

**FOTOSTİMÜLASYONUN 2 VE 3 BOYUTLU *İN VİTRO*  
HİPERGLİSEMİK MODELLERDE İNSAN DERMAL  
FİBROBLAST, KERATİNOSİT VE ENDOTEL  
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF  
PHOTOSTIMULATION ON HUMAN DERMAL  
FIBROBLASTS KERATINOCYTE AND ENDOTHELIAL  
CELLS IN 2D AND 3D *İN VİTRO* HYPERGLYCEMIC  
MODELS**

**SİMGE ÇITAK**

**DOÇ. DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

## ÖZET

### FOTOSTİMÜLASYONUN 2 VE 3 BOYUTLU *İN VİTRO* HİPERGLİSEMİK MODELLERDE İNSAN DERMAL FİBROBLAST, KERATİNOSİT VE ENDOTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

**Simge ÇITAK**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**

**Eylül 2024, 109 sayfa**

Bu çalışma “2-Boyutlu ve 3-Boyutlu *in vitro* Diyabetik Ülser Modellerinde Fotostimülasyonun Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı kapsamlı araştırma projesi (FBA-2022-20162) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışmasında fotostimülasyonun insan dermal fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin diyabetik koşulları taklit eden 2 ve 3 boyutlu *in vitro* hiperglisemik modellerde incelenmesi amaçlanmıştır. Diyabetik hastalarda sıklıkla karşılaşılan kronik yaralar, özellikle hiperglisemi nedeniyle hücresel proliferasyonun ve göçün azalması, yetersiz anjiyogenez, re-epitelizasyon, artan oksidatif stres gibi birçok faktörle ilişkilidir. Bu kapsamda fotostimülasyonun yara iyileşmesindeki hücresel ve moleküler süreçler üzerindeki etkilerinin *in vitro* çalışmalarla araştırılıp diyabetik yara tedavisindeki kullanım potansiyelinin ortaya koyulması hedeflenirken,

tedavi yaklaşımlarının denenebileceği *in vitro* hiperglisemik modellerin geliştirilmesi de hedeflenmiştir.

Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda ilk olarak insan dermal fibroblast (HDF), keratinosit (HS2) ve endotel hücrelerinin (HUVEC) kültürü yapılmıştır. Hücreler farklı glikoz konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan ortamlardaki proliferasyon ve morfoloji özellikleri incelenerek bir hiperglisemik koşul belirlenmiştir. Belirlenen hiperglisemik koşullarda ve normal koşullarda fotostimülasyon uygulaması yapılarak hücrelerin morfoloji, proliferasyon, ECM sentezi, göç ve anjiyogenez üzerindeki etkileri çeşitli analiz yöntemleri ile incelenmiştir. Hücre proliferasyonu MTT analizi, hücre göçü scratch analizi, ECM sentezi immünohistokimyasal analizler, anjiyogenez ise tübül oluşumu ve gen ekspresyonu analizleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra fibroblast ve keratinosit hücreleri ile polikaprolakton (PCL) / kitosan-jelatin doku iskelesi üretilerek 3-boyutlu bir hiperglisemi modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan modelde, fotostimülasyonun yara iyileşmesi üzerine etkisini incelemek üzere 600-1200 nm dalga boyunda, yakın kızılötesi (NIR) polikromatik ışın sağlayan plazma ark ışık kaynağı kullanılarak fotostimülasyon uygulaması yapılmıştır. Bu uygulama karşısında hücre canlılığı, morfolojisi ve ECM yoğunluğu üzerindeki etkisi SEM ve MTT analizleri ile incelenmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen analizler doğrultusunda fotostimülasyonun 2 ve 3-boyutlu modellerde hücresel proliferasyonu, göçü, ECM sentezini ve anjiyogenez sürecinde kritik rolü olan tübül oluşumunu desteklediği görülmüştür. Ayrıca hücrelerin biyolojik yanıtları göz önünde bulundurulduğunda keratinositlerin, fotostimülasyona en duyarlı hücreler olduğu, endotel hücrelerinin ise hiperglisemik koşullardan en çok etkilenen hücreler olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, fotostimülasyonun diyabetik yara tedavisinde potansiyel tedavi yöntemi olarak kullanılabilmesine dair umut vermektedir. Ancak bununla birlikte yapılacak olan yeni analizlerle bu 3-boyutlu hiperglisemik modelin optimize edilmesinin, *in vivo* ve klinik çalışmalar öncesinde önemli bir basamak oluşturacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fotostimülasyon; *in vitro* hiperglisemi modeli; yara iyileşmesi; dermal fibroblast; keratinosit; endotel hücresi; PCL/ kitosan-jelatin

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF PHOTOSTIMULATION ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS KERATINOCYTE AND ENDOTHELIAL CELLS IN 2D AND 3D *IN VITRO* HYPERGLYCEMIC MODELS**

**Simge ÇITAK**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Assoc. Prof. Özer Aylin GÜRPINAR**

**September 2024, 109 pages**

This study is supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) of Hacettepe University as part of the comprehensive research project titled "Investigation of the Effectiveness of Photostimulation in 2-Dimensional and 3-Dimensional *in vitro* Diabetic Ulcer Models" (FBA-2022-20162).

In the present study aims to investigate the biological effects of photostimulation on human dermal fibroblasts, keratinocytes, and endothelial cells in 2D and 3D *in vitro* hyperglycemic models that mimic diabetic conditions. Chronic wounds commonly encountered in diabetic patients are associated with many factors, particularly reduced cellular proliferation and migration due to hyperglycemia, inadequate angiogenesis, re-epithelialization, and increased oxidative stress. In this context, the aim is to investigate the effects of photostimulation on cellular and molecular processes in wound healing

through *in vitro* studies and to reveal its potential use in the treatment of diabetic wounds, while also developing *in vitro* hyperglycemic models where treatment approaches can be tested.

Human dermal fibroblast (HDF), keratinocyte (HS2), and endothelial cells (HUVEC) were cultured initially for *in vitro* cell culture study. A hyperglycemic condition has been determined by examining the proliferation and morphology characteristics of cells in using different glucose concentrations. The effects of photostimulation applied under established hyperglycemic conditions and normal conditions on cell morphology, proliferation, ECM synthesis, migration, and angiogenesis have been investigated using various analytical methods. Cell proliferation was evaluated comparatively through MTT analysis, cell migration through scratch analysis, ECM synthesis through immunocytochemical analyses, and angiogenesis through tube formation and gene expression analyses. Later, a 3-dimensional hyperglycemia model was created by producing a tissue scaffold of polycaprolactone (PCL) / chitosan-gelatin using fibroblast and keratinocyte cells. In the created model, photostimulation was applied using a plasma arc light source that provides polychromatic light in the near-infrared (NIR) wavelength range of 600–1200 nm to investigate the effect of photostimulation on wound healing. The effect of this application on cell viability, morphology, and ECM density has been examined using SEM and MTT analyses.

The analyses conducted in the study revealed that photostimulation supports cellular proliferation, migration, ECM synthesis, and the formation of tubules, which play a critical role in the process of angiogenesis, in both 2D and 3D models. Furthermore, considering the biological responses of the cells, keratinocytes have been identified as the most responsive cells to photostimulation, while endothelial cells are the most affected by hyperglycemic conditions. These results suggest that photostimulation could be used as a potential treatment method in the healing of diabetic wounds. Nonetheless, it is assumed that further refinement of this 3-dimensional hyperglycemic model through additional analyses will represent a crucial preliminary phase prior to advancing to *in vivo* and clinical investigations.

**Keywords:** Photostimulation; *in vitro* hyperglycemia model; wound healing; dermal fibroblasts; keratinocyte; endothelial cells; PCL/ chitosan-gelatin

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca deneyimlerini, bilgilerini esirgemeyen, her koşulda desteğini hissettiren, sorularımı sabırla yanıtlayan güler yüzlü ve kıymetli danışman hocam **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**'a;

Tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü sorunda değerli bilgi birikimleriyle ve tecrübesiyle yol gösteren ve yönlendiren saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na;

Deneysel çalışmalarımda değerli bilgi birikimlerini aktaran, bir sorunla karşılaştığımda her türlü destek ve imkânı bizzat sağlayan, çalışmalarımda büyük katkıları bulunan değerli hocam **Öğr. Gör. Dr. ANIL SERA ÇAKMAK**'a;

Hem akademik tecrübelerini hiç esirgmeden benimle paylaşan, hem de gösterdiği dostluğuyla bana her koşulda destek olarak yardım eden **Arş. Gör. Tülay Selin ERKUT**'a;

Tez çalışmalarının gerçekleşmesi için FBA-2022-20162 proje kodu ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne;

Son olarak, hayatımın her döneminde varlıklarıyla güven veren, sevgilerini hissettiren, her koşulda manevi ve maddi tüm destekleriyle arkamda duran en değerli varlıklarım **Annem, Babam ve Abim**'e;

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Simge ÇITAK

Eylül 2024, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hiperglisemi ve Diyabet.....	3
2.1.1. Hiperglisemi .....	3
2.1.2. Diyabet .....	4
2.2. Yara Oluşumu, İyileşmesi ve Tedavi Yaklaşımları .....	10
2.2.1. Yara Oluşumu ve Mekanizması .....	10
2.2.2. Yara Tipleri .....	10
2.2.3. Yara İyileşme Mekanizması.....	11
2.2.4. Diyabetik Yaralar .....	16
2.2.5. Kronik Yaraların Tedavi Yöntemleri .....	16
2.2.6. Diyabetik Yaralarda Tedavi Çeşitleri.....	17
2.3. Doku Mühendisliği Yaklaşımları .....	19
2.3.1. Biyomalzemelerin Kullanımı .....	19
2.3.2. Yara Örtüleri .....	20
2.3.3. Büyüme Faktörlerinin Kullanımı .....	21
2.3.4. Hücre Terapileri .....	22
2.4. Yara İyileşme Modelleri.....	23
2.4.1. <i>İn Vivo</i> Modeller.....	23
2.4.2. <i>İn Vitro</i> Modeller.....	23

2.5. Doku İskeleleri ve Üretim Yöntemleri .....	25
2.5.1. Elektroğirme Yöntemi.....	27
2.5.2. Dondurarak Kurutma Yöntemi .....	29
2.6. Fotostimülasyon.....	29
2.6.1. Işık Kaynakları.....	30
2.6.2. Fotostimülasyonun Etki Mekanizması.....	31
2.6.3. Fotostimülasyona Karşı Hücrel Cevap .....	32
2.6.4. Fotostimülasyon Parametreleri .....	33
2.6.5. Fotostimülasyonun Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanımı .....	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	36
3.1. Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler .....	36
3.2. İnsan Dermal Fibroblastların, Keratinositlerin ve Endotel Hücrelerinin Kültürü	37
3.3. İki Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları .....	38
3.3.1. Hiperglisemi Koşullarının Belirlenmesi .....	38
3.3.2. Fotostimülasyon Çalışmaları .....	39
3.4. Üç Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları .....	44
3.4.1. Doku İskelelerinin Üretimi .....	45
3.4.2. Hiperglisemik Koşullarının Belirlenmesi .....	46
3.4.3. Fotostimülasyon Çalışmaları .....	47
3.4.4. İstatistiksel Analiz.....	48
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	49
4.1. İki Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları .....	49
4.1.1. Hiperglisemi Koşullarının Belirlenmesi .....	49
4.1.2. Fotostimülasyon Çalışmaları .....	64
4.2. Üç Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları .....	82
4.2.1. Doku İskelelerinin Üretilmesi.....	83
4.2.2. Hiperglisemik Koşullarının Belirlenmesi .....	87
4.2.3. Fotostimülasyon Çalışmaları .....	88
5. YORUM.....	93
6. KAYNAKLAR .....	96
ÖZGEÇMİŞ .....	109

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pankreasın temel anatomik yapısının diyagramı .....	5
Şekil 2.2. Tip 1 ve tip 2 diyabetin patogenezi .....	6
Şekil 2.3. Diyabetik komplikasyonlara yol açan mekanizmalar .....	9
Şekil 2.4. Akut ve kronik yaralardaki patolojik mekanizmalar .....	11
Şekil 2.5. Yara iyileşmesinin hemostaz fazı .....	12
Şekil 2.6. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazı .....	12
Şekil 2.7. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı .....	14
Şekil 2.8. Yara iyileşmesinin yeniden yapılanma fazı .....	15
Şekil 2.9. Yara iyileşmesinde kullanılan yöntemler .....	18
Şekil 2.10. Elektroegirme yönteminin şematik gösterimi .....	27
Şekil 2.11. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi. ....	29
Şekil 2.12. Elektromanyetik spektrum .....	30
Şekil 2.13. Fotostimülasyonun hücreler üzerindeki etkileri .....	32
Şekil 3.1. Collagentex® cihazı ile kurulmuş fotostimülasyon sistemi .....	40
Şekil 4.1. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri. Beyaz oklar yuvarlak morfolojideki hücreleri göstermektedir (Büyütme: 10x). ....	50
Şekil 4.2. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). ....	51
Şekil 4.3. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). ....	52
Şekil 4.4. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). ....	54
Şekil 4.5. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). ....	55

Şekil 4.6. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).....	56
Şekil 4.7. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).....	57
Şekil 4.8. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).....	58
Şekil 4.9. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).....	59
Şekil 4.10. HS2 hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (* $p<0.05$ , ** $p<0.01$ , *** $p<0.001$ , **** $p<0.0001$ , $n=6$ ).....	60
Şekil 4.11. HDF hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (* $p<0.05$ , ** $p<0.01$ , *** $p<0.001$ , **** $p<0.0001$ , $n=6$ ). .....	62
Şekil 4.12. HUVEC hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24,48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (* $p<0.05$ , ** $p<0.01$ , *** $p<0.001$ , **** $p<0.0001$ , $n=6$ ). .....	63
Şekil 4.13. 2-boyutlu hiperglisemik modellerde fotostimülasyonun HS2 hücrelerine ait MTT analizi grafiği (* $p<0.05$ , ** $p<0.01$ , *** $p<0.001$ , **** $p<0.0001$ , $n=3$ ). Fotostimülasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplar “(+) ve (-)” olarak belirtilmektedir.....	65
Şekil 4.14. 2-boyutlu hiperglisemik modellerde fotostimülasyonun HDF hücrelerine ait MTT analizi grafiği (* $p<0.05$ , ** $p<0.01$ , *** $p<0.001$ , **** $p<0.0001$ , $n=3$ ). Fotostimülasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplar “(+) ve (-)” olarak belirtilmektedir.....	66

- Şekil 4.15. HDF hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar DMEM-LG (+), DMEM-HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla DMEM-LG (-), DMEM-LG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x).....68
- Şekil 4.16. HDF hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar 125 mM (+), 150 mM (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla 125 mM (-), 150 mM (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x).....69
- Şekil 4.17. HS2 hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), 125 mM (+), 150 mM (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), 125 mM (-), 150 mM (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x). .....70
- Şekil 4.18. HDF hücrelerine ait fibronektin/DAPI boyamalarının Floresan mikroskop görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), HG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 10x). .....72
- Şekil 4.19. HDF hücrelerine ait kolajen/DAPI boyamalarının Floresan mikroskop görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), HG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 10x). .....73
- Şekil 4.20. Fotostimülasyon uygulaması yapılmayan HDF hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). .....75
- Şekil 4.21. Fotostimülasyon uygulaması yapılan HDF hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). .....75
- Şekil 4.22. Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HDF hücrelerine ait yüzde hücre göç grafiği, a) fotostimülasyon uygulanan, b) fotostimülasyon uygulanmayan hücreler. ....76
- Şekil 4.23. Fotostimülasyon uygulaması yapılmayan HS2 hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). .....77
- Şekil 4.24. Fotostimülasyon uygulaması yapılan HS2 hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x). .....77
- Şekil 4.25. Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HS2 hücrelerine ait yüzde hücre göç grafiği, a) fotostimülasyon uygulanan, b) fotostimülasyon uygulanmayan hücreler. ....78

Şekil 4.26. Hiperglisemik ortam koşullarında kültürlenmiş ve fotostimülasyon uygulanan HUVEC hücrelerindeki tübül oluşumu ait inverted mikroskop görüntüleri (Bar: 100 µm).....	79
Şekil 4.27. Fotostimülasyon varlığında normal ve hiperglisemik koşullardaki HUVEC hücrelerinin PDGF ve VEGF gen ekspresyonu seviyeleri. ....	81
Şekil 4.28. Elektroçirgeme yöntemi ile üretilmiş olan PCL doku iskelelerinin a) makroskobik görüntüsü b) mikroskobik görüntüsü. ....	84
Şekil 4.29. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiş olan PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin makroskobik görüntüsü. ....	86
Şekil 4.30. İki katmanlı doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanına ait MTT grafiği. ....	87
Şekil 4.31. İki katmanlı doku iskelelerinin PCL katmanına ait MTT grafiği.....	88
Şekil 4.32. İki katmanlı doku iskelelerinin PCL katmanı üzerindeki HS2 hücrelerine ait SEM görüntüleri .....	89
Şekil 4.33. İki katmanlı doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanı üzerindeki HDF hücrelerine ait SEM görüntüleri. ....	90
Şekil 4.34. İki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerindeki hücrelere ait MTT analizi (* $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , $n=3$ ). ....	91

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri.....	25
Çizelge 2.2. Elektroğırme yönteminde kullanılan parametreler ve fiberler üzerindeki etkileri. ....	28
Çizelge 2.3. Fotostimölasyon uygulamalarında kullanılan parametreler ve açıklamaları. ....	34
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler. ....	36
Çizelge 4.1. Tek katmanlı kitosan-jelatin ve iki katmanlı PCL/ kitosan-jelatin iskelelerinin doku iskelelerine ait karakterizasyon sonuçları. ....	86



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
Hz	Frekans
J	Joule
kV	Kilovolt
nm	Nanometre
v/v	Hacim/hacim oranı
W	Watt
w/v	Kütle/hacim oranı
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

### Kısaltmalar

ADSC	Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Sığır Serum Albumini
CIA	Kolajenle İndüklenen Artrit
COOH	Karboksil Grubu
Cox	Sitokrom C Oksidaz
DAG	Diasilgliserol
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol

DC	Doğru Akım
DFU	Diyabetik Ayak Ülseri
DKA	Diyabetik Ketoasidoz
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DMEM/F12	Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı/Besin karışımı F12
DMEM-HG	Yüksek Glikozlu Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DMEM-LG	Düşük Glikozlu Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco Fosfat Tamponu Çözeltisi
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid Hidroklorür
FBS	Fetal Sığır Serumı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HDF	İnsan Dermal Fibroblast
HFIP	Hekzafloroizopropanol
HHS	Hiperosmolar Hiperglisemik Durum
HIF1	Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1
HMDS	Hekzametildisilazan
HS2	İnsan Dermal Keratinosit
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri
IL	İnterlökin
IPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
LED	Işık Yayan Diyot

LLLT	Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi
MMP	Metalloproteazlar
mRNA	Mesajcı RNA
MSC	Mezenkimal Kök Hücreler
MTT	3(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2-5-Dinefiltetrazolyum Bromür
NH <sub>2</sub>	Amino Grubu
NHS	N-Hidroksi Süksinimid
NO	Nitrik Oksit
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2
PAC	Plazma Ark
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PKC	Protein Kinaz C
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PRP	Plateletçe Zengin Plazma
PU	Poliüretan



# 1. GİRİŞ

Hiperglisemi ve diyabet dünya genelinde hızla artmakta olan halk sağlığı sorunları arasında yer almaktadır [1]. Hiperglisemi, diyabetle ilişkili olarak morbidite ve mortaliteyi artıran birçok ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. Hiperglisemi, kandaki glikoz seviyesinin normalin üzerinde olması durumudur ve genellikle pankreastan yetersiz insülin salgılanması veya insülinin etkin şekilde kullanılamamasına bağlı olarak gelişmektedir [2, 3]. Normal koşullarda pankreastan salgılanan insülin ve glukagon hormonlarının birbirine zıt ancak dengeli çalışma mekanizmaları sayesinde glikoz homeostazı sağlanmaktadır. Ancak diyabet gibi durumlarda bu mekanizmanın bozulması sonucu glikozun hücrelere taşınımı gerçekleşemez ve glikozun kanda birikmesine yol açar. Hiperglisemi ile karakterize olan diyabet, vücudun yeterli insülini üretememesi veya insülini etkin bir şekilde kullanamaması sonucunda ortaya çıkan kronik bir metabolik hastalıktır [4, 5]. Diyabetin patogenezine ve klinik özelliklerine göre tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabet gibi farklı tipleri mevcuttur. Otoimmün bozukluk olarak kabul edilen tip 1 diyabet, bağışıklık hücrelerinin pankreastaki beta hücrelerine saldırması sonucu insülin üretilmemesi sonucu gelişmektedir [6]. Tip 2 diyabet ise insülin direnci ve beta hücrelerinin disfonksiyonuna bağlı olarak gelişmektedir [7]. Her iki diyabet tipi de kontrol altına alınmadığında birçok komplikasyona neden olmaktadır. Diyabetin en yaygın komplikasyonlarından biri ise karmaşık patofizyolojik mekanizmalar içeren, ilerleyen evrelerinde uzuv kayıplarına dahi yol açan diyabetik yaralardır. Sağlıklı bireylerde yara iyileşme süreci, birbirini takip eden hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma fazlarından oluşmaktadır. Diyabetik hastalarda ise bu süreçte uzamış inflamatuvar yanıt, yetersiz re-epitelizasyon ve ekstraselüler matriks (ECM) sentezi, zayıf anjiyogenez görülmektedir [8]. Oluşan diyabetik yaraların tedavilerinde yara debridmanı, hiperbarik oksijen tedavisi, negatif basınçlı yara tedavisi ve yara örtüleri gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler geçici rahatlama sağlasa da genellikle iyileşme tam olarak gerçekleşmektedir [9]. Bu nedenle diyabetik yaraların tedavisi için geleneksel yöntemlere alternatif olacak yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yaklaşımlardan biri fotostimülasyon veya diğer adlandırma şekilleriyle fotobiyomodülasyon, düşük seviyeli lazer tedavisi (LLLT) veya fototerapidir. Günümüzde fotostimülasyon, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, ağrı tedavilerinde, diş hekimliğinde, dermatolojik hastalıklarda uygulanabilmektedir [10].

İlk kez Mester tarafından uygulanan bu yöntem, çeşitli ışık kaynaklarından elde edilen ve belirli dalga boylarındaki ışık enerjisinin kullanılarak biyolojik süreçlerin uyarılması prensibine dayanmaktadır [11]. Fotostimülasyonun etki mekanizması, ışık enerjisinin hücrelerde bulunan kromoforlar aracılığıyla algılanması ile başlamaktadır. Özellikle mitokondride bulunan sitokrom c oksidaz, kırmızı ve yakın kızılötesi ışık dalga boylarını absorbe eden hücrelerde nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini tetikleyen birincil fotoreseptörlerdendir. Bu reseptör tarafından ışığın absorbe edilmesi ile ATP, NO sentezi artmaktadır ve membran geçirgenliği tetiklenmektedir. Buna bağlı olarak ikincil haberciler aktive olup hücre içi sinyal mekanizmaları harekete geçmektedir [12].

Fotostimülasyonda LED (Işık Yayan Diyot), lazer ve plazma ark gibi ışık kaynakları kullanılarak hücresel düzeyde biyolojik süreçlerin modüle edilmesi sağlanmaktadır. Hücre proliferasyonunu, göçünü, anjiyogenezi, kolajen sentezini ve ECM üretimini artırarak iyileşme sürecinde rol oynayan biyolojik aktiviteleri teşvik ettiği bildirilmektedir [13].

Bu doğrultuda gerçekleştirilen tez çalışmasında, fotostimülasyonun 2 ve 3-boyutlu *in vitro* hiperglisemik modellerde insan dermal fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri üzerindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Genel olarak literatürde fotostimülasyonun *in vitro* ve *in vivo* yara iyileşme modelleri üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, tek bir dalga boyu ile yani monokromatik ışık kaynaklarının kullanımı ile gerçekleştirilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında “optik pencere” olarak bilinen aralıkta yani 600-1200 nm dalga boylarında ışıma veren polikromatik bir ışık kaynağı kullanılmıştır. Tedavi edici etkisi bilinen tüm dalga boylarının bir arada sunulması ile daha etkin ve güvenli bir penetrasyon sağlanmaktadır. Ayrıca literatürde henüz deneysel model olarak kullanılacak 3-boyutlu bir hiperglisemik model bulunmadığından çalışmamızda fibroblast ve keratinosit hücrelerini içeren iki katmanlı biyomimetrik PCL / kitosan-jelatin doku iskelesi oluşturularak literatüre katkıda bulunmaktadır. Fotostimülasyonun normal ve hiperglisemik koşullardaki hücresel etkilerinin, oluşturmuş olduğumuz 2 ve 3-boyutlu modeller üzerinde incelenmesi ile yenilikçi tedavi yaklaşımının geliştirilmesine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hiperglisemi ve Diyabet

Diyabet, insülin üretimindeki yetersiz veya insülin direncinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilmektedir. Diyabet ile ilişkili olarak hiperglisemi, hastalığın seyrini olumsuz yönde etkileyen, morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde arttıran akut veya kronik komplikasyonlara yol açabilmektedir.

#### 2.1.1. Hiperglisemi

Hiperglisemi, kandaki glikozun yüksek seviyelerde seyretmesi durumu olarak tanımlanmaktadır [2]. Kandaki glikoz homeostazı pankreas tarafından salgılanan insülin ve glukagon hormonlarının birbirine zıt ancak dengeli etkileri sayesinde sağlanmaktadır. Glukagon, uyku esnasında veya öğünler arasındaki periyotta kan şekerinin düşmesi ile pankrastaki alfa hücreleri tarafından salgılanmaktadır ve karaciğerde glikojenin glikoza dönüştürülmesini sağlamaktadır. İnsülin ise beta hücreleri tarafından öğün sonrasında yükselen glikoz seviyeleri ile tetiklenmektedir. Ayrıca kas ve yağ gibi dokulardaki reseptörlere bağlanarak glikozun dokulara taşınmasını sağlamaktadır. Buna bağlı olarak da kan dolaşımındaki glikoz seviyesini azaltmaktadır [3]. Ancak kandaki glikoz homeostazı, insülin hormonunun yetersizliği ya da insülinini etkin şekilde vücutta kullanılmaması yani insülin direnci oluşumu ile bozulabilmektedir. Buna bağlı olarak glikozun hücrelere taşınmaması ve kan dolaşımında glikoz birikimi gerçekleşmektedir. Uzun süreli yüksek kan şekeri seviyeleri ise pankreas ve karaciğerde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu süreç pankreasın daha fazla insülin üretmesine yol açmaktadır. Ancak bir süre sonra pankreas insülin talebine yanıt veremeyecek duruma gelmektedir. Bu durum insülin seviyesinin düşmesine ve hipergliseminin kronik hale gelmesine yol açmaktadır. Karaciğerde ise glikojenin glikoza dönüştürülmesi yani glikojenoliz ve karbonhidrat dışı glikoz üretiminin (glikoneogenez) kontrolsüz bir biçimde artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bu da bir kısır döngüye neden olarak kan şekerinin daha fazla yükselmesine neden olmaktadır [17].

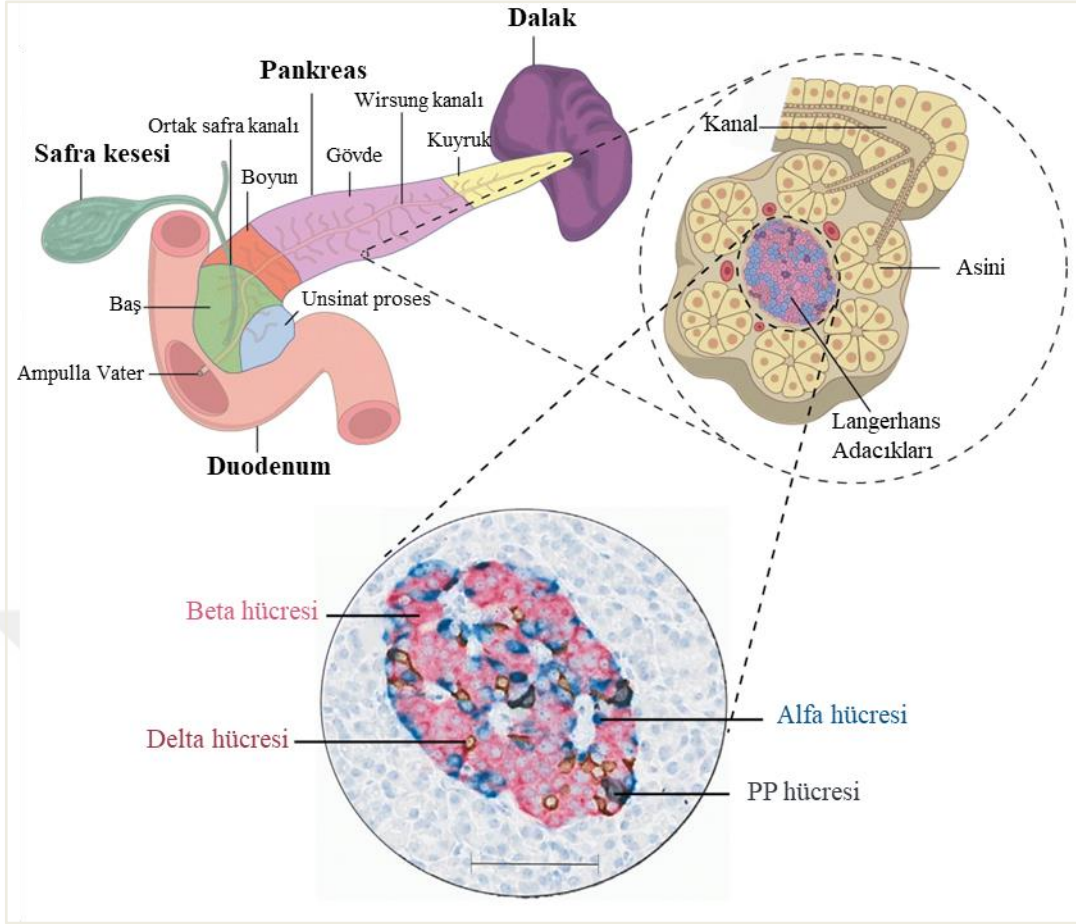
Hiperglisemi, ciddi akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilmektedir. Akut komplikasyonlardan diyabetik ketoasidoz (DKA) ve hiperosmolar hiperglisemik durum (HHS), yetersiz insülin veya glukagon, kortizol, büyüme hormonu gibi karşı-düzenleyici hormonların fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Kronik komplikasyonların başında ise vasküler komplikasyonlar gelmektedir [18, 19]. Kronik hiperglisemi, özellikle kılcal

damar endotel hücrelerinde hasara yol açabilmektedir. Buna bağlı olarak ilgili organın damar yapısının zarar görmesine ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır [20]. Bu komplikasyonlar poliol yolu, heksozamin yolu, diasilgliserol (DAG)-protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonu, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), oksidatif stres, büyüme faktörü ve sitokinlerin artışı içeren çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar ise diyabetin hiperglisemiye bağlı komplikasyonlarını oluşturmaktadır [19, 21].

### **2.1.2. Diyabet**

Diyabet, insülin yokluğu, eksikliği veya direncinden kaynaklanan kronik bir metabolik hastalıktır [4]. Diyabet ile ilgili ulusal ve elektronik kayıtlardan elde edilen verilere göre 21. yüzyılın en hızlı ilerleyen sağlık sorunu olduğu görülmüştür. Diyabet hastası sayının 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 783 milyona ulaşması öngörülmektedir [4]. Tüm dünyada yüksek prevalansa sahip diyabetin ülkemizde de görülme sıklığı hızla artış göstermektedir ve bu durum genellikle yağ oranı ve glisemik indeksi yüksek gıdaların tüketimindeki artış, daha hareketsiz yaşam tarzı ve farklı stres kaynakları ile ilişkilendirilmektedir [22].

Diyabet, vücuttaki insülin üretiminin yetersizliği veya insüline doğru şekilde yanıt verememesinden kaynaklanmaktadır. İnsülin üretimi ise pankreas tarafından gerçekleştirildiğinden dolayı diyabetin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Pankreas endokrin ve ekzokrin fonksiyonlarına sahip karmaşık bir yapıya sahiptir. Ekzokrin, asiner hücrelerden oluşan protein, yağ ve karbonhidratların sindiriminde rol oynayan enzimlerin salgılandığı bölümdür. Pankreasın endokrin kısmı ise, Langerhans adacıkları olarak adlandırılan hücre gruplarından oluşmaktadır. Langerhans adacıklarında temel olarak alfa, beta, delta ve PP hücreleri yer bulunmaktadır. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri somatostatin ve PP hücreleri ise pankreatik polipeptid salgılamasından sorumludur [23].



Şekil 2.1. Pankreasın temel anatomik yapısının diyagramı [23].

Endokrin pankreas, glukagon ve insülin gibi enerji metabolizmasının kontrolünü sağlayan temel hormonların salınımı nedeniyle önemlidir. Ayrıca alfa hücrelerinden salgılanan glukagon ve beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonlarının salınımı diyabet tiplerine göre önemli rol oynamaktadır.

### 2.1.2.1. Diyabet Tipleri

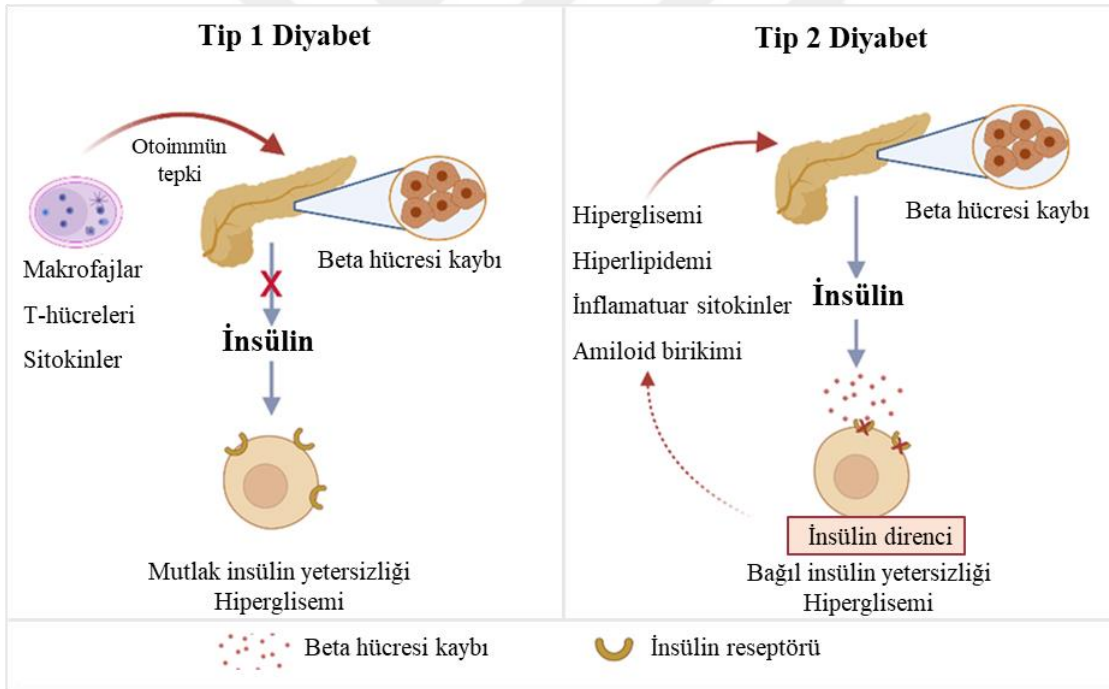
Diyabetin sınıflandırılması farklı tedavi yöntemlerinin uygulanması açısından oldukça önemli olmakla beraber pek çok hasta için tek bir sınıf belirlemek kolay olmamaktadır. 1997 yılında Amerikan Diyabet Derneğinin yapmış olduğu diyabet sınıflandırılması günümüzde kabul görmeye devam etmektedir [24]. Yapılan bu sınıflandırma çalışmasına göre diyabeti Tip 1, Tip 2, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik tipler olmak üzere dört gruba ayırmak mümkündür [24].

**Tip 1**, insülin üretiminin yetersiz olduğu durumlarda oluşan otoimmün bir diyabet türüdür. Diyabet hastalarının %5-10'u bu tip diyabet sınıfına dahildir. Genellikle genç yaşlarda görülmesiyle beraber pankreastaki beta hücrelerinin hücresel aracılı otoimmün

yıkımından kaynaklanmaktadır. Beta hücreleri tarafından yetersiz insülin salgılanması ile hiperglisemi gelişmektedir. Hiperglisemiye bağlı olarak ise hücrelerde bozulmuş metabolik koşullar oluşturur ve bu da mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara neden olmaktadır [6].

Beta hücrelerinin yıkımı bebek ve çocuklarda oldukça hızlı olup yetişkinlerde daha yavaştır. Özellikle genç hastalarda hastalığın ilk belirtisi olarak ketoasidoz ortaya çıkmaktadır. Yetişkinlerde beta hücreleri fonksiyonunu uzun süre koruyabildiğinden dolayı ketoasidoz oluşumunu önleyebilmektedir. Ancak bu hastalar da insülin bağımlı hale gelmektedir ve ketoasidoz riski mevcuttur [25].

Tip 1 diyabette genetik yatkınlık önemli bir etmen olmakla beraber birçok çevresel faktör de sebep olabilmektedir. Çeşitli viral faktörler, D vitamini düşüklüğü, çocukluk enfeksiyonlarının azalmasına bağlı olarak otoimmün hastalıkların artması, obezite gibi nedenler insülin direncinin artmasına sebep olur [24].



Şekil 2.2. Tip 1 ve tip 2 diyabetin patogenezi [26].

**Tip 2**, çok daha yaygın bir diyabet tipi olup temelinde iki metabolik bozukluktan kaynaklanmaktadır. Bunlardan biri iskelet kası, karaciğer ve yağ hücrelerinde insülin direncinin oluşmasıdır. Diğerisi ise pankreastaki beta hücrelerinden salgılanan insülin miktarının azalmasıdır. İnsülin direnci, tip 2 diyabetin erken evrelerinde iken insülin salınımının artması ile telafi edilebilmektedir. Ancak pankreasın insülin salgılama

kapasitesi azaldığında ve buna bağlı olarak insülin direncini yenemediğinde hiperglisemi ortaya çıkmaktadır [7].  $\beta$  hücrelerinin disfonksiyonunda ise insülin salgılanması yetersiz hale gelerek glikoz dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Her iki durumda da hiperglisemi oluşumu giderek artmaktadır ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır.

Hiperglisemi, mitokondrilerin aşırı ROS üretmesine sebep olmakta ve diyabetik komplikasyonların oluşumuna yol açmaktadır. Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresin yol açtığı hasar ise yalnızca erken dönemde glisemik kontrol ile önlenabilmektedir. Glisemik kontrol uzun süre boyunca sağlanamazsa hasarın geri dönüşü oldukça zordur.

Genellikle genetik yatkınlık, daha hareketsiz yaşam şekli ve sağlıksız beslenme gibi faktörler, tip 2 diyabetin temel unsuru olan insülin direncinin oluşumuna yol açmaktadır. Sağlıksız yaşam şekli ve obezitenin artışıyla birlikte özellikle genç ve çocuklarda tip 2 diyabetin görülme sıklığının artışıdaki temel etkenlerdendir [27].

**Gestasyonel diyabet**, gebelik sırasında başlayan ve genellikle ilk defa gebelik esnasında fark edilen farklı derecelerdeki glikoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Obezite, polikistik over sendromu, annenin yaşı, ailede diyabet geçmişinin olması ve hareketsiz yaşam gestasyonel diyabetin en önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır [24].

**Diğer spesifik tipler**, kan şekerinin farklı sebeplere bağlı olarak yüksekliğini tanımlayan diyabet sınıfını tanımlamaktadır. Pankreastaki beta hücrelerinin genetik kusurlarından kaynaklanan fonksiyon bozukluğuna bağlı monojenik diyabet, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaçlar veya bazı kimyasalların neden olduğu diyabet türleri olarak alt gruplara ayrılmaktadır [24].

### **2.1.2.2. Diyabetik Komplikasyonlar**

Diyabetik komplikasyonlar genel olarak akut ve kronik olarak ikiye ayrılmaktadır. Akut komplikasyonlar ketoasidoz, hipoglisemi, hiperglisemik hiperosmolar nonketotik sendrom olarak görülmektedir.

Ketoasidoz, genellikle tip 1 diyabet hastalarında görülmektedir. İnsülin yetersizliğine bağlı olarak hücrelerin glikozu kullanamadığı durumlarda yağları parçalayarak keton adı verilen asidik maddeleri üretmesi ile oluşan ve acil tıbbi müdahale gerektiren bir durumdur [28]. Hipoglisemi, kanda şekerin normalin yani ortalama 70 mg/dl'nin altına düşmesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu komplikasyon, özellikle insülin

enjeksiyonu, oral antidiyabetik ilaç kullanan diyabetli hastalarda yaygın görülen acil bir sağlık sorundur [29]. Hiperglisemik hiperosmolar nonketotik sendrom, genellikle tip 2 diyabet hastalarında görülmektedir. Kan şekerinin ciddi derece yüksek olduğu durumda yani 600 mg/dL'nin üzerine çıktığı ancak ketoasidozun gelişmediği ve acil müdahale gerektiren bir durumdur [30].

Kronik komplikasyonlar, vasküler ve vasküler olmayan komplikasyonlar olarak ayrı incelenmektedir. Vasküler komplikasyonlar ise mikrovasküler ve makrovasküler, yani büyük ve küçük kan damarlarında oluşan uzun süreli hasarlara bağlı olarak iki ana başlık altında kategorize edilebilmektedir.

### **Vasküler Olmayan Komplikasyonlar**

Diyabete bağlı vasküler olmayan kronik komplikasyonlarda işitme kaybı, enfeksiyon, ciltte değişiklikler ve gastroparezi gibi sorunlar yer almaktadır [31].

Diyabette işitme kaybı veya işitme duyusunda azalma, yüksek glikoz seviyelerinin iç kulaktaki sinir hücrelerine zarar vermesiyle gerçekleşmektedir [32].

Enfeksiyonlar, diyabetin bağışıklık disfonksiyonuna neden olması ile vücudun savunmasız hale gelmesine neden olmaktadır ve yüksek kan şekeri de bakteri ve mantarların üremesi için uygun ortam yaratmaktadır [33].

Cilt değişiklikleri, diyabetli hastalarda genellikle uzun süreli hiperglisemi, hiperlipidemi ve bunların sonucunda gelişen metabolik bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Diyabetli hastalarda ciltte görülen değişiklikler, kserozis (kuru cilt), diyabetik ayak, diyabetik dermopati olarak görülmektedir [34].

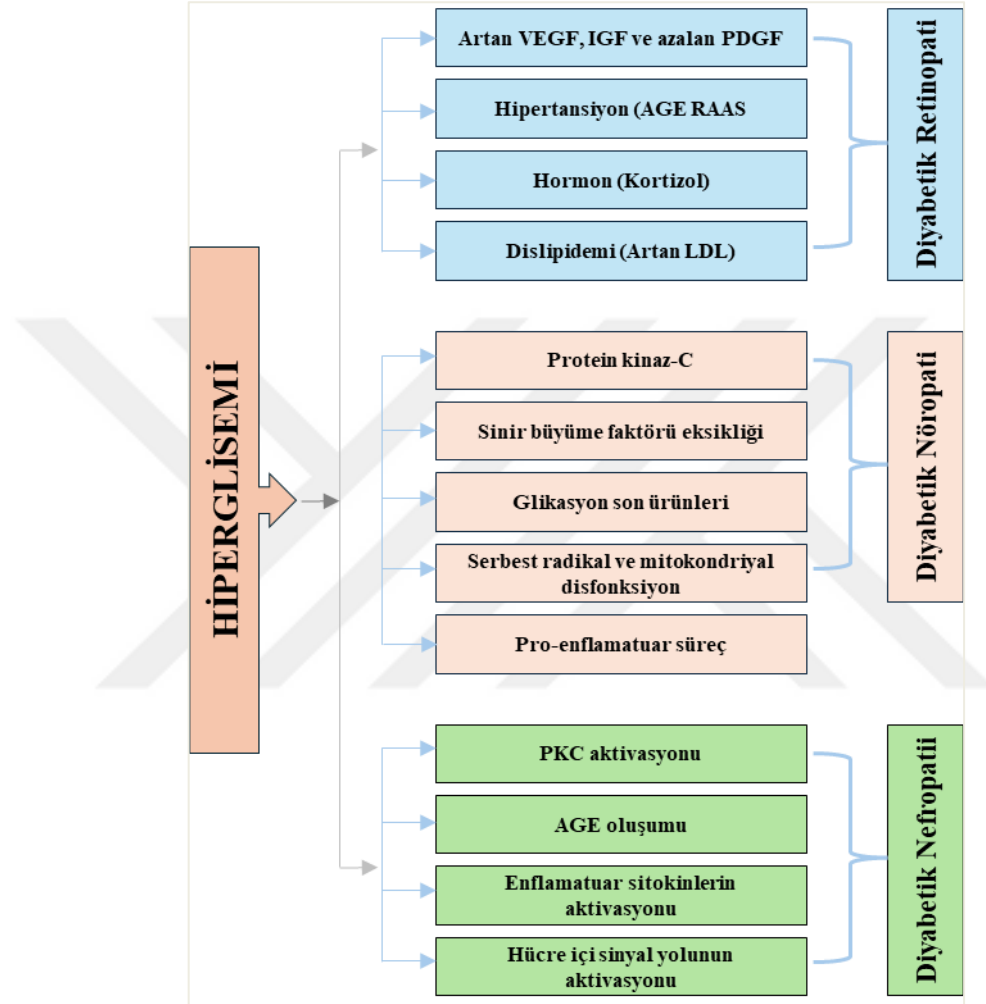
Gastroparezi ise kontrolsüz diyabetin neden olduğu, mekanik bir engel olmaksızın midenin boşalmasının gecikmesi ile karakterize olan bir komplikasyondur. Gastroparezinin patofizyolojisi karmaşık olmakla beraber, hiperglisemi, otonom nöropati ve hormonal değişiklikler gibi faktörleri içermektedir [35].

### **Vasküler Komplikasyonlar**

#### ***Mikrovasküler Komplikasyonlar***

Mikrovasküler komplikasyonlarda büyük oranda göz, böbrek ve sinirleri hedef almaktadır. Hiperglisemi kaynaklı hasarlar koroner ve serebrovasküler arterler gibi makrovasküler sistemlerde ölüm nedenlerinin başında gelmesine rağmen, böbrek, göz ve sinirlerdeki mikrovasküler hasar çok daha yaygındır. Ayrıca mikrovasküler sistemdeki

hiperglisemi kaynaklı hasarlar da mortalite üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır [36]. Mikrovasküler sistemde genellikle diyabetik böbrek hastalıkları, diyabetik retinopati, diyabetik nöropati gibi komplikasyonlar görülmektedir ve bu komplikasyonların oluşumu farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir [20]. Diyabete bağlı komplikasyonların belirli mekanizmaları Şekil 2.3’de şematize edilmektedir.



Şekil 2.3. Dişabetik komplikasyonlara yol açan mekanizmalar [20].

### ***Makrovasküler Komplikasyonlar***

Makrovasküler sistemde daha çok koroner kalp hastalıkları, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, felç gibi komplikasyonlar görülmektedir [37].

Diyabetin en yaygın komplikasyonlarından biri de dişabetik yaralardır. Özellikle dişabetik ayak ülserleri, karmaşık patofizyolojik mekanizmalar içermektedir ve ilerleyen evrelerinde uzuv kayıplarına yol açmaktadır. Ayaklarda oluşan çatlak ve yarıklar enfeksiyon sebebiyle alttaki doku ve kemiğe ilerlemeye devam ederek daha derin

ülserlere dönüşmeye başlamaktadır. Ancak genellikle bu enfeksiyonlu yara ve ağrılar diyabete bağlı olarak oluşan duyuşsal nöropati nedeniyle başlangıçta fark edilmemektedir. İyileşmesi yavaşlayan yaralar, enfeksiyonun yayılması nedeniyle çoğunlukla amputasyon gerektiren komplikasyonları da beraberinde getirmektedir [12]. Ülser oluşumuyla beraber 3-5 yıl içerisinde tekrarlama oranı % 65, yaşam boyu alt ekstremite amputasyonu riski %20 ve sonrasındaki 5 yıl içerisinde mortalite riski % 50-70 arasındadır [38].

## **2.2. Yara Oluşumu, İyileşmesi ve Tedavi Yaklaşımları**

### **2.2.1. Yara Oluşumu ve Mekanizması**

Yara, deride ya da başka bir dokuda meydana gelen basit veya önemli derecede yırtılmalara bağlı olarak fizyolojik yapı hasarı ve fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Oluşan hasar, çevresinde bulunan kas, sinir, atardamar, tendon gibi dokuları da etkileyebilmektedir [39]. Yaralar genellikle, oluşum biçimleri, iyileşme süresi, lokalizasyonu ve derinliğine bağlı olarak akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir [40].

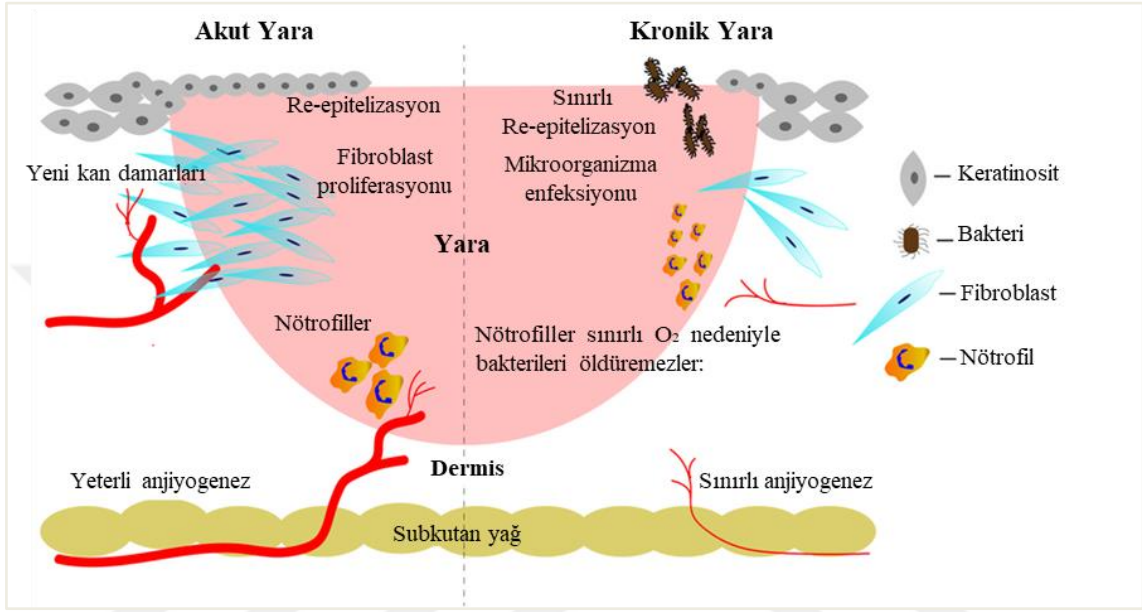
### **2.2.2. Yara Tipleri**

**Akut yaralar**, genellikle çeşitli moleküler mekanizmalar ile bütünlüğün geri kazanılması şeklinde sonuçlanırken kronik yaralarda bu süreç, enfeksiyon, nekroz oluşumunu içerir ve bu yaralarda tamamen iyileşme sağlanamamaktadır [41]. Akut yaralar genelde cerrahi işlemler, travmatik olaylar veya yanık gibi durumlar sonrasında oluşmaktadır ve yaklaşık olarak 8-12 hafta arasında iyileşme tamamlanmaktadır. Bu tip yaraların iyileşme sürecinde hücrel ve moleküler düzeydeki yanıtlar koordineli haldedir [40, 42]. İyileşme, yara bölgesinden salınan sitokin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Akut yaralar, normal iyileşme fazlarını doğrusal bir ilişki ile sonuna kadar takip ederken kronik yaralarda bu fazlar arasında bir düzen bulunmamaktadır. Yani yaranın farklı bölümlerinde farklı bir faz süreci gerçekleşebilmektedir [43].

**Kronik yaralar**, genellikle 12 haftadan uzun süren ancak yine de tam anlamıyla iyileşme göstermeyen yaralardır ve bu tip yaraların iyileşme süreci enfeksiyonlar, yetersiz damarlanma ve diyabet gibi iyileşmeyi engelleyen etmenler sebebiyle gecikmektedir [42, 44].

Yara oluşumundan sonra dokunun tekrar onarımı ve fonksiyonlarının doğru şekilde sağlanması için hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma süreçleri

gerçekleşmektedir. Bu süreçteki aşamaların düzenli ve doğru bir şekilde gerçekleşmesi ile iyileşme sağlanabilmektedir. Ancak bu aşamaların koordineli olarak sağlanamaması yaranın iyileşme sürecinde uzamaya ve buna bağlı olarak kronik yaralara neden olmaktadır. Kronik yaralarda yineleyen enfeksiyon, doku nekrozu, anjiyogenezde azalma, yetersiz reepitelizasyon ve aşırı ROS üretimi ortak olarak görülen sorunlardır [41, 44]



Şekil 2.4. Akut ve kronik yaralardaki patolojik mekanizmalar [45].

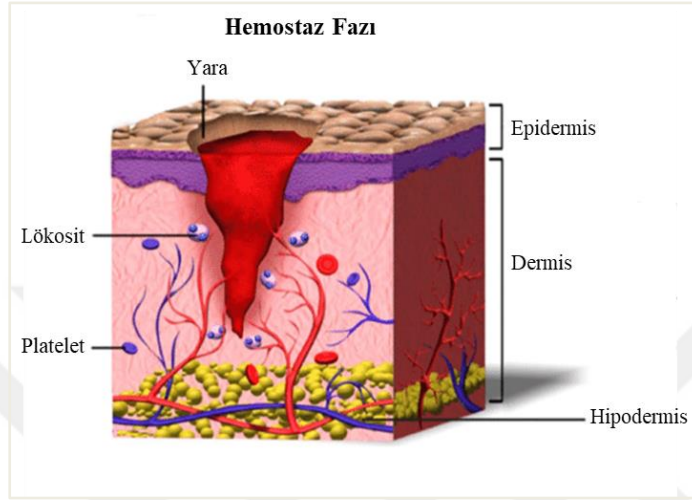
Genel olarak hem akut hem kronik yaralar için iyileşme aşamaları aynı aşamaları içermektedir ancak bu süreçlerin işleyişinde belirgin farklar bulunmaktadır. Akut yaralardaki iyileşme süreci sorunsuz ve düzenli işlediğinden doku onarımı hızlıca gerçekleşmektedir. Buna karşılık kronik yaraların iyileşme mekanizması çok daha kompleksdir ve iyileşme süreci komplikasyonlar ve gecikmeler ile karakterizedir [46].

### 2.2.3. Yara İyileşme Mekanizması

Yaralanma sonrasında cilt bütünlüğünün tekrar kazanılması ve fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için bir yara iyileşmesi süreci başlamaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde başta keratinosit, fibroblast, endotel hücreleri, periferik kan mononükleer hücreleri, ekstraselüler matris, büyüme faktörleri, sitokinler ve birçok düzenleyici molekül önemli bir rol oynamaktadır [47]. Yara iyileşme süreci temel olarak hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma fazlarını içermektedir.

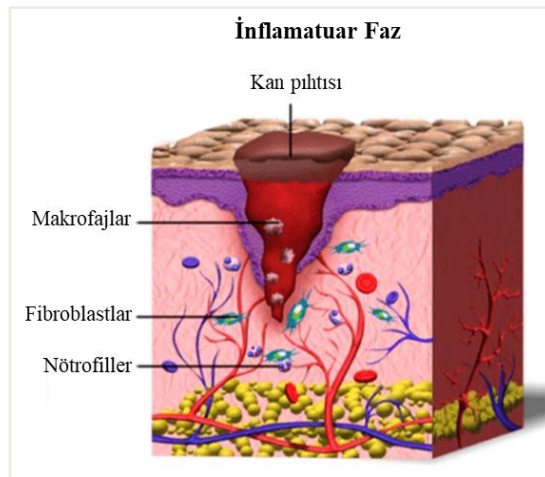
## A) Hemostaz ve İnflamatuar Faz

**Hemostaz fazında**, yara oluşumunun hemen sonrasında trombositler, yara çevresinde toplanarak pıhtılaşmayı başlatmak üzere aktive olur ve yara iyileşmesinin ilk adımı olarak kanamanın durdurulması sağlanır [46, 47].



Şekil 2.5. Yara iyileşmesinin hemostaz fazı [44].

**İnflamatuar fazda**, temel olarak yaranın enfeksiyondan ve hücre kalıntılarında temizlenmesi amacıyla nötrofiller ve proinflamatuar makrofajlar yara bölgesine göç eder ve iyileşme sürecini düzenler [41].



Şekil 2.6. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazı [44].

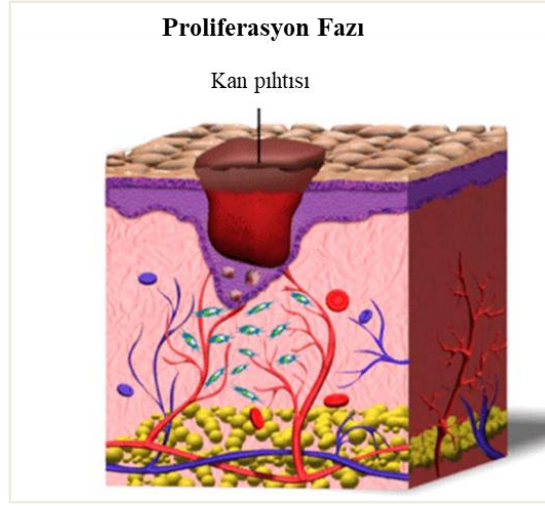
Anti-inflamatuar yanıtta, yaranın çevresinde lökosit akışı oluşmaktadır. Bu yanıt genelde çok kısa sürmektedir. Bu fazda, yaralanmadan hemen sonra nötrofil ve monositler yara çevresine kapillerden göç eder. Bu hücreler kemotaksik faktörler ve mast hücreleri tarafından yaraya doğru çekilir. Yara iyileşmesinin bu aşamasındaki güçlü büyüme faktörleri lökositler için de ayrıca önemli kemotaksik faktörlerdir. Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) ve Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF) yara iyileşmesinde önemli bir katkısı olan büyüme faktörleri de bu lökositler için güçlü kemotaksik faktörlerdendir.

Nötrofiller, yara bölgesine ulaştıktan sonra hücre ile matriks etkileşiminin artmasına katkıda bulunarak bakteri ve yaralı matriks proteinlerinin öldürülmesi ve fagositozun gerçekleşmesini sağlar.

Monositler, yara oluşumundan sonraki 48 saat içerisinde yara bölgesinde yoğunlaşır makrofajlara farklılaşır ve nötrofiller ile birlikte fagositoz yapar. Makrofajlar, FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), PDGF ve VEGF gibi önemli büyüme faktörlerini salgılar. Salınan bu faktörler hücre göçünü, proliferasyonunu uyarır ve yara bölgesinde yeni doku oluşumunu destekler. Ayrıca yara bölgesine fibroblastların çekilmesini sağlayan fibronektin gibi kemotaksik faktörleri salgılar. Makropların hipoksiye maruz kalması ile salgılanan anjiyogenik faktörlerin üretimi ile yeni kan damarlarının oluşumu gerçekleşir.

Bu aşamalarda lokal damar genişlenmesi, kan ve sıvı sızması, lenfatik drenajın engellenmesi ile kızarıklık, şişlik ve sıcaklığın yükselmesine sebep olabilir [48, 49].

**Proliferasyon fazı**, yaralanmadan sonraki 3-10 gün içerisinde başlar ve hücrelerin bir araya gelmesi ve dokuların yeniden oluşumunun içerir. Bu süreçte temel olarak farklı büyüme faktörleri etkileşimdedir ve bu faktörler fibroblast, keratinosit, endotel hücrelerini uyarıp büyümeyi, göçü ve çoğalmayı hızlandırır. Sonucunda granülasyon dokusu oluşumu sağlanır ve bu sırada büyüme faktörü sinyalinin alınması ile hasarlı dokunun temel hücreleri yara bölgesine hızla göç eder, çoğalıp epitelyal hücreleri oluştururlar. Böylece epitelizasyon süreci başlatılır [46, 50].



Şekil 2.7. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı [44].

Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar ve endotel hücrelerinin etkileşimleri ile desteklenen reepitelizasyon, anjiyogenez ve fibroplazi süreçlerini kapsamaktadır [41, 47].

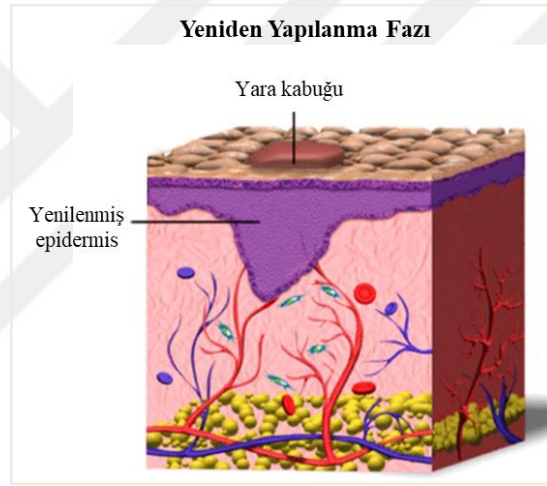
Fibroplazi, fibroblastların çoğalmasını ve miyofibroblastlara farklılaşması ile yara büzüşmesinin gerçekleştiği bir süreçtir. Fibroblastlar önemli bir plastisiteye sahip olup salınan çeşitli büyüme faktörlerine ve ekstraselüler sinyallere yanıt verebilmektedir. Büyüme faktörleri ve sitokinler fibroblastların çoğalmasını destekler. Olgun fibroblastlar ise granülasyon dokusuna göç ederek kolajen sentezini başlatır [47].

Fibroblastlar yara bölgesine girdikten sonra kolajen, elastin üretimi ve kolajenin çapraz bağlanması için gerekli olan lisil oksidaz üretimini gerçekleştirir. Ayrıca bunların bir kısmı miyofibroblastlara farklılaşarak yaranın büzülmesini sağlar. Hasarlı olan matriks proteinlerinin uzaklaştırılarak yeni kolajen, elastin ve proteoglikanların doğru biçimde entegre olabilesini sağlamak için proteazlar üretir.

Yara iyileşmesinin başlangıç safhalarında fibroblastlar tarafından üretilen ve granülasyon dokusunu oluşturan kolajen III, 5-7 gün arasında maksimum seviyeye ulaşır. Daha sonra kolajen I, zamanla kademeli olarak kolajen III'ün yerini almaya başlar ve bu sırada kolajen VI eşzamanlı olarak üretilir. Böylece oluşan kolajen matrisi ise geçici ECM'nin yerini alır [51].

Reepitelizasyon, epidermisin yaralanma sonrası yeniden oluşturulmasının gerçekleştiği süreçtir. Bu aşama genellikle çevresindeki epidermal keratinosit hücreleri yara bölgesine göç etmesi, çoğalması ve neopitelyumun epidermise farklılaşmasını içerir.

Hücrelerin yarayı onarmaya çalışırken metabolizmasının hızlanması ve kan akışının azalması nedeniyle ortam hipoksik hale gelir. Anjiyogenez oluşumu, hipoksik koşullar altında tetiklenir ve bu da makrofaj, fibroblast, keratinosit, endotel hücrelerinde anjiyogenezin aktivasyonunda rol alan hipoksiyle indüklenen faktör-1 (HIF1) sentezlenmesine sebep olur. Proanjiyogenik faktörlerin salınması ile birlikte neovaskülarizasyon, yeni kan damarlarının oluşumu, başlatılmış olur [47]. Yeni kan damarlarının oluşumu yalnızca sadece sitokin ve mevcut hücelere değil ekstraselüler matris bileşenlerinin üretimine ve işleyişi ile de ilgilidir. Ekstraselüler matris, endotel hücrelerinin göç etmesini kolaylaştıran destekleyici bir iskele olarak ve büyüme faktörleri için bir depo ve düzenleyici işlev görerek, kan damarı gelişimi için kritiktir [48].



Şekil 2.8. Yara iyileşmesinin yeniden yapılanma fazı [44].

**Yeniden yapılanma fazı**, yara iyileşmesinin son ve en uzun süren aşamasıdır. İyileşmenin bu aşamasında normal doku yapısının tekrar sağlanması proliferasyon fazında oluşturulmuş olan granülasyon dokusundaki hücreler aşamalı olarak apoptoza uğrar ve yerini skar dokuya bırakır. Bu süreçte kolajen tip I'in sentezi ve kolajen tip III'ün lizisi ile granülasyon dokusunu büyük ölçüde oluşturan kolajen tip III, yerini kademeli olarak kolajen tip I'e bırakır [52]. Daha sonra miyofibroblastlar kolajene çoklu şekilde bağlanır ve yarada kasılma meydana getirir. Böylece oluşan skar dokunun küçülmesini sağlar [50].

Yara iyileşmesinin tüm bu aşamalarını iyi bir organizasyon ile gerçekleşmemesi durumunda yara kronikleşir. Genellikle tekrarlayan enfeksiyonlar, aşırı miktarda ROS üretimi, reepitelizasyonun hatalı olması ve anjiyogenezin azalması yaraların iyileşmesini

engelleyen faktörlerdir [41]. Diyabetik yaralar da bu tür kronikleşmiş yaraların en yaygın ve kompleks örneklerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

#### **2.2.4. Diyabetik Yaralar**

Diyabet, sürekli olarak hiperglisemik koşullara maruziyet sebebi ile tedavisi zor komplikasyona sebep olmaktadır. Bu komplikasyonların başında diyabetik yaralar gelmektedir ve diyabet hastalarının diyabetik ayak ülseri gelişme olasılığının %34'ü bulabileceği öngörülmektedir [46, 53].

Yaraların iyileşmesi için diyabetin, iyileşmeyi engelleyen veya geciktiren patofizyolojik yönleri mevcuttur. Diyabetik yaraların etkin şekilde yönetilebilmesi için bu patofizyolojik etkiler temel şekilde sınıflandırılmıştır. Bu patofizyolojik olayların önemli faktörlerinden biri de hiperglisemidir.

Hiperglisemi, protein glikozilasyonunun tetiklenmesine sebep olmaktadır ve peroksit hasarına, ekstraselüler matriks değişimlerine yol açabilmektedir. Yaralarda aşırı reaktif oksijen türleri (ROS), fagositlerin, makrofajların göçünü engelleyerek inflamatuvar yanıtı sebep olmaktadır.

Ayrıca yüksek oranda kan şekeri, yara iyileşmesinde etkin rol oynayan fibroblast, keratinosit, endotel hücrelerinin çoğalma ve büyüme faaliyetlerinin azalmasına yol açarak anjiyogeneze engel olmaktadır.

Hiperglisemi, oksidatif stres, insülin direnci ve inflamasyona bağlı olarak sinir hücrelerinde işlev bozukluğuna ve ölümüne neden olmaktadır. Sinir sisteminde meydana gelen hasara bağlı olarak koruyucu duyu kaybı görülmektedir ve bu da doku hasarına yol açmaktadır. Bu etkenlerin bir araya gelmesi ile diyabet hastalarında deri yaralarının görülme olasılığı artmaktadır [46].

#### **2.2.5. Kronik Yaraların Tedavi Yöntemleri**

Kronik yaralar, kan akışını, bağışıklığı etkileyen faktörler, diyabet gibi metabolik hastalıklar veya radyoterapi gibi daha önceden yapılmış bir lokal doku hasarı sebebi ile oluşabilmektedir.

Kronik yaralar ile ilgili en ciddi sonuçlar dünya çapında yaygın olan diyabet ve beraberinde oluşan komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Diyabet hastalarının önemli bir popülasyonunda diyabetik yaralar meydana gelmektedir ve diyabetik hastalardaki yara iyileşme sürecini hızlandırmak için glisemik kontrolün sağlanmasının olumlu

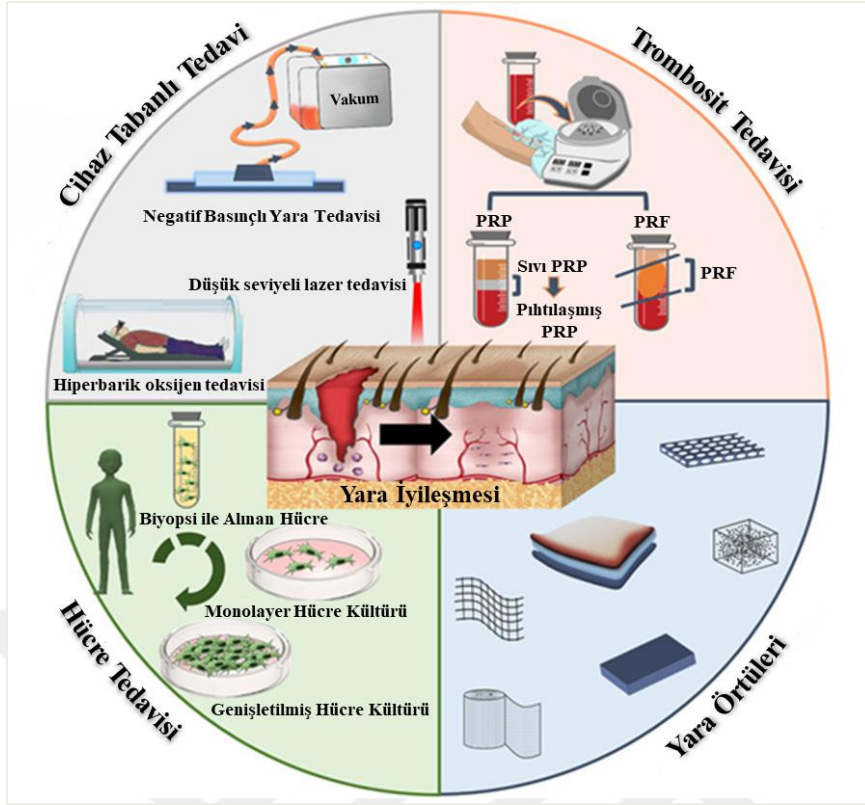
etkileri olabilmektedir [54]. Çünkü hipergliseminin fibroblast, keratinosit, endotel ve kök hücre gibi yara iyileşmesinde önemli yeri olan hücrelerin işlevlerini azalmaktadır [44].

Kronik yaraların tedavisinde çeşitli geleneksel ve yenilikçi tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedaviler arasında negatif basınç, hiperbarik oksijen, plateletçe zengin plazma (PRP), kök hücre ve büyüme faktörü tedavileri, yara örtüleri, allojenik hücresel tedaviler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemleri kronik yaraların bazı türlerinde etkili olmayabilmektedir. Örneğin diyabetik yaralarda henüz bu tedavi yöntemleri tam anlamıyla iyileşmeyi sağlayamamaktadır. Dolayısıyla mevcut tedavi yöntemlerinin daha etkin hale gelmesi için mevcut yöntemlerin daha etkili hale gelmek üzere geliştirilmesi ve biyomühendislik temelli kombine tedavi stratejilerinin oluşturulması için çalışmalar devam etmektedir [12].

#### **2.2.6. Diyabetik Yaralarda Tedavi Çeşitleri**

Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri olan diyabetik yaralar genellikle ayak ve bacaklarda görülmektedir. Bu diyabetik yaralardaki yara iyileşmelerinin gecikmesine bağlı olarak uzuv kayıpları ve yüksek mortalite riski ile sonuçlanmaktadır [55]

Diyabetik yaraların tedavisinde kullanılan yaklaşımlar, yara debridmanı (enfekte, hasarlı veya ölü dokunun çeşitli yöntemlerle çıkarılması) hiperbarik oksijen tedavisi, deri nakli, topikal krem uygulaması ve negatif basınçlı yara tedavisi gibi birçok tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin henüz diyabetik yara iyileşmesinde etkili bir sonuç göstermemesi sebebiyle iyileşmeyi hızlandıracak farklı yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu alanda doku iskelesi kullanımı, yara örtüleri, kök hücre tedavileri ve fotostimülasyon gibi non-invazif ışık tedavileri son zamanlarda başarılı sonuç verebilen tedaviler arasında yer almaktadır [9].



Şekil 2.9. Yara iyileşmesinde kullanılan yöntemler [9].

**Fotostimülasyon**, farklı kaynaklarından elde edilen ışığın hücreler üzerinde sıcaklık değişimine sebep olmadan molekül ve atomların uyarılması ile gerçekleştirilmektedir. Uygulama sırasında dalga boyu, enerji yoğunluğu, uygulama sıklığı, süresi gibi birçok önemli parametresi bulunmakta ve bu parametrelerin kullanım yerine uygun olarak seçilmesi halinde diyabetik ayak ülserlerinde iyileşme, ağrıların hafifletilmesinde, enfeksiyonun azaltılmasında destekleyici rol oynayabilmektedir. Bu tedavi yönteminin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin görülmesinden dolayı daha fazla araştırma ile optimum parametrelerin belirlenmesine ve daha etkin kullanımı üzerine çalışmaların yapılması gerekmektedir [12].

**Kök hücre tedavisinde**, genellikle erişkin dokudan elde edilen hücreler kullanılmaktadır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin yara bölgesine enjeksiyon, topikal veya biyomalzeme kullanımı ile birlikte uygulanabilmektedir. Kök hücre tedavisinin yanık yaraları, diyabetik yaralar ve yatak yaralarında iyileşme sürecine olumlu katkısının olduğu bilinmektedir [56]. Diyabetik ayak ülseri olan hastalarda iyileşmenin desteklenmesi ve uzuvdaki iskeminin tedavi edilmesi için yapılan kök hücre nakilleri ile neovaskülarizasyon desteklenebilmektedir [56]. Aynı zamanda yara bölgesine yerleşen kök hücrelerin anjiyogenez, granülasyon dokusu ve ECM'nin yapılanmasını

sağlayabilmektedir. Ancak kök hücre yaklaşımında ideal mekanizmanın bilinmemesi, kültür ve karakterizasyonunun uzun ve maliyetli bir süreç olması bazı dezavantajlarındandır [9].

**Yara örtüleri**, biyouyumluluğu yüksek biyomateryaller ve sentetik malzemelerin kullanımı ile köpük, film, hidrokolloid, hidrojel formlarında üretilebilmektedir. Aynı zamanda bu örtüler insan fibroblast, keratinosit gibi deri hücreleri ve çeşitli büyüme faktörlerini de içerebilmektedir. Yara örtüleri, doğal iyileşme sürecini desteklemek amacıyla yara bölgesine dış ortamdan mikroorganizma girişinin önlenmesi sağlayan ve bu bölgenin hasar almasını engelleyen bir bariyer görevi görmektedir [9]

**Hiperbarik oksijen tedavisinde**, hasta bir basınç odasına alınır ve sistematik olarak hastaya 1 atm'nin üzerinde ve 3 atm'ye kadar bir basınçta %100 O<sub>2</sub> uygulanır. Bu tedavi yöntemi ile anjiyogenezde, lökosit fonksiyonlarında, büyüme faktörlerinin salınımında artış sağlayabilmektedir. Ancak yapılan araştırmalar doğrultusunda diyabetik ayak ülserlerinde bu tedavinin iyileşme üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığı ve amputasyonu önlemede önemli bir etkinin görülmediği bildirilmiştir [57].

**Negatif basınç tedavisi**, yaranın iyileşme sürecini hızlandırmak için yaranın üzerinde negatif basınç oluşturup yara yatağındaki hücrelerde deformasyona sebep olarak anjiyogenez uyarır ve yara eksüdasının uzaklaştırılmasını sağlayan bir yöntemdir [58]. Akut, kronik, yanık, diyabetik veya venöz yaraların tedavilerinde kullanılmaktadır.

**Yara debridmanı**, bakterilerin yara bölgesinde biyofilm oluşturmasının engellenmesi, yaşlanmış, nekrotik ve fibröz dokunun uzaklaştırılarak yara iyileşmesinin teşvik edilmesini içeren bir tedavi yöntemidir. Cerrahi, mekanik, otolitik ve enzimatik debridman gibi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir [12].

### **2.3. Doku Mühendisliği Yaklaşımları**

Doku mühendisliği yaklaşımlarıyla yara iyileşmesi için uygulanan ve geliştirilmekte olan tedaviler çoğunlukla biyomalzeme tasarımı, doku iskeleleri, büyüme faktörleri, gen ve hücre terapilerini içermektedir.

#### **2.3.1. Biyomalzemelerin Kullanımı**

Biyomalzemeler, biyomühendislik yaklaşımıyla geliştirilen tedavilerde önemli bir rol oynamaktadır. Yara iyileşmesinde doğal kaynaklardan elde edilen, sentetik olarak elde edilen veya bu iki türün birleşiminden oluşturulmuş kompozit biyomalzemeler

kullanılmaktadır. Bu malzemelerin kullanımı ile yara iyileşmesi süreci önemli ölçüde hızlandırılabilen ve yara dokusunun onarımı teşvik edilerek yara izlerinin oluşumu engellenebilmektedir. Biyomalzemeler, iyileşme sürecini desteklerken çeşitli mekanizmalardan yararlanır. Mekanik destek, hücresel etkileşim, büyüme faktörleri ve antibakteriyel koruma gibi özelliklere sahip olup iyileşmeyi hızlandırır ve komplikasyon oluşumlarını azaltır [59].

### **2.3.2. Yara Örtüleri**

Yara örtüleri, yara iyileşme sürecini hızlandırmak, olası enfeksiyonları önlemek ve yara bölgesinin dış etkenlerden korunmasını sağlamak amacıyla kullanılan malzemelerdir [60]. İyileşme sürecinde yara bölgesinin nemli kalmasını, epitel hücre göçünü ve granülasyon dokusunu desteklemektedir. Gelişim biçimlerine göre geleneksel ve modern yara örtüleri olarak sınıflandırılmaktadır.

Geleneksel yara örtüleri, genellikle gazlı bez, doğal veya sentetik bandajlar ve pamuk gibi malzemelerden üretilmektedir. Düşük maliyetli ve kolay bulunabilir olması nedeniyle klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak içerisindeki liflerin granülasyon dokusuna yapışarak ağrıya neden olmaktadır ve sık değiştirilmesi gerektiğinden dolayı doku hasarı tekrarlayabilmektedir [60].

Modern yara örtüleri ise biyomühendislik ve malzeme bilimlerindeki gelişmelere bağlı olarak geleneksel yara örtülerindeki dezavantajları elimine etmek, yara iyileşme süreçlerini tetiklemek ve yara tipine göre özelleştirilmiş seçenekler sunmaktadır. Modern yara örtüleri de kendi içinde farklı sınıflara ayrılmaktadır.

**Hidrojel örtüler**, yüksek su içeriğine sahip jel yapısı ile yara bölgesinin nemli kalmasını, doku rejenerasyonunu sağlamaktadır ve yara bölgesinde soğutucu, rahatlatıcı, ağrıyı azaltıcı etkileri bulunmaktadır. Genellikle bası yaraları, kuru yaralar ve yanık yaraları için uygundur. Ancak ortamda fazla miktarda sıvı birikmesinden kaynaklı olarak bakteri üremesine ve enfeksiyona yol açabilmektedir [61, 62].

**Hidrokolloid örtüler**, yaranın eksüdası ile temas ettiğinde jelleşme özelliği göstermektedir. Yara bölgesinde oluşturduğu nemli ortam ile kolajenin ve fibroblastın çoğalmasını sağlayarak epitelizasyonun hızlanmasını sağlamaktadır [63]. Yüksek eksüda içeren yaralarda kullanılması durumunda yara bölgesinde birikmeye yol açabilmektedir ve bu nedenle sık değiştirilmesi gerekmektedir [61].

**Aljinat örtüler**, deniz yosunlarından elde edilmektedir ve yüksek bir emme kapasitesine sahiptir. Eksüda ile temas ettiğinde jelleşme özelliği göstermektedir ve yara bölgesinde nemli bir ortam oluşturmaktadır. Dolayısıyla, diyabetik ayak ülserlerinde, yüksek drenajlı ve enfekte yaralarda kullanıma uygundur. Kuru yaralarda ve yanıklarda kullanıma uygun değildir. Ayrıca kendiliğinden yapışma özelliğine sahip olmadığından dolayı ikincil bir örtü kullanımını gerektirmektedir [61].

**Köpük örtüler**, genellikle poliüretan (PU) kullanılarak üretilen, emme kapasitesi yüksek, yara bölgesinde nemli bir ortam ve ısı yalıtımı sağlayan malzemelerdir [61]. Aynı zamanda yara üzerindeki basıncı azaltıcı etkiye sahiptir. Düşük eksüda içeren yaralarda kurumaya neden olabileceğinden dolayı yüksek eksüda içeren yaralarda kullanıma uygundur [63].

**Biyoaktif örtüler**, yara iyileşme sürecine katkıda bulunan doğal veya yapay biyomalzemeler kullanılarak üretilmektedir. Kitosan, aljinat, hyalüronik asit, kolajen, antimikrobiyal peptitler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli kaynakların kullanımı ya da bazı durumlarda birlikte kullanımı ile yara iyileşmesini desteklemektedir. Ancak biyoaktif örtülerin daha maliyetli oluşu nedeniyle erişimi diğer yara örtü türlerine göre daha zor olabilmektedir [64].

### **2.3.3. Büyüme Faktörlerinin Kullanımı**

Büyüme faktörleri yara iyileşme mekanizmasının bütün aşamalarında kritik rol oynayan polipeptitlerdir. Bu peptitler, granülasyon dokusu ve ECM oluşumunu uyarır, inflamatuvar yanıtı düzenler ve yeni damar oluşumunu destekleyerek iyileşmeye önemli bir katkı sağlar [65]. Hücre zarındaki reseptörlere özgül olarak bağlanarak hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşmasını sağlarlar. Büyüme faktörleri farklı biyolojik özelliklere sahip olduğundan uygulama alanları da çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FBF), endotelial hücre çoğalmasını, hücre göçünü destekler. Transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ), endotel progenitör hücrelerini uyararak anjiyogenezi destekler ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ise birçok hücrenin mitogenezi, anjiyogenez ve kemotaksi süreçlerinde düzenleyici rol oynayarak yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [66, 67]. Ancak büyüme faktörlerinin kısa yarı ömür, zayıf stabilite ve kontrolsüz sinyalleme gibi sınırlayıcı özellikleri, klinik olarak etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Dolayısıyla büyüme faktörlerinin yara bölgesinde etkili olabilmesi için

yüksek doz uygulamaları gerekmektedir ve bu da maliyetin yükselmesine sebep olmaktadır. Biyomalzeme kullanımı ile dağıtım sistemi tasarımları da yaygın bir yöntemdir. Bu yöntem ile büyüme faktörlerinin yarılanma ömrü, lokalizasyon ve salınım kontrolü sağlanmaktadır [68].

#### **2.3.4. Hücre Terapileri**

Hücre tedavileri hem akut hem kronik yaralarda tercih edilen yöntemlerden biridir. Akut yaralarda iyileşme hızının artmasına, skar doku oluşumunun ve yara izlerinin minimize edilmesine olanak vermektedir. Kronik yaralarda da iyileştirme kapasitesine sahip hücrelerin yara yatağına nakledilmesi ile iyileşme için optimal koşulların oluşturulması amaçlanmaktadır [69]. Doku rejenerasyonunda genellikle mezenkimal kök hücre, adipoz kaynaklı kök hücre, indüklenmiş pluripotent kök hücre gibi çeşitli hücreler kullanılmaktadır [70].

Kök hücreler, sahip oldukları yenilenme, farklılaşma potansiyelleri ve sitokin, büyüme faktörlerinin salgılamaları sebebiyle yara iyileşme tedavilerinde tercih edilmektedir

**Mezenkimal kök hücreler (MSC)**, kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu gibi çeşitli dokulardan elde edilebilen bağ doku kaynaklı kök hücrelerdir. Başta kemik, kıkırdak, yağ gibi bağ dokular olmak üzere kalp, karaciğer ve sinir hücreleri dahil pek çok tipte hücreye dönüşüm özelliğine sahiptir [71].

**Adipoz Kaynaklı kök hücreler (ADSC)**, yağ dokusundan elde edilmektedir ve fibroblast, adiposit, kondrosit, osteoblast gibi birçok hücreye farklılaşma özelliğine sahiptir [72]. Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibronektin ve kolajen sentezini artırarak yara iyileşmesini desteklemektedir [73].

**İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPSC)**, somatik hücrelerin *in vitro* koşullarda belirli genler aracılığıyla pluripotent özellik kazandırılan hücrelerdir. Yani tüm deri hücrelerine farklılaşma ve yara iyileşmesini hızlandırma kapasitesine sahiptir. Ancak hücrelerin kontrolsüz çoğalma olasılığı, mutasyon riski ve etik sorunlar, kullanımını sınırlandırmaktadır [74].

Kök hücreler, etik veya güvenlik sorunları hakkındaki çalışmalarını devam etse de yara iyileşmesi sürecince önemli bir potansiyele sahiptir.

## 2.4. Yara İyileşme Modelleri

Kronik yaraların iyileşmesi için gerçekleştirilen çalışmalarda *in vivo* ve *in vitro* modeller kullanılmaktadır. Kullanılan bu modeller ile yaranın fizyolojik ve patofizyolojik koşulları taklit edilebilmektedir.

### 2.4.1. *İn Vivo* Modeller

*İn vivo* modellerde genellikle hayvan modelleri kullanılmaktadır ve fare, sıçan gibi kemirgenler, tavşan, domuz yaygın olarak tercih edilmektedir [75]. Her modelin farklı avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Bu sebeple hangi modelin kullanılacağı yapılan araştırmanın konusu ve amacına göre belirlenmelidir. Tedavi geliştirilmesi için çalışmalarda hayvan deneylerinin önemli ölçüde katkısı olmasına rağmen insan fizyolojisi ile farklılıklarının bulunması, çeşitli etik sorunlar ve ekonomik sınırlamaları da beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla farklı *in vitro* modeller geliştirilerek alternatif yöntemler geliştirilebilmektedir [76].

### 2.4.2. *İn Vitro* Modeller

Literatürde kronik yaraların temel özelliklerini taşıyan çeşitli *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda kullanılan modeller 2 veya 3 boyutlu olarak kategorize edilebilmektedir [75].

İki boyutlu modellerde genelde hücreler *in vitro* ortamda kültürlendikten sonra farklı yöntemler ile hücre tabakasında yara oluşturulur. Bu yöntemlerden en yaygın olanı pipetle çizik oluşturmaktır. Bunun dışında termo-mekanik, elektriksel, optik gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Termo-mekanik yöntemde ısının komşu hücrelere iletilmesinden dolayı tekrar edilebilirliğini olumsuz etkiler. Elektriksel yöntemde yüksek bir akım uygulanarak elektroporasyon ve hücreyel yara oluşturulur. Tekrarlanabilirlik ve nicel veri sağlaması açısından avantajlıdır. Optik yöntemlerde ise hücre ablasyonu, belirli bir bölgedeki hücrelerin lazer ışınları ile indüklenmesi ile elde edilir. Tekrarlanabilirlik açısından uygun olsa da bu cihazın elde edilme olanağı düşüktür [75]. Bu yöntemlerden biri ile oluşturulan yaraya hücrelerin göç etme hızı, proliferasyonu, canlılığı gibi özellikleri mikroskop altında incelenir [77]. Genellikle bu tip modellerde keratinositler, fibroblastlar kullanılmaktadır.

Üç boyutlu modellerde ise doğal dokulara daha benzer bir model oluşturma imkanından dolayı tedavi veya ilaç geliştirme çalışmalarına önemli bir katkısı vardır. Bu modellerde

genel olarak histokültürleri, deri eşdeğerlerini ve biyomühendislik ürünlerini içermektedir. Histokültürler kolajen jel destekli ya da serbest yüzen büyüme ortamına yerleştirilen üç boyutlu dokulardır. Deri eşdeğeri modellerinde ise dermal ve epidermal eşdeğerlerin işlevsel ve yapısal olarak ikamelerini üreten veya iki bölümden oluşturulan deri hücreleri ve ECM matrislerinden oluşmaktadır. Bu modellere yaygın olarak kolajen, kitosan, polikaprolakton, polilaktik asit gibi bazı polimerler deri eşdeğerlerine eklenmektedir. Üç boyutlu modellerde genellikle punch biyopsi gibi belli teknikler ile yara oluşturulmaktadır [75].

Üç boyutlu modellerle yapılan çalışmalar, fizyolojik ve hücresel ortamı çok daha iyi taklit etme imkânı sağlamaktadır. Yara iyileşmesine yönelik daha gerçekçi modeller geliştirilmesi adına Maione ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada diyabetik ayak ülserinden elde edilmiş fibroblastlar ve kontrol grubunu kullanarak üç boyutlu bir kronik yara iyileşme modeli oluşturmuşlardır. Oluşturulan modellerde kronik ülserlerde tipik olan anjiyogenezin, re-epitelizasyonun azalması, bozulmuş ECM birikimi taklit edilmiştir [78]. Başka bir çalışmada Lemarchand ve ark., diyabet kaynaklı hiperglisemiyi daha belirgin hale getiren glikasyon ürünlerinin yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerini taklit etmek amacıyla bir model geliştirmişlerdir. Kolajen süngerlerinde epidermal yapı olarak insan keratinosit ve fibroblast hücreleri, dermal yapı olarak da endotel ve fibroblast hücreleri kültürlenmiştir. Epidermal yapıda biyopsi iğnesi ile delik açılıp bir yara oluşturulmuştur. Yaralı epidermal yapı yaralı olmayan dermal tabakanın üstüne yerleştirilmiştir. Bu model 15 gün boyunca gliksal ile işleme tabi tutularak glikasyon son ürünlerinin (AGE) birikimine ve dolayısıyla diyabetik ülserlerin taklit edilerek yaraların kapanmasında gecikmeye neden olmuştur. Sonrasında AGE oluşumunu inhibe etmek için aminoguanidin eklenerek bu etkinin tersine çevrilmiştir [79].

Bu tez kapsamında doku mühendisliği yaklaşımlarıyla 2 ve 3 boyutlu *in vitro* yara modelleri oluşturulmuştur. 3 boyutlu *in vitro* model tasarımında biyomalzeme kullanımı ile doku iskeleleri üretilmiştir. Ayrıca hem 2 boyutlu hem de 3 boyutlu modeller üzerinde yenilikçi tedavi yaklaşımlarından biri olan fotostimülasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

## 2.5. Doku İskeleleri ve Üretim Yöntemleri

Doku iskeleleri, yara iyileşmesi sürecinde hücrelerle etkileşimde bulunan, doku oluşumu ve yenilenmesi için gerekli desteği sağlayan 3 boyutlu geçici yapılardır. İskele tasarımlarındaki en önemli özellik gerçek dokunun taklit edebilmesi ve fiziksel olarak da doğal yapısına benzer olmasıdır [80].

İskelenin yara iyileşmesinde kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu temel özellikler ise fiziksel ve mekanik dayanımının uygun olması, hücre adezyonuna, proliferasyonuna, farklılaşmasına olanak verecek, hücre göçüne olanak verecek ve anjiyogenezi teşvik edecek yapıda olmasıdır. Ayrıca iskelenin, bulunduğu ortama uyum sağlayabilmesi için esnekliğe sahip olması, gözenekliliğin yeterli düzeyde olması, biyouyumlu olması ve yara iyileşme süresi ile uyumlu şekilde bozunma özelliğine sahip olması gerekmektedir [81].

Çizelge 2.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri [82, 83].

<b>Doku İskelelerinin Özellikleri</b>		
<b>Biyolojik</b>	Biyouyumluluk	Hücrelerin yüzeye tutunabilmeleri, çoğalabilmeleri ve vücutta inflamatuvar bir yanıt oluşturmaması için iskelenin biyouyumlu olması gerekmektedir.
	Biyobozunurluk	Doku iskeleleri, yeni doku oluşumu veya doku yenilenmesi gerçekleşene kadar geçici bir destek yapı olarak görev aldığından dolayı bu sürecin doğru orantılı şekilde iskelenin bozunması gerekmektedir.
	Biyoaktivite	İskelelerin, hücre göçü, farklılaşması, doku rejenerasyonunu destekleyici ve büyüme faktörlerinin taşınması için uygun ortam oluşturacak şekilde tasarlanması gerekmektedir.
	Antimikrobiyalık	Doku iskelesinin yara bölgesinde enfeksiyon oluşumunu engelleyecek ve yara iyileşmesini kolaylaştıracak bir ortam sağlaması gerekmektedir.
<b>Mikro Yapı</b>	Yüksek Gözeneklilik	Besin ve metabolit difüzyonunun sağlanması için gözenekli yapı gerekmektedir. Ayrıca yüksek gözenekli yapıya sahip iskeleler, hücreler arası etkileşimi arttırarak doğal doku ile entegre olmasını sağlar.

	Gözenek Boyutu	Hücrelerin iskelelere bağlanması, göç hareketleri, besin ve atık maddelerin transferi için gözenek boyutlarının yeterli düzeyde olması gerekmektedir.
	Gözenekler Arası Bağlantı	Hücrelerin iskeleye tutunması, hücreler arası sinyal ve besin maddelerinin taşınması sağlayarak hücreler arası iletişim kurması sağlanır.
<b>Mekanik</b>	Mekanik Dayanım	Doku iskelelerinde kullanılan malzemelerin implante edildiği bölgenin doğal dokulara benzer mekanik özelliğe sahip olması gerekmektedir. Çekme dayanımı, elastisite modülü, kırılma dayanımı gibi çeşitli mekanik özellikler iskele üretiminde göz önünde bulundurulmalıdır.
<b>İmalat Teknolojisi</b>	Üretim Kolaylığı	İskelelerin, düşük maliyet ile hedef dokuya yönelik doğru üretim yöntemlerin belirlenmesi ve kolay üretilebilir olması gerekmektedir.

İskelelerin gerekli işlevleri yerine getirebilmesi için çeşitli doğal, sentetik biyomalzemeler kullanılmaktadır ve bu malzemenin doğru seçimi ve kullanımı da oldukça önemlidir. Sentetik polimerlerden polikaprolakton (PCL), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerler FDA onaylıdır ve biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve uygun mekanik dayanımı sebebi ile tercih edilmektedir [84, 85]. Doğal polimerlerden özellikle jelatin, kitosan, kolajen, ipek, hyalüronik asit gibi polimerler de iskele tasarımında sıklıkla tercih edilmektedir. Tez çalışmasında kullanılan iskelelerin bir katmanında biyoyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip PCL (Polikaprolakton) kullanılmıştır. Diğer katmanda kullanılan kitosanın biyoyumluluğu yüksektir ve antibakteriyel özelliğe sahiptir. Jelatin ise hücre-iskele etkileşimini kolaylaştıran RGD (Arjinin Glisin Aspartik Asit) motifine sahiptir ve metalloproteazlar (MMP) tarafından parçalanabilen moleküller içermesi sebebi ile iskelenin kontrollü şekilde bozunmasını sağlamaktadır [86].

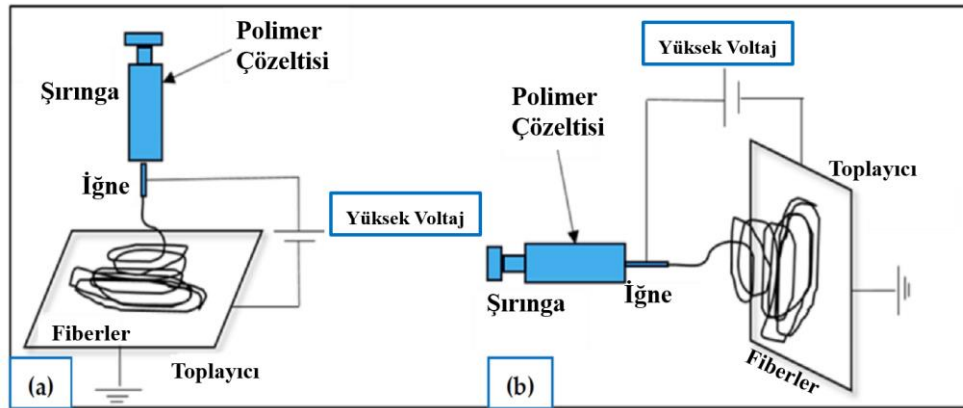
Doku iskelelerinin tasarımında ve üretiminde gerçek cilt dokusunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine uygun, iyi mekanik özelliklere sahip olmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Tercih edilen üretim yönteminin gözeneklilik, gözenekler arası bağlantı, biyobozunurluk gibi birçok faktörü doğrudan etkilediği bilinmektedir.

Yaygın olarak kullanılan iskele üretim yöntemleri geleneksel ve hızlı prototipleme olarak iki farklı kategoriye ayrılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde dondurarak kurutma,

elektroegirme, gaz köpüğü, faz ayırma, fiber bağlama, solvent dökümü ve partikül uzaklaştırma yaygın olarak bilinmektedir. Hızlı prototipleme yöntemlerinde ise 3B baskı, seçici lazer sinterleme (SLS), stereolitografi, eriyik yığıma modelleme, mürekkep püskürtme gibi metotlar bulunmaktadır [83, 87].

### 2.5.1. Elektroegirme Yöntemi

Elektroegirme yöntemi, nano-fibröz doku iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Yöntemin temel çalışma mekanizması, bir polimer çözeltisinin elektrik alana maruz bırakılarak bu çözeltinin jete dönüştürülmesi ve bir toplayıcıda ince fiberler halinde toplanmasına dayanmaktadır. Bu fiberlerin elde edilebilmesi için 10-40 kV arasında DC voltajı kullanımı gerekmektedir. Yöntemi oluşturan ana kısımlar güç ünitesi, şırınga pompası, metal iğne ve toplayıcıdır [83].



Şekil 2.10. Elektroegirme yönteminin şematik gösterimi [88].

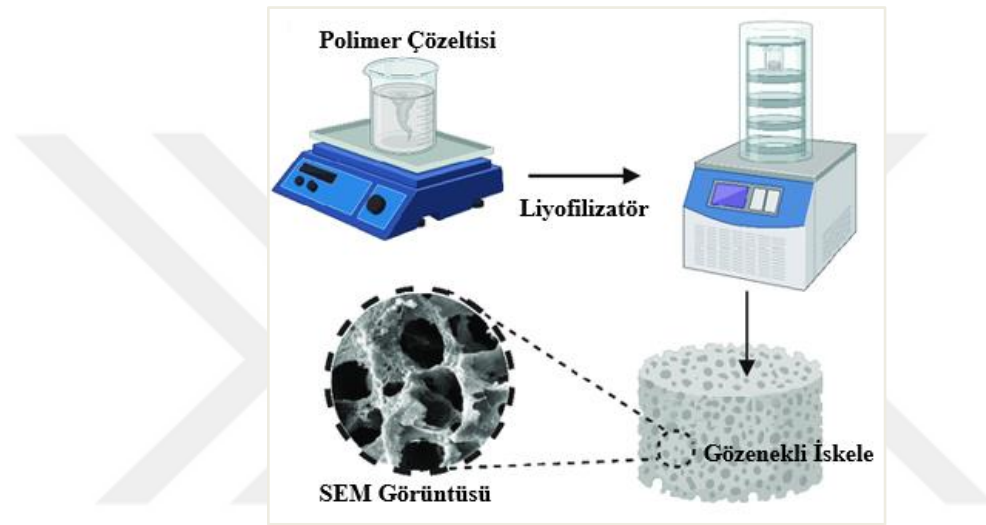
Elektroegirme işlemi için öncelikle uygun polimerlerin kullanımı ile homojen bir çözelti hazırlanır. Daha sonra hazırlanan bu çözelti şırınga içerisine yerleştirilir ve yüksek bir voltaj uygulanır. Böylece şırıngada bulunan polimer çözeltisi yüklenir ve itici bir güç oluşur. Yüksek gerilime maruz kalan çözeltinin damlacık şekli “Taylor Konisi” olarak da bilinen koni biçimine dönüşür. Uygulanan elektrikselsel kuvvetin kritik bir değere ulaşmasıyla birlikte yüzey gerilim kuvvetini yenerek Taylor konisinin ucundan tek bir jet akışı ile sürekli olarak toplayıcı plakada toplanır. Çözeltinin plakaya toplanması sırasında çözücünü buharlaştırır ve bu da ortama istenmeyen bir koku yayılmasına sebep olabilir. Dolayısıyla elektroegirme işlemi genellikle kapalı ve kontrol edilebilir bir ortamda gerçekleştirilmektedir [89, 90].

Çizelge 2.2. Elektroçirime yönteminde kullanılan parametreler ve fiberler üzerindeki etkileri [58, 59].

<b>Parametreler ve Etkileri</b>	
<b>Çözelti Parametreleri</b>	
<b>Konsantrasyon, Viskozite ve Yüzey Gerilimi</b>	Polimer konsantrasyonunun yeterli seviyede olması ile jetin kesintiye uğramadan yüzey gerilimini aşması sağlanır ve daha düzgün tek parça fiberler elde edilebilmektedir.  Viskozitenin optimum seviyede olması ile jet oluşumu ve sürekli akış sağlanmaktadır.
<b>İletkenlik</b>	Yüksek iletkenlik seviyesi ile daha düzgün ve ince fiberlerin elde edilmesi sağlanmaktadır.
<b>Çözücü Uçuculuğu</b>	Optimum uçuculuğa sahip çözücü kullanımında buharlaşmanın dengeli olması ile fiberlerin daha homojen, stabil ve istenilen çaplarda üretimi sağlanmaktadır.
<b>Dielektrik Sabiti</b>	Dielektrik sabiti çözelti içerisindeki yük dağılımını etkileyerek fiberlerin çapını ve morfolojisini değiştirebilmektedir.
<b>İşlem Parametreleri</b>	
<b>Mesafe</b>	Toplayıcı ve iğne ucu arasındaki mesafenin kısa olması, yüksek elektrik alan etkisi ile fiberlerin kalın, boncuklu ve pürüzlü olmasına sebep olmaktadır. Mesafenin fazla olması ise elektrik alanın azalmasına, daha ince fiberlere ve pürüzlülüğe sebep olmaktadır. Dolayısıyla mesafenin optimize edilmesi gerekmektedir.
<b>Uygulanan Voltaj</b>	Uygulanan gerilimin artması, daha fazla polimerin çekilmesine sebep olmaktadır. Gerilimin artması fiber çapında kalınlaşma ve boncuk oluşumuna sebep olmaktadır.  Çözeltinin jet oluşumunu başlatılması ve sürekliliğinin olması için minimum voltaj düzeyinin aşılması gerekmektedir.
<b>Akış Hızı</b>	Yavaş bir akış hızı ile jetin daha stabil, fiberlerin homojen ve pürüzsüz olmasını sağlamaktadır. Akış hızının artması ile gözenek boyutları artmaktadır
<b>Ortam Parametreleri</b>	
<b>Nem</b>	Yüksek nem seviyelerinde fiberlerde düzensizlik, boncuk oluşumu ve çapında değişikliklere yol açmaktadır. Ayrıca buharlaşma hızının düşmesine sebep olarak fiberlerin daha ıslak kalmasına ve birbirine yapışmasına neden olmaktadır.
<b>Sıcaklık</b>	Sıcaklığın artmasıyla birlikte viskozitede azalma ve buna bağlı olarak daha ince fiberlerin oluşması sağlanmaktadır.

### 2.5.2. Dondurarak Kurutma Yöntemi

Doku mühendisliğinde yüksek gözenekli iskele ve membranların üretiminde kullanılan yaygın yöntemlerden biri dondurarak kurutma yöntemidir. Bu yöntemde, hazırlanan polimer çözeltisi  $-20^{\circ}\text{C}$  ve  $-80^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda dondurularak katı hale getirilir. Daha sonra bir liyofilizatör kullanılarak bu örneklerdeki çözücü süblimleşme ile buharlaştırılır ve içsel bağlantılı ve yüksek gözeneklere sahip iskelelerin oluşması sağlanır. Bu gözenek boyutları ise dondurma işlemindeki parametrelerin değiştirilmesi ile manipüle edilebilmektedir [87].



Şekil 2.11. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi [91].

### 2.6. Fotostimülasyon

Fotostimülasyon, günümüzde kullanılan diğer adlandırılma şekilleriyle fotobiyomodülasyon, düşük seviyeli lazer tedavisi (LLLT) veya fototerapi çeşitli ışık kaynaklarından elde edilen ve belirli dalga boylarındaki ışık enerjisinin kullanımı ile biyolojik süreçlerin uyarılması ile tedavi amaçlı olarak kullanılmasıdır [92].

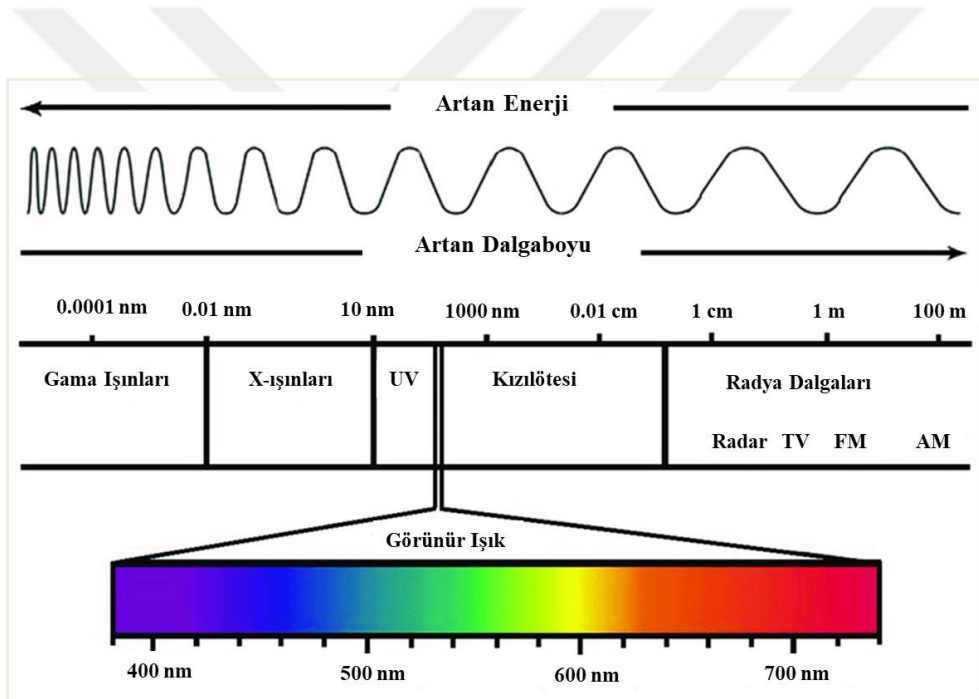
Fotostimülasyon tarihte ilk olarak Macar doktor Endre Mester tarafından 1967 yılında, lazer ışığına maruziyetin kanserli hücrelerin büyümesine neden olup olmadığını araştırmak üzere tüyleri tıraş edilmiş sıçanlar üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada beklenmedik şekilde sıçanların tüylerinin yeniden büyüdüğünü gözlemlemesi üzerine geliştirilmiştir [11].

Literatürde yapılan çalışmalar ve klinik denemeler göz önünde bulundurulduğunda Alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, diş hekimliği, ağrı tedavileri, yara iyileşmesi gibi birçok alanda kullanılabilir [10, 93].

### 2.6.1. Işık Kaynakları

Fotostimülasyonun tedavi amaçlı kullanımında farklı ışık kaynakları kullanılmaktadır. Işık kaynağı olarak genellikle belirli dalga boylarında kırmızı veya yakın kızılötesi bölgelerde, LED (Işık Yayan Diyot), lazer ve geniş bantlı ışık yaygın olarak kullanılmaktadır [94].

1960'lı yıllarda lazer teknolojilerinin icadı, ışığın tedavi amaçlı kullanımında önemli dönüm noktalarından biridir.



Şekil 2.12. Elektromanyetik spektrum [95]

### Lazer Işık Kaynağı

Lazerler, uyarılmış ışınım yayılımı ile ışığın yoğunlaştırılması şeklinde tanımlanmaktadır ve prensipleri esas olarak 1917 yılında Einstein tarafından önerilmiş olan kuantum kavramıdır. 1960 yılında ise Theodore Maiman, Einstein'ın 1917'deki teorik çalışmasına dayanarak ilk lazer cihazını icat etmiştir [96].

Lazerlerin biyolojik etkilerinin araştırılması üzerine 1967 yılında ilk deneysel çalışmalar başlatılmıştır ve Mester tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada düşük doz lazer

tedavilerin hücreler üzerinde uyarıcı etkilerinin olduğu ve yara iyileşmesini destekleyebileceği bildirilmiştir

Lazerlerin çalışma prensipleri esas olarak bir ışık kaynağından çıkan foton enerjisinin belirli bir ortamdan geçirilip ortamdaki atom elektronlarının dönüş hızlarını arttırarak özgün bir dalga boyuna sahip ve tek yönlü hareket eden farklı bir ışın oluşturmaktır [96].

### **LED Işık Kaynağı**

LED, p-n bağlantılarından (pozitif-p ve negatif-n) oluşan bir diyottur ve bu bağlantılar direkt olarak polarize edildiğinde, elektronların potansiyel bariyeri aşmasına ve cihaz içindeki deliklerle rekombine olmasına olanak tanır. Kendiliğinden gerçekleşen bu rekombinasyon sonucunda ise eş zamanlı olarak foton emisyonu oluşur [97]. 1990'lı yıllarda alüminyum galyum indiyum nitrid (AlGaInN) bazlı LED'in geliştirilmesiyle ekran ve aydınlatma sektöründe önemli bir ışık kaynağı haline gelmiştir. Bu gelişme ile tıbbi tedavi, fototerapi ve tarım endüstrisi gibi alanlarda da önemli pazar imkanları sağlanmıştır [98].

### **Plazma Ark Işık Kaynağı**

Plazma ark ışık iki elektrot arasında, elektriksel olarak iletken bir gaz (ksenon) ile elektrik arkı oluşturularak üretilmektedir. Elektrotlara uygulanan yüksek voltaj ile gaz iyonize olarak plazma haline dönüşür. Plazma ise elektrotlar arasında bir elektrik arkı oluşturarak yüksek yoğunlukta ışık üretmektedir. Plazma ark ışık kaynakları ile geniş bir dalga boyu aralığında ışık üretilebilmektedir ve belirli bir biyolojik hedefin spesifik dalga boylarında uyarılması gerektiğinde kullanımı avantajlıdır [99].

### **2.6.2. Fotostimülasyonun Etki Mekanizması**

Fotostimülasyonun temel etki mekanizması, ışığın mitokondride bulunan sitokrom c oksidaz enzimi veya hücre yapısındaki kromoforlar tarafından emilmesi yoluyla hücre metabolizmasında değişikliklere neden olması prensibine dayanmaktadır.

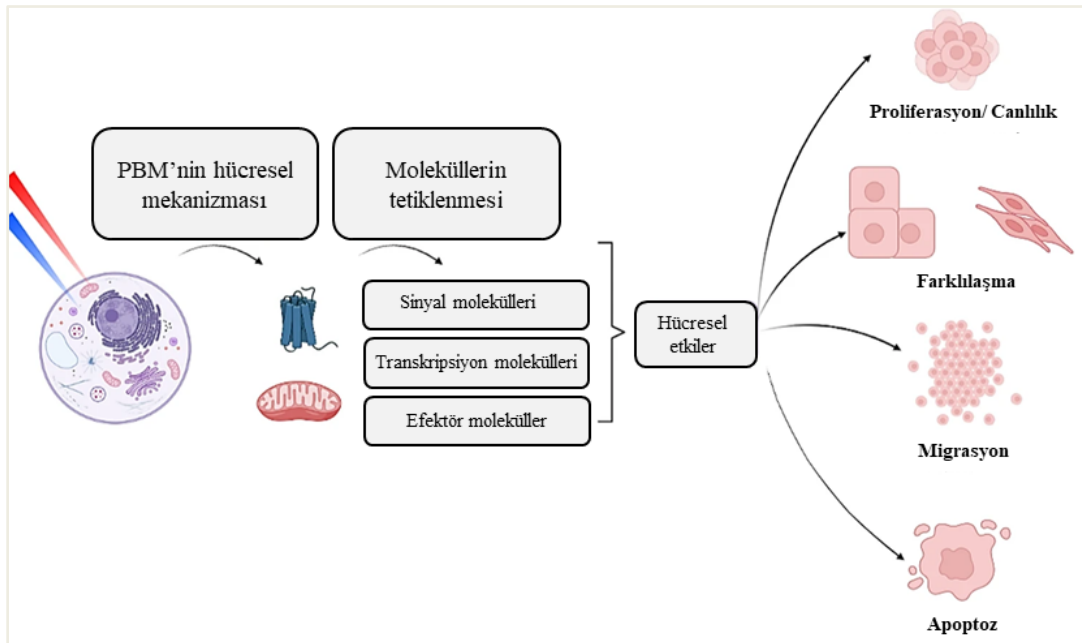
Bu mekanizmaya göre belirli bir dalga boyunda gönderilen ışığın sitokrom c oksidaz tarafından absorbe edilmesi ile elektron taşıma zincirinde ATP üretiminde ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artış tetiklenmektedir. Reaktif oksijen türlerinin, hücre sinyallemede, hücre döngüsünün kontrolünde, enzimatik aktivasyon, nükleik asit ve protein sentezinde önemli bir işlevi vardır. Dolayısıyla birçok sinyal yolunun uyarılmasına sebep olmaktadır [100]

Sitokrom c oksidaz (Cox), kızılötesi aralıkta birincil fotoalıcı olarak kabul edilmektedir. Sitokrom c oksidaz aktivitesi ve taşıma zincirinin modülasyonu, oksidatif fosforilasyon ve mitokondrinin redoks durumunda değişiklikleri ile yara iyileşmesini hızlandırılmasında önemli bir rolü olduğu görülmüştür. Sitokrom c oksidaz tarafından, gelen fotonlar emilir ve elektron taşıma zincirindeki ATP (Adenozin trifosfat) üretimi artar ve mitokondriyal membran geçirgenliği tetiklenir. Böylece ikincil habercilerin aktive olmasını ve sinyal kaskadlarının harekete geçmesine sebep olur [12].

Ayrıca ışığın, oksijenle rekabet halinde hem a<sup>3</sup>'e bağlanan ve geri dönüşümlü olarak sitokrom c oksidazı inhibe eden nitrik oksidin, heme proteinlerinden foto-ayrışmasını indüklediği bilinmektedir. Bu foto-ayrışmanın sonucunda ona yarışmalı olan oksine yeniden Cox'a bağlanır ve hücresel solunumda artış gerçekleşir. Bu sayede hem hücresel solunum artmış olur hem de NO kaynaklı apoptoz önlenir [101].

### 2.6.3. Fotostimülasyona Karşı Hücresel Cevap

Fotostimülasyon uygulaması sonrasında indüklenen transkripsiyon faktörleri, sinyal ve efektör moleküllerinin oluşturduğu moleküler etkilerin sonucu olarak bir hücresel cevap oluşmaktadır. Bu hücresel yanıtlar hücre proliferasyonu, canlılığı, hücre göçü, apoptozu ve farklılaşması gibi etkileri içermektedir [102].



Şekil 2.13. Fotostimülasyonun hücreler üzerindeki etkileri [102].

Fotostimülasyonun insan keratinosit hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı ve yara iyileşme sürecini hızlandırdığı belirtilmektedir [103, 104]. Benzer şekilde ortak

kültürdeki keratinosit ve fibroblastlarda proliferasyonun ve hücre göçünün arttığı görülmüştür [105].

Fibroblast hücreleriyle yapılan bir çalışmada 830 nm dalga boyu, 5 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda fotostimülasyon uygulamasının fibroblast hücre göçünü, canlılığını, proliferasyonunu arttırdığı ve diyabetik yaralarda iyileşmeyi desteklediği belirtilmiştir [106].

Romatoid artrit hastalarından alınan fibroblast benzeri sinoviyositler (FLSs) ve kolajenle indüklenen artrit (CIA) ile yapılan bir çalışmada 610 nm dalga boyunda 5 ve 10 mW/cm<sup>2</sup> güç yoğunluğunda ışık uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda inflamasyon ve kırıldak bozulması azalmıştır, anti-artritik etkiler görülmüştür. Ayrıca fotostimülasyon uygulaması pro-inflamatuar sitokinleri azaltmıştır ve anti-inflamatuar sitokinleri arttırmıştır [107]. Wistar sıçanları kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada 660 nm dalga boyu, 1 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda, 10 mW/cm<sup>2</sup> fotostimülasyon uygulamasının kronik yaralarda iyileşme sürecine olumlu etkisi olduğu, ROS, sitokin ve trombosit agregasyon aktivitesini düzenlediği görülmüştür [108].

Primer insan keratinositleri ile yapılan başka bir çalışmada 520 nm ve 660 nm dalga boylarında ışık uygulanması sonucunda her iki ışığın da TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin mRNA ekspresyonu azalmıştır ve Nrf2 yolağı aktivasyonu artmıştır. Fotostimülasyonun cilt ile ilgili inflamatuvar hastalıklarda tamamlayıcı bir teröpatik yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır [109].

#### **2.6.4. Fotostimülasyon Parametreleri**

Fotostimülasyonun tedavi amaçlı kullanımında dalga boyu, enerji yoğunluğu, güç yoğunluğu, ışık kaynağı, ışınlama süresi ve uygulama süresi gibi parametreler bulunmaktadır. Bu parametreler tedavinin amacına göre farklılık göstermekle beraber uygun parametrelerin belirlenmesine göre çalışmanın sonuçları değişebilmektedir. Işığın biyolojik ve klinik etkilerinin optimize edilmesi için ışığın yoğunluğu, doz gibi önemli faktörlerin yanında başka parametreler de ışığın oluşturabileceği etkileri değiştirebilmektedir. Fotostimülasyon uygulamalarında kullanılan parametreler ve açıklamaları Çizelge 2.3'te verilmektedir:

Çizelge 2.3. Fotostimülasyon uygulamalarında kullanılan parametreler ve açıklamaları [100, 110].

Fotostimülasyon Parametreleri		
Işınlama Parametreleri	Birim	Açıklama
Dalga boyu	nm	Kromofor absorpsiyonunu ve penetrasyon derinliğini belirleyen en önemli parametrelerden biri “dalga boyudur”. Bu terim bir fotonun bir tam döngüsü sırasında kat ettiği mesafeyi belirtir. Elektromanyetik spektrumda geniş bir aralığa sahiptir. Bu spektrumda görünür ışık 400-700 nm arasındadır.
Yoğunluk	W/cm <sup>2</sup>	Hüresel aktivasyon eşiğini belirler. Birim alana (cm <sup>2</sup> ) uygulanan güç (W) olarak hesaplanmaktadır.
Sinyal	Pik gücü (W) Frekans (Hz) Sinyal genişliği (s)	Bir ışının ortalama gücü (W), pik gücü (W) x sinyal genişliği (s) x sinyal frekansı (Hz) olarak hesaplanır. Uygulama sırasında olası bir hasar oluşumunu engellenmesi ve termal enerjinin dağıtılması için önemlidir.
Işınlama Süresi	Saniye (s)	Genellikle minimum ışınlama süresi 2 dk ve üzeridir.
Enerji Yoğunluğu	J/cm <sup>2</sup>	Birim alana (cm <sup>2</sup> ) iletilen enerji (J) olarak hesaplanmaktadır.
Uygulama Aralığı	Saat, gün, hafta veya ay	Uygulama aralıkları tedaviye özgü olarak değişiklik göstermekte ve fotostimülasyon etkinliğini önemli ölçüde etkilemektedir.
Koherens	Koherens uzunluğu spektral bant genişliğine bağlıdır.	Fotonların benzer bir fazda ve aynı frekansta titreşim göstermesidir. Fotostimülasyonda kullanılan ışığın koherensi tedaviyi etkileyebilmektedir. Lazer ışığı yüksek koherens özelliğine sahiptir
Polarizasyon	Doğrusal veya dairesel polarize	Işığın titreşim yönünün belirli bir düzlemde sınırlanması veya dairesel şekilde dönmesidir. Polarize ışığın cilt gibi dağıtıcı ortamlardan daha iyi geçebildiği düşünülmektedir.

### 2.6.5. Fotostimülasyonun Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanımı

Diyabetin genellikle kan akışı ve hücrel fonksiyon üzerinde etkileri bulunduğundan dolayı düzenli aşamalarla ve belirli bir periyotta iyileşemeyen kronik yaraların oluşumuna yol açmaktadır. Diyabetik yaraların tedavisi için yara debridmanı, deri nakli, hiperbarik oksijen tedavisi, doku iskeleleri, kök hücre tedavileri ve son zamanlarda fotostimülasyon gibi non-invazif ışık tedavileri uygulanmaktadır. Fotostimülasyon uygulamasının iyileşme sürecine olumlu etkilerinin olduğu bilinmekle birlikte farklı parametrelerin iyileşmeye etkileri değişiklik göstermektedir. Farklı doz ve parametrelerin optimize edilmesi adına çalışmalar devam etmektedir.

Diyabetik ayak ülserlerinde (DFU) fotostimülasyonun etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan *in vivo* ve *in vitro* bir çalışmada 400-900 nm arasındaki 12 farklı dalga boyu 10 mW/cm<sup>2</sup> ve 0,5-4 J/cm<sup>2</sup>'de ışık uygulanmıştır. Hücrelerin proliferasyonunu teşvik ettiği, re-epitelizasyon, anjiyogenez ve kolajen sentezini arttırdığı ve inflamasyonu azalttığı görülmüştür [82]. Zhao ve ark., DFU tedavisinde 630 ve 810 nm dalga boylarındaki ışık kaynaklarını fare fibroblastları ve diyabetik fareler üzerinde uygulamışlardır. Her iki dalga boyundaki ışık da *in vivo* ve *in vitro* olarak fibroblast hücre göçü, proliferasyonunu arttırmıştır. Ayrıca iki dalga boyu da tip 2 diyabetik yaralarda iyileşmeyi, VEGF ve TGF ekspresyonlarını desteklemiştir [111]. Karkada ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik nöropati oluşturulmuş Wistar sıçanlarında yara açılmış, 655 ve 808 nm dalga boylarında 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 J/cm<sup>2</sup> dozlarında ışık uygulaması yapılmıştır. İyileşmenin farklı fazlarında değerlendirme yapılmıştır ve ışığın 4,6, 8 J/cm<sup>2</sup> dozlarında yara iyileşme sürecinin daha iyi olduğu, ROS ve antioksidan seviyelerini modüle ederek yaranın oksidatif durumunu iyileştirilmiştir [112].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, bu çalışmaların sonuçları ve kullanılan malzemeler ile ilgili bilgi verilmektedir. Tez çalışmasının ilk aşamasında *in vitro* 2-boyutlu hiperglisemik ülser modelinin oluşturulmuştur.

Buna göre hazırlanmış olan 2-boyutlu hiperglisemik modellerde fotostimülasyon uygulamasının hücre proliferasyonu, göçü, ECM elemanları, tübül oluşumu ve gen ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu aşamadan sonra çalışmanın 3-boyutlu aşamasına geçilmiştir ve bu doğrultuda iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen iskelelerde hiperglisemik koşulların belirlenmesi adına hücre ekimi yapılarak analiz edilmiştir. 3-boyutlu hiperglisemik modeller oluşturulduktan sonra ise iskelelere hücre ekimi yapıp fotostimülasyon uygulanmıştır. Ardından bu modellerde fotostimülasyonun etkilerini incelemek amacıyla proliferasyon ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan insan dermal fibroblast hücreleri (HDF) Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir. İnsan dermal keratinosit hücreleri (HS2) Ege Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden temin edilmiştir. İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel hücreleri (HUVEC) ise Çukurova Üniversitesinden temin edilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan diğer kimyasal ve biyolojik malzemeler ise Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler.

Malzeme	Firma	Ülke
Alexa Fluor 488	Life Technologies	ABD
Asetik asit	Sigma-Aldrich	Almanya
BSA (Sığır Serum Albumini)	Capricorn Scientific	Almanya
DAPI	Sigma-Aldrich	ABD
D-Glukoz	Capricorn Scientific	Almanya
DMEM/F12	WISENT Inc.	Kanada

DMEM-HG	Capricorn Scientific	Almanya
DMEM-LG	Cegrogen Biotech	Almanya
DMSO	AppliChem GmbH	Almanya
Eosin Y	Merck	Almanya
Etil alkol	Sigma-Aldrich	ABD
FBS	Sigma-Aldrich	Almanya
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich	Almanya
HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)	Merck	Almanya
İzopropil alkol	Sigma-Aldrich	ABD
Jelatin (Tip A)	Sigma-Aldrich	Almanya
Kitosan (%75-85)	Sigma-Aldrich	Almanya
L-Glutamin	Biowest	Fransa
Matrigel Matriks	Corning	ABD
MTT	Sigma-Aldrich	Almanya
PCL	Sigma-Aldrich	Almanya
Penisilin/streptomisin	Capricorn Scientific	Almanya
RPMI 1640	Capricorn Scientific	Almanya
Steril DPBS	Capricorn Scientific	Almanya
Tripsin EDTA	Sigma-Aldrich	ABD
Triton X-100	Merck	Almanya

### 3.2. İnsan Dermal Fibroblastların, Keratinositlerin ve Endotel Hücrelerinin Kültürü

Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen HDF hücreleri %10 (v/v) FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM-HG besiyeri içerisinde kültürlenmiştir.

Çukurova Üniversitesinden temin edilen HUVEC hücreleri, %10 (v/v) FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde kültürlenmiştir.

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden temin edilen HS2 hücreleri ise %10 (v/v) FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde çoğaltılarak hücre stokları oluşturulmuştur. Hücreler, tüm kültür çalışmaları boyunca 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> bulunduran inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan hücrelerin daha önce yapılan çalışmalarda [113, 114] karakterizasyonları gerçekleştirilen ve kullanılan hücreler olduğundan bu tez çalışmasında doğrudan hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

### **3.3. İki Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları**

Sunulan tez çalışmasının 2-boyutlu hiperglisemi modelleri üzerinde yapılan çalışmalar ve yöntemleri bu bölümde yer almaktadır. 2-boyutlu hiperglisemi çalışmalarının başlangıcında HDF, HS2 ve HUVEC hücrelerinin kültürü ve hiperglisemik koşullarının belirlenmesi yer almaktadır. Daha sonrasında hiperglisemik koşullardaki bu hücelere yapılan fotostimülasyon uygulamasının ve hücre proliferasyonu, morfolojisi, ECM elemanları, hücre göçü ve anjiyogenez üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan analizler yer almaktadır.

#### **3.3.1. Hiperglisemi Koşullarının Belirlenmesi**

Fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerinde diyabetik ülser modellerinin oluşturulması için, hücreler kültür kaplarına ekilmiştir. Hiperglisemik ortamlar, belirlenen miktarlarda glikozun her hücrenin kendi besiyerine eklenmesi ile oluşturulmuştur.

Her hücreye 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM olmak üzere 6 farklı dozda glikoz içeren konsantrasyonlar uygulanmıştır. Bu konsantrasyonlar içerisinde 10 mM glikoz içeren besiyeri ise kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Hücrelerin proliferasyonlarının incelenmesi için 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda MTT (3 (4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-dinefiltetrazolyum bromür) analizi yapılmıştır.

##### **3.3.1.1. Hücre Proliferasyonunun Analizi**

Belirlenen glikoz konsantrasyonlarının hücelere uygulanması amacıyla HDF, HS2 ve HUVEC hücreleri, 96 gözlü hücre kültür kaplarına her bir göze  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 200 µL besiyeri ile ekilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra 1 gün bekletilmiştir ve daha önce belirlenmiş olan 7 farklı glikoz konsantrasyonu, her bir kuyucuğa 200 µL içeren besiyeri ile eklenmiştir.

Bu konsantrasyonların eklenmesini takiben 24, 48 ve 72. saatlerde ışık mikroskobu ile hücre morfolojileri incelenmiştir ve MTT analizleri yapılarak hücre canlılıkları ölçülmüştür.

### **MTT Analizi**

Hücrelerin proliferasyonunun ve sitotoksitesinin değerlendirilmesi için MTT ([3(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-dinefiltetrazolyum bromür]) testi yapılmıştır. Sarı bir tetrazolyum tuzu olan bu bileşik, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından indirgenerek mor renkli formazan kristalini oluşturur. Cansız hücrelerde mitokondriyal aktivite olmadığından dolayı tetrazolyum boyasında değişiklik gerçekleşmemektedir.

Hücreler kültür ortamında hiperglisemik koşullara alındıktan sonra proliferasyonunu ölçülmesi için kontrol gruplarına ve farklı dozlardaki hiperglisemik konsantrasyonlu gruplara 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için öncelikle kültür kaplarındaki besiyeri uzaklaştırılıp %10 oranında MTT (2,5 mg/ml PBS) içeren serumsuz besiyeri kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. Ardından hücreler 4 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren karanlık ortamda inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda hücrelerin üzerine eklenen boya uzaklaştırılıp her kuyucuğa 100 µl izopropil alkol eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır ve 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunarak hücre canlılığı ölçümleri yapılmıştır.

### **3.3.2. Fotostimülasyon Çalışmaları**

Çalışma kapsamında, hiperglisemik ortamlarda kültürlenmiş HDF, HS2 hücrelerine fotostimülasyon uygulamasının hücre proliferasyonu, morfolojisi ve ECM elemanları üzerindeki etkileri incelenmiştir. HUVEC hücrelerinde ise tübül oluşumu ve gen ekspresyon seviyelerinin incelenmesi amacıyla analizler gerçekleştirilmiştir.

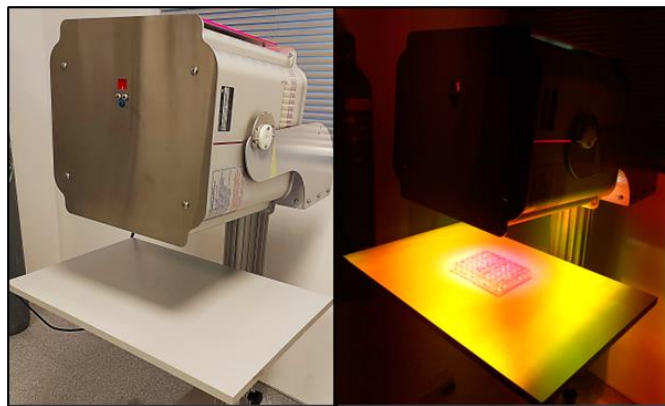
Bu doğrultuda gerçekleştirmiş olduğumuz hiperglisemik koşulların belirlenmesi çalışmaları değerlendirilerek bundan sonraki analizlerde 125 ve 150 mM glikoz konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

Öncelikle HDF ve HS2 hücrelerinin ayrı 24 gözlü hücre kültür kaplarına  $2,5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Bu ekimi takiben 1 gün sonra hücreler, daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan 125 ve 150 mM glikoz konsantrasyonundaki hiperglisemik ortamlara alınmıştır. HDF hücrelerinde DMEM-LG ve HS2 hücrelerinde

DMEM/F12 ortamı ile inkübe edilen gruplar ise kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Bir gün sonrasında fotostimülasyon uygulamasında kullanılacak olan PAC (Plazma ark) cihazı belirlenen parametrelere göre hazırlanmıştır ve ışık uygulamalarına başlanmıştır. Parametreleri 20 cm uygulama mesafesi ve 3 dk uygulama süresi ile uygulama sıklığı gün aşırı periyotlarda olacak şekilde tekrarlanmıştır. Tüm analizler bu prosedürde gerçekleştirilmiştir. Son olarak hücrelerde MTT analizi, immüno Floresan boyama, immüno sitokimyasal boyama, scratch analizi, RT-PCR analizleri yapılmıştır ve tübül oluşumu incelenmiştir.

### 3.3.2.1. Fotostimülasyon Uygulama Sisteminin Hazırlanması

Fotostimülasyon çalışmaları için Collagentex® firmasına ait plazma ark lambası 685 W çıkış gücü, 600-1200 nm dalga boyu arasında polikromatik ışık kaynağı olarak kullanılmıştır. Cihaz, FDA onaylı filtre ve reflektör sistemine sahiptir ve belirtilen dalga boylarının dışında kalan dalga boylarındaki ışık emisyonlarını engellemektedir. Çalışmadaki fotostimülasyon parametrelerinde uygulama mesafesi 20 cm olarak belirlenmiştir. Uygulama süresi ise çalışmanın 2-boyutlu aşamalarında 3 dk; 3-boyutlu aşamalarında ise 7 dk olarak belirlenmiştir. Işık uygulaması sırasında kültür kabındaki hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri alınıp %1 oranında penisilin/streptomisin içeren ve 34°C'ye getirilmiş olan PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir. Işık uygulaması bittikten hemen sonra aynı besiyerleri tekrar kuyucuklara eklenip kültüre devam edilmiştir. Fotostimülasyon parametreleri daha önce grubumuzda gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında belirlenmiştir [115, 116].



Şekil 3.1. Collagentex® cihazı ile kurulmuş fotostimülasyon sistemi

### 3.3.2.2. Hücre Proliferasyonunun Analizi

Fotostimülasyon uygulamasının hiperglisemik ortamdaki HDF ve HS2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

Işık uygulanan ve uygulanmayan hücelere kültürün 1, 3, 5 ve 7. günlerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için öncelikle 24 gözlü kültür kaplarındaki hücrelerin üzerinden besiyerleri alınmıştır. HDF hücreleri için serum içermeyen DMEM-LG ve HS2 hücreleri için serum içermeyen DMEM/F12 besiyerinden her bir göze 600 µL eklenmiştir. Üzerlerine 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklendikten sonra 3 saat boyunca karanlık ortamda ve 37°C’de inkübe edilmiştir. 3 saat sonunda hücrelerdeki besiyeri uzaklaştırılıp tüm gözlere 400 µL izopropil alkol eklenip pipetaj yapılmıştır. Ardından ölçüm alınabilmesi için 96 gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır. Son olarak okuyucusuna 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır.

### 3.3.2.3. İmmünofloresan Boyama

HDF ve HS2 hücrelerinin, ekiminden sonraki 7. günde morfolojik olarak incelenmiştir. Bu doğrultuda filamentöz aktin (F-aktin) Alexa Fluor 488 phalloidin ile çekirdekleri ise DAPI ile boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

HS2 ve HDF hücreleri ayrı ayrı 24 gözlü hücre kültür kaplarına, kuyucuk başına  $2,5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden sonra kontrol grubunda hücreler, glikoz ilavesi yapılmamış besiyerinde inkübe edilmiştir ve hiperglisemik gruplarda ise 125 mM ve 150 mM konsantrasyonlarındaki besiyerlerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürün belirlenen günlerinde boyama işlemini gerçekleştirmek için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Hücre yapısı ve aktin filamentlerinin korunması amacıyla %4'lük (v/v) paraformaldehit çözeltisi ile fikse edilmiştir. Fikse edilen hücrelerin hücre zarı geçirgenliğinin artırılarak boyayı içine almasını sağlamak amacıyla 5 dk boyunca %0,1 (v/v) Triton X-100 çözeltisinde bekletilmiştir. Hücre zarı geçirgen hale getirilmiş olan hücrelerin aktin filamentleri Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika süresince ve hücre çekirdekleri %0,1 DAPI ile 5 dakika süresince boyanmıştır. Ardından fazla boyanın alınması için PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra floresan mikroskop altında görüntülenerek analiz edilmiştir.

### 3.3.2.4. İmmünohistokimyasal Boyama

HDF hücrelerinin, ekiminden sonraki 7. günde hücre dışı matrikste (ECM) oluşabilecek değişimlerin incelenmesi amacıyla immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Bu doğrultuda temel ECM elemanlarından fibronektin ve kolajenin boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Hücreler, Bölüm 3.3.2'te anlatılan prosedür ile muamele edildikten sonra ekimin 7.gününde üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılıp DPBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %10 nötral buffered formalin ile 20 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilerek fiksasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonunda PBS ile 3 kere yıkanmıştır.

Fikse edilmiş hücrelerin üzerine %0,2'lik Triton X-100 (v/v, PBS içerisinde) eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek hücrelerin zar geçirgenliği artırılmıştır. Bloklama için ise %10 keçi serumu (v/v, PBS içerisinde) eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %1 BSA'lı (w/v) PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra primer antikolar %1 BSA'lı PBS ile seyreltilerek (fibronektin, 1:800, ve kolajen 1A1, 1:200) örnekler üzerine eklenmiştir ve 1 gün süresince 4°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda primer antikolar uzaklaştırılıp %1 BSA'lı PBS ile 3 kere yıkanmıştır. Ardından sekonder antikolar %1 BSA'lı PBS ile seyreltilerek (Alexa Fluor® 488, 1:500 ve Alexa Fluor® 555, 1:500 oranında) örneklerin üzerine eklenmiştir. 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. %1 BSA'lı PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra %0,1'lik (v/v, BSA'lı PBS içerisinde) DAPI ile 5 dk inkübe edilmiştir. Son olarak 3 kere %1 BSA'lı PBS ile yıkandıktan sonra görüntüleme işlemine geçilmiştir.

### 3.3.2.5. Hücre Göçü Analizi

Hücrelerin normal ve hiperglisemik ortamdaki hücre göçünü inceleyebilmek amacıyla scratch (çizik) analizi yapılmıştır. Fibroblast ve keratinosit hücreleri 24 gözlü hücre kültür kaplarına kuyucuk başına  $2,5 \times 10^4$  hücre ekim yapılmıştır. Ekimden 1 gün sonra bu hücreler kontrol ve hiperglisemik ortam olacak şekilde gruplandırılarak inkübe edilmiştir. Hiperglisemik ortama geçtikten 1 gün sonra ışık uygulaması yapılmıştır ve gün aşırı olarak tekrar edilmiştir. Hücreler konfluent hale geldikten sonra hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri toplanmıştır ve PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 100 µL'lik bir steril pipet ucu yardımıyla hücrelerin bulunduğu kuyucukların tabanına doğrusal bir şekilde çizik oluşturulmuştur. Çizik oluşturulduktan hemen sonrasında hücrelerin besiyeri %1 FBS içerecek şekilde yenilenmiştir. Hücre göçü çalışmalarının sınırlı bir yüzey alanı

üzerinde gerçekleştirilmesi nedeniyle kültürün 24 ve 48. saatlerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çizik alanı üzerindeki % kapanma alanı Image J programı ile hesaplanmıştır.

### **3.3.2.6. Tübül Oluşum Analizi**

Yara iyileşmesinin anjiyogenez aşamasında önemli bir rol oynayan HUVEC hücrelerine, normal ve hiperglisemik koşullarda fotostimülasyon uygulaması yapılmasının nasıl bir etki gösterdiğini incelemek amacıyla morfolojik bir analiz gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin tübül oluşumunu incelemek için hücreler 24 gözlü kültür kaplarına  $2,5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Ekimden 1 gün sonra hiperglisemik ortama geçilmiştir. Bir gün sonra ışık uygulamasına başlanmıştır ve gün aşırı olacak şekilde devam edilmiştir. Hücreler yeterli konfluense geldikten sonra tübül oluşumu, Matrigel kullanılarak analiz edilmiştir. Analizden 1 gün önce Matrigel  $4^\circ\text{C}$ 'de bekletilerek sıvı forma getirilmiştir. Normal şartlarda Matrigel,  $-20^\circ\text{C}$ 'de donmuş olarak saklanmaktadır ve analizde kullanılacak pipet uçları ve kültür kapları da yaklaşık 3-4 saat öncesinde  $-20^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Analiz gerçekleştirilirken laminer akışlı kabin içerisinde buz üzerinde çalışılmıştır. Kültür kaplarına ekim yapılmadan öncesinde 96 gözlü kültür kabının kuyucuklarına 50  $\mu\text{L}$  Matrigel eklenip  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilerek jel forma geçmesi sağlanmıştır. 24 gözlü kaplarındaki HUVEC hücreleri tripsinle kaldırılarak kuyucuklarda bulunan Matrigel üzerine HUVEC hücrelerinin 100  $\mu\text{L}$  besiyeri ile  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Tübül oluşumunu gözlemlemek amacıyla 5. saat sonunda mikroskop görüntüleri alınmıştır.

### **3.3.2.7. Gen Ekspresyonu Analizi**

HUVEC hücrelerinde fotostimülasyon uygulamasının anjiyogenik etkilerinin incelenmesi amacıyla RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir ve bu doğrultuğa anjiyogenezden sorumlu olan, VEGF ve PDGF genlerinin ekspresyon seviyelerinin takibi yapılmıştır.

Öncelikle HUVEC hücreleri 24 gözlü kültür kaplarına  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Ekimden gün sonrasında hiperglisemik ortama geçilmiştir. Hiperglisemik ortama geçtikten 1 gün sonra ise fotostimülasyon uygulamasına başlanmıştır. Gün aşırı olacak şekilde uygulandıktan sonra kültürün 7. gününde RT-PCR için hücreler tripsin ile kaldırılmıştır ve D-PBS ile yıkanmıştır. Hücre pelletleri halinde Eppendorf içerisinde analizin gerçekleştirileceği güne kadar  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Analiz prosedürünün ilk aşamasında total RNA'nın izole edilmesi amacıyla öncelikle hücre peletleri -80°C'den alınıp üzerlerine 500 µL trizol eklenmiştir. Örnekler 10-20 s vortekslenip 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından örneklerin üzerine 100 µL kloroform eklenmiştir ve alt-üst edilip çalkalandıktan sonra 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 13000 rpm'de 4°C'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra tüplerde faz ayrımları görülmüştür ve yüzeyde kalan şeffaf fazdaki RNA'lar tüplerden pipet yardımıyla toplanıp farklı tüplere aktarılmıştır. Bu fazdan alınan miktarla aynı miktarda olacak şekilde RNAaz içermeyen %70 (v/v) etil alkol üzerlerine eklenmiştir. RNA izolasyonuna Qiagen RNAeasy mini kiti kullanılarak devam edilmiştir ve kitin içerisinde bulunan tamponlar kullanılarak kendi protokol basamakları takip edilmiştir. Prosedürün son basamağında RNA molekülleri, 50 µL RNAaz içermeyen su ile kapaklı tüplere alınmıştır. Elde edilen RNA'nın miktar ve saflık ölçümlerinin yapılması için Nanodrop 2000c (Thermo Scientific™, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Analizin diğer aşamasında ise elde edilen RNA'lardan eşit miktarda alınıp High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kit (Thermo Scientific™, ABD) ve protokolü takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinin reaksiyon basamakları 25°C'de 10 dk, 37°C'de 2 sa ve 85°C'de 5dk olarak Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak uygulanmıştır. İşlem sonunda 4°C'de bekletilmiştir.

cDNA'ların sentezi gerçekleştirildikten sonra RT-PCR'da kullanılacak olan reaksiyon karışımı Eva Green® Master Mix, ileri ve geri primerler kullanılarak hazırlanmıştır. Karışımlara cDNA örnekleri aynı miktarlarda olacak şekilde eklendikten sonra cihazın PCR analiz başlatılmıştır.

Bu analiz kapsamında β-Aktin geni house keeping gen olarak kullanılarak VEGF ve PDGF genlerinin ekspresyonları incelenmiştir.

### **3.4. Üç Boyutlu Hiperlisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları**

Sunulan tez çalışmasının 3-boyutlu çalışmalarında kullanılan PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretim koşullarının belirlenmesi, karakterizasyon çalışmaları ve hücre kültüründe kullanılan parametrelerin optimizasyonu Hacettepe Üniversitesi Doku Mühendisliği grubu tarafından yapılan çalışmalarca tamamlanmıştır.

Doku iskelelerinin üretimi, sonrasında bu iskeleler üzerinde yapılan hiperglisemi ve fotostimülasyon uygulaması ile ilgili gerçekleştirilen analizler, yöntemler bu bölümde yer almaktadır.

### **3.4.1. Doku İskelelerinin Üretimi**

Tez çalışması kapsamında iki katmanlı doku iskelelerinin epidermisi temsil eden PCL katmanı elektroğirme yöntemi ile, dermisi temsil eden kitosan-jelatin katmanı ise dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiştir.

#### **3.4.1.1. PCL Doku İskelelerinin Üretilmesi**

İki katmanlı doku iskelesinin ilk katmanı, elektroğirme tekniği ile cildin epidermal tabakasını taklit eden bir yapı oluşturulmuştur.

Bu katmanın hazırlanması için PCL peletleri kütlece %12 oranında olacak şekilde HFIP (1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol) ile çözündürülerek 5 mL'lik bir çözelti hazırlanmıştır ve 1 gün boyunca karışmaya bırakılmıştır.

Daha sonra bu çözelti, belirli parametreler dikkate alınarak elektroğirme yöntemi ile nanofibröz membranlara dönüştürülme aşamasına geçilmiştir. Çalışmada kullanılan elektroğirme parametreleri akış hızı 1,8 mL/sa ve voltajı 16 kV, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe de 15 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra elektroğirme işlemi için hazırlanan PCL çözeltisi 5 ml'lik bir şırıngaya alınarak şırınga pompasına yerleştirilmiştir. Yaklaşık 3 saat boyunca belirlenen parametrelerde eğirme işlemi yapılarak elde edilen fiberler metal levha üzerine yerleştirilmiş alüminyum folyoda toplanmıştır. İşlem sonunda alüminyum folyoya toplanan fiberler 12 mm çapında dikkatlice kesilmiştir.

#### **3.4.1.2. İki Katmanlı PCL / Kitosan-jelatin Doku İskelesinin Üretimi**

İskelelerin iki katmanlı hale getirilmesi için daha önce hazırlanmış olan PCL katmanına, cildin dermis tabakasını taklit edecek olan kitosan-jelatin tabakasının hazırlanması ve katmanların birbirine entegrasyonu sağlanmıştır. Doku iskelesinin kitosan-jelatin katmanının üretimi daha önce grubumuzda gerçekleştirilen bir çalışmada belirlenen parametreler temel alınarak gerçekleştirilmiştir [117].

Öncelikle daha önce elektroğirme yöntemiyle üretilmiş ve 12 mm çapında kesilmiş olan PCL tabakaları alüminyum folyolu tarafı kuyucukların tabanına bakacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiştir.

Daha sonra kitosan çözeltisi %2 (w/v) 0,2 M asetik asit çözeltisi içerisinde 1 gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak elde edilmiştir. Aynı zamanda %2 (w/v) jelatin çözeltisi de 50°C'de distile su içerisinde çözündürülmüştür ve manyetik karıştırıcıda 1 gün bekletilerek elde edilmiştir. Her iki çözelti de 1 gün sonrasında elde edildikten sonra hacimce 3:1 (kitosan:jelatin) olacak şekilde birleştirilmiştir ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışması sağlanmıştır.

3 saat sonunda hazırlanmış olan kitosan-jelatin çözeltisine %1 glüteraldehit (v/v) çözeltisi eklenerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hemen sonrasında ise 24 gözlü kültür kaplarında bulunan PCL katmanlarının üzerlerine 2 mL olacak şekilde enjektör yardımı ile eklenmiştir. Ardından sırasıyla 4°C'de 1 gün boyunca, -20°C'de 1 gün ve ertesi gün -80°C'de 1 gün boyunca bekletilmiştir. Ertesi gününde ise iskeleler liyofilizatöre alınıp 3 gün boyunca kurutulmuştur.

Son olarak üretilen bu iskelelerin stabilize edilmesi amacıyla %96'lık (v/v) etanol çözeltisinde 2 gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra PBS içerisinde 2 gün ve distile su içerisinde 1 gün bekletilerek iskelelerden yapıya katılmayan glüteraldehitin ve safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra iskeleler liyofilizatörde 1 gün boyunca tekrar kurutulmuştur.

### **3.4.2. Hiperglisemik Koşullarının Belirlenmesi**

3-boyutlu çalışmalarda kullanılacak olan iki katmanlı PCL/ kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretimi tamamlandıktan sonra iskelelerde hiperglisemik koşulların belirlenmesi amacıyla çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada öncelikle iskelelerin kültürden önce sterilizasyon işlemleri yapılmıştır. Sterilizasyon işlemi için iskeleler öncelikle vakumlu etüv içerisinde %70'lik etanolde 1 saat bekletilerek etanolün gözeneklerin içerisine nüfuz etmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu iskeleler etanol içerisinde çıkarılmıştır ve üzerinde kalan fazla etil alkolün alınması için steril PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır.

İskeleler, 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirilip PCL katmanı 15 dk ve sonrasında kitosan-jelatin katmanı 30 dk boyunca UV altında bekletilmiştir. Ardından sterilize olan doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanına HDF hücreleri  $2 \times 10^5$  hücre/iskele olacak şekilde 30 µL besiyeri (DMEM-LG) ile ekilmiştir. Hücrelerin iskele yüzeyine tutunması ve iskelelerin kurumaması için 30-40 dakikada bir 20 µL besiyeri kuyucuklara ilave

edilmiştir ve 3 saatin sonunda her bir göze 1,5 ml besiyeri eklenmiştir ve 37°C’de inkübe edilmiştir.

Ekimi takiben 3 gün sonrasında iskelelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp diğer yüzündeki PCL katmanına HS2 hücreleri  $2 \times 10^5$  hücre/iskele olacak şekilde 30 µL besiyeri (DMEM/F12) ile ekilmiştir. Ekimden sonra saat başı 20 µL besiyeri eklenmiştir ve 3 saatin sonunda daha önce oranları belirlenmiş olan ko-kültür besiyerleri 1,5 ml olacak şekilde eklenerek 1 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gününde ise hiperglisemik ortama geçilmiştir. Kontrol grubu yalnızca DMEM/F12 : DMEM-LG (3:1) ko-kültür besiyeri ile ortamı yenilenirken hiperglisemik grupların besiyerleri 125 mM ve 150 mM glikoz konsantrasyonunda ko-kültür besiyeri hazırlanarak ortamı yenilenmiştir. Hiperglisemik ortama geçildikten sonraki 1, 3 ve 7. günlerde ise MTT testi yapılarak iskele üzerinde bulunan hücrelerin proliferasyonları incelenmiştir.

#### **3.4.2.1. Proliferasyon Analizi**

İskelelerde bulunan hücrelerin proliferasyonun analiz edilmesi için kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Analizin gerçekleştirilmesi aşamasında öncelikle iskelelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp iskelelerin PCL ve kitosan-jelatin katmanları steril pens yardımı ile birbirinden ayrılmıştır. Ayrı gözlere yerleştirilen iskele katmanları üzerine serumsuz besiyeri kullanılarak hazırlanan MTT çözeltisi eklenmiştir. 3 saat boyunca karanlıkta 37°C’de inkübe edildikten sonra iskeleler üzerindeki MTT çözeltisi uzaklaştırılarak 400 µL izopropil alkol ile formazan kristalleri çözdürülmüştür. Daha sonra 96 gözlü kültür kaplarına aktarılarak absorbans değerleri ölçülmüştür.

#### **3.4.3. Fotostimülasyon Çalışmaları**

Doku iskelelerinde fotostimülasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi için öncelikle Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde sterilizasyon işlemleri, hücre ekimi ve hiperglisemi koşulları uygulanmıştır. Hiperglisemik ortama geçildikten 1 gün sonrasında fotostimülasyon, yani ışık uygulamasına geçilmiştir. Işık uygulamadan hemen öncesinde iskelelerin üzerinde bulunan besiyerleri yeniden aynı gözlerde kullanılmak üzere atılmadan ayrı ayrı tüplere alınmıştır. Ardından %1 penisilin/streptomisin içeren PBS 33°C’de bekletilmiştir ve kuyucuklara 500 µL olacak şekilde eklenmiştir. PBS içerisindeki iskelelere 7 dk boyunca ışık uygulanmıştır ve her bir grubun daha önce ayrılmış olan besiyeri yeniden gözlere eklenerek kültürün devamlılığı sağlanmıştır. Bu

prosedürü takip ederek gün aşırı olacak şekilde ışık uygulanmıştır. Işık uygulamaları devam ederken proliferasyon ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.3.1. SEM Analizi**

Hücrelerin iskele üzerindeki canlılığı, hücre-hücre etkileşimleri, hiperglisemik koşullarda fotostimülasyon maruziyetinin etkilerini incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda iskeleler Bölüm 3.4.2 ve Bölüm 4.2.3'te anlatıldığı şekilde iskelelerin kültür için hazırlanması, her iki katmana hücre ekimi ve aynı prosedürde ışık uygulamaları gerçekleştirilmiştir. İskelelerin hiperglisemik ortama alınmasından sonraki 7. günde ise hücreler SEM analizi için fikse edilmiştir. Fiksasyon için iskelelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra üzerlerine %2,5'lük (v/v) glutaraldehit eklenerek 30 dk boyunca karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra örnekler PBS içerisinde 4°C'de analiz gününe kadar bekletilmiştir. Fikse edilen hücrelere SEM analizi öncesinde susuzlaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla hücreler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100 (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilmiştir. Ardından %100 HMDS (Hekzametildisilazan) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. HMDS uzaklaştırıldıktan sonra örnekler çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler altına kaplama işlemi yapılmıştır ve SEM ile görüntüleri alınmıştır.

#### **3.4.3.2. Proliferasyon Analizi**

İskelelerde bulunan hücrelerin proliferasyonun analiz edilmesi için kültürün 1., 3., 5. ve 7. günlerinde ışık uygulanan ve uygulanmayan gruplar için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT analizi Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ancak iskele katmanları birbirinden ayrılmadan toplam hücre canlılığına bakılarak ölçüm alınmıştır.

#### **3.4.4. İstatistiksel Analiz**

Tez çalışmasında, analiz sonuçları GraphPad Software Prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmelerde one-way veya two-way ANOVA ve Tukey Pos Hoc testi kullanılmıştır. Analizlerde *p*-değerinin 0.05'ten az olduğu sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçları verilmiş olup bu sonuçlar, literatürde yer alan çalışmalar ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

Öncelikle çalışmanın 2-boyutlu analizlerinde kullanılan HDF, HS2 ve HUVEC hücreleri ile hiperglisemik model oluşturulması ve bununla ilgili olarak hücre canlılık analizlerinin sonuçları verilmiş ve yorumlanmıştır. Daha sonra oluşturulan 2-boyutlu modellerde fotostimülasyon uygulamalarının hücre proliferasyonu, göç, tübül oluşumu ve hücre morfolojisi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Son olarak ise, 3-boyutlu modellerin oluşturulması için iskelelerin üretim yöntemleri ve karakterizasyonu ile ilgili analiz sonuçları verilmiştir. Ardından bu 3-boyutlu ortamda hiperglisemik koşulların belirlenmesi ve bu koşullardaki fotostimülasyon çalışmalarına dair analizler sonuçları verilerek literatürdeki bilgiler ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

### 4.1. İki Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları

#### 4.1.1. Hiperglisemi Koşullarının Belirlenmesi

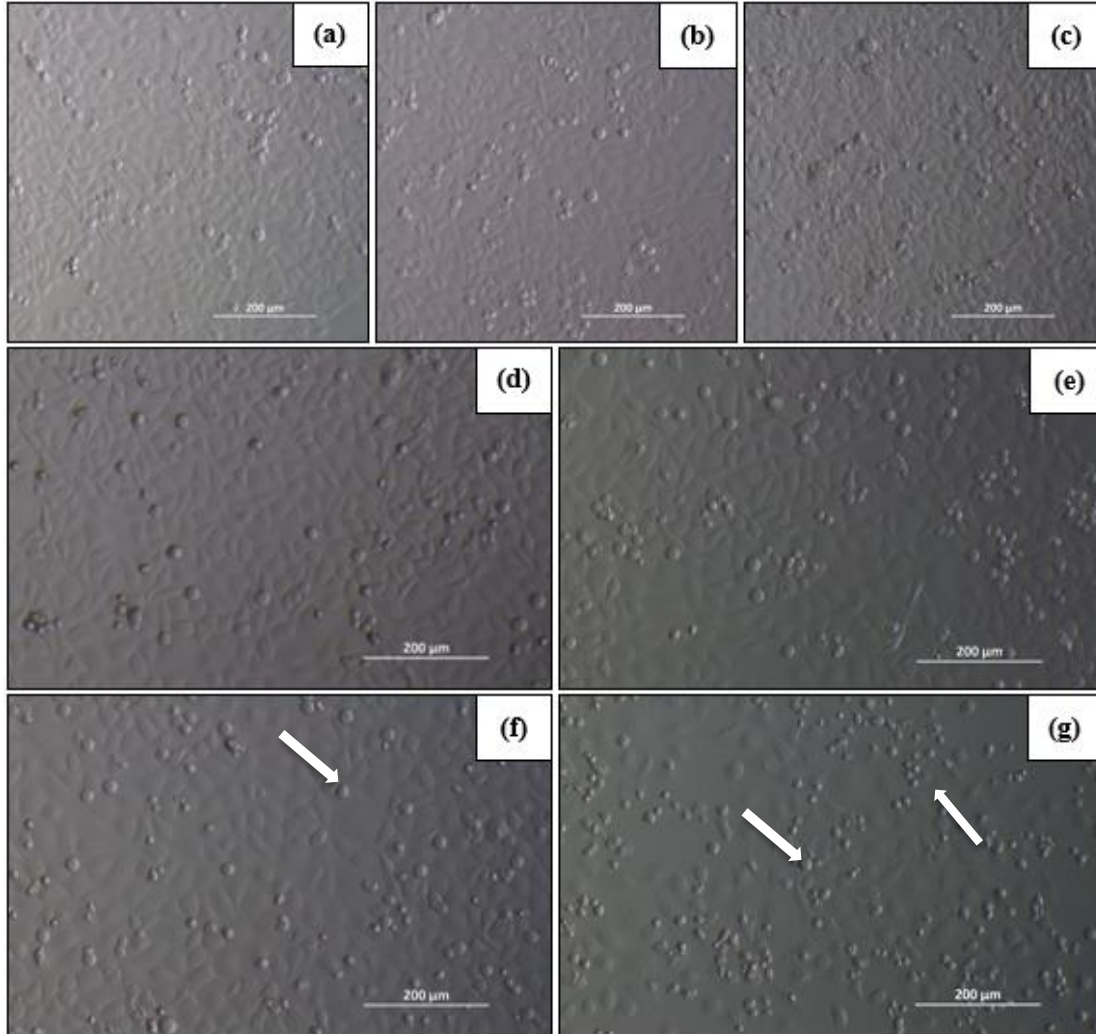
Çalışmanın tüm aşamalarında sağlıklı sonuçlar alınabilmesi için hiperglisemik modelin oluşturulması ve bunun stabilizasyonun sağlanması son derece önem arz etmektedir. Bu nedenle, bu aşamada HDF, HS2 ve HUVEC hücreleri için geniş bir glukoz konsantrasyon aralığı belirlenerek çalışılmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarında hücrelerde meydana gelen değişiklikler aşağıda verildiği şekilde değerlendirilmiştir.

##### 4.1.1.1. Hücrelerin Morfolojilerinin İncelenmesi

HDF, HS2 ve HUVEC hücrelerindeki morfolojik değişimler, normal (10 mM glukoz) ve hiperglisemik (25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM glukoz) koşullarında inkübasyonun 24., 48., ve 72. saatlerinde inverted mikroskop altında incelenmiş ve sonuçlar her bir hücre için aşağıda verilmiştir. Ayrıca 10 mM normal glukoz konsantrasyonu kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

### HS2 Hücreleri

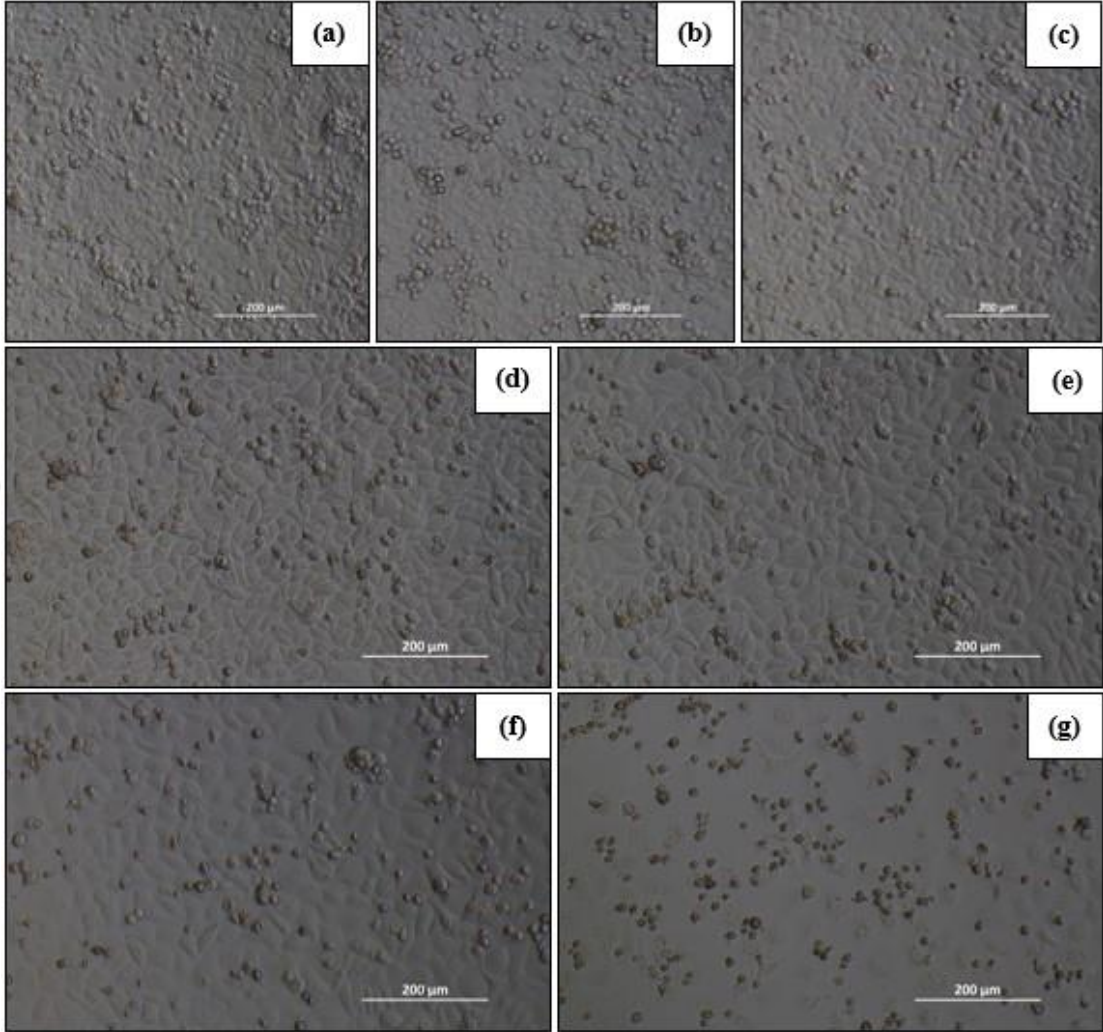
Hücre morfolojilerine ait inverted mikroskop görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.1. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri. Beyaz oklar yuvarlak morfolojideki hücreleri göstermektedir (Büyütme: 10x).

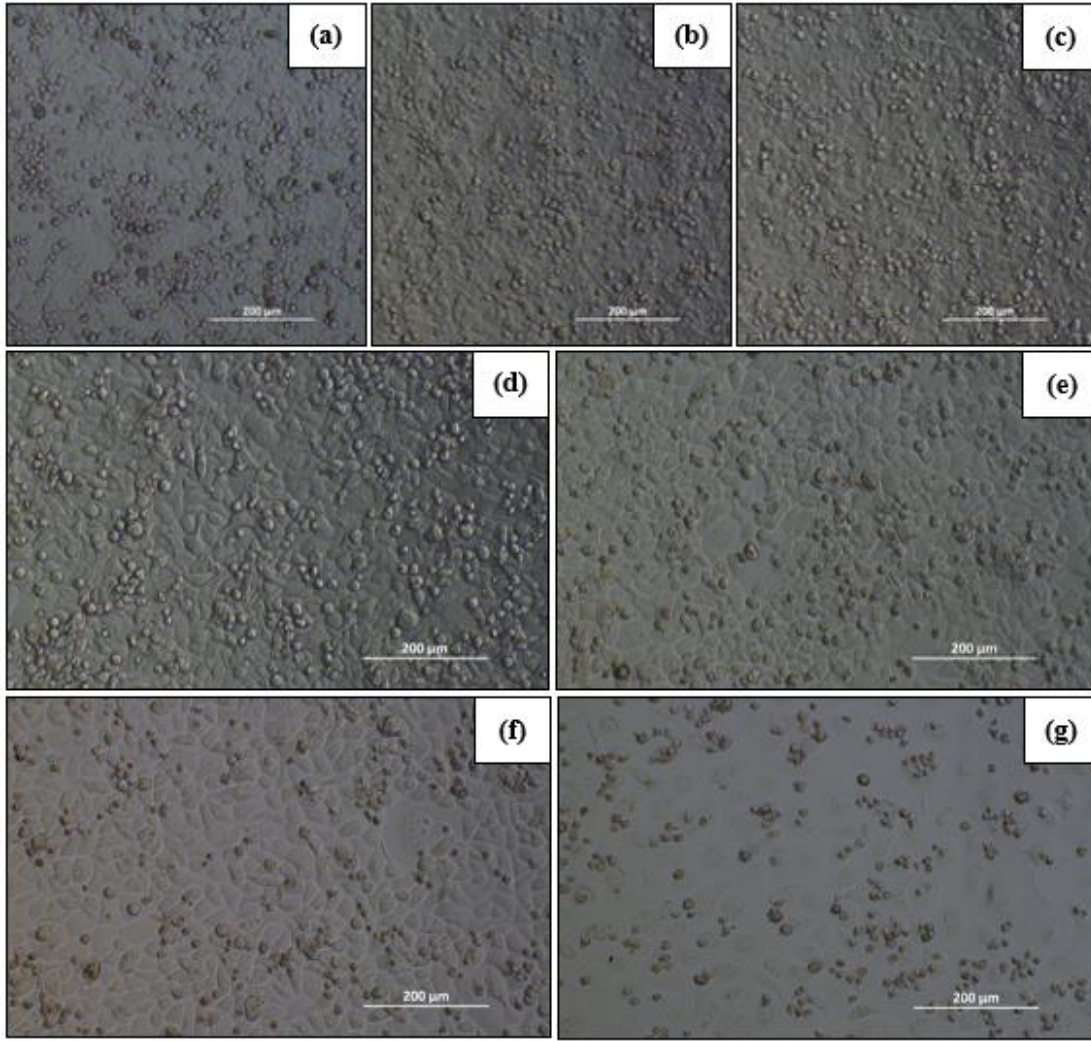
İnkübasyonun 24. saatinde hücre morfolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte (Şekil 4.1. a-e); 125 ve 150 mM glikoz konsantrasyonunun kullanıldığı iki grupta, morfolojinin bozularak standart kaldırım taşı

keratinosit görüntüsünden daha farklı yuvarlak morfolojide hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.1. f ve g).



Şekil 4.2. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnkübasyonun 48. saatinde, hücre yoğunluğu 24. saate göre tüm glukoz konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Hücre yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla 25, 50, 75 ve 100 mM konsantrasyonlarında biraz daha fazla olduğu (Şekil 4.2. b-e); bununla birlikte, 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonlarında hücre yoğunluğunda bir miktar azalma olduğu ve hücre morfolojisinde de değişimler olduğu görülmüştür (Şekil 4.2. f ve g).



Şekil 4.3. HS2 hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnkübasyonun 72. saatinde, hücre yoğunluğunun 24 ve 48. saatler ile karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık göstermemekle birlikte; hücre morfolojisindeki değişim 150 mM konsantrasyonda belirgin bir dejenerasyon olarak görülmüştür (Şekil 4.3. g).

Keratinositler epiderminin farklı katmanlarından yer alan ve kaldırım taşı görünümlü yuvarlak hücrelerdir [118]. Bu hücreler, yara iyileşme süreçlerinde reepitelizasyon, hücre göçü ve proliferasyonu, sitokin üretimi gibi süreçlerde etkin rol oynadığından dolayı iyileşme mekanizmasının anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından *in vitro* modellerin oluşturulmasında da sıklıkla tercih edilmektedirler [119, 120]

Keratinositler yara iyileşmesindeki reepitelizasyon sürecine proliferasyon ve göç özelliği sayesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yara oluşumundan sonra proliferasyona

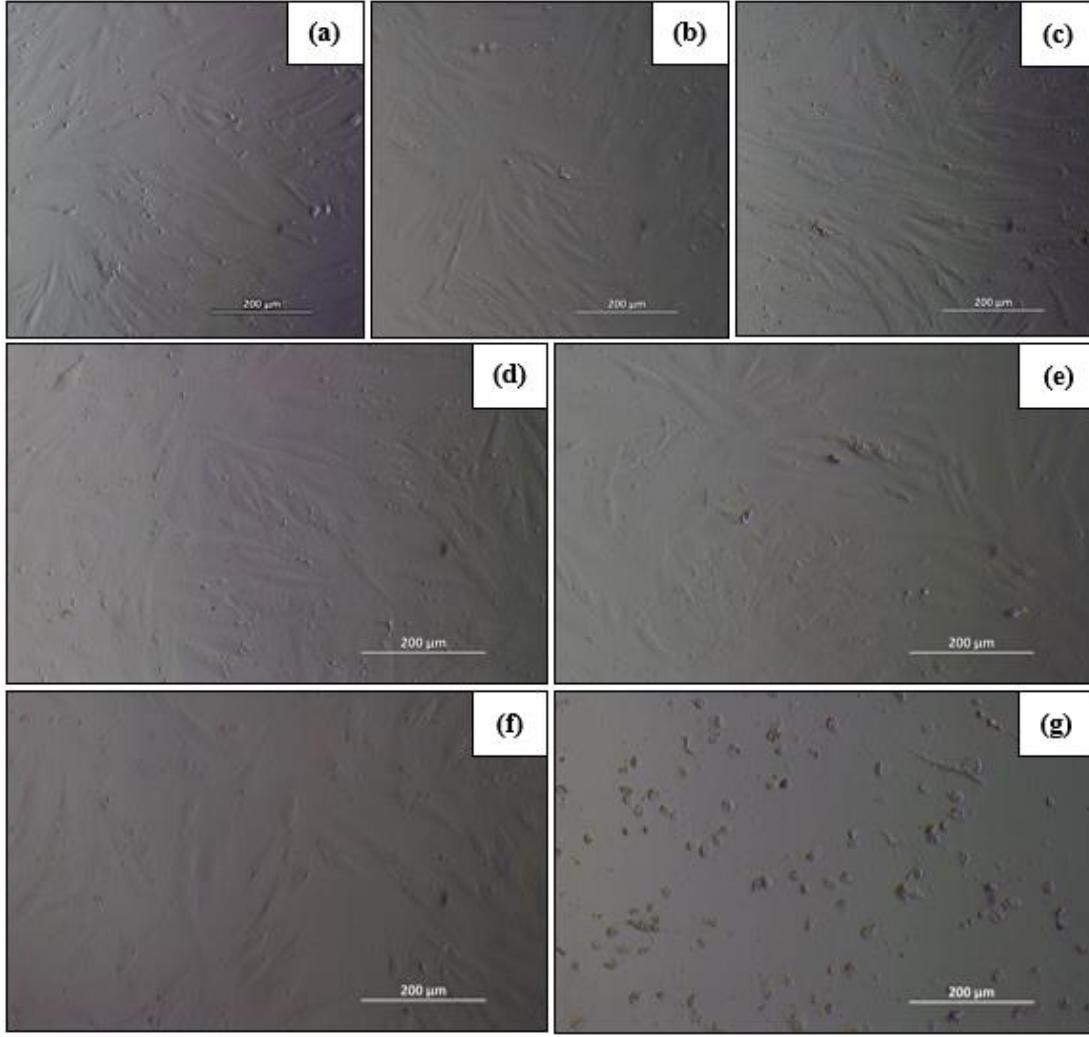
başlayarak yara bölgesini kaplamaktadır. EGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin salınımını artırarak kendi proliferasyonunu ve diğer hücrelerin proliferasyonunu uyararak iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır. Diyabetik yara ortamı ise yüksek glikoz seviyesi, ileri glikasyon son ürünleri, reaktif oksijen türleri ve inflamatuvar sitokinleri içermektedir [121]. Yapılan çalışmalarda yüksek glikoz seviyeleri ve ileri glikasyon son ürünleri birbirine benzer şekilde keratinosit hücrelerinin göç ve proliferasyon özellikleri olumsuz etkilendiği belirtilmektedir. Aynı zamanda bozulan artan ROS üretimi, bozulan prooksidan ve antioksidan seviyeleri oksidatif strese neden olmaktadır. ROS seviyeleri diyabete bağlı olarak artmaktadır ve bu da keratinositlerin proliferasyonunu azaltmaktadır [122]. Diyabette yaygın olarak görülen hiperglisemik ortamın simüle edilmesi için hücre kültürlerinde glikoz kullanılmaktadır. Böylece laboratuvar ortamında hiperglisemi ve buna bağlı gelişen hücre fonksiyon bozuklukları incelenebilmektedir.

Literatürdeki benzer çalışmalarda yüksek glikoz seviyeleri oluşturmak için genellikle 25, 50, 75, 100 mM dozları tercih edilmektedir. Buranasin ve ark. tarafından diyabetli hastaların diş eti keratinosit ve fibroblastları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada fibroblast hücreleri için 50 ve 75 mM seviyelerindeki glikozun hücre canlılığını azalttığı belirtilmiştir [123].

Biz de çalışmamızda keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerini kullandığımız *in vitro* hiperglisemi modelinde 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM şeklinde geniş bir konsantrasyon aralığı kullanarak hücre morfolojisi ve proliferasyonunu incelediğimiz bir hiperglisemi modeli oluşturduk. Elde ettiğimiz sonuçlar, 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun azaldığını ve hücre morfolojisinin bozulmaya başladığını göstermiştir.

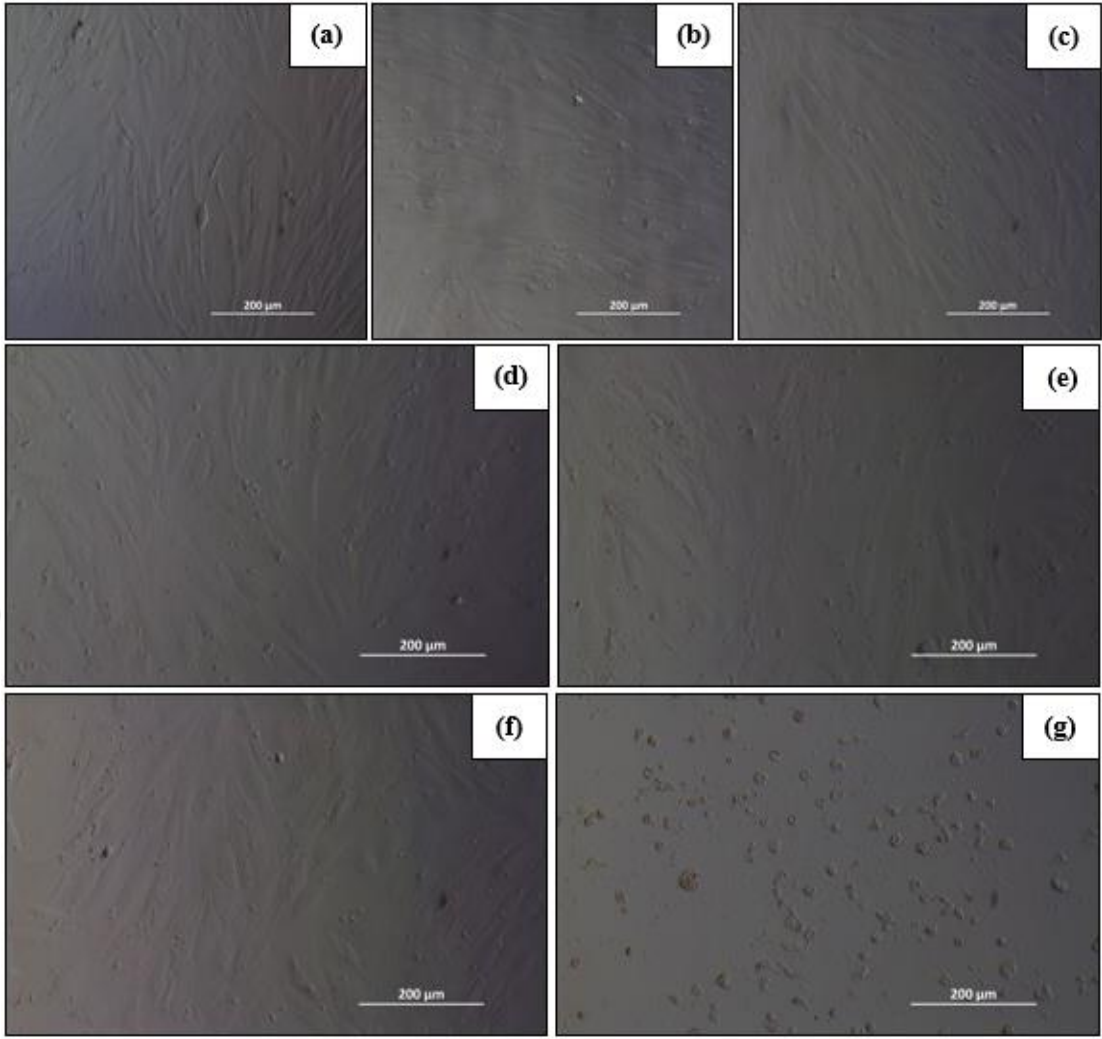
### **HDF Hücreleri**

Hücre morfolojilerine ait inverted mikroskop görüntüleri Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6'da verilmektedir.



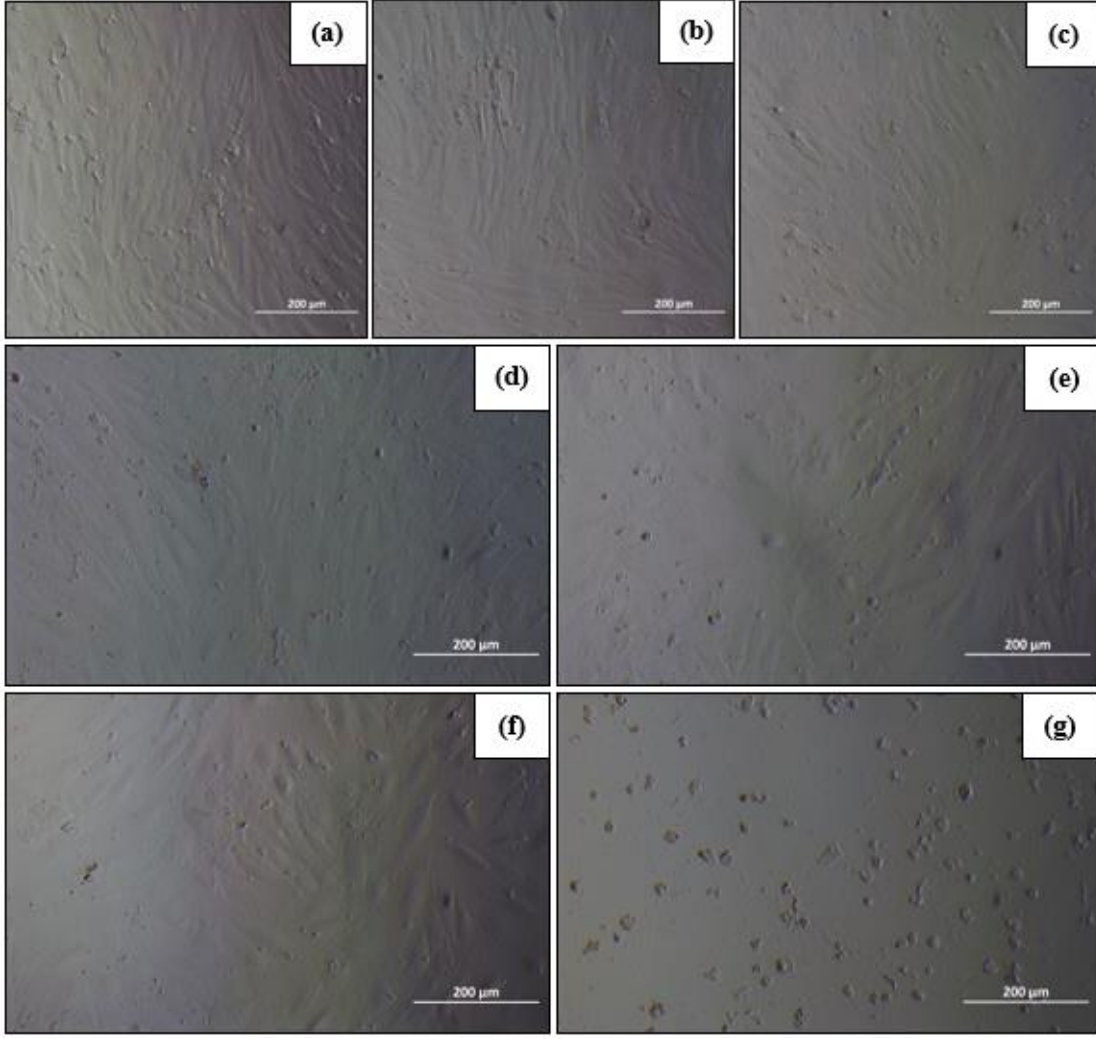
Şekil 4.4. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnkübasyonun 24. saatinde hücre morfolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte (Şekil 4.4. a-e); 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonunun kullanıldığı iki grupta, morfolojinin bozularak standart fibroblast görüntüsünden daha farklı yuvarlak morfolojide hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.4. f ve g).



Şekil 4.5. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnkübasyonun 48. saatinde hücre morfolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte (Şekil 4.5. a-e); 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonunun kullanıldığı iki grupta, morfolojinin bozularak standart fibroblast görüntüsünden daha farklı yuvarlak morfolojide hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.5. f ve g).



Şekil 4.6. HDF hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

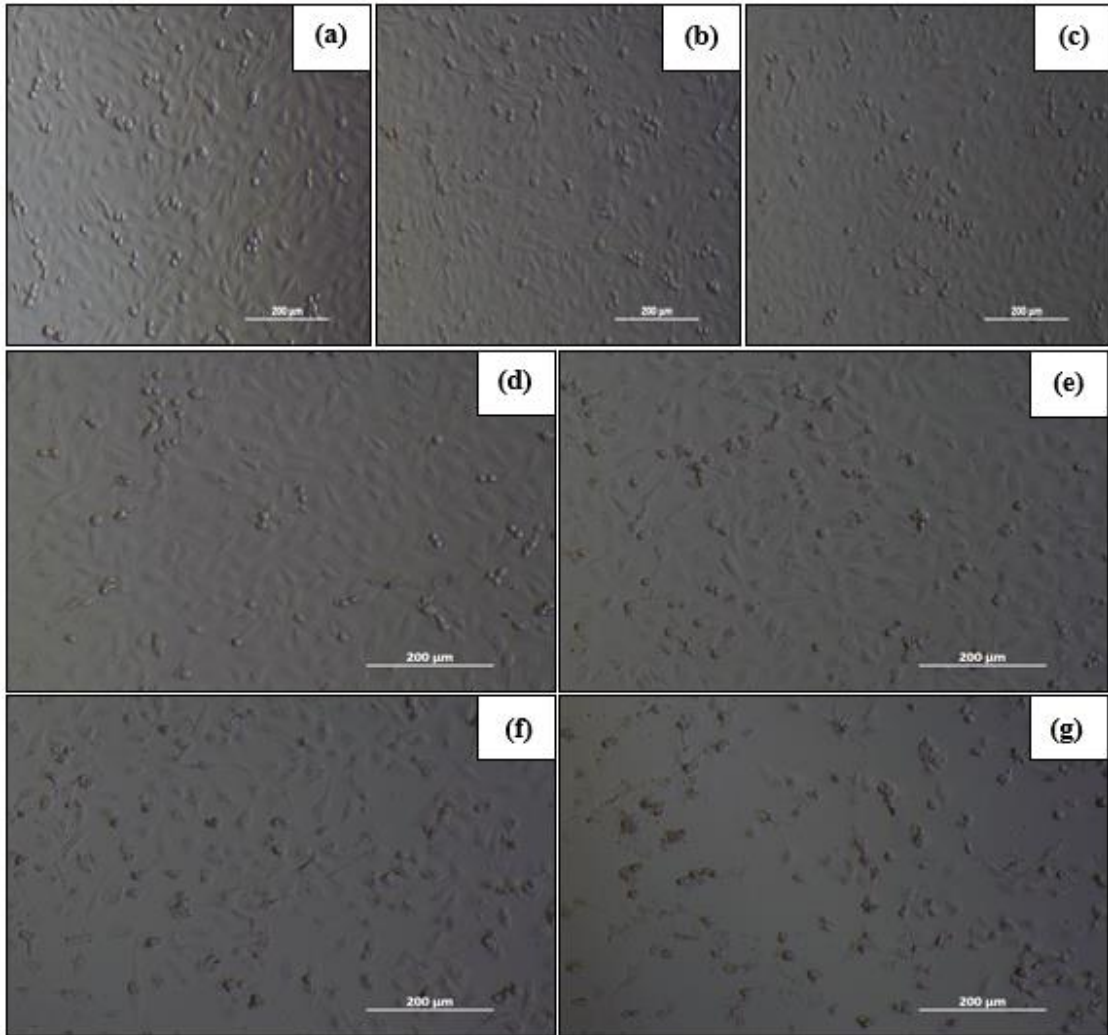
İnkübasyonun 72. saatinde hücre morfolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte (Şekil 4.6. a-e); 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonunun kullanıldığı iki grupta, morfolojinin bozularak standart fibroblast görüntüsünden daha farklı yuvarlak morfolojide hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.6. f ve g).

Dermal fibroblastları bağ dokusunun temel hücrelerindedir ve tipik olarak iğ şeklinde bir morfolojiye sahiptir. Yara iyileşmesi sürecinde proliferasyon ve maturasyon fazlarında önemli bir role sahiptir [124]. Fibroblastlar yara oluşumundan sonra yara bölgesine göç edip ECM üretimini ve düzenlenmesini başlatmaktadır. Ayrıca PDGF, VEGF gibi büyüme faktörlerinin salımı, keratinosit ve endotel gibi diğer hücrelerin proliferasyonunu teşvik etmektedir. Ürettiği büyüme faktörleri ile anjiyogenez sürecini

desteklemektir. Dolayısıyla kronik yaralar için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için fibroblastların işlevsel yönlerinin daha iyi anlaşılması önemlidir. Bu nedenle literatürdeki *in vitro* ve *in vivo* yara tedavisi çalışmalarında ECM üretiminde, fibroblast hücreleri kullanılmaktadır [75, 79, 124]. Çalışmamızda fibroblast hücreleri kullanarak oluşturduğumuz hiperglisemi modelinde elde ettiğimiz sonuçlara göre 125 ve 150 mM glikoz konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun azaldığı ve morfolojinin bozulmaya başladığı görülmüştür.

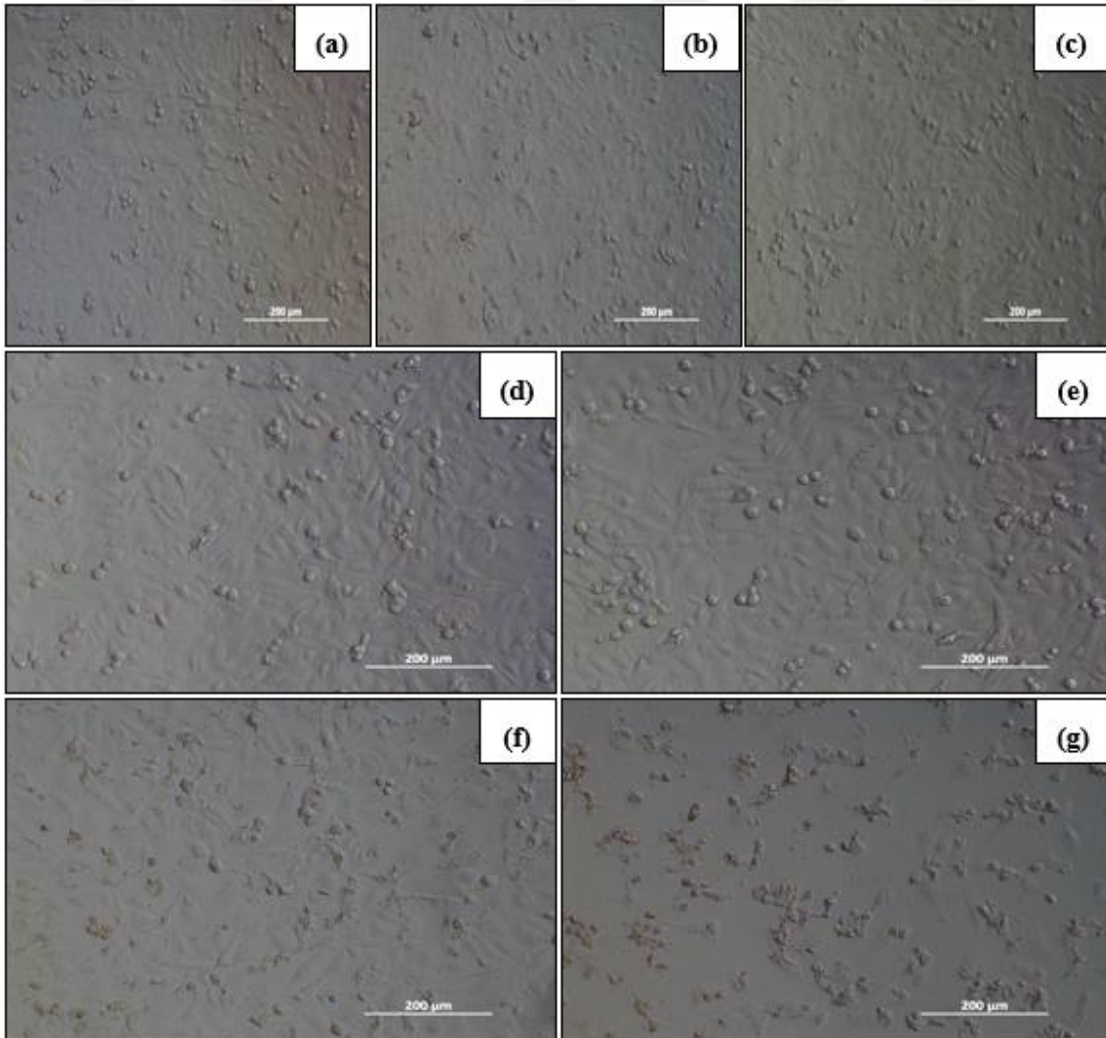
### **HUVEC Hücreleri**

Hücre morfolojilerine ait inverted mikroskop görüntüleri, Şekil 4.7., Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da verilmektedir.

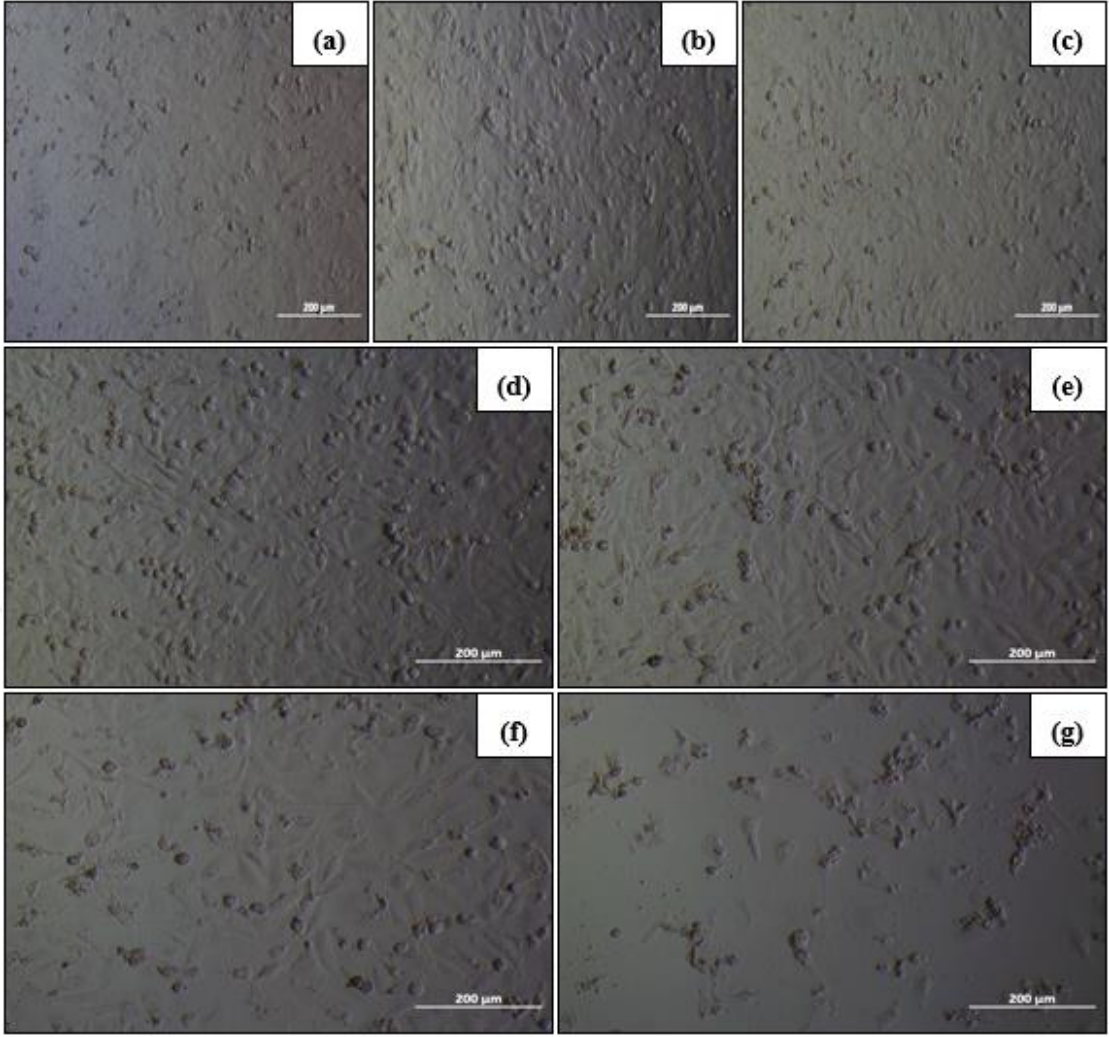


Şekil 4.7. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnkübasyonun 24. saatinde hücre morfolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte (Şekil 4.7. a-e); 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonunun kullanıldığı iki grupta, morfolojinin bozularak standart morfolojiden farklı yuvarlak morfolojide dejenere hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.7. Şekil 4.7f ve g). Ancak 150 mM konsantrasyonunda, HUVEC hücrelerindeki dejenerasyonun HS2 (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3.) ve HDF (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.) hücrelerinden daha belirgin olduğu görülmüştür. İnkübasyonun 48 ve 72. saatlerinde de 24. saate benzer bir morfoloji görülmüş aynı zamanda hücre sayısının artmasıyla birlikte oluşan fiziksel stresin etkisiyle 100 mM ve 125 mM konsantrasyonlarda da dejenere morfoloji görülmüş olup; bu durum doğrudan hiperglisemik durumun yarattığı bir sonuç şeklinde yorumlanmamıştır.



Şekil 4.8. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 48. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).



Şekil 4.9. HUVEC hücrelerinin a) 10 mM (Kontrol), b) 25 mM, c) 50 mM, d) 75 mM, e) 100 mM, f) 125 mM ve g) 150 mM glikoz konsantrasyonundaki inkübasyonunun 72. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri (HUVEC) insan göbek kordonundaki venin iç yüzeyini oluşturan kaldırım taşı morfolojisine sahip hücrelerdir [125]. Bu hücreler literatürde genellikle damar onarımı ve anjiyogenez süreçlerinin araştırılması amacıyla model olarak tercih edilmektedir [126]. Yara iyileşme sürecinde rol oynayan temel hücreler fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleridir. İyileşme aşamasındaki en kritik süreçlerden biri anjiyogenezdır ve vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve dallanması bu süreç için oldukça önemlidir [127].

Yüksek glikoz seviyeleri endotel hücrelerinde oksidatif strese, NO (Nitrik oksit) üretiminin azalmasına, inflamasyon artışına, ileri glikasyon son ürünlerinin artışına, DNA hasarına ve apoptoz artışına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak yüksek glikoz

seviyelerinde hücrelerin proliferasyonunda azalma, hücresel işlev bozukluğu ve morfolojik bozulmalar meydana gelmektedir [128].

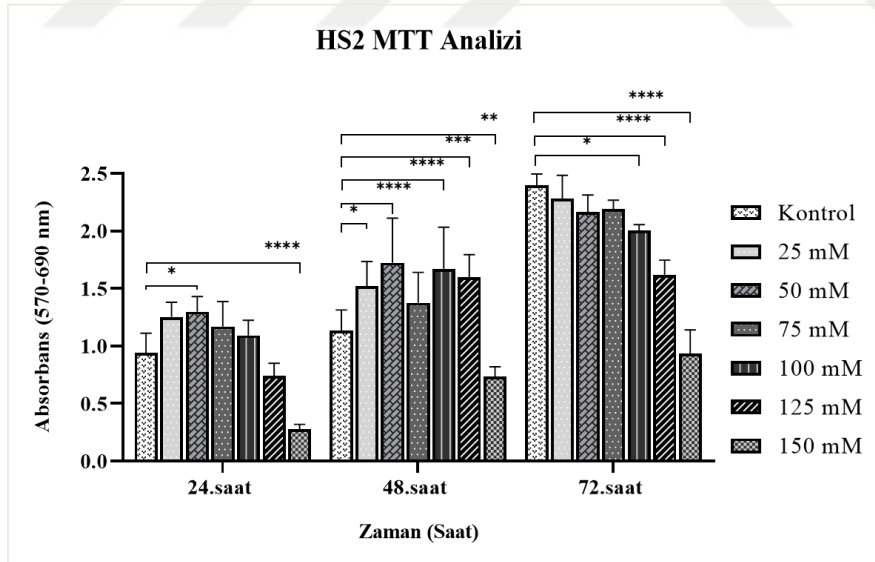
Yu ve ark. tarafından HUVEC hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada 11, 30, 60 ve 120 mM yüksek glikoz konsantrasyonlarında kültürlenmiş olup 60 ve 120 mM'da hücre morfolojilerinin kaldırım taşı şeklinden iğ benzeri şekle doğru değişime uğradığı belirtilmiştir [129].

#### 4.1.1.2. Proliferasyon Analizi

Yüksek glikoz seviyelerinin keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilmektedir [130-132]. Bu doğrultuda HS2, HDF ve HUVEC hücrelerinin yüksek glikoz seviyelerindeki hücre proliferasyonu analiz edilmiştir. Glikoz konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi için 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi gerçekleştirilmiştir. HS2 hücrelerine ait MTT analizi sonuçları

Şekil 4.10'da, HDF hücrelerine ait sonuçlar Şekil 4.11'de ve HUVEC hücrelerine ait sonuçlar ise Şekil 4.12'de verilmiştir.

#### HS2 Hücreleri



Şekil 4.10. HS2 hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ,  $n=6$ ).

HS2 hücrelerinin hiperglisemik konsantrasyonlarında kültürünün 24. saatinde hücre proliferasyonu 48 ve 72. saatlere kıyasla daha düşüktür. Tüm grupların proliferasyonu kültürün 72. saatinde en yüksektir.

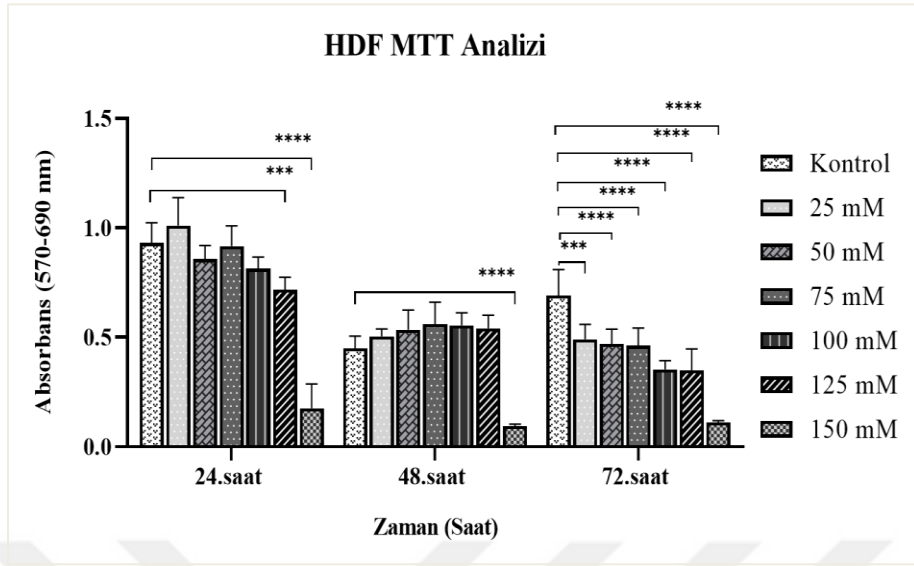
Kültürün 24. saatinde 25, 50, 75 ve 100 mM konsantrasyonlarında proliferasyon kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu artış 50 mM glikoz konsantrasyonunda ise istatistiksel olarak anlamlıdır (\* $p < 0.05$ ). Ayrıca 125 ve 150 mM konsantrasyonlarında proliferasyon kontrole göre azalmıştır ve 150 mM'da bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.

Kültürün 48. saatinde tüm gruplarda proliferasyon 24. saate göre artış göstermiştir. Kontrol grubuna göre 25, 50, 75, 100 ve 125 mM glikoz konsantrasyonlarında proliferasyon istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. 150 mM konsantrasyonunda ise hücre proliferasyonunda anlamlı derece azalma görülmüştür (\*\* $p < 0.01$ ).

Son olarak kültürün 72. saatinde tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu 24. saate göre artış göstermiştir. Genel anlamda hiperglisemik konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu kontrole göre daha düşük olmakla beraber 100, 125 ve 150 mM'daki düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. Tüm kültür süresince en düşük hücre proliferasyonun görüldüğü konsantrasyonun 150 mM olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen MTT testi sonuçlarının Bölüm 4.1.1.1'de gösterilen hücre morfolojileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda keratinosit ve fibroblastların hiperglisemik koşullara maruz kalmanın hücre proliferasyonunda azalma ve morfolojisinde bozulmaların görüldüğü belirtilmektedir [123, 133]. Kruse ve ark. tarafından keratinosit ve fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada hiperglisemi modeli oluşturmak için 10, 23, 26, 50 ve 100 mM glikoz konsantrasyonları uygulanmıştır. Hücre canlılığının 26 mM glikoz konsantrasyonunun altındaki dozlarda etkilenmediği ancak daha üstündeki dozlarda azaldığı görülmüştür. Ayrıca keratinositlerin fibroblastlara göre yüksek glikozu daha iyi tolere ettiği bildirilmiştir [134].

## HDF Hücreleri



Şekil 4.11. HDF hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n=6$ ).

Kültürün 24. saatinde tüm glikoz konsantrasyonları için HDF hücrelerinin proliferasyonu, en yüksek seviyededir. Kontrol grubuna göre 125 mM (\*\* $p < 0.01$ ) ve 150 mM (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır.

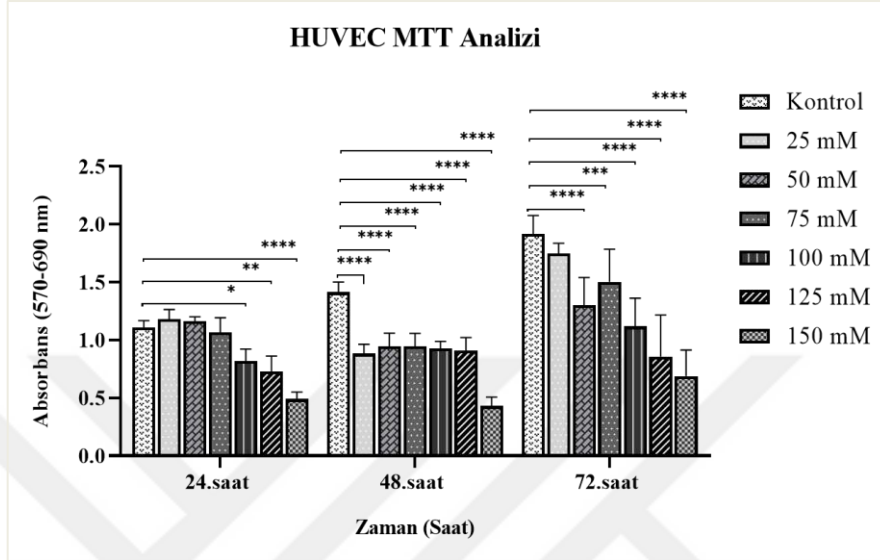
Kültürün 48. saatinde 25, 50, 75, 100 ve 125 mM konsantrasyonlarında kontrole göre artış görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak 150 mM konsantrasyonunda hücre proliferasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) azalmıştır.

Kültürün 72. saatinde ise kontrol grubuna göre tüm glikoz konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) proliferasyon azalmıştır ancak 150 mM'da hücre canlılığı en düşük seviyededir. Hücre proliferasyonu sonuçları ile Bölüm 4.1.1.1'de gösterilen hücre morfolojisi arasındaki ilişkinin ise uyumlu olduğu görülmüştür.

Aldoss ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada insan periodontal ligament fibroblastları kullanılarak 5,5 mM, 25 mM ve 50 mM glikoz konsantrasyonları ile hiperglisemi modeli oluşturulmuştur. Bu modelde 50 mM konsantrasyonunun hücre çoğalması ve göçünü azalttığı bildirilmiştir [135]. Kido ve ark. tarafından sıçan primer

dişeti fibroblastları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 100 mM glikoz konsantrasyonunda önemli ölçüde sitotoksik etki gösterdiği ve inkübasyon sonrası canlılığın olmadığı görülmüştür [136].

### HUVEC Hücreleri



Şekil 4.12. HUVEC hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki inkübasyonunun 24,48 ve 72. saatlerine ait MTT analizi sonuçları (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ,  $n=6$ ).

Kültürün 24. saatinde hücre proliferasyonu tüm konsantrasyonlarda en düşük seviyededir. Kontrol grubuna göre 25, 50 ve 75 mM konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Ancak 100 mM (\* $p<0.05$ ), 125 mM (\*\* $p<0.01$ ) ve 150 mM’da (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Proliferasyonun en düşük olduğu seviye ise 150 mM konsantrasyonundadır.

Kültürün 48. saatinde kontrol grubuna göre tüm glikoz konsantrasyonlarında proliferasyon istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) azalmıştır. Ayrıca 25, 50, 75, 100 ve 125 mM’da proliferasyon değerleri birbirine yakın seviyelerdeyken 150 mM’da ise en düşük seviyede olduğu görülmüştür.

Kültürün 72. saatinde ise hücre proliferasyonu 24. saate göre daha yüksek seviyelerdedir. Hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre tüm glikoz konsantrasyonlarında anlamlı olarak (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) azalmıştır ve en düşük canlılık seviyesi 150 mM konsantrasyonundadır. Hücre proliferasyonu sonuçları ile Bölüm 4.1.1.1’de gösterilen hücre morfolojilerinin benzer doğrultuda olduğu görülmüştür.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında ise Liu ve ark. tarafından HUVEC hücreleri kontrol olarak 25 mM ve yüksek glikoz olarak 50 mM konsantrasyonları ile analiz gerçekleştirilmiştir. Yüksek glikozun, HUVEC hücrelerinde canlılığı, anjiyogenezi ve göçü azalttığı, inflamasyon ve seneseste ise artışa sebep olduğu bildirilmiştir [137]. Chen ve ark tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da HUVEC hücrelerinde aralıklı hiperglisemik dozların uygulanması hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu artırdığı bildirilmiştir [138].

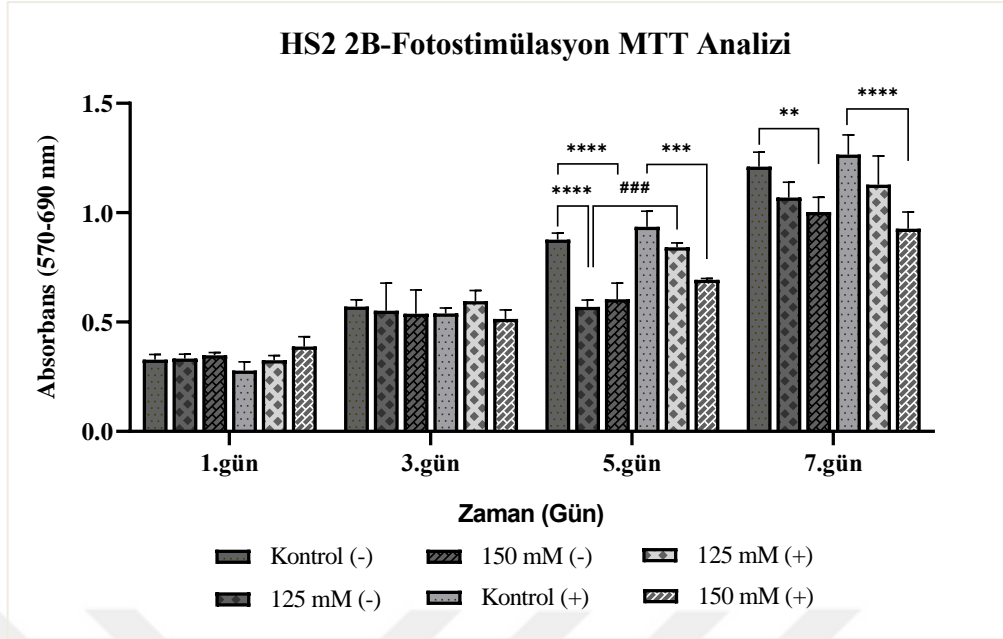
Çalışmamızda keratinosit, fibroblast ve endotel hücreleri üzerinde gerçekleştirdiğimiz MTT analizi sonuçlarına ve hücre morfolojilerine göre yüksek glikoz seviyelerine bağlı olarak hücre proliferasyonunun en düşük olduğu ve morfolojilerinin en çok bozulduğu konsantrasyonların 125 ve 150 mM olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında fotostimülasyon çalışmalarına bu iki konsantrasyon kullanılarak devam edilmiştir.

#### **4.1.2. Fotostimülasyon Çalışmaları**

Tez çalışmasının bu bölümünde HDF, HS2 ve HUVEC hücrelerinin hiperglisemik ortamlarda inkübasyonu ile oluşturulan 2-boyutlu modelde fotostimülasyon uygulamaları gerçekleştirilmiş olup; fotostimülasyonun hücre proliferasyonu, morfolojisi, göç ve tübül oluşumu gibi aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bölüm 4.1.1’de elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda bu aşamada hiperglisemik ortam olarak 125 ve 150 mM glukoz konsantrasyonları kullanılmıştır. Hücreler konfluensiye ulaştıktan sonra hiperglisemik ortama geçilmiş ve gün aşırı olacak şekilde 7 gün boyunca, 20 cm mesafeden 3 dk süreyle fotostimülasyon uygulanmıştır.

##### **4.1.2.1. Hücre Proliferasyonunun Analizi**

Fotostimülasyon uygulanan ve hiperglisemik koşullardaki HDF ve HS2 hücrelerinde gerçekleştirilen MTT analizinin sonuçları Şekil 4.13’te ve Şekil 4.14’te verilmektedir.



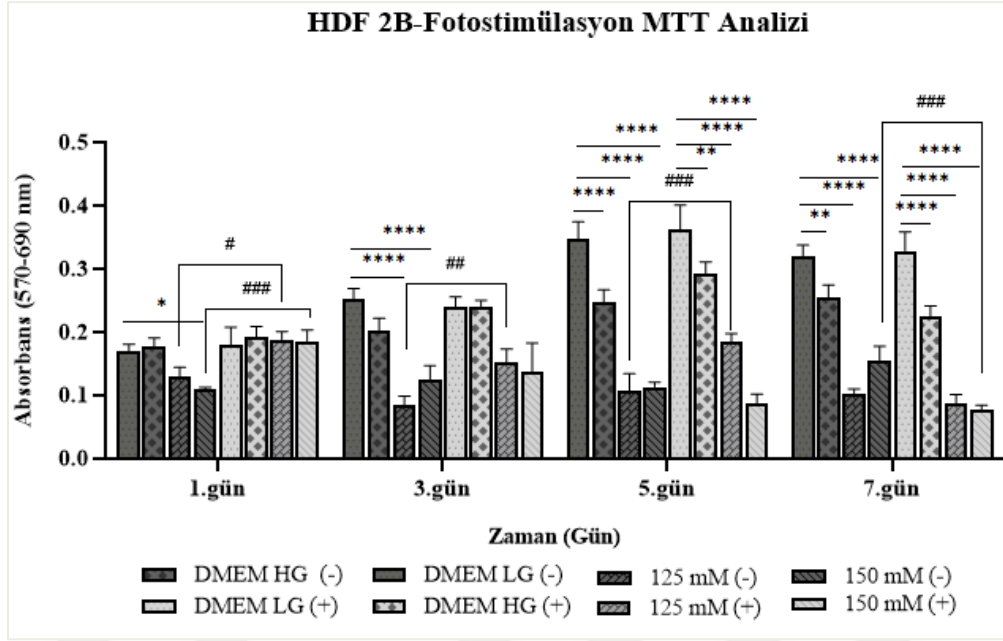
Şekil 4.13. 2-boyutlu hiperglisemik modellerde fotostimülasyonun HS2 hücrelerine ait MTT analizi grafiği (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n=3$ ). Fotostimülasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplar “(+) ve (-)” olarak belirtilmektedir.

Keratinosit hücrelerinde, kültürün 1. ve 3. gününde fotostimülasyon uygulaması yapılmayan gruplarda kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Kültürün 5. gününde ise 125 mM ve 150 mM glikoz konsantrasyonlarındaki gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) görülmektedir. 7. günde ise 150 mM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı azalma (\*\* $p < 0.01$ ) görülmektedir.

Fotostimülasyon uygulaması yapılan gruplarda 1. ve 3. günde kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamaktadır. 5.günde (\*\*\* $p < 0.001$ ) ve 7. günde (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) 150 mM konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma görülmektedir.

Kültürün 5. günde fotostimülasyon uygulanan 125 mM konsantrasyonundaki grupta ise canlılık fotostimülasyon uygulanmayan gruba göre daha yüksek çıkmıştır. Yapılan analize göre hücrelerin, kontrol grubu ile kıyaslandığında hiperglisemik konsantrasyonlarda zarar gördüğü görülmektedir.

Fibroblast hücrelerinde yapılan MTT analizinde ise kontrol olarak DMEM-LG grubu belirlenmiştir. HDF hücreleri için uygun besiyeri olarak DMEM-LG ve DMEM-HG kullanılmaktadır. Dolayısıyla iki besiyeri de analize dahil edilerek her ikisinin de proliferatif etkisi incelenmiştir. DMEM-LG grubunun kontrol olarak tercih edilmesinin sebebi ise içeriğindeki glikoz seviyesinin daha düşük olmasıdır.



Şekil 4.14. 2-boyutlu hiperglisemik modellerde fotostimülasyonun HDF hücrelerine ait MTT analizi grafiği (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ,  $n=3$ ). Fotostimülasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplar “(+) ve (-)” olarak belirtilmektedir.

Kültürün 1. gününde ışık uygulanmayan grupta hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre DMEM-HG grubunda artış görülmüştür. Ancak 150 mM konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür (\* $p<0.05$ ). Işık uygulanan grupta ise glikoz konsantrasyonları arasında belirgin bir fark olmamakla beraber kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ayrıca 125 mM (\*\* $p<0.01$ ) ve 150 mM (### $p<0.001$ ) konsantrasyonunda ışık uygulanan grupta proliferasyon, ışık uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır.

Kültürün 3. gününde ışık uygulanmayan grupta kontrole göre proliferasyon 125 ve 150 mM konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Ancak ışık uygulanan grupta proliferasyonda anlamlı bir azalma görülmemiştir. Ayrıca 125 mM’da ışık uygulanan gruptaki proliferasyon, ışık uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır (### $p<0.01$ ).

Kültürün 5. gününde ışık uygulanmayan gruptaki proliferasyon değeri kontrole göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak düşmüştür (\*\*\*\* $p<0.0001$ ). Işık uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre DMEM-LG (\* $p<0.05$ ), 125 mM (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) ve 150 mM (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) grupları anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca 125 mM’da ışık uygulanan

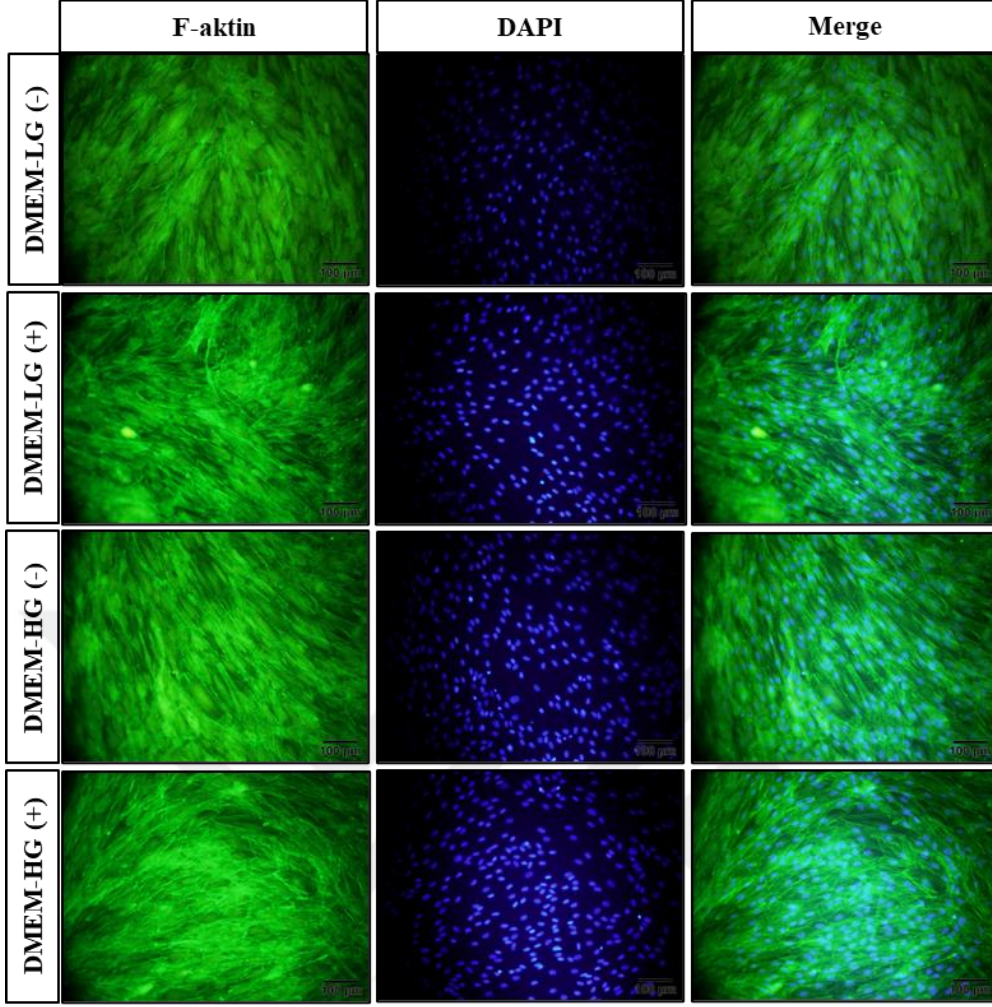
gruptaki proliferasyon, ışık uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ( $###p<0.001$ ).

Son olarak kültürün 7. gününde proliferasyon, kontrol grubuna göre DMEM-LG ( $**p<0.01$ ), 125 ve 150 mM ( $****p<0.0001$ ) grupları anlamlı olarak azalmıştır. Işık uygulanan grupta da benzer şekilde kontrol grubuna göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı ( $****p<0.0001$ ) düşüş görülmüştür. Ayrıca 150 mM'da ışık uygulanan gruptaki proliferasyon, ışık uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ( $###p<0.001$ ).

Literatürde yapılan çeşitli çalışmalar da uygun parametrelerde uygulanan fotostimülasyonun, çeşitli çalışmalarda uygun parametrelerde uygulandığında keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerinde proliferasyonu arttırabildiği bildirilmektedir [139-141]. Góralczyk ve ark. endotel hücreleri üzerinde farklı enerji dozlarında fotostimülasyon uygulaması gerçekleştirmiştir ve hücre çoğalmasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ifade edilmiştir [142]. Oyebodye ve Hourel tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada fotostimülasyonun fibroblastlar ile oluşturulan diyabetik yara modellerinde hücre proliferasyonunu artırdığı bildirilmektedir [106]. Mathioudaki ve ark. tarafından keratinosit hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada da farklı güç ve enerji oranlarındaki diyet lazer ile ışık uygulamasının hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür [143]. Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında fotostimülasyonun HS2 hücreleri üzerinde kültürün ilerleyen günlerinde, özellikle 125 mM glikoz konsantrasyonunda proliferasyonu desteklediği görülmüştür. HDF hücrelerinde fotostimülasyonun proliferatif etkisi kültürün ilk günlerinde görülmeye başlamıştır ve 125 mM konsantrasyonunda ışığın hücre çoğalmasını kontrol grubuna göre anlamlı derecede artırdığı görülmüştür.

#### **4.1.2.2. İmmünofloresan Boyama**

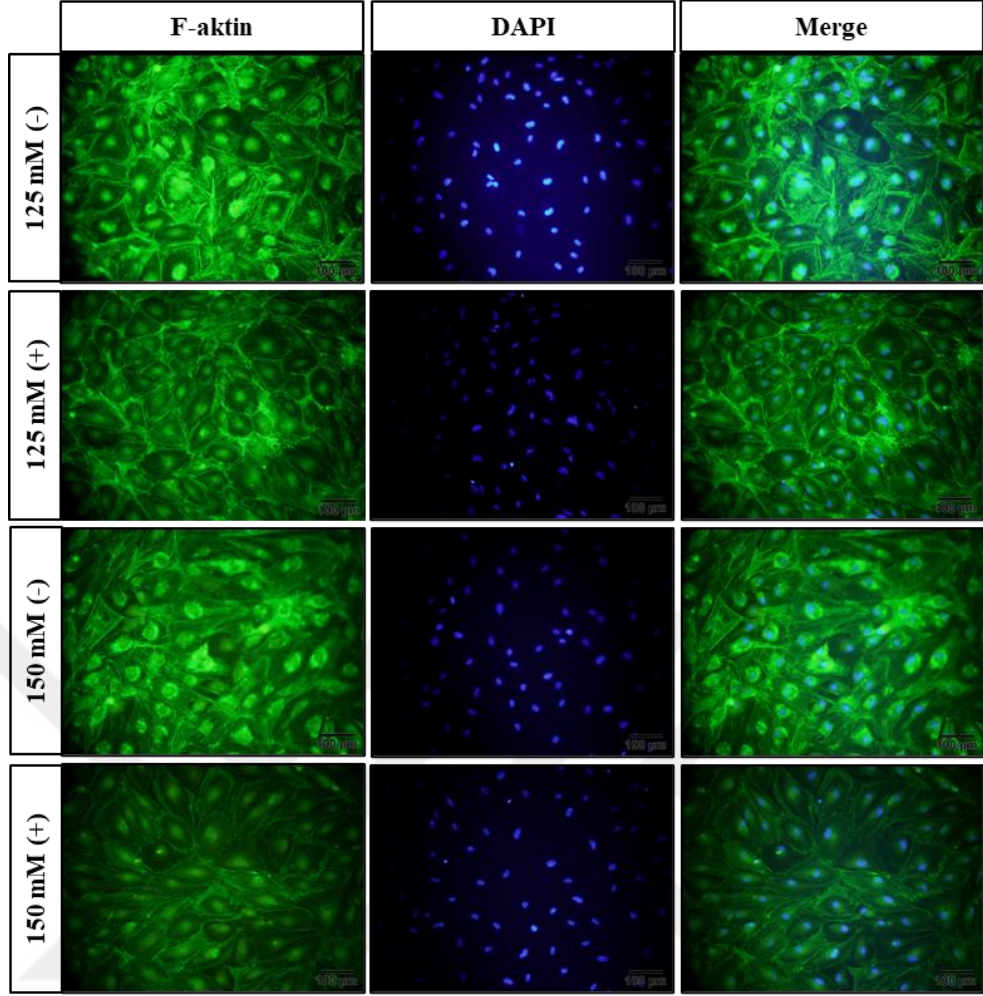
Tez kapsamında fotostimülasyonun, hiperglisemik ortamlarda kültürlenmiş HS2 ve HDF hücrelerinin aktin filamentleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla kültürün 7. gününde ait F-aktin/DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada analizin 7. günde yapılmasının nedeni, *in vitro* ortamda filament oluşumu için bu sürenin gerekli olmasıdır. HDF (Şekil 4.15'te ve Şekil 4.16'da) ve HS2 (Şekil 4.17'de) hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.15. HDF hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar DMEM-LG (+), DMEM-HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla DMEM-LG (-), DMEM-LG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x).

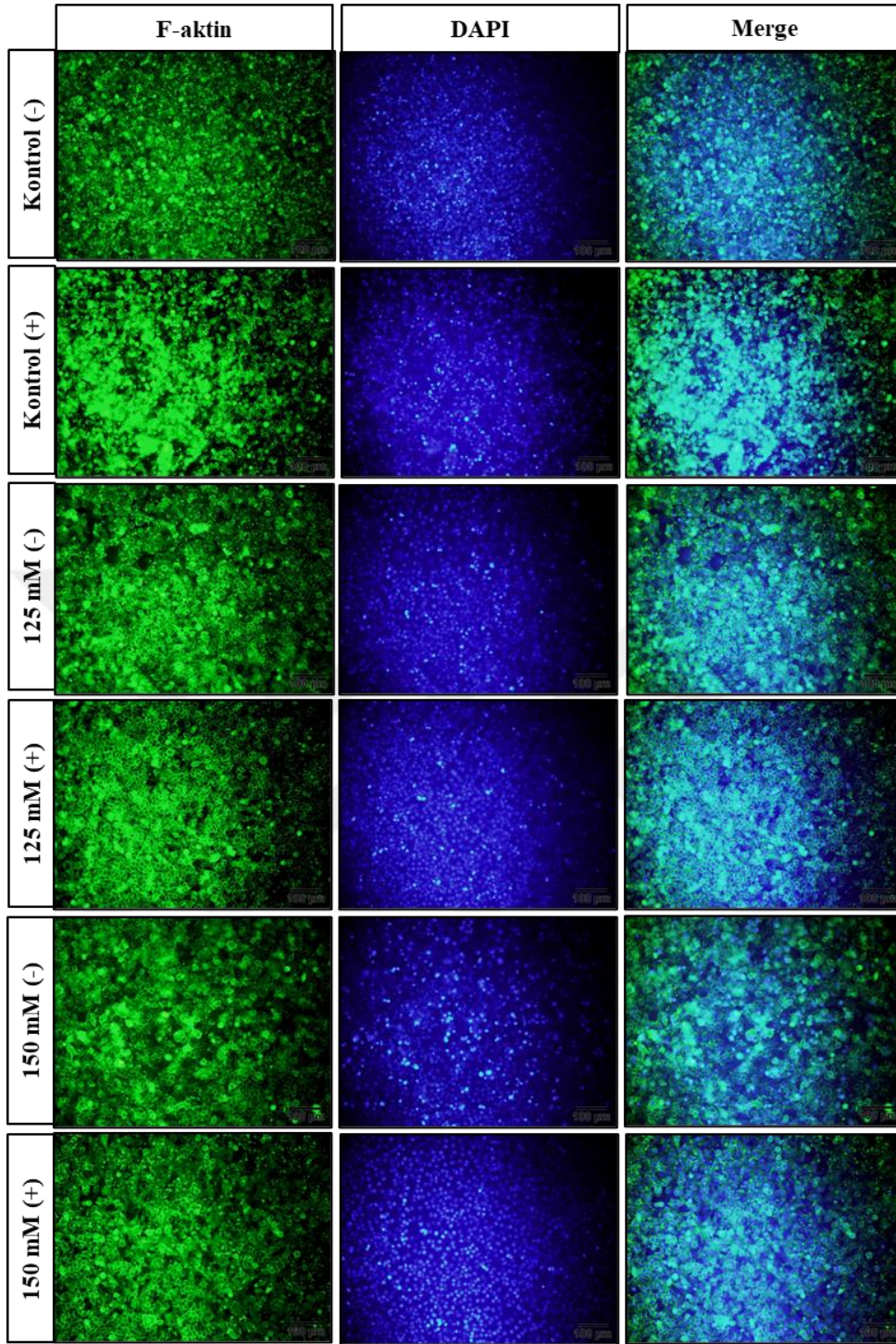
Dermal fibroblastların 7. gündeki F-aktin/DAPI boyamaları incelendiğinde ışık uygulanan DMEM-LG grubunun daha yoğun bir iskelet boyaması göstermektedir. Aktin filamentleri ise fibroblast morfolojisine benzer yapıda olduğu görülmüştür. Benzer şekilde DMEM-HG grubuna ait görüntülerde de aktin filamenti yapısının ışık fotostimülasyonu uygulanan grupta daha yoğun dağılım gösterdiği görülmüştür.

Yüksek glikoz konsantrasyonlarında (125 ve 150 mM) inkübe edilen HDF hücrelerinin morfolojileri incelendiğinde fotostimülasyonu uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Ancak kontrol grubu (DMEM-LG) ve DMEM-HG grubuna göre aktin filamentlerinin yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca hiperglisemik koşullarda hücreler sahip olması gereken fibroblastik yapıyı kaybederek poligonal bir morfoloji sergilemiştir ve bu yapı ışık varlığında değişim göstermemiştir.



Şekil 4.16. HDF hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar 125 mM (+), 150 mM (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla 125 mM (-), 150 mM (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x).

Keratinosit hücrelerinin yüksek glikoz koşullarındaki kültürünün 7. gününe ait morfoloji görüntüleri incelendiğinde tüm konsantrasyonlarda floresan yoğunluğunun çok daha belirgin olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna ait aktin filamentleri yoğunluğunun fotostimülasyon uygulandığında artış gösterdiği görülmüştür. Ancak 125 ve 150 mM konsantrasyonlarında gruplarda fotostimülasyon uygulanmasının aktin filamentleri üzerinde belirgin bir etkisi görülmemiştir. Ayrıca tüm gruplarda aktin filamentleri, keratinositlere ait poligonal morfolojisini göstermiştir.



Şekil 4.17. HS2 hücrelerine ait immüno Floresan boyama görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), 125 mM (+), 150 mM (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), 125 mM (-), 150 mM (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 20x).

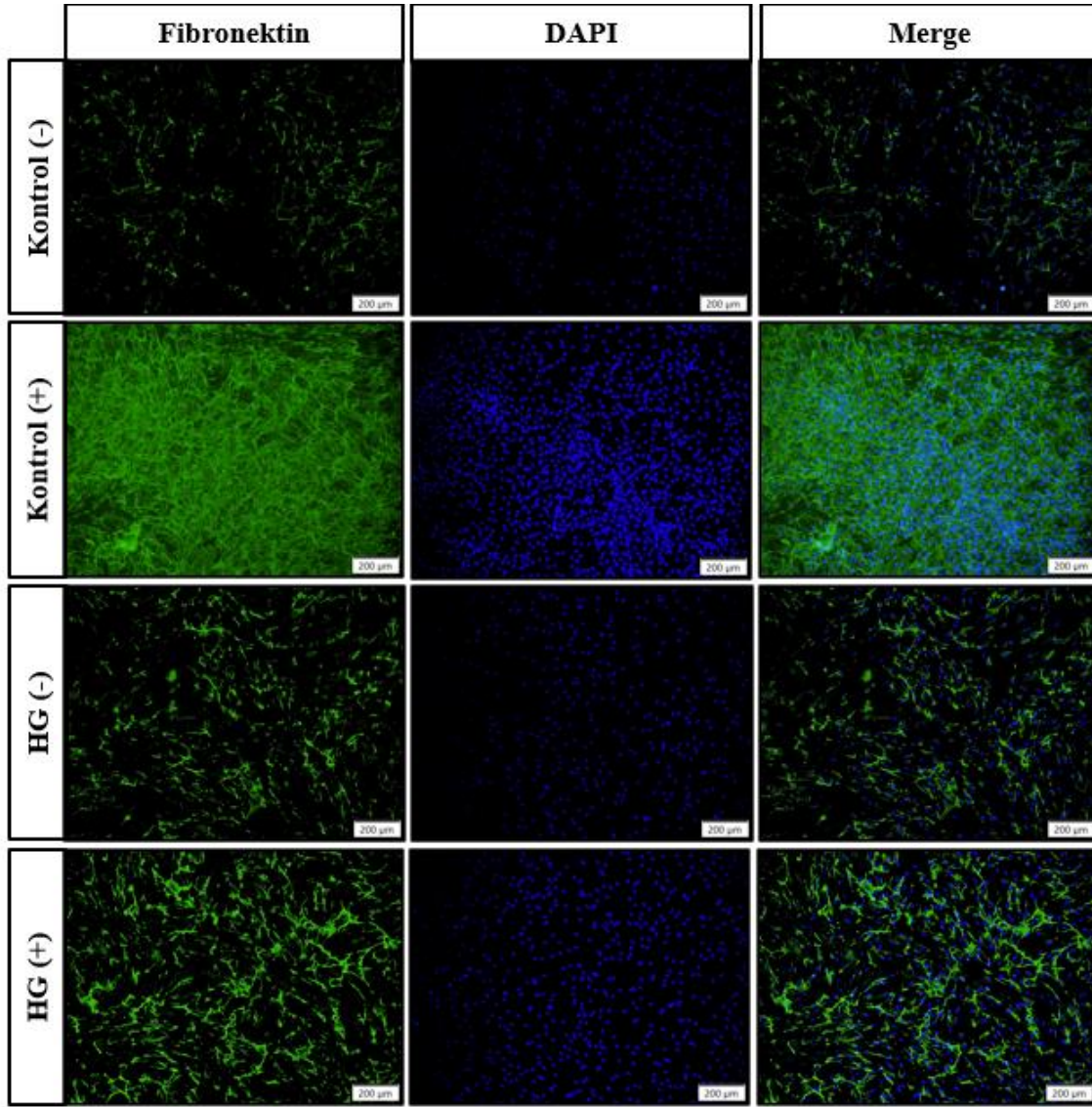
Yara iyileşmesinde hücrelerin yara bölgesine doğru hareket etmesi gerekmektedir. Hücre iskeleti ise bu süreci yapısında bulunan çeşitli özellikteki filamentler aracılığıyla gerçekleştirmektedir [144].

Aktin filamentleri, hücrede birçok önemli fonksiyonu olan ve hücre iskeletini oluşturan olan temel bileşenlerden biridir. Hücre sitoplazmasında özellikle hücre zarının çevresinde bol miktarda bulunmaktadır. Aktin filamentleri hücre tutunması, göçü, bölünmesi, hücre içi molekül taşınımı ve hücre şeklinin korunması gibi birçok süreçte kritik bir rol oynamaktadır. Ayrıca hücrelere fotostimülasyon uygulanmasının hücre morfolojisini ve iskelet yapısını değiştirebileceği bildirilmiştir [144].

Monteiro ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, fotostimülasyon uygulanan hücrelerdeki aktin filamentlerinin daha yoğun şekilde boyandığını ve hücre iskeletinin daha iyi organize olduğu belirtilmektedir. Buna bağlı olarak hücre göçünü de kolaylaştırdığı düşünülmektedir [145].

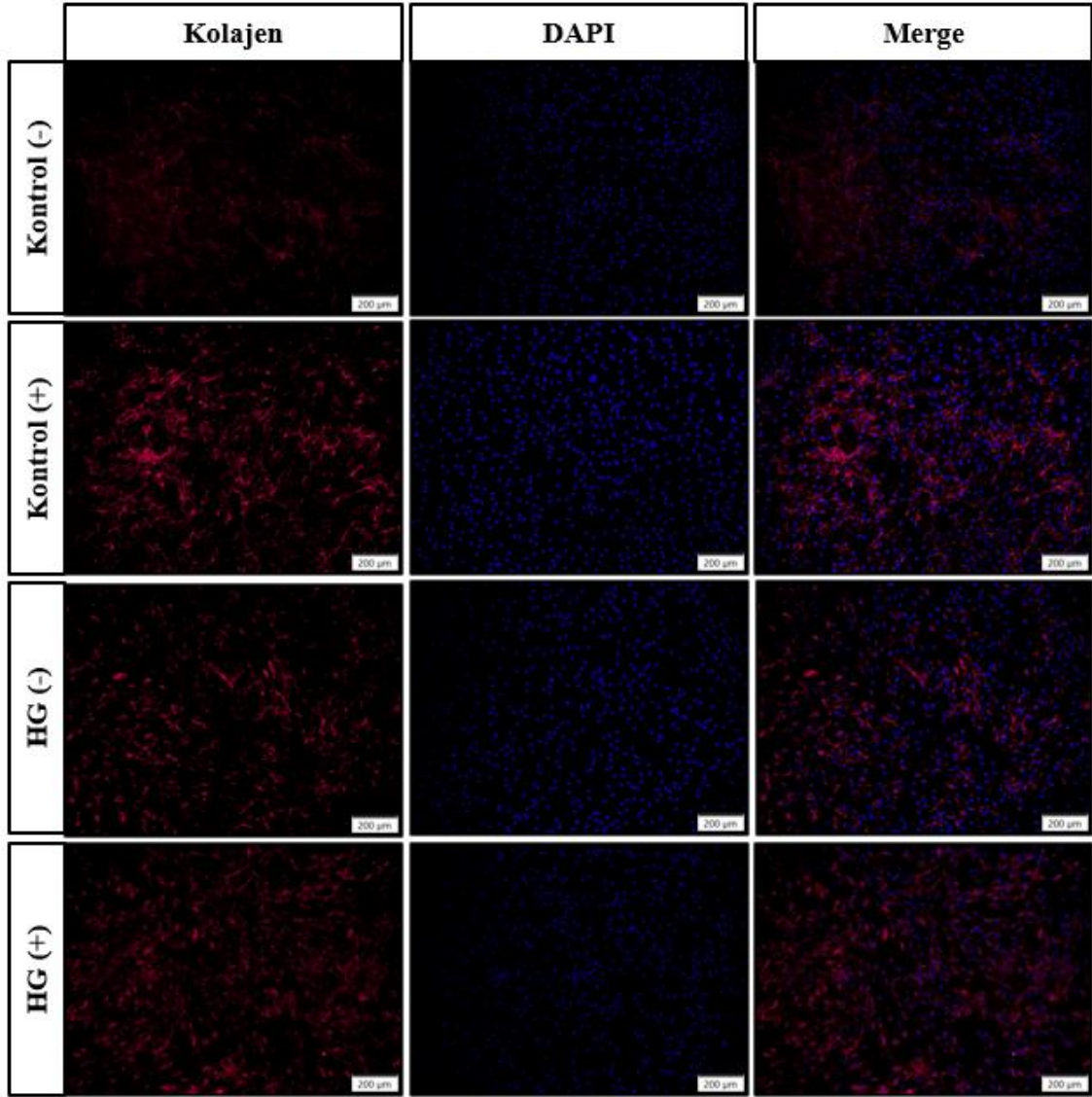
#### **4.1.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama**

Tez kapsamında fotostimülasyonun, hiperglisemik ortamlarda kültürlenmiş HDF hücrelerinin ECM elemanlarından fibronektin ve kolajen yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla kültürün 7. gününde ait fibronektin ve kolajen boyamaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analize ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmektedir.



Şekil 4.18. HDF hücrelerine ait fibronektin/DAPI boyamalarının floresan mikroskop görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), HG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 10x).

Dermal fibroblastların kültürün 7. günündeki immünohistokimya boyamaları incelendiğinde tüm kontrol ve hiperglisemi grupları için fibronektin ve kolajen varlığı görülmüştür. Fibronektin ve kolajenin fotostimülasyon uygulanan kontrol ve HG gruplarında çok daha yoğun sentezlendiği ve homojen dağılım gösterdiği görülmüştür. Ayrıca hipergliseminin ECM sentezi üzerinde olumsuz etkisi olmasına rağmen fotostimülasyonun bu koşullarda dahi ECM oluşumu ve organizasyonunu desteklediğini göstermektedir.



Şekil 4.19. HDF hücrelerine ait kolajen/DAPI boyamalarının floresan mikroskop görüntüleri. Işık uygulanan gruplar Kontrol (+), HG (+) ve ışık uygulanmayan gruplar sırasıyla Kontrol (-), HG (-) olarak ifade edilmiştir (Büyütme: 10x).

Fibronektin ve kolajenin analiz edilmesinin en önemli nedeni bu iki proteinin hücre dışı matris yapısını oluşturan temel bileşenler olması ve hücrelerin tutunma, proliferasyon, farklılaşma gibi süreçlerde rol oynamalarıdır [146]. Fibronektin, dokuların neredeyse tamamında bulunan ve hücre yapışma etkileşimlerinde önemli bir rolü olan glikoproteindir [147]. Hücrelerin hem birbirine hem de ECM'ye bağlanmasında rol oynamaktadır. Kolajen, fibrin, integrin ve glikozaminoglikanlar gibi moleküllere bağlanma kapasitesine sahiptir. Fibronektin yara iyileşmesinin ilk evrelerinde fibrin ve trombositlerle bağlanarak pıhtılaşmaya katkıda bulunmaktadır. İyileşmenin ilerleyen evrelerinde ise fibroblast ve endotel hücreleri yara bölgesine göç eder ve granülasyon

dokusunun oluşumunu destekleyen hücrel fibronektin birikimini sağlar [147]. Kolajen hücre ile ECM arasındaki yapışmayı ve sinyalleşme süreçlerinin düzenlenmesinde rol alan ECM'nin temel bileşenidir [148]. Yara iyileşme aşamasında trombositlerin aktive olmasını ve fibrin pıhtısı oluşumunu desteklemektedir. Fibroblastlar ve diğer hücreler yara bölgesine göç eder ve kolajen birikimini sağlar. Bu sırada kolajenin bozularak büyüme faktörlerinin sentezlenmesini tetikleyen parçaların salınmasını sağlamaktadır. Böylece anjiyogenez ve reepitelizasyon süreçlerine katkıda bulunmaktadır. Son olarak kolajen yapıları yeniden organize edilerek yara dokusunun çekme mukavemetinin artmasını ve skar dokunun olgunlaşmasını sağlamaktadır [148].

Literatürdeki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara bakıldığında fotostimülasyonun kolajen ve fibronektin ekspresyonunu desteklediği bilinmektedir [149-151]. Ayrıca Ayuk ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insan fibroblast hücreleri kullanılarak oluşturulan diyabetik yara modellerine fotostimülasyon uygulandığında kolajen sentezinin arttığı görülmüştür [152]. Keshri ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise sıçanlarda oluşturulan yara modellerinde fibronektin ekspresyonunun, fotostimülasyon uygulanan gruplarda arttığı belirtilmiştir [146].

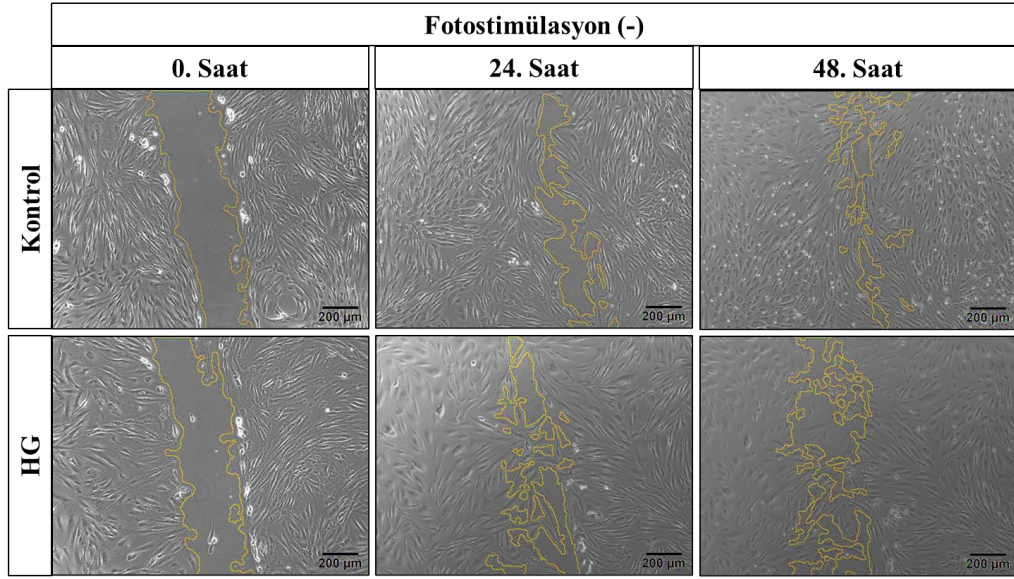
#### **4.1.2.4. Hücre Göçü Analizi**

Yapılan hücre göçü analizlerinin HDF (Şekil 4.20'de ve Şekil 4.21'de) ve HS2 (Şekil 4.23'te ve Şekil 4.24'te) hücrelerine ait görüntüleri aşağıda verilmektedir.

##### **HDF Hücreleri**

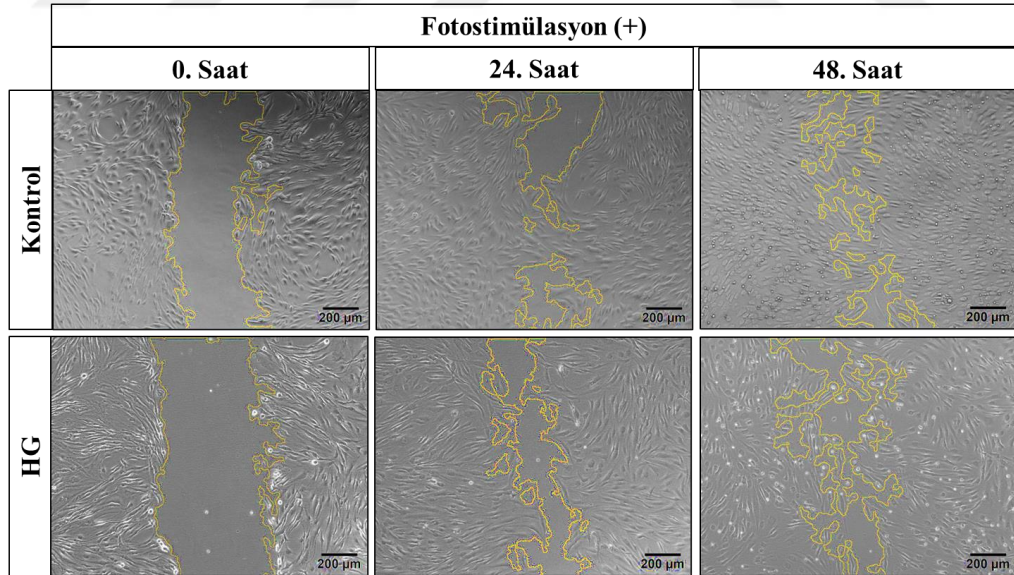
Fibroblast hücrelerine yapılan scratch analizi görüntüleri incelendiğinde kontrol grubunda göç bölgesindeki kapanma oranının hiperglisemi grubuna göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Fotostimülasyon uygulanmayan HDF hücrelerinde 48 saat sonunda tamamen kapanma gerçekleşmemiştir. Bununla beraber hiperglisemi grubundaki kapanma oranı kontrol grubunda göre oldukça az olduğu görülmüştür.



Şekil 4.20. Fotostimülasyon uygulaması yapılmayan HDF hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

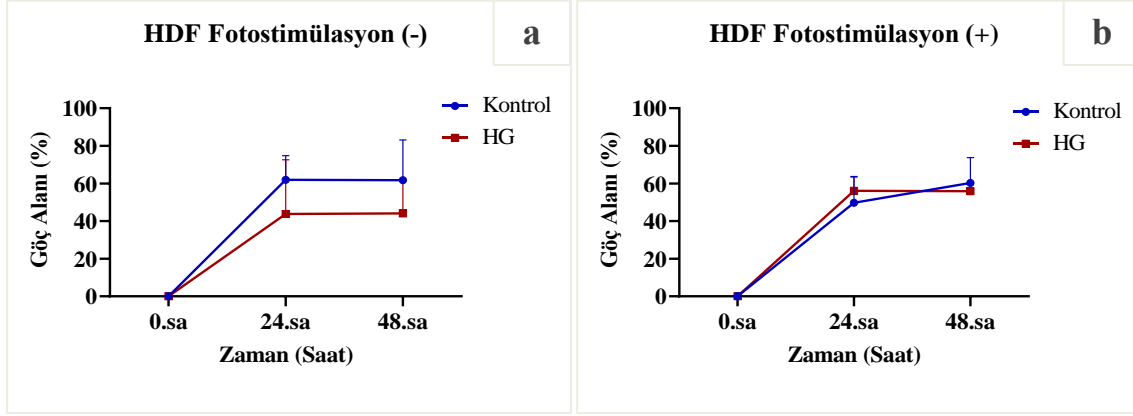
Fotostimülasyon uygulanan HDF hücrelerine ait görüntüler incelendiğinde ise hiperglisemi grubundaki hücre göçünün kontrol grubu ile benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Bu durumda fotostimülasyon, hiperglisemik koşullardaki HDF'lerde hücre göçünü destekleyen bir etki göstermiştir.



Şekil 4.21. Fotostimülasyon uygulaması yapılan HDF hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

Göç alanının Image J programı kullanılarak nicel verilere dönüştürülmesi ile elde edilen yüzde hücre kapanması grafiği (Şekil 4.22) ile göç bölgesinin inverted mikroskop görüntüleri uyumludur. Hiperglisemik koşullarda hücrelerin kontrol grubuna göre göç

kabiliyetleri azaldığı görülmüştür. Diğer yandan fotostimülasyon uygulaması ile hiperglisemik koşullardaki hücrelerin göçü desteklenmiş ve kontrol grubu ile benzer bir kapanma oranına ulaşılmıştır.

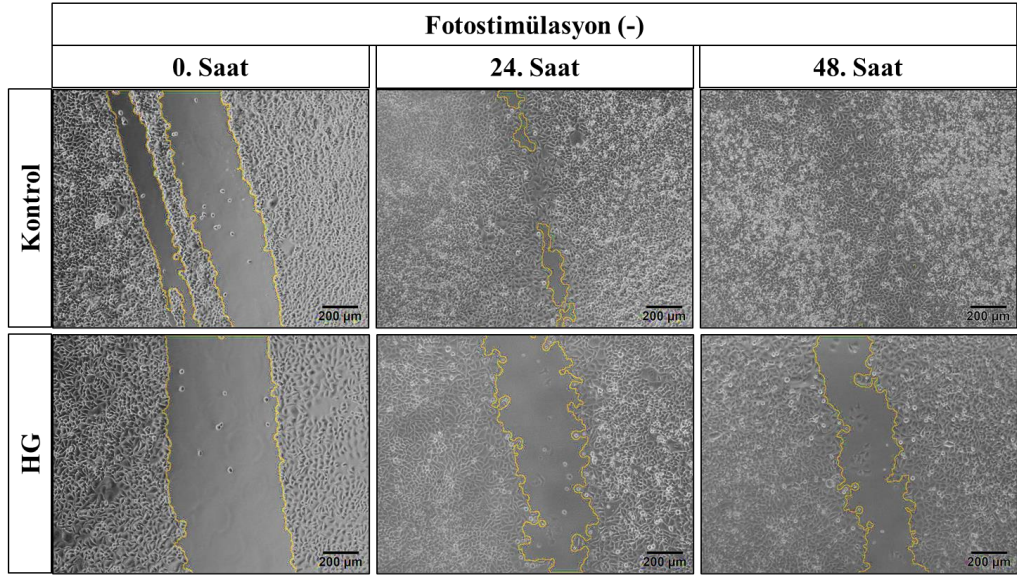


Şekil 4.22. Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HDF hücrelerine ait yüzde hücre göç grafiği, a) fotostimülasyon uygulanan, b) fotostimülasyon uygulanmayan hücreler.

### **HS2 Hücreleri**

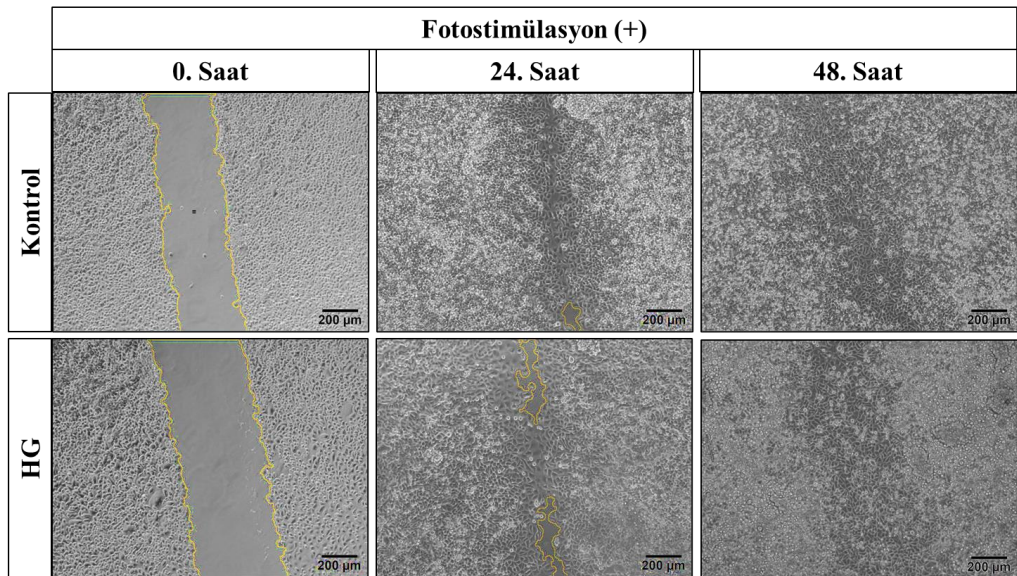
Keratinositlerde yapılan scratch analizi görüntüleri (Şekil 4.23) incelendiğinde fotostimülasyon uygulanmayan hiperglisemi grubunda hücre göçünün kontrol grubuna göre çok daha az olduğu görülmektedir.

Yara bölgesi kontrol grubu hücrelerinde 48 saatin sonunda tamamen kapanmıştır ancak hiperglisemi grubu hücrelerinde kapanma gerçekleşmemiştir. Buna göre hiperglisemi, keratinosit hücrelerinde de hücre göçünün azalmasına sebep olmaktadır.



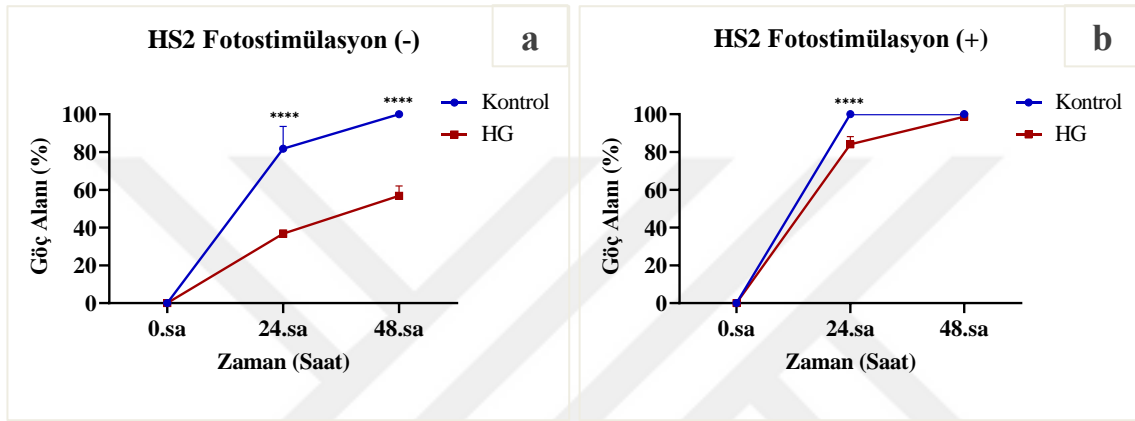
Şekil 4.23. Fotostimülasyon uygulaması yapılmayan HS2 hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

Fotostimülasyon uygulanan hücrelerin Şekil 4.24'te verilen inverted mikroskop görüntülerine bakıldığında ise 24. saatin sonunda kontrol grubunda göç alanının tamamen kapandığı görülmektedir. Ayrıca hiperglisemi grubu hücrelerinde de yara alanı 24. saatin sonunda büyük ölçüde kapanmıştır ve 48. saatin sonunda ise tamamen kapanma gerçekleşmiştir. Dolayısıyla fotostimülasyon uygulandığında kontrol ve hiperglisemi grubunda keratinositler benzer bir hücre göçü sergilemiştir.



Şekil 4.24. Fotostimülasyon uygulaması yapılan HS2 hücrelerine ait hücre göçünün 0, 24 ve 48. saatlerine ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: 10x).

Göç bölgesindeki inverted mikroskop görüntülerine ek olarak Şekil 4.25'te verilen grafiklerde, kontrol grubuna ait yüzde göç alanının hiperlisemi grubuna göre istatistiksel olarak anlamı derecede yüksek olduğu ve 48 saatin sonunda tamamen kapanma gerçekleştiği görülmektedir. Hiperglisemi grubunda ise 48 saat sonunda yara bölgesi yalnızca %56 oranında kapanmıştır. Fotostimülasyon uygulandığında ise kontrol ve hiperglisemi gruplarının her ikisi de 48 saat sonunda %100 oranında kapanmıştır. Buna göre Şekil 4.25'te verilen grafikler ile inverted mikroskop görüntüleri birbiriyle uyumlu sonuçlar vermiştir.



Şekil 4.25. Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenen HS2 hücrelerine ait yüzde hücre göç grafiği, a) fotostimülasyon uygulanan, b) fotostimülasyon uygulanmayan hücreler.

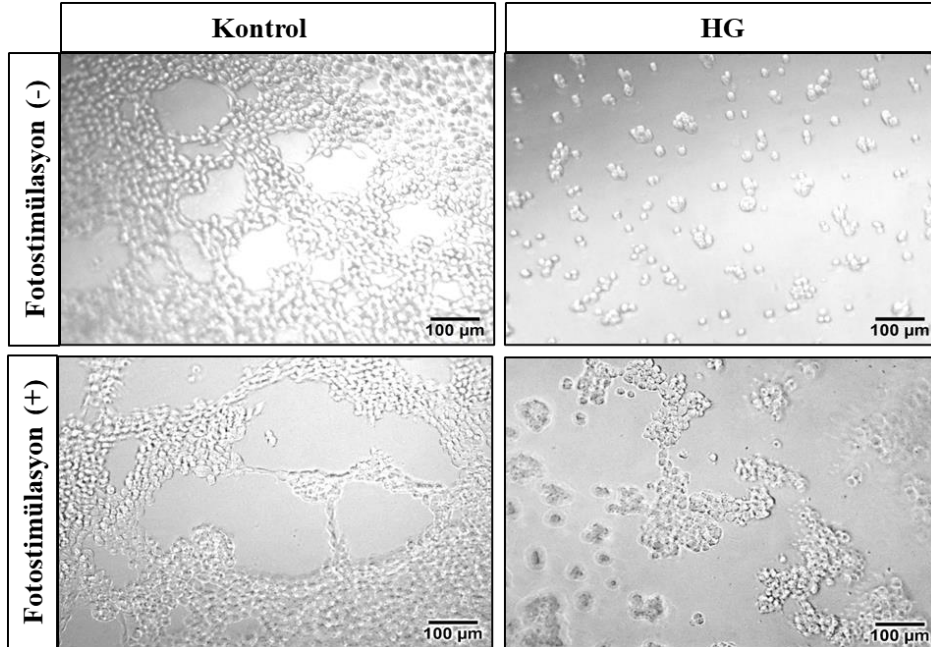
Genel anlamda scratch analizine ait inverted mikroskop görüntüleri ve grafiklere bakıldığında fotostimülasyonun HDF ve HS2 hücrelerinin yara bölgesine göçünü desteklediği ve özellikle hiperglisemik koşullarda hücrelerin göçünde belirgin bir artış sağladığı görülmüştür. Ancak fotostimülasyon, HS2 hücrelerinin göçünde daha etkin bir rol oynamıştır. Bu durumun keratinositlerin hızlı proliferasyonu, migrasyon kapasitesi veya fotostimülasyona karşı duyarlılığının fibroblast hücrelerine göre daha yüksek olabileceğinden, hücrelerinin yapısal ve metabolik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İn vitro modellerde yara oluşturmak için scratch yöntemi haricinde damgalama, elektriksel, termo-mekanik ve optik yöntemler de mevcuttur [75]. Ancak ısının diğer hücreleri etkilemesi, erişimi zor cihazların kullanımı veya tekrarlanabilirliğin düşük olması gibi dezavantajlara sahip olması nedeniyle çalışmamızda da olduğu gibi scratch yöntemi tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesinde, fibroblastların ve keratinositlerin yara bölgesine göçü ve proliferasyonu oldukça kritiktir. Yara oluşumundan sonraki saatlerde keratinositler göç etmeye başlamaktadır ve 1-2 gün sonra proliferasyon gerçekleşmektedir. Yaralanma sonrasında keratinositlerin çoğalmasını arttırmak için büyüme faktörleri salınmaktadır ve keratinositlerdeki bu çoğalma süreci epitel kapanma gerçekleştikten sonra da devam etmektedir [122]. Ancak yüksek glikoz seviyeleri ile karakterize olan diyabetik yaralarda çizik analizi sonrası keratinosit göçü ve çoğalması azalmaktadır [153]. Literatürdeki çalışmalar bakıldığında Mathioudaki ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada keratinosit hücrelerinde bir çizik modeli oluşturulmuş ve bir diyot lazer sistemi ile ışık uygulaması yapılmıştır. Işık uygulanan yara modellerinde hücre göçünün arttığı ve iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir [143]. Oyebode ve Hourel tarafından fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada da diyabetik yara modellerinde fotostimülasyon uygulanmasının hücre göçünü teşvik ettiği görülmüştür [106].

#### 4.1.2.5. Tübül Oluşum Analizi

Tez çalışmasında normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HUVEC hücrelerinde fotostimülasyonun tübül oluşumuna etkisi incelenmiştir. Şekil 4.26'da HUVEC hücrelerinin 5 saat sonundaki tübül oluşumunu gösteren inverted mikroskop görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.26. Hiperglisemik ortam koşullarında kültürlenmiş ve fotostimülasyon uygulanan HUVEC hücrelerindeki tübül oluşumunu gösteren inverted mikroskop görüntüleri (Bar: 100 µm).

Hiperglisemik ortam koşullarının HUVEC hücrelerinde tübül oluşumunu olumsuz etkilediği görülmüştür. Fotostimülasyon uygulanmayan hücelere bakıldığında kontrol grubunda tübül oluşumunun gerçekleştiği görülürken hiperglisemi grubu hücrelerinde tübül oluşumu gözlenmemiştir.

Fotostimülasyon uygulanan hücelere bakıldığında ise kontrol grubunda belirgin şekilde tübül oluşumu gerçekleşmiştir. Ayrıca hiperglisemi grubunda da tübül oluşumunun başladığı görülmektedir. Kontrol grubuna göre belirgin tübüller oluşmasa da tübül oluşturma yeteneği fotostimülasyon uygulanmayan hiperglisemik hücelere göre daha fazladır. Bu sonuçlara göre fotostimülasyonun HUVEC hücrelerinde hiperglisemik koşullarda dahi anjiyogenez potansiyelini artırabildiği düşünülmektedir.

Tübül oluşumu, *in vitro* çalışmalarda genellikle HUVEC (İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri) kullanımı ile anjiyogenez sürecini taklit etmek üzere incelenen biyolojik bir süreçtir [154]. Anjiyogenez, kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşum sürecini ifade etmektedir ve bu süreç fizyolojik ve patolojik koşullarda kritik bir öneme sahiptir. Bu süreci modellemek ve anjiyogenez mekanizmasını anlamak amacıyla HUVEC hücreleri yaygın olarak kullanılmaktadır [154].

Tübül oluşumu endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve hücre-hücre bağlantıları ile kapiller formda yapılar oluşturmalarını içeren bir süreçtir. Yara iyileşmesinde tübül oluşumu süreci kritik bir öneme sahiptir. Çünkü yeni kan damarlarının oluşumu ile oksijen ve besin ihtiyacını karşılayarak iyileşme sürecinin hızlanmasını sağlamaktadır.

Diyabetik yaralarda genellikle anjiyogenez mekanizmasında bozulmalar meydana gelmektedir ve buna bağlı olarak tübül oluşumu ve yara iyileşmesi gecikmektedir. Yüksek glikoz seviyeleri endotel hücrelerinde fonksiyonel bozukluk, apoptoz ve ayrılma gibi olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu durum endotel hücrelerinin tübül oluşturma kapasitenin azalmasına ve yetersiz anjiyogeneze neden olmaktadır. Yetersiz anjiyogenez ise diyabetik yara iyileşmesi ve vasküler komplikasyonların patolojik etkisinde kritik rol oynamaktadır [155]. Bu nedenle diyabetik yara tedavisinde büyüme faktörlerinin kullanımı, hücre terapileri ve fotostimülasyon gibi tedavi yaklaşımları büyük önem taşımaktadır.

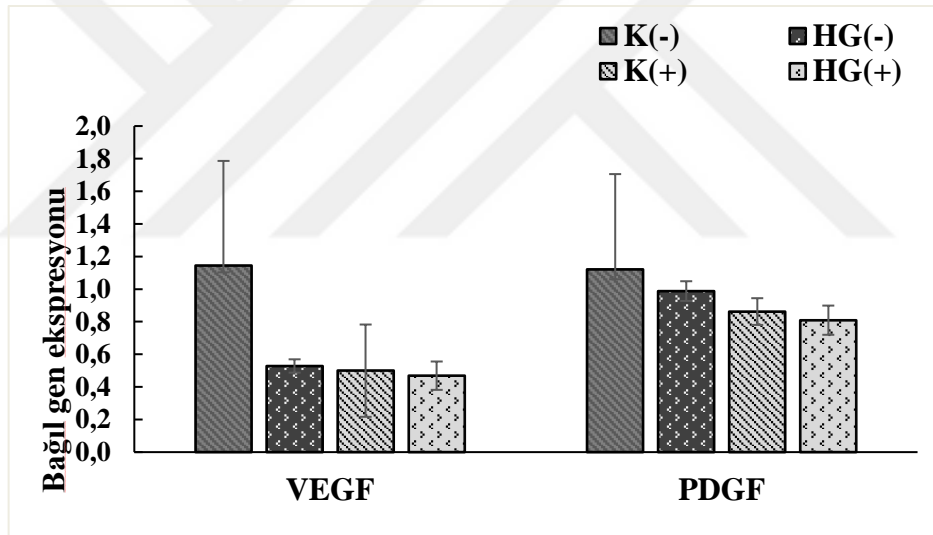
Zhang ve ark. tarafından HUVEC hücrelerinde Matrijel tübül oluşum analizi gerçekleştirilmiş olup fotostimülasyonun hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi desteklediği görülmüştür [156]. Fotostimülasyonun anjiyogenez üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla Zhong ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir başka bir çalışmada ise HUVEC ve MC3T3-E1 hücreleri birlikte kültürlenmiştir. Tübül oluşum analizi

sonrasında ise birlikte kültürlenmiş bu hücrelerde fotostimülasyonun anjiyogenezi artırdığı bildirilmiştir [157]. Dungal ve ark. tarafından diyabetik fareler üzerinde gerçekleştirilen yara modellerinde farklı dalga boylarında fotostimülasyon uygulamasının yara kapanmasını ve anjiyogenezi artırmada etkili olduğu gösterilmiştir [158]. Dolayısıyla literatürdeki bu çalışmaların sonuçları ile gerçekleştirdiğimiz analizlerin sonuçları birbiri ile uyumludur.

#### 4.1.2.6. Gen Ekspresyonu Analizi

Tez kapsamında anjiyogenez ile ilgili yapılan çalışmalardan bir diğeri anjiyogenezden sorumlu VEGF ve PDGF genlerinin ekspresyon seviyelerinin analizi olmuştur. Bu amaçla RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HUVEC hücrelerine fotostimülasyon uygulanmış olup kültürün 7. gününde RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analize dair sonuçlar Şekil 4.27’de verilmektedir.



Şekil 4.27. Fotostimülasyon varlığında normal ve hiperglisemik koşullardaki HUVEC hücrelerinin PDGF ve VEGF gen ekspresyonu seviyeleri.

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonuna bakıldığında tübül oluşum analizi ile benzer şekilde hiperglisemik koşullarda VEGF ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ekspresyonunda ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Anjiyogenez sürecinde VEGF, başlatıcı faktör olarak görev almaktadır. Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ise anjiyogenez sürecinin ilerleyen aşamalarında yeni damarların stabilizasyonu ve olgunlaşması aşamalarında yer almaktadır [159].

Dolayısıyla anjiyogenez sürecindeki büyüme faktörü genlerinin eksprese olma aşamaları göz önünde bulundurulduğunda fotostimülasyonun etkisinin incelenmesi için daha uzun süreli bir çalışmanın planlanması gerektiği düşünülmüştür.

Anjiyogenez süreci bir doku hasarı sonrasında mevcut endotel yapıları hasar nedeniyle destabilizasyona uğramaktadır. Büyüme faktörleri, sitokin ve hücreler arası etkileşimler endotel hücrelerinin aktive olmasına destek olmaktadır. Anjiyogenez başlatmak üzere aktive olan endotel hücreleri, trombosit, makrofaj ve fibroblastlar tarafından vasküler endotel büyüme faktörü-A (VEGF-A), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) gibi anjiyogenik sitokinlerin salınmasında görev almaktadır. Böylece yerleşik endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve yeni tübül oluşturması sağlanmaktadır [160].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenez süreçlerini tetikleyen, trombosit, fibroblast ve endotel hücreleri gibi birçok hücre tarafından yara iyileşmesinin farklı aşamalarında salınmaktadır. Platelet kaynaklı büyüme faktörü ise yara iyileşmesi sürecinde, yara bölgesinde trombositlerin degranülasyonu ile salınmaktadır. İyileşmenin diğer aşamalarında da endotel, fibroblast ve monosit kaynaklı hücreler tarafından salınmaktadır. Fibroblast proliferasyonu, granülasyon doku oluşumunu ve yeni kan damarlarının oluşumunu desteklemektedir [161].

Ruh ve ark. tarafından diyabetik hastalardaki basınç ülserlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada fotostimülasyonun VEGF ve TGF- $\beta$  seviyesini artırdığı bildirilmektedir [162]. Komine ve ark. tarafından *in vitro* fare fibroblastları kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada fotostimülasyon uygulanan grupta PDGF ekspresyonunda önemli bir artış olduğu bildirilmiştir [163]. Safavi ve ark., sıçanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada düşük seviyeli He-Ne lazeri ile fotostimülasyon uygulamasının PDGF ekspresyonunda anlamlı artış sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır [164].

#### **4.2. Üç Boyutlu Hiperglisemi ve Fotostimülasyon Çalışmaları**

Tez çalışmasının 3-boyutlu çalışmaları kapsamında üretilen doku iskelelerinin üretiminde kullanılan malzemeler, yöntemler ve tercih edilme sebepleri hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonrasında ise iskelelerin, Doku Mühendisliği grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş olan karakterizasyon sonuçları gösterilmiştir.

Sonrasında üretilen iskeleler üzerinde gerçekleştirilen hiperglisemi ve fotostimülasyon çalışmaları hakkında bilgi verilmiş olup literatürdeki benzer çalışmalar ile arasındaki uyum değerlendirilmiştir.

#### **4.2.1. Doku İskelelerinin Üretilmesi**

İki katmanlı doku iskelelerinin bir katmanında malzeme olarak PCL tercih edilmiştir ve elektroğirme yöntemiyle üretilmiştir. Diğer katmanda ise kitosan ve jelatin kullanılmıştır ve dondurarak kurutma yöntemiyle üretimi gerçekleştirilmiştir. İskelelerin üretimine yönelik yapılan çalışmalar ve sonuçları aşağıda açıklanmıştır.

##### **4.2.1.1. PCL Doku İskelelerinin Üretilmesi**

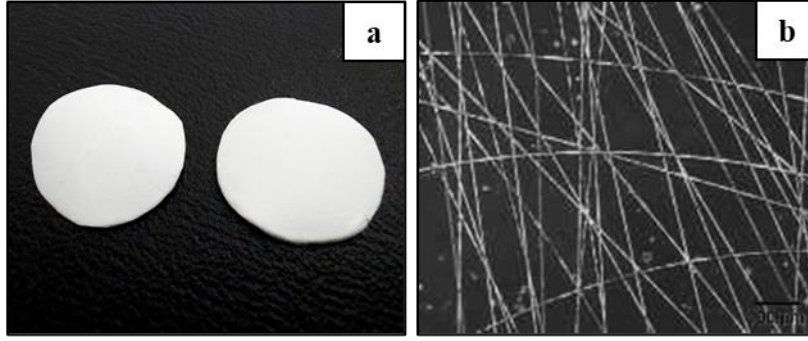
Doku iskelesinin epidermisi tabakasını taklit etmek amacıyla üretilecek olan ilk katmanda PCL polimeri kullanılmıştır. PCL, genellikle polikondenzasyon ve halka açma polimerizasyonu yöntemleri ile sentezlenmektedir ve literatürde doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [165]. Yüksek biyoyumluluğa sahip, biyobozunur ve toksik etki göstermeyen FDA onaylı bir polimerdir ve elektroğirme yöntemiyle nanofiber üretimi için oldukça elverişlidir. Uygun maliyetlerde sentezlenebilirliği, vücuttaki dokuların birçoğu ile sitouyumluluğu, yavaş bozunma hızı ve kopolimerizasyon ile mekanik özelliklerinin optimize edilebilir olması nedeniyle ideal bir yapay polimerdir [165-168].

Doku iskelelerinin üretiminde birçok farklı teknik kullanılmaktadır ve elektroğirme yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Elektroğirme yöntemi ile üretilmiş olan nanofiber membranların en önemli avantajları derideki ECM yapısına benzer fiber yapısına, gözenek boyutlarının küçük ve yüksek sayıda olmasını sağlamasıdır. Ayrıca bu özelliklere sahip membranlar uygun biyokimyasal ve fiziksel ortamların sağlanması ile hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasını desteklemektedir. Yapısal avantajlarının yanında maliyetinin düşük olması, kullanım alanına göre uyarlanabilir olması ve kolaylıkla nanofiber elde edilebilmesi nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [82, 169].

Elektroğirme yöntemi bir polimerin uygun bir çözücü ile çözelti haline getirildikten sonra şırınga içerisine alınıp elektriksel alan uygulanması ve bu polimer çözeltisinin fiberler halinde toplayıcıda toplanması prensibine dayanmaktadır.

Literatürde elektroğirme yöntemi ile üretilmiş olan nanofiberler cildin gerçek ECM yapısına benzeyen, hücrelerin doğal fonksiyonlarını gerçekleştirmesine olanak sağlayan yapıların üretilebildiği belirtilmektedir [170]. PCL, elektroğirme yöntemiyle nanofiberlerin üretilmesini sağlayan ideal polimerlerden biridir. Dayanıklılığının yüksek olması, esnekliği ve düşük su buharı geçirgenliği, elektrospun PCL fiberlerinin yara

iyileşmesinde kullanılmasını sağlayan önemli özelliklerdir [171]. Çalışma kapsamında elektroğirme yöntemiyle üretilen PCL iskele katmanlarına ait mikroskopik ve makroskopik görüntüler Şekil 4.28’de verilmektedir. Fiberlerin düzgün formda, boncuk içermeyecek şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.28. Elektroğirme yöntemi ile üretilmiş olan PCL doku iskelelerinin a) makroskopik görüntüsü b) mikroskopik görüntüsü.

#### 4.2.1.2. İki Katmanlı PCL / kitosan-jelatin Doku İskelelerinin Üretilmesi

İki katmanlı doku iskelelerinde derinin dermiş tabakasını temsil etmek üzere kitosan ve jelatin polimerleri kullanılmıştır. Kitosan, genellikle kabuklu hayvanların ve bazı mantarların kabuklarında bulunan kitin maddesinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Kitosanın doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmesinin en önemli sebepleri, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, biyouyumlu, biyobozunur olması ve toksik olmayan bir yapıya sahip olmasıdır. Kimyasal yapısı glukozamin (2-amino-2-deoksi-D-glukoz) ve N-asetil glukozamin (2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz) birimlerinden oluşan yarı kristalli bir polisakkarittir. Yapısında bulunan amino grubu (-NH<sub>2</sub>) sebebiyle katyonik bir yapıdadır. Sahip olduğu bu pozitif yük ise elektrostatik çekim yoluyla proteoglikan gibi negatif yüklü molekülleri bağlama özelliği sağlamaktadır ve bu da ECM oluşumunu desteklemektedir. Kitosanda bulunan amino, hidroksil, karboksil fonksiyonel grupları, kitosanın başka bir doğal veya yapay materyaller ile kompozit oluşturabilmesini sağlamaktadır. Bu sayede kitosanın çeşitli özellikleri uygulama alanına göre modifiye edilerek yara iyileşmesi gibi çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilir [172].

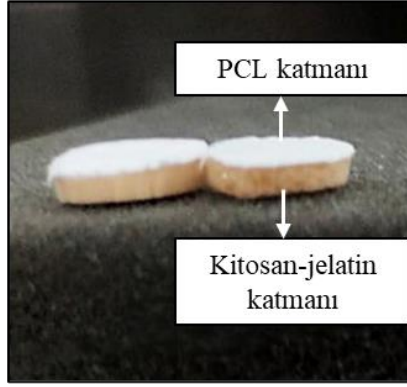
Jelatin, kolajenin hidrolizi ile elde edilen ve sığır, domuz, balık gibi hayvanların deri, kemik, bağ dokularında oldukça fazla bulunan düşük maliyetli bir protein türüdür. Yapısında -NH<sub>2</sub> ve -COOH fonksiyonel grupları bulunmaktadır ve hidrofilik, biyobozunur özelliktedir. Bir malzemenin mekanik dayanımını, biyolojik aktivitelerini,

fonksiyonel özelliklerini arttırabilmektedir ve daha düşük immünolojik etki göstermektedir. Ancak jelatinin gösterdiği zayıf mukavemet, düşük termal stabilite özellikleri ve hızlı bozunma gibi dezavantajları da mevcuttur. Dolayısıyla bu yara iyileşmesi, ilaç salınımı gibi uygulamalarda uzun süreli olarak kullanıma uygun değildir. Ayrıca kitosan ve jelatin tek başına kullanımda hücre tutunmasını, çoğalmasına olanak verecek bir yapıda olmasına rağmen jelatinin mekanik dayanımının düşük olması sebebiyle jelatini başka polimerler ile birleştirilerek kullanımını gerektirmektedir. Kitosan ve jelatinin birlikte kullanımında iki polimer arasındaki moleküler etkileşimler sayesinde kompozit malzemenin mekanik özellikleri, termal stabilite, biyoaktif özellikleri gelişmektedir.

Kitosan ve jelatinin karıştırma veya çapraz bağlama yöntemleri ile birleştirilmesi mümkündür. Çapraz bağlayıcı olarak genellikle gluteraldehit, genipin, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür) ve NHS (N-hidroksi süksinimid) kullanılmaktadır. Gluteraldehit diğer bağlayıcılara göre kolay erişilebilen, düşük maliyetli, geniş kullanım alanına sahip, hızlı reaksiyon süresi ve yüksek stabilite gibi avantajlar sağladığından dolayı bu çalışma kapsamında da tercih edilmiştir [173].

Kitosan-jelatin doku iskelelerinin üretimi için sıklıkla tercih edilen yöntemler arasında dondurarak kurutma, elektroçirme, 3B biyo-baskı, faz ayırma gibi teknikler bulunmaktadır. Dondurarak kurutma yöntemi ile yüksek gözeneklilikte ve ayarlanabilir boyutlarda gözeneklere sahip iskeleler elde edilebilmektedir. Dondurma parametrelerinde değişiklik yapılarak iskelenin gözenek boyutu, dağılımı ve şekli istenilen özelliklere göre ayarlanabilmektedir.

Çalışmamızda da iskelelerde iyi mekanik özelliklere ve içsel bağlantılara sahip gözenekli bir yapıya ulaşmak için dondurarak kurutma yöntemi tercih edilmiştir. Kitosan ve jelatin hacimsel olarak 3:1 oranında üretilmiştir. Üretimi yapılan PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin makroskobik görüntüsü Şekil 4.29'da verilmektedir.



Şekil 4.29. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiş olan PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin makroskobik görüntüsü.

Üretilen tek katmanlı kitosan-jelatin ve iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda Doku Mühendisliği grubumuz tarafından gerçekleştirilen su tutma kapasitesi ve basma testlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tek katmanlı kitosan-jelatin ve iki katmanlı PCL/ kitosan-jelatin iskelelerinin doku iskelelerine ait karakterizasyon sonuçları.

<b>Doku İskelelerinin Karakterizasyon Sonuçları</b>		
<b>Doku İskelesi</b>	<b>Young modülü (MPa)</b>	<b>Su tutma kapasitesi (%)</b>
Kitosan-Jelatin	0,1975 ± 0,06	1637,1 ± 178,3
PCL/ kit-jel (Kitosan yüzeyi)	0,3653 ± 0,05	1206,9 ± 119,2
PCL/ kit-jel (PCL yüzeyi)	0,32825 ± 0,05	

Gerçekleştirilen mekanik analizlerin sonucuna göre kontrol grubu olarak kullanılan tek katmanlı kitosan-jelatin doku iskelelerine kıyasla iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin iskelelerinin kitosan yüzeyi (PCL/ kit-jel 1) ve PCL yüzeyine (PCL/ kit-jel) ait Young modülünün istatistiksel olarak anlamlı (\*p<0.05, \*\*p<0.01) olduğu görülmüştür.

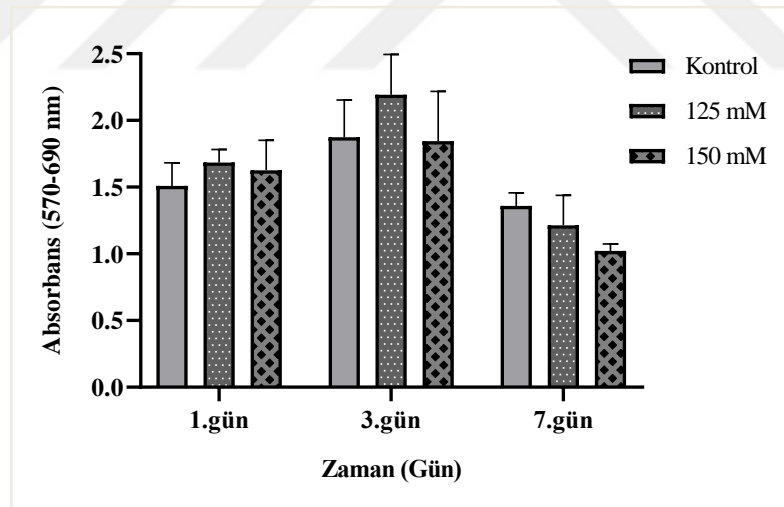
İskelelerin karakterizasyon sonuçlarına göre derinin epidermis tabakasını taklit etmek üzere tasarlanmış olan PCL iskele katmanının iskelenin mekanik özelliklerini iyileştirdiği görülmüştür.

#### 4.2.2. Hiperglisemik Koşullarının Belirlenmesi

Tez kapsamında üretimi tamamlanan PCL / kitosan-jelatin doku iskeleleri üzerindeki HDF ve HS2 hücrelerinin iki farklı glikoz konsantrasyonunda gösterdiği hücre proliferasyonu analiz edilmiştir. Bu analize göre çalışmanın diğer analizlerinde kullanılacak olan hiperglisemik ortam koşuluna karar verilmiştir.

##### 4.2.2.1. Proliferasyon Analizi

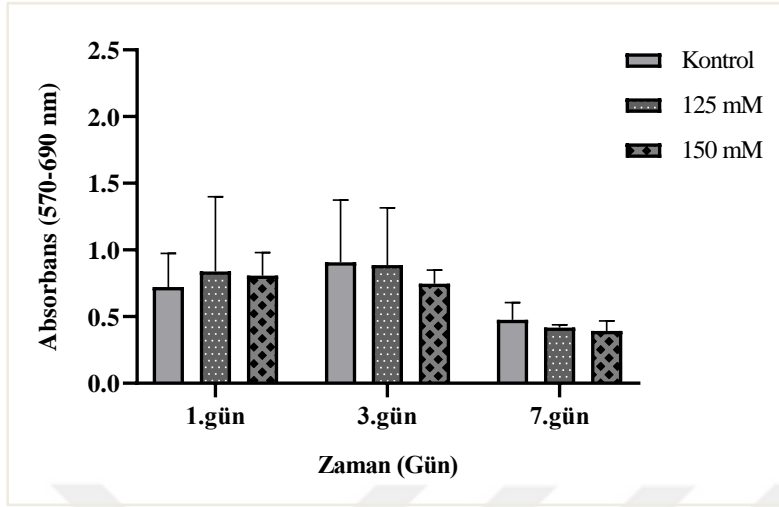
İki katmanlı iskelelerdeki HDF ve HS2 hücrelerinin, 125 ve 150 mM glikoz konsantrasyonlarındaki hücre proliferasyonunun analiz edilmesi için kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında katmanlar birbirinden pens yardımıyla ayrılmıştır ve katmanlardaki hücre canlılığı ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Kitosan-jelatin katmanındaki HDF hücrelerine ait MTT analizinin grafiği Şekil 4.30'de, PCL katmanındaki HS2 hücrelerine ait grafik ise Şekil 4.31'de verilmektedir.



Şekil 4.30. İki katmanlı doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanına ait MTT grafiği.

İki katmanlı doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanındaki HDF hücrelerinin hücre proliferasyonuna bakıldığında kültürün ilk 3 gününde her hiperglisemik konsantrasyonda da yükseldiği görülmektedir. Kültürün 7. gününe gelindiğinde proliferasyon tüm gruplarda azalma göstermiştir ve kontrol grubu ile kıyaslandığında 125 ve 150 mM konsantrasyonundaki proliferasyonun düştüğü görülmektedir. Ancak en düşük hücre

proliferasyonu 150 mM konsantrasyonunda izlenmiştir. Yine de proliferasyondaki bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.31. İki katmanlı doku iskelelerinin PCL katmanına ait MTT grafiği

Doku iskelelerinin PCL katmanındaki HS2 hücrelerine ait proliferasyonu incelendiğinde kültürün 3. gününe kadar kontrol grubu dahil tüm konsantrasyonlarda artış görülmektedir. Kültürün 7. gününde ise tüm grupların hücre proliferasyonu düşüş göstermiştir. Kontrol grubuna kıyaslandığında ise 125 ve 150 mM konsantrasyonlarında proliferasyon azalmıştır. Hücre canlılığı 150 mM konsantrasyonunda en düşüktür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Doku iskelelerinin her iki katmanı da ayrı ayrı incelendiğinde hiperglisemik konsantrasyonlarda benzer proliferasyonlar göstermiştir. İki katman için de en düşük proliferasyon 150 mM konsantrasyonunda izlenmiştir. Tez kapsamında doku iskeleleri üzerinde bundan sonra gerçekleştirilecek olan fotostimülasyon çalışmalarında kullanılacak olan hiperglisemik konsantrasyonun standardize edilmesi adına tek bir konsantrasyon ile devam edilmiştir. Doku iskelelerinde yapılan çalışmalarda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığından dolayı etkin bir hiperglisemik koşul belirlenmemiştir. Ancak 2-boyutlu çalışmalarda etkin doz olarak belirlenen 125 mM ile 3-boyutlu fotostimülasyon çalışmasına devam edilmiştir. Belirlenen bu hiperglisemik konsantrasyon ise analiz sonuçlarında kısaca “HG” olarak ifade edilecektir.

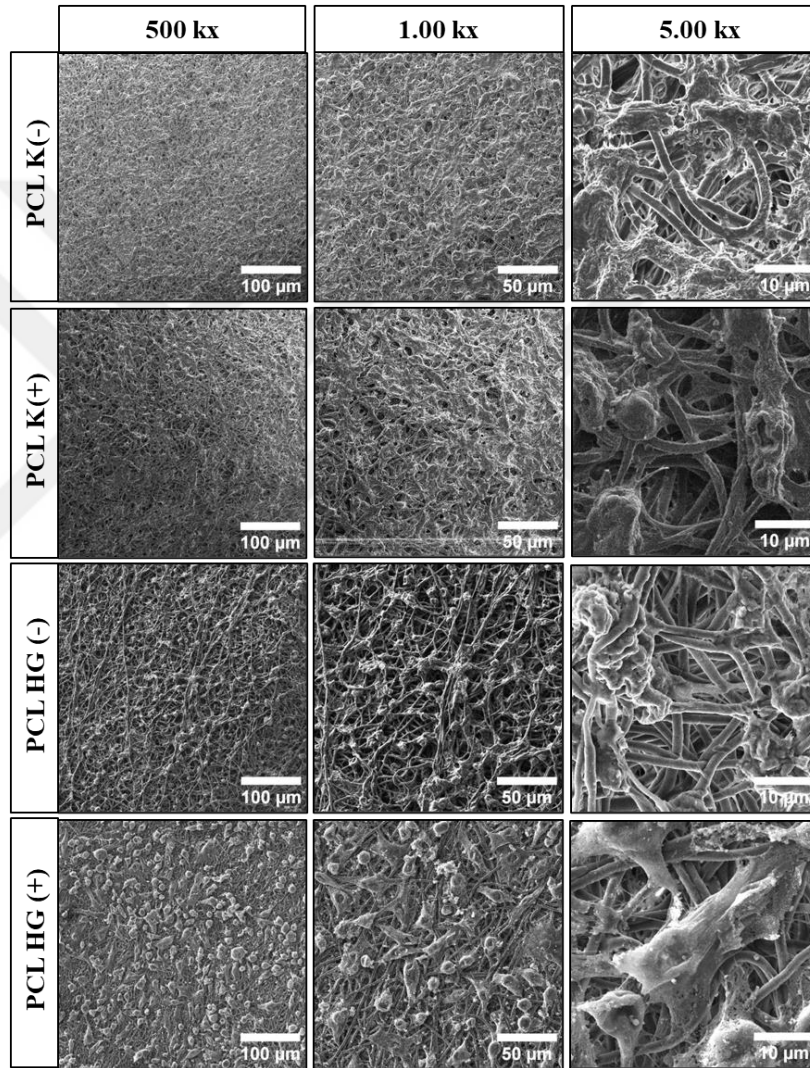
#### 4.2.3. Fotostimülasyon Çalışmaları

Hiperglisemik koşullarda kültürlenen HDF ve HS2 hücrelerinin iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskeleleri üzerindeki dağılımı ve morfolojilerini incelemek amacıyla

SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca iskelelerin her iki katmanındaki hücre proliferasyonunu incelemek amacıyla iskelelerde proliferasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin SEM analizine ait görüntüler Bölüm 4.2.3.1’de ve proliferasyon analizine ait sonuçlar ise Bölüm 4.2.3.2’de verilmiştir.

#### 4.2.3.1. SEM Analizi

İki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerine PCL katmanına ekilen keratinosit hücrelerinin fiberler üzerindeki dağılımı ve morfolojisi Şekil 4.32’de verilmektedir.

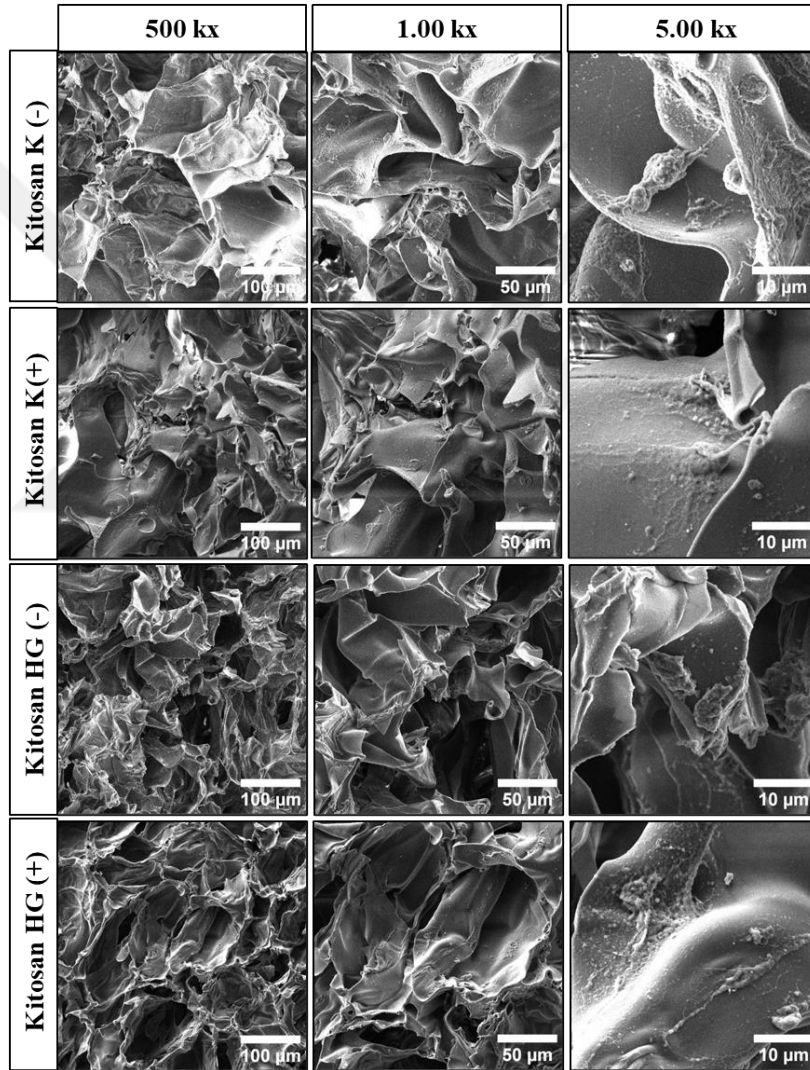


Şekil 4.32. İki katmanlı doku iskelelerinin PCL katmanı üzerindeki HS2 hücrelerine ait SEM görüntüleri

Kültürün 7. gününde derinin epidermis tabakasını taklit eden PCL katmanında, hiperglisemik koşullardaki HS2 hücrelerinin iskele yüzeyine tutunduğu ve tamamen kapladığı görülmektedir. Yapısal olarak hidrofobik özellik taşımakta olan PCL

katmanlarına HS2 hücrelerinin tutunmasının ve yüksek proliferatif etki göstermeleri ise bu polimerin hücre tutunmasını desteklediğini göstermektedir.

Hücreler, kontrol grubunda iskele yüzeyinin tamamen kaplanmış ve ECM oluşumları ile fiberlerin arasını doldurmuştur. Hiperglisemik koşullardaki HS2 hücrelerinde ise ECM yoğunluğu fotostimülasyon uygulanmayan gruplarda azalmıştır ve fiberler arasındaki boşluklar fotostimülasyon uygulanan gruplara kıyasla çok daha fazladır. Fotostimülasyon uygulanan gruplarda hücre tutunması, ECM sentezi ve hücre-hücre bağlantılarının daha yoğun olduğu görülmüştür.



Şekil 4.33. İki katmanlı doku iskelelerinin kitosan-jelatin katmanı üzerindeki HDF hücrelerine ait SEM görüntüleri.

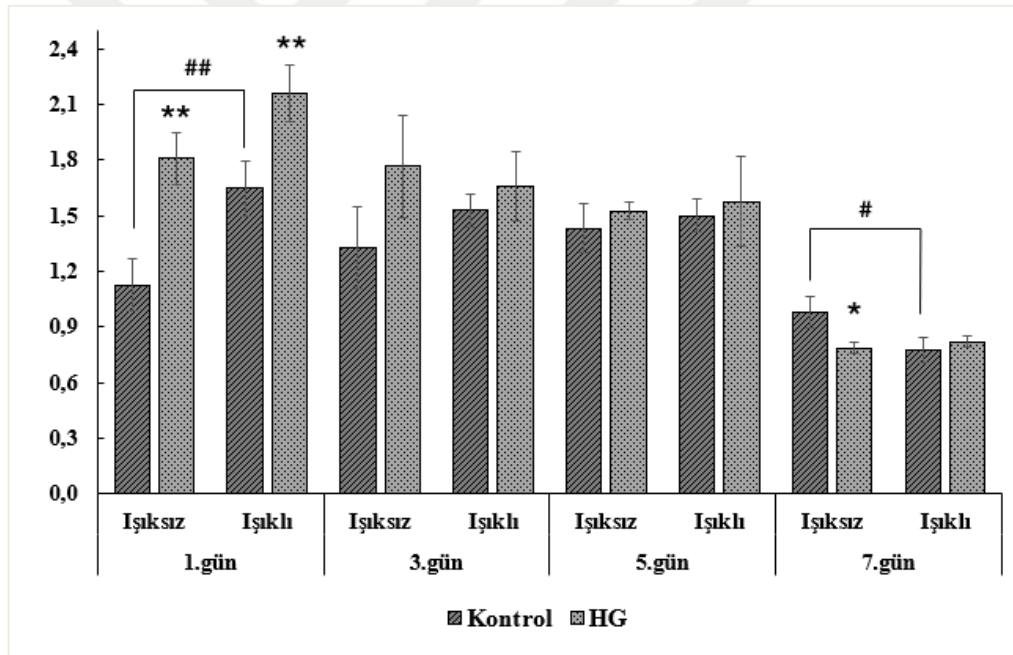
Kültürün 7. gününde derinin dermis tabakasının taklit eden kitosan-jelatin katmanında, hiperglisemik koşullardaki HDF hücrelerinin iskele gözeneklerinin içerisine doğru göç ettiği ve sentezledikleri hücre dışı matris (ECM) yapısı ile gözenekleri doldurduğu

görülmektedir. Ancak fibroblast hücrelerinin yavaş proliferasyon özelliği göstermesi nedeniyle HS2 hücreleri kadar yoğun bir dağılım göstermemiştir.

Tüm gruplarda hücreler iskelenin belli bölgelerinde tutunmuş, yayılmıştır ve gözenekler aracılığıyla iç bölgelere göç etmiştir. Ancak gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Buna ek olarak SEM görüntülerinden elde edilen morfolojik analiz bulguları ile Şekil 4.34'te verilen MTT sonuçları ile uyumluluğu olduğu görülmüştür.

#### 4.2.3.2. Proliferasyon Analizi

Hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinde HDF ve HS2 hücrelerinin proliferasyonunun ölçülmesi amacıyla MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, iskelenin PCL ve kitosan-jelatin katmanları birbirinden ayrılmadan gerçekleştirilmiş ve toplam hücre canlılığına bakılmıştır. İskelelere ait MTT analizi sonuçları Şekil 4.34'te verilmektedir.



Şekil 4.34. İki katmanlı PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerindeki hücrelere ait MTT analizi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ ).

İskelelerde yapılan MTT analizi sonuçlarına bakıldığında kültürün 1. gününde ışık uygulanmayan hiperglisemik gruptaki hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede (\*\* $p < 0.01$ ) artış göstermiştir. Ayrıca ışık uygulanan kontrol grubundaki hücre proliferasyonu, ışık uygulanmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede (\*\* $p < 0.01$ ) yüksektir. Kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde genel

olarak ışık uygulanan hücrelerde proliferasyonun ışık uygulanmayan hücelere göre daha yüksek olduğu görölmektedir.

Kültürün 7. gününde ise ışık uygulanmayan hiperglisemik gruptaki hücelerde proliferasyon, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $*p<0.05$ ) azalmıştır. Işık uygulanan kontrol ve hiperglisemik gruplar arasında ise anlamlı bir fark görölmemiştir.

Genel olarak ışık uygulanan grupların hücre proliferasyonunu kültürün ilk günlerinde artırdığı görölmüştür ve özellikle hiperglisemik koşullardaki hücelerde bu etki daha belirgindir.

Özetle, 3-boyutlu çalışmalarda fotostimülasyonun erken dönemde proliferasyonu desteklediği ve kültürün devam eden günlerinde ECM sentezini artırıcı etkisi olduğu görölmüştür. Bu açılardan fotostimülasyonun yara iyileşmesini arttırıcı bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Ancak bu etki ışık kaynağı, kültür süresi, kültür koşulları ve hücre türlerine göre farklılık gösterebilmektedir.

## 5. YORUM

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında fotostimülasyonun 2 ve 3-boyutlu *in vitro* hiperglisemik modellerde insan dermal fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla öncelikle insan dermal fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri ile *in vitro* koşullarda 2-boyutlu bir hiperglisemi modeli oluşturulmak için kültür koşulları optimize edilmiştir. Daha sonra bu hücrelerin belirlenen 2-boyutlu kültür koşullarında normal ve hiperglisemik ortamlardaki hücresel aktivitelerinde fotostimülasyonun etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda fotostimülasyonun hiperglisemik koşullardaki insan dermal fibroblast ve keratinosit hücrelerinin morfoloji, proliferasyon, göç, ECM sentezi üzerindeki etkileri analiz edilirken endotel hücrelerinde ise anjiyogenik etkileri analiz edilmiştir.

Çalışmanın 2-boyutlu modellerinde yapılan analizlerin sonuçları da temel alınarak PCL / kitosan-jelatin biyomalzemeleri ile iki katmanlı bir 3-boyutlu hiperglisemi modeli oluşturulmuştur. Son olarak oluşturulan 3-boyutlu hiperglisemi modelinde fotostimülasyon uygulanmasının hücrelerin proliferasyonu, iskele yüzeyine tutunması, ECM sentezi ve hücre-hücre bağlantıları üzerindeki etkileri analiz edilmiştir.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- İnsan dermal fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerinin morfolojisini bozması ve proliferasyonunu düşürmesi nedeniyle 125 mM glikoz konsantrasyonu içeren ortam hiperglisemik koşul olarak belirlenmiştir.
- Hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HDF, HS2 ve HUVEC hücrelerine gün aşırı periyotlarda, 20 cm mesafeden, 3 dk süreyle fotostimülasyon uygulanmasının hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür.
- Fotostimülasyonun normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HDF hücrelerinde kolajen ve fibronektin sentezini artırdığı gerçekleştirilen immünohistokimya analizleri sonucunda anlaşılmıştır.
- Hiperglisemik koşullarda HDF ve HS2 hücrelerinde scratch analizi gerçekleştirilerek fotostimülasyonun hücre göçü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Analize sonucuna göre fotostimülasyonun hücre göçünü teşvik ettiği ve özellikle hiperglisemik koşullardaki hücrelerin göçünde daha belirgin bir artış sağlamıştır.

Fotostimülasyonun keratinosit hücrelerinin göçü üzerinde daha etkin bir rol oynadığı görülmüştür.

- Fotostimülasyonun normal ve hiperlisemik koşullardaki HUVEC hücrelerindeki anjiyogenik etkisinin incelenmesi amacıyla tübül oluşumu analizi gerçekleştirilmiştir. Normal ve hiperglisemik koşullarda kültürlenmiş HUVEC hücreleri üzerinde fotostimülasyon uygulamasının tübül oluşumunu desteklemiştir ve özellikle hiperglisemik koşullarda dahi anjiyogenez potansiyelini artırabilmektedir.
- Fotostimülasyonun normal ve hiperlisemik koşullardaki HUVEC hücrelerindeki anjiyogenik etkilerinin incelenmesi amacıyla gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Tübül oluşum analizinin sonuçlarına paralel olarak hiperglisemik koşulların HUVEC hücrelerindeki VEGF ekspresyonunu azaltıcı etkisine sahip olduğu görülmüştür. Ancak PDGF ekspresyonunda gruplar arasında belirgin bir fark olmadığından dolayı gen ekspresyon analizi için 7 günlük kültür süresinin yeterli olmadığı düşünülmektedir.
- Çalışmada son fazında 3-boyutlu hiperglisemik model oluşturulmak üzere üzere PCL / kitosan-jelatin doku iskelelerinin PCL katmanı elektroçirgeme yöntemiyle ve kitosan-jelatin katmanı ise dondurarak kurutma yöntemiyle başarıyla gerçekleştirilmiştir.
- Oluşturulan 3-boyutlu hiperglisemik modellerde gün aşırı periyotlarda, 20 cm mesafeden, 7 dk süreyle fotostimülasyon uygulanmıştır. Daha sonra bu iskelelerin PCL ve kitosan-jelatin katmanındaki HS2 ve HDF hücreleri SEM analizi yapılarak ayrı ayrı incelenmiştir.
- İskelelerin PCL katmanında bulunan HS2 hücrelerinin iskeleye yüzeyini tamamen kapladığı, ECM yapıları ile fiberler arasındaki boşluğu doldurduğu görülmüştür. Hiperglisemik koşullardaki hücrelerin ECM yoğunluğunun normal koşullardaki hücrelere göre azaldığı görülmüştür. Ancak hiperglisemik koşullardaki HS2 hücrelerine fotostimülasyon uygulandığında hücre tutunmasının, ECM sentezinin ve hücre-hücre bağlantılarının daha yoğun olduğu, fiberler arası boşluğun tamamen kapandığı görülmüştür.
- İskelelerin kitosan-jelatin katmanında bulunan HDF hücrelerinin iskeleye tutunduğu, gözeneklerin içerisine göç ettiği, ECM'lerinin gözenekleri doldurduğu görülmüştür. Ancak gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

- Hiperglisemik ve normal koşullarda kültürlenmiş iki katmanlı PCL / kitosan-jelatin iskelelerinde fotostimülasyonun hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre fotostimülasyonun hücre proliferasyonunu kültürün ilk günlerinde artırdığı ve özellikle hiperglisemik koşullardaki hücrelerde daha belirgin bir etki gösterdiği görülmüştür.
- Kültürün 7. gününde ise fotostimülasyon uygulanmayan hiperglisemi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken fotostimülasyon uygulanan hiperglisemi grubunda proliferasyon kontrole göre artış göstermiştir. Ayrıca hücre proliferasyonlarının kültürün 7. günü gerçekleştirilen SEM analizi sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında gerçekleştirilen analizler, fotostimülasyonun hem 2 hem de 3 boyutlu hiperglisemi modellerinde hücre çoğalmasını, hücre göçünü, hücre dışı matriks (ECM) sentezini ve anjiyogenez sürecinin önemli bir parçası olan tübül oluşumunu desteklediğini göstermiştir. Bu bulgular, fotostimülasyonun diyabetik yara tedavisinde potansiyel bir tedavi yöntemi olarak umut vaat ettiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, geliştirilmiş 3 boyutlu hiperglisemik model üzerinde yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile bu modelin optimize edilmesi, *in vivo* çalışmalarda hayvan kullanımının azaltılmasına yardımcı olabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] J.B. Echouffo-Tcheugui, R. Garg, Management of hyperglycemia and diabetes in the emergency department, *Current diabetes reports*, 17 (2017) 1-8.
- [2] M. Mogoi, V. Iulian, S. Dumitriu, C. Paul, G. Noditi, Hyperglycemia: “Trick or treat” - Case report, *XV* (2012).
- [3] P.V. Röder, B. Wu, Y. Liu, W. Han, Pancreatic regulation of glucose homeostasis, *Experimental & molecular medicine*, 48 (2016) e219-e219.
- [4] D.J. Magliano, E.J. Boyko, I.D.F.D.A.t.e.s. committee, *IDF Diabetes Atlas, Idf diabetes atlas*, International Diabetes Federation © International Diabetes Federation, 2021., Brussels, 2021.
- [5] A.M. Egan, S.F. Dinneen, What is diabetes?, *Medicine*, 47 (2019) 1-4.
- [6] A.D. Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, *Diabetes care*, 33 (2010) S62-S69.
- [7] V.A. Fonseca, M. Pendergrass, R.H. McDuffie, V.A. Fonseca, *Diabetes in clinical practice*, Springer2010.
- [8] Y. Han, Y. Jiang, Y. Li, M. Wang, T. Fan, M. Liu, Q. Ke, H. Xu, Z. Yi, An aligned porous electrospun fibrous scaffold with embedded asiatic acid for accelerating diabetic wound healing, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (2019) 6125-6138.
- [9] M. Mirhaj, S. Labbaf, M. Tavakoli, A.M. Seifalian, Emerging treatment strategies in wound care, *International Wound Journal*, 19 (2022) 1934-1954.
- [10] P. Bikmulina, N. Kosheleva, A. Shpichka, V. Yusupov, V. Gogvadze, Y. Rochev, P. Timashev, Photobiomodulation in 3D tissue engineering, *Journal of Biomedical Optics*, 27 (2022) 090901-090901.
- [11] N. Tripodi, D. Corcoran, P. Antonello, N. Balic, D. Caddy, A. Knight, C. Meehan, F. Sidirolou, S. Fraser, D. Kiatos, The effects of photobiomodulation on human dermal fibroblasts in vitro: A systematic review, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 214 (2021) 112100.
- [12] O.A. Oyebode, S.W. Jere, N.N. Houreld, Current Therapeutic Modalities for the Management of Chronic Diabetic Wounds of the Foot, *Journal of Diabetes Research*, 2023 (2023) 1359537.
- [13] E. Vinesh, S. Jeyapriya, M. Kumar, M. Arunachalam, Photobiomodulation and oral wound healing, *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*, 7 (2017).
- [14] S.M. Ayuk, N.N. Houreld, H. Abrahamse, Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660 nm, *Diabetes technology & therapeutics*, 14 (2012) 1110-1117.
- [15] A. Mostafavinia, H. Ahmadi, A. Amini, Z. Roudafshani, M.R. Hamblin, S. Chien, M. Bayat, The effect of photobiomodulation therapy on antioxidants and oxidative stress profiles of adipose derived mesenchymal stem cells in diabetic rats, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 262 (2021) 120157.

- [16] N.K. Rajendran, N.N. Houreld, H. Abrahamse, In Vitro Wound Healing Potential of Photobiomodulation Is Possibly Mediated by Its Stimulatory Effect on AKT Expression in Adipose-Derived Stem Cells, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021 (2021) 6664627.
- [17] J. Son, D. Accili, Reversing pancreatic  $\beta$ -cell dedifferentiation in the treatment of type 2 diabetes, *Experimental & Molecular Medicine*, 55 (2023) 1652-1658.
- [18] A. Rewers, Acute metabolic complications in diabetes, (2021).
- [19] M.L. Marcovecchio, M. Lucantoni, F. Chiarelli, Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications, *Diabetes technology & therapeutics*, 13 (2011) 389-394.
- [20] A. Gupta, T. Behl, A. Sehgal, S. Bhardwaj, S. Singh, N. Sharma, A. Hafeez, Exploring the recent molecular targets for diabetes and associated complications, *Molecular Biology Reports*, 48 (2021) 2863-2879.
- [21] A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, N. Augé, R. Pamplona, M. Portero-Otin, Hyperglycemia and glycation in diabetic complications, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (2009) 3071-3109.
- [22] S. Dağdelen, M. Balcı, O. Deyneli, Ş. Karadeniz, M. Sargın, T. Demir, O. Bakıner, M. Yılmaz, *Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi*, (2023).
- [23] M.A. Atkinson, M. Campbell-Thompson, I. Kusmartseva, K.H. Kaestner, Organisation of the human pancreas in health and in diabetes, *Diabetologia*, 63 (2020) 1966-1973.
- [24] A.T. Kharroubi, H.M. Darwish, Diabetes mellitus: The epidemic of the century, *World journal of diabetes*, 6 (2015) 850.
- [25] W.K. Chung, K. Erion, J.C. Florez, A.T. Hattersley, M.-F. Hivert, C.G. Lee, M.I. McCarthy, J.J. Nolan, J.M. Norris, E.R. Pearson, Precision medicine in diabetes: a consensus report from the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), *Diabetes care*, 43 (2020) 1617-1635.
- [26] P.P. Khin, J.H. Lee, H.-S. Jun, Pancreatic beta-cell dysfunction in type 2 diabetes, *European Journal of Inflammation*, 21 (2023) 1721727X231154152.
- [27] U. Galicia-Garcia, A. Benito-Vicente, S. Jebari, A. Larrea-Sebal, H. Siddiqi, K.B. Uribe, H. Ostolaza, C. Martín, Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, *International journal of molecular sciences*, 21 (2020) 6275.
- [28] A.P.P. Calimag, S. Chlebek, E.V. Lerma, J.T. Chaiban, Diabetic ketoacidosis, *Disease-a-Month*, 69 (2023) 101418.
- [29] J.K. Snell-Bergeon, R.P. Wadwa, Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular disease, *Diabetes technology & therapeutics*, 14 (2012) S-51-S-58.
- [30] D.G. McCombs, S.J. Appel, M.E. Ward, Expedited diagnosis and management of inpatient hyperosmolar hyperglycemic nonketotic syndrome, *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 27 (2015) 426-432.
- [31] B.K. Tripathi, A.K. Srivastava, Diabetes mellitus: complications and therapeutics, *Med Sci Monit*, 12 (2006) 130-147.
- [32] D. Samocho-Bonet, B. Wu, D.K. Ryugo, Diabetes mellitus and hearing loss: A review, *Ageing Research Reviews*, 71 (2021) 101423.

- [33] J. Casqueiro, J. Casqueiro, C. Alves, Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis, *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16 (2012) S27-S36.
- [34] A. Oksay Sahin, *Diyabetli Bireylerde Cilt, Ağız ve Diş Bakımı*, (2015).
- [35] J. Zhou, S.L. Ran, Y.C. Zhao, Diabetic gastroparesis: a disease for which long-term therapeutic benefits are difficult to obtain, *Endokrynologia Polska*, 75 (2024) 148-158.
- [36] J.B. Cole, J.C. Florez, Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications, *Nature reviews nephrology*, 16 (2020) 377-390.
- [37] E.B. Rangel, C.O. Rodrigues, J.R. De Sa, *Micro-and macrovascular complications in diabetes mellitus: preclinical and clinical studies*, Hindawi, 2019.
- [38] K. McDermott, M. Fang, A.J. Boulton, E. Selvin, C.W. Hicks, Etiology, epidemiology, and disparities in the burden of diabetic foot ulcers, *Diabetes Care*, 46 (2023) 209-221.
- [39] J. Chhabra, H. Chopra, R. Pahwa, N. Raina, K. Wadhwa, S. Saini, P. Negi, M. Gupta, I. Singh, H. Dureja, Potential of nanoemulsions for accelerated wound healing: innovative strategies, *International Journal of Surgery*, 109 (2023) 2365-2377.
- [40] E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely Neisiany, S. Ramakrishna, *Wound dressings: Current advances and future directions*, *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (2019) 47738.
- [41] K. Raziyeva, Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Kassymbek, S. Jimi, A. Saparov, *Immunology of acute and chronic wound healing*, *Biomolecules*, 11 (2021) 700.
- [42] C. Dai, S. Shih, A. Khachemoune, *Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review*, *Journal of Dermatological Treatment*, 31 (2020) 639-648.
- [43] V. Falanga, R.R. Isseroff, A.M. Soulika, M. Romanelli, D. Margolis, S. Kapp, M. Granick, K. Harding, *Chronic wounds*, *Nature Reviews Disease Primers*, 8 (2022) 50.
- [44] T. Jiang, Q. Li, J. Qiu, J. Chen, S. Du, X. Xu, Z. Wu, X. Yang, Z. Chen, T. Chen, *Nanobiotechnology: applications in chronic wound healing*, *International journal of nanomedicine*, 17 (2022) 3125.
- [45] Y. Wang, U. Armato, J. Wu, *Targeting tunable physical properties of materials for chronic wound care*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (2020) 584.
- [46] L. Zhou, T. Min, X. Bian, Y. Dong, P. Zhang, Y. Wen, *Rational design of intelligent and multifunctional dressing to promote acute/chronic wound healing*, *ACS Applied Bio Materials*, 5 (2022) 4055-4085.
- [47] L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala, *Skin acute wound healing: a comprehensive review*, *International journal of inflammation*, 2019 (2019).
- [48] J. Li, J. Chen, R. Kirsner, *Pathophysiology of acute wound healing*, *Clinics in dermatology*, 25 (2007) 9-18.

- [49] M.G. Visha, K. Monika, A review on wound healing, *International Journal of Clinicopathological Correlation*, 3 (2022) 50-59.
- [50] J. Reinke, H. Sorg, Wound repair and regeneration, *European surgical research*, 49 (2012) 35-43.
- [51] C.N. Lux, Wound healing in animals: a review of physiology and clinical evaluation, *Veterinary dermatology*, 33 (2022) 91-e27.
- [52] M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham, G.C. Gurtner, Wound healing: a cellular perspective, *Physiological reviews*, 99 (2019) 665-706.
- [53] A.J.M. Boulton, R.W. Whitehouse, The Diabetic Foot, in: K.R. Feingold, B. Anawalt, M.R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W.W. de Herder, K. Dhatriya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C.S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E.A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A.S. Shah, F. Singer, M.A. Sperling, C.A. Stratakis, D.L. Trencé, D.P. Wilson (Eds.) *Endotext*, MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000.
- [54] G. Han, R. Ceilley, Chronic wound healing: a review of current management and treatments, *Advances in therapy*, 34 (2017) 599-610.
- [55] E. Tsourdi, A. Barthel, H. Rietzsch, A. Reichel, S.R. Bornstein, Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus, *BioMed research international*, 2013 (2013) 385641.
- [56] L. Yang, G.-C. Rong, Q.-N. Wu, Diabetic foot ulcer: challenges and future, *World Journal of Diabetes*, 13 (2022) 1014.
- [57] S. Babaniamansour, N. Najari, E. Aliniagerdroudbari, A. Babaniamansour, S. Pezeshki, Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Diabetic Foot Ulcer; a Clinical Study, *Reviews in Clinical Medicine*, 8 (2021).
- [58] A. Guffanti, Negative pressure wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a systematic review of the literature, *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 41 (2014) 233-237.
- [59] M. Downer, C.E. Berry, J.B. Parker, L. Kameni, M. Griffin, Current Biomaterials for Wound Healing, *Bioengineering*, 10 (2023) 1378.
- [60] R. Dong, B. Guo, Smart wound dressings for wound healing, *Nano Today*, 41 (2021) 101290.
- [61] H.M. Nguyen, T.T.N. Le, A.T. Nguyen, H.N.T. Le, T.T. Pham, Biomedical materials for wound dressing: Recent advances and applications, *RSC advances*, 13 (2023) 5509-5528.
- [62] V. Brumberg, T. Astrelina, T. Malivanova, A. Samoilov, Modern wound dressings: Hydrogel dressings, *Biomedicines*, 9 (2021) 1235.
- [63] L.J. Borda, F.E. Macquhae, R.S. Kirsner, Wound dressings: a comprehensive review, *Current Dermatology Reports*, 5 (2016) 287-297.
- [64] G. Polverino, F. Russo, F. D'Andrea, Bioactive Dressing: A New Algorithm in Wound Healing, *Journal of Clinical Medicine*, 13 (2024) 2488.
- [65] A. Oliveira, S. Simões, A. Ascenso, C.P. Reis, Therapeutic advances in wound healing, *Journal of Dermatological Treatment*, 33 (2022) 2-22.

- [66] N. Guan, Z. Liu, Y. Zhao, Q. Li, Y. Wang, Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering, *Drug delivery*, 27 (2020) 1438-1451.
- [67] L. Vaidyanathan, Growth factors in wound healing—a review, *Biomed. Pharmacol. J*, 14 (2021) 1469-1481.
- [68] X. Ren, M. Zhao, B. Lash, M.M. Martino, Z. Julier, Growth factor engineering strategies for regenerative medicine applications, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7 (2020) 469.
- [69] H.-J. You, S.-K. Han, Cell therapy for wound healing, *Journal of Korean medical science*, 29 (2014) 311.
- [70] S. Nour, N. Baheiraei, R. Imani, M. Khodaei, A. Alizadeh, N. Rabiee, S.M. Moazzeni, A review of accelerated wound healing approaches: biomaterial-assisted tissue remodeling, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30 (2019) 1-15.
- [71] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton, Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem cells*, 25 (2007) 2739-2749.
- [72] Z. Si, X. Wang, C. Sun, Y. Kang, J. Xu, X. Wang, Y. Hui, Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114 (2019) 108765.
- [73] A. Mester, D. Opincariu, I. Benedek, I. Benedek, Stem cell therapy in wound healing, *Journal of interdisciplinary medicine*, 2 (2017) 20-24.
- [74] B. Farabi, K. Roster, R. Hirani, K. Tepper, M.F. Atak, B. Safai, The Efficacy of Stem Cells in Wound Healing: A Systematic Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (2024) 3006.
- [75] K. Flynn, N.N. Mahmoud, S. Sharifi, L.J. Gould, M. Mahmoudi, Chronic wound healing models, *ACS Pharmacology & Translational Science*, 6 (2023) 783-801.
- [76] E. Hofmann, J. Fink, A.-L. Pignet, A. Schwarz, M. Schellnegger, S.P. Nischwitz, J.C. Holzer-Geissler, L.-P. Kamolz, P. Kotzbeck, Human in vitro skin models for wound healing and wound healing disorders, *Biomedicines*, 11 (2023) 1056.
- [77] S. Ud-Din, A. Bayat, Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: in silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin, *Wound Repair and Regeneration*, 25 (2017) 164-176.
- [78] A.G. Maione, Y. Brudno, O. Stojadinovic, L.K. Park, A. Smith, A. Tellechea, E.C. Leal, C.J. Kearney, A. Veves, M. Tomic-Canic, Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic in vivo features of chronic wounds, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21 (2015) 499-508.
- [79] M. Lemarchand, K. Thouin, T. De Serres-Bérard, S. Bellenfant, S. Cadau, F. Berthod, In vitro glycation of a tissue-engineered wound healing model to mimic diabetic ulcers, *Biotechnology and Bioengineering*, 120 (2023) 1657-1666.
- [80] D. Chouhan, N. Dey, N. Bhardwaj, B.B. Mandal, Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances, *Biomaterials*, 216 (2019) 119267.

- [81] I. Negut, G. Dorcioman, V. Grumezescu, Scaffolds for wound healing applications, *Polymers*, 12 (2020) 2010.
- [82] J. Chen, Y. Fan, G. Dong, H. Zhou, R. Du, X. Tang, Y. Ying, J. Li, Designing biomimetic scaffolds for skin tissue engineering, *Biomaterials science*, (2023).
- [83] M. Krishani, W.Y. Shin, H. Suhaimi, N.S. Sambudi, Development of scaffolds from bio-based natural materials for tissue regeneration applications: A review, *Gels*, 9 (2023) 100.
- [84] G. El Fawal, H. Hong, X. Mo, H. Wang, Fabrication of scaffold based on gelatin and polycaprolactone (PCL) for wound dressing application, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63 (2021) 102501.
- [85] J. Qin, F. Chen, P. Wu, G. Sun, Recent advances in bioengineered scaffolds for cutaneous wound healing, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10 (2022) 841583.
- [86] S. Nagarajan, H. Belaid, S. Radhakrishnan, C. Teyssier, S. Balme, P. Miele, D. Cornu, N.K. Subbaraya, V. Cavallès, M. Bechelany, Sacrificial mold-assisted 3D printing of stable biocompatible gelatin scaffolds, *Bioprinting*, 22 (2021) e00140.
- [87] A. Kumar, A. Jacob, Techniques in scaffold fabrication process for tissue engineering applications: A review, *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10 (2022) 163-176.
- [88] M.Z.A. Zulkifli, D. Nordin, N. Shaari, S.K. Kamarudin, Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications, *Polymers*, 15 (2023) 2418.
- [89] M. Mabrouk, H.H. Beherei, D.B. Das, Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 110 (2020) 110716.
- [90] A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, N. Radacsi, 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12 (2020) e1626.
- [91] A.G. Abdelaziz, H. Nageh, S.M. Abdo, M.S. Abdalla, A.A. Amer, A. Abdal-hay, A. Barhoum, A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges, *Bioengineering*, 10 (2023) 204.
- [92] H. Solmaz, Y. Ulgen, M. Gulsoy, Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation, *Lasers in medical science*, 32 (2017) 903-910.
- [93] A. Abijo, C.-Y. Lee, C.-Y. Huang, P.-C. Ho, K.-J. Tsai, The beneficial role of photobiomodulation in neurodegenerative diseases, *Biomedicines*, 11 (2023) 1828.
- [94] M.L. Hernández-Bule, J. Naharro-Rodríguez, S. Bacci, M. Fernández-Guarino, Unlocking the Power of Light on the Skin: A Comprehensive Review on Photobiomodulation, *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (2024) 4483.

- [95] L.M. Ailioaie, G. Litscher, Molecular and cellular mechanisms of arthritis in children and adults: New perspectives on applied photobiomodulation, *International journal of molecular sciences*, 21 (2020) 6565.
- [96] İ. Boyraz, A. Yıldız, Lazer Çeşitleri ve yüksek yoğunluklu lazer kullanımı, *Çağdaş Tıp Dergisi*, 6 (2017) 104-109.
- [97] M.-H. Chang, D. Das, P.V. Varde, M. Pecht, Light emitting diodes reliability review, *Microelectronics Reliability*, 52 (2012) 762-782.
- [98] G.B. Nair, S. Dhoble, A perspective perception on the applications of light-emitting diodes, *Luminescence*, 30 (2015) 1167-1175.
- [99] R. Price, L. Ehrnford, P. Andreou, C.A. Felix, Comparison of quartz-tungsten-halogen, light-emitting diode, and plasma arc curing lights, *The journal of adhesive dentistry*, (2003).
- [100] R.C. Mosca, A.A. Ong, O. Albasha, K. Bass, P. Arany, Photobiomodulation therapy for wound care: a potent, noninvasive, photoceutical approach, *Advances in skin & wound care*, 32 (2019) 157-167.
- [101] S. Kashiwagi, A. Morita, S. Yokomizo, E. Ogawa, E. Komai, P.L. Huang, D.E. Bragin, D.N. Atochin, Photobiomodulation and nitric oxide signaling, *Nitric Oxide*, 130 (2023) 58-68.
- [102] T.G. da Silva, R.S. Ribeiro, A.L. Mencialha, A. de Souza Fonseca, Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels, *Lasers in Medical Science*, 38 (2023) 136.
- [103] F.F. Sperandio, A. Simões, L. Corrêa, A.C.C. Aranha, F.S. Giudice, M.R. Hamblin, S.C. Sousa, Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair, *Journal of biophotonics*, 8 (2015) 795-803.
- [104] E. Sutterby, C. Chheang, P. Thurgood, K. Khoshmanesh, S. Baratchi, E. Pirogova, Investigating the effects of low intensity visible light on human keratinocytes using a customized LED exposure system, *Scientific Reports*, 12 (2022) 18907.
- [105] R.F. Oliveira, L.F. Marquiore, C.B. Gomes, P.T. de Abreu, L.A. Ferreira, L.A. Diniz, N.A. Gomes, H. Jácome-Santos, A. Moreno, S. Macari, Interplay between epithelial and mesenchymal cells unveils essential proinflammatory and pro-resolutive mediators modulated by photobiomodulation therapy at 660 nm, *Wound Repair and Regeneration*, 30 (2022) 345-356.
- [106] O.A. Oyeboode, N.N. Houreld, Photobiomodulation at 830 nm stimulates migration, survival and proliferation of fibroblast cells, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, (2022) 2885-2900.
- [107] J.H. Ryu, J. Park, B.-Y. Kim, Y. Kim, N.G. Kim, Y.-I. Shin, Photobiomodulation ameliorates inflammatory parameters in fibroblast-like synoviocytes and experimental animal models of rheumatoid arthritis, *Frontiers in Immunology*, 14 (2023) 1122581.
- [108] S.B. Pavlov, N.M. Babenko, M.V. Kumetchko, O.B. Litvinova, R.N. Mikhaylusov, Experimental study of the effect of photobiomodulation therapy on the regulation of the healing process of chronic wounds, *International Journal of Photoenergy*, 2021 (2021) 1-10.

- [109] S. Salman, C. Guermonprez, L. Peno-Mazzarino, E. Lati, A. Rousseaud, L. Declercq, S. Kerdine-Römer, Photobiomodulation controls keratinocytes inflammatory response through Nrf2 and reduces Langerhans cells activation, *Antioxidants*, 12 (2023) 766.
- [110] D. Barolet, Photobiomodulation in dermatology: harnessing light from visible to near infrared, *Medical Research Archives*, 6 (2018).
- [111] H. Zhao, T. Ji, T. Sun, H. Liu, Y. Liu, D. Chen, Y. Wang, Y. Tan, J. Zeng, H. Qiu, Comparative study on Photobiomodulation between 630 nm and 810 nm LED in diabetic wound healing both in vitro and in vivo, *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 15 (2022) 2250010.
- [112] G. Karkada, G.A. Maiya, P. Arany, M.R. Kg, S. Adiga, S.U. Kamath, Dose-response relationship of photobiomodulation therapy and oxidative stress markers in healing dynamics of diabetic neuropathic ulcers in Wistar rats, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 22 (2023) 393-400.
- [113] Ş. Poyraz, Z. Altınışik, A.S. Çakmak, M. Şimşek, M. Gümüşderelioğlu, Random/aligned electrospun PCL fibrous matrices with modified surface textures: Characterization and interactions with dermal fibroblasts and keratinocytes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 218 (2022) 112724.
- [114] C. Kutlu, A.S. Cakmak, M. Gümüşderelioğlu, Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study, *Journal of Microencapsulation*, 31 (2014) 700-707.
- [115] N. Ülker, *Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği*, (2013).
- [116] A.S. Çakmak, *Biyofiziksel ve Biyokimyasal Uyaranlarla Desteklenmiş Doku İskeleleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi*, (2014).
- [117] A. Koyuncu, S. Koç, Ö.E. Akdere, A.S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Investigation of the synergistic effect of platelet-rich plasma and polychromatic light on human dermal fibroblasts seeded chitosan/gelatin scaffolds for wound healing, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 232 (2022) 112476.
- [118] T. Banno, A. Gazel, M. Blumenberg, Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 32633-32642.
- [119] C. Wiegand, U.-C. Hipler, P. Elsner, J. Tittelbach, Keratinocyte and fibroblast wound healing in vitro is repressed by non-optimal conditions but the reparative potential can be improved by water-filtered infrared A, *Biomedicines*, 9 (2021) 1802.
- [120] K. Iyer, Z. Chen, T. Ganapa, B.M. Wu, B. Tawil, C.S. Linsley, Keratinocyte migration in a three-dimensional in vitro wound healing model co-cultured with fibroblasts, *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15 (2018) 721-733.
- [121] W.-C. Fang, C.-C.E. Lan, The epidermal keratinocyte as a therapeutic target for management of diabetic wounds, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 4290.

- [122] Y. Wang, D.T. Graves, Keratinocyte function in normal and diabetic wounds and modulation by FOXO1, *Journal of Diabetes Research*, 2020 (2020) 3714704.
- [123] P. Buranasin, K. Mizutani, K. Iwasaki, C. Pawaputanon Na Mahasarakham, D. Kido, K. Takeda, Y. Izumi, High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts, *PloS one*, 13 (2018) e0201855.
- [124] F. Shams, H. Moravvej, S. Hosseinzadeh, E. Mostafavi, H. Bayat, B. Kazemi, M. Bandehpour, E. Rostami, A. Rahimpour, H. Moosavian, Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: In vitro and in vivo studies, *Scientific reports*, 12 (2022) 18529.
- [125] G.W. Fearnley, G.A. Smith, A.F. Odell, A.M. Latham, S.B. Wheatcroft, M.A. Harrison, D.C. Tomlinson, S. Ponnambalam, Vascular endothelial growth factor A-stimulated signaling from endosomes in primary endothelial cells, *Methods in Enzymology*, Elsevier2014, pp. 265-292.
- [126] H.-J. Park, Y. Zhang, S.P. Georgescu, K.L. Johnson, D. Kong, J.B. Galper, Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis, *Stem cell reviews*, 2 (2006) 93-101.
- [127] Y. Lu, Y. Yang, L. Xiao, S. Li, X. Liao, H. Liu, Autocrine and paracrine effects of vascular endothelial cells promote cutaneous wound healing, *BioMed Research International*, 2021 (2021) 6695663.
- [128] G.K. Kolluru, S.C. Bir, C.G. Kevil, Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing, *International journal of vascular medicine*, 2012 (2012) 918267.
- [129] C.-H. Yu, M. Gong, W.-J. Liu, N.-X. Cui, Y. Wang, X. Du, Z.-C. Yi, High glucose induced endothelial to mesenchymal transition in human umbilical vein endothelial cell, *Experimental and molecular pathology*, 102 (2017) 377-383.
- [130] S.C.-S. Hu, C.-C.E. Lan, High-glucose environment disturbs the physiologic functions of keratinocytes: focusing on diabetic wound healing, *Journal of Dermatological Science*, 84 (2016) 121-127.
- [131] L. Pang, Y. Wang, M. Zheng, Q. Wang, H. Lin, L. Zhang, L. Wu, Transcriptomic study of high-glucose effects on human skin fibroblast cells, *Molecular medicine reports*, 13 (2016) 2627-2634.
- [132] Y.H. Xuan, B.B. Huang, H.S. Tian, L.S. Chi, Y.M. Duan, X. Wang, Z.X. Zhu, W.H. Cai, Y.T. Zhu, T.M. Wei, High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation, *PloS one*, 9 (2014) e108182.
- [133] F. Shu, H. Gao, W. Wu, S. Yu, L. Zhang, H. Liu, S. Xiao, Z. Xia, Y. Zheng, Amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing by protecting keratinocytes and fibroblasts from high-glucose-induced senescence, *Cell Biology International*, 46 (2022) 755-770.

- [134] C.R. Kruse, M. Singh, J.A. Sørensen, E. Eriksson, K. Nuutila, The effect of local hyperglycemia on skin cells in vitro and on wound healing in euglycemic rats, *Journal of surgical research*, 206 (2016) 418-426.
- [135] A. Aldoss, R. Lambarte, F. Alsalleeh, High-glucose media reduced the viability and induced differential pro-inflammatory cytokines in human periodontal ligament fibroblasts, *Biomolecules*, 13 (2023) 690.
- [136] D. Kido, K. Mizutani, K. Takeda, R. Mikami, T. Matsuura, K. Iwasaki, Y. Izumi, Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress, *PLoS One*, 12 (2017) e0189601.
- [137] Y. Liu, J. Chen, H. Liang, Y. Cai, X. Li, L. Yan, L. Zhou, L. Shan, H. Wang, Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling, *Stem cell research & therapy*, 13 (2022) 258.
- [138] G. Chen, Y. Chen, H. Chen, L. Li, J. Yao, Q. Jiang, X. Lin, J. Wen, L. Lin, The effect of NF- $\kappa$ B pathway on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose, *Molecular and cellular biochemistry*, 347 (2011) 127-133.
- [139] C. Dompe, L. Moncrieff, J. Matys, K. Grzech-Leśniak, I. Kocherova, A. Bryja, M. Bruska, M. Dominiak, P. Mozdziak, T.H.I. Skiba, Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical applications, *Journal of clinical medicine*, 9 (2020) 1724.
- [140] G.E. Glass, Photobiomodulation: A review of the molecular evidence for low level light therapy, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 74 (2021) 1050-1060.
- [141] P.V. Peplow, T.-Y. Chung, G.D. Baxter, Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies, *Photomedicine and Laser Surgery*, 28 (2010) S-3-S-40.
- [142] K. Góralczyk, J. Szymańska, M. Łukowicz, E. Drela, R. Kotzbach, M. Dubiel, M. Michalska, B. Góralczyk, A. Zając, D. Rość, Effect of LLLT on endothelial cells culture, *Lasers in medical science*, 30 (2015) 273-278.
- [143] E. Mathioudaki, M. Rallis, K. Politopoulos, E. Alexandratou, Photobiomodulation and Wound Healing: Low-Level Laser Therapy at 661 nm in a Scratch Assay Keratinocyte Model, *Annals of Biomedical Engineering*, 52 (2024) 376-385.
- [144] A.C. de Magalhães, Z. Guimarães-Filho, E.M. Yoshimura, L. Lilge, Photobiomodulation therapy can change actin filaments of 3T3 mouse fibroblast, *Lasers in Medical Science*, 35 (2020) 585-597.
- [145] M.M. Monteiro, J.A. Dos Santos, V.P. Barbosa, T.M.B. Rezende, E.N.S. Guerra, Photobiomodulation effects on fibroblasts and keratinocytes after ionizing radiation and bacterial stimulus, *Archives of Oral Biology*, 159 (2024) 105874.
- [146] G.K. Keshri, A. Gupta, A. Yadav, S.K. Sharma, S.B. Singh, Photobiomodulation with pulsed and continuous wave near-infrared laser (810

- nm, Al-Ga-As) augments dermal wound healing in immunosuppressed rats, *PloS one*, 11 (2016) e0166705.
- [147] E.A. Lenselink, Role of fibronectin in normal wound healing, *International wound journal*, 12 (2015) 313-316.
- [148] S.S. Mathew-Steiner, S. Roy, C.K. Sen, Collagen in wound healing, *Bioengineering*, 8 (2021) 63.
- [149] V. Prabhu, B.S.S. Rao, A.C.K. Rao, K. Prasad, K.K. Mahato, Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice, *Lasers in Medical Science*, (2022) 1-10.
- [150] D.P. Kuffler, Photobiomodulation in promoting wound healing: a review, *Regenerative medicine*, 11 (2016) 107-122.
- [151] R. Illescas-Montes, L. Melguizo-Rodríguez, O. García-Martínez, E. de Luna-Bertos, F.J. Manzano-Moreno, C. Ruiz, J. Ramos-Torrecillas, Human fibroblast gene expression modulation using 940 NM diode laser, *Scientific reports*, 9 (2019) 12037.
- [152] S.M. Ayuk, H. Abrahamse, N.N. Houreld, Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro, *Journal of biophotonics*, 11 (2018) e201700127.
- [153] C.C. Lan, I.H. Liu, A.H. Fang, C.H. Wen, C.S. Wu, Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes, *British Journal of Dermatology*, 159 (2008) 1103-1115.
- [154] I. Arnaoutova, H.K. Kleinman, In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract, *Nature protocols*, 5 (2010) 628-635.
- [155] U.A. Okonkwo, L.A. DiPietro, Diabetes and wound angiogenesis, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 1419.
- [156] G. Zhang, L. Yi, C. Wang, P. Yang, J. Zhang, J. Wang, C. Lu, X. Zhang, Y. Liu, Photobiomodulation promotes angiogenesis in wound healing through stimulating the nuclear translocation of VEGFR2 and STAT3, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 237 (2022) 112573.
- [157] J. Zhong, X. Zhang, Y. Ruan, Y. Huang, Photobiomodulation therapy's impact on angiogenesis and osteogenesis in orthodontic tooth movement: in vitro and in vivo study, *BMC Oral Health*, 24 (2024) 147.
- [158] P. Dungal, S. Sutalo, C. Slezak, C. Keibl, B. Schädler, H. Schnidar, M. Metzger, B. Meixner, J. Hartmann, J. Oesterreicher, Wavelength-dependent effects of photobiomodulation for wound care in diabetic wounds, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 5895.
- [159] Y. Bai, L. Bai, J. Zhou, H. Chen, L. Zhang, Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis, *Cellular immunology*, 323 (2018) 19-32.

- [160] S.M. Bauer, R.J. Bauer, O.C. Velazquez, Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds, *Vascular and endovascular surgery*, 39 (2005) 293-306.
- [161] M.J. White, P.S. Briquez, D.A. White, J.A. Hubbell, VEGF-A, PDGF-BB and HB-EGF engineered for promiscuous super affinity to the extracellular matrix improve wound healing in a model of type 1 diabetes, *NPJ Regenerative Medicine*, 6 (2021) 76.
- [162] A.C. Ruh, L. Frigo, M.F.X.B. Cavalcanti, P. Svidnicki, V.N. Vicari, R.A.B. Lopes-Martins, E.C.P. Leal Junior, N. De Isla, F. Diomede, O. Trubiani, Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers, *Lasers in medical science*, 33 (2018) 165-171.
- [163] N. Komine, K. Ikeda, K. Tada, N. Hashimoto, N. Sugimoto, K. Tomita, Activation of the extracellular signal-regulated kinase signal pathway by light emitting diode irradiation, *Lasers in Medical Science*, 25 (2010) 531-537.
- [164] S.M. Safavi, B. Kazemi, M. Esmaeili, A. Fallah, A. Modarresi, M. Mir, Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , bFGF, and PDGF in rat's gingiva, *Lasers in medical science*, 23 (2008) 331-335.
- [165] P. Mandal, R. Shunmugam, Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 58 (2020) 111-129.
- [166] M. Khandaker, H. Nomhwange, H. Progri, S. Nikfarjam, M.B. Vaughan, Evaluation of Polycaprolactone Electrospun Nanofiber-Composites for Artificial Skin Based on Dermal Fibroblast Culture, *Bioengineering*, 9 (2022) 19.
- [167] A. Yazdanpanah, Z. Madjd, M. Pezeshki-Modaress, Z. Khosrowpour, P. Farshi, L. Eini, J. Kiani, M. Seifi, S.C. Kundu, R. Ghods, Bioengineering of fibroblast-conditioned polycaprolactone/gelatin electrospun scaffold for skin tissue engineering, *Artificial Organs*, 46 (2022) 1040-1054.
- [168] V. Bayati, M.R. Abbaspour, F.N. Dehbashi, N. Neisi, M. Hashemitabar, A dermal equivalent developed from adipose-derived stem cells and electrospun polycaprolactone matrix: an in vitro and in vivo study, *Anatomical Science International*, 92 (2017) 509-520.
- [169] B. Sowmya, A. Hemavathi, P. Panda, Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-based electrospun nano-featured substrate for tissue engineering applications: a review, *Progress in biomaterials*, 10 (2021) 91-117.
- [170] A.A. Chaudhari, K. Vig, D.R. Baganizi, R. Sahu, S. Dixit, V. Dennis, S.R. Singh, S.R. Pillai, Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review, *International journal of molecular sciences*, 17 (2016) 1974.
- [171] A. Azari, A. Golchin, M.M. Maymand, F. Mansouri, A. Ardeshtyrlajimi, Electrospun polycaprolactone nanofibers: Current research and applications in biomedical application, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 12 (2022) 658.

- [172] A. Madni, R. Kousar, N. Naeem, F. Wahid, Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering, *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6 (2021) 11-25.
- [173] S. Sethi, B.S. Kaith, A review on chitosan-gelatin nanocomposites: Synthesis, characterization and biomedical applications, *Reactive and Functional Polymers*, 179 (2022) 105362.

