün inkübasyon sonucundaki kontrol grubu ve 980 nm dalga boyundaki lazer uygulanmış tüm gruplardaki tip I kollajen varlığı lazer uygulanmamış ilk 24 saat sonunda fikse edilmiş hücrelerden daha fazlaydı. 9 günlük inkübasyon sonucundaki gruplar kıyaslandığında ise 100 saniye 980 nm diyot lazer uygulanmış grup hariç diğer gruplarla kontrol grubu arasında belirgin bir fark görülmedi.




Şekil 3.31. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde 9 gün diyot lazer uygulamasından sonra sentezlenen tip I kollajenin immünfloresan görüntüleri. Lazer uygulamaları: A) 24. saat kontrol, B) 9. gün kontrol, C) 10 sn, D) 20 sn, E) 30 sn, F) 40 sn, G) 50 sn, H) 60 sn, I) 70 sn, J) 80 sn, K) 90 sn, L) 100 sn, Yeşil: Tip I kollajen (Orijinal büyütme: 10X, Skala: 50 μm)




Şekil 3.32. Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde 9 gün diyot lazer uygulamasından sonra sentezlenen tip I kollajenin immünfloresan görüntüleri. Lazer uygulamaları: A) 24. saat kontrol, B) 9. gün kontrol, C) 10 sn, D) 20 sn, E) 30 sn, F) 40 sn, G) 50 sn, H) 60 sn, I) 70 sn, J) 80 sn, K) 90 sn, L) 100 sn, Yeşil: Tip I kollajen (Orijinal büyütme: 10X, Skala: 50 µm

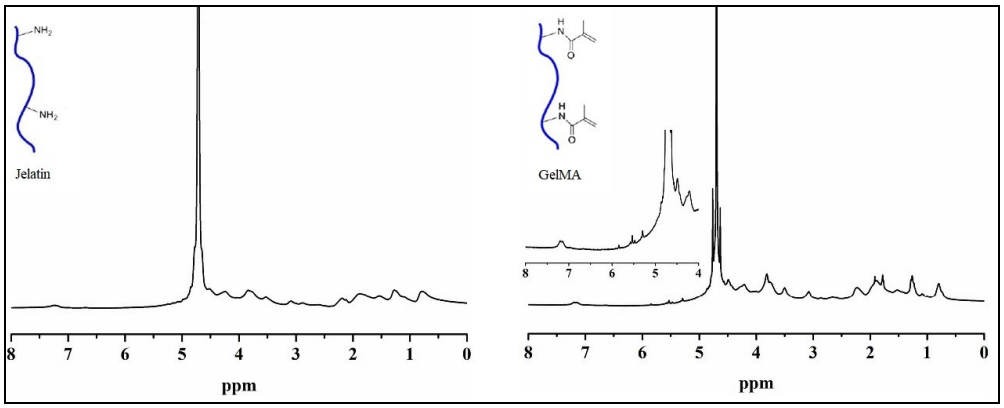
### 3.5. *İn vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modeli

#### 3.5.1. Metakrilatlanmış jelatin (GelMA) karakterizasyonu

Vücuttaki dokular, hücreler ve hücre dışı matriksten (ECM) oluşan uzaysal olarak organize olmuş mikroyapıyla karakterize edilen fonksiyonel 3-boyutlu birimlerden meydana gelir. Her bir hücre biyokimyasal, biyomekanik ve biyoelektrik sinyallerle etrafındaki 3-boyutlu mikroçevreyle sürekli iletişim içerisindedir. Yeni *in vitro* modeller ya da fonksiyonel biyoyapılar geliştirilirken doğal doku mikroyapısını uzaysal ve fonksiyonel olarak taklit edilmesi sağlıklı ve fizyolojik olarak uygun hücre tepkisini elde etmek için önemli bir basamaktır. Geleneksel 2-boyutlu *in vitro* kültür teknikleri *in vivo* ortamdaki karmaşıklığı taklit etmekten yoksun olduğundan 3-boyutlu modeller geliştirilmeye karar verilmiştir (Occhetta ve diğ., 2013). Doku mühendisliği alanında pek çok araştırmacı son yıllarda doğal mikroçevreyi taklit edebilecek nitelikte 3-boyutlu kültür modeli geliştirmek için birçok malzemeyle çalışmışlardır. Bu malzemelerden özellikle hidrojeller karmaşık protein ve polisakkarit ağlarıyla karakterize edilen doğal ECM'e büyük benzerlik göstermesiyle dikkat çekmektedir. Hidrojeller yüksek su içerikli, besin ve gaz transferini üst düzeye çıkaran yüksek oranda şişmiş ve birbirleriyle bağlantılı ağ yapısının yaratılmasına katkıda bulunurlar. Dahası, çapraz-bağlama derecesi ve yöntemi kadar büyük oranda makromoleküler yapısına da bağlı mekanik özellikleri özel uygulamalarla farklı yumuşak dokuların biyomekanik karakterlerine kolayca dönüştürülebilir. Bunun yanı sıra fonksiyonel grupların varlığı hidrojel yapıların kimyasal olarak değiştirilmesine ve doğal ECM'de bulunan karmaşıklığı taklit eden özel biyofonksiyonların eklenmesine izin verir. Doku mühendisliğinde *in vitro* 3-boyutlu hücre kültürü modelini oluşturacak biyomimetik malzemeler olarak birçok hidrojel formülasyonu ve polimerizasyon tekniği denenmiştir. Bu amaçla hücre ekimi için doku iskeleleri yapılmış ya da hücreler doğrudan bir matrikse gömülmüştür. Bu stratejiler içerisinde fotopolimerizasyon üzerinde çok durulmuş ve bu yöntemle canlılık oranı yüksek, 3-boyutlu hücreli matriksler oluşturulabildiği tespit edilmiştir. Buna rağmen, polimerik öncüller, ışık kaynağı ve foto-başlatıcı kombinasyonlarının optimizasyon çalışmaları hala devam etmektedir (Occhetta ve diğ., 2015). Hidrojel yapımında en çok kullanılan polimerik malzemelerden birisi de GelMA'dır. GelMA jelatinin amin içeren yan gruplarına metakrilit grupların eklenmesiyle sentezlenir ve foto-çapraz

bağlanarak hidrojel yapısı oluşturulur. GelMA hidrojeller doğal ve sentetik biyomalzemelerden her ikisinin de avantajlarını taşır. Özellikle GelMA hücre iskelesi olarak uygun hücre tutunma kısmı ve proteolitik bozunabilirlik gibi karakterleri sağlayan jelatini içerir. Jelatin çeşitli kaynaklardan uygun maliyetle elde edilebilir. Metakrilasyon derecesi basit yollarla modifiye edilerek gözeneklilik ve bozunurluk oranı değiştirilebilir. Metakrilasyon seviyesi arttıkça sertlik artarken gözenek çapı küçülür. Aynı zamanda hücre yüklenmiş GelMA'da üretilen mikrokanalların kütle taşınmasına izin verdiği, zamanla hücre canlılığı ve farklılaşmasını arttırdığı ve endotel monotabakaların hızlı oluşumunu da desteklediği bilinmektedir (Chen ve diğ., 2012; Schuurman ve diğ., 2013; Bertassoni ve diğ., 2014). Tüm bu sebepler, 3-boyutlu insan deri modelimizde GelMA'yı fotopolimerizasyon tekniğiyle çapraz bağlayarak hidrojel elde etmeye karar verilmesinde etkili olmuştur.

Bu tezde jelatin metakrilik anhidrit ile reaksiyona sokulup GelMA sentezlendi. Jelatinin metakrilasyon derecesi jelatinin aromatik amino asit kısmından gelen 7,2 ppm'deki proton NMR'ından elde edilen spektrum pikinden ve metakrilit grupların çift bağını gösteren 5,3 ppm ve 5,5 ppm piklerinden hesaplandı (Şekil 3.33).

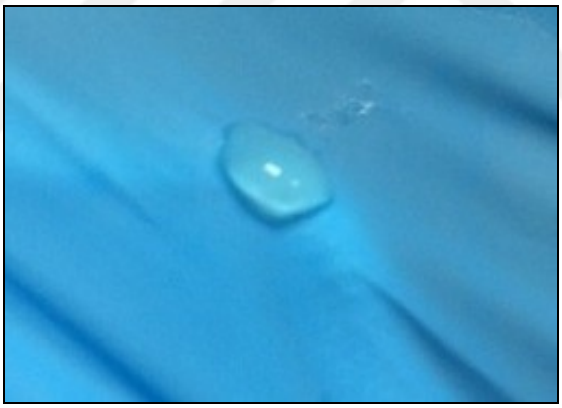



Şekil 3.33. Jelatin ve GelMA'nın NMR görüntüleri

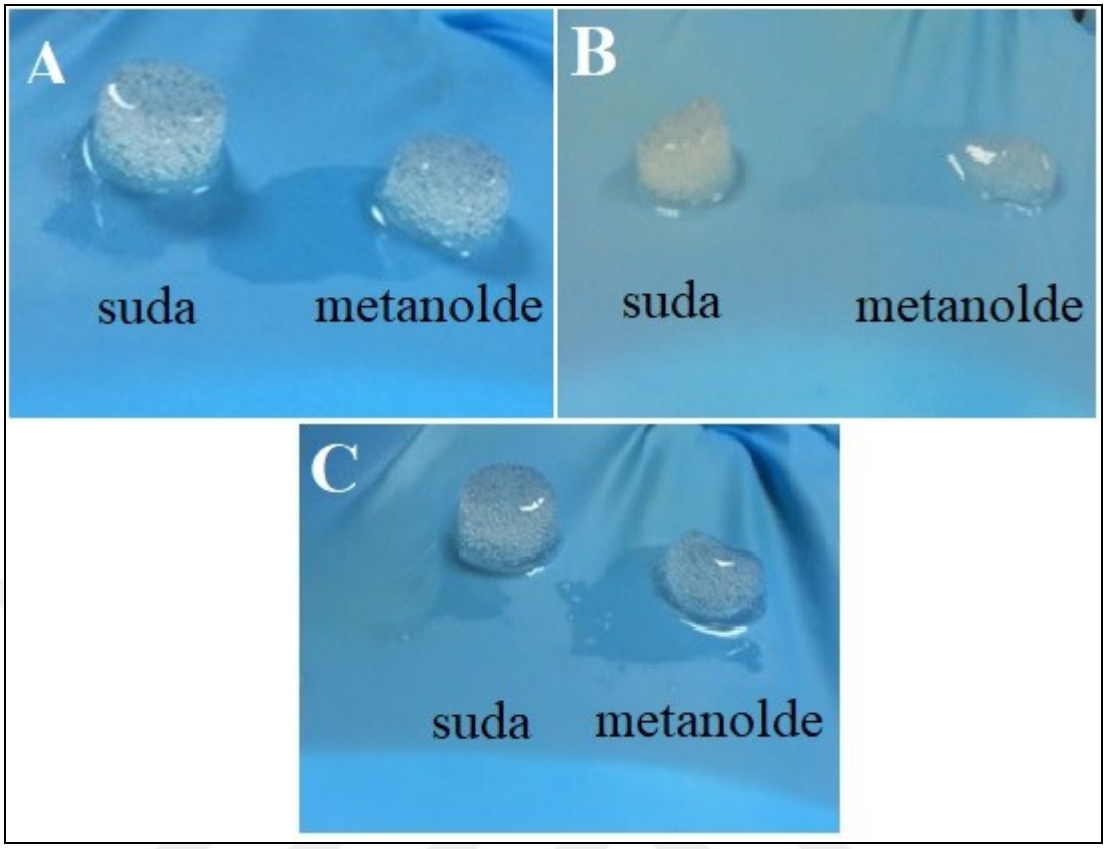
NMR sonuçları jelatinin % 80 oranında metakrilatlandığını gösterdi (Şekil 3.33).

### 3.5.2. Hücresiz GelMA hidrojelin makroskopik özellikleri

3-boyutlu insan deri modelini oluşturmak için GelMA kullanılarak irgacure ve VA 086 olmak üzere iki farklı foto-başlatıcı ile hidrojel yapılmaya çalışıldı. % 5-15 konsantrasyonlarındaki GelMA hidrojellerin hücre yayılması, proliferasyonu ve metabolizmasını desteklediğini gösteren literatür (Bertassoni ve diğ., 2014) ışığında hidrojel yapımında kullanılmak üzere 44 mg/mL konsantrasyonunda GelMA tercih edildi. En iyi mekanik özelliklere sahip hidrojelin elde edilmesi için farklı ışıma süreleri denendi. Denemeler sonucunda irgacure foto-başlatıcı olarak kullanıldığında karışımın 6, 7 ve 8 dakika UV ışımasına maruz bırakılmasının aynı formda hidrojel oluşumuna sebep olurken 5 dakikalık UV uygulamasının bütünlük oluşturabilecek bir hidrojelin oluşmasına yeterli olmadığı gözlendi (Şekil 3.34). İrgacure kullanılarak GelMA hidrojelinin oluşması için optimum ışıma süresi 6 dakika olarak tespit edildi.



Şekil 3.34. İrgacure kullanılarak 6, 7 ve 8 dakika UV ışıması sonucunda elde edilmiş GelMA hidrojelinin makroskobik görüntüsü

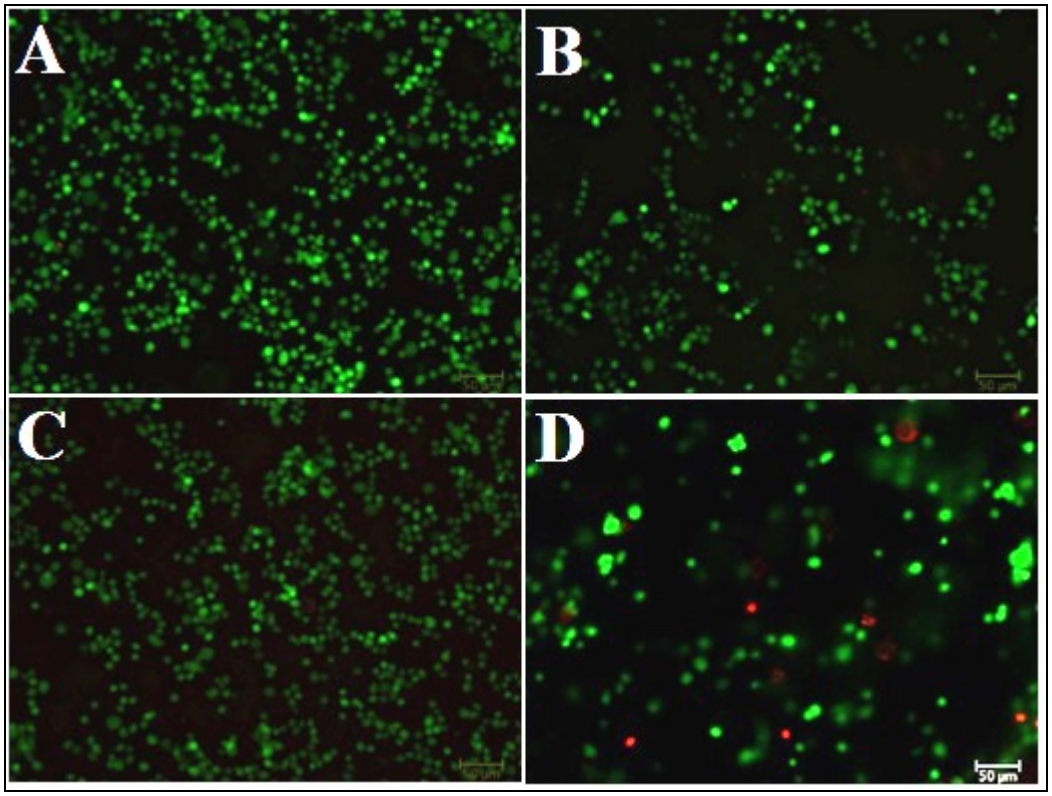



Şekil 3.35. Farklı UV ışıma sürelerinde, suda veya metanolde çözünmüş VA 086 foto-başlatıcısı ile elde edilmiş GelMA hidrojellerin makroskobik görüntüleri, A) 15 dakika, B) 12 dakika, C) 11 dakika

GelMA hidrojel yapımında 75 mg/mL konsantrasyonundaki GelMA, foto-başlatıcı olarak 3,65 mg/mL VA 086 ile karıştırılıp 5, 10, 11, 12 ve 15 dakika UV ışımasına maruz bırakıldı. 11, 12 ve 15 dakika UV ışıması uygulanan karışımda foto-çapraz bağlanma gerçekleşirken 5 ve 10 dakikalık UV ışımasında hidrojel elde edilemedi. Metanol ve distile su olarak iki farklı çözücüde hazırlanan VA 086 ile hazırlanmış GelMA hidrojelleri arasında ise en iyi jel bütünlüğüne distile suda çözünmüş VA 086 foto-başlatıcısı ile hazırlanmış GelMA hidrojelde rastlandı (Şekil 3.35). Distile suda hazırlanmış VA 086 kullanılarak GelMA hidrojelinin oluşması için optimum ışıma süresi 11 dakika olarak tespit edildi.

### 3.5.3. Hücreli GelMA hidrojelin biyouyumluluğu

#### 3.5.3.1. UV ışımanın hücre canlılığına etkisi




Şekil 3.36. Farklı UV ışıma sürelerine maruz kalan normoglisemik dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı, A) Kontrol, B) 6 dakika, irgacure, C) 11 dakika, VA 086, D) 22 dakika, VA 086. Yeşil: Canlı, Kırmızı: Ölü (Orijinal Büyütme A, B, C: 10X, Orijinal Büyütme D: 20X)

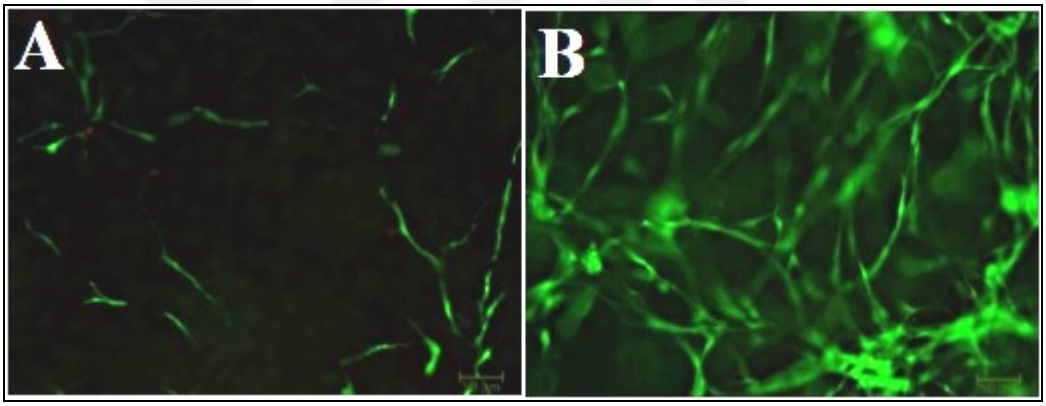
En iyi mukavemete sahip hidrojellerin (GelMA-irgacure için 6 dakika, GelMA-VA 086 için 11 dakika ve alternatif olarak da GelMA-VA 086 için 22 dakika UV ışımaya maruz bırakılmış) normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerine bakıldı. Foto-çapraz bağlanma sağlandıktan sonra hidrojellerdeki hücrelere canlı/ölü hücre boyaması yapıldı. GelMA hidrojel yapımı sırasında foto-başlatıcı olarak irgacure ve VA 086 kullanılan UV uygulanmış tüm hidrojellerdeki insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılık oranları UV ışıması görmemiş kontrol gruplarıyla benzer sonuçlar gösterdi. Hiçbir hidrojeldeki hücrelerde UV ışımadan kaynaklı herhangi bir zarara rastlanmadı (Şekil 3.36). Bunun en önemli sebeplerinden biri UV ışığına maruz kalmaktan kaynaklanan hücre zararının kaynak yoğunluğuna ve emisyon spektrumuna bağlı olmasıdır. Kısa UV dalga boyları (UV B aralığı) düşük enerji dozlarında bile olsa hücrelere zarar verirken daha yüksek dalga

boylarına hareketin çarpıcı bir biçimde hücre ölümünün görülme sıklığını azalttığı tespit edilmiştir (Occhetta ve diğ., 2013). Ayrıca foto-çapraz bağlama esnasında oluşan radikallerin çabucak tüketildiği ve böylece hücrelerin bu süreçte UV'den olumsuz yönde etkilenmediği bilinmektedir (Schuurman ve diğ., 2013).

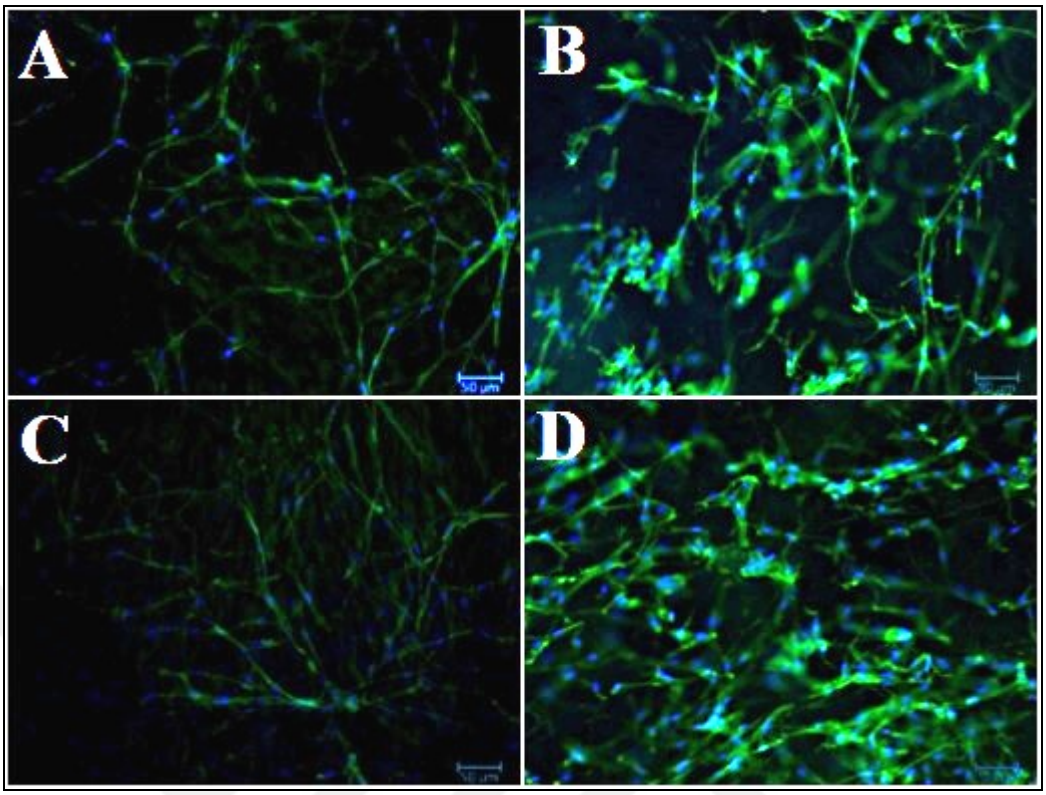
### 3.5.3.2. GelMA hidrojel içerisinde hücre uzanması

Hücresiz hidrojel fotopolimerizasyon çalışması sonucunda en iyi sonuçları veren irgacure ve VA 086 foto-başlatıcı konsantrasyonlu ve süreli hidrojeller içerisine insan dermal fibroblast hücreleri ekilerek 10 gün sonunda bu hücrelerin canlı/ölü hücre boyaması ve falloidin boyama ile durumları değerlendirildi.

Foto-başlatıcı olarak irgacure ve VA 086'nın kullanıldığı her iki GelMA hidrojeldeki insan dermal fibroblast hücrelerinin 10 günlük inkübasyon sonucunda bile hala canlılıklarını korudukları yapılan canlı/ölü hücre boyamasıyla kanıtlandı (Şekil 3.37).




Şekil 3.37. Farklı foto-başlatıcılı GelMA hidrojelindeki insan dermal fibroblast hücrelerin 10 günlük inkübasyon sonucundaki canlı/ölü hücre boyaması, A) İrgacure, B) VA 086, Yeşil: Canlı, Kırmızı: Ölü (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)




Şekil 3.38. Farklı foto-başlatıcılı GelMA hidrojelindeki insan dermal fibroblast hücrelerin 10 günlük inkübasyonu sonunda falloidin boyama ile elde edilmiş floresan mikroskop görüntüleri, A, B) İrgacure, C, D) VA O86, Yeşil: Falloidin, Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 μm)

Aynı hidrojeller içerisindeki hücrelere yapılan falloidin boyaması sonucunda ise irgacure'ün foto-başlatıcı olarak kullanıldığı hidrojellerde ilk gün ekilen birçok dermal fibroblast hücresinin hidrojelde kalmayıp kuyucuk tabanına tutunduğu görüldü. Ancak hidrojeldeki hücreler jele tutunmuş ve uzanmış halde görüntülendi (Şekil 3.38A ve Şekil 3.38B). Hücrelerin çoğunun hidrojel içerisinde kalamamasının sebebi hidrojel konsantrasyonunun ya da uygulanan ışığın uygun olmaması olabilir. İrgacure'un 250 ve 300 nm dalga boyunda absorpsiyon gösterdiği bilindiğinden (Occhetta ve diğ., 2013) kullandığımız 368 nm dalga boyundaki UV lambası GelMA'nın uygun polimerizasyonu için yeterli olmamış gibi görünmektedir. VA 086'nın foto-başlatıcı olarak kullanıldığı GelMA hidrojellerde ise hidrojel içerisinde hücrelerin ağsı bir yapı oluşturdukları ve uygulanan hidrojel konsantrasyonunun hücre uzanması ve göçü için uygun olduğu gözlendi (Şekil 3.38C ve Şekil 3.38D). Elde edilen sonuçlar VA 086 foto-başlatıcısının sitotoksik etki göstermediği ve hücre canlılığı açısından daha güvenli bir aralık olan 365-385 nm dalga boylarında

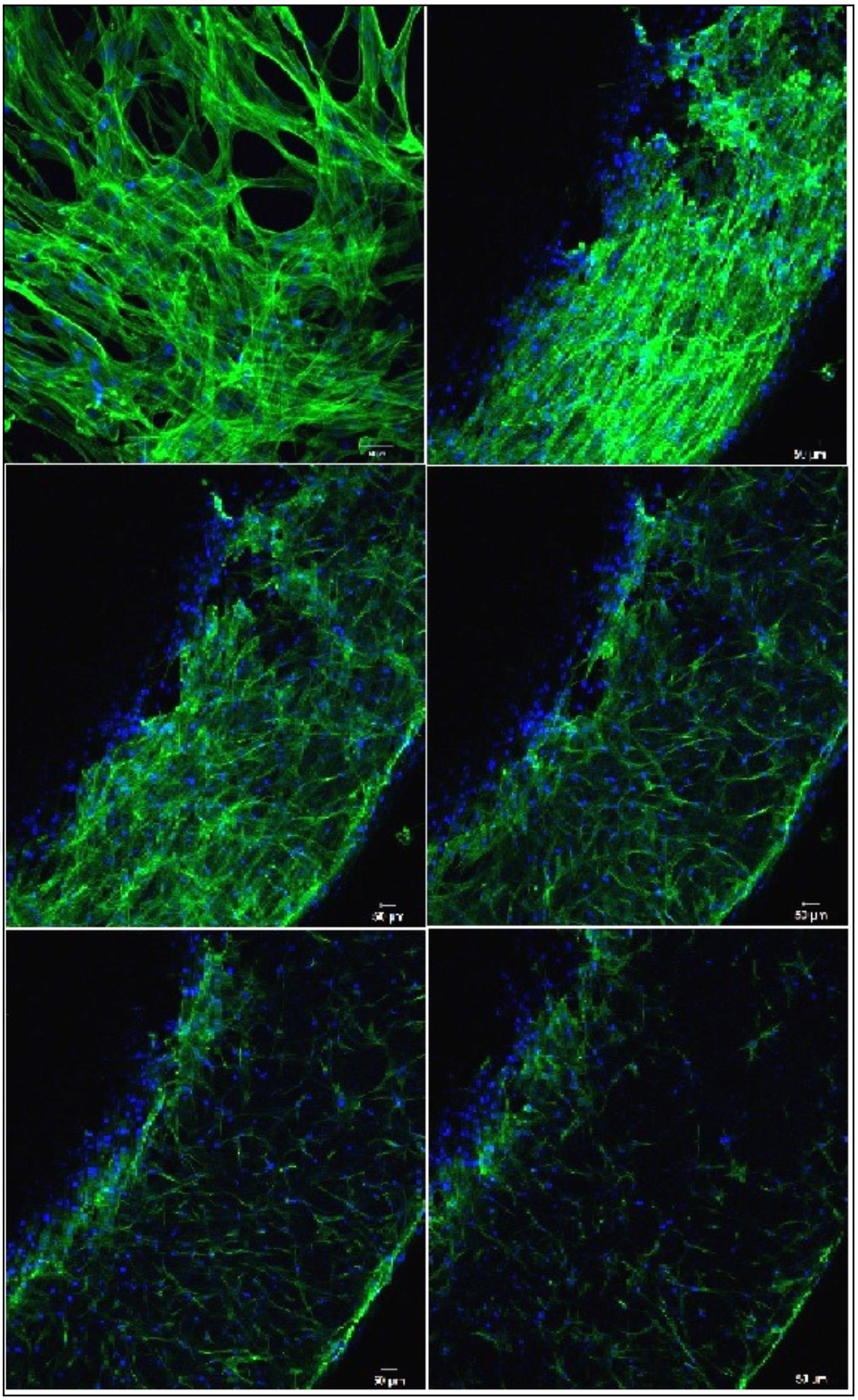
absorpsiyon piki gösteren bir molekül olduğunu (Occhetta ve diğ., 2013) bir kez daha ispatladı.

İki farklı foto-başlatıcıyla yapılmış GelMA hidrojel içerisinde hapsedilmiş insan dermal fibroblast hücrelerinin 10 gün inkübasyonu sonucunda uygulanan canlı/ölü hücre boyaması ve falloidin boyaması sonuçları çalışmamızda 3-boyutlu insan deri modelini üretmek için VA 086'nın foto-başlatıcı olarak kullanıldığı GelMA hidrojelin daha uygun olduğunu gösterdi.

### 3.5.4. Dermis tabakası

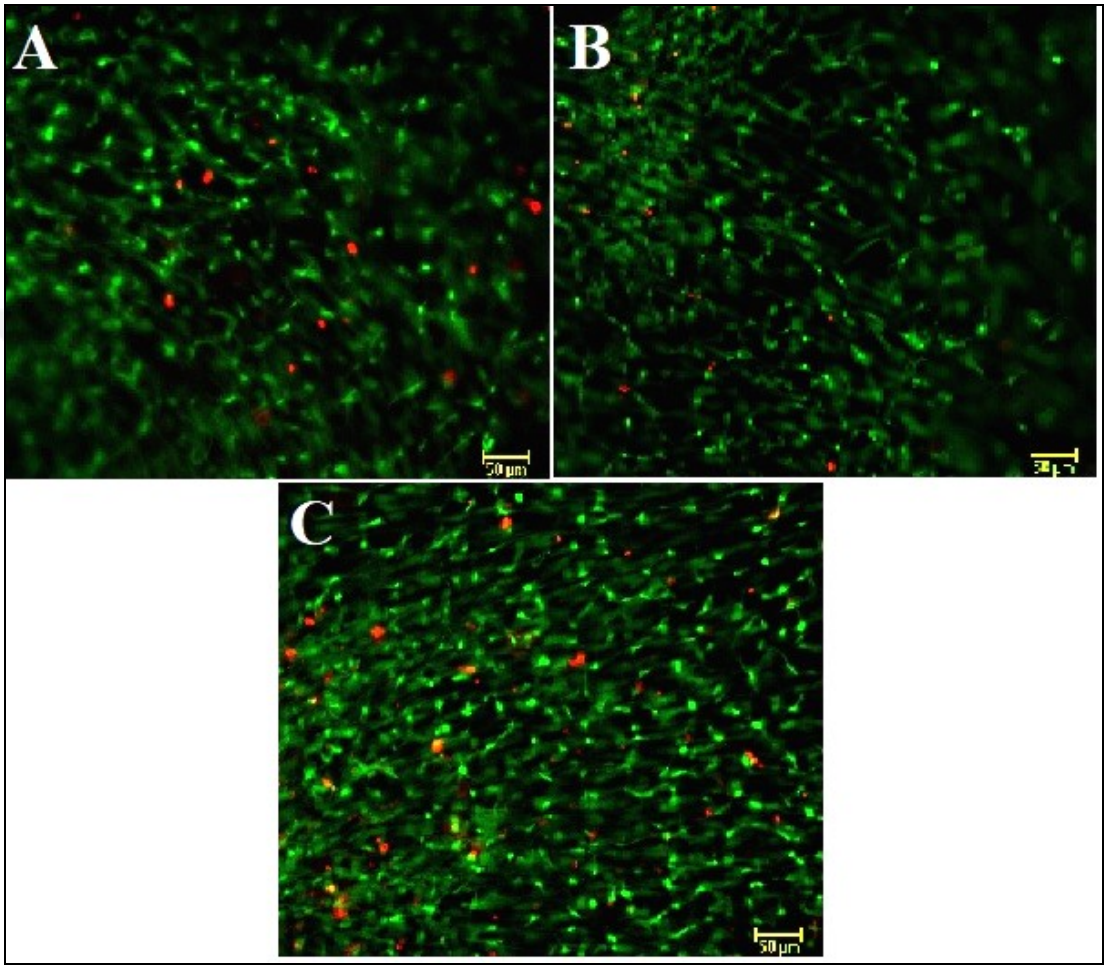
3-boyutlu insan deri modelinin dermis tabakasında insan dermal fibroblast hücrelerinin hücre konsantrasyonunun yeterli olup olmadığını gözlemleyebilmek için 100 µL'lik GelMA hidrojeller içerisine $5x10^4$ hücre ekilerek 14 günlük inkübasyon sonucunda konfokal mikroskopta görüntüleri alındı (Şekil 3.39).

İnsan dermal fibroblast hücrelerinin hücre dışı matriks olarak GelMA'ya uyum sağladığı gözlendi. Literatürde de GelMA hidrojeller hücre yayılmasını, proliferasyonunu ve metabolizmasını destekleme özellikleriyle dikkat çekmektedir (Bertassoni ve diğ., 2014). Ancak çalışmada GelMA hidrojel içerisine tutuklanmış hücre konsantrasyonunun gerçek bir dokuyu taklit edebilecek nitelikte yoğun hale getirilebilmesi için hücre konsantrasyonunun arttırılmasının ya da inkübasyon süresinin uzatılmasının daha doğru olacağı sonucuna varıldı.



Şekil 3.39. GelMA içerisine tutuklanmış $5x10^4$ hücre/100 µL hidrojel konsantrasyonundaki insan dermal fibroblast hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü. Üst solda yer alan fotoğraf en üst tabakayı, devamındaki görüntüler de alt tabakaları temsil etmektedir. Yeşil: Falloidin, Mavi: DAPI (Skala: 50 µm)

Deri modelindeki dermal fibroblast hücre konsantrasyonunu belirleyebilmek amacıyla ikinci deneme olarak 100 uL GelMA içerisine $2x10^5$, $3x10^5$ ve $4x10^5$ insan dermal fibroblast hücresi gömülüp 34 günlük inkübasyon sonunda canlı/ölü hücre boyaması gerçekleştirildi (Şekil 3.40).

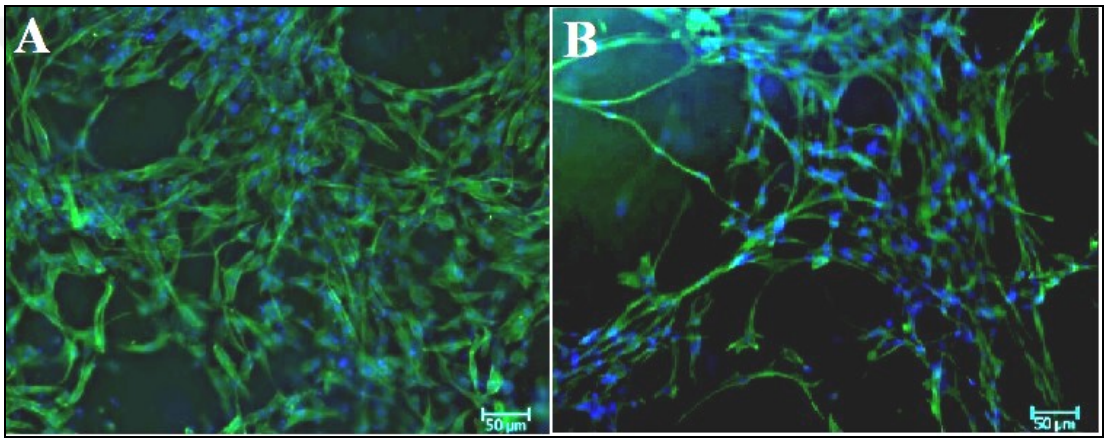



Şekil 3.40. GelMA içerisine farklı konsantrasyonlarda gömülmüş insan dermal fibroblast hücrelerinin 34 gün inkübasyonu sonundaki hücre canlılığı: canlı/ölü hücre boyaması, A) $2x10^5$ hücre, B) $3x10^5$ hücre, C) $4x10^5$ hücre, Yeşil: Canlı, Kırmızı: Ölü (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

Süre sonunda yapılan canlı/ölü hücre boyaması test edilen tüm hücre konsantrasyonlarının yüksek oranda hücre canlılığına sahip olduğunu gösterdi. Ancak gerçek bir dokuyu taklit etmek adına hücre konsantrasyonunun epidermis tabakasıyla birlikte belirlenmesine karar verildi.

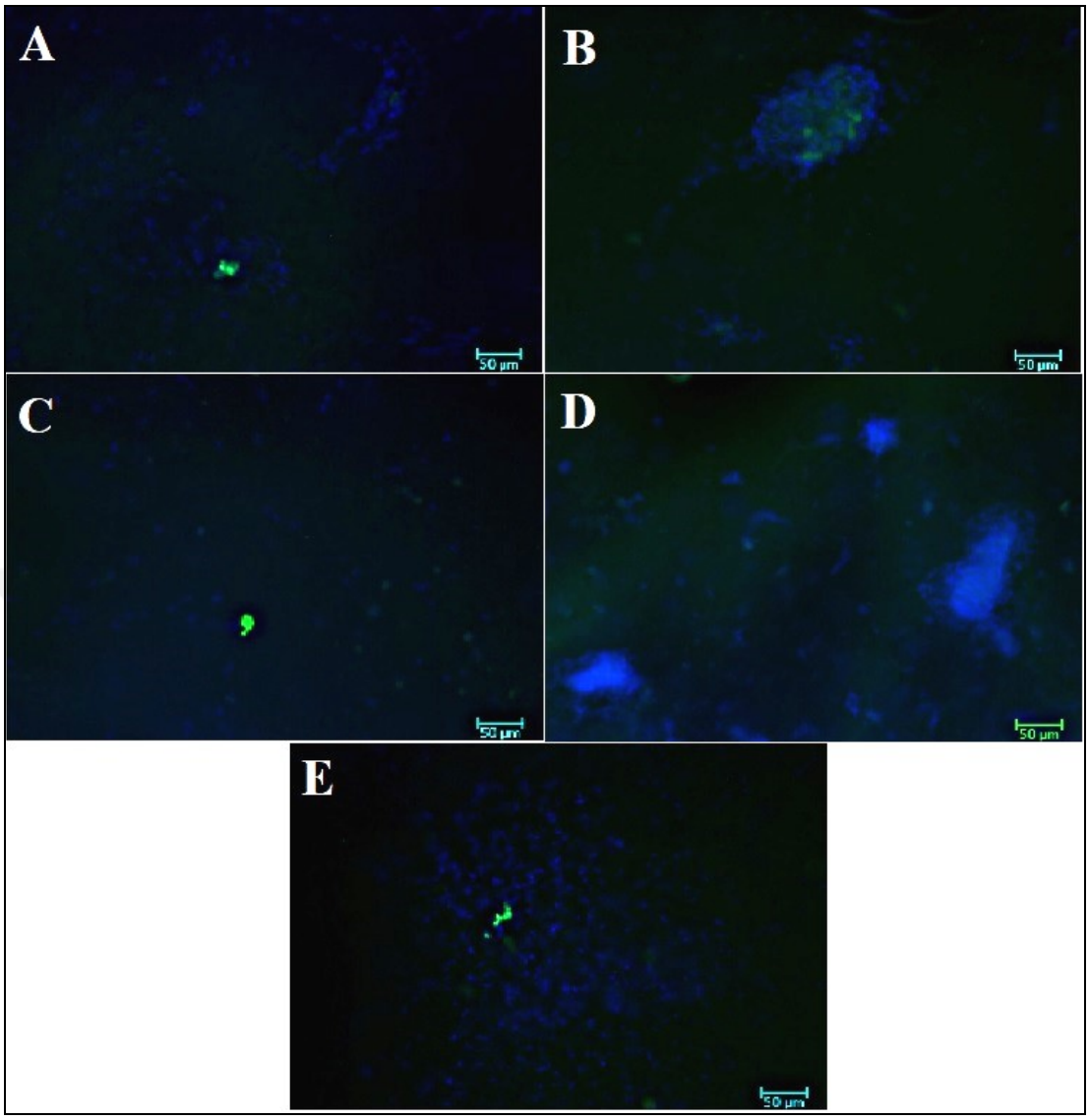
### 3.5.5. Dermis ve epidermis tabakalarının birlikte kültürü

*İn vitro* insan deri modeli için GelMA hidrojeller içerisine tutuklanmış insan dermal fibroblast hücrelerinin üzerine insan keratinosit hücreleri ekilerek farklı besiyerlerinde (DMEM-F12, Cascade besiyeri ya da 1:1 oranında DMEM-F12:Cascade besiyeri) inkübasyona bırakıldı. Fibroblast hücrelerinin bir kısmı sadece GelMA içerisine tutuklanırken bir kısmı ise hem GelMA içerisine hem de üzerine ekildi. Hücrelerin iki haftalık kültürü sonucunda fibroblast hücreleri anti-vimentin antikoruyla işaretlendi. Çekirdeği boyanıp sitoplazması boyanmayan hücreler ise keratinosit olarak değerlendirildi (Şekil 3.41 ve Şekil 3.42).




Şekil 3.41. GelMA hidrojeller içerisinde farklı besiyerlerinde kültürlenmiş insan dermal fibroblastların anti-vimentin ile immünfloresan boyanması ile elde edilmiş florasan mikroskop görüntüleri, A) Cascade besiyeri, B) DMEM-F12:Cascade besiyeri (1:1), Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

GelMA hidrojeller üzerine keratinosit hücreleri ekildikten bir gün sonra hidrojellerin degradasyona uğramaya başladığı tespit edildi. Mekanik özellikleri zayıflamış hidrojellerin fikse edildikten sonra özellikle hem GelMA içerisine hem de üzerine dermal fibroblast ekilen hidrojellerden büyük kısmının tamamen erozyona veya degradasyona uğradığı gözlendi. Dermal fibroblast hücrelerinin her iki besiyerinde de (DMEM-F12:Cascade besiyeri ya da Cascade besiyeri) yaşadığı görüldü. Keratinosit hücreleri için yapılan boyamalarda hidrojel üzerinde çok nadir keratinosit hücresinin görülmesi kullanılan besiyerinin keratinosit hücre çoğalması ve hidrojel ile sağlıklı etkileşimi, hidrojel degradasyonunun engellenmesi için yeterli olmadığını kanıtladı.




Şekil 3.42. GelMA hidrojellerdeki farklı besiyerlerinde inkübe edilmiş insan keratinosit hücrelerinin DAPI çekirdek immünfloresans boyaması, A) Cascade besiyeri, B) DMEM-F12:Cascade besiyeri (1:1), GelMA üzerine ekilmiş fibroblast hücreli hidrojeller, C) Cascade besiyeri, D) DMEM-F12:Cascade besiyeri (1:1), E) DMEM-F12, Yeşil: Vimentin Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X, Skala: 50 µm)

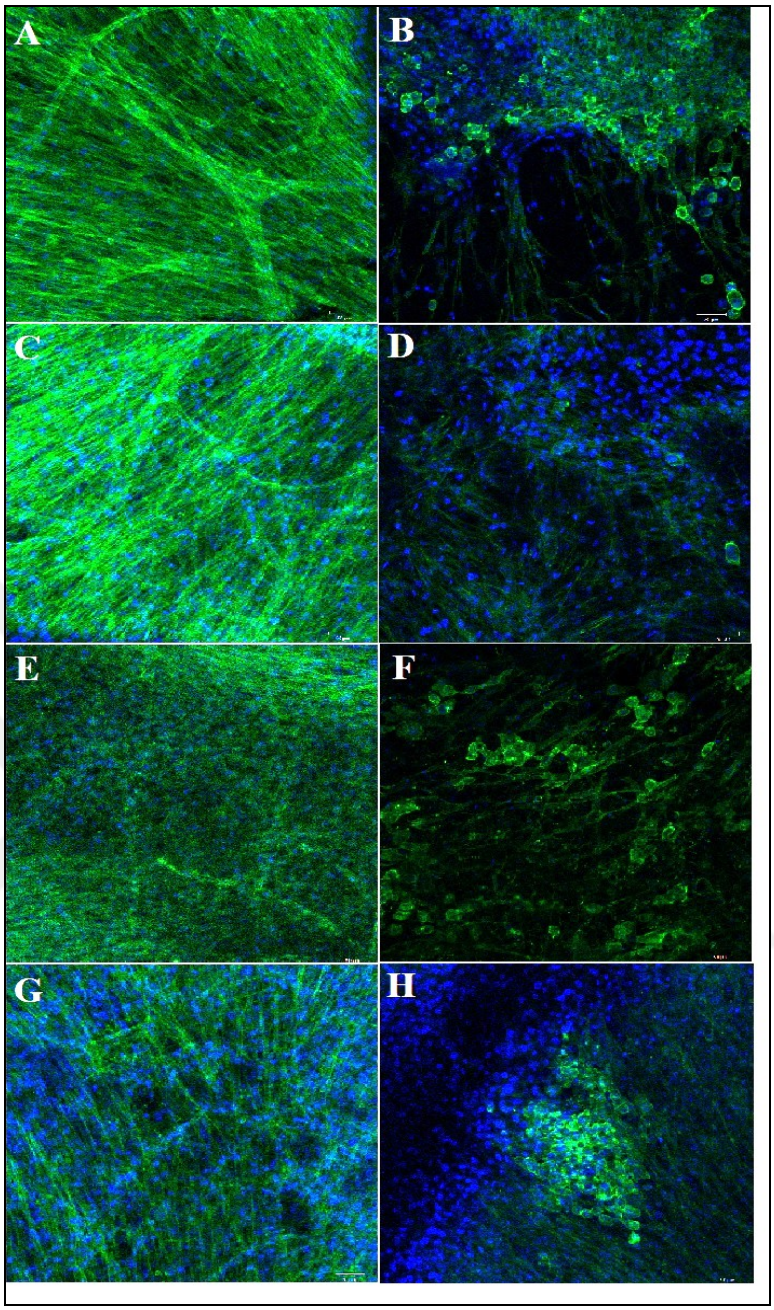
Modelin insan derisini daha yakın bir kompozisyonda taklit etmesi amaçlandığından dermis tabakasına endotel hücrelerinin de eklenmesine karar verildi. Farklı GelMA içeriklerine sadece insan dermal fibroblast hücreleri veya insan dermal fibroblast hücreleriyle birlikte HUVEC hücreleri ve keratinosit hücreleri birlikte gömülerek inkübe edildi (Şekil 3.43).

Konfokal mikroskobu görüntülerinde özellikle hidrojel içerisinde kollajen olmasının kılcal damar ağı oluşumu ve keratinosit tutunmasını diğer gruplara göre arttırdığı

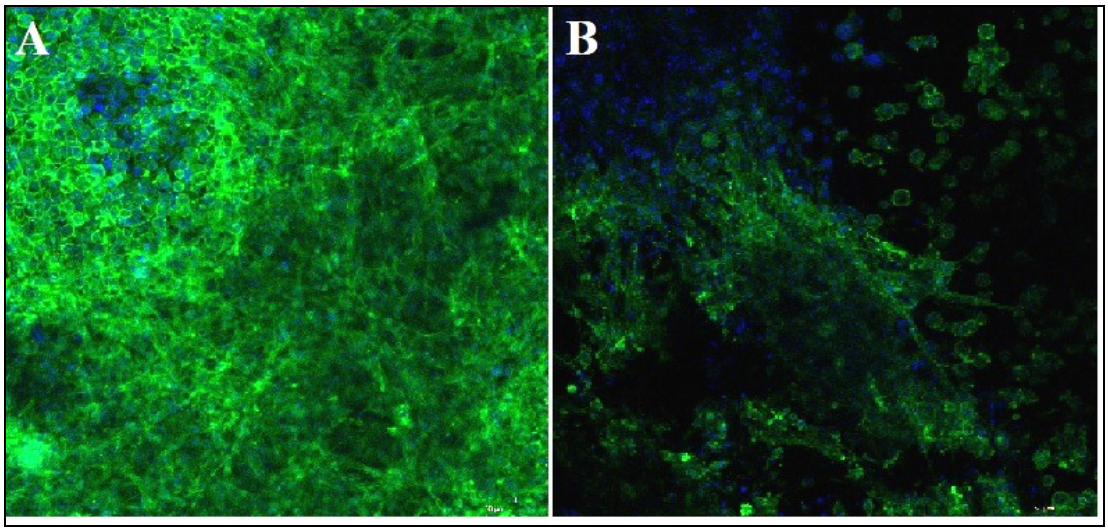
görüldü. Ancak hiçbir hidrojel formülasyonunda bütün bir epidermis tabakasının oluşmaması kullanılan besiyeri ve mikroçevrenin keratinosit çoğalması ve sağlıklı kültürü için yeterli olmadığını gösterdi.

Dermis tabakasını oluştururken hücrelerin kollajen kaplanmasının su kaybını en aza indirdiğini belirten literatür (Liu ve diğ., 2016) ve önceki yapılan denemeler ışığında modelin dermis tabakasını oluştururken fibroblast ve endotel hücrelerinin sığır aşil tendonundan izole edilen atelokollajen ile muamele edilmesine karar verilmişti. Dermis ve epidermis tabakalarını oluşturmak için 3 μm gözenek çaplı insertler üzerine insan dermal fibroblast hücreleri, HUVEC hücreleri ve keratinosit hücreleri birlikte ekildi (Şekil 3.44). İnsertler içerisinde hazırlanmış olan hidrojellerden özellikle dermis tabakasını oluşturacak hücre karışımının önceden atelokollajen ile muamele gördüğü grupta hücrelerin daha iyi organize olduğu ve daha fazla kılcal damar ağı oluşturduğu görüldü. Bu yüzden de dermis tabakasının yapımı esnasında bu yöntemin uygulanmasının daha doğru olduğu sonucuna varıldı.

Doğal dokuya benzer bir epidermis tabakası yapabilmek amacıyla *in vitro* 3-boyutlu insan deri modelleri 4 farklı besiyerinde (% 5 insan plazmalı Cascade besiyeri, % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri:% 5 insan plazmalı, düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM besiyeri [1:1], % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri:% 5 insan plazmalı EGM-2 besiyeri [1:1], % 5 insan plazmalı Cascade besiyeri:% 5 insan plazmalı düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM besiyeri:% 5 insan plazmalı EGM-2 besiyeri [1:1:1]) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda deri modellerinin epidermis ve dermis tabakalarında keratinosit hücreleri için anti-sitokeratin 5, fibroblast hücreleri için anti-vimentin ve endotel hücreler için ise anti-CD31 immunfloresan boyama yapılıp konfokal mikroskoptaki görüntüleri incelenip model için uygun besiyerine karar verildi (Şekil 3.45 ve Şekil 3.46).

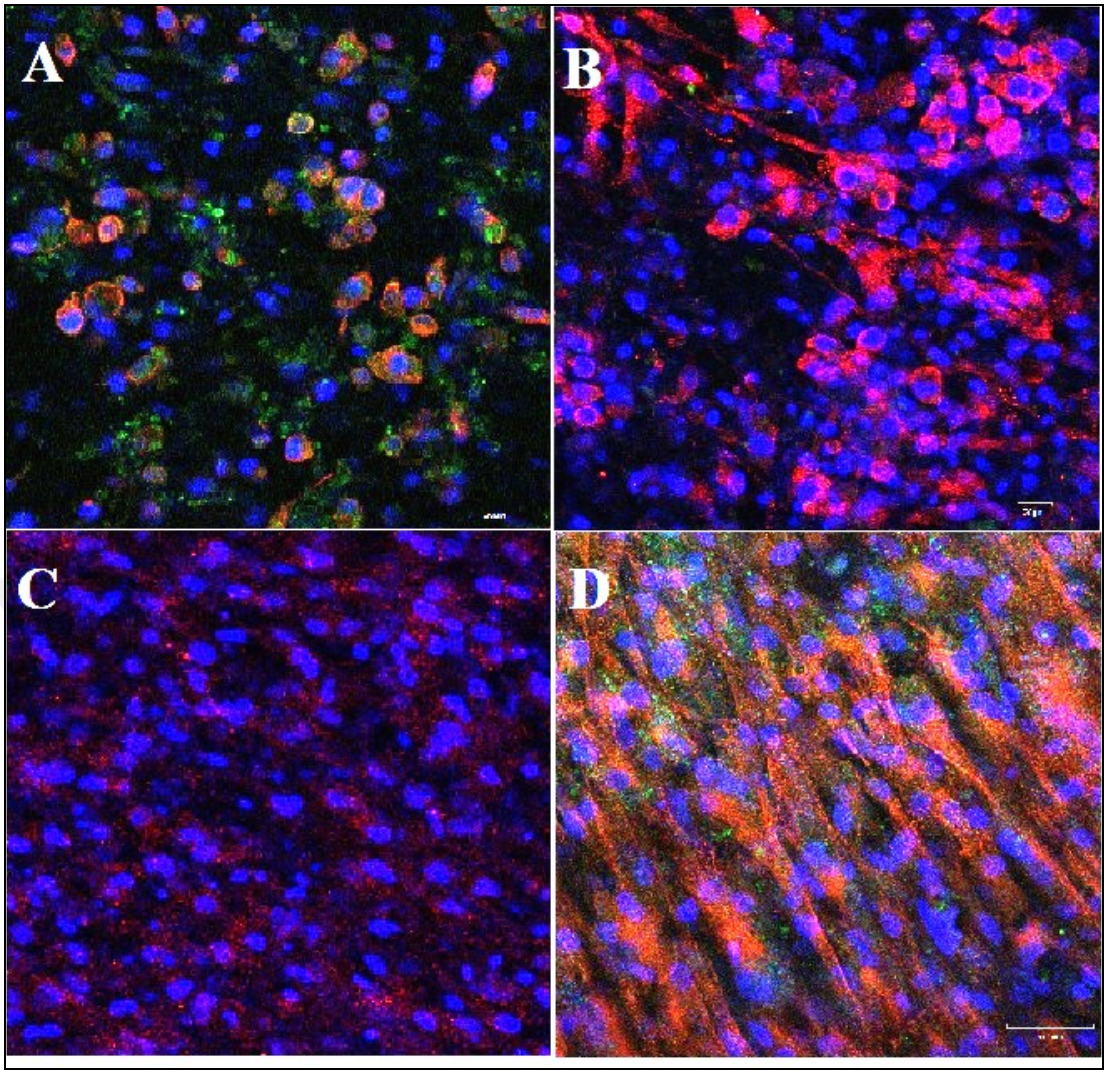



Şekil 3.43. 3-boyutlu *in vitro* insan deri modelindeki hücrelerin falloidin boyaması sonucu konfokal mikroskobu görüntüsü, A) İnsan dermal fibroblast, HUVEC, B) İnsan dermal fibroblast, HUVEC, keratinosit, C) Kollajen kaplı insan dermal fibroblast, HUVEC, D) Kollajen kaplı insan dermal fibroblast ve HUVEC üzerine keratinosit, E) İnsan dermal fibroblast, HUVEC askorbik asitli besiyerinde, F) İnsan dermal fibroblast, HUVEC, keratinosit askorbik asitli besiyerinde, G) Kollajen kaplı insan dermal fibroblast ve HUVEC askorbik asitli besiyerinde, H) Kollajen kaplı insan dermal fibroblast ve HUVEC üzerine keratinosit askorbik asitli besiyerinde, Yeşil: Falloidin, Mavi: Çekirdek

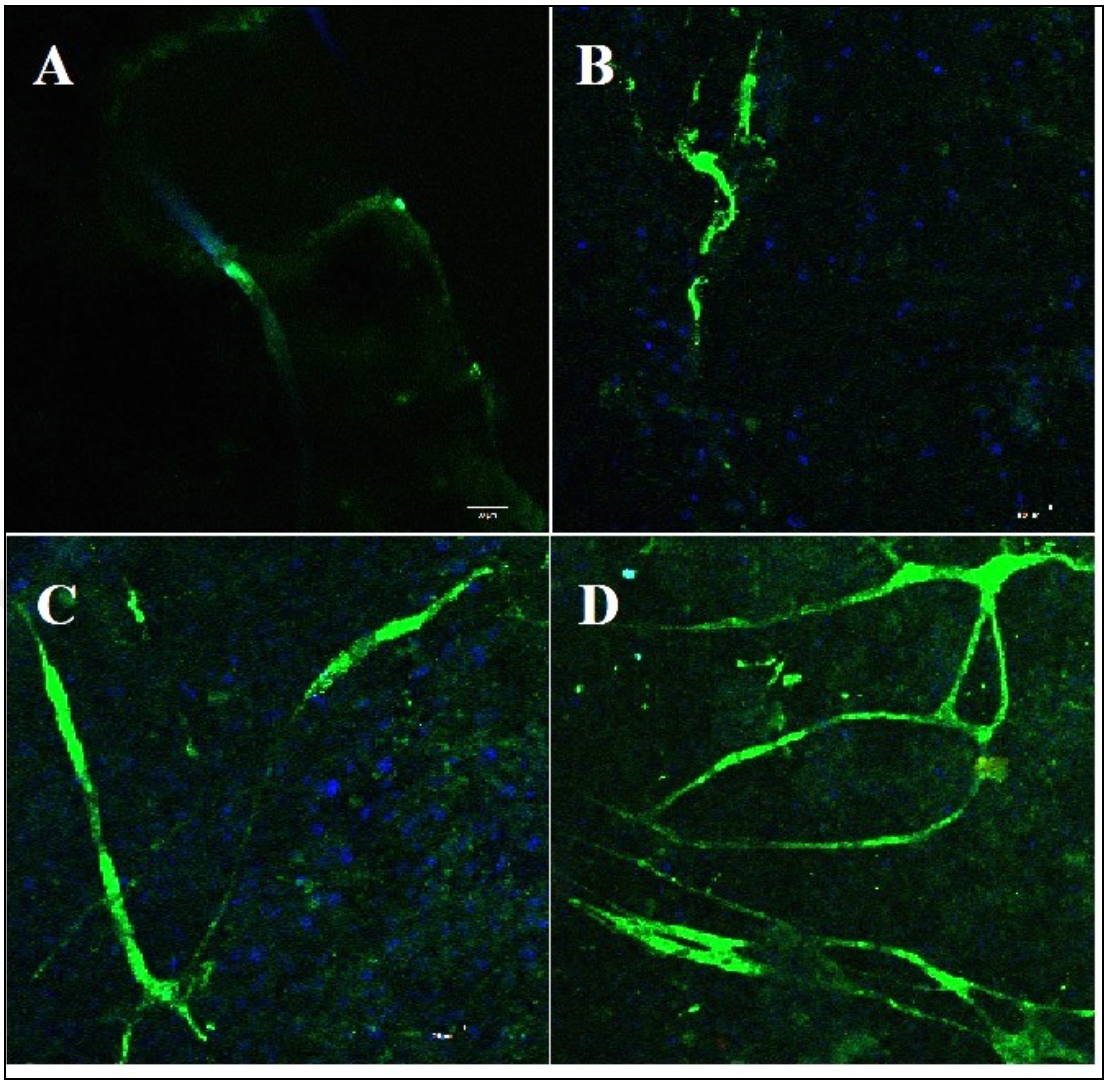



Şekil 3.44. İnsert içerisinde oluşturulmuş 3-boyutlu *in vitro* insan deri modelindeki hücrelerin 5 gün sonundaki falloidin boyaması sonucunda elde edilmiş konfokal mikroskobu görüntüleri, A) Sığır tendon kollajeni ile kaplanmış insan dermal fibroblast ve HUVEC, ve keratinosit hücreli model, B) İçerisine sığır aşil tendon kollajeni karıştırılmış GelMA içerisindeki insan dermal fibroblast, HUVEC ve keratinosit hücreli model, Yeşil: Falloidin, Mavi: Çekirdek (Skala: 50 μm)

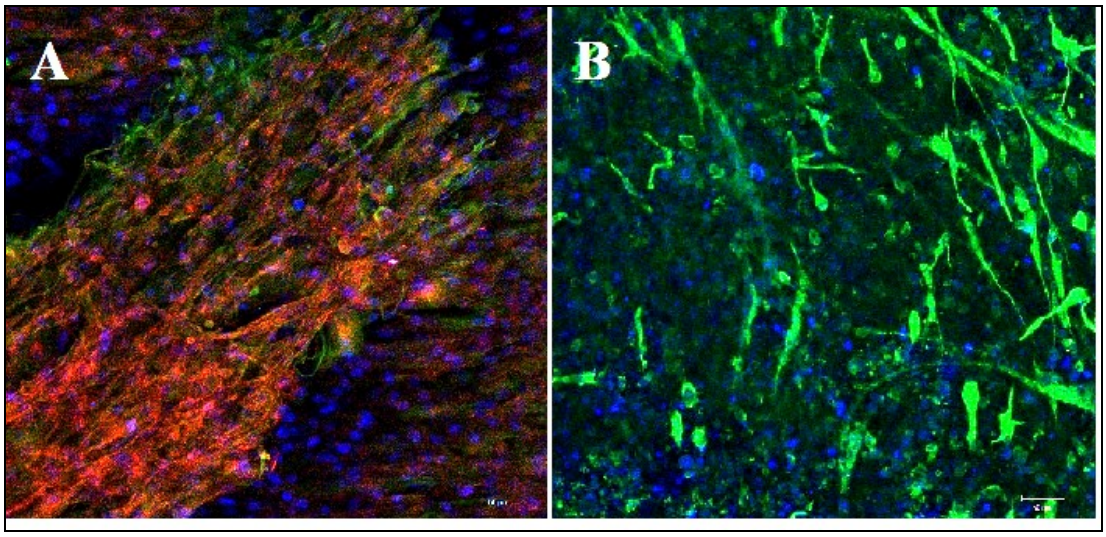
*İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin farklı besiyerlerinde inkübe edilmesi sonucunda yapılan konfokal mikroskobu incelemesi sonucunda epidermis tabakasını tamamlayan en iyi besiyeri içeriğine denenen % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM:% 5 HP içeren EGM-2 (1:1:1) karışım besiyerinde rastlandı. Ancak epidermis tabakası bir alt tabakadaki hücre morfolojisine yakın bir morfolojiye sahipti, bu da keratinositlerin bu besiyerinde dedifferansiye olduğunu, epitel-mezenkimal geçişe uğradığını, düşündürmektedir. Dermis tabakası incelendiğinde ise bu besiyerinin damar ağı oluşumunu ve fibroblast hücre gelişimini desteklediği görülmüştür (Şekil 3.46 ve Şekil 3.47).




Şekil 3.45. Farklı besiyerlerinde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modellerinin epidermis tabakalarının konfokal mikroskobu görüntüsü, A) % 5 HP içeren Cascade besiyeri, B) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukozlu DMEM besiyeri (1:1), C) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren EGM-2 besiyeri (1:1), D) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM besiyeri:% 5 HP içeren EGM-2 besiyeri (1:1:1), Kırmızı: Sitokeratin 5, Yeşil: CD31, Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 20X)

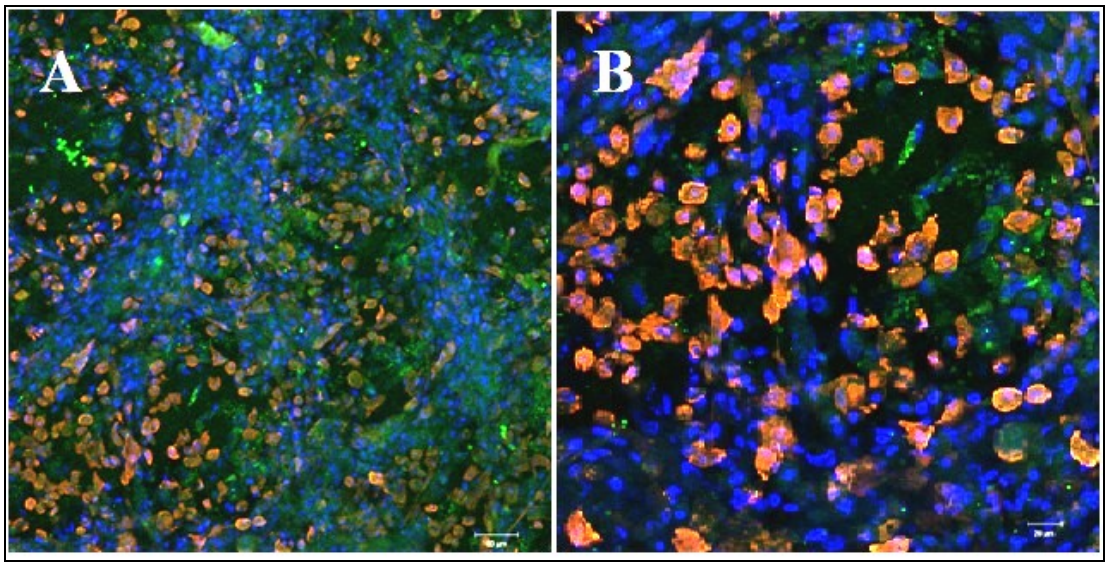



Şekil 3.46. Farklı besiyerlerde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modellerinin dermis tabakalarının konfokal mikroskobu görüntüsü, A) % 5 HP içeren Cascade besiyeri, B) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukozlu DMEM (1:1), C) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren EGM-2 (1:1), D) % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM:% 5 HP içeren EGM-2 (1:1:1) Yeşil: CD31, Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X)

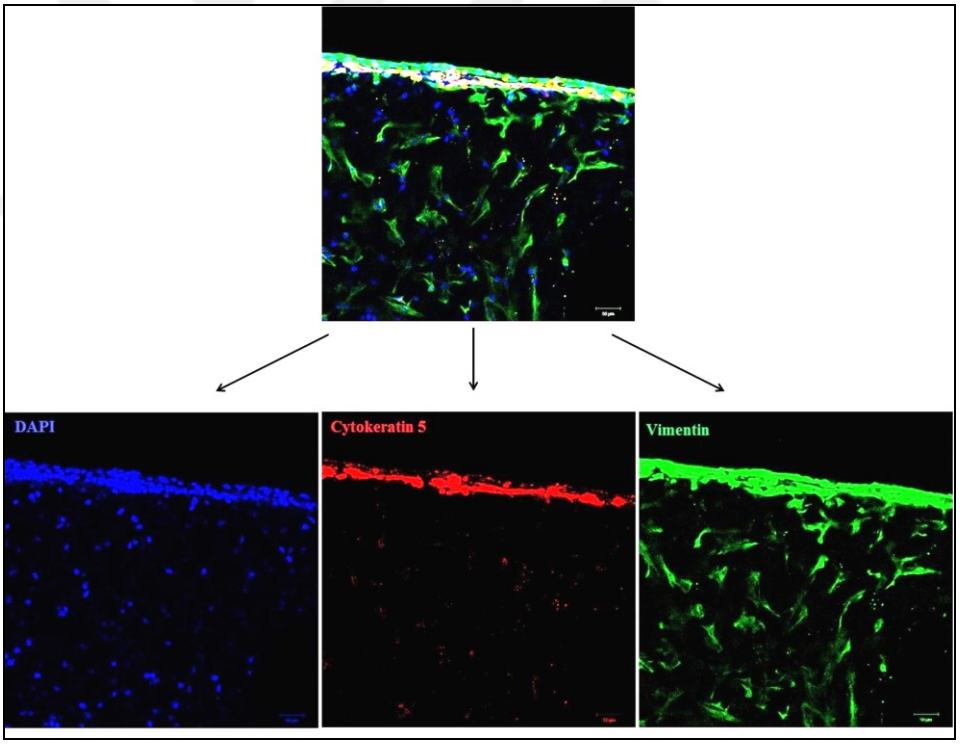



Şekil 3.47. % 5 HP içeren Cascade besiyeri:% 5 HP içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM:% 5 HP içeren EGM-2 (1:1:1) besiyerinde kültüre edilmiş *in vitro* insan deri modelinin konfokal mikroskobu görüntüsü, A) Epidermis, B) Dermis, Kırmızı: Sitokeratin 5, Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI (Orijinal Büyütme: 10X)

Son bir deneme olarak 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis tabakasındaki keratinositlerin farklılaşmış fenotiplerini (stratum corneum tabakasını) elde etmek amacıyla farklı besiyerleri uygulandı. Öncelikle dermis tabakası 50 µg/mL askorbik asit içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM: EGM-2 besiyerinde oluşturuldu. Epidermis tabakası oluşturulduktan sonra 2 gün keratinosit hücrelerinin çoğalması için model askorbik asit içeren keratinosit besiyerinde inkübe edildikten sonra üst tabaka havayla temas halinde bırakılıp geriye kalan sürede model 8 mg/mL BSA, 0,4 µg/mL hidrokortizon, 0,12 IU/mL insülin, 50 µg/mL askorbik asit ve % 1 penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren düşük glukoz konsantrasyonlu DMEM ve DMEM-F12 (3:1) besiyeri karışımında inkübasyona bırakıldı. Uygulama sonunda fikse edilen modelde epidermis ve dermis tabakasını gözlemleyebilmek adına keratinosit hücreleri için anti-sitokeratin ve anti-involucrin ve fibroblast hücreleri için ise anti-vimentin immunfloresan boyama yapılıp konfokal ve floresan mikroskoptaki görüntüleri incelendi (Şekil 3.48 ve Şekil 3.49).




Şekil 3.48. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis tabakasının konfokal mikroskop görüntüsü, A) 10X büyütme, B) 20X büyütmeli, Kırmızı: Sitokeratin-5, Yeşil: İnvolucrin, Mavi: DAPI




Şekil 3.49. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinin epidermis ve dermis tabakalarının konfokal mikroskop görüntüsü, Kırmızı: Sitokeratin-5, Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI Skala: 50 µm

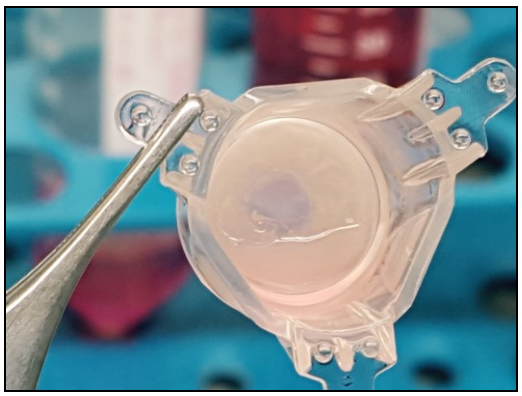
Mikroskop görüntüleri, uygulamanın düzenli bir epidermis tabakası oluşması için gerekli keratinosit hücre sayısı ve/veya artışını sağlayamadığını göstermiştir. Epidermis tabakasındaki hücrelerin involucrin pozitif olması keratinosit hücrelerinin

bir kısmının farklılaştığını kanıtlamıştır (Şekil 3.48). Dermis ve epidermis tabakalarının birlikte alındığı görüntülerde (Şekil 3.49) yüzeydeki bazı keratinositlerin vimentin pozitif oluşu keratinositlerin bu besiyerinde dedifferansiye olduğunu düşündürmektedir, fakat morfolojik olarak epitel hücre görünümlerini korumuşlardır. Bu keratinosit hücrelerinin vimentin pozitif olmalarının sebebi literatürde (Borowiec ve diğ., 2013) modelin serum içeren besiyerinde büyütülmesinden kaynaklı olduğu ifade edilmektedir.

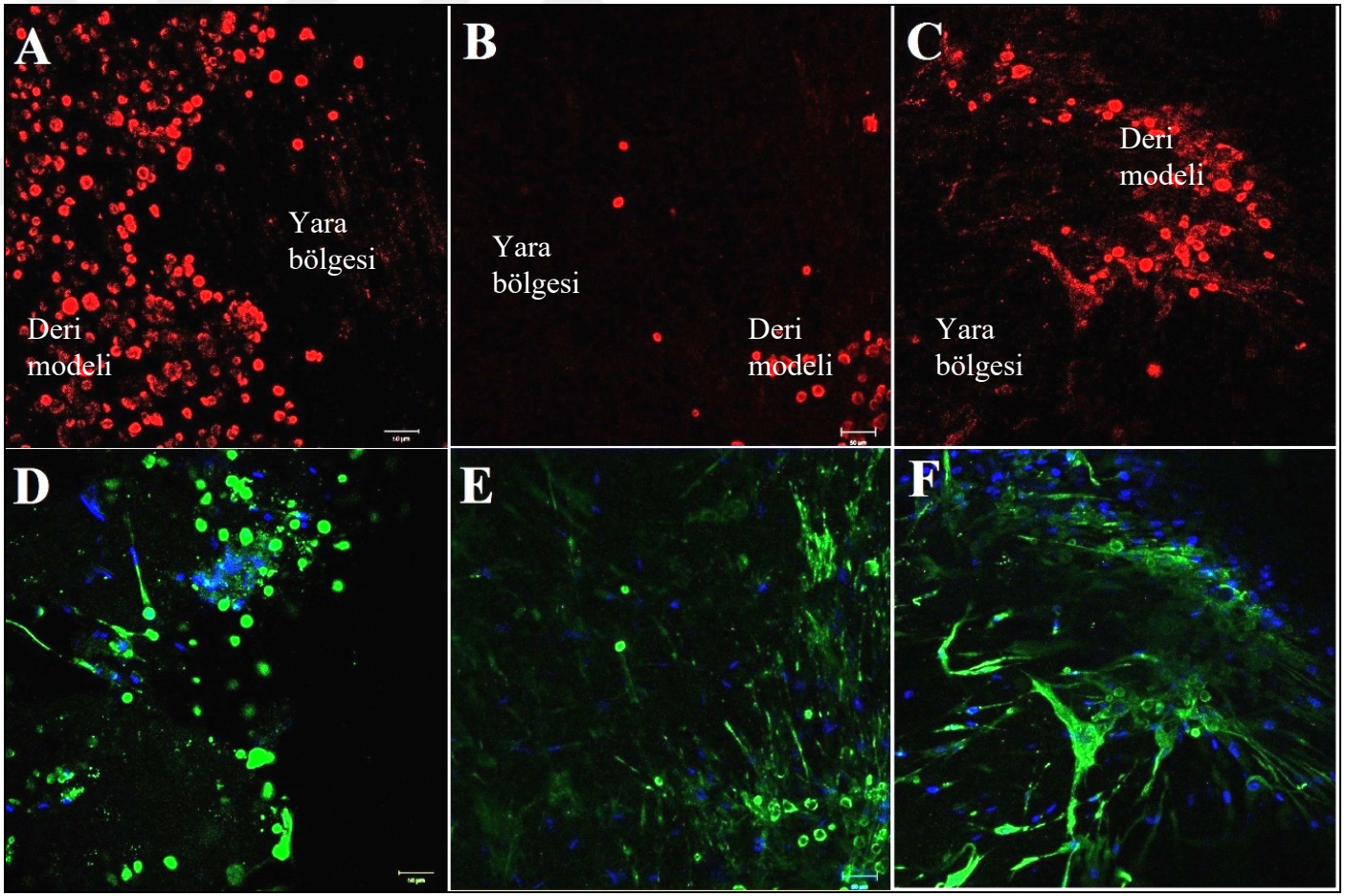
Epidermis tabakasını farklılaştırmak, yani stratum corneum'u oluşturmak için yapılan denemede epidermal tabaka optimizasyonu sağlanamadığından ve çalışmamızda yara iyileşmesinde keratinositlerin yara bölgesine göçünün ve bu bölgede çoğalmasının takibi önem arzettiğinden, ki bu faaliyetler keratinositler farklılaşınca görülememektedir, 3-boyutlu insan deri modelinde epidermis tabakasındakeratinosit hücrelerinin stratum corneum tabakasını oluşturmak üzere farklılaştırılmamasına karar verilmiştir.

### 3.6. Hücresel ve Bitkisel Tedavinin *İn Vitro* 3-Boyutlu İnsan Deri Modelindeki Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

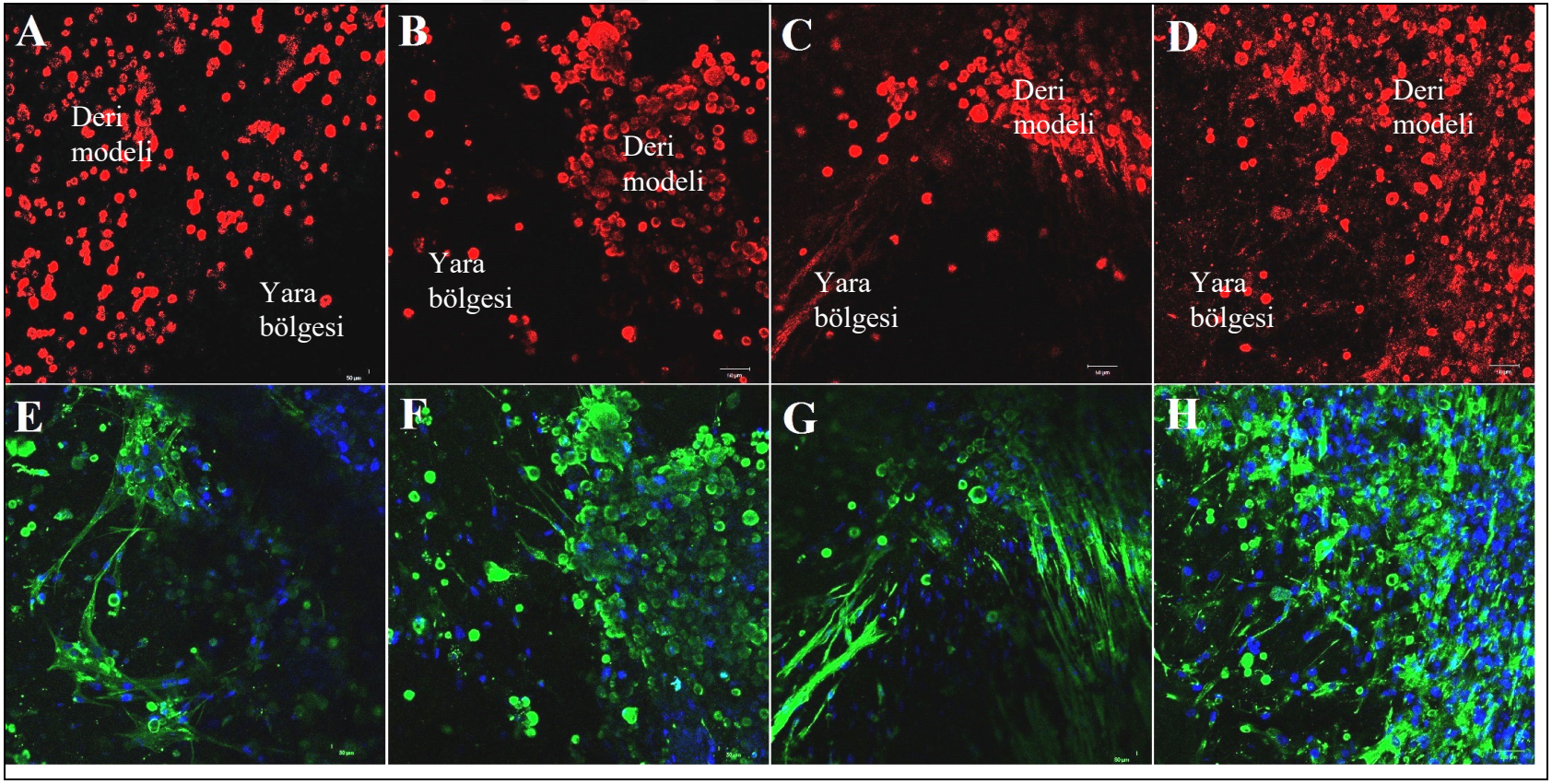
*İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaralar (Şekil 3.50) üzerine, hücresel ve bitkisel tedavi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen tedavi yaklaşımları uygulandı. Uygulamadan 9 gün sonra fikse edilen hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri çekildi.



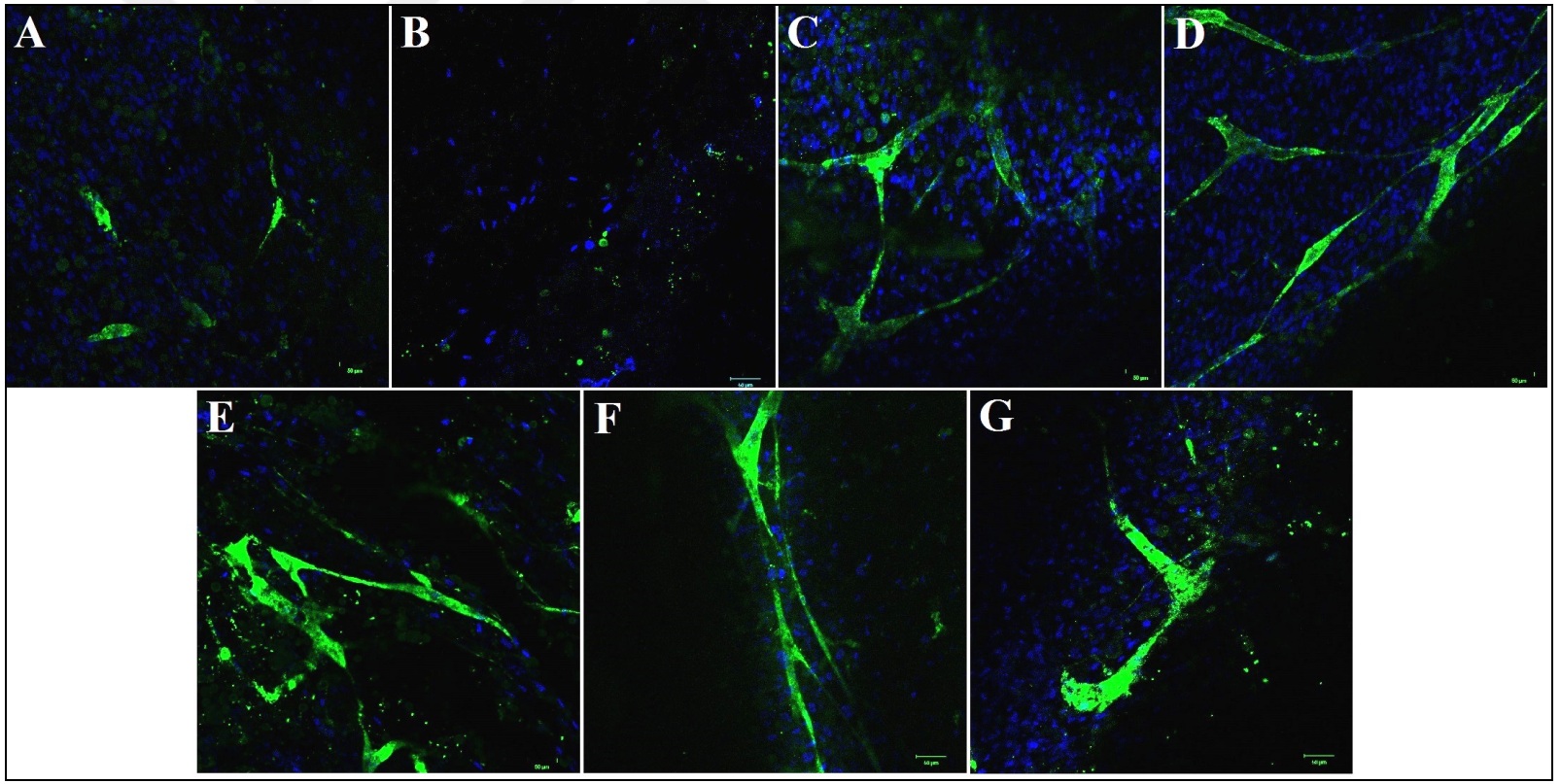
Şekil 3.50. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaranın makroskopik görüntüsü




Şekil 3.51. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki yara iyileşmesi konfokal görüntüsü. Epidermis tabakası (A-C) ve Dermis tabakası (D-F), A ve D) Kontrol yara, B ve E) Hücresiz kollajenli hidrojel, C ve F) Hücreli kollajenli hidrojel, Kırmızı: Sitokeratin 5, Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI, Skala: 50 µm



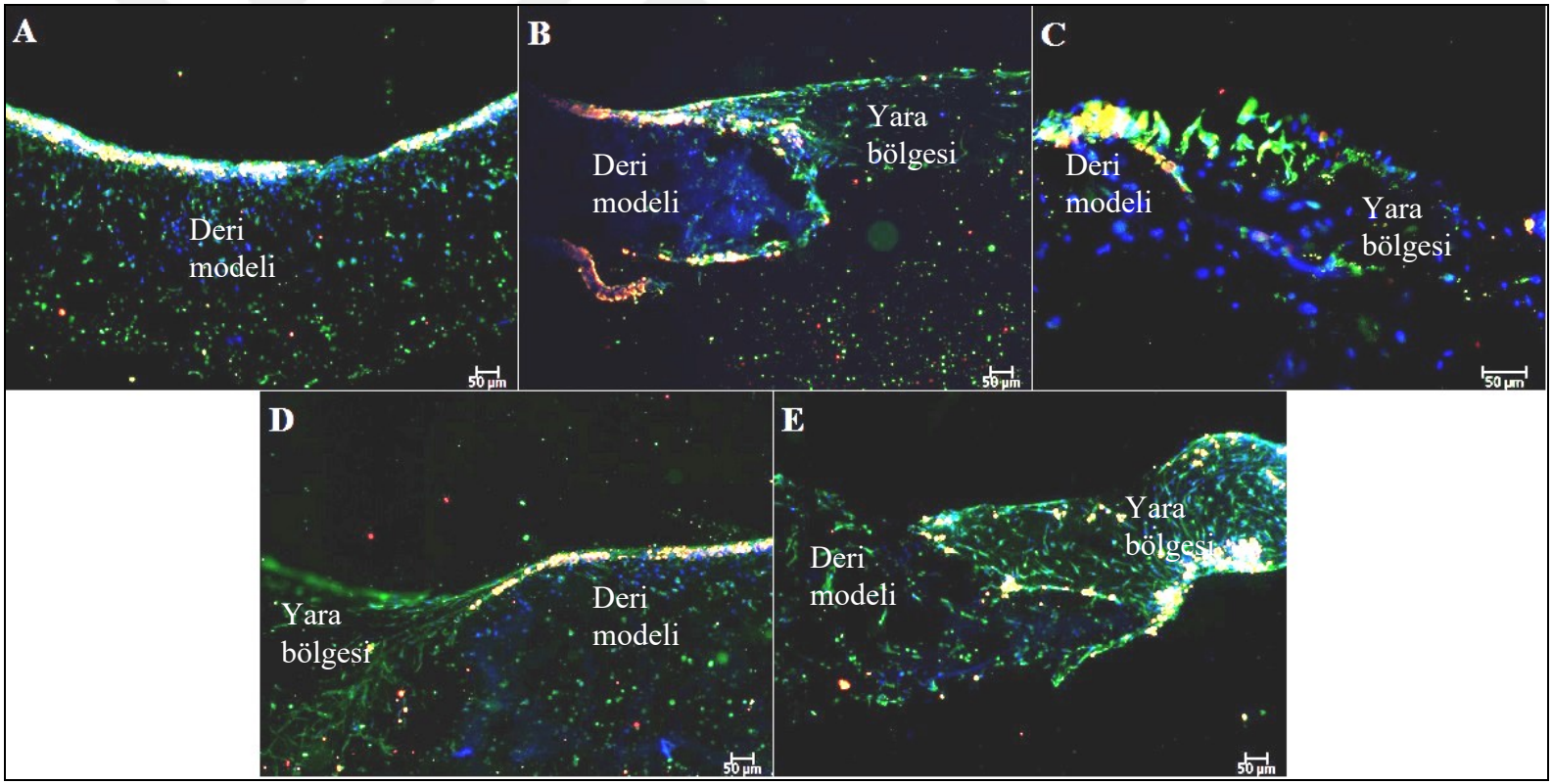

Şekil 3.52. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki yara iyileşmesi konfokal görüntüsü, Epidermis tabakası (A-D) ve Dermis tabakası (E-H), A ve E) Boyacı sumağı distile su özütü kollajenli hidrojel, B ve F) Boyacı sumağı distile su özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, C ve G) Boyacı sumağı geleneksel özütü kollajenli hidrojel, D ve H) Boyacı sumağı geleneksel özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, Kırmızı: Sitokeratin 5, Yeşil: Vimentin, Mavi: DAPI, Skala: 50 µm




Şekil 3.53. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 gün sonundaki damar ağı, A) Kontrol, B) Hücresiz kollajenli hidrojel, C) Hücreli kollajenli hidrojel, D) Boyacı sumağı distile su özütü kollajenli hidrojel, E) Boyacı sumağı distile su özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, F) Boyacı sumağı geleneksel özütü kollajenli hidrojel, G) Boyacı sumağı geleneksel özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, Yeşil: CD31 Mavi: DAPI, Skala: 50 µm

Deri modelinde uygulanan tüm tedavi yaklaşımları incelendiğinde inkübasyon süresinin yaranın tamamen kapanması için yeterli olmadığı görüldü (Şekil 3.51, 3.52, 3.54). Tüm uygulama gruplarında keratinosit göçünün başladığı görülürken en fazla keratinosit göçünün boyacı sumağının geleneksel özütünün hücreli kollajenli hidrojel ile birlikte uygulandığında olduğu tespit edildi. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinde fibroblast hücrelerinin iç tabakalara besiyeri ulaşmamasından kaynaklı hidrojelin kenarlarına göç ettiği belirlendi. Ayrıca yarayı kapatmak için kullanılan kollajenli hidrojel içerisine tüm gruplarda fibroblast göçü mevcuttu. Uygulama gruplarının hiçbirinde yara bölgesinde damar oluşumu gözlenmedi. Bunun muhtemel sebebi yara bölgesine damar oluşturacak hücrelerin göç etmesinden önce bölgedeki fibroblast hücrelerinin yeterli miktarda çoğalmaması ve endotel hücrelerin bölgeye yerleşmesi için gerekli ECM üretiminin yeterli olmaması olabilir. Buna karşın tüm deri modellerinde damar yapısının varlığı tespit edildi (Şekil 3.53).

Boyacı sumağının geleneksel özütü ve hücreli kollajen hidrojelinden oluşan tedavi yaklaşımı, *in vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaranın iyileştirilmesinde kullanılan kombinasyonlar arasında en fazla keratinosit ve fibroblast göçünü sağlayan, modeldeki damar ağı oluşumunu destekleyen grup olarak belirlendi.




Şekil 3.54. *İn vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde 9 günlük yara iyileşmesinin floresan mikroskop görüntüleri, A) Deri modeli, B) Boyacı sumağı distile su özütü kollajenli hidrojel, C) Boyacı sumağı distile su özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, D) Boyacı sumağı geleneksel özütü kollajenli hidrojel, E) Boyacı sumağı geleneksel özütü ve hücreli kollajenli hidrojel, Kırmızı: Sitokeratin 5 Yeşil: Vimentin Mavi: DAPI, Skala: 50 µm

# 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yara çok sayıda hastayı etkileyen ve yaşam kalitesini düşüren bir etmendir. Yara, vücut dokusu sürekliliğindeki bir çeşit kesinti olarak ifade edilebilir. Yaralar çeşitli fiziksel, kimyasal ve mekanik travmalarla ya da tıbbi müdahalelerle meydana gelebilir. Deri yaraları yetişkinlerde nispeten yaygındır ve popülasyonda görülme oranı yaşam beklentisindeki gelişmelerle paralel olarak artar. Oluşan yaralardan özellikle kronik yaraların iyileşmesi diğer yaralara kıyasla daha zordur. Biz de çalışmamızda diyabetik yaraları iyileştirmek amacıyla yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalıştık. Öncelikle askorbik asitli atelokollajen bazlı hidrojelin, boyacı sumağı ve 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelenip, *in vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modelinde açılan suni yaralara önceden kararlaştırılmış tedavi yaklaşımları uygulandı ve yarayı iyileştirme kapasiteleri araştırıldı.

Yara iyileşmesini tetiklemek için kullanılan yaklaşımlardan birisi olan hücresel tedavide yararlanılan hidrojel içerisindeki kollajen, sığır aşil tendonundan izole edildi. Kollajenin immün tepki yaratan N- ve C-terminal telopeptit bileşenleri yapılan enzimatik izolasyonla uzaklaştırılarak düşük immünojenik kollajen türevi (atelokollajen) elde edilmiş oldu. Bu hidrojel içerisine askorbik asit de ilave edilerek hem yara iyileşme sürecinin kısalması hem de damarlanmanın tetiklenmesi sağlanmaya çalışıldı. Hidrojel içerisindeki sodyum aljinat da hidrojelin mekanik sağlamlığına destek vermiştir. Hidrojellerin polimerizasyonu çoğunlukla kimyasal ajanlarla gerçekleştirilmektedir ancak bu ajanlar toksik etkiye sahip olduğundan tercih edilmemektedir. Projemizde kullandığımız termal çapraz bağlama yöntemi bu olumsuzluğa sebep olmadan hidrojel oluşumunu sağlamakta fakat bunu beklenenden daha uzun sürede gerçekleştirmektedir. Üretilen hidrojelin klinik uygulamalarda kullanılması amaçlandığı için ilerleyen çalışmalarda polimerizasyon süresinin kısaltılması hedeflenmektedir.

Projede farklı *C. coggygria* (boyacı sumağı) özütlerinin hücre proliferasyonuna ve yara iyileşmesine olan etkisi incelendi. Normoglisemik ve tip 2 diyabetik hücrelerin boyacı sumağı özütlerine verdiği tepkinin farklı olduğu görüldü. Literatürde boyacı sumağının antimikrobiyal etkisi de vurgulanmaktadır. Çalışmamızda özütlerin antimikrobiyal etkilerine bakıldı ancak geleneksel yöntemle elde edilen özüt ile diğer özütlerin kıyaslanacağı şekilde özütler hidrojel içerisine entegre edilip test edilmedi, ilerleyen çalışmalarda bu şekilde bir araştırmanın da yapılması planlanmaktadır.

980 nm dalga boyundaki diyot lazerin hücre proliferasyonuna etkisi araştırılıp uygulama süreleri optimize edildi. Yapılan denemelerin hepsi *in vitro* hücre kültüründe gerçekleştirildi. *İn vitro* 3-boyutlu insan deri modelinde ya da doğrudan *in vivo*'da da test edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Farklı tedavi yaklaşımları *in vitro* 3-boyutlu insan deri modellerine uygulandı. Bu modellerin kullanılması hem birçok hayvanın ölmesine sebep olan *in vivo* çalışmaların yerine geçebilmiş hem de insan hücreleriyle oluşturuldukları için daha gerçekçi bir analizin yapılmasına olanak sağlamıştır. Oluşturulan modellerin dermis kısmı fibroblast ve göbek kordonundan izole edilen endotel hücrelerden meydana gelmekteydi. Doğal dokuyu taklit etmek amacıyla bu modelin dermis kısmına deriden izole edilen endotel hücrelerin ve bağışıklık sistemi hücrelerinin (makrofajlar gibi) entegre edilebileceği düşünülmektedir. Çünkü özellikle kronik yaraların zor iyileşmesinin temel sebeplerinden biri literatürde enflamasyon basamağının gereğinden uzun sürmesi olarak gösterilmektedir ve modelde bu hücrelerin bulunması daha doğru bir yara modelinin oluşturulmasını sağlayacaktır. Ayrıca epidermis tabakasının da farklılaşması sağlanarak doğal dokuyu benzer bir yara modelinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Bu doktora tezinde, *in vitro* 3-boyutlu tip 2 diyabetik insan deri modeline açılan suni yaraları iyileştirmek amacıyla farklı tedavi yaklaşımları denendi. Uygulanan tüm tedavi yaklaşımlarında keratinosit ve fibroblast göçünün olmasına ve gruplar arasındaki farkın görülebilecek düzeyde olmasına rağmen 9 günlük kültür süresi tam yara kapanması için yeterli olmadı. İlerleyen çalışmalarda modeldeki yara iyileşme süreci uzatılabileceği gibi deri modelimizde birebir *in vivo* koşulların taklit

edilememesinden dolayı uygulanan tedavi yaklaşımları klinik denemeler öncesi *in vivo* hayvan deneylerinde de test edilebilir.

## KAYNAKLAR


Abergel R. P., Lam T. S., Meeker C. A., Castel C. J., Dwyer R. M., Uitto J., Biostimulation of Procollagen by Low Energy Lasers in Human Skin Fibroblast Cultures, *J. Invest. Dermatol*, 1984, **82**, 395

Adetutu A., Morgan W. A., Corcoran O., Antibacterial, Antioxidant and Fibroblast Growth Stimulation Activity of Crude Extracts of *Bridelia ferruginea* Leaf, a Wound-Healing Plant of Nigeria, *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, **133**, 116-119

Akbay T. T., Batırel S., Yarat A., Emekli N., Lens and Skin Protein Glycation, Lipid Peroxidation and Glutathione Levels in Vitamin C Administered Diabetic Rats, *F. Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.*, 2010, **24**(1) 35-39

Almeida-Lopes L., Rigau J., Zangaro R. A., Guidugli-Neto J., Jaeger M. M. M.,Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001, **29**, 179-184

Alt E., Yan Y., Gehmert S., Sang Y., Altman A., Gehmert S., Vykoukal D., Bai X., Fibroblasts Share Mesenchymal Phenotyped with Stem Cells, but Lack Their Differentiation and Colony-Forming Potential, *Bio. Cell,* 2011, **103**, 197-208

Ambati B. C., Devery S. M., Higginbotham C. L., Photochemical Crosslinking of Collagen and Poly(vinyl pyrrolidone) Hydrogel System for Biomedical Applications by Using Novel Photo Initiators, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2013, **6**(3), 16-22

Aubin H., Nichol J. W., Hutson C. B., Bae H., Sieminski A. L., Cropek D. M., Akhyari P., Khademhosseini A., Directed 3D Cell Alignment and Elongation in Microengineered Hydrogels, *Biomaterials*, 2010, **31**, 6941-6951

Ayuk S. M., Houreld N. N., Abrahamse H., Effect of 660 nm Visible Red Light on Cell Proliferation and Viability in Diabetic Models *in vitro* under Stressed Conditions, *Lasers in Medical Science*, 2018, **33**, 1085-1093

Basso F. G., Pansani T. N., Turrioni A. P. S., Bagnato V. S., Hebling J., de Souza Costa C. A., *In vitro* Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts, *International Journal of Density*, DOI: 10.1155/2012/719452

Bertassoni L., E., Cardoso J. C., Manoharan V., Cristino A. L., Bhise N. S., Araujo W. A., Zorlutuna P., Vrana N. E., Ghaemmaghami A. M., Dokmeci M. R., Khademhosseini A., Direct-Write Bioprinting of Cell-Laden Methacrylated Gelatin Hydrogels, *Biofabrication*, 2014, DOI: 10.1088/1758-5082/6/2/024105

Bertassoni L. E., Cecconi M., Manoharan V., Nikkhah M., Hjortnaes J., Cristino A. L., Barabaschi G., Demarchi D., Dokmeci M. R., Yang Y., Khademhosseini A., Hydrogel Bioprinted Microchannel Networks for Vascularization of Tissue Engineering Constructs, *Royal Society of Chemistry*, 2014, **14**, 2202-2211

Borowiec A. S., Delcourt P., Dewailly E., Bidaux G., Optimal Differentiation of In Vitro Keratinocytes Requires Multifactorial External Control, *Plos One*, 2013, **DOI:** 10.1371/journal.pone.0077507

Brett D., A Review of Collagen and Collagen-Based Wound Dressings, *Wounds,* 2008, **20**(12), 347-356

Brown M. A., Daya M. R., Worley J. A., Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System, The Journal of Emergency Medicine, 2009, 37(1), 1-7

Capon A., Souil E., Gauthier B., Sumian C., Bachelet M., Buys B., Polla B. S., Mordon S., Laser Assisted Skin Closure (LASC) by Using a 815 nm Diode-Laser System Accelerates and Improves Wound Healing, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001, **28**, 168-175

Cen L., Liu W., Cui L., Zhang W., Cao Y., Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications, *Pediatric Research*, 2008, **63**(5), 492-496

Chattopadhyay S., Raines R. T., Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing, *Biopolymers*, 2014, **101**(8), 821-833

Chen Y. C., Lin R. Z., Qi H., Yang Y., Bae H., Melero-Martin J. M., Khademhosseini A., Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels, *Advanced Functional Materials*, 2012, **22**, 2027-2039

Chung Tzu-Yun, Peplow P., V., Baxter G., D., Laser Photobiostimulation of Wound Healing: Defining a Dose Response for Splinted Wounds in Diabetic Mice, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, ***42***, 816-824

Colombo F., Neto A. A. P. V., Cavalcanti de Sousa A. P., Marchionni A. M. T., Pinheiro A. L. B., Regina de Almeida Reis S., Effect of Low-Level Laser Therapy (λ660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: An Immunohistochemical Study in a Rodent Model, *Braz. Dent. J.,* 2013, **24**(4), 308-312

Davidson J. M., LuValle P. A., Zoia O., Quaglino D., Giro M., Ascorbate Differentially Regulates Elastin and Collagen Biosynthesis in Vascular Smooth Muscle Cells and Skin Fibroblasts by Pretranslational Mechanisms, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(1), 345-352

Demirci B., Demirci F., Başer K. H. C., Composition of the Essential Oil of *Cotinus coggygria* Scop. From Turkey, *Flavour and Fragrance Journal*, 2003, **18**, 43-44

Durna Z., Diyabetin Sınıflandırılması ve Tanı Kriterleri, Diyabet Hemşireliği Derneği Kitabı, http://www.tdhd.org/dhd_kitap/02blm.pdf , (Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2018)

Eke G., Mangir N., Hasirci N., MacNeil S., Hasirci V., Development of a UV Crosslinked Biodegradable Hydrogel Containing Adipose Derived Stem Cells to Promote Vascularization for Skin Wounds and Tissue Engineering, *Biomaterials*, 2017, **129**, 188-198

Emilia de Abreu Chaves M., Piancastelli A. C. C., Rodrigues de Araujo A., Pinotti M., Effects of Low-Power Light Therapy on Wound Healing: LASER x LED, *An Bras Dermatol.,* 2014, **89**(4), 616-623

Esmaeelinejad M., Bayat M., Darbandi H., Bayat M., Mosaffa N., The Effects of Low-Level Laser Irradiation on Cellular Viability and Proliferation of Human Skin Fibroblasts Cultured in High Glucose Mediums, *Lasers Med. Sci.*, 2014, **29**, 121-129

Geesin, J. C., Darr, D., Kaufman, R., Murad, S., Pinnell, S. R., Ascorbic Acid Specifically Increases Type I and Type III Procollagen Messenger RNA Levels in Human Skin Fibroblasts, *Journal of Investigative Dermatology*, 1988, **90**(4), 420-424

Gökalp Özkorkmaz, E., Özay, Y., Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2009, **2**(2), 63-67

Grossman N., Schneid N., Reuveni H., Halevy S., Lubart R., 780 nm Low Power Diode Laser Irradiation Stimulates Proliferation of Keratinocytes Cultures: Involvement of Reactive Oxygen Species, Lasers in Surgery and Medicine, 1998, 22, 212-218

Grunert P., Borde B. H., Towne S. B., Moriquchi Y., Hudson K. D., Bonassar L. J., Härti R., Riboflavin Crosslinked High-Density Collagen Gel for the Repair of Annual Defects in Intervertebral Discs: An in vivo study, *Acta Biomater*., 2015, **26**, 215-24

Gürsoy A., Yara Örtüsü Seçimi, *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 2007, **4**(1), 6-9

Hakki S., S., Bozkurt S. B., Effects of Different Setting of Diode Laser on the mRNA Expression of Growth Factors and Type 1 Collagen of Human Gingival Fibroblasts, *Lasers Med. Sci.*, 2012, **27**, 325-331

Hawkins D., Abrahamse H., Phototherapy- A Treatment Modality for Wound Healing and Pain Relief, *African Journal of Biomedical Research*, 2007, **10**, 99-109

Houreld N. N., Abrahamse H., Laser Light Influences Cellular Viability and Proliferation in Diabetic-Wounded Fibroblast Cells in a Dose- and Wavelength-Dependent Manner, *Lasers Med. Sci.*, 2008, **23**, 11-18

Houreld N. N., Ayuk S. M., Abrahamse H., Cell Adhesion Molecules are Mediated by Photobiomodulation at 660 nm in Diabetic Wounded Fibroblast Cells, *Cells*, DOI: 10.3390/cells7040030

Hynds R. E., Aissa A. B., Gowers K. H. C., Watkins T. B. K., Bosshard-Carter L., Rowan A. J., Veeriah S., Wilson G. A., Quezada S. A., Swanton C., Consortium T., Janes S. M., Expansion of Airway Basal Epithelial Cells from Primary Human Non-Small Cell Lung Cancer Tumors, *Int. J. Cancer.*, 2018, **143**(1), 160-166

IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation Sixth Edition, 2013, 34-69

Ibusuki S., Halbesma G. J., Randolph M. A., Redmond R. W., Kochevar I. E., Gill T. J., Photochemically Cross-linked Collagen Gels as Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, 2007, **13**(8), 1995-2005

Ikuno T., Masumoto H., Yamamizu K., Yashioka M., Minakata K., Ikeda T., Sakata R., Yamashita J. K., Efficient and Robust Differentiation of Endothelial Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells via Lineage Control with VEGF and cyclic AMP, *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0173271

Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T., Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **96**, 145-150

Kawalec J. S., Hetherington V. J., Pfennigwerth T. C., Dockery D. S., Dolce M., Effect of a Diode Laser on Wound Healing by Using Diabetic and Nondabetic Mice, *The Journal of foot & Ankle Surgery,* 2004, **43**(4), 214-220

Khil M. S., Cha D., Kim H. Y., Kim I. S., Bhattarai N., Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2003, **67B**(2), 675-679

Lau K., Lai K., Liu C., Tam J. C., To M., Kwork H., Lau C., Leung P., Fung K., Poon S., K., Lau C. B., Synergic Interaction between Astragali Radix and Rehmanniae Radix in a Chinese Herbal Formula to Promote Diabetic Wound Healing, *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, **14**, 250-256

Lei Y.-K., Wang W., Liu Y.-P., He D., Li Y., Adaptive Genetic Variation in the Smoke Tree (*Cotinus coggygria* Scop.) is Driven by Precipitation, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, **59**, 63-69

Liu Chen-Yen, Matsusaki Michiya, Akashi Mitsuru, Control of Vascular Network Location in Millimeter-Sized 3D-Tissues by Micrometer-Sized Collagen Coated Cells, *Biomedical and Biophysical Research Communications*, 2016, **472**, 131-136

Madigan M. T., Martinko J. M., Mikrobiyal Üreme, Çökmüş C., *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, 11. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara, 142, 2012

Marčetić M., Božić D., Milenković M., Malešević N., Radulović S., Kovačević N., Antimicrobial, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Young Shoots of the Smoke Tree, *Cotinus coggygria* Scop, *Phytotherapy Research*, 2013, **27**(11), 1658-1663

Matić S., Stanić S., Bogojević D., Vidaković M., Grdović N., Arambašić J., Dinić S., Uskoković A., Poznanović G., Solujić S., Mladenović M., Marković J., Mihailović M., Extract of the Plant *Cotinus coggygria* Scop. Attenuates Pyrogallol-Induced Hepatic Oxidative Stress in Wistar Rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2011, **89**(7), 401-411

Matthew I. R., Browne R. M., Frame J. W., Millar B. G., Tissue Response to a Haemostatic Alginate Wound Dressing in Tooth Extraction Sockets, *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1993, **31**(3), 165-169

McCarthy M. E., Brown T. A., Bukowska J., Bunnell B. A., Frazier T., Wu X., Gimble J. M., Therapeutic Applications for Adipose-Derived Stem Cells in Wound Healing and Tissue Engineering, *Current Stem Cell Reports*, 2018, **4**, 127-137

Medrado A. R. A. P., Pugliese L. S., Reis S. R. A., Andrade Z. A., Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action upon Myofibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003, **32**, 239-244

Merrell J. G., McLaughlin S. W., Tie Lu Laurencin C. T., Chen A. F., Nair L. S., Curcumin-loaded Poly(ε-caprolactone) Nanofibres: Diabetic Wound Dressing with Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology',* 2009, **36**, 1149-1156

Michel M., L'heureux N., Pouliot R., Xu, W., Auger F. A., Germain L., Characterization of a New Tissue-Engineered Human Skin Equivalent with Hair, *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 1999, **35**, 318-326

Moura L. I., F., Dias A. M. A., Carvalho E., de Sousa H. C., Recent Advances on the Development of Wound Dressings for Diabetic Foot Ulcer Treatment- A Review, *Acta Biomaterialia*, 2013, **9**, 7093-7114

Niiyama H, Kuroyanagi Y., Development of Novel Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid and Collagen Sponge Containing Epidermal Growth Factor and Vitamin C Derivative, *J. Artif. Organs*, 2014, **17**, 81-87

Occhetta P., Visone R., Russo L., Cipolla L., Moretti M., Rasponi M., VA-086 Methacrylate Gelatine Photopolymerizable Hydrogels: A Parametric Study for Highly Biocompatible 3D Cell Embedding, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2015, **103A** (6), 2109-2117

Occhetta P., Sadr N., Piraino F., Redaelli A., Moretti M., Rasponi M., Fabrication of 3D Cell-Laden Hydogel Microstructures through Photo-Mold Patterning, *Biofabrication*, 2013, DOI: 10.1088/1758-5082/5/3/035002

Osman A. H., Kamel M. M., Wahdan M. H., Al-gazaly M., Assessment to the Effects of Low Diode Laser on Wound Healing in Diabetic Rats, *Life Science Journal*, 2013, **10**(2), 1313-1320

Özkaynak M. U., C. Atalay-Oral S. B. Tantekin-Ersolmaz F. S. Güner Polyurethane Films for Wound dressing Applications, *Macromolecular Symposia*, 2005, **228**, 177-184

Özuğuz U., Aydın Y., Berker D., Gestasyonel Diyabet: Risk faktörleri, Tanı ve Tedavi, *İç Hastalıkları Dergisi*, 2010, **17**, 71-79

Posten W., Wrone D. A., Dover J. S., Arndt K. A., Silapunt S., Alam M., Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy, *Dermatol. Surg.*, 2005, **31**, 334-340

Rabotyagova O. S., Cebe P., Kaplan D. L., Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation, *Materials Science and Engineering C*, 2008, **28**, 1420-1429

Ross M. H., Pawlina W., Deri Sistemi, Editörler: İnalöz S. S., İnalöz H. S., *Histoloji Konu Anlatımlı ve Atlas*, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 488-525, 2014

Šavikin K., Zdunić G., Janković T., Stanojković T., Juranić Z., Menković N., *In vitro* Cytotoxic and Antioxidative Activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*, *Natural Product Research,* 2009, **23**(18) 1731-1739

Schuurman W., Levett P. A., Pot M. W., Renè van Weeren P., Dhert W. J. A., Hutmacher D. W., Melchels F. P. W., Klein T. J., Malda J., Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs, *Macromolecular Bioscience*, 2013, **13**, 551-561

Shah V., Manekar A., Isolation and Characterization of Collagen from the Placenta of Buffalo (*Bovidae bubalus bubalis*) fort he Biomaterial Applications, *Dama International*, 2012, **1**(4), 26-32

Shi L., Ronfard V., Biochemical and Biomechanical Characterization of Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS): A Mini Review, *Int. J. Burn Trauma*, 2013, **3**(4), 173-179

Singh A., Bajpai S., Singh N., Kumar V., Gour J. K., Singh P. K., Singh R., K., Wound Healing Activity of Standardized Extract of *Curculigo orchioides* in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2014, **4**(1), S48-S53

Takayama T., Taguchi T., Koyama H., Sakari M., Kamimura W., Takato T., Miyata T., Nagawa H., The Growth of a Vascular Network inside a Collagen-Citric Acid Derivative Hydrogel in Rat', *Biomaterials*, 2009, **30**(21), 3580-3587

Tan H., Marra K. G., Injectable, Biodegradable Hydrogel for Tissue Engineering Applications, *Materials*, 2010, **3**, 1746-1767

URL-1: http://www.diabetcemiyeti.org/c/turkiye-de-ve-bolge-ulkelerinde-diyabet -sorunu (Ziyaret tarihi: 14 Ocak 2019)

URL-2: https://www.turkdiab.org/bilgiler.asp?lang=TR&id=63, (Ziyaret tarihi: 14 Ocak 2019)

URL-3: http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=15063, (Ziyaret tarihi: 6 Haziran 2015)

URL-4: https://www.123rf.com/photo_81940465_wig-tree-cotinus-coggygria-scop-with-pink-hairs.html, (Ziyaret tarihi: 14 Ocak 2019)

URL-5:https://www.123rf.com/photo_35647575_smoketree-rhus-cotinus-coggygria-pink-blooming-royal-purple-smoke-bush-flowering-macro-closeup-green.html, (Ziyaret tarihi: 13 Ocak 2019)

URL-6:http://www.zenbio.com/pdf/ZBM%20Human%20Adult%20Dermal %20Fibroblast%20Manual.pdf, (Ziyaret tarihi: 9 Ocak 2019)

Yenigün H., Ener N., Diabetes Mellitus'un Tarihçesi, Editörler: Yenigün M., Altuntaş Y., *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3-6, 2001

Yu W., Naim J. O., Lanzafame J., Effects of Photostimulation on Wound Healing in Diabetic Mice, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1997, **20**, 56-63

Wang T., Peng Y., Shen N., Yu Y., Yao M., Zhu J.,Photochemical Activation Increases the Porcine Corneal Stiffness and Resistance to Collagenase Digestion, *Experimental Eye Research*, 2014, **123**, 97-104

Wedmore I., McManus J., Pusateri A. E., Holcomb J. M., A Special Report on the Chitosan-Based Hemostatic Dressing: Experince in Current Combat Operations, *J. Trauma*, 2006, **60**(3), 655-658

Zeugolis D. I., Paul R. G., Attenburrow G.. Factors Influencing The Properties of Reconstituted Collagen Fibers Prior to Self-Assembly: Animal Species and Collagen Extraction Method, *J Biomed Mater Res* , 2008, **86A,** 892–904

Zhang J., Doll B. A., Beckman E. J., Hollinger J. O., A Biodegradable Polyurethane-Ascorbic Acid Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, **67A**(2), 389-400

Zhao O. X., Sun X., Yildirimer L., Lang Q., Lin Z. Y., Zheng R., Zhang Y., Cui W., Annabi N., Khademhosseini A., Cell Infiltrative Hydrogel Fibrous Scaffolds for Accelerated Wound Healing, *Acta Biomaterialia*, 2017, **49**, 66-77

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Kenar H., **Yilmaz Ozdogan C**., Dumlu C., Doger E., Torun Kose G., Hasirci V., Microfibrous Scaffolds from Poly(L-Lactide-Co-Ɛ-Caprolactone) Blended with Xeno-free Collagen/Hyaluronic Acid for Improvement of Vascularization in Tissue Engineering Applications, *Materials Science&Engineering C*, 2019, **97**, 31-44

Kenar H., **Yılmaz Ozdogan C**., Keskin H, Islek E. E., Doger E., Nalla A., Tarkun I., Nielsen J. H., Kasap M., Effect of Gestational Diabetic Blood Soluble Factors on Beta Cell Function: In vitro Physiological Analysis Combined with Proteomics Approach, *54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*, Berlin, Germany, 1-5 October 2018

Karadenizli S., Şahin D., Kenar H., **Yılmaz Özdoğan C**., Ateş N., Effects of Retigabine on Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Thapsigargin and Tunicamycin in PC12 Cells; A Comparative Study, *Neuroscience 2017*, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017

**Yılmaz Özdoğan C.**, Doger E., Kenar H., Atelocollagen-based Hydrogels for Wound Healing, *22nd International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2017)*, Ankara, Türkiye, 12 - 14 Mayıs 2017

Ozaslan V., Uzuner H., Karadenizli A., **Yilmaz Ozdogan C**., Kenar H., Antibacterial Activity of Ciprofloxacin Loaded Chitosan Microparticles Against *E. coli* and *P. aeruginosa* and Their Cytotoxic Effect on Human Lung Epithelial Cells, *22nd International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2017)*, Ankara, Turkiye, 12 - 14 Mayıs 2017

Wulamujiang A., Doger E., Kara G., **Yilmaz C**., Ozaslan V., Muezzinoglu B., Ozbek B., Canturk Z., Cetinarslan B., Tarkun I, Kenar H., Vascular Complications Associated with Gestational Diabetic Mothers and Their Newborn, *3rd Heidelberg International Symposium on Diabetic Complications 2016*, Heidelberg, Almanya, 06-08 Ekim 2016

Kenar H., **Yılmaz C**., Doğer E., Torun Köse G., Hasırcı V., Development of a Vascularized Stem Cell Based Myocardial Tissue Patch on Microfibrous Polymeric Scaffolds, *21st International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2015)*, Antalya, Turkiye, 22 - 24 Ekim 2015

Kara G., Vural Ç., Bayrak B. Y., **Yilmaz C**., Kenar H., Decellularized Sheep SIS Sponges for Treatment of Diabetic Wounds, *21st International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2015)*, Antalya, Turkiye, 22 - 24 Ekim 2015

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

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İzmit'te doğdu. Orta öğretimini Ankara Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lise'de 2001 yılında tamamladı. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) Bölümü'nü kazandı ve 2006 yılında bu bölümden biyolog olarak mezun oldu. 2007 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2010 yılında uzman biyolog olarak mezun oldu. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktoraya başladı.