

**VEZIKOVAJİNAL FİSTÜL ONARIMI İÇİN
PRO-ANJİOGENİK/ANTİBAKTERİYEL DOKU
İTERPOZİSYON FLEP EŞLENİĞİNİN TASARIMI VE
GELİŞTİRİLMESİ**

**DESIGNING AND FABRICATION OF
PRO-ANGIOGENIC/ANTIBACTERIAL TISSUE
INTERPOSITION FLAP SUBSTITUTE FOR USE IN
VESICOVAGINAL FISTULA REPAIR**

HALİME SERİNÇAY

PROF. DR KEZBAN ULUBAYRAM
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

VEZİKOVAJİNAL FİSTÜL ONARIMI İÇİN PRO-ANJİOGENİK/ANTİBAKTERİYEL DOKU İNTERPOZİSYON FLEP EŞLENİĞİNİN TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

Halime SERİNÇAY

Doktora, BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Eş Danışman: Doç. Dr. Naşide MANGIR BOLAT

Temmuz 2023, 125 sayfa

Vezikovajinal fistül (VVF), mesane ve vajina arasında sürekli idrar kaçırmaya neden olan olağan dışı bir açıklıktır. VVF' nin tedavisi fistülün boyutu, yeri ve cerrahın deneyimi gibi etmenlere bağlı olarak konservatif veya girişimseldir. VVF'nin cerrahi onarımında başarılı bir sonuç elde etmek için çoğunlukla mesane ile vajina arasına iyi damarlanmış bir doku interpozisyon flebi yerleştirilmektedir. Doku interpozisyon flepleri, mesane ile vajina arasında bir bariyer görevi görerek ve doku oluşumunu ve damarlanmayı artırarak tedavinin başarı şansını yükseltmektedir. VVF'nin cerrahi tedavisinde otolog doku interpozisyon flepleri yaygın olarak tercih edilmektedir. Ancak otolog fleplerin kullanımı hastanın genel sağlık durumu, fistülün özellikleri ve cerrahi teknik ile ilgili nedenlerle her zaman mümkün olmamaktadır. Otolog dokuların kullanımının mümkün olmadığı durumlarda, sentetik interpozisyon fleplerinin kullanılması önerilmiş ve bazı çalışmalarda denenmiştir. Bu fleplerin hiçbiri VVF tedavisi için özel olarak tasarlanmamış olup yaygın klinik kullanıma girememiştir. Bu tez çalışmasının birinci aşamasında VVF onarımında kullanılan doku interpozisyon fleplerinin klinikte başarı oranları değerlendirilmiş ve klinik ihtiyaçlar göz önüne alınarak tedaviye özel, pro-anjiyojenik ve antibakteriyel fiber yapıda bir doku interpozisyon flepi tasarlanmıştır. Tez çalışmasının ikinci bölümünde ise tasarlanan flepler elektro-eğirme yöntemi ile üretilerek *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Bu amaçla ipek fibroin (Fib) ve polikaprolakton

(PCL) polimerleri kullanılarak elektro-eğirme yöntemi ile 2 katmanlı fiberler (Fib/PCL) üretilmiştir. Fib/PCL fiberlerin birinci katmanına pro-anjiyogenik özellik gösteren 17- β -estradiol (E2) ve ikinci katmanına ise antibakteriyel etki gösteren AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartiküllere indirgenmesi sağlanmıştır. E2 ve AgNP içeren fiberlerin (E2Fib/PCL-Ag) anjiyogenik ve antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Çapları 0,28-0,55 μ m arasında değişen düzgün ve homojen morfolojideki fiberler, L929 hücre hattında toksik etki göstermemiştir. E2'nin fiberlerden salım profilleri incelendiğinde; ilk 7 günde ani bir salım gözlenmiş olup 14. günden sonra ise sürekli bir salım profili izlenmiştir. AgNP ise benzer bir salım profili göstermiştir. E2 içeren fiberlerin anjiyogenik etkisi koryoallantoik membran (CAM) deneyi ile incelenmiştir. Bu fiberlerin normalize damar yoğunluklarını kontrol grubuna göre %10 ile 36 arasında artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar fiber yapısından salınan E2'nin anjiyogenik etki gösterdiğini ispatlamıştır. Aynı zamanda AgNP içeren fiberler mesane ve vajina florasında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. E2 ve AgNP içeren fiberler sıçanların abdomen ve mesane-vajina bölgesine ayrı ayrı implante edilerek erken dönem doku yanıtı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, bu bölgelerden alınan doku kesitleri, polimorfonükleer lökositler (PMN), mononükleer hücreler (MN), bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma açısından değerlendirilerek skorlanmıştır. E2 içeren iki katmanlı fiberlerin damarlanmayı ve bağ dokusu oluşumunu kontrole göre artırdığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, fiberler enfeksiyon açısından değerlendirildiğinde, AgNP içeren fiberler diğer gruplara göre daha az yabancı cisim reaksiyon kaynaklı enfeksiyon göstermiştir. Mesane-vajina ve abdomen bölgelerinden alınan doku örnekleri PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu ve dev hücre sayısı açısından incelendiğinde, bölgeler arasında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak doku interpozisyon flep eşleniği olarak geliştirilen iki katmanlı fiberlerin klinik kullanım potansiyeli olduğu ve ileriye dönük çalışmalar ile kliniğe translasyonunun mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Vezikovajinal fistül, doku interpozisyon flep, anjiyogenez, antibakteriyel, fiber, fibroin, PCL

ABSTRACT

DESIGNING AND FABRICATION OF PRO-ANGIOGENIC/ANTIBACTERIAL TISSUE INTERPOSITION FLAP SUBSTITUTE FOR USE IN VESICOVAGINAL FISTULA REPAIR

Halime SERİNÇAY

Doctor of Philosophy, Department of BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Co-Supervisor: Doç. Dr. Naşide MANGIR BOLAT

July 2023, 125 pages

A vesicovaginal fistula (VVF) is an abnormal opening between the bladder and vagina that causes continuous leakage of urine and urinary incontinence. Definitive treatment of VVF is surgery and the type of surgical intervention is chosen depending on factors such as the size and location of the fistula, and the surgeon's experience. In order to achieve successful surgical repair of VVF, a well-vascularized tissue interposition flap is usually placed between the bladder and the vagina. Tissue interposition flaps increase the chances of success of treatment by acting as a barrier between the bladder and the vagina and increasing tissue formation and vascularization. Autologous tissue interposition flaps are widely preferred in the surgical treatment of VVF. However, the use of autologous flaps is not always possible due to the general health status of the patient, the characteristics of the fistula, and the surgical technique. In cases where the use of autologous tissues is not possible, the use of synthetic interposition flaps has been suggested and tried in several studies. None of these flaps were designed specifically for the treatment of VVF and have not ever gained widespread clinical acceptance. In the first part of this thesis, the clinical success rates of tissue interposition flaps used in VVF repair were evaluated, and a treatment-specific, pro-angiogenic, and antibacterial tissue interposition flap in fiber form was designed considering clinical needs. In the second part of the thesis, the designed flaps were produced by electro-spinning method and examined *in vitro* and *in vivo*. For

this purpose, bilayered fibers (Fib/PCL) were produced by an electro-spinning method using silk fibroin (Fib) and polycaprolactone (PCL) polymers. 17- β -estradiol (E2), which has pro-angiogenic properties, was added to the first layer of Fib/PCL fibers, and AgNO₃, which has an antibacterial effect, was added to the second layer to reduce it to silver nanoparticles (AgNPs). The angiogenic and antibacterial effects of fibers containing E2 and AgNPs (E2Fib/PCL-Ag) were investigated. Fibers with smooth and homogeneous morphology varying between 0,28-0,55 μ m in diameter did not show any toxic effects in the L929 cell line. When the release of E2 from fibers are examined; initial burst effect was observed in the first 7 days and then a continuous release profile was observed after the 14th day. AgNPs release from the fibers showed a similar release profile. The angiogenic effect of E2 containing fibers was investigated by chorioallantoic membrane (CAM) assay. It was observed that these fibers increased the normalized vascular densities between 10 and 36% compared to the control group. These results proved that E2 released from the fiber structure showed an angiogenic effect. It has been determined that fibers containing AgNPs have antibacterial effects against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Candida albicans* ATCC 90028 strains that are commonly found in the bladder and vaginal flora. Fibers containing E2 and AgNP were implanted separately in the abdomen and paravaginal regions of rats and the early tissue response was comparatively examined. For this purpose, tissue sections taken from these regions were evaluated and scored in terms of polymorphonuclear leukocytes (PMN), mononuclear cells (MN), connective tissue organization and vascularization. It was observed that E2 containing bilayered fibers were observed to increase vascularization and connective tissue formation as compared to the control. On the other hand, when the fibers were evaluated in terms of infection, AgNP containing fibers showed less foreign body reaction-induced infection than the other groups. When the tissue samples taken from the paravaginal and abdomen regions were examined in terms of PMN, MN, connective tissue organization, and the number of giant cells, it was observed that there was no significant difference between the regions. As a result, it is thought that bilayer fibers developed as tissue interposition flap equivalents have the potential for clinical use and their translation to the clinic may be possible with prospective studies.

Keywords: Vesicovaginal fistula, tissue interposition flap, angiogenesis, antibacterial, fiber, fibroin, PCL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgisiyle ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren, sağladığı imkanlarla tez çalışmalarımı sürdürmemi sağlayan, kendisiyle tanışmış olmaktan dolayı büyük mutluluk duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Klinik disiplinle birlikte çalışmanın önemini görmemi sağlayan ve bana yeni ufuklar açarak bilimsel bakış açımı genişleten ikinci danışmanım Doç. Dr. Naşide Mangır Bolat'a,

Doktora tez dönemim boyunca tez izleme komitesi üyeleri olarak bana değerli katkılarını sunan değerli hocalarım; Prof. Dr. İpek Eroğlu ve Prof. Dr. Pınar Yılıgör Huri'ye,

Histoloji çalışmalarında değerli katkıları olan, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Prof. Dr. Naciye Dilara Zeybek'e ve Özlem Bozdemir'e,

Doktora tezimdaki katkıları ve arkadaşlıkları için Öğr. Gör. Dr. Şükrü Öztürk ve Arş. Gör. Elif Cönger'e,

Antibakteriyel test çalışmalarındaki desteği için Doç. Dr. Ceren Özkul Koçak'a,

Tez çalışmama cihaz desteği sunan Prof. Dr. Hakan Eroğlu'na,

Doktora eğitimim boyunca yanımda olan Prof. Dr. Eda Ayşe Aksoy'a,

Ablalığı ve değerli arkadaşlığı için Dr. Öğr. Üyesi Merve Gültekinoglu Bayram'a,

Bu uzun yolculukta bana her zaman değerli arkadaşlıklarıyla destek olan Dr. Minela Aslan, Şeyma Nur Türkmen Koç, Soghrat Salamatı, Hadiye Keskin ve Melike Akman'a,

Varlığıyla hayatımı güzelleştiren, dostluğuna minnet duyduğum Tuğçe Yılmaz Kaçaroğlu'na,

Doktora sürecimin başından beri desteğiyle her zaman varlığını hissettiren ve dostluğuna müteşekkir olduğum Dr. Ecz. Özgün Fırat Düzenli'ye,

Beni ben yapan, her koşulda beni destekleyen seven; annem, babam ve kardeşime,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. VEZİKOVAJİNAL FİSTÜL TEDAVİ YÖNTEMLERİ VE KLİNİK SONUÇLARI 2	
2.1. Vezikovajinal Fistül	2
2.2. Vezikovajinal Fistül (VVF) Tedavi Yöntemleri	6
2.3. Vezikovajinal Fistül Tedavisinde Kullanılan Otolog ve Sentetik Doku	
İnterpozisyon Flepleri	8
2.3.1. Otolog Doku İnterpozisyon Flepleri	8
2.3.1.1. Martius Flep	9
2.3.1.2. Peritoneal Flep	9
2.3.1.3. Omental Flep.....	10
2.3.1.4. Gracilis Kası Flepi	10
2.3.1.5. Rektus Abdominis Kası Flepi	10
2.3.1.6. Urakal Flep.....	11
2.3.1.7. Mesane Flepi.....	11
2.3.1.8. Singapore Fasiyokütan Flep.....	11
2.3.1.9. İleal Segment Flep	12
2.3.1.10. Rotasyonel Mesane Flepi.....	12
2.3.1.11. Sigmoid Epiploika Flep:	12
2.3.1.12. Dura Mater Flepi.....	12
2.3.2. Sentetik Doku İnterpozisyon Flepleri	13
2.3.2.1. Fibrin Yapıştırıcı	13
2.3.2.2. Siyanoakrilik yapıştırıcı	14
2.3.2.3. Domuz ince bağırsak mukozası	15
2.3.2.4. Jelatin matriks	15

2.3.2.5. Aselüler domuz dermal kollajen.....	15
2.3.2.6. Oksidize selüloz.....	15
2.4. Vezikovajinal Fistül Tedavisinde Görülen Postoperatif Komplikasyonlar.....	16
2.5. Vezikovajinal Fistül Tedavisinden Kullanılan Doku İnterpozisyon Fleplerin Klinik Değerlendirilmesi	16
3. YARA İYİLEŞMESİ VE DOKU ONARIMINDA KULLANILAN BİYOMALZEMELER	28
3.1. Yara İyileşmesi.....	28
3.2. Doku Onarımında Kullanılan Biyomalzemeler.....	31
4. TEZİN AMACI	33
5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
5.1. İpek Fibroin Eldesi	37
5.2. Elektro-eğirme Yöntemi ile Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi.....	38
5.2.1. Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi.....	39
5.2.2. 17-β Estradiol (E2) İçeren Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi.....	40
5.2.3. AgNO ₃ İçeren Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi	40
5.2.4. E2 ve AgNO ₃ İçeren Fibroin/ PCL Fiberlerin Üretimi	40
5.3. Fiberlerin Karakterizasyonu	41
5.3.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Analizi	41
5.3.2. Fiberlerin Morfolojik Analizi	41
5.3.3. Fiberlerin Termal Özelliklerinin Analizi.....	41
5.3.4. İndirekt Sitotoksitesite Analizi.....	41
5.4. <i>In vitro</i> Salım Testleri.....	42
5.4.1. Fiberlerden E2 ve Ag Salımının İncelenmesi.....	42
5.4.2. Fiberlerden E2 Salımının Franz Difüzyon Yöntemi ile İncelenmesi	42
5.5. Fiberlerin Pro-angiogenik Etkisinin Koryoallantoik Membran (CAM) Yöntemi ile İncelenmesi	43
5.5.1. Döllenen Yumurtaların İnkübasyonu ve <i>Ex Ovo</i> Kültürün Hazırlanması...43	
5.5.2. Döllenen Yumurtaların Sağ Kalım Analizleri.....	44
5.5.3. Pro-angiogenik Ajanların Etkilerinin CAM ile İncelenmesi.....	44
5.5.4. Fiberlerin Pro-angiogenik Etkisinin İncelenmesi.....	45
5.5.4. Pro-angiogenik Yanıtın Sayısal Değerlendirilmesi.....	46
5.6. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi	47

5.7. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Doku İnterpozisyon Flepi Olarak <i>İn Vivo</i> Yanıtının Değerlendirilmesi.....	48
5.7.1. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Sıçanlara Uygulanması	48
5.7.2. Histolojik Analizler.....	50
5.7.3. Değerlendirme Kriterleri ve Skorlama.....	51
5.7.4. <i>İn vivo</i> Sonuçlarına Ait Verilerin İstatistiksel Analizi.....	52
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	53
6.1. Pro-anjiyogenik/Antibakteriyel Fibroin/PCL Fiberler.....	53
6.2. Pro-anjiyogenik/Antibakteriyel Fibroin/PCL Fiberlerin Özellikleri	55
6.2.1. Fiber Morfolojisi ve Çap Dağılımları	55
6.2.2. Fiber Yapıların FT-IR Spektrumları	57
6.2.3. Fiberlerin Termal Özellikleri	58
6.2.4. Fiberlerin Sitotoksitesisi	62
6.3. E2Fib/PCL-Ag fiberlerden E2 ve Ag Salım Profilleri.....	63
6.3.1. E2 Salım Profili.....	63
6.3.2. Ag Salım Profili	65
6.4. E2 Yüklü Fiberlerin Pro-anjiyogenik Etkileri.....	67
6.4.1. E2Fib/PCL Fiberlerin Pro-anjiyogenik Etkilerinin Görüntülenmesi.....	68
6.5. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Antibakteriyel Etkisi.....	73
6.6. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Doku İnterpozisyon Flepi Olarak <i>İn Vivo</i> Yanıtı.....	75
7. YORUM.....	104
8. KAYNAKLAR	107
EKLER.....	121
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	121
EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	123
EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	123
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	124
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a) Mesane ve vajinanın normal görüntüsü, b) Vezikovajinal fistül oluşumu...	3
Şekil 2.2. Vezikovajinal fistül tedavisinde kullanılan Goh sınıflandırma sistemi.	5
Şekil 2.3. VVF tedavisinde doku interpozisyon flep kullanımının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.4. İncelenen çalışmalardaki vakaların ülkelere göre dağılımı (%) [99].	27
Şekil 4.1. Pro-anjiojenik ve antibakteriyel özelliklere sahip 2 katmanlı doku interpozisyon flep eşleniğinin şematik gösterimi.	34
Şekil 5.1. İpek böceği kozasından ipek fibroinin eldesinin aşamaları.	38
Şekil 5.2. Embriyonik gelişim. A) döllenmemiş yumurta görüntüsü, B) koryoallantoik membranın (CAM) görüntüsü.	44
Şekil 5.3. Yer belirteci halkanın iki ana damar arasına yerleştirilmesi (7. gün).	45
Şekil 5.4. Fiberlerin iki ana damar arasına yerleştirilmesi (7. gün)	45
Şekil 5.5. Görüntü analizinin akış şeması.	47
Şekil 6.1. Fiberlerin çap dağılımları; A) Fib/PCL fiber, B) E2 Fib/PCL fiber, C) Fib/PCL-Ag fiber, D) E2 Fib/PCL-Ag fiber (E2 tarafı), E) E2 Fib/PCL-Ag fiber (Ag tarafı).	55
Şekil 6.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (25.000 X) ve enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX).....	56
Şekil 6.3 (devamı). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (25.000 X) ve enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX).	57
Şekil 6.4. Fiberlerin FT-IR spektrumları.	58
Şekil 6.6. Fib/PCL fiberlerin DSC termogramı.....	60
Şekil 6.7. E2Fib/PCL fiberlerin DSC termogramı.	60
Şekil 6.8. Fib/PCL-Ag fiberlerin DSC termogramı.....	61
Şekil 6.9. E2Fib/PCL-Ag fiberlerin DSC termogramı.	61
Şekil 6.10. Fib/PCL fiberlerin hücre canlılığına etkisi.....	63
Şekil 6.11. Fib/PCL fiberlerden kümülatif salım grafiği.....	64
Şekil 6.12. Fib/PCL fiberlerden E2 salımının % salım/zaman grafiği.	64
Şekil 6.13. E2Fib/PCL fiberlerin E2 difüzyon grafiği.	65
Şekil 6.14. Fib/PCL fiberlerin Ag salım grafiği.....	66
Şekil 6.16. Embriyoların sağ kalım analizi grafiği.....	68
Şekil 6.17. Kontrol gruplarının CAM görüntüleri.....	69

Şekil 6.18. Fib/PCL fiberlerin CAM görüntüleri.....	69
Şekil 6.19. PBS, E2, VEGF'e ait olan CAM fotoğrafları ve 1. (binary), 2. (skeletonize) adım işlenmiş görüntüler.....	70
Şekil 6.20. E2Fib/PCL, Fib/PCL-Ag, E2Fib/PCL-Ag fiberlere ait olan CAM fotoğrafları ve 1. (binary), 2. (skeletonize) adım işlenmiş görüntüleri.	71
Şekil 6.21. E2, VEGF gruplarının belirlenen CAM alanındaki kontrol grubu olan PBS grubuna göre normalize damar yoğunlukları. Yukarı yönlü ok artışı göstermektedir. ** p<0.01 temsil etmektedir.	72
Şekil 6.22. E2Fib/PCL, Fib/PCL-Ag, E2Fib/PCL-Ag gruplarının belirlenen CAM alanındaki kontrol grubu olan Fib/PCL grubuna göre normalize damar yoğunlukları.	73
Şekil 6.23. Disk difüzyon testi sonucunda fiberlerin farklı bakteri suşları üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.	74
Şekil 6.24. Kontrol ve deney gruplarının mesane ve vajina bölgeleri ve abdomen bölgeleri.	76
Şekil 6.25. Mesane ve vajina bölgesine ait 10 farklı alanda sayılan PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma verilerine ait grafik.....	78
Şekil 6.26. Kontrol grubunda mesane-vajina ara yüzü. Mikrografların üst kısmında mesane, alt kısmında ise vajinaya ait tabakalar izlenmiştir. Mesanenin kas tabakası ile vajinanın kas tabakası arasında yer yer adipositler içeren gevşek bağ dokusu gözlenmektedir. Bu alandaki bağ dokusunun bir kısmı (dikdörtgen alan) B ve D de daha büyük büyütmede verilmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D:X40).	79
Şekil 6.27. Kontrol grubunda mesane-vajina ara yüzündeki bağ doku. Bağ dokusu içinde fibroblastlar (beyaz ok), kan damarları (mavi ok), çevresinde Masson'un trikrom boyası ile yeşil gözlenen kollajen fibriller, adipositler ve birkaç tane mononükleer hücre (kırmızı ok) izlenmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D:X40).	80
Şekil 6.28. PP doku iskelesi uygulanan grupta iskele ve komşuluğunda üstte mesane altta vajinanın kas tabakası izlenmektedir. Polipropilene ait boş alanların çevresinde iskelenin makroporları arasını dolduran doku ile mesane ve vajina arasındaki gevşek bağ dokuya entegre olduğu izlenmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X40).	81

- Şekil 6.29. Uygulanan PP doku iskelesinin mikrofiberlerinin çevresinde kapsül (beyaz ok), dev hücre (siyah ok), iskelenin makroporları arasını dolduran bağ dokusunda damarlanma (mavi ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok) izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, X200). 82
- Şekil 6.30. Uygulanan PP doku iskelesinin mikrofiberleri çevresinde ince bir kapsül ve iskelenin makroporları arasını dolduran dokuda yeşil boyanan kollajen fibriller ile orta derecede organize bağ dokusu ve bu dokuda damarlanma izlenmektedir (Masson'un trikromu, A: X100, B, C:X200, D: X400). 83
- Şekil 6.31. Mesane ile vajina arasında her iki organın kas tabakası altında bağ dokusu içinde fiber izlenmiştir. Fib/PCL fiberin çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah ok) ve kapsül (beyaz ok) gözlenmiştir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, B: X12,5, C, D: X100). 84
- Şekil 6.32. Uygulanan Fib/PCL fiberin içinde fibroblastlar (beyaz ok), ince kollajen fibriller (siyah ok), çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah okbaşı), damarlar (mavi ok) ve mononükleer hücreler (kırmızı ok) gözlenmektedir. Histiositler ile çevrili dalgalı görünümde homojen eosinofilik ipek fibroin yapılar izlenmiştir (A, C, E, F: Hematoksilen-eozin, B, D: Masson'un trikromu A, B: X100, C, D, E: X200, F:X400). 85
- Şekil 6.33. Şekilde abse oluşan doku örneği görülmektedir. Absenin üst kenarında doku içinde ipek fibroin yapısı (çizgili dikdörtgen), çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah okbaşı), damarlar (mavi ok) ve mononükleer hücreler (kırmızı ok) gözlenmektedir. Benzer yapılar Fib/PCL fiberin tüm çevresinde de izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, A:X12,5, B: X40, C: X100, D: X200). 86
- Şekil 6.34. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin doku içerisinde katlandığı, tam degrade olmamakla birlikte degradasyonun başladığı ve fiberin iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X40). 87
- Şekil 6.35. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin E2 tarafında epitelooid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın (mavi ok) arttığı, Ag tarafında histiositlerin varlığı ancak epitelooid özellikte olmadığı, bu tarafta daha çok sayıda dev hücre (siyah ok) olduğu, örneklerin bazı alanlarında bu tarafta nekroz (asteriks) gözlenmektedir. Fiberin içinde işçi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri

izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (Hematoksilen-eozin, A: X100, B, C, D: X200).	88
Şekil 6.36. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberi içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse izlenmektedir. E2: E2Fib/PCL-Ag fiberinin E2 yüzü, Ag: E2Fib/PCL-Ag fiberinin Ag yüzü (Hematoksilen-eozin, A:X12,5, B: X200, C:X100, D: X400).	88
Şekil 6.37. Mesane-vajina implantasyonu gerçekleştirilen çalışmada deneysel gruplara ait A) PMN, B) MN, C) bağ doku organizasyonu ve D) Damarlanmaya ait skorlamalar. * p<0.05, *** p<0.01 ve **** p<0.0001 temsil etmektedir.	90
Şekil 6.38. Abdomen bölgesine ait 10 farklı alanda sayılan PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma verilerine ait grafik.....	91
Şekil 6.39. Kontrol grubunun abdomen dokusundan alınan örneklerinde iskelet kası ve kasın her iki tarafında gevşek bağ dokusu gözlenmektedir. Cilde bakan yüzeyde gevşek bağ dokusu içinde adipositler arasında meme bezi (ok) kesitleri yer almakta ve altında örneklerin yerleştirilmesi hedeflenen alanda gevşek bağ dokusu normal histolojik görünümünde izlenmektedir (A, B, C: Hematoksilen-eozin, D, E, F: Masson'un trikromu A, D: X12,5, B, E: X40, C, F: X100).	92
Şekil 6.40. Örneklerin yerleştirilmesi hedeflenen alanda normal histolojik yapısı ile gevşek bağ dokusu izlenmiştir. Bu alanda hücre infiltrasyonu, damarlanmada artış, kollajen fibrillerin düzenleniminde değişim bulunmamaktadır. (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X200, B, D: X400).	93
Şekil 6.41. Kontrol grubunda sütürlerin etrafında dev hücreler (siyah ok), iki taraflı koyulan dikiş arasındaki dokuda paralel olarak sıkı düzenlenmiş kollajen fibriller, damarlanmada (mavi ok) artış, mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok) izlenmektedir (Hematoksilen-eozin, A:X12,5, B, D:X200 C: X40).	93
Şekil 6.42. PP doku iskelesi uygulanan grubun abdomen örneklerinde doku iskelesi çevresinin kapsül (siyah ok) ile çevrili olduğu ve polipropilenin bıraktığı boş alanlar ile iskelenin makroporları arasını dolduran doku gözlenmektedir. PP doku iskelesi çevresinde orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanmada (mavi ok) artış, orta derecede organize olmuş bağ dokusu izlenmektedir (A, B, C: Hematoksilen-eozin, D, E, F: Masson'un trikromu A: X12,5, B, C, E, F: X200, D: X40).	94
Şekil 6.43. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta cilt altında kasın üstünde bulunan bağ dokusu içinde fiber yapı gözlenmektedir. Sütür çevresinde granülomatöz	

- inflamasyon izlenmektedir. Fiber katlanmış olduğu için 2 tabaka halinde gözlenmektedir. Fiberin her iki tarafı da epiteloid histiositler ile çevrelenmiştir. Fiber içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri, ciddi derece mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanma (mavi ok) ve dev hücreler (siyah ok) izlenmektedir. Fiberin çevresindeki yabancı cisim reaksiyonu çevresinde organize olmuş bağ dokusu (beyaz ok) gözlenmektedir. (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X100). 95
- Şekil 6.44. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta bağ dokusu içinde fiberin çevresinde epiteloid histiositler, fiber içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri, ciddi derece mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanma (mavi ok) ve dev hücreler (siyah ok) izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, X200)..... 96
- Şekil 6.45. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta fiberi içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse oluşumu gözlenmektedir (Masson'un trikromu, A: X12,5, B, C: X40, D: X100). 96
- Şekil 6.46. Abdomene E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu izlenmiştir. Fiberin içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri izlenirken E2 tarafında epiteloid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın (mavi ok) arttığı, Ag tarafında epiteloid özelliği kazanmamış histiositlerin varlığı ve bu tarafta daha çok sayıda dev hücre (siyah ok) izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B: X100, D:X200) 98
- Şekil 6.47. Abdomene E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberi de içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B: X200, D: X100). 99
- Şekil 6.48: Abdomen implantasyonu gerçekleştirilen çalışmada deneysel gruplara ait A) PMN, B) MN, C) bağ doku organizasyonu ve D) Damarlanmaya ait skorlamalar. * $p<0.05$, *** $p<0.01$ ve **** $p<0.0001$ temsil etmektedir..... 102



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. VVF onarımında kullanılan sentetik doku interpozisyon fleplerin özellikleri.	18
Çizelge 2.2. Literatür taramasında incelenen doku interpozisyon flepleri ve bu fleplerin kullanıldığı hasta sayıları [99].	19
Çizelge 2.3. Literatür taramasında incelenen çalışmaların karakteristik özellikleri [99].	20
Çizelge 2.4. İncelenen çalışmalarda tedavi edilen fistül karakteristiklerinin dağılımı [99].	22
Çizelge 2.5. VVF'nin preoperatif değerlendirmesinde kullanılan tanı testleri ve çalışma sayıları [99].	22
Çizelge 2.6. Postoperatif sonuç değerlendirme yöntemleri ve çalışma sayıları [99].	23
Çizelge 2.7. İncelenen çalışmaların VVF onarımında cerrahi başarı [99].	24
Çizelge 2.8. VVF tedavisinde görülen postoperatif komplikasyonlar [99].	25
Çizelge 2.9. İncelenen çalışmaların ait olduğu ülkeler [99].	26
Çizelge 5.1. Üretilen fiberlerin kompozisyonu.	39
Çizelge 5.2. Dokuların mikroskop incelemesinde elde edilen bulgularının skorlama kriterleri.	51
Çizelge 6.1. Disk difüzyon testi sonucunda fiberlerin farklı bakteri suşları üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm).	74
Çizelge 6.2. Mesane-vajina bölgesinde, 10 farklı alanda sayılan ortalama PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damar sayısı*	77
Çizelge 6.3. Abdomen bölgesinde, 10 farklı alanda sayılan ortalama PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma*	91



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

VVF	Vezikovajinal Fistül
CBD	Sürekli Mesane Drenajı
PRP	Platelet Yönünden Zenginleştirilmiş Plazma
PCN	Perkütan Nefrostomi
ECM	Ekstraselüler Matriks
IVU	İntravenöz Ürografi
CT	Bilgisayarlı Tomografi
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
VUD	Vezikoüreteral Refluks
VCUG	İşeme Sistoüretrogramı
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü
(TNF)- α	Tümör Nekrozis Faktör
(TGF)- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
EGF	Endotelyal Büyüme Faktörü
E2	17- β estradiol
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ATP	Adenozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PGA	Poliglikolik Asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PCL	Polikaprolakton
GAG	Glikozaminoglikan
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
AgNPs	Ag ⁺ Nanopartiküller
UV	Ultraviyole
CA	Selüloz Asetat
PGA	Poli (glikolik asit)
PEG	Poli (etilen glikol)

PEI	Polietilen İmin
PU	Poli(üretan)
PVA	Poli (vinil alkol)
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
LiBr	Lityum Bromür
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CH ₂ O ₂	Formik Asit
CH ₃ COOH	Asetik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılım X Işını Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
T _m	Erime Sıcaklığı
FT-IR	Fourer Transform Infrared Analizi
CH ₂	Metilen
C=O	Karbonil
CAM	Koryoallantoik Membran
PBS	Fosfat Tamponu
FBS	Fetal Bovine Serum
MTT	3-4,5 Dimetil-tiyazolil-2-5-Difeniltetrazolyum bromür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MHA	Mueller Hinton Agar
DMF	N-N-dimetil formamid
HFIP	Heksafloro-2-propanol
PP	Polipropilen
PMN	Polimorfonükleer lökositler
MN	Mononükleer hücreler

1. GİRİŞ

Vezikovajinal fistül (VVF), mesane ve vajina arasında sürekli idrar kaçırmaya neden olan olağan dışı bir açıklıktır. VVF, sebep olduğu idrar kaçırma sorunu nedeniyle kadınların yaşamlarında sosyal ve psikolojik anlamda olumsuz etkilere neden olmaktadır [1]. VVF'nin görülme nedenleri gelişmekte olan ülkeler ve gelişmiş ülkeler için farklılık göstermektedir. VVF, gelişmekte olan ülkelerde doğum travmaları nedeniyle meydana gelirken, gelişmiş ülkelerde ise hastalıklar, ürojinekolojik girişimlerden sonra uygulanan pelvik radyasyon tedavisinin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, en az 2 milyon kadında VVF olduğu tahmin edilmektedir ve her yıl sadece Afrika'da 30.000 ila 130.000 yeni vaka görülmektedir [2].

VVF'nin tedavisi, fistülün boyutu, yeri ve cerrahın deneyimi gibi etmenlere bağlı olarak konservatif veya girişimsel olmaktadır. Fistül oluşumunun erken evrelerinde, fistül boyutu 1 cm'den küçük iken, çeşitli konservatif yöntemler tedavide tercih edilmektedir. Konservatif tedavi yöntemleri arasında, fistülün takip edilmesi, antikolinergik ilaç kullanımı ve kateter uygulaması sayılabilmektedir [3]. Konservatif tedavi yaklaşımlarının yetersiz kaldığı durumlarda, VVF cerrahi onarım yoluyla tedavi edilmektedir. VVF'nin cerrahi onarımında başarılı bir sonuç elde etmek için çoğunlukla mesane ile vajina arasına iyi damarlanmış bir doku interpozisyon flebi yerleştirilmektedir [4]. Doku interpozisyon flepleri, mesane ile vajina arasında bir bariyer görevi görerek ve doku oluşumunu ve damarlanmayı artırarak tedavinin başarı şansını yükseltmektedir [5]. Bu amaçla birçok otolog ve sentetik doku interpozisyon flepi kullanılmaktadır. Otolog doku interpozisyon flepleri tedavide yaygın olarak tercih edilmekle birlikte hastanın genel sağlık durumunun uygun olmaması, yeterli flep bulunmaması, donör bölgesi morbiditesi gibi nedenler kullanımını kısıtlamaktadır. Sentetik doku interpozisyon flepler, elde edilme kolaylığı, daha kısa operasyon süreleri, donör bölgesi morbiditesine neden olmaması ve otolog fleplerden tedavide daha iyi etkinlik göstermesi gibi avantajlarla iyi bir alternatif olarak düşünülmektedir. Literatürde VVF onarımında kullanılan ürünler, çeşitli cerrahi disiplinler tarafından kanamayı kontrol etmek ve iyileşmeyi hızlandırmak için kullanılan başlıca doku yapıştırıcıları ve hemostatik ajanlardır. Bu ürünlerin VVF tedavisi için yetersiz kalmalarının nedeni, hiçbirinin VVF onarımı için özel olarak tasarlanmamış olmasıdır. VVF bölgesindeki iyileşmeye katkıları olmasına rağmen tedavide tam olarak

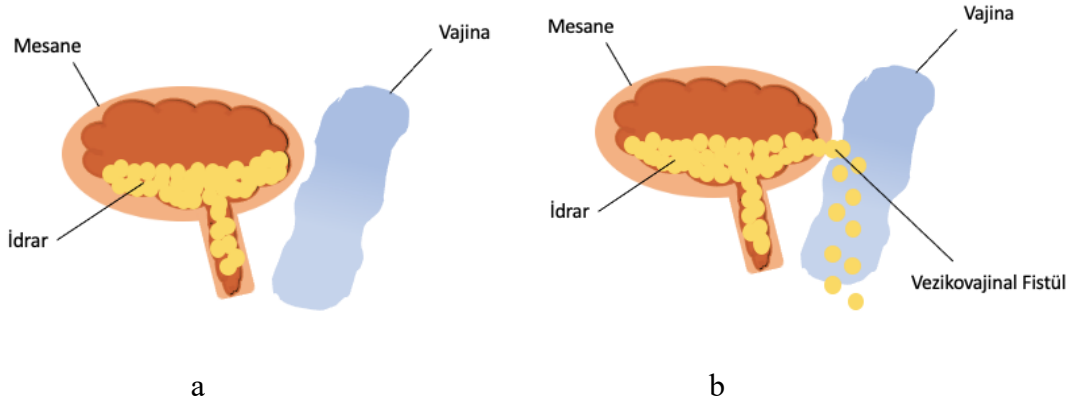
ihtiyacı karşılamamaktadırlar. Doku mühendisliği ve malzeme bilimindeki gelişmelere rağmen, cerrahların VVF onarımı sırasında mesane ve vajina arasında kaliteli doku gelişimini karşılayabilecek, amaca yönelik tasarlanmış sentetik bir doku interpozisyon flep geliştirilmemiştir.

Bu tez kapsamında vezikovajinal fistül tedavi yöntemleri ele alınmış ve bu amaçla klinikte kullanılan otolog ve sentetik doku interpozisyon flepleri hakkında bilgiler derlenmiştir. Ayrıca VVF onarımında kullanılan doku interpozisyon flepleri; cerrahi, biyomalzeme ve başarı oranları açısından klinik değerlendirilmesi yapılarak sunulmuştur.

2. VEZIKOVAJİNAL FİSTÜL TEDAVİ YÖNTEMLERİ VE KLİNİK SONUÇLARI

2.1. Vezikovajinal Fistül

Vezikovajinal fistül (VVF), mesane ve vajina arasında meydana gelen olağan dışı bir açıklıktır. Hastalarda görülen VVF'ye bağlı en önemli şikâyet idrar kaçırma olup buna bağlı olarak hastalarda sosyal ve psikolojik tahribat meydana gelmektedir [6]. VVF'nin görülme sıklığı tam olarak bilinmemekle birlikte Dünya Sağlık Örgütü'nün 1993 yılı verilerine göre 2 milyondan fazla kadının VVF oluşumunun beraberinde getirdiği problemlere sahip olduğu ve her yıl ortalama 50.000-100.000 arasında yeni vaka meydana geldiği tahmin edilmektedir [7]. Batı Afrika'da her yıl en az 33.000 yeni vakanın görüldüğü belirtilmektedir. Afrika bölgesinde yapılan başka bir çalışmada ise 30.000-130.000 doğum yapan kadında fistül oluştuğu tahmin edilmektedir. Obstetrik fistüller adolesan dönemdeki kadınların üreme sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [8, 9]. Erken yaşta yapılan evlilik ve çocuk sahibi olma, yetersiz sosyoekonomik durum, düşük okuma yazma oranı, yetersiz beslenme, yetersiz obstetrik bakım gibi etkenler VVF görülme sıklığını artırmaktadır [10]. VVF'nin obstetrik nedenleri arasında en çok karşılaşılan durum uzamış doğumlardır. Erken yaşta oluşan gebelikler olgunlaşmamış pelvik çatı nedeniyle uzamış doğuma ve neticesinde VVF oluşuma neden olmaktadır [11]. Gelişmekte olan ülkelerde obstetrik vezikovajinal fistüllerin görülme sıklığının %84 - %97 oranında olduğu [12, 13], gelişmiş ülkelerde ise bu oranın %3 -%8 arasında olduğu bildirilmektedir [14, 15].



Şekil 2.1. a) Mesane ve vajinanın normal görüntüsü, b) Vezikovajinal fistül oluşumu.

Gelişmiş ülkelerde fistüller, büyük oranda jinekolojik operasyonlar ve radyoterapi nedeniyle meydana gelmektedirler. Fistüller, daha az oranda pelvik tümörler, inflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonları nedeniyle de meydana gelmektedirler [16, 17].

VVF, insanlık tarihi kadar eski jinekolojik bir hastalıktır. Bilinen en eski fistül, M.Ö 2050 yıllarında yaşamış olan Kraliçe Henhenit'e aittir. 1935 yılında, Profesör Derry, Henhenit'in mumyalanmış kalıntılarında büyük bir fistül tanımlamıştır [18]. İbn-i Sina fistülün tanımını MS 1000 yıllarında "Kanun" adlı kitabında yapmıştır. Bu tarihten sonra literatürde bu konu ile ilgili yer alan bilgilerin büyük bir kısmı küçük ölçekli retrospektif vaka serileri ve uzman görüşleri şeklindedir. Elde edilen bilgilerin büyük bir kısmı, sağlam bilimsel kanıtlara dayanmaktan çok küçük ölçekli çalışmaların sonuçları şeklindedir [19].

Fistül tedavisine yönelik ilk girişimler, idrarın çeşitli yöntemlerle ortamdaki emilmesi şeklinde yapılmıştır. 1663 yılında, Hendrik van Roonhuyse, operatif jinekoloji hakkında bilinen ilk metin olan yayınında fistül onarımı hakkında yenilikler önermiştir. Bu yayında; i. fistülün bir spekulum ile açığa çıkarılması, ii. mesane duvarının çevre dokulardan ayrılması, iii. fistül kenarlarının dikiş iğneleri vasıtasıyla birbirine yaklaştırılması önerilmektedir [20]. İsviçreli Dr. Johann Fatio, 1675 yılında Roonhuyse tekniğini kullanarak iki fistülün başarılı bir şekilde onarımını gerçekleştirmiştir. Fistülün görüntülenmesi ve onarılması amacıyla diz-dirsek pozisyonu ilk kez Dr. Sims tarafından

önerilmiştir [21]. Amerika'daki ilk fistül tedavisi 1836 yılında Peter Mettauer tarafından yapılmıştır. Amerika'daki ilk fistül hastanesi ise 1855 yılında New York'ta açılmıştır [18].

Fistül onarımının temel yaklaşımlarından biri olan transvezikal yaklaşımdaki gelişmelere 1890 yılında Fredrich Trendelenburg öncülük etmiştir. Katmanlı fistül onarımı ise ilk kez Alwin Mackenrodt tarafından 1894 yılında yapılmıştır [18]. Fistül onarımındaki en önemli gelişme 1928 yılında Heinrich Martius tarafından kaydedilmiştir. Heinrich Martius, mesane ve vajina arasına yerleştirilen bir labial yağ grefti olan Martius grefti tanımlamıştır. Martius greftinin tanımlanmasından sonra 1928 yılında, Garlock tarafından gracilis kası greftinin kullanılması önerilmiştir [18].

VVF oluşumundaki önemli etiyolojik faktörler; doğum travmaları, obstetrik ve cerrahi yaralanmalardır. VVF oluşumundaki etiyolojik faktörler ve görülme sıklığı, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, VVF doğum travmaları ve doğum sonrası bakım hizmetlerine erişimin yetersiz olduğu durumlarda meydana gelmektedir [22]. Gelişmiş ülkelerde ise, VVF'nin görülme nedenleri çoğunlukla, cerrahi yaralanmalar ve radyoterapidir [23].

İdrar kaçırma şikâyeti, VVF'nin en belirgin semptomudur. VVF'nin idrar kaçırma gibi fizyolojik etkilerine ek olarak, hastalar üzerinde bu duruma bağlı, psikolojik etkileri de meydana gelmektedir. VVF'nin, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve kişilerin sosyal izolasyonuna sebep olan etkileri de mevcuttur [24].

VVF tedavisi öncesinde, fistülün teşhis edilmesi, tanımlanması ve sınıflandırılması basamakları yer almaktadır. VVF teşhisinde fistül konumunun, boyutunun ve sayısının tanımlanması amacıyla pelvik muayene, sistoskopik ve vajinoskopik muayene kullanılan başlıca yöntemlerdir [25, 26]. Fenazopiridin ve metilen mavisi boya testleri VVF teşhisi için kullanılmaktadırlar. Oral yolla hastaya verilen fenazopiridin, idrarı turuncu renge boyar ve vajinaya yerleştirilen tampon sayesinde idrar kaçağının varlığı tespit edilir. VVF teşhisi için kullanılan bir diğer boya testi ise metilen mavisi testidir. Mesane metilen mavisi boyası ile doldurulur ve vajinaya yerleştirilen tampon sayesinde idrar kaçırma durumunun varlığı tespit edilir [27, 28]. Vajinoskopi, vajinal duvarın anterior kısmında meydana gelen hasarların görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Sistogram ve işeme sistoüretrogramı görüntülemeleri de kullanılan yöntemlerdir [24]. Sistogram VVF

varlığını belirlemenin yanı sıra, fistülün boyut ve yerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [27]. İntravenöz pyelografi, bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme yöntemleri de fistülün teşhisi amacıyla kullanılmaktadırlar [25, 29].

Literatürde obstetrik fistül sınıflandırması için on iki farklı sınıflandırma sistemi bulunmaktadır. Bu sınıflandırma sistemlerinden en yaygın kullanılanlar; Waaldijk ve Goh sınıflandırma sistemleridir. Waaldijk sistemi, VVF'nin üretra ile ilişkisini, onarım mekanizmasını ve fistül boyutunu sınıflandırır. Goh sınıflandırma sistemi ise fistül boyutunu, dış üretral meatustan uzaklığı ve vajinal fibrozisin şiddetini sınıflandırır [30] (Şekil 2.2). Capes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Goh'un sınıflandırma sisteminin Waaldijk'in sisteminden önemli ölçüde daha başarılı fistül onarma tahminine sahip olduğu belirtilmektedir [31].



Şekil 2.2. Vezikovajinal fistül tedavisinde kullanılan Goh sınıflandırma sistemi.

Fistüller çeşitli parametrelere göre sınıflandırılmaktadır. Boyutu $\leq 0,5$ cm, radyoterapi uygulanmamış ve tek fistüller, literatürde basit fistüller olarak adlandırılırlar. Boyutu $\geq 2,5$ cm olan ve tekrarlayan başarısız onarım öyküsü olan fistüller karmaşık fistül olarak tanımlanırlar. Kompleks fistüller, radyoterapi sonrasında ya da kronik hastalıklar sonucunda meydana gelmektedirler [1, 28].

2.2. Vezikovajinal Fistül (VVF) Tedavi Yöntemleri

VVF tedavisinde çeşitli konservatif yaklaşımlar uygulanmaktadır. Bu yaklaşımlar; doku yapıştırıcısı enjeksiyonu, platelet yönünden zenginleştirilmiş plazma (PRP) enjeksiyonu ve antikolinerjiklerin uygulanmasıdır. Tekrarlayan VVF vakalarında, perkütan nefrostomi (PCN), bilateral üreter oklüzyonlu PCN, izobutil-2-siyanoakrilat enjeksiyonu, çıkarılabilir veya ayrılmaz balon uygulamaları, naylon tıkaçlar, bobinler, jelatin süngerler, fulgurasyon gibi yöntemler uygulanmaktadır [32].

Fistül teşhis edilene kadar epitelizasyonun başladığı durumlarda, eğer fistül boyutu 5 mm'den küçük ise birkaç ek tedavi seçeneği uygulanır. Bu tedavi yöntemleri standart ve kabul görmüş yöntemler olmamakla birlikte her biri deneysel düzeyde uygulanan tedavilerdir. Bu yöntemler;

- Koter kullanılarak epitel tabakasının ortadan kaldırılması ile mesane dokularının ve vajinal dokuların iyileşmesi sağlanmaktadır.
- Fibrin yapıştırıcı, vajina yoluyla doğrudan fistül çevresine enjekte edilebilir. Fibrin yapıştırıcı; fistül çevresinde, fizyolojik pıhtıdan yaklaşık 10 kat daha güçlü olan fibrin tıkaçı oluşturarak fistülün kenarlarından doku büyümesi gerçekleşene kadar boşluğu doldurur. Fibrin yapıştırıcı kateter ile birlikte uygulandığında 1-4 hafta içerisinde fistülde iyileşme gerçekleşir.
- Ototolog PRP transvajinal yolla fistül etrafındaki dokulara enjekte edilerek fistülün iyileşmesi sağlanmaktadır. PRP yapısında bulunan büyüme faktörlerinin doku yenilenmesini desteklediği düşünülmektedir [33].
- Siyanoakrilik yapıştırıcılar da konservatif tedavide kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, siyanoakrilik yapıştırıcıların uzun ve dar fistüllerin kapatılmasında daha başarılı olduğu görülmüştür [25].

Konservatif yaklaşımların yetersiz kaldığı VVF'lerde cerrahi onarım tercih edilmektedir. Cerrahi yaklaşım tipi, fistülün boyutuna, bulunduğu yere, basit ya da kompleks tipte olmasına ve cerrahın tecrübesine bağlı olarak değişmektedir [25]. Başarılı bir fistül onarımı için temel prensip fistülün gerilimsiz olarak ve idrar kaçırmaya olanak vermeyecek şekilde kapatılmasıdır [6]. Cerrahi onarımda transvajinal ve transabdominal yaklaşımlar kullanılmaktadır.

Transvajinal yaklaşımda minimal invaziv prosedür uygulanmakta olup kan kaybı daha az görülmektedir. Cerrahi müdahale ve hastanede yatış sürelerinin kısalığı da göz önüne alındığında avantajları olan bir yöntemdir [34]. Latzko tekniği transvajinal yaklaşımda, boyutu 1,5 cm'den küçük olan basit fistüller için kullanılmaktadır [35]. Boyutu 2 cm'den büyük olan ya da kompleks olarak tanımlanan fistüllerin kapatılması için doku interpozisyon fleplere ihtiyaç duyulmaktadır [25]. Martius flep, peritoneal flep, gracilis kası flepi transvajinal yaklaşımda yaygın olarak tercih edilen fleplerdir. Transvajinal yaklaşımda, fistül boyutunun ve yerinin tam olarak tespit edilmiş olması önemlidir [34].

Transabdominal yaklaşım vajinal yolla fistüle erişim sağlanamadığı durumlarda ya da kompleks tipteki fistüllerde tercih edilir. Transabdominal yaklaşımda, genellikle O'Conor tekniği tercih edilmektedir [34]. O'Conor tekniğinde göbek altı bölgesine yapılan kesi ile mesaneye ulaşılmaktadır. Mesane, çevre dokulardan ayrılarak fistül üzerine kapatılabilecek konuma getirilmektedir [36]. Transabdominal yaklaşımda, omental flep, peritoneal flep, abdominis kası flepi ve gracilis kası fleplerinin kullanımları tercih edilmektedir. Omental flep ve peritoneal flep, transabdominal yaklaşımda kullanım kolaylığı açısından en çok tercih edilen fleplerdir [34]. Transabdominal yaklaşımın VVF onarımındaki başarı oranı oldukça yüksek olmakla birlikte transvajinal yaklaşım ile karşılaştırıldığında, daha geç iyileşme süresine sahip olduğu görülmektedir [25].

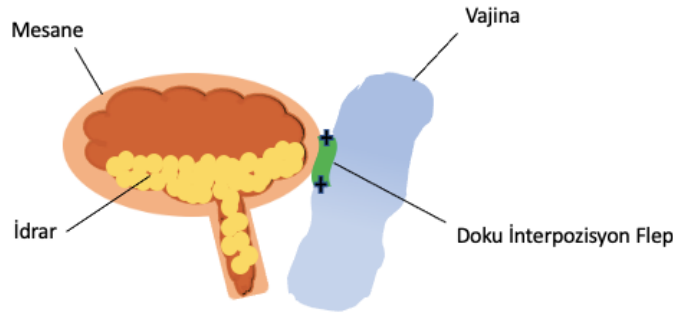
Laparoskopik cerrahi, transvajinal ve transabdominal yaklaşımlara alternatif olarak tercih edilen minimal invaziv bir tekniktir. Görüntüleme esasına dayanan bu teknik, ek bir kesi işlemi yapmadan fistülün tam konumunu belirleme esasına dayanmaktadır [37]. VVF onarımında laparoskopik cerrahi ilk kez 1994 yılında Nezhat ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde videolaparoskopi ve videosistoskopi kullanılarak fistüle hızlı ve direkt erişim sağlanmıştır. Görüntüleme sayesinde ek bir kesiye ihtiyaç duyulmadan ve gerilimsiz bir şekilde fistül onarımı gerçekleştirilmiştir [38]. Melamud ve arkadaşları ise ilk kez robotik yardımcı laparoskopik onarımını gerçekleştirmişlerdir.

Standart laparoskopi ve açık cerrahi tekniklere kıyasla karmaşık laparoskopik görevler için hızı ve hassasiyeti artırmak için DaVinci robotik sistemi kullanılmıştır [39]. Klinikte, transabdominal yaklaşımın ve laparoskopik cerrahinin transvajinal yaklaşıma herhangi bir açıdan üstünlüğü olmadığı bilinmektedir.

VVF tedavisinde, topikal estradiol kullanımının damarlanmayı artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. Bu nedenle preoperatif tedavide topikal estradiol önerilmektedir [40, 41].

2.3. Vezikovajinal Fistül Tedavisinde Kullanılan Otolog ve Sentetik Doku İnterpozisyon Flepleri

VVF tedavisinde interpozisyon flepleri, fistül bölgesindeki ölü boşluğu doldurarak damarlanmanın artmasıyla iyileşmeyi desteklemekte ve tekrarlayan fistül oluşumunu engellemektedir (Şekil 2.3) [42-44]. Yapılan çalışmalarda interpozisyon flep kullanımının tedavide başarı oranını artırdığı gösterilmiştir [17]. Bu amaçla kullanılan flepler otolog ve sentetik olmak üzere iki kategori altında değerlendirilir.



Şekil 2.3. VVF tedavisinde doku interpozisyon flep kullanımının şematik gösterimi.

2.3.1. Otolog Doku İnterpozisyon Flepleri

VVF onarımı, fistülün çevresindeki dokulardan ayrılması ve gerilimsiz olarak kapatılması esasına dayanmaktadır. Onarımın sıvı geçişine olanak vermeyecek şekilde çok katmanlı ve bununla beraber dikiş hatlarının üst üste gelmeyeceği şekilde yerleştirilmiş olması

gerekmektedir. Onarımda kan damarları bakımından zengin olan otolog doku interpozisyon flep kullanımı, fistül çevresinde kan akışını sağlayacağından iyileşmenin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir [16].

Literatürde VVF onarımında, Martius flep, omental flep, peritoneal flep, abdominis kası flepi, gracilis kası flepi, mesane flepi, rotasyonel mesane flepi, singapore fasiyokütan flep, ileal segment flep, urakal flep, sigmoid epiploica flep, dura mater grefti otolog interpozisyon flep olarak kullanılmaktadırlar [19]. Modern cerrahi pratikte en çok kullanılan otolog doku interpozisyon flep Martius fleptir. Diğer flepler, literatürde nadiren kullanılmaktadır.

2.3.1.1. Martius Flep

VVF onarımında en yaygın olarak kullanılan flep, Martius fleptir. Martius flep, 1928 yılında Martius tarafından tanımlanmıştır [45, 46]. Bu flep, labial arterden damarlanan bulboavernosus kasından ya da internal ve eksternal pudental arterlerden ve obturator arterden damarlanan labia majoradan elde edilmektedir. Kullanılması hedeflenen yağ pedinin boyutuna bağlı olarak mons pubis seviyesinden furset seviyesine doğru labia majora üzerinde dikey kesi yapılmakta ve kesi bulboavernosus kasından ayrılana kadar derinleştirilmektedir. Kan akışının korunması flep canlılığı açısından önemlidir. Elde edilen yağ pedi, labia minora ve vajinal dokunun altından VVF bölgesine doğru tünellenerek, puboservikal kısım ve vajina duvarı arasına dikilir [47, 48]. Böylelikle mesane ve vajinanın onarılan kısımlarının üst üste gelmesi engellenir [49]. VVF bölgesine yerleştirilen yağ pedi, bu bölgede yeni damar oluşmasını destekler ve granülasyon dokusu oluşumunu artırır [50]. Martius flep, VVF onarımının yanı sıra, üretrovajinal ve rektovajinal fistüllerin onarımında da kullanılmaktadır [51]. Martius flep kullanımı, distal yerleşimli fistüllerde tercih edilmektedir. Proksimal fistüllerde Martius flep onarım bölgesine gerilimsiz olarak ulaşamamaktadır [52].

2.3.1.2. Peritoneal Flep

Periton, proksimal vajina bölgesinde bulunan ve fistül onarımında ek bir kesiye ihtiyaç duyulmaksızın elde edilebilen damarlanmış bir dokudur. Fistül bölgesine doğru kolay hareket ettirilebilen bu doku peritoneal flep olarak VVF onarımında kullanılmaktadır. Peritoneal flep, proksimal yerleşimli VVF'lerin onarımında tercih edilmektedir [52].

Peritoneal flep kullanımı, tedavisi zor olan kompleks yapıdaki VVF'lerin transvajinal yaklaşım ile onarılmasına olanak sağlamaktadır. Peritoneal flep, Martius flep uzunluğunun yeterli olmadığı durumlarda ve Martius flep yönteminde kullanılan vajinal duvarın kesilmesi ve tünellenmesi basamaklarının uygulanmasının tercih edilmediği durumlarda bir alternatif olarak kullanılmaktadır [53]. Peritoneal flep, periton zarının mesanenin posterior duvarından ayrılması ile elde edilir [54].

2.3.1.3. Omental Flep

Omentum, abdominal kısımda meydana gelen inflamasyonun sınırlandırılması için gelişmiş olan dokudur. Omentum dinlenme durumunda iken yağ dokusu ile benzerlik göstermekte olup onarım potansiyeli başka dokular ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Sahip olduğu lenfatik ve vasküler ağ omentumun onarım potansiyelini artırmaktadır [55]. Omentumun fistül onarımındaki kullanımı ilk kez 1972 yılında Kiricuta ve Goldstein tarafından tanımlanmıştır. Omentumun beslenmesi, sağ ve sol gastroepiploik arterlerden sağlanır. Omentum, zengin lenfatik ve vasküler ağ kaynağı sayesinde VVF onarımında interpozisyon flep olarak kullanılmaktadır. Omentumun yeterli uzunluk ve hareket ettirilebilme özelliği sayesinde büyük VVF'lerin bile gerilimsiz olarak onarımı gerçekleştirilebilmektedir [56].

2.3.1.4. Gracilis Kası Flepi

Gracilis kası, pubik arktan çıkan ve proksimal tibiaya yapışan yaklaşıtrıcı kastır [57]. Kalçanın medial kısmında yer alan gracilis kası, fonksiyonel olmayan bir kastır ve perineal rekonstrüksiyonlar için çok yönlü olmasını sağlayan proksimal bir nörovasküler pedikül içerir [58]. İyi damarlanmış bir doku olan gracilis kası, vajinal ve penil rekonstrüksiyonlarda ve VVF onarımında kullanılmaktadır. Gracilis kası, VVF onarımında omentum kullanımına bir alternatif olarak tercih edilmektedir [59]. Gracilis kası VVF onarımında vajinal [60] ve abdominal [59] yaklaşımların her ikisinde de tercih edilmektedir.

2.3.1.5. Rektus Abdominis Kası Flepi

Rektus abdominis kası; alt epigastrik, üst epigastrik arterlerden ve lateral perforan damarlardan kaynaklanan kan beslemesine sahiptir. Rektus abdominis kasının sahip olduğu çoklu kan beslemesi sayesinde, onarılması hedeflenen dokularda iyileşmeyi

destekleyici özellik göstermektedir. Zengin damar kan beslemesi sayesinde rektus abdominis kasından elde edilen flepler, gracilis kasından elde edilen fleplere kıyasla daha çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar. Rektus abdominis kası flepleri, üst veya alt vasküler pedikül üzerinde hareket ettirilebildiğinden rekonstrüktif uygulamalarda tercih edilen fleplerdir [61]. Rektus abdominis kası, suprapubik olarak kesilir, fistül üzerine hareket ettirilerek fistülün kapatılması sağlanır [62].

2.3.1.6. Urakal Flep

Urakus, peritonun zengin damarlara sahip ve etraf dokulardan kolaylıkla ayrılabilen bir kısımdır. Urakal flep, urakusun karın duvarı ve mesaneden proksimal rezeke edilmesi ile elde edilmektedir. VVF onarımında yaygın olarak kullanılan peritoneal flepin bir çeşidi olan urakal flep, kalın ve zengin damarlanmış yapısı sayesinde interpozisyon flep olarak kullanımda avantaj sağlamaktadır. Ayrıca urakal flep kesisi, peritoneal flep kesisi ile karşılaştırıldığında morbidite düzeyinin minimal seviyede olduğu görülmektedir [63].

2.3.1.7. Mesane Flepi

Cerrahide mesane flepi kullanımının temel ilkeleri 1894 yılında Boari tarafından üreteral implantasyonun klasik tanımında kullanılmıştır. Mesane flepi, daha sonraki yıllarda VVF onarımı için kullanılmaya başlanmıştır [62]. Mesane çevre dokulardan rezeke edilerek, flep muskularisten ayrılır. Mukoza yüzeyi vajinaya bakacak şekilde, mesane ve vajina duvarları arasına yerleştirilir [64].

2.3.1.8. Singapore Fasiyokütan Flep

Singapore fasiyokütan flep, tabanı perineal bölgede olacak şekilde labiokrural kıvrım üzerinde ortalanmış pudental uyluk flepidir [65]. Pudental flep, 1989 yılında ilk kez vajinal rekonstrüksiyonda kullanılmış ve perineal yaralar ve fistüllerin onarımında da kullanılabileceği önerilmiştir [66]. Fasiyokütan flep, kutanöz inervasyonu ve damarları koruyarak stent gereksinimini ortadan kaldırır. Singapore fasiyokütan flep, minimum ek malzeme gereksinimi, güvenilir oluşu ve kesi kolaylığı açısından tercih edilen otolog fleplerdendir [65].

2.3.1.9. İleal Segment Flep

İleal segment flep, ilk kez 2004 yılında Tabakov ve arkadaşları tarafından ileosistoplasti yönteminin uyarlanması sonucu VVF onarımında kullanılması ile tanımlanmıştır. İleumun, mezenterden ayrılması ile iyi damarlanmış özellikteki ileal segment flep elde edilir. İleal segment, mesane üzerine katlanarak fistül onarımı gerçekleştirilir [67].

2.3.1.10. Rotasyonel Mesane Flepi

Abdominal yaklaşımda kullanılan tekniklerden biri bivalve tekniğidir. Bivalve tekniğinde mesane, üzerine kesi atılmadan vajinadan ayrılır. Bu teknik, fistülün direkt görülebilmesine ve rezeke edilmesine olanak tanır [68]. Kesi yapılmadan mesanenin vajinadan ayrılarak hareket ettirilmesine dayanan bu yöntemde rotasyonel mesane flepinin kullanımı tercih edilmektedir [69]. Rotasyonel mesane flepinin uygulanması O'Conor tekniğinin esaslarına dayanmaktadır [70]. O'Conor tekniği VVF onarımında, fistülün kolaylıkla görülebilmesi ve onarılabilmesi açısından önemlidir [71].

2.3.1.11. Sigmoid Epiploika Flep:

Kalın bağırsağın bir kısmı olan sigmoid epiploika, VVF onarımında omental flep yerine bir alternatif olarak kullanılmaktadır. Omental flep ile karşılaştırıldığında avantajları, daha kısa operasyon süresi ve enfeksiyon riskinin daha az olması sayılabilmektedir [72-74].

2.3.1.12. Dura Mater Flepi

Dura mater zarı, nörolojide, genel cerrahide ve otolaringolojide interpozisyon flep olarak kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının yanında ürolojide de VVF onarımında kullanılmaktadır [75].

Otolog interpozisyon flepler, VVF onarımı için standart olarak görünmekle birlikte sentetik interpozisyon flepler; elde edilme kolaylığı, daha kısa operasyon süresi ve kullanımları için ek bir cerrahi operasyona gerek olmaması nedeniyle iyi bir alternatif ol. Doku yapıştırıcılar ve hemostatik ajanlar, çeşitli cerrahi disiplinlerde iyileşmeyi hızlandırmak ve cerrahi komplikasyonları önlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu malzemeler son yıllarda VVF onarımında da kullanılmaktadırlar [76].

2.3.2. Sentetik Doku İnterpozisyon Flepleri

Literatürde, VVF onarımında altı adet sentetik doku interpozisyon flep kullanılmıştır. Bunlar; fibrin yapıştırıcı, siyanoakrilik yapıştırıcı, ince bağırsak mukozası, jelatin matriks, aselüler kollajen matriks, oksidize selülozdur [3, 76-78].

2.3.2.1. Fibrin Yapıştırıcı

Fibrin yapıştırıcı, cerrahide hemostatik ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde fibrin yapıştırıcının kullanıldığı randomize kontrollü çalışmalar analiz edildiğinde, postoperatif kan kaybını ve kırmızı kan hücrelerinin transfüzyonunu azalttığı görülmüştür. Hemostatik ajan olarak kullanımının yanı sıra doku yapıştırıcısı özelliği nedeniyle de cerrahi işlemlerde tercih edilmektedir. Cerrahide pek çok alanda kullanılan fibrin yapıştırıcı, üroloji alanında da özellikle VVF tedavisinde kullanılmaktadır. Tisseel ve Crosseal ticari isimleriyle piyasada yer alan fibrin yapıştırıcılar, farklı alanlarda kullanım için özelleşmişlerdir. Tisseel; kardiyopulmoner bypass operasyonlarında ve abdomende yer alan kanamaların kontrol altına alınmasında ve kolostomilerin kapatılmasında kullanılmaktadır. Tisseel, yapısında bulunan sığır kaynaklı aprotinin nedeniyle, alerjik ve anaflaktik reaksiyonlara sebebiyet verebilmektedir. Crosseal ise karaciğer operasyonları sırasında meydana gelen kanamaların kontrol altına alınmasında kullanılmaktadır. Crosseal yapısında bulunan traneksamik asit kanamanın durdurulmasını sağlar fakat serebrospinal sıvılar ya da dura mater ile temas etmemesi gerekmektedir [79].

Fibrin yapıştırıcının tarihçesine bakıldığında ilk kullanımının, 1. Dünya savaşı yıllarına dayandığı görülmektedir. Savaş sırasında, parankimal organlarda meydana gelen kanamaların kontrol altına alınması amacıyla kullanılmıştır. Otolog fibrin ve trombin çözeltilerinin insanlarda deri greftlerinin yapıştırılması amacıyla kullanımı ilk kez 1940'lı yıllarda gerçekleştirilmiştir [80]. Fibrin yapıştırıcı VVF onarımında ilk kez, 1985 yılında Papadopoulos ve arkadaşları tarafından tavşan modeli üzerinde denenmiştir [81].

Fibrin yapıştırıcı, uygulandığı bölgede fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlamakta olup bu özelliği nedeniyle pıhtılaşmanın son evresine benzetilmektedir. Fibrin yapıştırıcı, iki ayrı şırıngadan enjekte edilmek suretiyle bir araya gelen iki bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerin ilki fibrinojendir. Fibrinojen, fibrin yapıştırıcının temel bileşeni olmakla

birlikte, beraberinde faktör 13 ve diğer plazma proteinleri olan fibronektin ve plazminojen ile birlikte bulunurlar. Diğer bileşen ise trombin ve beraberinde kullanılan kalsiyum klorür. Bu iki bileşen birlikte kullanıldığında, trombin varlığında, fibrinojen fibrine dönüşerek hidrojen bağ yapısını oluşturur. Oluşan pıhtının mekanik dayanımı, fibrin monomerlerin çapraz bağlanarak dayanımlarının artması sonucunda meydana gelir. Fibrin yapıştırıcının dokuları yapıştırma kapasitesi fibrinojen konsantrasyonuna bağlıdır ve 3-5 dakika içerisinde etkinlik göstermektedir [80]. Fibrin yapıştırıcı doku yapıştırıcı özelliğinin yanında yara iyileşmesinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Fibronektin yapısında bulunan ve spesifik fonksiyonlar gösteren bağlantı bölgeleri sayesinde yara iyileşmesinde aktif rol oynamaktadır. Fibronektin bu özelleşmiş bölgeler sayesinde farklı hücre tipleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks (ECM) ile etkileşime girmektedir [82].

2.3.2.2. Siyanoakrilik yapıştırıcı

Siyanoakrilatlar, su veya kan gibi zayıf bazlarla temas ettiğinde hızla katılaşılan sentetik yapıştırıcılardır. Diğer doku yapıştırıcılarla karşılaştırıldıklarında, daha hızlı polimerleşmeleri ve mekanik dayanımlarının yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedirler [83]. Siyanoakrilatlar, Dermabond, Glubran ve Glubran 2 ticari isimleriyle piyasada yer almaktadırlar. Dermabond ismiyle satılan 2-oktil siyanoakrilat, eksternal ve cerrahi yaraların kapatılmasında kullanılmaktadır. Glubran, etil-2-siyanoakrilat, butil akrilat ve metakriloksi sulfolan yapısıdadır. Glubran 2 ise n-butil-2-siyanoakrilat ve metakriloksi sulfolan yapısındadır. Her ikisi de internal yaraların tedavisinde kullanılmaktadır [78]. N-butil-2-siyanoakrilat, bir monomer ilavesiyle değişime uğratılır ve 45°C'de bir ekzotermik polimerleşme meydana gelir. Bu polimerleşme sayesinde, yüksek çekme direnci gösteren dokular üzerinde hızlı bir şekilde ince film elde edilir [83]. N-butil-2-siyanoakrilat; nem, kan ve doku sıvıları gibi iyonik bileşenlerin varlığında 5-6 saniye içerisinde polimerleşmeye başlar ve polimerleşme 60 saniye içerisinde sonlanır. N-butil-2-siyanoakrilat zararsız ve kanserojen olmayan malzemeler sınıfındadır, biyolojik olarak absorbe edilemez ve yavaş bir şekilde bozunur. N-butil-2-siyanoakrilat; arteriyal embolizasyon, varis skleroterapisinde ve fistül onarımında kullanılır [84]. Siyanoakrilik yapıştırıcı, Glubran 2 ticari ismi ile VVF onarımında kullanılmaktadır [85-87].

2.3.2.3. Domuz ince bağırsak mukozası

İnce bağırsak mukozası, Surgisis ticari ismi ile fitik onarımında greft malzemesi kullanılmaktadır. Aselüler domuz ince bağırsak mukozası, etilen oksit ile sterilize edilerek kullanılmaktadır. Aselüler yapısı sayesinde immünojenik yanıtı neden olmamaktadır. Malzeme yapısında çapraz bağlar olmadığından mekanik özellikleri düşüktür ve bu nedenle malzeme vücuda yerleştirildikten sonra tamamen bozunmaktadır [88]. Surgisis, doku iskelesi ve greft malzemesi olarak ürolojide mesane ve VVF onarımında kullanılmaktadır. Surgisis, vücuda yerleştirildiği bölgede hücrelerin gelişimi için destekleyici bir ortam oluşturarak, yeni kan damarlarını oluşumunu destekleyerek doku onarımını sağlamaktadır [89].

2.3.2.4. Jelatin matriks

Jelatin matriks ve trombin bazlı hemostatik ajanlar piyasada FloSeal ticari ismi ile bulunmaktadır. Jelatin matriks, sığır kornea dokusundan elde edilen kollajenden üretilmektedir. Kollajen, gluteraldehit ile çapraz bağlanarak kullanılmaktadır. Trombin de sığırdan elde edilmekte ve liyofilize edildikten sonra kullanım öncesinde jelatin matriks ile karıştırılarak onarılması istenen bölgeye uygulanmaktadır. Trombin, fibrinojenin fibrine dönüşmesini destekler, fibrin ise yapının dayanıklılığını artırarak hemostatik özellik gösterir [77, 90]. FloSeal, hemostatik özelliği sayesinde VVF onarımında kullanılmaktadır.

2.3.2.5. Aselüler domuz dermal kollajen

Aselüler domuz dermal kollajen, Pelvicol ve Permacol ticari isimleri ile cerrahi onarım malzemesi olarak ürolojide kullanılmaktadırlar. Pelvicol, biyoyumlu, doğal ve esnek özellikte bir greft malzeme olmakla birlikte, onarımı istenen bölgedeki hücrelerin gelişimini desteklemektedir [91]. Pelvicol literatürde VVF onarımında doku interpozisyon flep olarak kullanılmaktadır [92-94].

2.3.2.6. Oksidize selüloz

Oksidize selüloz, Surgicel ticari ismi ile cerrahide hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. Surgicel, dokuda absorbe edilebilen, antibakteriyel özellikli [95] ve trombojenik özellik gösteren bir onarım malzemesidir [96]. Surgicel, α -selülozun alkali

çözümlenmesi ile elde edilir. α -selüloz, asit banyosunda, elyafa dönüştürülerek oksitlenir. Oksitlenmiş selüloz kan ile temas ettiğinde trombus oluşturur [97]. Sürgeci, VVF onarımında doku interpozisyon flep olarak kullanılmaktadır [98].

2.4. Vezikovajinal Fistül Tedavisinde Görülen Postoperatif Komplikasyonlar

VVF tedavisinde cerrahi işlem sonrasında postoperatif komplikasyonlar görülebilmektedir. VVF onarımında yaygın olarak görülen postoperatif komplikasyonlar enfeksiyon, kanama, donör saha morbiditesi, ağrı, işeme bozukluklarıdır [99]. Cerrahi komplikasyonların değerlendirilmesi için standardize edilmiş sınıflama ve derecelendirme sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerin kullanılması cerrahi sonuçların doğru yorumlanması ve sonuçların karşılaştırılması açısından önemlidir [100]. Literatürde beş adet sınıflandırma sistemi önerilmektedir. Güncel literatüre bakıldığında, Clavien-Dindo sınıflandırma sisteminin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu sistem ilk olarak 1992 yılında Clavien ve arkadaşları tarafından önerilmiştir, 2004 yılında ise Dindo ve arkadaşları tarafından önerilen değişikliklerle birlikte sınıflandırma sistemi bugün kullanıldığı halini almıştır [101].

2.5. Vezikovajinal Fistül Tedavisinden Kullanılan Doku İnterpozisyon Fleplerinin Klinik Değerlendirilmesi

Otolog ve sentetik doku interpozisyon fleplerinin klinikte kullanımına ilişkin sonuçlar tüm yönleriyle heterojenlik göstermekte olup çeşitli doğal ve sentetik malzemelerin başarı oranlarının karşılaştırılması ile ilgili literatürde yeterli bilgi bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu tez kapsamında öncelikle VVF onarımında kullanılan doku interpozisyon flepleri; cerrahi, biyomalzeme ve başarı oranları açısından klinik değerlendirilmesi yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatüre sunulmuştur [99].

VVF tedavisinin başarı oranının artırılması ve onarılan fistülün aynı yerde tekrar oluşumunun engellenmesi amacıyla, fistül bölgesinde otolog ve/veya sentetik doku interpozisyon fleplerinin kullanılması cerrahi literatürde önerilmektedir [44]. Doku interpozisyon fleplerinin fistül onarımındaki önemi fistülün bulunduğu yere ve fistül çevresindeki dokuların durumuna göre değişmektedir [102]. Elde edilen klinik sonuçlar, doku interpozisyon fleplerinin kanıt düzeylerinin düşük olduğunu göstermektedir.

Tekrarlayan ve büyük boyutlu fistüllerde, interpozisyon flep kullanımının onarımdaki pozitif etkisi açıkça görülmektedir [23]. Doku interpozisyon flepler, onarımda ek bir katman oluşturarak, fistül çevresindeki ölü boşluğu doldurmakta ve onarım bölgesinin altında meydana gelen hematoma riskini azaltmaktadır. Bölgeye kan akışı sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırdığı varsayılmaktadır [103]. Literatürde VVF tedavisinde otolog doku interpozisyon fleplerinin kullanımının sentetik interpozisyon fleplere kıyasla daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Otolog doku interpozisyon flepler, daha sıklıkla tercih edilmelerine ve başarı oranlarının yüksek olmasına rağmen kullanımlarında kısıtlamalar bulunmaktadır. Bu kısıtlamaların en önemlileri, otolog doku interpozisyon flep kullanımına bağlı olarak gelişen hematoma, ağrı, deformasyon gibi postoperatif komplikasyonlar ve cerrahi sürenin uzamasıdır. VVF tedavisinde sentetik interpozisyon fleplerinin tercih edilme sebepleri, donör saha morbiditesine neden olmamaları, kullanıma hazır durumda bulunmaları ve yan etkilerinin olmamasıdır [104].

Bu tez kapsamında OVID Medline ve PubMed veri tabanları kullanılarak literatür taraması yapılmıştır. Literatür taraması sonucunda, VVF onarımı için kullanılan otolog ve sentetik doku interpozisyon fleplerini ve tedavilerinde VVF onarımı olan hastaların objektif ve/veya açık bir şekilde tanımlanmış sonuçları incelenmiştir. Literatür taramasında, incelenen çalışmaların özellikleri, fistül boyutu ve yeri, kullanılan cerrahi yaklaşım, idrar kaçırma ve iyileşme durumları ile ilgili veriler incelenmiştir.

Literatür taramasında, belirlenen dahil etme kriterleri; vaka bildirimleri, VVF teşhisi koyulmuş hastalar, VVF tedavisinde doku interpozisyon flep kullanılan hastalar, hasta sayısı 10'dan fazla olan vaka raporları, tedavi sonuçları objektif ve açık bir biçimde ifade edilen vaka raporları şeklindedir. Dahil etme kriterlerini karşılayan 25 çalışma incelenmiştir. Bu 25 çalışmada, toplamda otolog doku interpozisyon flepler 943 hastaya, sentetik doku interpozisyon flepler ise 127 hastaya uygulanmıştır. Literatür taramasına dahil edilen yayınlar; çalışmaların karakteristikleri, makalelerin metodolojileri (retrospektif, prospektif, randomize), cerrahi başarı oranları, her vaka için uygulanan takip süreleri, hastaların preoperatif radyasyon öyküleri, çalışmaların kontrol grubu varlığı, tercih edilen cerrahi yaklaşım, kullanılan doku interpozisyon flep çeşitleri, fistül karakteristikleri, preoperatif ve postoperatif değerlendirmeler, sonuç değerlendirmeleri ve vakaların ülkelere göre olan dağılımları açısından incelenmiş ve sonuçlar

değerlendirilmiştir. VVF onarımında kullanılan sentetik doku interpozisyon flepleri, malzeme özellikleriyle birlikte Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. VVF onarımında kullanılan sentetik doku interpozisyon fleplerin özellikleri.

Flepler/ Köken/Form	Ticari İsmi	Malzeme İçeriği	Malzeme Özellikleri	Malzeme Nitelikleri	Biyouyumluluk /Biyobozunur/ Absorpsiyon	Kullanım Alanı
Fibrin Yapıştırıcı/ Biyolojik/Jel	Tisseel, Beriplas t-p	İnsan fibrinojen	Hemostatik doku yapıştırıcı	Yara direnajını azaltır	Biyouyumlu, biyobozunur, absorbe edilebilir	Yara yüzeyine uygulanır
İnce bağırsak mukozası/ Doğal/ Tabaka	Surgisis	Aselüler domuz ince bağırsak mukozası	Biyoaktif doku iskelesi	Hücreler için doku iskelesi	Biyouyumlu, biyobozunur, absorbe edilemeyen	Dokulara destek sağlar
Siyanoakrilik Yapıştırıcı/ Sentetik/ Jel	Trufill, Glubran 2Endocr yl	n-butil-2- siyanoakrilat	Hemostatik doku yapıştırıcı	Doku yapıştırıcısı	Biyouyumlu, biyobozunur, absorbe edilemeyen	Arteriyal embolizasyon, skleroterapi, fistül onarımı
Aselüler Kollajen Matriks/ Doğal/ Tabaka	Permaco 1 (Pelvico 1)	Aselüler çapraz bağlanmış domuz dermal kollajen	Biyoaktif doku iskelesi	Hücreler için doku iskelesi	Biyouyumlu, biyobozunur olmayan, absorbe edilemeyen	Cerrahi işlemde yumuşak dokulara destek sağlar
Oksidize Selüloz/ Doğal/ Gazlı bez benzeri	Surgicel	α -selüloz	Hemostatik trombojenik	Kanamayı durdurucu	Biyouyumlu, biyobozunur, absorbe edilebilir	Kanamayı kontrol eder
Jelatin Matriks/ Doğal/ Sıvı	FloSeal	Çapraz bağlanmış sığır jelatin ve insan trombin	Hemostatik	Kanamayı durdurucu	Biyouyumlu, biyobozunur, absorbe edilebilir	Kanamayı kontrol eder

Literatür taramasında incelenen toplam 25 çalışmanın karakteristik özellikleri incelendiğinde, VVF onarımında on farklı olog doku interpozisyon flepi (Martius, omental, peritoneal, urakal, abdominis kası, gracilis kası, ileal segment, mesane duvarı, rotasyonel mesane ve singapore fasiyokütan flepleri) ve altı farklı sentetik doku interpozisyon flepinin (fibrin yapıştırıcı, siyanoarklik yapıştırıcı, ince bağırsak mukozası, aselüler kollajen matriks, oksidize selüloz, jelatin matriks) kullanıldığı görüldü. Tüm yayınlar, çalışmada yer alan hasta sayılarına göre; hasta sayısı <10, hasta sayısı 10-50, hasta sayısı >10 olmak üzere üç ana grup altında incelendi. Literatür taramasında incelenen flepler ve bu fleplerin kullanıldığı hasta sayılarına ait bilgiler Çizelge 2.2’de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Literatür taramasında incelenen doku interpozisyon flepleri ve bu fleplerin kullanıldığı hasta sayıları [99].

		Hasta Sayısı <10	Hasta Sayısı 10-50	Hasta Sayısı >10
Otolog Doku İnterpozisyon Flepleri	Martius Flep	16	10	2
	Omental Flep	21	5	-
	Peritoneal Flep	3	5	1
	Abdominis Kası Flepi	5	-	-
	Diğer Otolog Flepler*	5	7	1
Sentetik Doku İnterpozisyon Flepleri	Fibrin Yapıştırıcı	7	3	-
	Siyanoakrilik Yapıştırıcı	3	-	-
	Aselüler Kollajen Matriks	3	-	-
	Oksidize Selüloz	1	-	-
	İnce bağırsak mukozası	-	1	-
TOPLAM		64	31	4

*Gracilis kası flepi, Rotasyonel mesane flepi, Singapore fasiyokütan flep, Urakal flep, İleal segment flep.

İncelenen 25 çalışmada, toplamda otolog doku interpozisyon flepler 943 hastaya, sentetik doku interpozisyon flepler ise 127 hastaya uygulanmıştır. En fazla kullanılan otolog doku interpozisyon flepin Martius flep, sentetik doku interpozisyon flepin ise fibrin yapıştırıcı olduğu tespit edilmiştir. Dahil edilen çalışmalar makale metodolojiler açısından incelendiklerinde; üç makalenin prospektif randomize kontrollü çalışma olduğu, iki tanesinin prospektif olduğu ve kalan on sekiz makalenin ise retrospektif vaka serisi olduğu görülmüştür. İncelenen çalışmalardan beş tanesinde kontrol grubu yer alırken, on beş çalışmada kontrol grubu yer almamaktadır. Üç çalışmada doku interpozisyon flepler, diğer cerrahi alternatiflerle karşılaştırılmıştır. Makalelerde tercih edilen cerrahi yaklaşımlar incelendiğinde, dokuz çalışmada transvajinal, dokuz çalışmada transabdominal, iki çalışmada hem transvajinal hem de transabdominal, bir çalışmada transperitoneal ve iki çalışmada transvajinal enjeksiyon yaklaşımlarının tercih edildiği görülmüştür. Dahil edilen tüm çalışmalar incelendiğinde, VVF onarımından sonra takip sürelerinin 3 ay ve 66 ay arasında değiştiği görülmüştür. İncelenen çalışmaların karakteristik özellikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Literatür taramasında incelenen çalışmaların karakteristik özellikleri [99].

Flep	Hasta sayısı (n)	Çalışma metodu	Kontrol grubu	Cerrahi yaklaşım	Takip süresi (ay)	Kaynaklar
Martius	64	Prospektif Randomize	-	Transvajinal	3	Shaker-2011 [105]*
Martius	216	Retrospektif	+	Transvajinal [#]	-	Pushkar-2008 [106]
Martius	57	Retrospektif	+	Transvajinal	-	Steg-1983 [107]
Martius	46	Retrospektif	+	Transvajinal	6-66	Rangnekar-2000 [48]
Martius	43	Retrospektif	-	Transvajinal	38,4	Malde-2017 [108]
Martius	37	Retrospektif	-	Transvajinal	4-42	Singh-2010 [109]
Martius	32	Retrospektif	-	Transvajinal	4-12	Warner-2019 [110]
Omental	69	Prospektif Randomize	+	Transabdominal	39,6	Singh-2019 [111]
Omental	34	Retrospektif	+	Transabdominal	-	Oakley-2014 [112]
Omental	30	Retrospektif	-	Transabdominal	-	Milicevic-2013 [113]
Omental	28	Retrospektif	-	Transabdominal	24	Singh-2013 [114]
Peritoneal	83	Retrospektif	-	Transabdominal	-	Eilber-2003 [115]
Peritoneal	36	Retrospektif	-	Transabdominal	6	Tewary-2020 [116]
Peritoneal	29	Retrospektif	-	Transabdominal	-	Eisen-1974 [117]
Peritoneal	24	Retrospektif	-	Transvajinal	24	Raz-1993 [53]
Gracilis Kas	13	Retrospektif	Direkt karşılaştırma yok	Transabdominal Transvajinal	6	Ezzat-2009 [118]
Singapore Fasiyokütan	69	Retrospektif	Direkt karşılaştırma yok	Transvajinal	-	Pope-2020 [119]
Singapore Fasiyokütan	26	Retrospektif	Direkt karşılaştırma yok	Transabdominal Transvajinal	12	Maljaars-2021 [120]
Rotasyonel Mesane	18	Retrospektif	-	Transperitoneal	20	Chen-2016 [69]
Rotasyonel Mesane	10	Retrospektif	-	Transabdominal	6--30	Sharifiaghdas-2012 [121]
Urakal	13	Retrospektif	-	Transabdominal	6	James-2013 [63]
Fibrin Yapıştırıcı	38	Prospektif Randomize	Direkt karşılaştırma yok	Transvajinal enjeksiyon	3	Safan-2009 [122]
Fibrin Yapıştırıcı	12	Prospektif	-	Transvajinal enjeksiyon	6	Shirvan-2013 [123]
Fibrin Yapıştırıcı	20	Retrospektif	Direkt karşılaştırma yok	Transvajinal enjeksiyon	3	Choudhury-2021 [124]
İnce bağırsak mukozası	23	Prospektif	-	Transabdominal Transvajinal	6	Farahat-2012 [89]

*%97,2 Transvajinal

İncelenen çalışmalarda tedavi edilen fistüller; boyutları, yerleşim yerleri karmaşıklık durumları, etiyojileri ve preoperatif radyasyon öyküleri açısından incelendiklerinde oldukça değişkenlik gösterdikleri görülmüştür. Fistül boyutu, on dört çalışmada çeşitli

boyutlarda, yedi çalışmada <1,5 cm ve iki çalışmada >3 cm boyutlarındadır. Otolog doku interpozisyon flepler genellikle 1-7,5 cm büyüklüğündeki fistüllerin onarımında kullanılırken, sentetik doku interpozisyon flepleri 5 mm-2,5 cm boyutlarındaki fistüllerin onarımında kullanılmıştır. Fistüller karmaşıklık durumu açısından incelendiklerinde, altı çalışmada yer alan fistüllerin primer fistüller olduğu, diğerlerinin ise çeşitli fistüllerden oldukları görülmüştür. Çalışmaların etiyojileri incelendiğinde, on dört çalışmanın jinekolojik kökenli, beş çalışmanın obstetrik kökenli, iki çalışmanın hem jinekolojik hem de obstetrik kökenli, iki çalışmanın ise kökenlerinin belirtilmediği görülmüştür. Fistül yerleşimleri yalnızca üç çalışmada, posteriyor mesane duvarı, supratrigonal ve mesane boynunda olduğu açık şekilde bildirilmekle birlikte on üç çalışmada fistül yerleşimleri açıkça belirtilmediğinden çeşitli yerlerde oldukları saptanmıştır. Yedi çalışmada ise fistül yerleşimleri belirtilmemiştir. Çalışmalar, preoperatif radyasyon öyküleri açısından incelendiğinde, on bir çalışmada tedavi edilen fistüllerin radyasyon ilintili fistüller olduğu, on bir çalışmanın radyasyon ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Bir çalışmada preoperatif radyasyon öyküsünden bahsedilmemektedir. Fistül karakteristikleri, çalışma sayıları ile birlikte Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çalışmalarda preoperatif hasta değerlendirmeleri sekiz farklı tanı yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemler arasında en çok kullanılan sistoskopi olmakla birlikte en az tercih edilen yöntem metilen mavisi testidir. Preoperatif değerlendirme amacıyla kullanılan diğer testler, intravenöz ürografi (IVU), bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), vezikoüreteral reflüks (VUD), işeme sistoüretrogram (VCUG) ve ürodinamidir. Preoperatif tanı yöntemleri, kullanıldıkları çalışma sayılarıyla birlikte Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. İncelenen çalışmalarda tedavi edilen fistül karakteristiklerinin dağılımı [99].

Fistül Karakteristikleri		Çalışma Sayısı	Hasta sayı* (n)
Fistül Boyutu	<1,5 cm	7	28
	>3 cm	3	12
	Çeşitli	15	60
Karmaşıklık Durumu	Primer	7	28
	Çeşitli	18	72
Etiyoloji	Obstetrik	7	28
	Jinekolojik	14	56
	Obstetrik/ Jinekolojik	1	8
	Belirtilmemiş	3	12
Fistülün Bulunduğu Yer	Posteriyör Mesane Duvarı/ Supratrigonal	2	8
	Mesane boynu	1	4
	Çeşitli	15	60
	Belirtilmemiş	7	28
Preoperatif Radyoterapi Öyküsü	Evet	12	48
	Hayır	12	48
	Belirtilmemiş	1	4

*Çalışmalarda tanımlanan fistül karakteristiklerinin boyut, karmaşıklık durumu, etiyoloji, fistülün bulunduğu yer ve preoperatif radyoterapi öyküsü açılarından heterojen olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.5. VVF'nin preoperatif değerlendirmesinde kullanılan tanı testleri ve çalışma sayıları [99].

Tanı Testleri	Yayın Sayısı (n)
Sistoskopi	16
IVU ¹	10
CT/MRI ²	5
VUD/VCUG/Ürodinami ³	3
Metilen mavisi boya testi	2
Belirtilmemiş	5

¹IVU- İntravenöz Ürografi

²CT/MRI-Bilgisayarlı tomografi/manyetik rezonans görüntüleme

³VUD/VCUG- Video ürodinami/İşeme Sistoüretrografisi

Postoperatif sonuç değerlendirmelerinin büyük bir kısmı semptomatik değerlendirmeye dayanmaktadır. Fiziksel muayene, sistogram ve metilen mavisi testi en fazla tercih edilen yöntemlerdir. Yedi çalışmada, postoperatif sonuç değerlendirmeleri ile ilgili veri yer almamaktadır. Postoperatif sonuç değerlendirme yöntemleri çalışma sayılarıyla birlikte Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Postoperatif sonuç değerlendirme yöntemleri ve çalışma sayıları [99].

Değerlendirme Yöntemleri	Çalışma Sayıları (n)
Semptomatik	10
Fiziksel Muayene	6
Sistogram	6
Metilen mavisi testi	4
Belirtilmemiş	8

VVF onarımlarının cerrahi başarı oranları değerlendirildiğinde, oranların %53,8 ve 100 arasında dağıldığı görülmektedir. İncelenen çalışmalardan beş tanesinde cerrahi başarı oranları, birincil ve ikincil operasyonlar olarak ayrı ayrı belirtilmiştir. On bir çalışmada ise başarı oranları her bir grup için tek olarak verilmiştir. VVF onarımında cerrahi başarı oranları her bir çalışma için ayrı ayrı Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Tüm çalışmalarda postoperatif komplikasyonlar enfeksiyon, kanama, donör saha morbiditesi, ağrı, işeme bozuklukları ve diğer komplikasyonlar olarak sınıflandırılmıştır. En yaygın görülen postoperatif komplikasyon enfeksiyon ve işeme bozukluklarıdır. Dört çalışmada postoperatif komplikasyon görülmemiştir. Clavien-Dindo sınıflandırması ile standardize edilen postoperatif komplikasyonlar yalnızca üç çalışmada belirtilmiştir. Postoperatif komplikasyonlar Çizelge 2.8.'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. İncelenen çalışmaların VVF onarımında cerrahi başarı [99].

Çalışmalar	Otolog Flepler																				Sentetik Flepler				
	Milicevic 2013	Warner 2019	Rangnekar 2000	Singh 2019	Shaker 2011	Eilber 2003	Ezzat 2009	Pope 2020	Małjaars 2021	Pushkar 2008	Steg 1983	Singh 2010	Maide 2017	Singh 2013	Tewary 2020	Eisen 1974	Raz 1993	Chen 2016	James 2013	Sharifiagh das 2012	Safan 2009	Choudhury 2021	Oakley 2014	Shurvan 2013	Farahat 2012
Genel Başarı (%)	83.3	100	95.2	96.0	67.6 ve 75*	96	88	68.4	53.8	80.4	90.9	100	95	100	97.2	>90	82	92	92	90	90	100	83.1	100	91.3
İlk onarımdan sonraki başarı (%)	75	89	-	-	-	-	-	-	-	48.1	70	80.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İkinci onarımdan sonraki başarı (%)	40	-	-	-	-	-	-	-	-	39.8	93	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Her bir grup için ayrı olarak verilen başarı	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır

*genel başarı oranı tüm grup için belirtilmemiş

Çizelge 2.8. VVF tedavisinde görülen postoperatif komplikasyonlar [99].

Flepler	Çalışmalar	Komplikasyonlar							
		Enfeksiyon	Kanama	Cerrahi alan	Ağrı	İşeme bozuklukları	Diğer	Yok	Belirtilmemiş
Martius Flep	Shaker 2011	+				+			
	Pushkar 2008								+
	Steg 1983						+		
	Rangnekar 2000					+			
	Malde 2017								+
	Singh 2010								+
	Warner 2019							+	
Omental Flep	Singh 2019*	+	+	+	+		+		
	Oakley 2014								+
	Milicevic 2013							+	
	Singh 2013								+
Peritoneal Flep	Eilber 2003							+	
	Tewary 2020**					+			
	Eisen 1974								+
	Raz 1993						+		
Gracilis Kası Flepi	Ezzat 2009	+							+
Singapore Fasiyoküta n Flep	Pope 2020	+		+					
	Maljaars 2021	+	+				+		
Rotasyonel Mesane Flepi	Chen 2016	+				+			
	Sharifiaghda s 2012	+				+	+		
Urakal Flep	James 2013***	+					+		
Fibrin Yapıştırıcı	Safan 2009								+
	Shirvan 2013							+	
	Choudhury 2021						+		
Small İntestinal Submukoza	Farahat 2012						+		

* Clavien-Dindo Sınıflandırması (Derece I-II-III)

** Clavien-Dindo Sınıflandırması (Derece I-II)

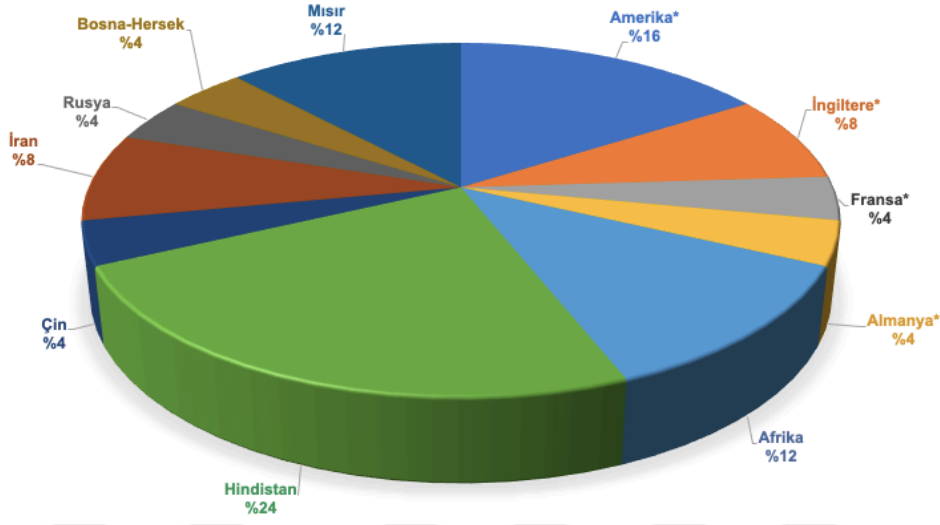
*** Clavien-Dindo Sınıflandırması (Derece I-II-III-IV)

VVF görülme sıklığı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Ekonomik Kalkınma ve İş birliği Örgütü (OECD)'nin verilerine göre, incelenen çalışmaların sekiz tanesi OECD üyesi ülkelere ait iken (%32), bu çalışmaların on yedi tanesi (%68) OECD üyesi olmayan ülkelere aittir. Veriler hasta sayısı bazında incelendiğinde, OECD üyesi ülkelerdeki toplam hasta sayısının 315, OECD üyesi olmayan ülkelerdeki toplam hasta sayısının ise 755 olduğu tespit edilmiştir. Fistüller etiyojik açıdan ülkeler baz alınarak incelendiklerinde, OECD üyesi ülkelerde jinekolojik kökenli fistüller görülürken, OECD üyesi olmayan ülkelerde görülen fistüllerin nedenlerinin hem jinekolojik hem de obstetrik olduğu görülmüştür. OECD üyesi ülkelerin, VVF onarımında başarı oranı ortalaması %91,1 iken, OECD üyesi olmayan ülkelerdeki başarı oranı ortalamasının 88,2 olduğu görülmüştür. Literatürde incelenen çalışmaların ait olduğu ülkeler çalışma sayılarıyla birlikte çizelgede Çizelge 2.9'da verilmiştir. İncelenen çalışmalardaki vakaların ülkelere göre % dağılımı Şekil 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.9. İncelenen çalışmaların ait olduğu ülkeler [99].

Ülke	Çalışma Sayıları (n)
Amerika Birleşik Devletleri*	4
İngiltere*	2
Fransa*	1
Almanya*	1
Hindistan	6
Mısır	3
Afrika	3
İran	2
Çin	1
Rusya	1
Bosna-Hersek	1

*OECD üyesi ülkeler



Şekil 2.4. İncelenen çalışmalardaki vakaların ülkelere göre dağılımı (%) [99].

VVF onarımında kullanılan doku interpozisyon flepleri karakteristik özellikler ve cerrahi açılardan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler neticesinde, otolog fleplerin cerrahide sentetik fleplere kıyasla daha yaygın olarak kullanıldıkları görüldü. Literatürde, bildirilen başarı oranlarının ise hem otolog hem de sentetik flepler için oldukça yüksek olduğu saptandı fakat bu çalışmaların büyük bir kısmının küçük hasta gruplarının dahil edildiği, prospektif veya retrospektif kohort çalışmaları oldukları saptandı. Bu nedenle çalışmalar metodolojik olarak sınırlı ve bulgular açısından heterojen bir yapı göstermektedirler. Postoperatif komplikasyonlara ait olan veriler incelendiğinde, çalışmaların büyük bir kısmında komplikasyonların standardize biçimde değerlendirilmediği görülmektedir. Bu nedenle de doku interpozisyon fleplerinin etkinlikleri ve güvenilirlikleri hakkında kanıta dayalı yorum yapılamamaktadır.

Doku interpozisyon fleplerinin etkinliklerini değerlendiren klinik çalışmaların kanıt düzeyleri genel olarak düşüktür. VVF tedavisine ilişkin cerrahi literatürdeki metodolojik zayıflık, tedavinin kanıta dayalı yönetimi konusunda belirsizliklere neden olmaktadır. Bu belirsizliklerin ortadan kaldırılması, VVF tedavisi için geliştirilen yeni malzemelerin güçlü kanıtlarla literatüre sunulmasını sağlayabilir bunun için geliştirilen malzemelerin,

iyi tanımlanmış fistül özelliklerine sahip, prospektif, randomize kontrollü klinik çalışmalarda araştırılması gerekmektedir.

VVF onarımı için kullanılan sentetik doku interpozisyon flep olarak kullanılan malzemeler, doğal ekstraselüler matriksler ya da hemostatik ajanlardır. Bu flepler, VVF onarımı için özel olarak tasarlanmadıklarından, bölgenin iyileşme sürecine katkıları değerlendirildiğinde eksiklikler görülmektedir.

3. YARA İYİLEŞMESİ VE DOKU ONARIMINDA KULLANILAN BİYOMALZEMELER

3.1. Yara İyileşmesi

Yara, çeşitli sebeplerden dolayı canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması sonucu meydana gelmektedir. Yara iyileşmesi, zamana bağlı olarak yeni doku oluşumunu sağlayan, vücuttaki en karmaşık biyolojik mekanizmalardan biridir. Yara oluşumunun hemen ardından, çoklu biyolojik basamaklar birbirleriyle eş zamanlı olarak aktif hale gelerek bu süreci başlatırlar [125, 126]. Bu süreç, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar bütünüdür. Yara iyileşme süreci; hemostaz ve inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma olmak üzere başlıca üç aşamadan meydana gelir.

Hemostaz ve inflamasyon fazı: Yara oluşumunun hemen ardından, hücre membranlarından vazokonstriktör ajanlar olan, tromboksan A₂ ve prostaglandin 2- α hücre membranlarından salımı başlar. Bununla birlikte, trombositler kollajen ile temas ederek aktive olurlar ve pıhtı oluşumunu başlatarak kanamayı azaltırlar. Pıhtı içeriğinde, kollajen, platelet, trombin, fibronektin bulunur. Pıhtı oluşumu, inflamatuvar cevabın başlamasını sağlayan fazdır. Bu süreçte oluşan fibrin, yara alanına göç eden, nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler için doku iskelesi oluşturur. Buna ek olarak fibrin, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salımından sorumludur. Pıhtı oluşumundan sonra, kemotaktik faktörlerin etkisiyle, nötrofiller ve monositler yara bölgesine göç ederler. Nötrofiller, interlökinler (IL)-1, tümör nekrozis faktör (TNF)- α , dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β , platelet faktör-4 (PF4) ve bakteriyel ürünler, nötrofiller, salgıladıkları proteolitik enzimler sayesinde, bakterileri ve doku kalıntılarını

etkisiz hale getirirler. Yara bölgesine göç eden diğer hücreler ise makrofajlar ve lökositlerdir. Monositler, yara oluşumundan 48-96 saat içerisinde makrofajlara dönüşürler. Yara iyileşimi için oldukça önemli olan makrofajlar, yara oluşumundan 72 saat sonrasında bölgede en aktif olan hücrelerdir. Lökositler ise bu süreçte bakterilerin etkisiz hale getirilmesini sağlarlar. Makrofajlar, bakterilerin, ölü doku ve lökositlerin fagositozundan ve kollajenaz, IL'ler ve TNF gibi enzim ve sitokinlerin salgılanmasından sorumludur. Bu enzim ve sitokinler sayesinde fibroblastlar uyarılarak anjiyogenezin başlaması sağlanır. Fibroblastlar, oluşan yeni damarların çevresinde kollajen, proteoglikan ve fibronektin üretiminden sorumludur. Proteoglikanlar, kollajenlerin birbirine bağlanmasını ve yara bölgesinin daha esnek olmasını sağlarlar. Fibronektin ise, kollajen ve diğer hücrelerin bir arada durmasını sağlar [127, 128].

Proliferasyon fazı: Bu safhada, epitelizasyon, anjiyogenezis, granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen oluşumu meydana gelmektedir. Epitelizasyon yara iyileşmesinin erken evresinde oluşmaya başlar. Yaralanmada, doku kaybı meydana gelmediyse, epitelyal hücreler normal büyümelerine devam ederek epidermis hasarını 2-3 günde onarırlar. Ancak doku kaybı varsa epitelyal hücreler, yara kenarından başlayarak onarımı gerçekleştirirler. Anjiyogenezis, (TNF)- α tarafından kontrol edilir ve endotelyal hücre göçünü uyarır. Proliferatif safhanın son aşaması granülasyon dokusunun oluşumudur. Fibroblastlar çevre dokulardan yara bölgesine göç ederek aktifleşir, ardından kollajen sentezini başlatarak çoğalırlar. Trombosit ve makrofaj kaynaklı olan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve endotelyal büyüme faktörü (EGF) fibroblastlara ulaşan ana sinyallerdir. Fibroblastlar, makrofajlar tarafından salgılanan TGF- β 1 büyüme faktörünün uyarımı ile yara miyofibroblastlara dönüşür [127, 128].

Olgunlaşma ve yeniden modellenme: Proliferasyon safhasından hemen sonra başlayan ve bir yıl kadar sürebilen olgunlaşma safhasının, klinik olarak en önemli süreç olduğu düşünülmektedir ve bu süreçte, kollajen birikimi ve matriks oluşumu meydana gelir. Kollajen sentezi yara oluşumunun ardından 4-5 hafta kadar sürmektedir [127, 128]. Bu süreçte kollajen üretimi ve yıkımı dengelenir, kollajen matriksi dermiş tabakasına bağlanarak yeniden şekillenir ve kontraksiyonla birlikte yeni gelişen dokunun mekanik dayanımı artar. Oluşan kılcal damarlar gelişir, deri uzantıları (saç, yağ bezi, vb.) oluşur ve zamanla oluşan doku fonksiyonellik kazanır.

Akut yaralar yukarda bahsi geçen iyileşme süreçlerden geçerek iyileşirken kronik yaralar enflamasyon aşamasında durarak normal sürede iyileşme sürecinde kapanmazlar. Yara iyileşmesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunları lokal ve sistemik olmak üzere 2 sınıfa ayırabiliriz. Lokal faktörler, yara iyileşmesinde önemli bir yere sahiptir. Bunların başında iskemi, enfeksiyon, yabancı cisim varlığı, ödem, radyoterapi gelmektedir.

İskemi, lokal kan dolaşımının belirli bir bölge için geçici olarak azalması durumu olup yara iyileşmesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Yara bölgesine kan akışı ile glikoz ve oksijen taşınmaktadır. Yara iyileşmesi, enerji gerektiren bir süreçtir ve enerji kaynağı olarak, glikoz kullanılmaktadır. Adenozin trifosfat (ATP), glikoliz sonucu olarak elde edilmektedir. Proliferatif fazda, protein sentezi için oldukça fazla miktarda ATP gereksinimi olduğundan, kan akışı ile yeterli glikoz sağlanması, iyileşme sürecini hızlandırmaktadır. Nötrofil hücrelerinin aktivitelerinin düşük oksijen seviyelerinde azaldığı ve yara iyileşme sürecini olumsuz etkilediği de bilinmektedir.

Yara bölgesinde ve çevresinde enfeksiyon oluşumu proliferasyon fazın uzamasına ve dolayısıyla yara iyileşmesinin gecikmesine neden olmaktadır. Enfeksiyon; epitelizasyonu, kollajen oluşumunu ve birikimini engellemektedir. Bakteri varlığı sonucu ortaya çıkan endotoksinler, fagositozu uyararak, kollajen yıkımına sebebiyet verirler. Doku hipoksisi ile ilintili kontaminasyon, makrofajlar tarafından düzenlenen proliferasyonu baskılayarak yara iyileşme sürecini engeller. Benzer şekilde yabancı cisim bulunması da epitelizasyonu engellemektedir. Yara çevresindeki ölü dokular da yabancı cisim olarak kabul edilmekte ve iyileşme sürecini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca yara bölgesinde oluşan ödem, doku üzerindeki basıncı artırarak iskemiye neden olur ve inflamatuvar cevabın gecikmesine yol açmaktadır. Bu durum yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Radyoterapi, fibroblast proliferasyonunu, göçünü, birikimini yavaşlatmakta ve bunlara ek olarak akut inflamatuvar cevabın gecikmesine ve granülasyonun bozulmasına neden olmaktadır. Tüm bu süreçlerdeki aksamalar yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Radyoterapi, serbest radikaller nedeniyle doğrudan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) hasarlarına sebep olduğu için kollajen sentezinde gecikmeler görülmektedir.

Sistemik faktörler arasında ise yaş, hipotermi, ağrı ve sepsis sayılabilir. İleri yaşlarda azalan ECM ve protein üretimi, büyüme faktörlerinin yetersizliği gibi nedenler yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu faktörlerin yanında ileri yaşlarda ortaya çıkan kronik hastalıkların da iyileşme süreci üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Hipotermi, vazokonstrüksiyonu tetikleyen kutanöz perfüzyon üzerinde etkilidir. Bu nedenle yara çevresinin ısısının sabit tutulması gerekmektedir. Ağrılı uyarılar, adrenerjik deşarja neden olarak vazokonstrüksiyon meydana getirirler. Vazokonstrüksiyon, yara ve çevresindeki kan akışını etkileyerek, yara iyileşmesinin gecikmesine yol açmaktadır.

Lökosit aktivitesinde ve inflamatuvar cevapta meydana gelen düzensizlikler yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır. Sepsis, trombosit aktivitesinde azalma meydana getirerek pıhtı oluşumunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Yetersiz beslenme, hormon üretiminde bozukluklar, immün ve hematolojik etkiler, sitotoksik, antimetabolik ve steroid ilaç kullanımları sepsis şüphesini artırarak yara iyileşmesinde aksamalar meydana getirmektedir. Bunlara ek olarak, hipotroid, diyabet gibi hastalıkların varlığı ve organ yetmezlikleri de yara iyileşimini olumsuz etkileyen sistemik faktörlerdendir. Cutis laxa, ehlers-danlos sendromu, homosistinüri, osteogenesis imperfekta gibi genetik hastalıkların da yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir [125-128].

3.2. Doku Onarımında Kullanılan Biyomalzemeler

Günümüze yaranın çeşidine ve enfeksiyon durumuna bağlı olarak yara bölgesini çevresel faktörlerden korumak, enfeksiyonu önlemek, nemli tutmak ve doku onarımını sağlamak için farklı formlarda (film, köpük, sünger, hidrokolloid, hidrojel, fiber vb.) birçok biyomalzeme kullanılmaktadır. Doku onarımına yönelik kullanılan biyomalzemeler arasında en yaygın kullanımda olanlar doğal ve sentetik polimerler, aselüler matriksler ve hibrid malzemelerdir [129]. Bunların kullanımı hedeflenen bölge göz önüne alınarak biyolojik, kimyasal ve biyomekanik özelliklerine göre tercih edilmektedirler.

Doğal polimerler, canlı organizmalar tarafından üretilen polimerler olarak tanımlanmaktadır. Kollajen, laminin, elastin ve fibronektin gibi yapısal proteinlerdir. Kollajen, memeli hücrelerinde en fazla bulunan ECM elemanı olduğu için doku onarımında sıklıkla tercih edilmektedir. Hyalüronik asit, dekstran, aljinat, kitosan gibi karbonhidrat bazlı doğal polimerler ise benzer şekilde yaygın olarak kullanılan doğal polimerler arasındadır. Eşsiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, ipek fibroin de sıklıkla tercih edilen doğal polimerlerdir [129].

Sentetik polimerler, tekrar eden monomerlerin kovalent bağlanarak büyük molekül ağırlıklı makromolekülleri meydana getirmesi sonucunda oluşur. Özellikle biyobozunur polimerlerin mekanik özelliklerinin ve bozunma kinetiklerinin kontrol edilebilir olması nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında ve doku onarımında oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL) gibi polimerler, literatürde yaygın olarak kullanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir.

Sentetik polimerlerin biyomedikal uygulamalarda tercih edilmelerinin nedeni kolay şekil alma, mekanik dayanıma sahip olma ve esnekliktir. Doğal polimerler ise biyouyumlu olmaları, biyobozunur olmaları ve bozunma ürünlerinin canlı organizmalarda toksik etki yaratmaması nedeniyle tercih edilmektedir. Doğal polimerlerin mekanik dayanımlarının düşük olması, sahip oldukları en büyük dezavantajdır. Bu nedenle doğal polimerler biyolojik özelliklerini kaybetmeden mekanik dayanımlarının artırılması için sentetik polimerler ile karışım halinde kullanılmaktadır [130].

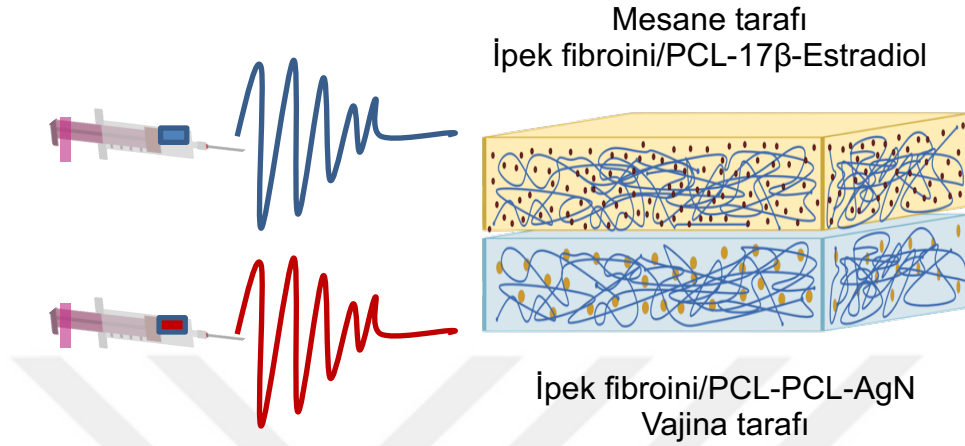
Dokuların deselülerize edilerek hücre içeriklerinin uzaklaştırılmasıyla elde edilen aselüler dokular doku iskelesi olarak ve biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Deselülerizasyon sonrasında elde edilen matriks, doğal dokuya olan biyolojik, yapısal ve biyomekanik benzerlikleri nedeniyle ideal bir doku iskelesi özelliklerini taşımaktadır. Deselülerizasyon işlemi sonrasında yapıda kalan kollajen, fibronektin, glikozaminoglikan (GAG), laminin ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküller yeni hücrelerin büyümesi için zengin bir ortam sağlamaktadırlar. Literatürde sıklıkla kullanılan aselüler matriks ince bağırsak mukozası, cerrahi işlemlerde pek çok alanda kullanılmaktadır [129].

4. TEZİN AMACI

VVF tedavisinde kullanılan otolog ve sentetik doku interpozisyon fleplerinin klinik olarak değerlendirilmesi sonucunda, hastanın fizyolojisine, fistülün büyüklüğüne ve fistülün konumuna bağlı olarak pek çok kısıtlamanın var olduğu tespit edilmiştir. Hastanın fizyolojisi, otolog doku interpozisyon fleplerinin elde edilmesi için uygun olmadığı durumda fistül onarımı bu fleplerle yapılamamaktadır. Buna ek olarak, otolog interpozisyon fleplerinin elde edilmesi, ikinci bir cerrahi işlem ve yara iyileşmesi gerektirdiğinden dezavantaj sağlamaktadır. Otolog doku interpozisyon fleplerinin kullanımının mümkün olmadığı durumlarda doğal ya da sentetik interpozisyon flepleri kullanılmakla birlikte bu fleplerinin hiçbirisi VVF tedavisi için özel olarak tasarlanmamıştır. Bu tez kapsamında VVF onarımında kullanılan doku interpozisyon flepleri; cerrahi, biyomalzeme ve başarı oranları açısından klinik değerlendirilmesi yapılmış ve elde edilen sonuçlar derlenerek yayınlanmıştır [99]. Bu değerlendirmeye göre otolog ve sentetik doku interpozisyon fleplerin tedavide başarı oranı açısından önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak fleplerin klinik sonuçlarının tüm yönleriyle heterojenlik göstermesi olduğu değerlendirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında doku interpozisyon fleplerinin, pro-anjiogenik özellik göstererek mesanedeki açıklığı kapatması ve doku iyileşmesini destekler özellikte olması ve aynı zamanda doku çevresinin enfekte olmasını engellemek amacıyla antibakteriyel özellikte olmasının klinik ihtiyacı karşılayacağı değerlendirilmiştir. Mesane, steril bir yapıya sahip olmasına karşın, vajina yapısı bakteriyel ve fungal flora açısından oldukça zengindir. Bu nedenle, sentetik interpozisyon fleplerinin, yara etrafındaki bakteriyel ve fungal enfeksiyonların oluşumunu engeller nitelikte olması gerekmektedir. Ayrıca yara iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla, interpozisyon fleplerinin pro-anjiyogenik özellikte olması klinikte tercih edilmektedir. Bu gereksinimler dikkate alınarak klinik ihtiyacı karşılamak için bu tez kapsamında, VVF tedavisinde kullanılmak üzere pro-anjiogenik ve antibakteriyel özelliklere sahip 2 katmanlı doku interpozisyon flep eşleşiminin tasarımı ve geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ipek fibroin (Fib) ve polikaprolakton (PCL) içeren fiberler elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesi planlanmıştır. Fib/PCL fiberlerin birinci katmanının pro-anjiogenik özellik gösteren estradiol (E2) içermesi planlanmıştır (Şekil 4.1). Fiberlere pro-anjiogenik faktör olarak eklenen E2'nin kısa dönemde anjiyogenezi uyarak mesane ve vajina arasındaki dokunun onarılması

hedeflenmektedir. Üretilen fiberlerin ikinci katmanında ise gümüş nanopartiküllerin (AgNP) varlığı ile mesane ve vajina çevresindeki olası enfeksiyonun önlenmesi hedeflenmiştir.



Şekil 4.1. Pro-angiogenik ve antibakteriyel özelliklere sahip 2 katmanlı doku interpozisyon flep eşleniğinin şematik gösterimi.

İnterpozisyon flep eşleniğinin fiber yapıda olması tercih edilmiştir. Fiberler, doku mühendisliğinde ve yara iyileşmesinde sıklıkla kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen, gözenekli biyomalzemelerdir. Fiberlerin üç boyutlu gözenekli yapıları, ECM'nin doğal yapısına benzerlik gösterdiğinden hücre tutunmasına, epitelizasyona ve anjiyogeneze olanak sağlar. Aynı zamanda gözenekleri yapıları sayesinde oksijen geçirgenliğine olanak sağlarlar.

Fiber yapıların üretilmesinde ipek fibroini ve PCL polimerlerinin kullanılması planlanmıştır. Tekstil endüstrisinde eski çağlardan beri kullanılan ipek, son yıllarda biyomalzeme olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Jel, sünger, film ve fiber formlarında elde edilebilen ipek biyomalzemeler doku mühendisliği alanında kullanılmaktadır. Fibroin ipek böceğinin ürettiği salgıdan elde edilen, protein yapıda doğal bir polimerdir. Yüzlerce türü olan ipekböceğinin, *Bombycoidea* familyası ticari açıdan önemlidir. *Bombyx mori* türü, tamamen evcilleştirilmiş bir türdür ve bu nedenle doğal yaşamda yer almamaktadır. İpek böceğinin salgı bezlerinde yer alan ipek, bezlerden salgılanır ve hava etkisiyle iplik haline dönüşerek böceğin etrafında birikerek koza oluşturur. Koza yapısının %72-81'lik kısmı fibroin proteininden, %19-28'lik kısmı ise serisin

proteininden meydana gelmektedir. Hidrofobik bir glikoprotein olan fibroin suda çözünmez. Fibroin; amorf ve kristal olmak üzere bölgeler içeren bir proteindir. Fibroindeki kristal β -tabakaları oldukça düzenli olup yapıya mukavemet ve kararlılık sağlarken, amorf bölgeler ise elastikiyet sağlamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı ipek fibroinin fiber üretiminde kullanılması planlanmıştır.

Diğer taraftan alifatik poliester ailesinden olan PCL ise hidrofobik, biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri sayesinde biyomedikal alanda sıklıkla tercih edilen bir polimerdir. Yarı kristalin yapıda olan PCL'in erime sıcaklığı 59-64°C arasındadır. Erime sıcaklığı, vücut sıcaklığının üzerinde olduğu için yapısındaki amorf bölgeler sayesinde vücut içerisinde elastik yapısını muhafaza eder [131]. Bunlara ek olarak, PCL'in bozunma özelliğinin ve mekanik özelliklerinin kontrol edilebilir olması, reolojik ve viskoelastik özelliklerinin biyomalzemeler için uygun olması ve PCL, PGA ve PDLA polimerlerine kıyasla daha yavaş bozunma hızına sahip olması ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanıldığında, 1 yıl boyunca bozunmadan işlevini yerine getirmesi gibi sebeplerden dolayı doku mühendisliği alanında geniş bir kullanım olanağına sahiptir [132]. Diğer alifatik polyesterler ile karşılaştırıldıklarında ucuz üretim yöntemlerine sahip olması ve FDA onaylı bir polimer olması da son yıllarda biyomalzeme alanında popülaritesinin artmasına neden olmuştur [133]. Literatürde özellikle kemik, kardiyovasküler, sinir ve deri doku mühendisliği alanlarında doku iskelesi olarak kullanılmaktadır [134].

Geliştirilmesi planlanan iki katmanlı fiber yapısının bir katmanına anjiyogenezi artırmak için östrojenin en baskın formu olan, 17- β estradiol'ün yüklenmesi (E2) tercih edilmiştir. E2 kadınlarda yetişkinlik döneminde yumurtalıklardan salgılanan ve üremeden sorumlu olan steroid hormondur. Yumurtalıklarda, foliküler granuloza ve teka hücrelerinin koordinasyonu, gonadotropinlerden salgılanan luteinize edici hormon ve folikül stimüle edici hormonun düzenlemesiyle sentez işlemi gerçekleşir.

Kadınlarda, lokal ya da sistemik östrojen seviyesinin, menopoz öncesi ve sonrasında gösterdiği farklılıklara dayanarak, östrojenin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Menopoz sonrası dönemde, hormon replasman tedavisi sonucunda hastalarda yara iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar, hastalarda yaştan bağımsız olarak yara üzerine topikal östrojen uygulamasının, kollajen

depolanmasını ve buna bağı olarak granülasyon dokusunun yoğunluğunu artırdığını göstermektedir. Östrojen uygulaması, elastaz enzim aktivitesini azaltarak kollajen ve fibronektin depolanmasını artırarak, yara iyileşme sürecini desteklediği bildirilmiştir [40, 135]. Yara iyileşmesinde majör olarak görev alan fibroblastlarda bulunan östrojen reseptörleri sayesinde, fibroblastların fonksiyonları da östrojen tarafından kontrol edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, yara iyileşmesine önemli katkıları olan TGF- β 1 büyüme faktörünün fibroblast hücrelerindeki miktarının östrojen miktarı ile doğru orantılı olduğu görülmüştür [136]. Diğer taraftan çalışmalarda E2'nin anjiyogenezi artırdığı kanıtlanmıştır. E2, anjiyogenezi düzenleyen bir sinyal protein olan, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nün üretimini düzenleyerek, anjiyogenezi artırmaktadır [137]. Aynı zamanda matriks metalloproteinaz inhibitörü olan E2, kollajen sentezini uyararak kollajen üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır [138, 139]. E2'nin vücuttaki seviyesi yaşa bağı olarak değişmekle birlikte normal menstrual döngüsündeki bir kadında 21-251 pikogram/mL aralığında değişmektedir [140].

Fiber yapısının ikinci katmanına ise AgNO₃ eklenerek antibakteriyel etkinin sağlanarak mesane ve vajina çevresindeki olası enfeksiyonun önlenmesi amaçlanmıştır. Formik asit içinde gümüş iyonlarının indirgenerek fiber yapısında gümüş nanopartiküllerin (AgNP) oluşması ve yapıdan salınarak antibakteriyel etki göstermesi beklenmektedir [141].

Bu bilimsel gerekçeler ışığında tez çalışması gerçekleştirilerek ileriki bölümde sonuçlar sunulmuş ve tartışılmıştır.

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

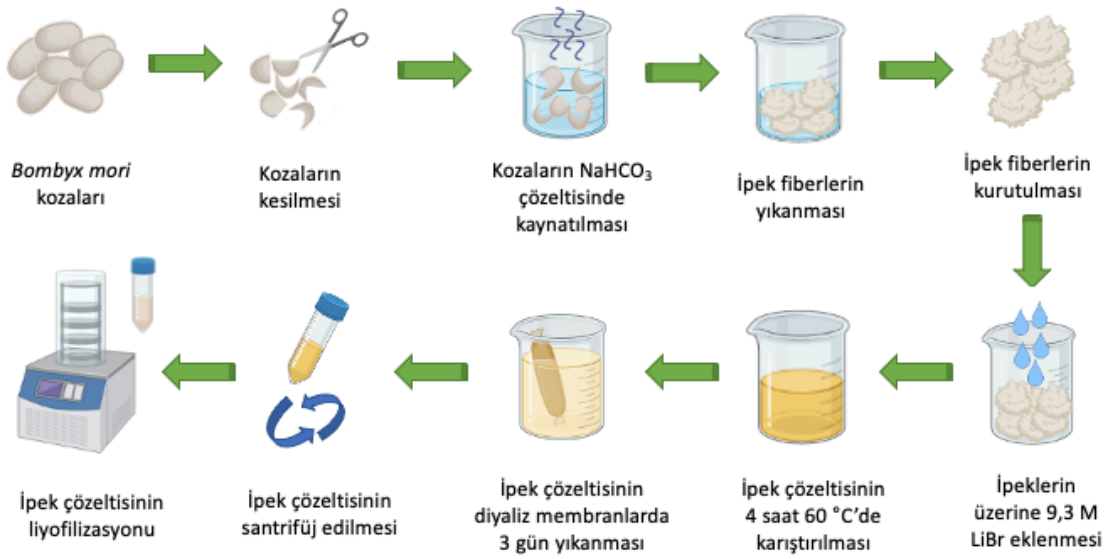
5.1. İpek Fibroin Eldesi

Bombyx mori kozası, Bursa Koza Birlik (Bursa)'ten temin edilmiştir. *Bombyx mori* kozaları kesilerek içerisinden ipek böcekleri çıkartılmıştır. Kozalar; %0,5 (w/v)'lik NaHCO₃ alkali çözeltisinde 100 °C'de 1 saat kaynatılarak serisin proteini ortamdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 5.1). Kaynama süresi bittikten sonra, ipek fibroin fiberler distile su ile yıkanarak 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan ipek fibroin çözeltisi elde edilmesi amacıyla 9,3 M LiBr çözeltisinde çözülmüştür. Çözelti içerisinde, ipek ve LiBr oranı 1:4 olacak şekilde hazırlanmıştır. LiBr çözeltisi, ekzotermik bir reaksiyon olduğu için, çözeltinin sıcaklığı 60 °C olarak ölçülmüştür. İpek fibroin çözeltisinin hazırlanması için reaksiyonun 60 °C'de 4 saat karıştırılarak gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu nedenle, ısıtıcılı manyetik karıştırıcının sıcaklığı 60 °C'de sabit tutulmuştur. Bu reaksiyonda, beher içerisine ipek fibroin ve LiBr çözeltisinin koyulması sırasında reaksiyonun verimi açısından önemli olduğu için, beher içerisine önce ipek fibroin fiberler yerleştirilmiş, ardından üzerine 60 °C'deki LiBr çözeltisi eklenmiştir. Çözelti, ipek fibroin fiberlerin homojen dağılması amacıyla karıştırılmıştır. 4 saatin sonunda, ipek fibroinin tamamen çözünerek amber rengini aldığı gözlemlenerek viskoz yapıda bir ipek fibroin çözeltisi elde edilmiştir.

Elde edilen ipek fibroin çözeltisi, safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz membranlara alınmıştır. Diyaliz membranlarda çözeltinin yıkanma süresi 4 gün olarak belirlenmiştir. Diyaliz membranlar kesilerek distile su dolu beherlerin içerisine alınmıştır. Daha sonrasında, şırınga içerisine alınan ipek fibroin çözeltisi, membranlara koyulmuştur.

İpek fibroin çözeltisi membranlara aktarıldıktan sonra, membranlar distile su dolu beher içerisine alınmıştır. Beher içerisindeki su, yıkama işlemi başladıktan 1 saat sonra ve 4 saat sonra değiştirilmiştir. Ardından 4 gün boyunca distile su, sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez değiştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından, ipek fibroin çözeltisi, kalan safsızlıkların da uzaklaştırılması amacıyla, santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüplerine alınan çözelti 9.000 rpm'de ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Eppendorf 5430 R

Almanya). İpek çözeltisi 4 °C’de 1 ay buzdolabında saklanabilmektedir. Elde edilen çözelti, uzun süre bozunmadan saklanabilmesi amacıyla liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon basamağı için ipek fibroin çözeltisi falkon tüplere alınarak -80 °C’de dondurulmuştur. Ardından liyofilizatöre alınan çözelti, çözücü tamamen uzaklaşana kadar (ortalama 3 gün) kurutulmuştur. Çözücüsü tamamen uzaklaşan ipek fibroinler, kuru bir ortamda muhafaza edilebilmektedir [142]. İpek böceği kozasından ipek fibroinin elde edilmesi şematik olarak Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. İpek böceği kozasından ipek fibroinin eldesinin aşamaları.

5.2. Elektro-eğirme Yöntemi ile Fibroin/PCL Fiberlerin Üretilmesi

Bu tez kapsamında, VVF tedavisinde kullanılmak üzere pro-anjiyogenik ve antibakteriyel özelliklere sahip 2 katmanlı doku interpozisyon flep eşleniklerinin elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesi planlanmıştır. Bu amaçla formik asit/asetik asit içinde hazırlanan %15’lik (w/v) ipek fibroin ve %20’lik (w/v) PCL çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak fibroin/PCL (Fib/PCL) fiberler üretilmiştir. Mesane ve vajina arasındaki doku onarımını indüklemek için fiberlerin ilk katmanına pro-anjiyogenik etkili estradiol (E2) eklenmiş ikinci katmana ise AgNO₃ eklenerek mesane ve vajina çevresindeki olası enfeksiyonun önlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan elektro-eğirme çözeltilerinin kompozisyonu Çizelge 5.1’de verilmiş olup yöntem aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Üretilen fiberlerin kompozisyonu.

Fiber	Fibroin çözeltilisi % (w/v)	PCL çözeltilisi % (w/v)	Fibroin/PCL orani (v/v)	Estradiol (E2) % (w/v)	AgNO₃ % (w/v)
Fib/PCL	15	20	1	-	-
E2Fib/PCL	15	20	1	1	-
Fib/PCL-Ag	15	20	1	-	1
E2Fib/PCL-Ag	15	20	1	1	1

Fiberlerin üretimi için İnovento-Ne300 Nanospinner marka elektro-eğirme cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla içerikleri Çizelge 5.1.'de verilen polimer çözeltileri hazırlanmış ve 12 mL polimer çözeltilisi şırıngaya konmuştur. Şırınga ucu ile toplayıcı mesafesi, akış hızı ve voltaj parametreleri için optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda boncuksuz ve homojen fiberlerin eldesi için akış hızı 500 µL/saat, 23 kV voltaj altında ve şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 13 cm olarak belirlenmiştir. Fiber üretimi döner ve sabit toplayıcı üzerinde gerçekleştirilmiş ve üretilen fiberlerin kalınlık karşılaştırılmıştır. Sabit toplayıcı ile üretilen fiberlerin daha yoğun olduğu görülmüş ve fiber üretiminde 13 cm çapındaki sabit toplayıcının kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca cihazın toplayıcı ünitesinin yatay olarak sağa sola hareket etmesi kontrol edilerek fiberlerin toplayıcının tüm yüzeyine eşit olarak dağılması sağlanmıştır. Sonuç olarak 12 mL polimer çözeltilisi kullanılarak 500 µL/saat akış hızı ile 23 kV voltaj altında ve şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 13 cm'de homojen fiberler elde edilmiştir. Polimer çözeltilerine E2 veya AgNO₃ eklenmesi fiber üretimindeki bu parametrelerde bir değişikliğe neden olmamıştır. Fiber üretimindeki ayrıntılar aşağıdaki bölümlerde sunulmuştur.

5.2.1. Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi

Liyofilize edilmiş ipek fibroin, formik asit/asetik asit (Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)) içinde çözülerek %15 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmıştır. PCL (Mw 80.000) (Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)), asetik asit (Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)) ve formik asit içerisinde 1:1 oranında çözülmüş ve %20'lik (w/v) PCL çözeltilisi hazırlanmıştır [143]. Daha sonra %15 ipek fibroin ve %20 PCL çözeltilisi 1:1 oranında karıştırılmış ve 12 mL

polimer çözeltisi şırınga içine konarak 500 µL/saat akış hızı ve 23 kV voltaj altında elektro-eğirme yöntemi ile Fib/PCL fiberler elde edilmiştir.

5.2.2. 17-β Estradiol (E2) İçeren Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi

%15 ipek fibroin/%20 PCL (1:1) çözeltisi içerisine pro-anjiyogenik etkisinden dolayı %1 (w/v) oranında E2 eklenmiştir. Bu amaçla E2 etanol (Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)) içerisinde çözülerek, bu çözelti %15'lik ipek fibroin çözeltisi içerisine eklenmiştir. Homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra üzerine PCL çözeltisi eklenerek, E2 içeren E2Fib/PCL hibrit çözelti elde edilmiştir. 12 mL bu çözelti şırınga içine koyularak, 500 µL/saat akış hızı ile 23 kV voltaj altında elektro-eğirme yöntemi ile E2Fib/PCL fiberler üretilmiştir.

5.2.3. AgNO₃ İçeren Fibroin/PCL Fiberlerin Üretimi

%15 ipek fibroin/%20 PCL (1:1) hibrit çözeltisi içerisine antibakteriyel etkisinden dolayı %1 (w/v) AgNO₃ (Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)) eklenmiştir. AgNO₃ tuzu, PCL çözücüsü olan formik asit ve asetik asit karışımı içerisine eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. AgNO₃ tuzunun çözünmesinden sonra PCL çözücü içerisine eklenerek 12 saat karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır [144]. Homojen PCL/AgNO₃ çözeltisi içerisine ipek fibroin çözeltisi eklenmiş ve daha sonra 12 mL çözelti şırınga içine koyularak, 500 µL/saat akış hızı ile 23 kV voltaj altında Fib/PCL-Ag fiberler üretilmiştir.

5.2.4. E2 ve AgNO₃ İçeren Fibroin/ PCL Fiberlerin Üretimi

E2 ve AgNO₃ içeren fibroin/ PCL fiberler 2 katmanlı olarak üretilmiştir. Bu amaçla E2 içeren Fib/PCL polimer çözeltisi Bölüm 5.2.2'de sunulduğu gibi hazırlanmış ve bu çözeltinin 6 mL'si şırınga içine koyularak, 500 µL/saat akış hızı ile 23 kV voltaj altında elektro-eğirme yöntemi ile ilk katman üretilmiştir. Daha sonra üretime 6 mL AgNO₃ içeren Fib/PCL çözeltisi (Bölüm 5.2.3) ile aynı şartlar altında devam edilerek 2 katmanlı E2Fib/PCL-Ag fiberler elde edilmiştir.

5.3. Fiberlerin Karakterizasyonu

5.3.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Analizi

Üretilen fiberlerin yapısal analizi Perkin Elmer Spectrum 400 cihazı ve ATR eklentisi kullanılarak yapılmıştır. Analiz için belirlenen spektrum aralığı $4000-400\text{ cm}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

5.3.2. Fiberlerin Morfolojik Analizi

Üretilen fiberlerin morfolojik karakterizasyonları, QUANTA 400F Field Emission SEM marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Fiber yapısındaki Ag varlığı, enerji dağılım X ışını spektroskopisi (EDX) analizi yapılarak gösterilmiştir. Fiberlerin SEM görüntüleri 25.000X büyütmede alınmıştır. Fiber çapları Image J programı ile ölçülmüş ve fiber çap dağılımlarının ortalamaları hesaplanarak, dağılım grafiği elde edilmiştir.

5.3.3. Fiberlerin Termal Özelliklerinin Analizi

Fiberlerin termogravimetrik analizi (TGA) Perkin Elmer Pyris 1 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analiz için tarama hızı $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ve sıcaklık aralığı $25-800^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Deney atmosferi olarak azot gazı kullanılmıştır. Ayrıca üretilen fiberler diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analiz edilmiş bu amaçla Perkin Elmer Diamond cihazı kullanılmış olup analiz azot gazı altında yapılmıştır. Yapılan analizde tarama hızı $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ve sıcaklık aralığı $0-300^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir.

5.3.4. İndirekt Sitotoksite Analizi

Fiberlerin sitotoksik analizi ISO 10993-5:2009(E) standardına göre indirekt sitotoksite testi yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla fiberler, $1 \times 1\text{ cm}^2$ boyutlarında her kesilmiş ($n=6$) ve fiberlerin her iki yüzü UV ışık altında 1 saat steril edilmiştir. Daha sonra fiberler, tüplere yerleştirilerek üzerlerine, 2 mL besi yeri (Mem Alpha Modification, Cegrogen, Almanya, %10 fetal bovine serum (FBS), Sigma, US, %1 L-glutamin (200 mM), Cegrogen, Almanya, %0,1 Penisilin/Streptomisin(100x), Cegrogen, Almanya) koyularak inkübatörde (Thermo Scientific HeraCell, Almanya) (37°C ve %5 CO_2) 72 saat bekletilmiştir. 96 kuyucuklu kaplara, her bir kuyucuğa 1×10^4 L929 fibroblast hücresi ekilerek inkübatörde aynı şartlarda 24 saat kültüre edilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, hücrelerin üzerinde bulunan besi yeri alınarak, yerine fiberlerin içerisinde 72

saat beklediği besi yeri koyulmuştur. Bu besi yeri, hücrelerin üzerine koyulmadan önce 0,22 µm filtreden geçirilerek olası bir kontaminasyon riski ortadan kaldırılmıştır. L929 fibroblast hücreleri, bu besi yeri içerisinde, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda, hücrelerin üzerinden besi yeri çekilerek, yerine %10 MTT (3-4,5 Dimetil-tiyazolil-2-5-Difeniltetrazolyum bromür) içeren besi yeri koyulmuştur. Hücreler bu şekilde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, enzimatik yolla tetrazolyum bileşiğinin formazan kristallerine dönüşmesi gerçekleşmiştir. Formazan kristallerinin hücre zarından dışarı çıkmasını sağlamak amacıyla kuyucuklara DMSO (dimetil sülfoksit) eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra absorbanları 570 ve 690 nm’de mikropłaka okuyucuda okutulmuştur. İndirekt sitotoksisite testinde pozitif kontrol olarak %10 DMSO içeren besi yeri, negatif kontrol olarak ise besi yeri kullanılmıştır. MTT deneyi her fiber grubu için 6 tekrarlı olarak yapılmıştır

5.4. *In vitro* Salım Testleri

5.4.1. Fiberlerden E2 ve Ag Salımının İncelenmesi

Üretilen fiberlerden salınan E2 miktarının belirlenmesi amacıyla, 1x1 cm² boyutlarında kesilen Fib/PCL, E2Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberler tartılarak (n=3) hazırlanmıştır. Fiberler, 5 mL PBS/etanol (4:1, v/v) çözeltisi içerisinde alınarak, 37⁰C’deki su banyosu içerisinde salım deneyi başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından 1 mL örnek alınarak yerine PBS/etanol çözeltisi eklenmiştir. Alınan örnekler UV spektrofotometrede (Shmadzu UV-1280) 280 nm dalga boyunda ölçülmüş ve zamana karşı salınan E2 miktarı grafik ile gösterilmiştir.

Üretilen fiberlerden salınan Ag miktarının tayini için yukardaki metodun aynı uygulanmış olup, salım ortamından alınan örneklerdeki Ag miktarı Perkin Elmer (AAnalyst 800) atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçülerek zamana karşı salınan Ag miktarı grafik ile gösterilmiştir.

5.4.2. Fiberlerden E2 Salımının Franz Difüzyon Yöntemi ile İncelenmesi

Fiberlerden E2 salımı ayrıca 0,63 cm² alan ve 5 mL hacme sahip Franz difüzyon hücreleri (Sigma Aldrich ABD) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla reseptör faz ve donör faz olarak, PBS/etanol (4:1 v/v) karışımı kullanılmıştır. Franz hücrelerinde, 1x1 cm² boyutlarında kesilen E2Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberler membran üzerine

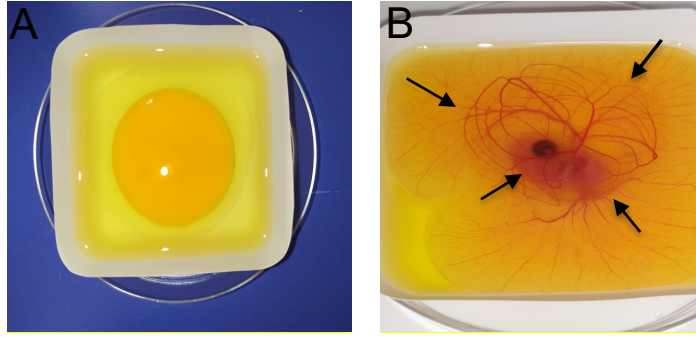
yerleştirilmiştir. Daha sonra donör faz, yerleştirilen fiberin üst kısmına, reseptör faz ise fiberin alt kısmına gelecek şekilde hücreler içerisine koyulmuştur. Franz hücreler, 130 rpm karıştırma hızındaki karıştırıcının üzerinde olacak şekilde 37°C'deki su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. E2 salım miktarı, belirli zaman aralıklarında reseptör fazdan alınan örneklerin UV spektrofotometrede (Shmadzu UV-1280) 280 nm dalga boyunda ölçülmesiyle belirlenmiş ve bu miktarlar zamana karşı grafikte gösterilmiştir.

5.5. Fiberlerin Pro-anjiogenik Etkisinin Koryoallantoik Membran (CAM) Yöntemi ile İncelenmesi

E2 içeren fiberlerin pro-anjiogenik etkisi *ex ovo* bir yöntem olan koryoallantoik membran (CAM) üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla döllenmiş tavuk yumurtaları, Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Ankara) temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen döllenmiş tavuk yumurtalarının temin edildiği gün, 0. gün olarak kabul edilmiştir. Döllenmiş yumurtalar, %20'lik etil alkol ile yumurta kabuğuna zarar vermeden temizlenmiş ve ardından sıcaklığı 37°C ve nem oranı %60-65 olan kuluçka makinesine (Cimuka) yatay olarak yerleştirilmiştir. Kuluçka makinesinde, yumurtalar belirli aralıklarla döndürülerek embriyoların yapışması önlenmiştir.

5.5.1. Döllenmiş Yumurtaların İnkübasyonu ve *Ex Ovo* Kültürün Hazırlanması

Kuluçka makinesine koyulan yumurtalar (0.gün kabul edilmiş), 3. günde kırılarak embriyolar dikdörtgen kaplara alınmıştır. Yatay konumda duran yumurtalarda embriyo, yumurtanın üst tarafında yer almaktadır. Bu nedenle embriyonun yer aldığı yumurtaların üst kısımları bir kalem ile işaretlenmiştir. Kırılma işleminin embriyonun bulunduğu kısmın tam karşısından yapılması planlanmıştır. Laminer kabinde petri kaplarına nem sağlaması amacıyla petri kaplarına 2 mL steril su konmuştur. Diğer taraftan kabin içine dikdörtgen kaplar alınmış ve bunların içine %1'lik penisilin-streptomisin çözeltisi içeren 2 mL PBS konularak petri kabının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra yumurtaların işaretli kısım üste gelecek şekilde tutulmuş ve sert bir cismin (1000 mL beher) kenarına vurularak kırılmıştır. Embriyo dikkatli bir biçimde kabuktan çıkarılarak dikdörtgen petri kabına aktarılmıştır (Şekil 5.2). Petri kabının kapağı kapatılarak inkübatör (Panasonic) içerisine yavaş hareketlerle yerleştirilmiştir. İnkübatör koşulları, 37 °C'de sabit tutularak embriyoların gelişme evreleri gözlemlenmiştir.



Şekil 5.2. Embriyonik gelişim. A) döllenmemiş yumurta görüntüsü, B) koryoallantoik membranın (CAM) görüntüsü.

5.5.2. Döllenmiş Yumurtaların Sağ Kalım Analizleri

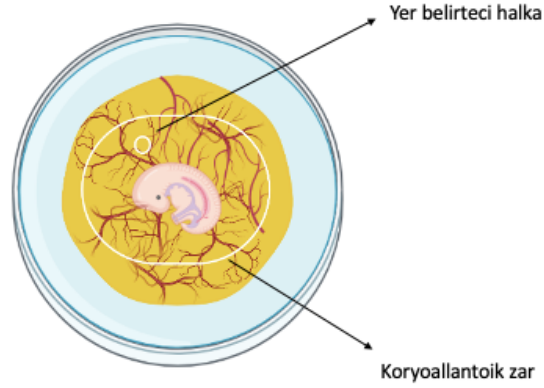
CAM deney protokolünün optimizasyonu için her bir seride 36 yumurta olacak şekilde 15 deney serisi yapılmıştır. Bu deney serilerinde sağ kalım analizleri yapılarak, ilerleyen deneylerdeki embriyoların yaşam sürelerinin durumu gözlemlenmiştir. Sağ kalım analizi her bir yumurtanın yaşadığı gün sayısının, Graphpad (Version 6.1) programının sağ kalım analizi fonksiyonuna eklenmesi yoluyla yapılmıştır.

5.5.3. Pro-anjiogenik Ajanların Etkilerinin CAM ile İncelenmesi

CAM deneyinin optimizasyonu için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) pozitif kontrol grubu olarak, fosfat tamponu (PBS) kontrol grubu olarak seçilmiş ve CAM üzerine uygulanmıştır. Her deney grubunda n=5 embriyo yer almıştır. Serbest E2 çözeltisi ise fiberlerden salınan E2 ile karşılaştırma yapılabilmesi açısından kontrol olarak kullanılmıştır. Bu amaçla; VEGF 100 ng/gün ve E2 30 nM/gün olarak CAM üzerine uygulanmıştır. Etkin maddelerin konsantrasyonları literatür baz alınarak seçilmiştir [145].

Deney aşamasında Bölüm 5.5.1.'de inkübe edilen embriyolar, 7. günde laminar kabine alınmış ve yer belirteci plastik halkalar CAM üzerine embriyoya zarar vermeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Bu halkalar etken ajanların uygulama yerini belirlemek amacıyla CAM ile embriyo arasındaki bölgede bulunan iki ana damar arasına yerleştirilmiştir (Şekil 5.3) (n=5). Daha sonra etken madde içeren çözeltiler ve PBS, 8.günden itibaren CAM üzerindeki halka içerisine sabah ve akşam, 10 µL olmak üzere günde iki kez

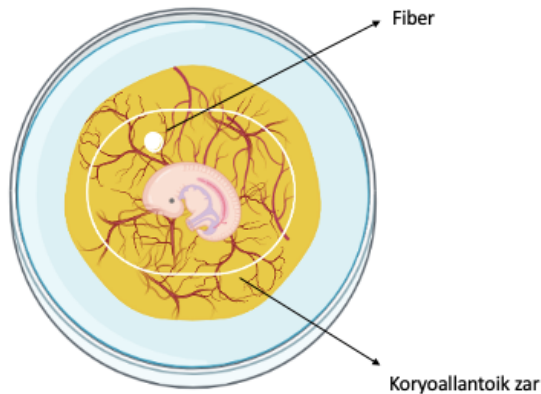
damlatılmış ve 10. günde deney sonlandırılmıştır. Embriyoların 8. ve 10. günler arasında her gün fotoğrafları çekilmiş ve gelişen yeni damarlar analiz edilmiştir.



Şekil 5.3. Yer belirteci halkanın iki ana damar arasına yerleştirilmesi (7. gün).

5.5.4. Fiberlerin Pro-anjiogenik Etkisinin İncelenmesi

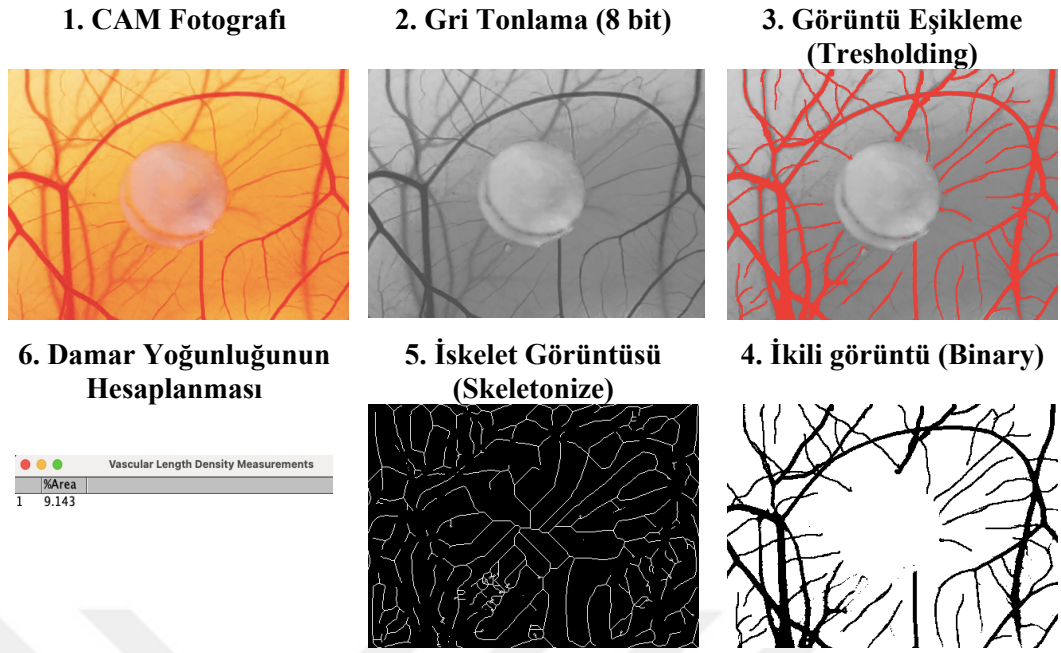
Fiberlerin pro-anjiogenik etkisinin belirlenmesi amacıyla (Fib/PCL, E2Fib/PCL, Fib/PCL-Ag, E2Fib/PCL-Ag) fiberler 0,6 mm çapında punç aleti ile eşit alana sahip olacak şekilde kesilerek 30 dk UV ile steril edilmiştir. Daha sonra embriyolar 7. günde laminar kabine alınarak fiberler CAM ile embriyo arasındaki bölgede bulunan iki ana damar arasına yerleştirilmiştir (Şekil 5.4) (n=5). Embriyoların 8. ve 10. günler arasında her gün fotoğrafları çekilmiş ve gelişen yeni damarlar analiz edilmiştir.



Şekil 5.4. Fiberlerin iki ana damar arasına yerleştirilmesi (7. gün)

5.5.4. Pro-anjiyogenik Yanıtın Sayısal Değerlendirilmesi

Etken maddelerin ve fiberlerin CAM üzerine uygulanmasının 10. gününde deney sonlandırılmış ve çekilen fotoğrafların tamamının, embriyolara eşit uzaklıkta ve eşit alanı kapsayacak şekilde olması sağlanmıştır. Fotoğrafların analizi için Fiji (<https://fiji.sc/>) programı kullanılmıştır. Fiji; görüntü analizi için kullanılan ImageJ (National Institutes of Health) programının, bilimsel görüntü analizini kolaylaştıran birçok eklentisini içerisinde barındıran bir versiyonudur. Fiji programının eklentilerinden biri olan damar analizi eklentisi (<https://imagej.net/plugins/vessel-analysis>) programa dahil edilerek, 10. günde çekilen embriyo fotoğraflarında belirlenen alan içerisindeki damarların % yoğunluğu hesaplanmıştır. Görüntü analizi için fotoğraflar Fiji programı ile gri tonlamaya (8 bit) dönüştürülmüştür. Daha sonra fotoğraflara görüntü eşikleme (thresholding) uygulanmıştır. Görüntü eşikleme, fotoğraflar üzerindeki gürültüyü azaltmak ya da nesnelere belirginleştirmek amacıyla kullanılmıştır. Analiz bölgesinde yapılan görüntü eşikleme işlemi, görüntülenen damarların belirginleştirilmesini sağlamaktadır. Belirginleştirilen damarlar, ikili görüntü (binary) elde edilmesi amacıyla siyah beyaz olarak tanımlanmıştır. Daha sonra siyah beyaz olarak tanımlanan damarların, sayım yapılması amacıyla iskelet görüntüsü (skeletonize) elde edilmiştir. İskelet görüntüsü eklentisi (analyze skeleton), görüntüdeki tüm bağlantı noktalarını, uzunlukları ve yoğunluğu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. İskelet görüntüsü analiz edildikten sonraki basamakta, damar analizi eklentisi (vessel-analysis) ile görüntü alanındaki damarların yoğunluğu ölçülmüştür. Damar analizi eklentisi, belirlenen alandaki damarların dallanma sayılarını, her bir dalın uzunluğunu, dalların ortalama uzunluklarını ve belirlenen alandaki damar yoğunluğunun yüzdesini analiz edilebilmektedir. Fiji programı kullanılarak yapılan görüntü analizinin akış şeması Şekil 5.5'de verilmiştir.



Şekil 5.5. Görüntü analizinin akış şeması.

5.6. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi

E2Fib/PCL-Ag fiberlerin antibakteriyel etkisinin araştırılması amacıyla, mesane ve vajina florasında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 [146] ve *Candida albicans* ATCC 90028 [147] suşları kullanılarak disk difüzyon testi yapılmıştır. Ayrıca mikrobiyota üyesi olan faydalı mikroorganizmalar üzerine etkinliklerini test etmek amacıyla *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [148] suşu kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite Kirby-Bauer yöntemi baz alınarak test edilmiştir [149].

E. coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 taze kültürleri Tryptic Soy Agar'da (TSA, (Difco, Detroit, MI), *C. albicans* ATCC 90028 Sabouraud Dextrose Agar (Merck, Germany) kullanılarak 37°C'de 16-24 saat inkübasyon sonrası elde edilmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 ise De Man Rogosa Sharpe Agar'da (MRS, Merck, Germany) 37°C'de anaerobik koşullarda üretilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco, Detroit, MI), besiyeri her bir petri kabına 20 mL olmak üzere dağıtılmıştır. 0.5 McFarland bulanıklığa denk gelecek şekilde hazırlanan bakteri (1.5×10^8 cfu/mL) süspansiyonları MHA besiyerine, *C. albicans* (1.5×10^6 cfu/mL) süspansiyonu, %2 glukoz içeren MHA

besiyerine steril eküvyon çubukları yardımıyla ekilmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 için antimikrobiyal aktivite ise 0,5 McFarland bulanıklıkta hazırlanan *L. acidophilus* süspansiyonu MRS Agar yüzeyine yayılarak test edilmiştir. Her bir petri içerisinde, deney grubu olarak E2Fib/PCL-Ag fiber ve kontrol grubu olarak Fib/PCL fiber yerleştirilmiştir. Fiberler, 5 mm çapında kesilerek kullanılmıştır. Daha sonra petriler, 37⁰C'de 24 saat inkübe edilmiştir, *L. acidophilus* ise 37⁰C'de 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde, fiberlerin çevresinde oluşan zon çapları ölçülmüştür.

5.7. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Doku İnterpozisyon Flepi Olarak *İn Vivo* Yanıtının Değerlendirilmesi

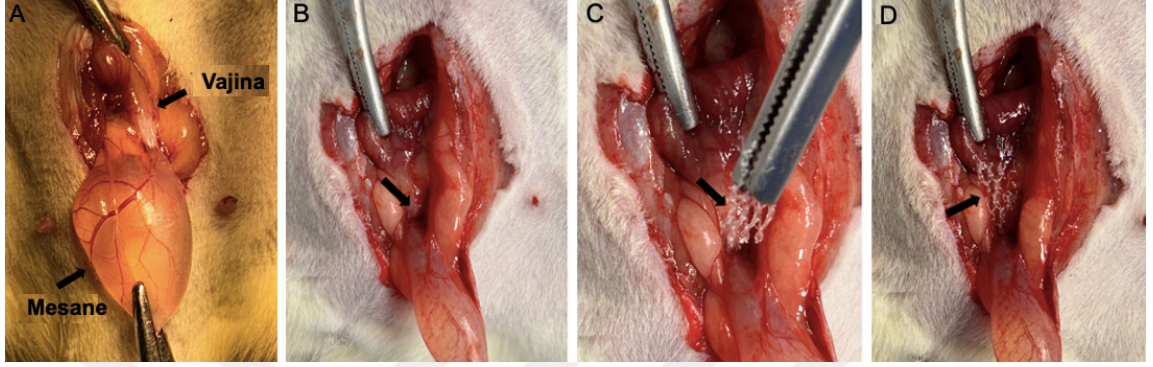
5.7.1. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Sıçanlara Uygulanması

Geliştirilen E2Fib/PCL-Ag fiberlerin doku interpozisyon flep eşleniği olarak *in vivo* doku yanıtı; *Sprague Dawley* dişi sıçanlarda 655 protokol numaralı etik kurul izni ile incelenmiştir. Bu amaçla E2Fib/PCL-Ag fiberler, dişi sıçanların mesane ve vajina arası ve abdomen olmak üzere iki ayrı bölgeye implante edilmiştir. *İn vivo* deneyde, 32 adet doğurganlık dönemindeki dişi sıçan kullanılmıştır. Deneyde toplamda 4 grup yer almış ve her bir grupta 8 adet sıçan kullanılmıştır. Deney 28 günlük tek zaman diliminde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen fiberlerin doku yanıtı ticari olarak kullanılan polipropilen (PP) doku iskelesi ile karşılaştırılmıştır. *İn vivo* deney grupları aşağıda verilmiştir.

1. Grup (Pozitif kontrol): Ticari polipropilen (PP) doku iskelesi yerleştirilen grup,
2. Grup (Negatif kontrol): Diğer gruplarla aynı cerrahi işlemler uygulanan ancak flep kullanılmayan grup,
3. Grup (Fiberler için kontrol grubu): Fib/PCL fiberlerin yerleştirildiği grup,
4. Grup (Pro-anjiyogenik ve antibakteriyel fiberler): E2Fib/PCL-Ag fiberlerin yerleştirildiği grup.

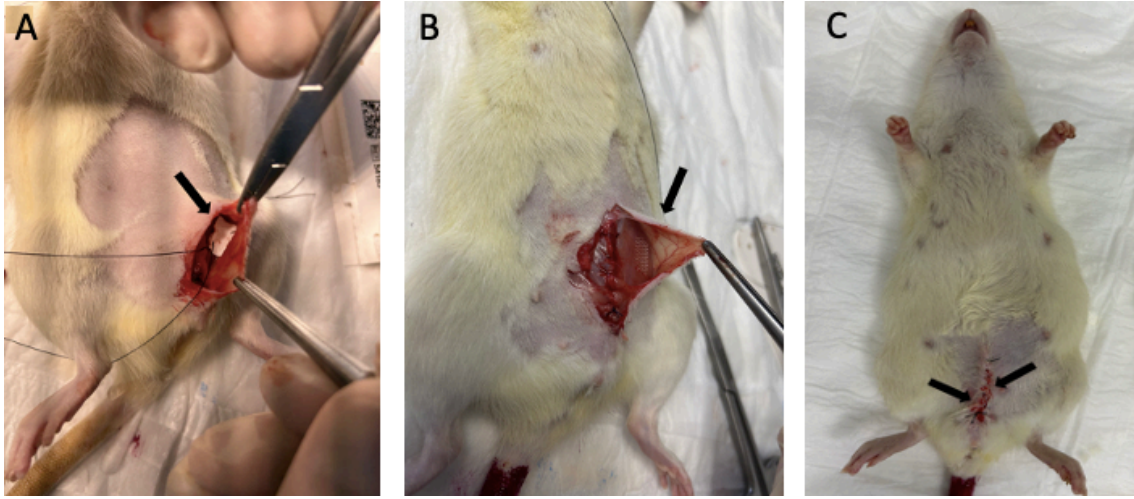
Deney öncesinde sıçanlara anestezik ajan olarak, intraperitoneal enjeksiyon ile ksilazin (100-200 mg/kg) verilerek genel anestezi uygulanmıştır. Operasyon öncesinde sıçanların karın alt bölgeleri tıraşlanarak hazır hale getirilmiştir. Sıçanların göbek altından dikey bir insizyon ile cilt ve cilt altı dokular kat kat geçilerek karın içerisine girilmiştir. Periton geçildikten sonra, vajina ve mesane belirlenmiştir (Şekil 5.6.A). Mesanenin arka duvarı

ile vajinanın üst kısmı arasındaki dokular kesilerek bir cep oluşturulmuştur. Ticari olarak doku interpozisyon flep eşleniği olarak kullanılan PP doku iskelesi bu cep içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 5.6.C, D). Aynı zamanda PP doku iskelesi, farklı bölgedeki doku yanıtının incelenmesi amacıyla aynı sıçan üzerinde abdomen kısmında cilt altına da yerleştirilmiştir (Şekil 5.7.B).



Şekil 5.6. A) *Sprague Dawley* sıçanların mesane ve vajina görüntüsü, B) Mesane ve vajinanın üst kısmı arasında oluşturulan cep, C) ve D) Ticari PP doku iskelesinin oluşturulan cebe yerleştirilmesi.

Benzer şekilde geliştirilen Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberler mesane ve vajina arasında ve abdomende oluşturulan cepler (Şekil 5.7.A) içerisine yerleştirilmiştir. Ancak E2Fib/PCL-Ag fiberler mesane ve vajina arasına yerleştirilirken E2 içeren 1. katman yüzeyi mesane üzerine, Ag içeren 2.katman yüzeyi ise vajina tarafına gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Abdomende ise, Ag içeren katman yüzeyi cilde yakın olan kısma (üst kısım) gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Negatif kontrol grubunda, bu cepler oluşturulduktan sonra herhangi bir malzeme yerleştirilmemiştir. Malzemelerin yerleştirilmesi işlemi tamamlandıktan sonra batın katları sırasıyla kapatılmıştır (Şekil 5.7.C).



Şekil 5.7. Geliştirilen fiberlerin ve PP doku iskelesinin sıçan abdomeninde oluşturulan cebe yerleştirilmesi: A) Fib/PCL fiberler, B) PP doku iskelesi, C) batın katlarının kapatılması.

Sıçanlar, 28 gün sonra yüksek doz ksilazin enjeksiyonu ile sakrifiye edilerek sıçanların abdomen kısmına ve mesane ve vajina arasına yerleştirilen PP doku iskelesi ve E2FibPCL-Ag fiberler eksplantasyon prosedürüne uygun olarak çıkarılmıştır. Bu amaçla PP doku iskelesi, Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag fiberlerin implante edildiği bölgeler kesi oluşturularak açılmış ve etrafındaki dokularla birlikte kesilip alınarak, %10 tampon içeren formalin içerisinde fiksasyon için 48 saat bekletilmiştir.

5.7.2. Histolojik Analizler

Histolojik analizler için dokular fiksasyondan sonra parafin içerisinde gömülerek 7 mikron kalınlıkta kesilmiş, daha sonra Mayer'in hematoksilin eozin ve Masson'un trikromu ile boyanarak mikroskop altında analiz edilmiştir.

Hematoksilen Eozin boyama: Dokuların boyanması için, alınan kesitler bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 3x15 dk olmak üzere toplamda 45 dk ksilolde tutularak deparafinize edilmiştir. Ksilolden sonra kurutulan kesitler, rehidratasyon için %96'lık alkolde 2x10 dk olmak üzere toplamda 20 dk ve %80'lik alkolde 10 dk bekletilmiştir. Dokular, çeşme suyunda yıkandıktan sonra, Mayer's Hematoksilin ile 15 dk boyama yapılmıştır. Ardından tekrar çeşme suyunda yıkanan kesitler amonyaklı suya batırıp çıkarılarak tekrar çeşme suyu ile yıkanmıştır. Sonrasında kesitler, eozin ile 1 dk boyanmıştır. Kesitler, %80'lik ve 2 kere %96'lık alkollere batırılıp çıkartılarak dehidrate edilmiştir. Ksilol ile en az 45 dk şeffanlandırma işleminden sonra, kesitler entellan ile

kapatılmıştır. Kesitler digital kamera (Leica DC490, Wetzlar-Germany) bağlı ışık mikroskopi (Leica 6000B) ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Masson'un Trikromu boyama: Deparafinize edilen kesitler, ksilol içerisinde 15 dk bekletilmiş ve bu basamak 3 kez tekrarlanmıştır. Ardından örnekler, 15 dk kurutulmuştur. Sonrasında 10'ar dk sırasıyla %96, %96 ve %80 alkoller içerisinde bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkanmıştır. Yıkanan örnekler, 25 dk hematoksilen içerisinde bekletildikten sonra yıkanarak amonyaklı suya batırılmıştır. Tekrar yıkama işleminin ardından, 20 dk trikrom boya içerisinde bekletilmiştir. Ardından 3 dk asetik asitte bekletilen dokular, bu basamaktan sonra, sırasıyla %80 ve %96 alkoller içerisine batırılmıştır. Ardından kurutulan kesitler, ksilol ile en az 45 dk şeffaflandırma işleminden sonra, entellan ile kapatılmıştır.

5.7.3. Değerlendirme Kriterleri ve Skorlama

Her örnekte mesane ile vajina ve abdomen bölgelerindeki alanlarda eksplant çevresindeki dokuda örtüşmeyen 10 alan 200X büyütmede polimorfonükleer lökosit (PMN), mononükleer hücre (MN), bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma açısından Çizelge 5.2'de verilen kriterlere göre değerlendirilerek skorlanmıştır [150]. Ayrıca bu alanlarda dev hücre sayımı yapılmıştır.

Çizelge 5.2. Dokuların mikroskop incelemesinde elde edilen bulgularının skorlama kriterleri.

Değerlendirme Kriteri	Skor			
	0	1	2	3
Polimorfonükleer lökositler (PMN)	Yok	0 ile 5 arasında PMN hücre var	6 ile 10 arasında PMN hücre var	10'dan fazla PMN hücre var
Mononükleer hücreler (MN)	Yok	0 ile 5 arasında mononükleer hücre var	6 ile 10 arasında mononükleer hücre var	10'dan fazla mononükleer hücre var
Bağ dokusu organizasyonu	Tamamen disorganize	Hafif organize	orta derecede organize	İyi organize
Damarlanma	Yok	1 ile 3 kan damarı var	4 ile 10 kan damarı var	10'dan fazla mononükleer hücre var

5.7.4. *İn vivo* Sonuçlarına Ait Verilerin İstatistiksel Analizi

Polimorfonükleer lökosit (PMN), mononükleer hücre (MN), bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma açısından değerlendirilerek skorlanan ve dev hücre sayımı yapılan her bir örneğe ait veriler, tek yönlü ANOVA ve gruplar arasında tespit edilen farkların istatistiksel anlamlılığı Tukey post hoc testi kullanılarak incelenmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılığı ve * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$ ifade etmektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programı (Version 6.1) kullanılarak yapılmıştır.



6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1. Pro-anjiyogenik/Antibakteriyel Fibroin/PCL Fiberler

Pro-anjiyogenik ve antibakteriyel fiberler elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiştir. Elektro-eğirme yöntemi, 1930'lu yılların başında geliştirilmeye başlamış ve son yıllarda fiber üretiminde yaygın olarak kullanılan bir teknik olmuştur. Bu yöntem ile çok çeşitli polimerler boyutları birkaç nanometre ile mikrometre arasında değişen dağınık ve paralel fiberler üretilmektedir.

Bu tez kapsamında biyomalzeme alanında sıklıkla kullanılan ve doğal bir polimer olan ipek fibroini ve biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri dolayısı ile tercih edilen PCL hacimce 1:1 oranlarında karıştırılarak elektro-eğirme yöntemiyle fiberler elde edilmiştir. Literatürde, doğal polimerler mekanik özelliklerini iyileştirmek için sentetik polimerler ile birlikte sıklıkla kullanılmaktadır [151]. Polimer çözelti konsantrasyonu, jetin Taylor konisinden ayrılmasını doğrudan etkilediği için fiber üretiminde önemli bir parametredir [152]. Tez kapsamında farklı konsantrasyonlarda ipek fibroin ve PCL çözeltileri formik asit/asetik asit karışımında hazırlanarak denemeler yapılmış ancak %15'lik (w/v) fibroin ve %20'lik (w/v) PCL çözeltileri 1:1 oranında karıştırıldığında boncuksuz ve homojen fiberler elde edilmiştir. Fiber üretiminde polimer çözeltisinin akış hızı 500 µL/saat, 23 kV voltaj altında ve şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 13 cm olarak belirlenmiştir.

İpek fibroini ve PCL'in ortak çözücüsü olduğu için formik asit/asetik asit tercih edilmiştir. PCL, tetrahidrofuran, kloroform, metilen klorid, karbon tetraklorid, benzen, toluen, sikloheksanon dihidropiran ve 2-nitropropan, 2- butanon, etil asetat, asetonitril ve dimetil fumarat içerisinde çözünmekte olup aseton içerisinde ise kısmi olarak çözünmektedir. Elektro-eğirme yönteminde, PCL için çözücü kombinasyonları arasında; kloroform/metanol, metilen klorid/metanol, metiln klorid/N, N-dimetil formamid (DMF), metilen klorid/toluen ya da tetrahidrofuran/DMF kullanılmıştır. Elektro-eğirme yöntemi için uygun olan bu çözeltiler toksik ve sağlığa zararlı olmaları nedeniyle kullanımları oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sağlık üzerinde daha az toksik etkiye sahip ve tehlikesiz olarak nitelendirilebilecek çözücüler üzerinde durmaktadır. Bu çözücüler, formik asit, asetik asit gibi asidik çözücüler ve asetonur [153]. Polimerik çözeltilerin elektro-eğirme verimlerinin artırılması amacıyla iki ya da daha fazla çözücü

birlikte kullanılabilirler. PCL elektro-eğirme çözeltisi olarak formik asit ile hazırlandığında boncuklu fiberler elde edilirken, formik asit ve asetik asit ile birlikte kullanıldığında bu sorun ortadan kalkarak boncuksuz fiberler elde edilebilmiştir. Literatürde önerilen ideal formik asit/asetik asit oranı hacimce 1:1 olarak bildirilmiştir [154]. Bu veriler ışığında, tez kapsamında üretilen fiberlerde PCL polimerinin çözücü olarak, formik asit/asetik asit ikili çözücü sistemi kullanılarak, boncuksuz yapıdaki fiberler elde edilmiştir.

Fibroin, kozadan NaHCO_3 alkali çözeltisi içerisinde serisin proteininin ortamdan uzaklaştırılarak elde edilmiştir. Elde edilen fibroin LiBr içerisinde çözülerek fiber üretiminde kullanılmıştır. Literatürde, ipek fibroin çözeltisi elde etmek amacıyla çözücü olarak organik bir bileşik olan heksafloro-2-propanol (HFIP) kullanılmaktadır. HFIP'nin florlu alkol yapıda olması nedeniyle özel bir protokol uygulanarak imha edilmesi gerekmektedir. Buna ek olarak dermal ve inhalasyon toksisitesine neden olduğu için, farklı çözücü seçenekleri değerlendirilmektedir [155]. İpek fibroin fiberleri çözmek amacıyla, alternatif bir çözücü olarak, molar oranları:1:2:8 olan $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ içeren Ajisawa çözeltisi kullanılmaktadır [156]. Diğer bir alternatif olarak kullanılan çözücü ise lityum bromürün (LiBr) sulu çözeltisidir. Ajisawa ve LiBr çözeltilerinin her ikisinin de verimleri %90'ın üzerindedir. İpek, Ajisawa çözeltisinde 10-15 dakikada, LiBr çözeltisinde ise 4-5 dakikada çözülür. Bu iki çözücü sistemi arasındaki fark ise, LiBr çözeltisi ipek fibroinin α heliks ve β tabakalarında konformasyonel değişimlere neden olmazken, Ajisawa çözeltisi bu yapılarda değişiklikler meydana getirmektedir. α heliks ve β tabakalarındaki değişimler, ipek fibroinin kristal yapısında ve termal stabilitesinde değişikliklere neden olmaktadır [157]. Bu bilgiler ışığında, ipek fibroin yapısının değişmeden kalabilmesini sağlamak amacıyla ipek fibroinin çözücü olarak LiBr sulu çözeltisi tercih edilmiştir.

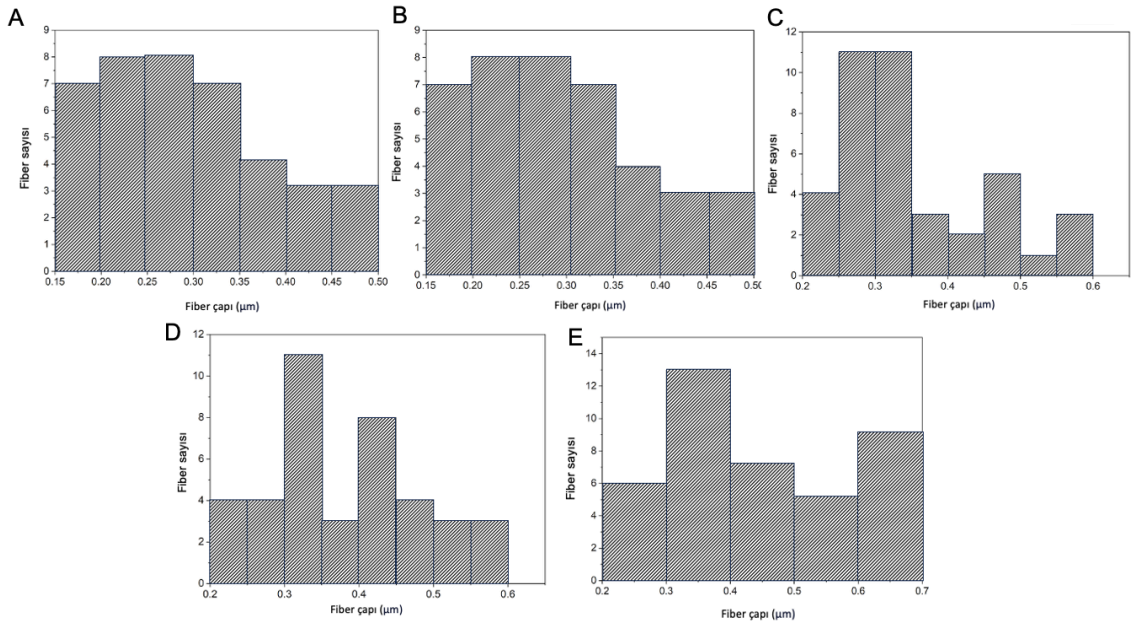
Fib/PCL fiberler içerisine pro-anjiyogenik özelliği nedeniyle eklenen E2, etanol içerisinde çözülerek ipek fibroin çözeltisine eklenmiştir. Diğer taraftan Fib/PCL fiberler içerisine antibakteriyel etkisi nedeniyle eklenen AgNO_3 tuzu, önce formik asit/asetik asit karışımında çözülmüş, ardından PCL bu karışıma eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan hibrit çözeltilerden, elektro-eğirme düzeneğinde, optimize edilen parametreler kullanılarak fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Fib/PCL fiberlerin

karakterizasyonları, salım testleri, *in vitro* testleri, antibakteriyel analizleri, CAM deneyi ve *in vivo* deneyleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

6.2. Pro-anjiyogenik/Antibakteriyel Fibroin/PCL Fiberlerin Özellikleri

6.2.1. Fiber Morfolojisi ve Çap Dağılımları

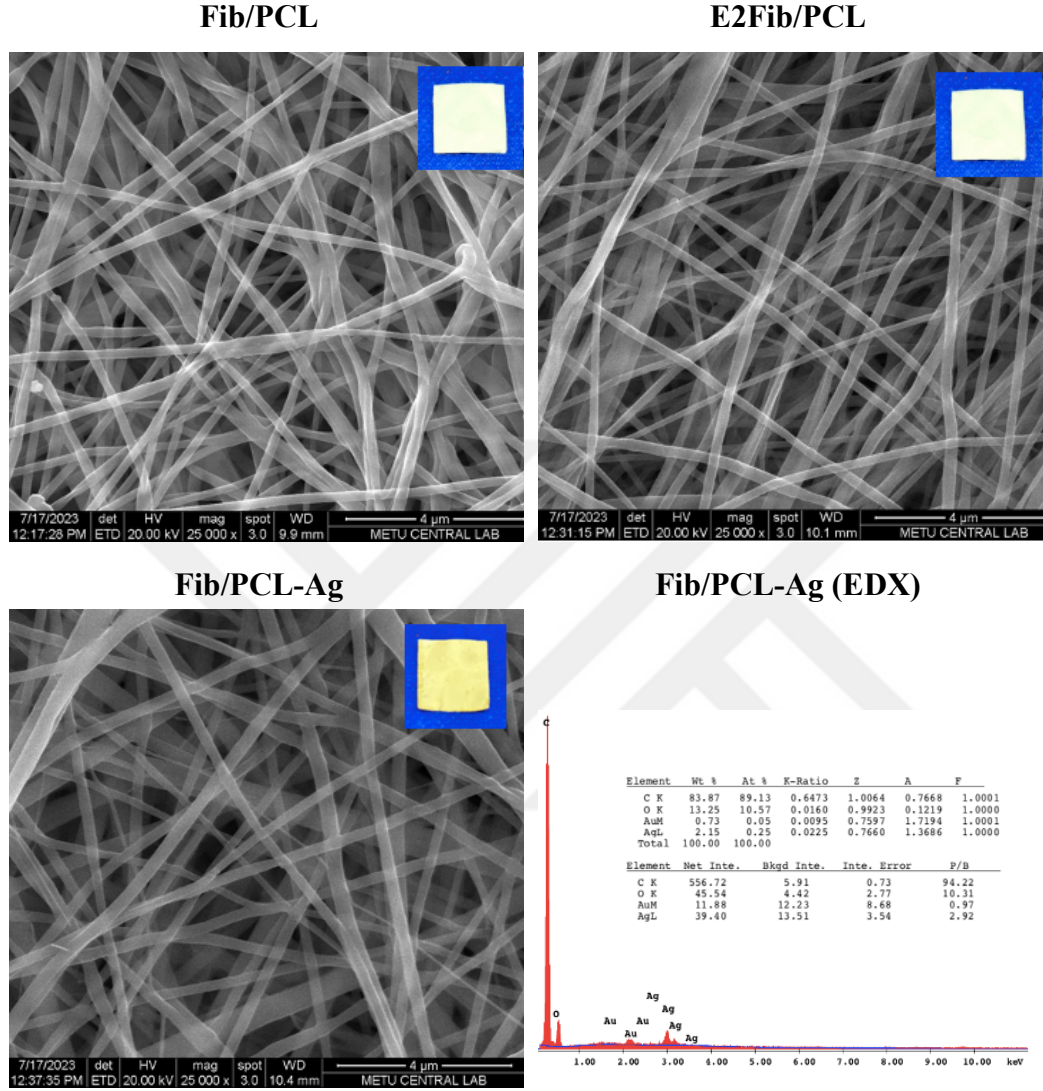
Fiberlerin SEM görüntüleri (Şekil 6.2-3) incelendiğinde, homojen, dağınık, boncuksuz fiberlerin başarıyla elde edildiği izlenmiştir. Fiberlerin ortalama çaplarının; Fib/PCL için 0,28 μm , E2Fib/PCL için 0,30 μm , Fib/PCL-Ag için 0,34 μm , E2Fib/PCL-Ag fiberlerin E2 içeren tarafı için, 0,35 μm , E2 Fib/PCL-Ag fiberlerin Ag içeren tarafı için, 0,55 μm olduğu belirlenmiştir. Fib/PCL fiberlerin yapısına E2 ve Ag eklenmesi ile fiber çaplarında minimal bir artış meydana gelmiştir. Fiberlerin çap dağılımları Şekil 6.1’de verilmiştir. Literatürdeki farklı çalışmalarda da, fiber yapısına E2 [158] ve Ag [159] eklenmesinin fiber çaplarında artışa neden olduğu belirtilmektedir.



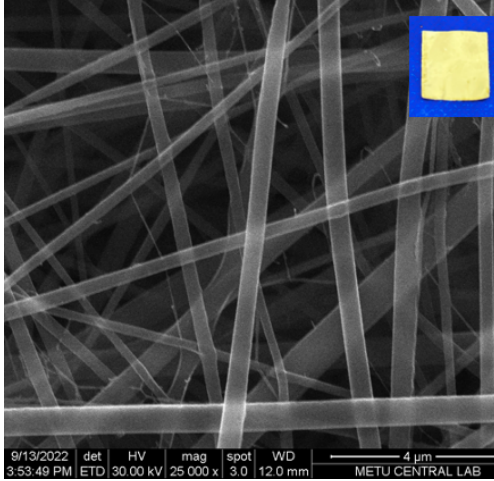
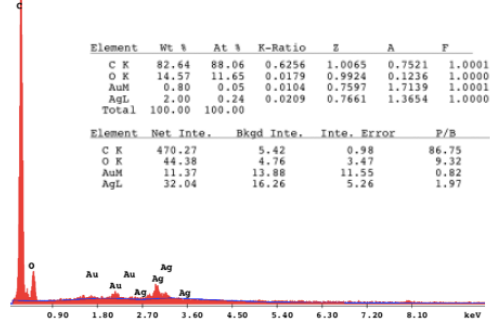
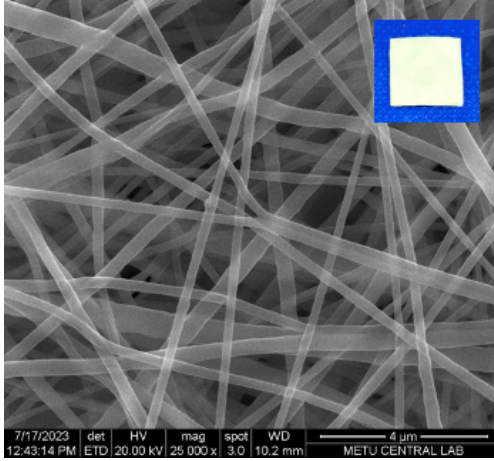
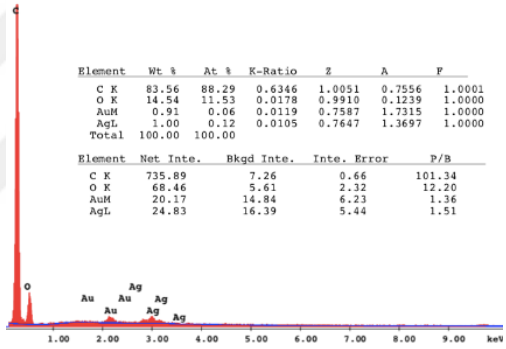
Şekil 6.1. Fiberlerin çap dağılımları; A) Fib/PCL fiber, B) E2 Fib/PCL fiber, C) Fib/PCL-Ag fiber, D) E2 Fib/PCL-Ag fiber (E2 tarafı), E) E2 Fib/PCL-Ag fiber (Ag tarafı).

Fiberlerin EDX analizlerinde, Fib/PCL-Ag ve E2Fib/PCL-Ag fiberlerdeki Ag miktarı belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda, Fib/PCL-Ag fiberlerde, yüzeydeki elementlerin %2,15'inin Ag elementinden oluştuğu, E2Fib/PCL-Ag fiberlerin Ag tarafındaki elementlerin, %2'sinin Ag elementinden oluştuğu ve aynı fiberin E2 tarafındaki

elementlerin %1'inin Ag elementinden oluştuğu görülmüştür (Şekil 6.2-6.3). Bu veriler ışığında fiber yapısındaki Ag varlığı ispatlanmıştır.



Şekil 6.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (25.000 X) ve enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX).

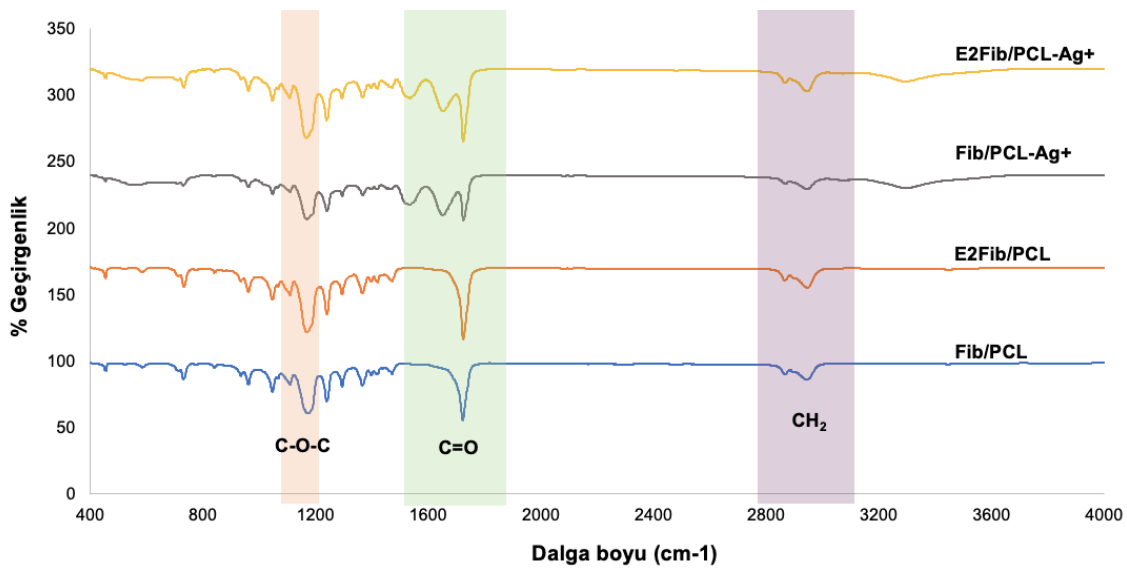
E2Fib/PCL-Ag (Ag tarafı)**E2Fib/PCL-Ag (Ag tarafı) (EDX)****E2Fib/PCL-Ag (E2 tarafı)****E2Fib/PCL-Ag (E2 tarafı) (EDX)**

Şekil 6.3 (devamı). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (25.000 X) ve enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX).

6.2.2. Fiber Yapıların FT-IR Spektrumları

Fib/PCL fiber yapılarının incelenmesi amacıyla FT-IR analizi yapılarak, spektrumları incelenmiştir (Şekil 6.4). 1700cm^{-1} - 1500cm^{-1} bandı amit I ve amit II peptitlerinin pik verdiği bant aralığıdır. 1654cm^{-1} 'deki pik, amit I, 1532cm^{-1} 'deki pik amit II ve 1238cm^{-1} 'deki pik amit III peptitlerine ait piklerdir [160]. Spektrumdaki, 1626cm^{-1} ve 1518cm^{-1} 'deki pikler, amit I bandındaki fibroin silk II (β -kristalin) yapısının varlığını göstermiştir [161], [162].

1727 cm^{-1} 'deki kuvvetli pik, PCL'in karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gruplarının gerinimini göstermektedir. 2949 cm^{-1} bandındaki pikler, PCL yapısında bulunan asimetrik metilen (CH_2) gruplarının varlığını, 2865 cm^{-1} bandındaki pikler ise, simetrik CH_2 gruplarının varlığını göstermektedir. 1293 cm^{-1} 'deki pikler, PCL'in kristalin fazındaki C-O ve C-C gerinimini işaret eden piklerdir. 1240 cm^{-1} bandındaki pikler PCL yapısındaki asimetrik C-O-C gruplarının varlığını gösterirken, 1170 cm^{-1} 'deki pikler simetrik C-O-C gruplarını işaret etmektedir [163].

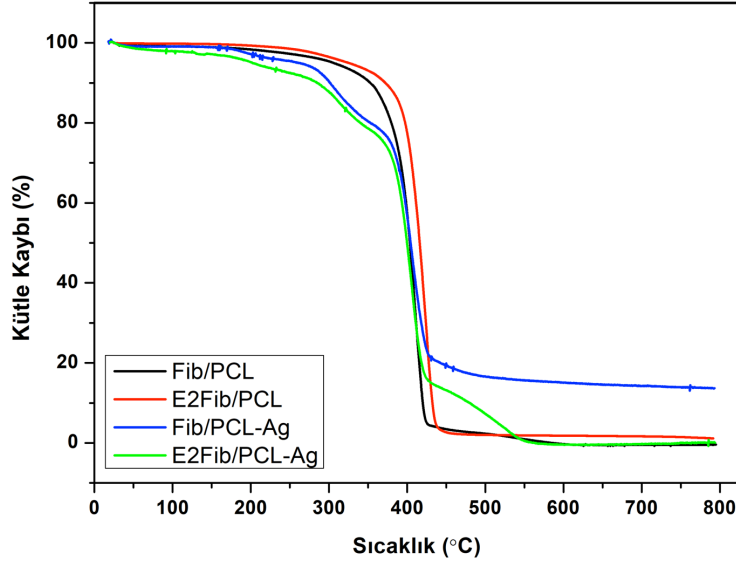


Şekil 6.4. Fiberlerin FT-IR spektrumları.

6.2.3. Fiberlerin Termal Özellikleri

Fiberlerin TGA termogramları incelendiğinde; Fib/PCL ve E2Fib/PCL fiberlerde tek basamaklı ısıl bozunmanın gerçekleştiği görülmüş olup bu durum polimerlerin iyi harmanlandığını göstermektedir (Şekil 6.5). Bu bozunma PCL polimer zincirlerinin ve fibroin yapısındaki peptitlerin bozunmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. E2'nin polimer harmanına katılması ısıl bozunmaya bir etki göstermemiştir. 300-450 $^{\circ}\text{C}$ arasında toplam kütle kayıpları Fib/PCL fiberler için %100 ve E2Fib/PCL fiberler için ise %98,8 olarak belirlenmiştir. AgNPs içeren Fib/PCL-Ag fiberler ise 2 basamaklı ısıl bozunma gösterirken, E2Fib/PCL-Ag fiberler 3 basamaklı ısıl bozunma profili sergilemiştir. Bu fiberler için kütle kayıpları 200-600 $^{\circ}\text{C}$ aralığında meydana gelmiş olup bu sıcak aralığında kütle kayıpları E2Fib/PCL-Ag fiberler için %100, Fib/PCL-Ag fiberler için %86,5 olarak izlenmiştir. 400 $^{\circ}\text{C}$ civarında AgNPs içeren fiberlerde yaklaşık %20

oranında kalan kütle, kül kalıntısı olarak değerlendirilmiştir. AgNPs içeren fibroin fiberler için 400 °C civarındaki kütle kayıpları literatürdeki veriler ile uyumlu sonuçlar göstermektedir [164]. Bu verilerden yola çıkarak AgNPs'lerin fiber yapısına eklenmesinin ısıl bozunma profilini değiştirdiği gözlenmiştir [165].

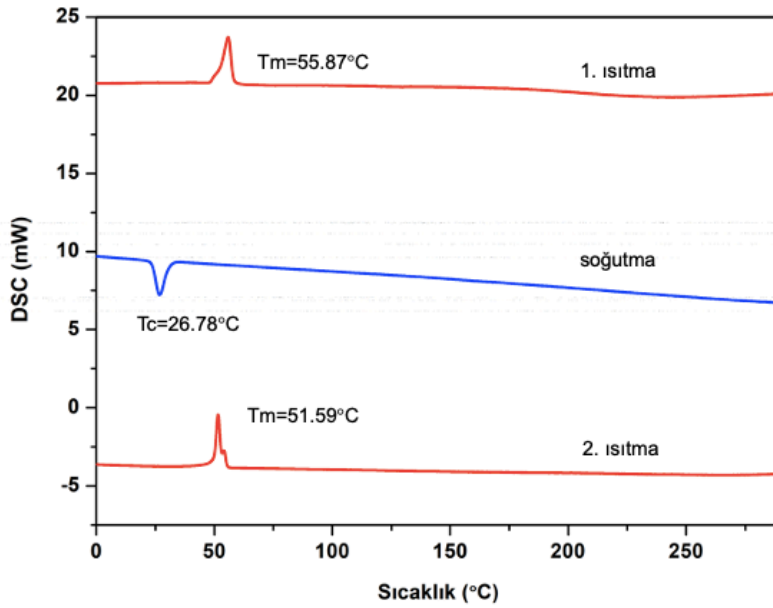


Şekil 6.5. Fiberlerin TGA termogramı.

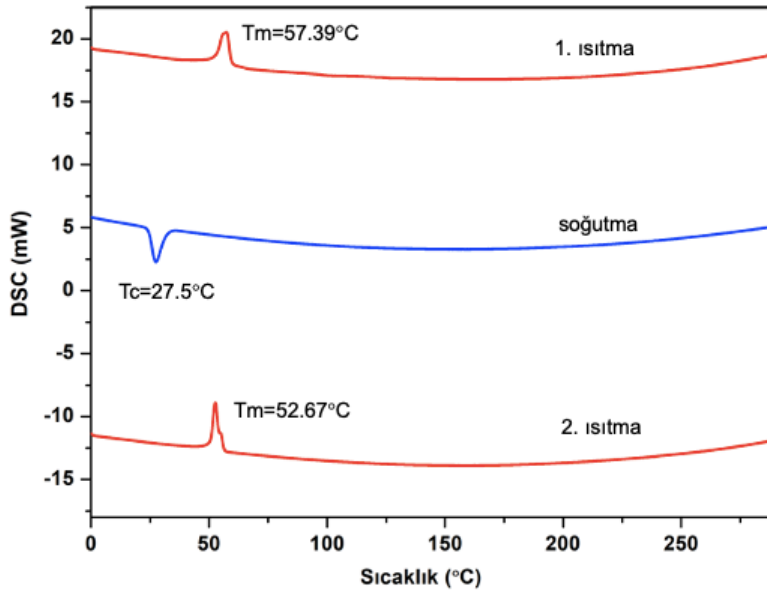
DSC analizleri polimer harmanlarının; karışabilirlik, moleküllerarası etkileşimler, kristallenme derecesi gibi özellikleri hakkında bilgiler sunmaktadır. Fib/PCL fiberlerin DSC analizleri 0-250 °C aralığında gerçekleştirilmiş ve elde edilen termogramlar Şekil 6.6-7'de verilmiştir. Bu sıcaklık aralığında DSC termogramlarında ısıtma ve soğutma döngülerinde sadece endotermik ve ekzotermik pikler izlenmiştir. Isıtma döngülerinde görülen endotermik pikler, polimerlerin erime sıcaklığını (T_m) verirken, soğutma döngülerindeki ekzotermik pikler polimerlerin kristallenme sıcaklığını (T_c) göstermektedir [165].

Fib/PCL fiberler 1.ısıtmada 55,87 °C'de, ikinci ısıtmada ise 51,59 °C'de endotermik pik göstermiş olup bu pik erime sıcaklığı (T_m) ile ilişkilendirilmiştir. T_m değerlerinde görülen bu kayma polimer zincirlerinin yeniden düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Fib/PCL fiberlerin 26,78 °C'de göstermiş olduğu ekzotermik pik ise T_c 'dir (Şekil 6.6). E2 içeren fiberlerin (E2Fib/PCL) T_m değerleri, 1. ısıtmada 57,39 °C, ikinci ısıtmada ise

52,67 °C olduğu endotermik pikler ile izlenmiştir. Bu fiberlerin Tc değeri ise 27,5 °C’de izlenmiştir (Şekil 6.7).



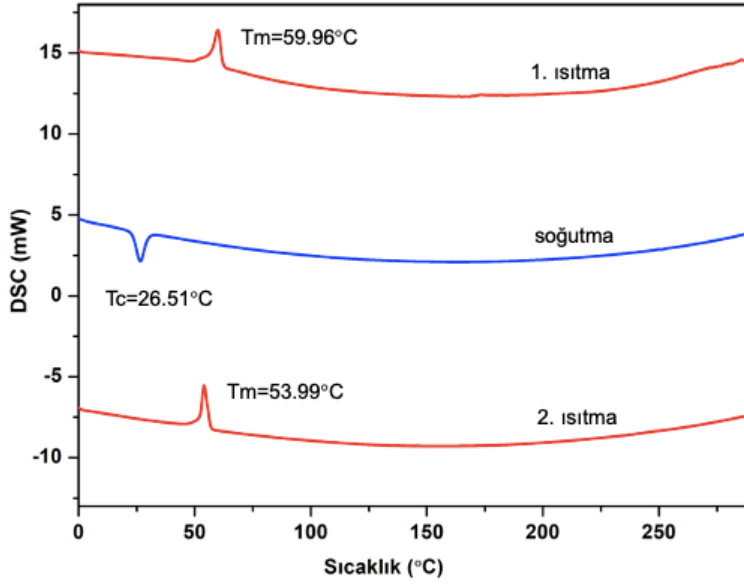
Şekil 6.6. Fib/PCL fiberlerin DSC termogramı.



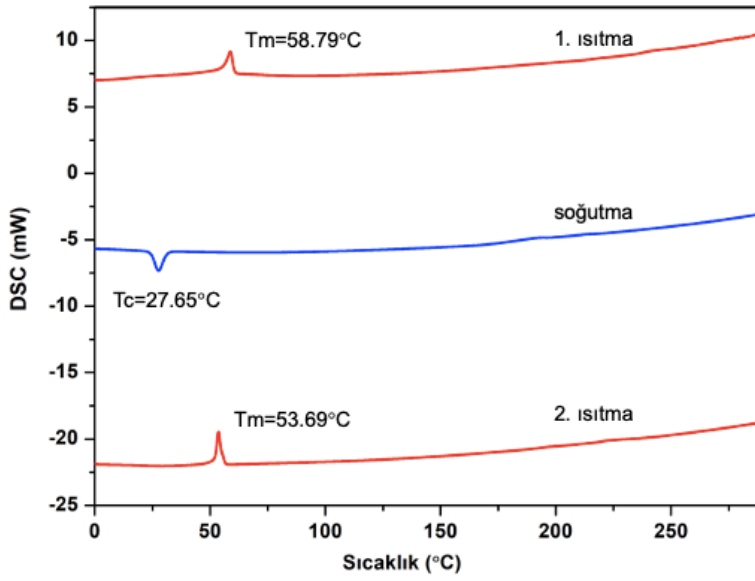
Şekil 6.7. E2Fib/PCL fiberlerin DSC termogramı.

Fib/PCL-Ag fiberlerin Tm değerleri, 1. ısıtmada 59,96 °C, ikinci ısıtmada 53,99 °C’ olup Tc ise 26,51°C’de izlenmiştir (Şekil 6.8). E2 ve AgNPs içeren fiberlerin (E2Fib/PCL-Ag)

Tm değerleri; 1. ısıtmada 58,79 °C, ikinci ısıtmada 53,69 °C olarak bulunmuştur. Bu fiberlerin Tc ise 27,65°C olarak gözlenmiştir (Şekil 6.9).



Şekil 6.8. Fib/PCL-Ag fiberlerin DSC termogramı.

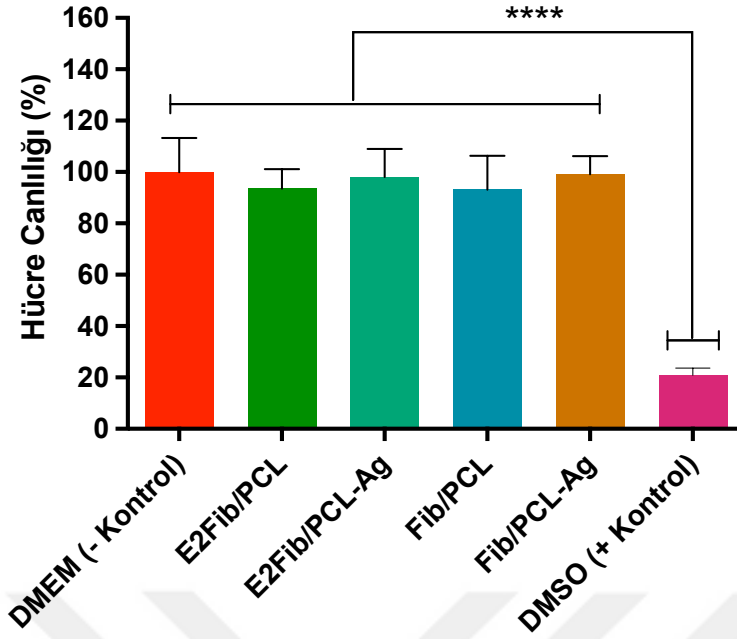


Şekil 6.9. E2Fib/PCL-Ag fiberlerin DSC termogramı.

DSC analizleri 0-250 C⁰ aralığında gerçekleşmesinden dolayı termogramlarda camısı sıcaklığı (Tg) izlenmemiştir. Literatürde PCL polimerinin erime sıcaklığı 56,6 °C ve kristalleşme sıcaklığı ise 30,1 °C olarak verilmiştir [165]. Diğer taraftan *Bombyx mori* ipek fibroini amorf (α helix yapısı, Silk I) ve kristal (β tabaka yapısı, Silk II) bölgelere sahip bir proteindir. Ancak fibroin işlem gördükten sonra bu yapıdaki amorf ve kristal yapıdaki değişikliklerden dolayı ısıl özelliklerinde farklılık gözlenmektedir. Örneğin; yapılan bir çalışmada amorf fibroin fiberlerin 190 °C Tg gösterdiği ve 270 °C'de ise bozunmanın başladığı bildirilmiştir. Bununla birlikte metanol ile işlem gören fibroin fiberler kısmi olarak kristal β -tabaka yapısına geçmesinden dolayı fibroin fiberlerin Tg değeri 190 °C, Tm ve Tc ise sırasıyla 275 ve 225 C⁰ olarak izlenmiştir (164). Diğer bir çalışmada ise saf fibroin filmler 289 C⁰'de, PCL fiberler 65.2 °C'de, fibroin/PCL fiberler ise içerdikleri fibroin miktarına bağlı olarak 57,1 °C ve 56,3 °C'de Tm göstermiştir [166]. Bu çalışmada ise fiberlerin DSC analizleri 0-250 C⁰ aralığında gerçekleşmiş olup bu sıcaklık aralığında izlenen Tm ve Tc değerleri literatür değerleri ile uyumlu bulunmuştur. E2 ve Ag etken maddelerinin Fib/PCL yapısına eklenmesi sonucunda, Tm değerlerinde artışa neden olmuştur. Polimer yapısına E2 eklenmesi ile yapıdaki hidrojen bağlarında meydana gelen artış, sterik engel yaratarak polimer zincirinin serbest dönüşünü yavaşlattığı ve bunun sonucu olarak Tm değerinde artış meydana geldiği düşünülmektedir. Buna ek olarak Fib/PCL fiberlerin yapısına eklenen Ag ise polimer zincirlerinin dinamiğini değiştirerek Tm değerinin artmasına neden olduğu değerlendirilmiştir [167].

6.2.4. Fiberlerin Sitotoksitesisi

Fib/PCL fiberlerin, E2 ve Ag içeren fiberler de dahil olmak üzere, tüm fiberler L929 hücre hattı için toksik etki göstermemiştir. Hücre canlılığı Fib/PCL fiberler için %93,06, E2Fib/PCL fiberler için, %93,46, Fib/PCL-Ag fiberler için; %99,1, E2Fib/PCL-Ag fiberler için ise %98,01 bulunmuştur. Fiberlerin L929 hücreleri üzerindeki % hücre canlılığı pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, fiberlerin hücre canlılığını üzerinde olumsuz bir etkisinin görülmediği saptanmıştır. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fiberlerin hücre canlılığı kabul edilebilir sınırlar içerisinde (Şekil 6.11). Tüm gruplar ile pozitif kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre canlılığı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır (p<0,0001).

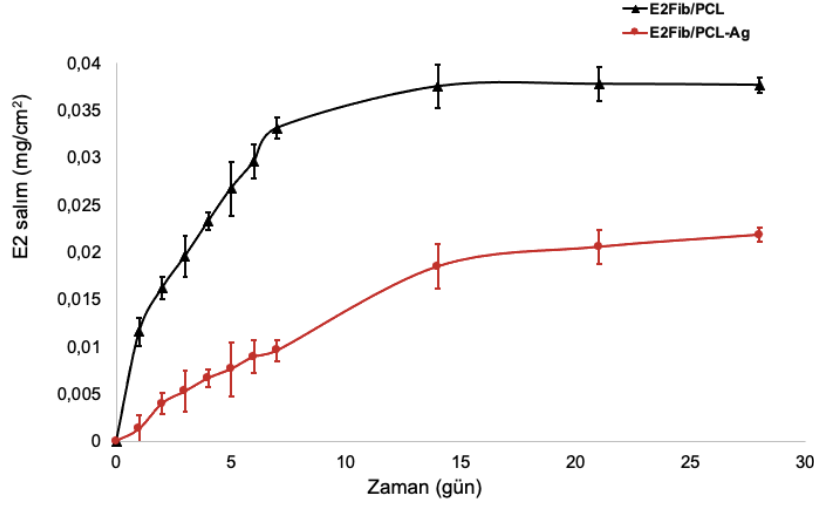


Şekil 6.10. Fib/PCL fiberlerin hücre canlılığına etkisi.

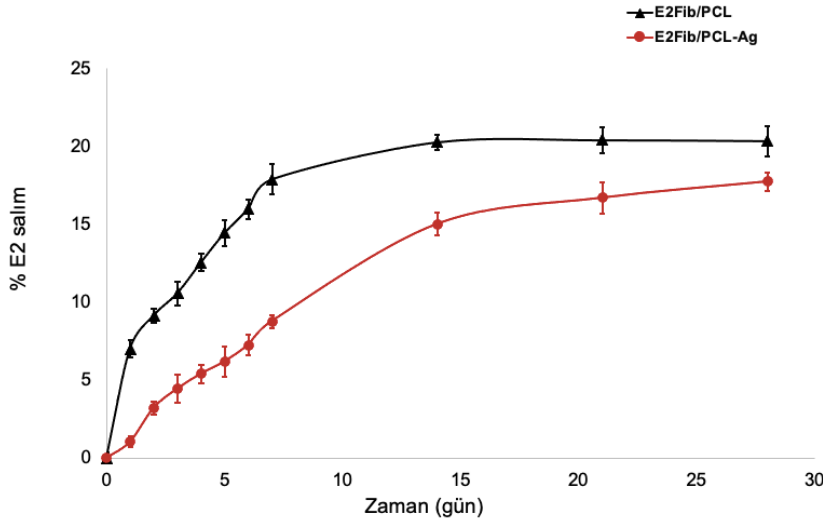
6.3. E2Fib/PCL-Ag fiberlerden E2 ve Ag Salım Profilleri

6.3.1. E2 Salım Profili

Fib/PCL fiberlerden E2 salım profili incelendiğinde her iki fiber formülasyonu için ilk 7 günde ani salım gözlenmiş olup, bu ani salımın fiberin geniş yüzey alanına bağlı olarak yüzeye yakın olan E2'nin difüzyon-bozunma sonucu salım ortamına daha hızlı geçmesine dayandırılmıştır (Şekil 6.11-12). E2 salımı 14. günde en yüksek konsantrasyona ulaşarak; E2Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberlerden sırasıyla 0,037 mg ve 0,021 mg olarak gerçekleşmiştir. Daha sonra sürekli bir salım profili izlenmiştir. E2 salımının E2Fib/PCL fiberlerde daha yüksek olmasının nedeni fiber üretim aşamasında %1 E2 içeren 12 mL Fib/PCL polimer çözeltisinin tamamının kullanılmasından kaynaklanmaktadır. İki katmanlı E2Fib/PCL-Ag fiberlerde ise E2 katmanını üretmek için %1'lik E2 içeren 6 mL polimer çözeltisinin kullanılmasıyla E2 miktarı yarıya düşmüştür. E2Fib/PCL fiberlerde bulunan E2'nin %20'sinin, E2Fib/PCL-Ag fiberlerde bulunan E2'nin ise %17'sinin PBS ortamına salımının gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 6.12).

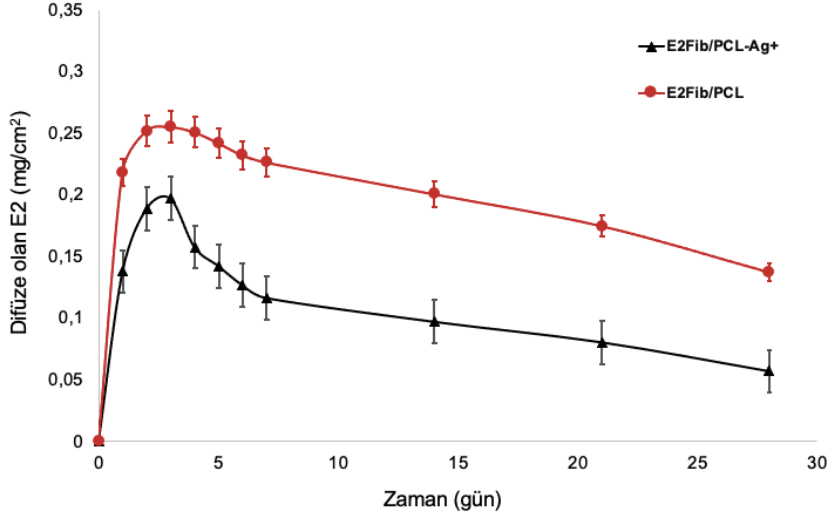


Şekil 6.11. Fib/PCL fiberlerden kümülatif salım grafiği.



Şekil 6.12. Fib/PCL fiberlerden E2 salımının % salım/zaman grafiği.

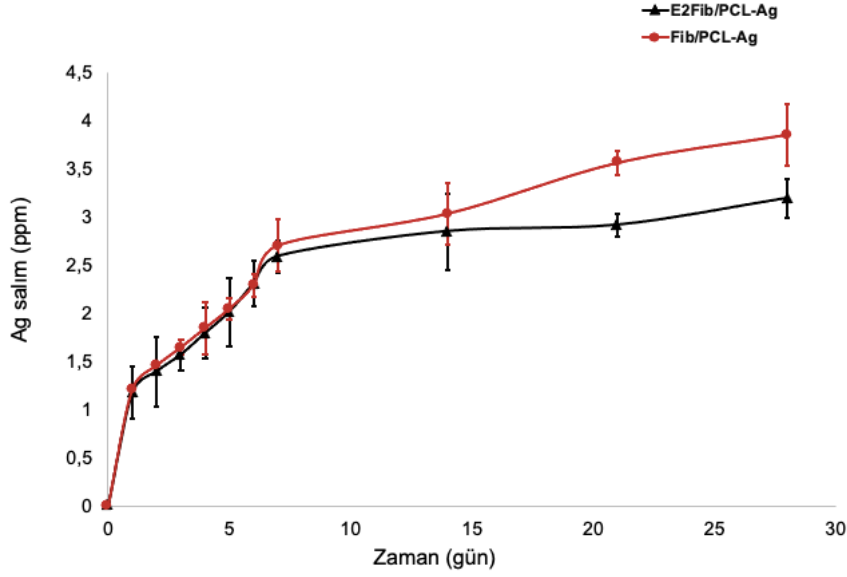
Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapılan salım çalışmaları sonucunda elde edilen E2 salım profili incelendiğinde ise ilk 3 günde ani salım gözlenmiştir (Şekil 6.13). E2Fib/PCL fiberlerde 3. günde 0,255 mg E2 ortama difüze olurken, E2Fib/PCL-Ag fiberlerden 3. günde 0,197 mg E2 membrandan difüze olmuştur. Daha sonra E2 salımı her iki fiber örneğinde de kademeli olarak azalmıştır. Bu azalan salım profilinin Franz hücresinin reseptör fazına her örnek alımından sonra taze PBS eklenmesiyle ortamdaki E2 miktarının seyreltilmesi sonucunda E2 konsantrasyonunun düşmesine dayandırılmıştır.



Şekil 6.13. E2Fib/PCL fiberlerin E2 difüzyon grafiği.

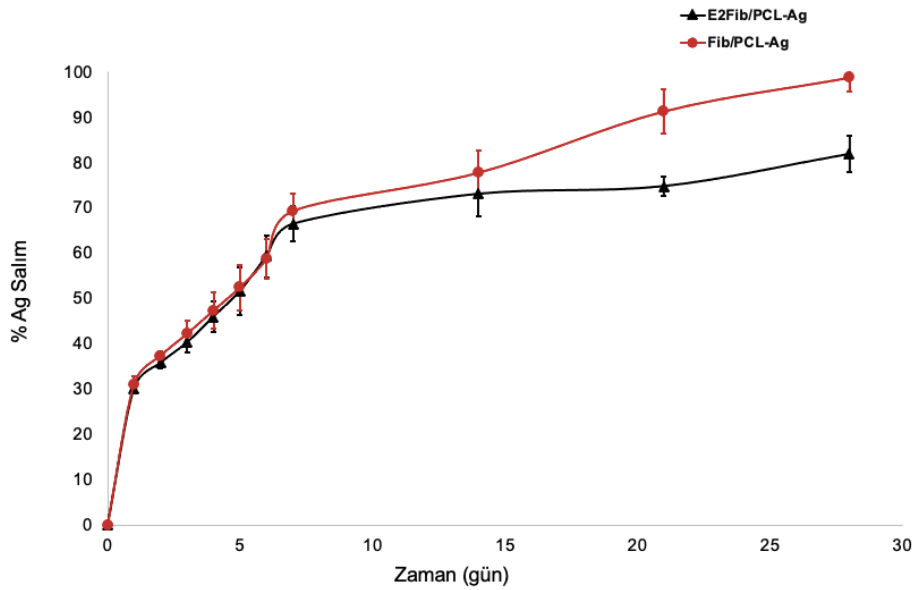
6.3.2. Ag Salım Profili

Fib/PCL fiberlerden Ag salımı incelendiğinde ilk 7 günde ani salım gerçekleştiği görülmüştür. E2 salım profiline benzer şekilde gerçekleşen bu ani salımın geniş yüzey alana sahip fiberlerde yüzeye yakın olan Ag'nin fiber yüzeyinden difüzyon-bozunma ile ortama daha hızlı geçmesine dayandırılmıştır (Şekil 6.14). 28. günde fiberler içerisindeki Ag salımı en yüksek konsantrasyona ulaşarak, Fib/PCL-Ag fiberlerden 3,85 ppm, E2Fib/PCL-Ag fiberlerden ise 3,19 ppm olarak gerçekleşmiştir. Daha sonra sürekli bir salım profili izlenmiştir. Ag salımının Fib/PCL-Ag fiberlerde daha yüksek olması, fiber üretim aşamasında %1 Ag içeren 12 mL Fib/PCL polimer çözeltisinin tamamının kullanılmasında kaynaklanmaktadır. E2Fib/PCL-Ag fiberlerde ise %1'lik Ag içeren 6 mL polimer çözeltisinin kullanılmasıyla Ag miktarı yarıya düşmüştür.



Şekil 6.14. Fib/PCL fiberlerin Ag salım grafiği.

Fib/PCL-Ag fiberlerden 28. günde Ag miktarının %98,7'sinin, E2Fib/PCL-Ag fiberlerden ise Ag miktarının %81,8'inin PBS/etanol ortamına salımı gerçekleşmiştir. Ag'nin % salım grafiği Şekil 6.15'te verilmiştir. Fib/PCL fiberlerden Ag salımı literatür verileri ile karşılaştırıldığında, literatürdeki sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalamak ve ark. yaptığı çalışmada 14. günde ipek fibroin fiberlerden Ag salımının % 63 olduğunu bildirmiştir [164]. Şekil 6.15'teki grafik incelendiğinde literatür ile uyumlu Ag salım miktarına ulaşıldığı görülmüştür.

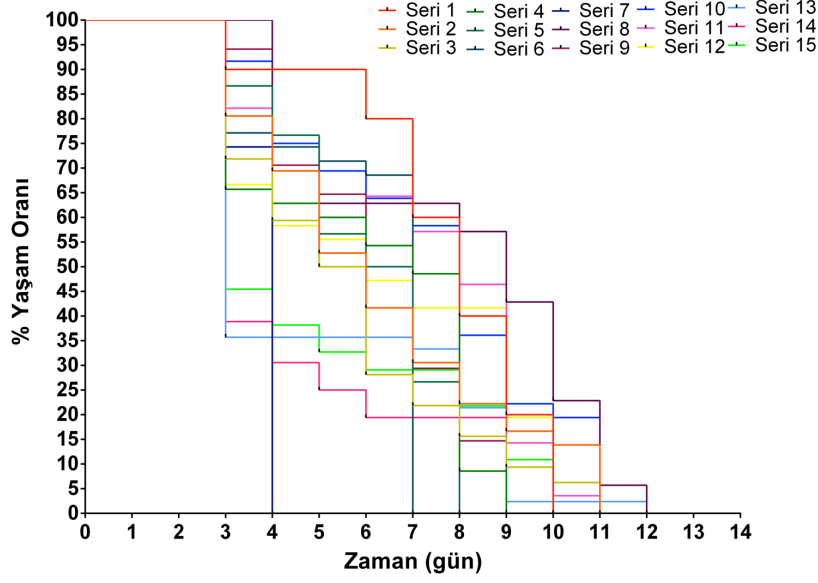


Şekil 6.15. Fib/PCL fiberlerin % Ag salım grafiği.

6.4. E2 Yüklü Fiberlerin Pro-anjiyogenik Etkileri

Biyomalzemelerin hayvan modelleri üzerinde test edilmesi, uzun soluklu ve pahalı çalışmalar olduğundan son yıllarda daha hızlı sonuç veren yöntemler öncelikli olarak tercih edilmektedir. *Ex ovo* bir yöntem olan koryoallantoik membran (CAM) testi doku yanıtının araştırılmasında kullanılmaktadır [168]. Bu tez kapsamında E2 içeren fiberlerin pro-anjiyogenik etkisi CAM testi ile incelenmiştir. CAM, civciv embriyosunda bulunan ve embriyonun dış ortamdan gaz alışverişini sağlayan bir organ olarak görev yapan ekstraembriyonik bir zar olup yoğun kılcıl damar ağlarına sahiptir. Aynı zamanda CAM, gelişen embriyonun üzerinde kaldığı için, deneysel müdahaleler için erişim kolaylığı sağlamaktadır. CAM testi ilaçların ya da biyomalzemelerin pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik yanıtlarının belirlenmesinde ve tümör anjiyogenezinin tüm yönleri ile araştırılmasında kullanılmaktadır [169]. CAM deneyi, *in ovo* ve *ex ovo* olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak yapılmaktadır. *In ovo* yöntemde, inkubasyon süresinden sonra, yumurta kabuğu üzerinde küçük bir delik açılır ve deneyler bu delikten sürdürülmektedir. Bu yöntemin kısıtlılıkları, CAM'e ulaşmada yaşanan sorunlar ve deney sonuçlarının fotoğraflanma aşamasında iyi bir görüntü alamama ve buna bağlı olarak güvenilir bir damar analizi yapamamak şeklinde sıralanabilir. *Ex ovo* kültürde ise, CAM'e olan erişim ve damar gelişiminin görüntülenmesi *in ovo* yöntemle kıyasla daha kolaydır [170]. Bu nedenle bu tez kapsamında E2 içeren fiberlerin anjiyogenik etkisi *ex ovo* CAM deneyi ile incelenmiştir.

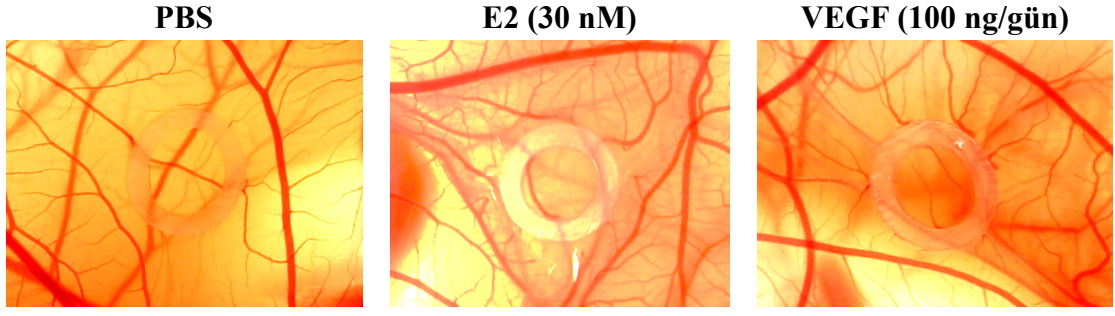
CAM deneyinde öncelikle embriyoların sağ kalım analizleri yapılmıştır (Şekil 6.16). Grafikteki verilerin ışığında, deney serilerinin optimizasyonu sağlandığında deney süresi boyunca yaşayan embriyo sayısının arttığı görülmüştür. CAM deneylerinde 15 deney serisi yapılmıştır. Her bir deney serisinde 36 adet embriyo yer almıştır. Deney serilerinin tekrar sayısı arttıkça embriyoların yaşam oranlarının arttığı sağ kalım analizi grafiğinde görülmektedir.



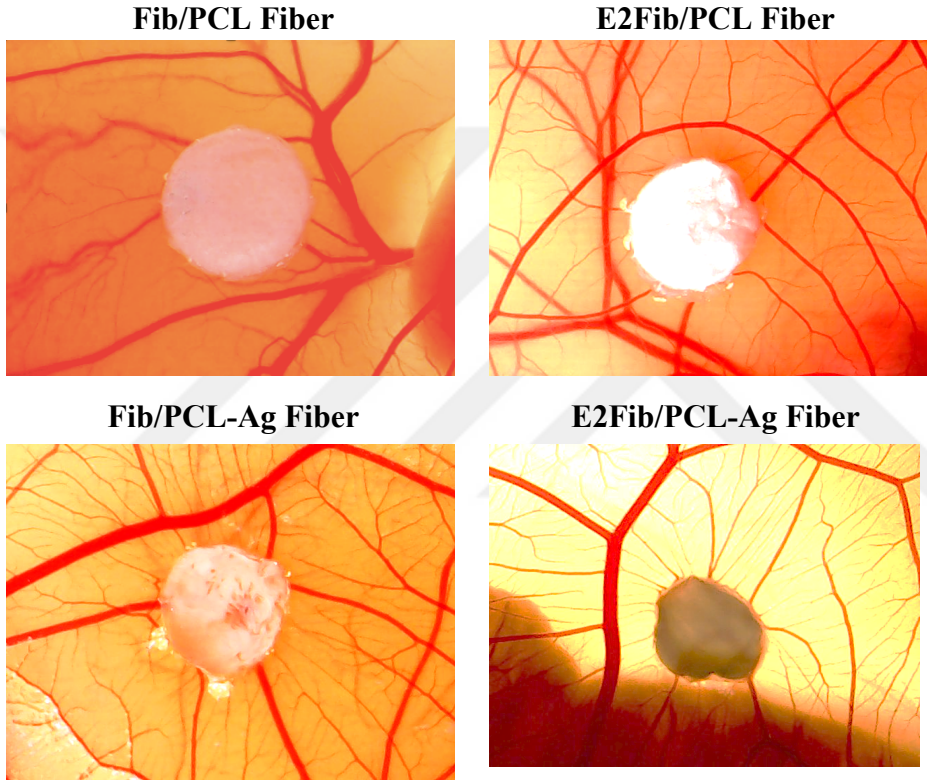
Şekil 6.16. Embriyoların sağ kalım analizi grafiği.

6.4.1. E2Fib/PCL Fiberlerin Pro-anjiyogenik Etkilerinin Görüntülenmesi

E2Fib/PCL fiberlerin pro-anjiyogenik etkilerinin görüntülenmesi amacıyla, CAM deneyinde embriyoların 10. günde fotoğrafları çekilmiştir. Kontrol gruplarında, yer belirteci olarak kullanılan halkaların içi ve etrafındaki damar oluşumları değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olan PBS grubunda embriyonun normal gelişime devam ederek, halka içinde ve etrafında yeni damarlar oluşturduğu, bir diğer kontrol grubu olan E2 grubunda ise, PBS grubuna kıyasla yeni kan damarları gelişiminin halka içerisinde ve çevresinde daha fazla olduğu, pozitif kontrol grubu olan VEGF grubunda ise halka içerisinde ve çevresinde yeni oluşan kan damarlarının her iki kontrol grubundan daha fazla olduğu fotoğraflarda görülmektedir (Şekil 6.17).



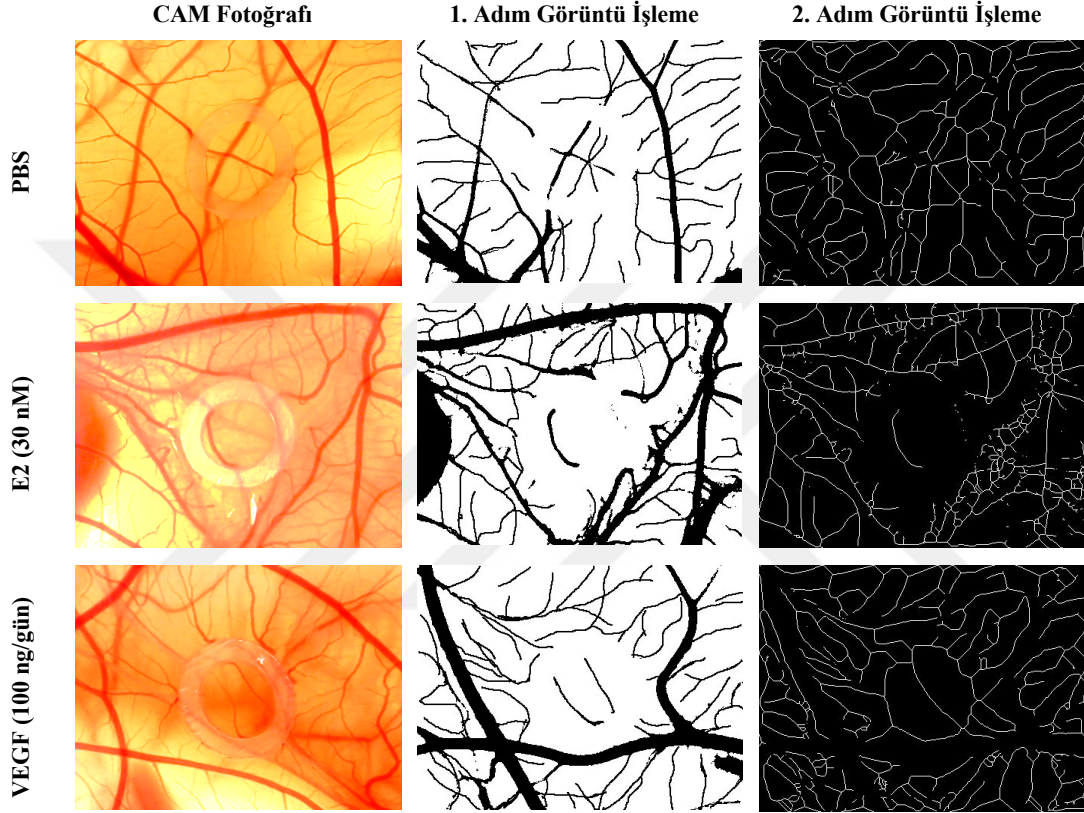
Şekil 6.17. Kontrol gruplarının CAM görüntüleri.



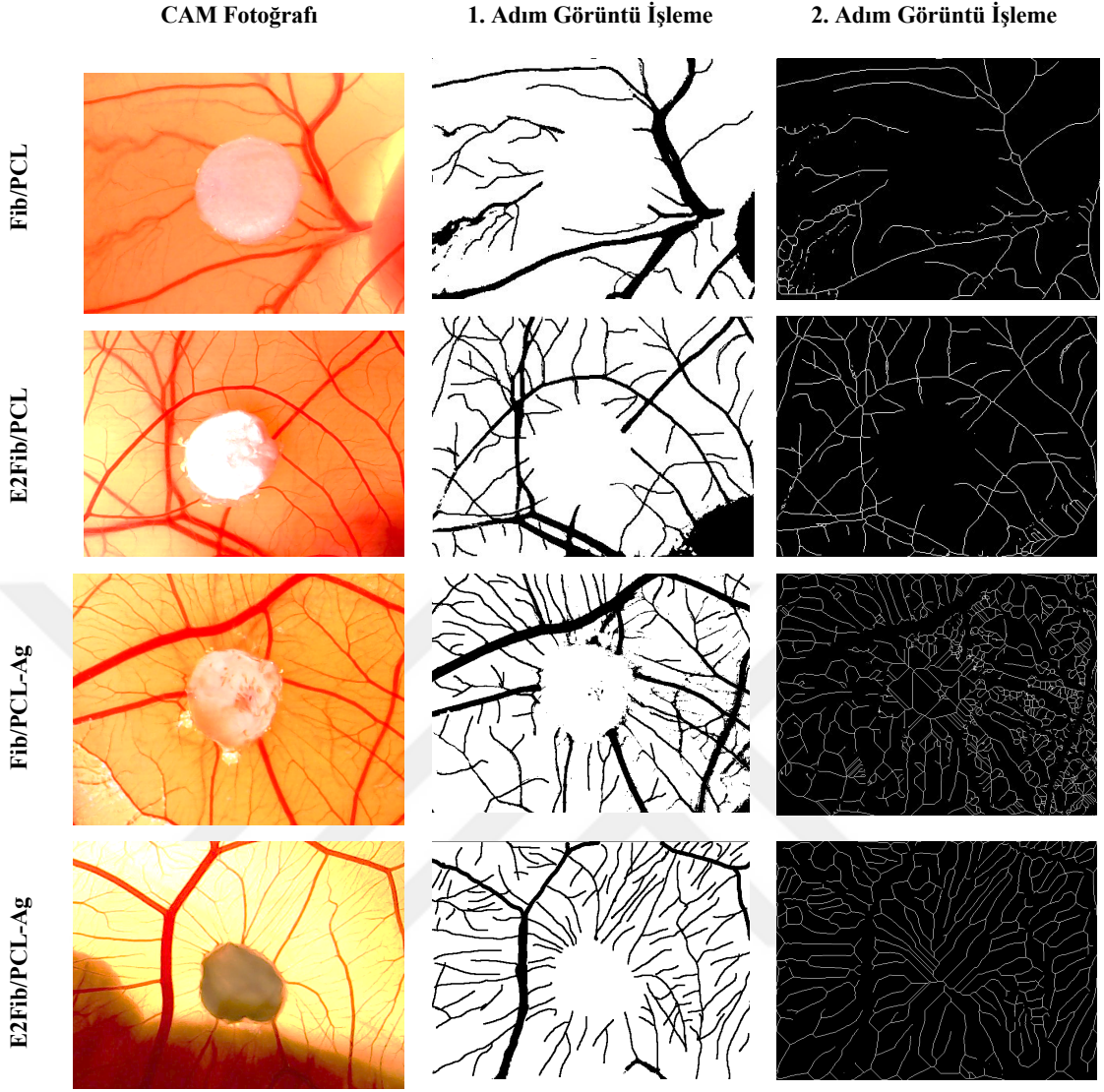
Şekil 6.18. Fib/PCL fiberlerin CAM görüntüleri

Deney gruplarında ise Fib/PCL fiberler, kontrol grubu olarak deney serilerinde yer almıştır. Deney grubu olarak ise E2 Fib/PCL fiberler, Fib/PCL-Ag fiberler, E2Fib/PCL-Ag fiberler yer almıştır. Fiberlerin pro-anjiyogenik etkilerinin gözlemlenmesi planlanırken, Fib/PCL-Ag grubunda, fiber içeriğindeki Ag varlığının embriyolar üzerindeki etkinliğinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. E2Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberlerde, Fib/PCL ve Fib/PCL-Ag fiberlere kıyasla yeni kan damarları oluşumunun arttığı görülmüş olup bunun fiber yapılardan salınan E2'nin etkisinden kaynaklandığı gözlenmiştir (Şekil 6.18).

E2Fib/PCL fiberlerin pro-anjiyogenik etkilerinin sayısal olarak belirlenmesi amacıyla, embriyoların 10. günlerinde çekilen fotoğraflar, Fiji görüntü analizi programı kullanılarak işlenmiştir. Görüntü işleme yöntemi, fotoğraflardaki damar yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 1. adımdaki görüntülerin iskelet görüntüsü olan, 2. adımdaki görüntüler kullanılarak (Şekil 6.19, Şekil 6.20), alandaki damar yoğunlukları hesaplanmıştır

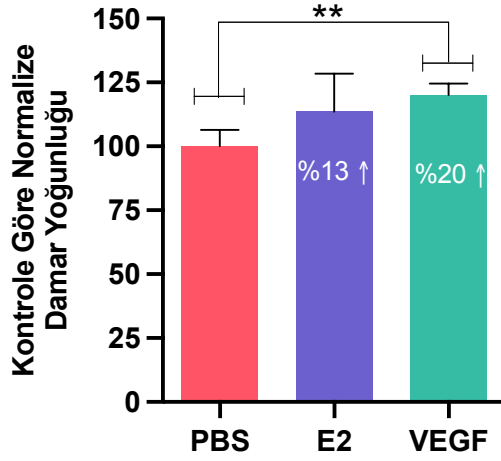


Şekil 6.19. PBS, E2, VEGF'e ait olan CAM fotoğrafları ve 1. (binary), 2. (skeletozize) adım işlenmiş görüntüler.



Şekil 6.20. E2Fib/PCL, Fib/PCL-Ag, E2Fib/PCL-Ag fiberlere ait olan CAM fotoğrafları ve 1. (binary), 2. (skeletonize) adım işlenmiş görüntüleri.

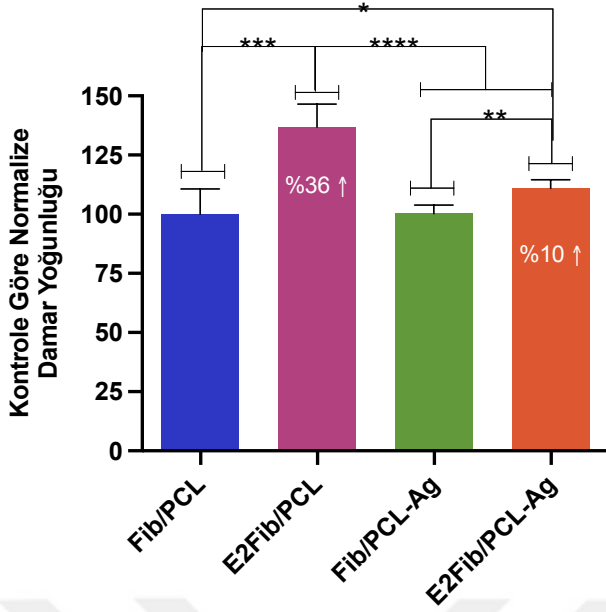
Kontrol grubu olan PBS grubuna göre normalize damar yoğunlukları Şekil 6.21’de verilmiştir. Elde edilen bu verilere göre, E2’nin kontrol grubu olan PBS’e göre damar yoğunluğunu %13 oranında, VEGF’in ise %20 oranında artırdığı görülmüştür. E2 ve VEGF’in anjiyogenik özellikleri, literatürde Dikici ve ark. tarafından CAM deneyi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada da VEGF’in anjiyogenik etkisinin olduğu ve E2’nin VEGF’e alternatif olabilecek kadar anjiyogenez üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [171].



Şekil 6.21. E2, VEGF gruplarının belirlenen CAM alanındaki kontrol grubu olan PBS grubuna göre normalize damar yoğunlukları. Yukarı yönlü ok artışı göstermektedir. ** p<0.01 temsil etmektedir.

Şekil 6.22'deki grafikte kontrol grubuna göre (Fib/PCL) normalize damar yoğunlukları verilmiştir. Bu verilere göre, E2Fib/PCL grubunda, kontrol grubuna göre damar yoğunluğunu %36 oranında, E2Fib/PCL-Ag grubunda ise, %10 oranında artırdığı görülmektedir (p<0.05). Fib/PCL-Ag grubunda ise bir artış tespit edilememiştir.

Fiberlerden E2 salımı *in vitro* salım deneyi ile doğrulandığından ve izlenen bu anjiyogenik etkinin fiberlerden salınan E2'nin etkisi olarak değerlendirilmiştir. Fiberlerden salınan E2, anjiyogenik etkisini göstererek yeni damar oluşumunu artırmıştır. Fiberlerin üretim sürecinde her bir grup fiber için aynı miktarda (12 mL) polimer çözeltisi kullanılmıştır. E2Fib/PCL fiber grubu üretilirken kullanılan polimer çözeltisinin tamamında E2 bulunurken (12 mL), iki katmanlı olan E2Fib/PCL-Ag grubunda ise çözeltinin yarısında (6 mL) E2, diğer yarısında (6 mL) Ag bulunmaktadır. Franz difüzyon deneyinden elde ettiğimiz verilere göre, E2Fib/PCL fiberlerden 3. günde salımı gerçekleşen E2 miktarı, 0,255 mg, E2Fib/PCL-Ag fiberlerden salımı gerçekleşen E2 miktarı ise 0,197 mg'dır. Bu nedenle E2Fib/PCL grubunun meydana getirdiği damar yoğunluğu artışı yüklenen E2 miktarına bağlı olarak E2Fib/PCL-Ag grubundan %26 oranında daha fazladır. Diğer taraftan Fib/PCL-Ag fiberlerin anjiyogeneze bir katkısının olmadığı ve % damar yoğunluğunun Fib/PCL fiberler ile aynı olduğu görülmüştür. Bu sonuç fiber yapısındaki Ag varlığının embriyo üzerinde toksik bir etki oluşturmadığını göstermiştir.



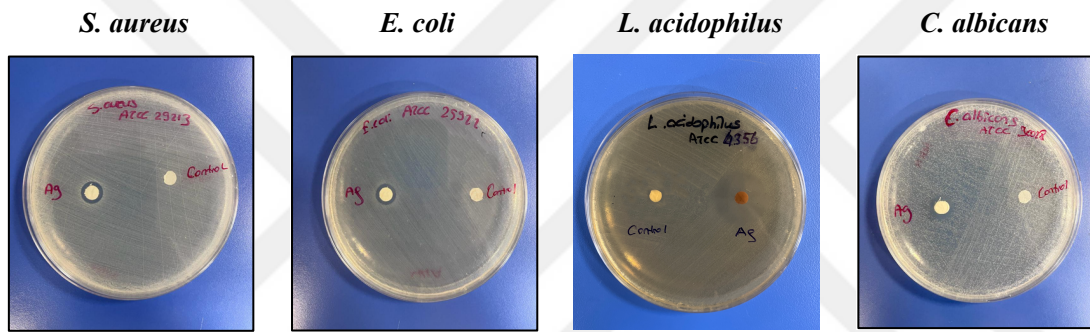
Şekil 6.22. E2Fib/PCL, Fib/PCL-Ag, E2Fib/PCL-Ag gruplarının belirlenen CAM alanındaki kontrol grubu olan Fib/PCL grubuna göre normalize damar yoğunlukları.

6.5. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Antibakteriyel Etkisi

E2Fib/PCL-Ag fiberlerin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amacıyla, mesane ve vajina florasında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 [146], *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [148] ve *Candida albicans* ATCC 90028 [147] suşları kullanılmıştır. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşu; mikrobiyota üyesi olup geliştirilen fiberlerin faydalı mikroorganizmalar üzerine etkisini test etmek amacıyla kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite Kirby-Bauer yöntemi baz alınarak test edilmiştir [149]

Bu amaçla yapılan disk difüzyon testinde fiberlerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları incelenerek çapları ölçülmüştür (Şekil 6.23). İnhibisyon zonlarına ait çap değerleri Çizelge 6.1'de yer almaktadır. Disk difüzyon testi sonuçları değerlendirildiğinde, E2Fib/PCL-Ag fiberlerde bulunan Ag nanopartiküllerin agar yüzeyine salımının gerçekleştiği ve mesane ve vajina florasında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Candida albicans* suşları üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Fib/PCL fiber çevresinde bu suşların üreme gösterdiği fakat E2Fib/PCL-Ag fiberlerin çevresinde üremediği görülmektedir. Literatürde yer alan verilerde de *Escherichia coli* [172], *Staphylococcus aureus* [173], *Lactobacillus*

acidophilus [174] ve *Candida albicans* [175] suşları üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Ag nanopartikülün farklı suşlar üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamakla birlikte bu inhibisyon çaplarının ortalamaları *S. aureus* için 8,8 mm, *E. coli* için 8,8 mm, *C. albicans* için 9,6 mm ve *L. acidophilus* için 21,1 mm olarak ölçülmüştür. Fiberlerin antibakteriyel etkinliklerinin saptanması amacıyla yapılan disk difüzyon testi sonucunda, *L. acidophilus* suşunun Ag nanopartiküllere karşı duyarlılığının, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarından daha fazla olduğu görülmüştür. Laktobasillerin asidik büyüme ortamlarının daha fazla Ag nanopartikül salımına sebep olduğu ve bu sayede daha fazla mikroorganizma üzerinde etkili olduğu literatürde de belirtilmiştir [174]. Deney sonuçlarından elde edilen veriler de literatür bilgisini destekler niteliktedir.



Şekil 6.23. Disk difüzyon testi sonucunda fiberlerin farklı bakteri suşları üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.

Çizelge 6.1. Disk difüzyon testi sonucunda fiberlerin farklı bakteri suşları üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm).

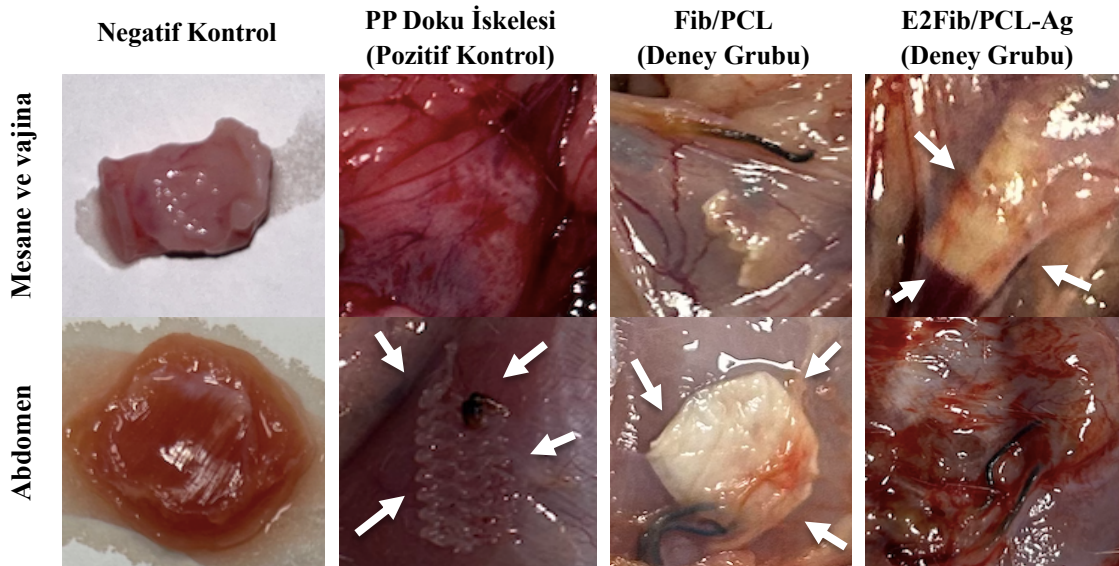
	E2Fib/PCL-Ag (mm)	Fib/PCL (Kontrol) (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	9,5	-
	8,5	-
	8,5	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9	-
	9	-
	8,5	-
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	21,5	-
	21	-
	21	-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10	-
	9,5	-
	9,5	-

Mikroorganizamalara etki eden Ag nanopartikül miktarları (MIC) literatürde, *S. aureus* için 5 ppm [176], *E. coli* için 3,4 ppm [177] ve *C. albicans* için 3,98 ppm [178] olarak belirtilmiştir. Ag salım çalışmasında, E2Fib/PCL-Ag fiberlerden ortama salımı gerçekleşen Ag miktarının 3,19 ppm olduğu sonucuna varılmıştır. Disk difüzyon testi sonucunda ölçülen inhibisyon zon çapları ortalamaları göz önüne alındığında, Ag nanopartiküllerin mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ag nanopartiküllerin, mikroorganizmaların hücre duvarında yapısal değişikliklere neden olduğu ve çekirdek zarına zarar vermek suretiyle öldürdüğü yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Ayrıca mikroorganizmaların DNA ve RNA yapılarında bozunmalara neden olarak üremelerini engellediği de bilinmektedir [179].

6.6. E2Fib/PCL-Ag Fiberlerin Doku İnterpozisyon Flepi Olarak *In Vivo* Yanıtı

Üretilen Fib/PCL fiberlerden E2 salımının *in vitro* salım deneyi ile doğrulanmasının ardından, E2'nin pro-anjiyogenik etkisinin araştırılması amacıyla *ex ovo* CAM deneyi yapılmış ve elde edilen sonuçlar E2 yüklü doku iskelelerinin damarlanmayı artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Ag ve E2 yüklü doku iskelelerinin inflamasyon, damarlanma ve doku organizasyonuna etkisi bakımından doku yanıtının araştırılması amacıyla, *Sprague Dawley* dişi sıçanlarda mesane ve vajinası arası ve abdomen olmak üzere iki farklı bölgeye, doku interpozisyon flep eşleniği olarak E2Fib/PCL-Ag fiberler implante edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında benzer yöndeki çalışmalarda üretilen biyomalzemeler ya abdomen bölgesine [180, 181] ya da mesane-vajina bölgesine [182, 183] implante edilmiştir. Bu çalışmada ise aynı hayvan üzerinde her iki vücut bölgesine doku interpozisyon flep eşleniklerinin yerleştirilmesi ile farklı vücut bölgelerindeki doku yanıtı karşılaştırılmıştır. Literatürde Chang ve arkadaşlarının çalışmasında, ipek fibroin doku iskelesi sıçanlarda abdomen, pelvik bölge ve vajinaya implante edilerek doku yanıtları hücre infiltrasyonu ve biyouyumluluk açısından araştırılmıştır. Elde edilen veriler akut inflamasyon bakımından abdomen, pelvik bölge ve vajinada fark oluşmadığını, ancak abdomen bölgesine implante edilen ipek fibroin doku iskelelerinde fibroblast büyümesinin daha hızlı olduğu, vajina bölgesinde ise abdomen ve pelvik bölgeye göre makrofaj infiltrasyonunun daha fazla olduğunu göstermiştir [184]. Bu çalışmada da implantasyon bölgesine bağlı olarak inflamasyon, damarlanma ve doğal doku organizasyonu bakımından benzer doku yanıtı olduğu tespit edilmiştir. Bunun muhtemel nedeninin üretilen malzeme içeriğinin farklı olması olarak düşünülmektedir.

In vivo çalışmada aynı hayvan üzerinde iki farklı bölgeye Fib/PCL fiberler, E2Fib/PCL-Ag fiberler, polipropilen (PP) ticari doku iskelesi implante edilmiştir. Negatif kontrol grubunda ise aynı cerrahi işlemler uygulanmış ancak doku interpozisyon flep eşleniği implante edilmemiştir. E2Fib/PCL-Ag fiberler mesane ve vajina arasına yerleştirilirken, fiberlerin E2 içeren yüzeyi mesane tarafına, Ag içeren yüzeyi ise vajina tarafına gelecek şekilde koyulmuştur. Bunun nedeni mesanenin yapısının steril olması ve vajinanın doğal florasında *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Candida albicans* suşlarının yer almasıdır. Ag varlığının bu suşlar üzerinde etkili olduğu yapılan antimikrobiyal aktivite testleri ile doğrulandığı için olası bir enfeksiyonun önüne geçilmesi hedeflenmiştir. E2Fib/PCL-Ag fiberlerin abdomene implantasyonunda ise, Ag içeren kısmının sıçanların cilt altı bölgesine gelecek şekilde konumlandırılmıştır. Bu yerleştirilmedeki amaç ise sıçanlarda cildin üst kısmında oluşabilecek enfeksiyon riskini en aza indirmektir. Fiberlerin E2 içeren kısmının cilt altındaki kan damarlarının üzerine yerleştirilmesinde de yeni kan damarlarının oluşumlarının desteklenerek yara iyileşmesinin hızlandırılması hedeflenmiştir. PP doku iskelesi ve fiberlerin implantasyon alanından uzaklaşmaması için kenarlarına bir sütür atılarak sabitlenmiştir. Şekil 6.24'te deney gruplarının ve kontrol gruplarının mesane ve vajina ile abdomen bölgeleri yer almaktadır. PP doku iskelesi ve fiberler ok işaretleri ile gösterilmiştir.



Şekil 6.24. Kontrol ve deney gruplarının mesane ve vajina bölgeleri ve abdomen bölgeleri.

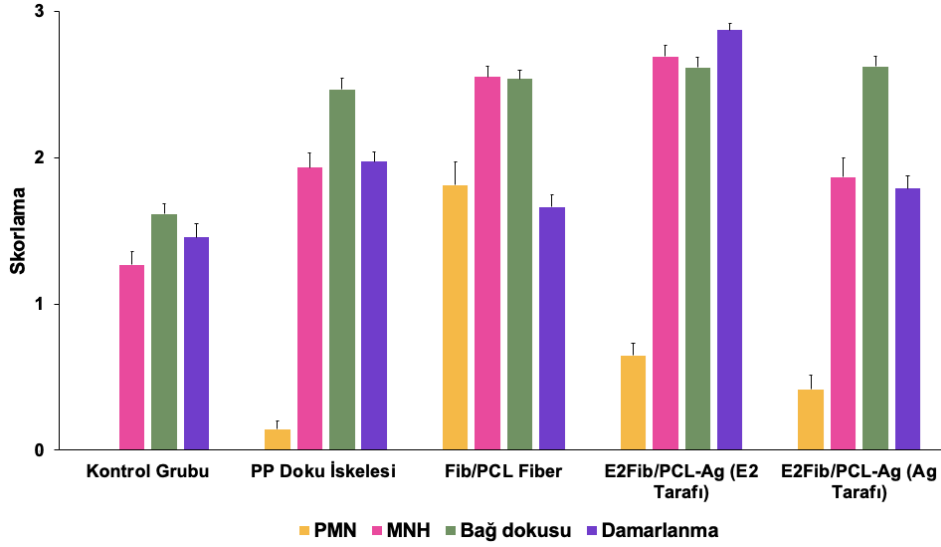
Yapılan makroskopik gözlemler 28 günlük deney sürecinin sonunda, PP doku iskelelerinin ve fiberlerin implantasyon bölgesinde doku ile bütünleştikleri görülmüştür. Bununla birlikte PP doku iskelesi 28 günün sonunda bozunmadan kalırken [181], fiberlerin yer yer bozunmaya başladıkları [185] ancak her iki bölgede doku iskelesi kaynaklı lezyon ya da komplikasyon oluşmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Kontrol, PP, Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiber yerleştirilen gruplardan, mesane ve vajina bölgesinden alınan doku örneklerine ait kesitlerde Hematoksilen-eozin ve Masson Trickrom'u boyamaları yapılarak, polimorfonükleer lökositler (PMN), mononükleer hücreler (MN), bağ dokusu organizasyonu ile damarlanma açısından skorlanmıştır. Bu alanlarda dev hücre sayımı yapılmıştır. Skorlamaya ait veriler mesane-vajina bölgesi için Çizelge 6.2'de ve grafikleri ise Şekil 6.25'de sunulmuştur.

Çizelge 6.2. Mesane-vajina bölgesinde, 10 farklı alanda sayılan ortalama PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damar sayısı*.

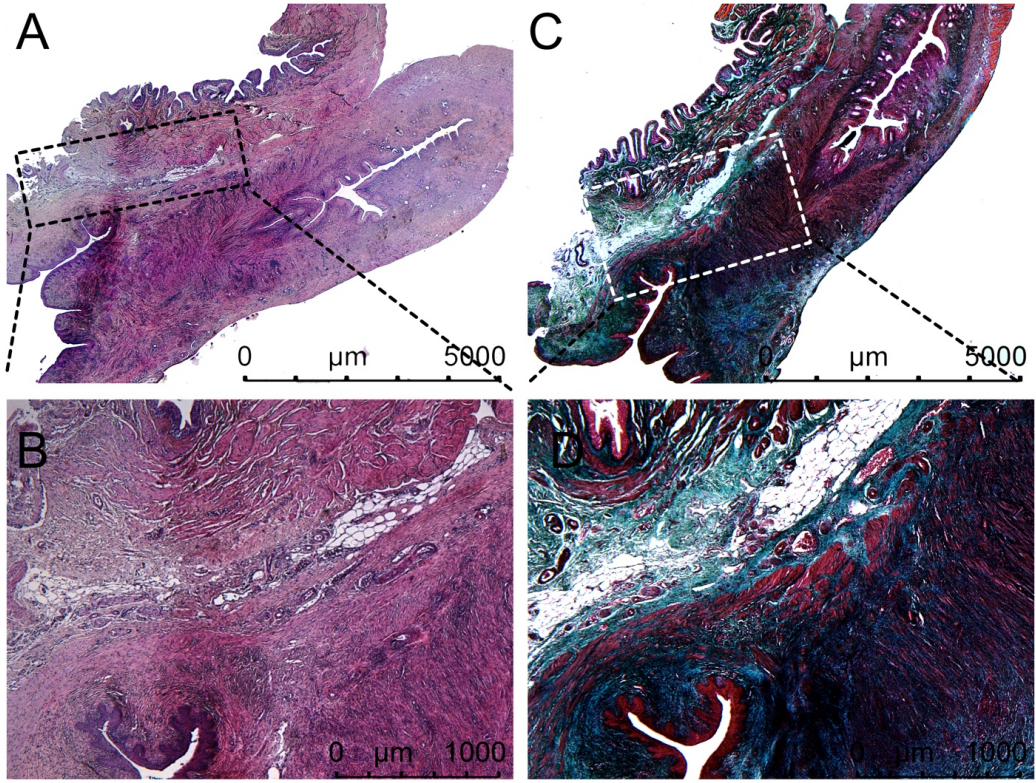
	Polimorfonükleer Lökositler	Mononükleer Hücreler	Bağ Dokusu Organizasyonu	Damarlanma
Kontrol	0	1,26	1,61	1,45
PP Doku İskelesi	0,14	1,92	2,46	2,02
Fib/PCL Fiber	1,81	2,55	2,53	2,46
E2Fib/PCL-Ag Fiber (E2 /Ag)	0,64/0,41	2,62/1,64	2,61/2,62	2,86/2,14

*(E2Fib/PCL-Ag fiber (E2/Ag); fiberin E2 ve Ag taraflarına ait skorlamalar birlikte verilmiştir).

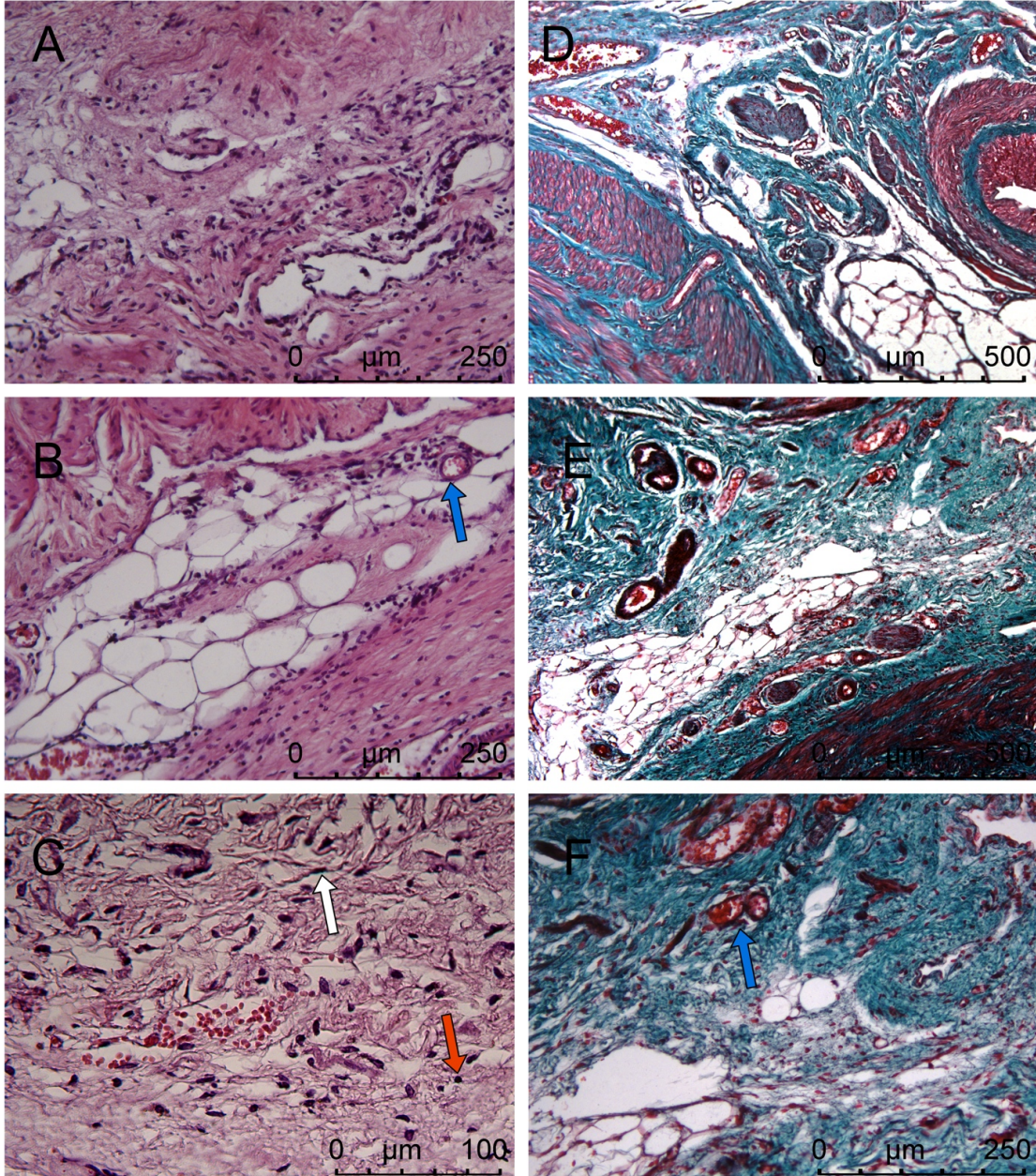


Şekil 6.25. Mesane ve vajina bölgesine ait 10 farklı alanda sayılan PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma verilerine ait grafik.

Mesane-vajina bölgesine implantasyonun yapıldığı çalışmada kontrol grubuna ait örneklerin ışık mikroskop incelemesinde kesitinin bir tarafında mesaneye ait değişici epitel, epitelin altında kan damarları, bağ dokusu hücreleri ve fibrilleri ile bağ dokusu, altında düz kaslardan oluşan kas tabakası izlenirken kesitin diğer tarafında çok katlı yassı epitel, bağ dokusu ve düz kas tabakası ile vajina izlenmiştir [186]. Mesanenin kas tabakasından vajinanın kas tabakasına geçiş alanı yer yer adipositler içeren gevşek bağ dokusu damarlanma, kollajen düzenlenimi ile normal histolojik görünümündedir (Şekil 6.26) [187]. Birkaç tane (alanda yok veya < 5) mononükleer hücre gözlenmiştir (Şekil 6.27, Çizelge 6.2). Sütürün olduğu alanda sütür materyaline karşı doku reaksiyonu izlenmiştir.



Şekil 6.26. Kontrol grubunda mesane-vajina ara yüzü. Mikrografların üst kısmında mesane, alt kısmında ise vajinaya ait tabakalar izlenmiştir. Mesanenin kas tabakası ile vajinanın kas tabakası arasında yer yer adipositler içeren gevşek bağ dokusu gözlenmektedir. Bu alandaki bağ dokusunun bir kısmı (dikdörtgen alan) B ve D de daha büyük büyütmede verilmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D:X40).

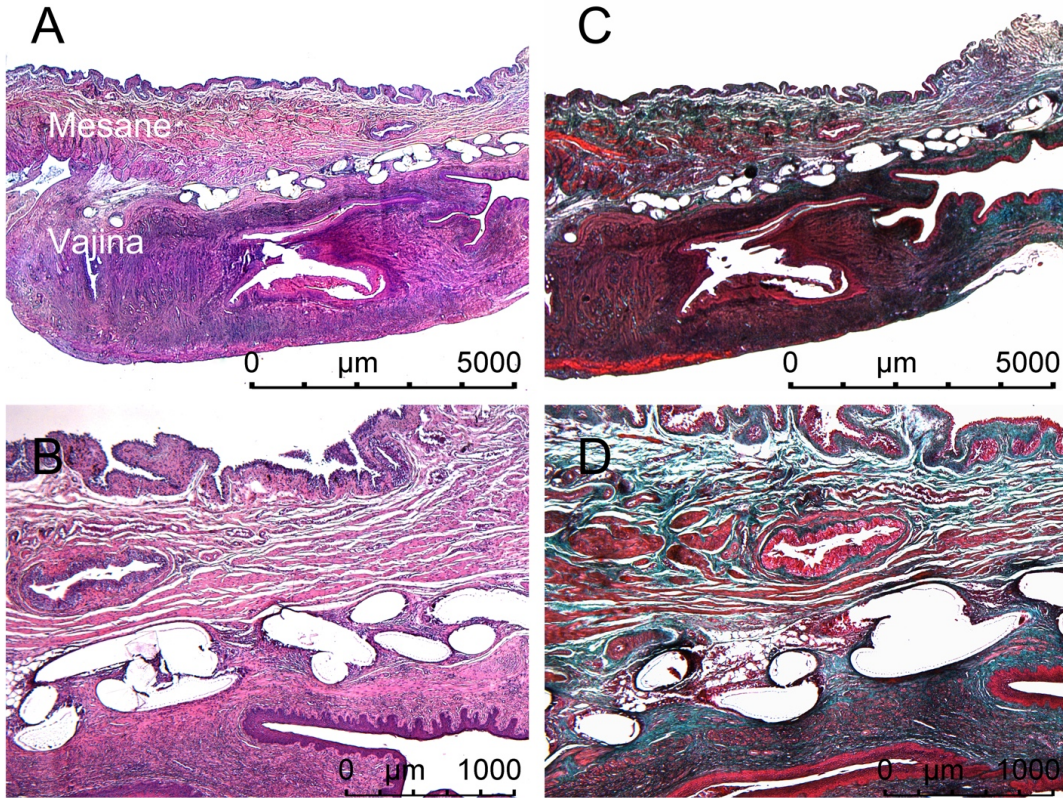


Şekil 6.27. Kontrol grubunda mesane-vajina ara yüzündeki bağ doku. Bağ dokusu içinde fibroblastlar (beyaz ok), kan damarları (mavi ok), çevresinde Masson'un trikrom boyası ile yeşil gözlenen kollajen fibriller, adipositler ve birkaç tane mononükleer hücre (kırmızı ok) izlenmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D:X40).

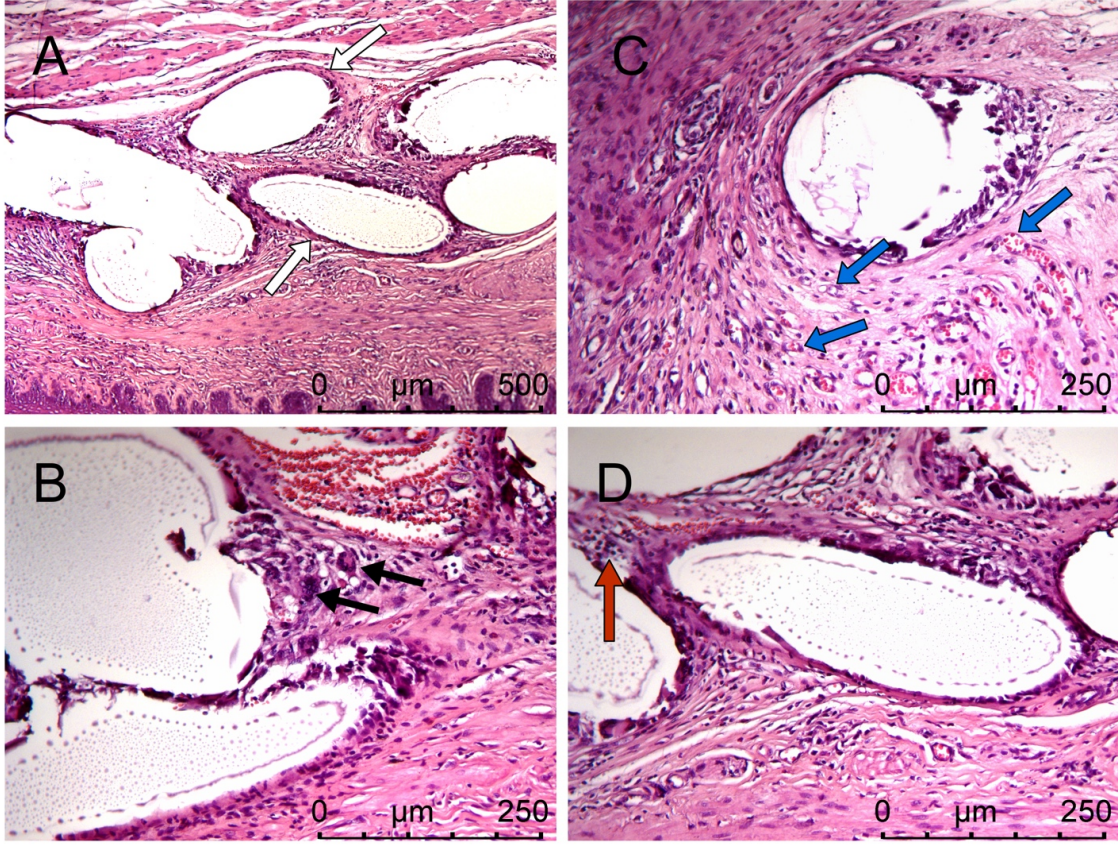
Vajina-mesane bölgesine implante edilen çalışmada PP doku iskelesi uygulanan grupta, mesane ve vajinanın kas tabakaları altında mesane ile vajina arasındaki bağ dokusunda polipropilene ait boş alanlar ve iskeletin makroporları arasını dolduran doku ile ayırt edilen PP doku iskelesinin bu alandaki dokuya iyi tutunarak entegre olduğu izlenmektedir (Şekil 6.28) [188]. PP doku iskelesinin polipropilene ait boş alanlarını çevreleyen dokuda

orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonu ve damarlanma, organize olmuş bağ dokusu ile kapsül varlığı ve ortalama $1,21 \pm 0,15$ dev hücre/alan gözlenmiştir (Şekil 6.29, Şekil 6.30, Çizelge 6.2).

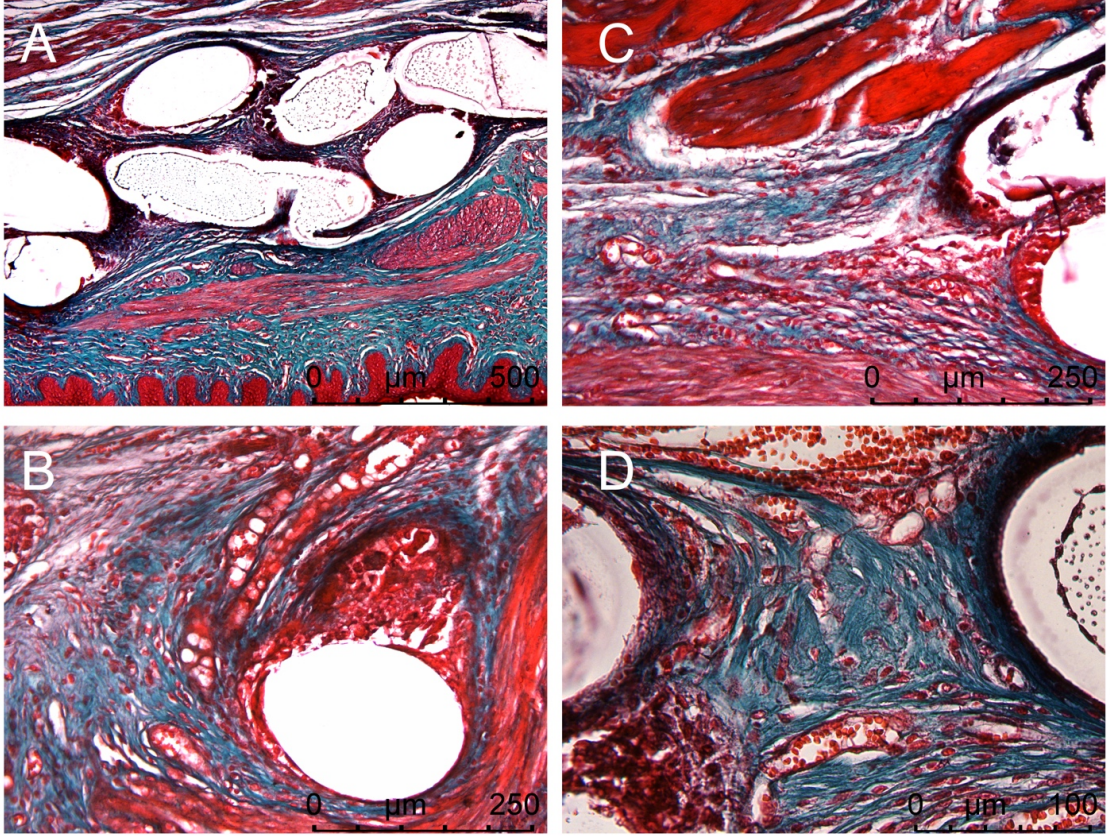
PP doku iskelesi, klinikte doku interpozisyon flep eşleniği olarak kullanılan bir biyomalzemedir. Roman ve ekibinin yaptığı çalışmada da elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiş poliüretan ve poli-l-laktik asit fiberlerin doku yanıtlarının araştırılmasında kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Üretilen fiberler bu çalışmada tavşanların abdomen bölgesine uygulanarak doku yanıtı araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarında da PP doku iskelesi çevresinde kapsül oluşumu, bağ dokusu oluşumu ve yabancı cisim reaksiyonundan kaynaklanan enfeksiyon görülmüştür [181]. Doku içerisinde bozunmadan kalan PP doku iskelesi, implante edildiği bölgede literatür ile uyumlu sonuçlar göstermiştir.



Şekil 6.28. PP doku iskelesi uygulanan grupta iskele ve komşuluğunda üstte mesane altta vajinanın kas tabakası izlenmektedir. Polipropilene ait boş alanların çevresinde iskelenin makroporları arasını dolduran doku ile mesane ve vajina arasındaki gevşek bağ dokuya entegre olduğu izlenmektedir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X40).



Şekil 6.29. Uygulanan PP doku iskelesinin mikrofiberlerinin çevresinde kapsül (beyaz ok), dev hücre (siyah ok), iskelenin makroporları arasını dolduran bağ dokusunda damarlanma (mavi ok) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok) izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, X200).

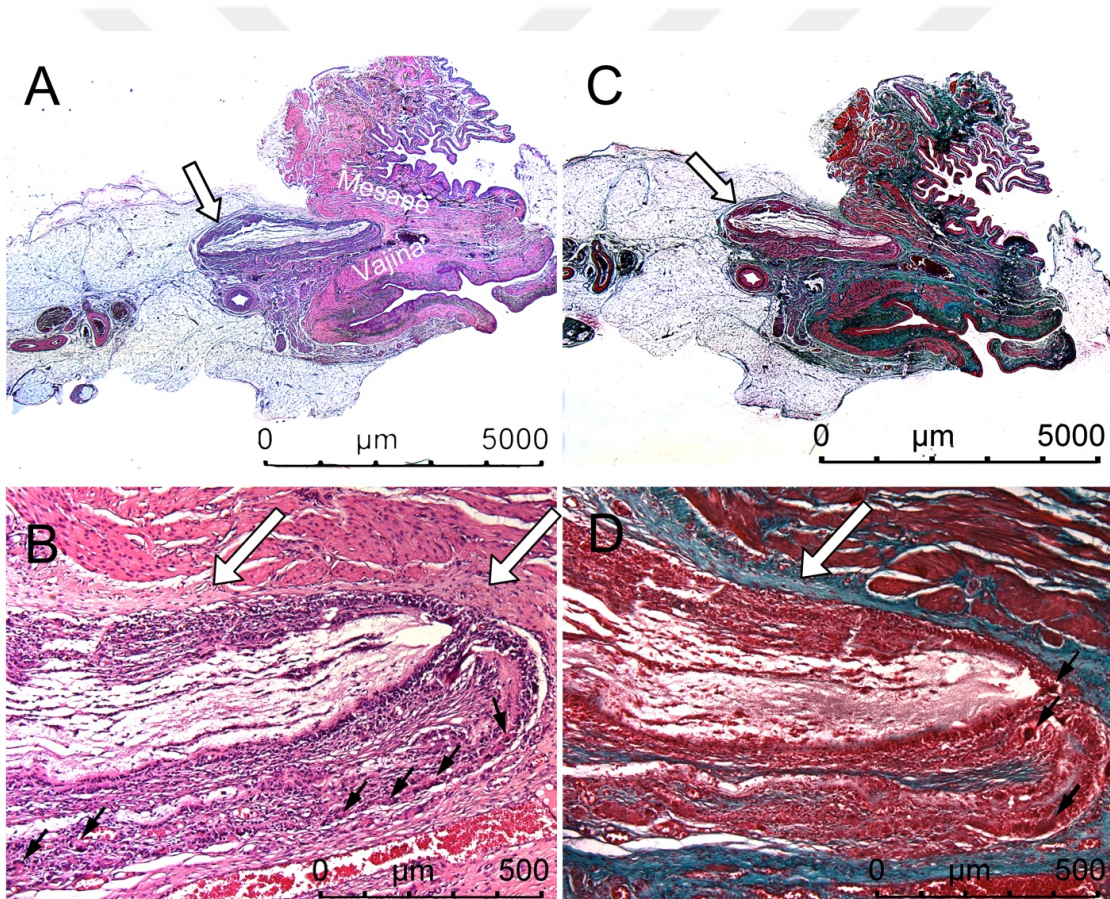


Şekil 6.30. Uygulanan PP doku iskelesinin mikrofiberleri çevresinde ince bir kapsül ve iskelenin makroporları arasını dolduran dokuda yeşil boyanan kollajen fibriller ile orta derecede organize bağ dokusu ve bu dokuda damarlanma izlenmektedir (Masson'un trikromu, A: X100, B, C: X200, D: X400).

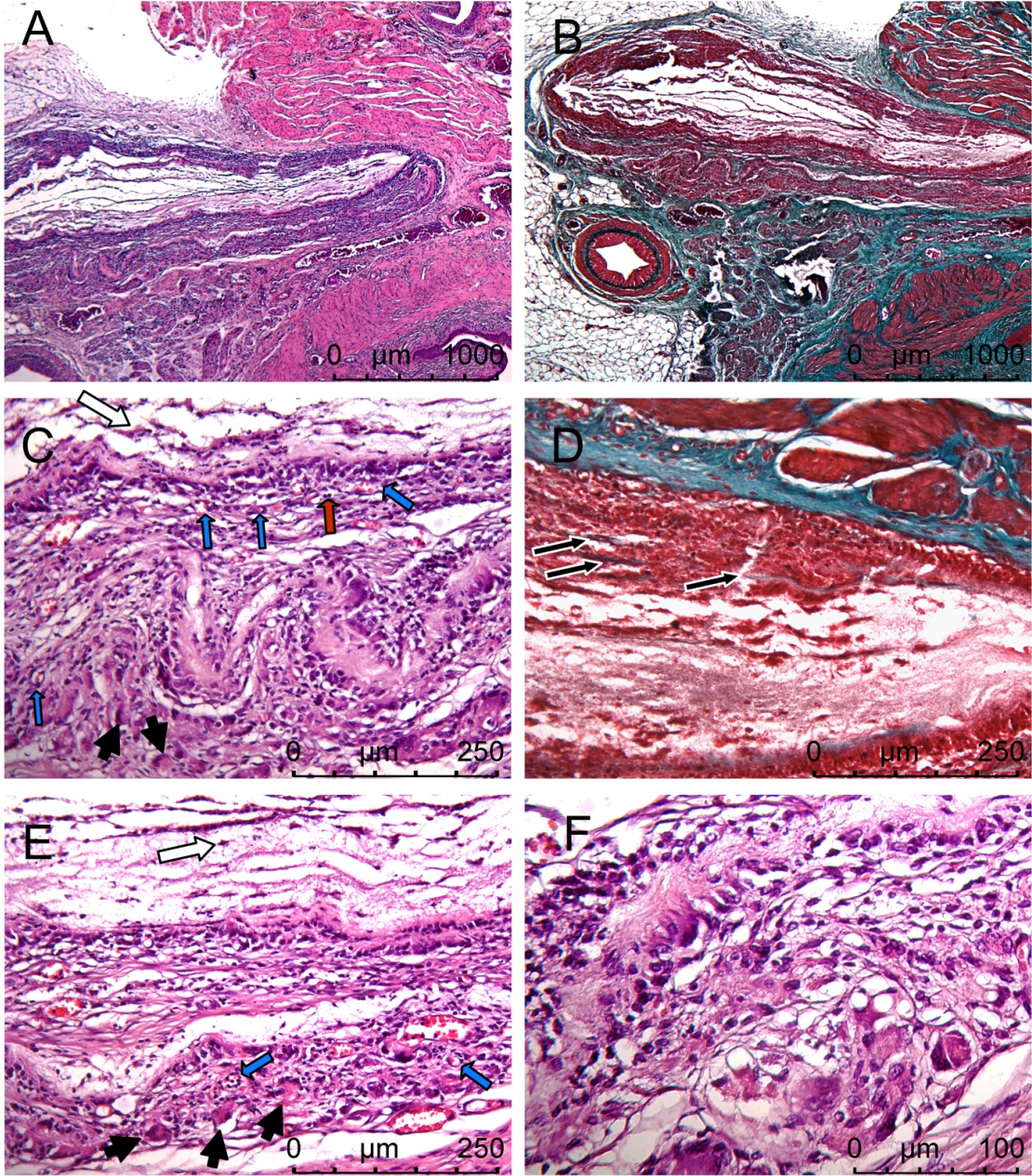
Fib/PCL fiber uygulanan grupta fiberlerin yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu ve çok çekirdekli dev hücreler ile sınırlandırılmaya çalışıldığı izlenmiştir (Şekil 6.31). Fiberin tam olarak bozunmadığı, ancak bozunmanın yer yer başladığı gözlenmiştir. Doku içinde çevresi histiositler ile çevrili homojen eozinofilik yer yer dalgalı görünümde yapının fiber içeriğindeki ipek fibroin ve PCL polimerinin bozunmaya başladığını düşündürmektedir. Literatürde yer alan ipek fibroin ve PCL fiber içeren *in vivo* çalışmalar, 28. günün sonunda Fib/PCL fiberlerin bozunma davranışı gösterdiğini desteklemektedir [185, 189]. Fiberin her iki tarafında epiteloid histiositler fiberi çevrelerken, fiber boşlukları içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri ve yer yer ince kollajen fibriller bulunmaktadır (Şekil 6.32). Bu grupta mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlanma ve dev hücreler (ort. $3,9 \pm 0,377$ dev hücre/alan) PP doku iskelesi uygulanan grubu göre daha fazladır. Fiberin çevresindeki bağ dokusu orta derecede organize olmuş bir bağ dokusudur (Çizelge 6.2).

Literatürde Diedrich ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada, koyun mesane-vajina bölgesine doku iskelesi yerleştirilerek doku yanıtı araştırılmıştır. Bu çalışmada da bozunma davranışı gösteren doku iskelesinin implante edildiği gruplarda hücre infiltrasyonu ve bağ doku oluşumunun PP doku iskelesi grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür [182]. Bu çalışmanın verileri de bizim elde ettiğimiz sonucu destekler niteliktedir.

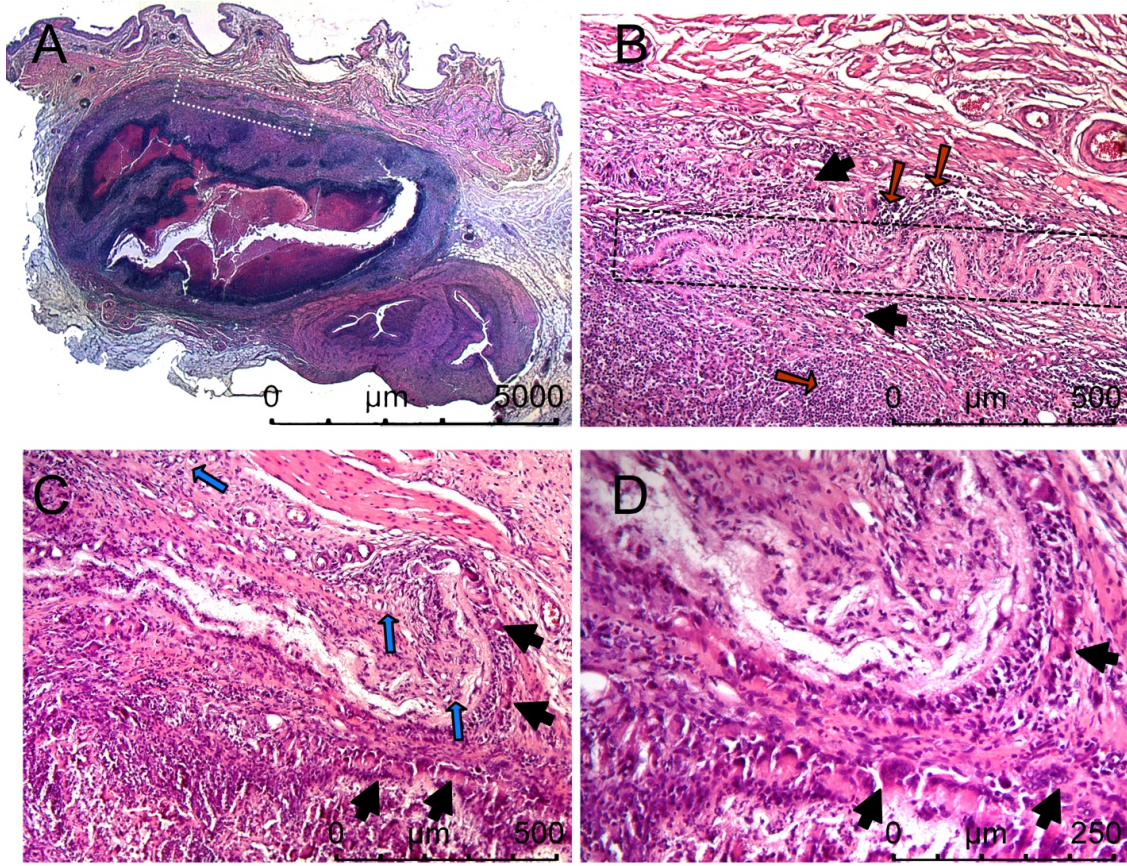
İncelenen 8 örnekten 4 tanesinde fiberin hemen altında fiberin bir parçasını da içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun polimorfonükleer, mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse oluşmuştur (Şekil 6.33).



Şekil 6.31. Mesane ile vajina arasında her iki organın kas tabakası altında bağ dokusu içinde fiber izlenmiştir. Fib/PCL fiberin çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah ok) ve kapsül (beyaz ok) gözlenmiştir (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, B: X12,5, C, D: X100).



Şekil 6.32. Uygulanan Fib/PCL fiberin içinde fibroblastlar (beyaz ok), ince kollajen fibriller (siyah ok), çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah okbaşı), damarlar (mavi ok) ve mononükleer hücreler (kırmızı ok) gözlenmektedir. Histiositler ile çevrili dalgalı görünümde homojen eosinofilik ipek fibroin yapılar izlenmiştir (A, C, E, F: Hematoksilen-eozin, B, D: Masson'un trikromu A, B: X100, C, D, E: X200, F:X400).

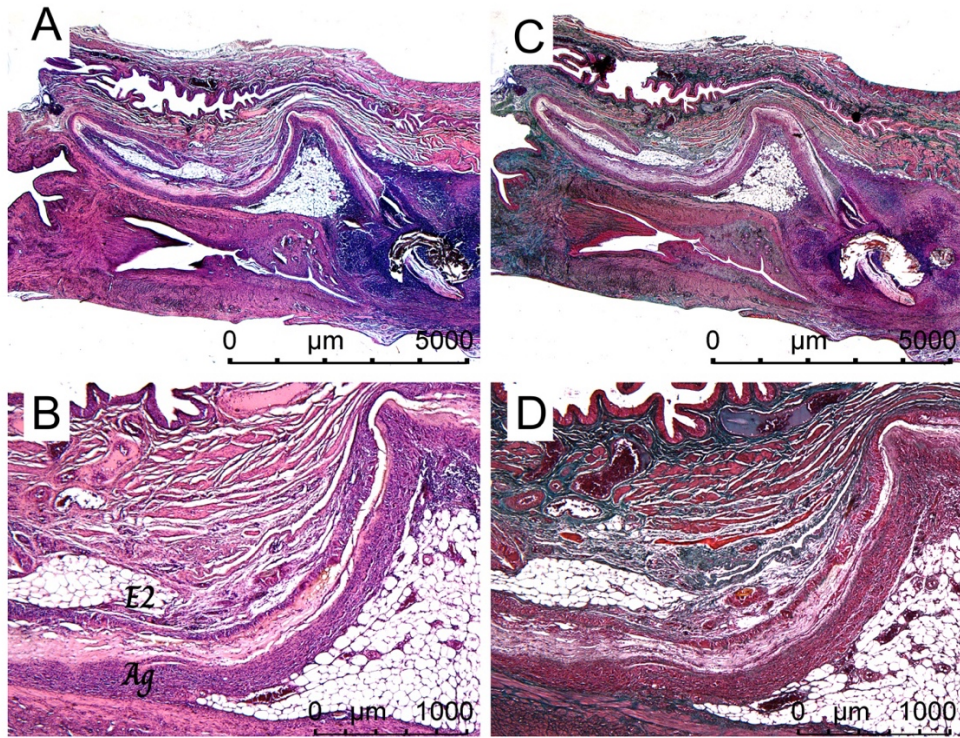


Şekil 6.33. Şekilde abse oluşan doku örneği görülmektedir. Absenin üst kenarında doku içinde ipek fibroin yapısı (çizgili dikdörtgen), çevresindeki dokuda çok çekirdekli dev hücreler (siyah okbaşı), damarlar (mavi ok) ve mononükleer hücreler (kırmızı ok) gözlenmektedir. Benzer yapılar Fib/PCL fiberin tüm çevresinde de izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, A: X12,5, B: X40, C: X100, D: X200).

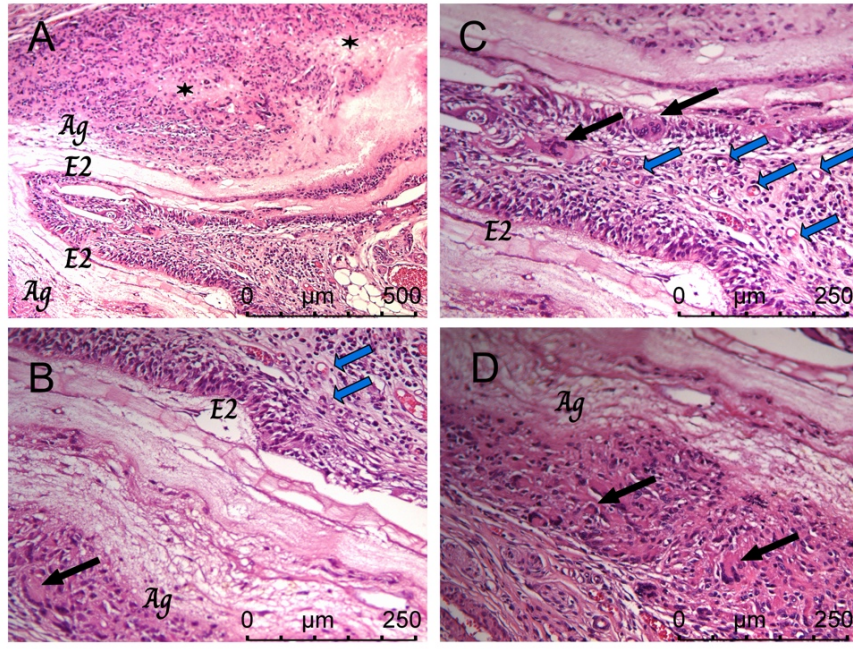
E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin doku içerisinde katlandığı, fiberin tam olarak bozunmadığı, ancak bozunmanın yer yer başladığı ve fiberlerin yabancı cisim reaksiyonuna neden olarak çok çekirdekli dev hücreler ile sınırlandırılmaya çalışıldığı izlenmiştir. Fiberin yer yer bozunma davranışı göstermesi de literatürdeki benzer çalışmalar ile örtüşmektedir [185]. Fiberin her iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu saptanmıştır (Şekil 6.34). E2 tarafında epitelooid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın arttığı, Ag tarafında histiositlerin varlığı ancak epitelooid özellikle olmadığı, bu tarafta çok daha fazla sayıda dev hücre olduğu, örneklerin bazı alanlarında da nekroz olduğu belirlenmiştir. Fiberin içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri bulunmaktadır (Şekil 6.35). Bu grupta E2 tarafında orta-ciddi derecede mononükleer hücre infiltrasyonu, orta derecede damarlanma ve dev hücreler (ort. $0,78 \pm 0,18$ dev hücre/alan) belirlenmiştir. Ag tarafında hafif-orta derecede mononükleer hücre

infiltrasyonu, orta derecede damarlanma ve dev hücreler (ort. $7,94 \pm 0,59$ dev hücre/alan) belirlenmiştir (Çizelge 6.2). Doku reaksiyonu PP doku iskelesi uygulanan gruba göre bu grupta daha fazla olduğu gözlenmiştir.

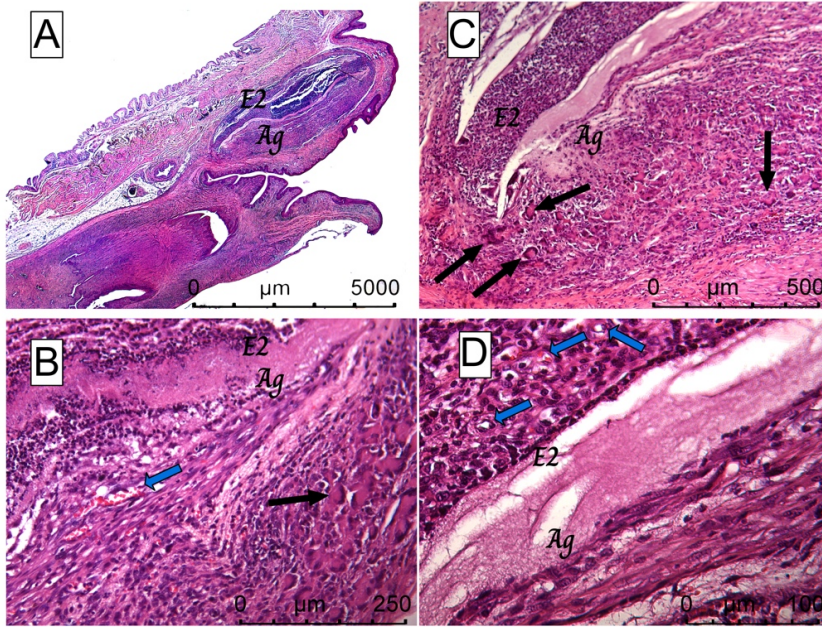
İncelenen 8 örnekten 3 tanesinde fiberi de içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse oluşumu gözlenmiştir (Şekil 6.36). Bu grup, Fib/PCL fiber uygulanan grup ile abse gözlenmesi açısından karşılaştırıldığında E2Fib/PCL-Ag grubunda daha az örnekte abse oluşumu belirlenmiştir.



Şekil 6.34. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin doku içerisinde katlandığı, tam degrade olmamakla birlikte degradasyonun başladığı ve fiberin iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X40).



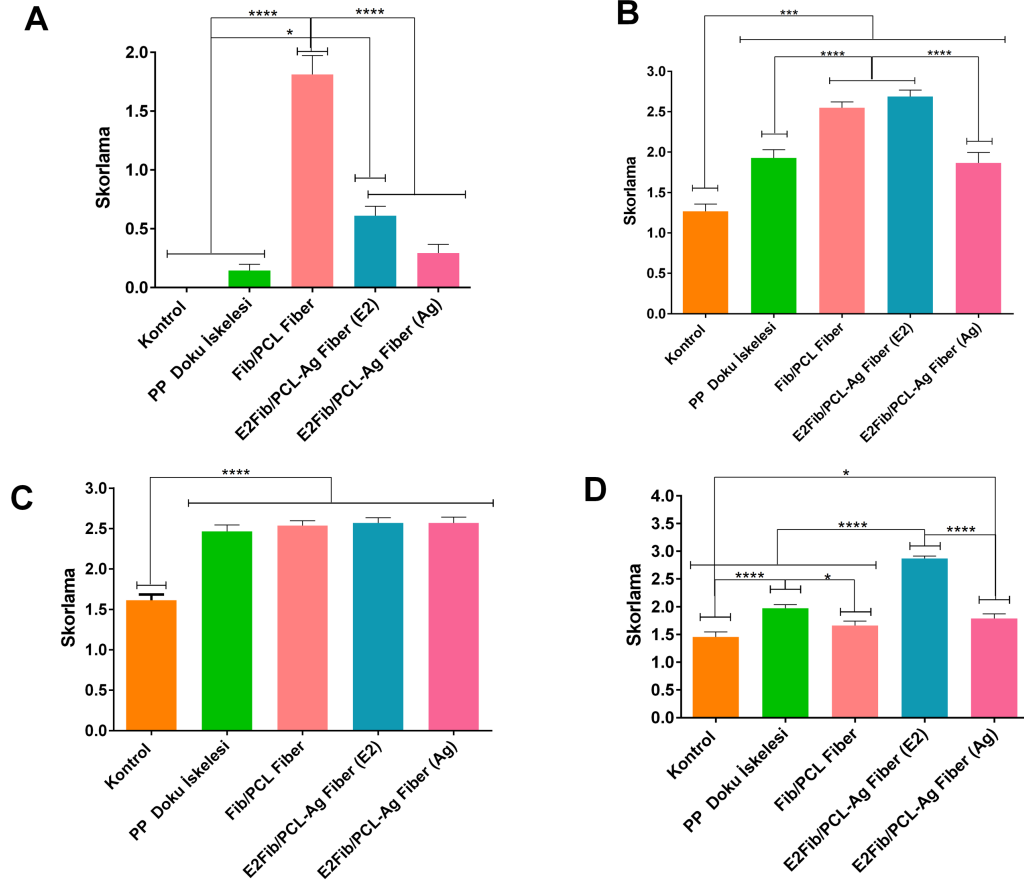
Şekil 6.35. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin E2 tarafında epitelioid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın (mavi ok) arttığı, Ag tarafında histiositlerin varlığı ancak epitelioid özelliğe olmadığı, bu tarafta daha çok sayıda dev hücre (siyah ok) olduğu, örneklerin bazı alanlarında bu tarafta nekroz (asteriks) gözlenmektedir. Fiberin içinde işçi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (Hematoksilen-eozin, A: X100, B, C, D: X200).



Şekil 6.36. E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberi içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse izlenmektedir. E2: E2Fib/PCL-Ag fiberinin E2 yüzü, Ag: E2Fib/PCL-Ag fiberinin Ag yüzü (Hematoksilen-eozin, A: X12,5, B: X200, C: X100, D: X400).

Doku reaksiyonu açısından, tüm gruplardaki PMN, MN skorlamaları ve bu alanlarda dev hücre sayıları istatistiksel olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlara dair detaylar aşağıda verilmiştir.

Polimorfonükleer lökosit skorlamaları açısından değerlendirildiğinde, en yüksek sayıda PMN Fib/PCL grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubunda ise PMN olmadığı tespit edilmiştir. E2Fib/PCL-Ag grubunun Ag tarafına kıyasla E2 tarafında daha fazla sayıda PMN tespit edilmiştir ($p>0.05$). MN skorlamaları açısından değerlendirildiğinde, en yüksek skor E2Fib/PCL-Ag grubunun E2 tarafında, en düşük skor kontrol grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$). PP doku iskelesi ile Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan gruplar karşılaştırıldığında tespit edilen farkın anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0.0001$). Tüm bu sonuçlar Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag gruplarında, PP doku iskelesi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde doku reaksiyonu gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. Vajina-mesane arasına implante edilen fiberlerin doku yanıtının tespit edilmesi için değerlendirilen parametreler arasında bağ doku organizasyonu ve damarlanma kritik öneme sahiptir [190]. Bu çalışmada da geliştirilen doku iskeleleri vajina-mesane arasına implante edilmiş ve 28 gün sonunda bağ dokusu organizasyonu ve damarlanma değerlendirilmiştir. Yapılan skorlama bağ dokusu organizasyonu açısından kıyaslandığında, kontrol grubu ve diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğunu ($p<0.0001$), ancak deney gruplarında benzer birbiri ile benzer sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Son olarak tüm gruplar damarlanma skorlamaları açısından istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde, kontrol grubu, PP ve Fib/PCL fiber yerleştirilen grup, E2Fib/PCL-Ag fiber yerleştirilen grup ile kıyaslandığında, E2Fib/PCL-Ag fiber grubunun E2 tarafında görülen damarlanma diğer tüm gruplarda ve bu grubun Ag tarafında görülen damarlanmadan fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Kontrol grubu ve E2Fib/PCL-Ag fiber grubunun Ag tarafında görülen damarlanma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmakla birlikte bu farkın daha az olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). E2Fib/PCL-Ag fiber yerleştirilen grupta E2 ve Ag taraflarında görülen damarlanma skorlamaları kıyaslandığında oluşan farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). (Şekil 6.37).



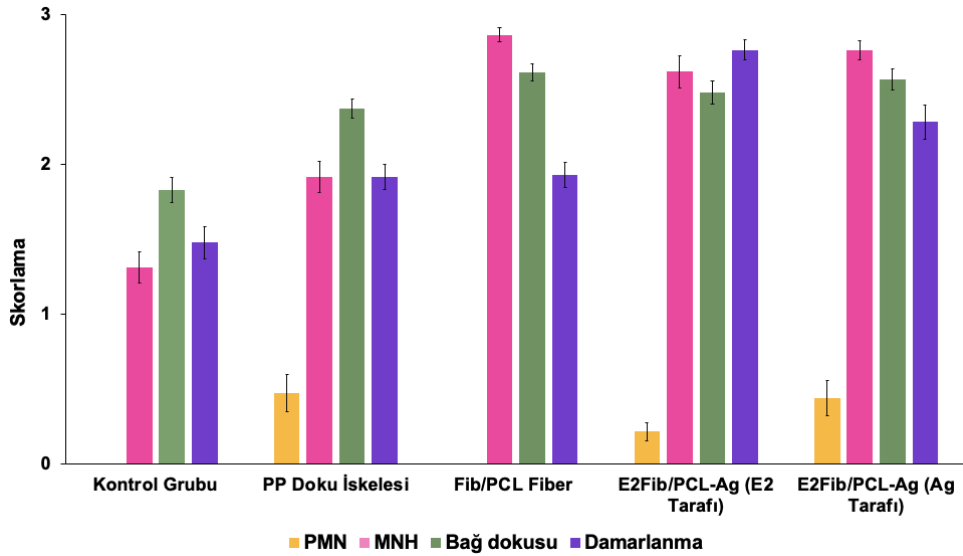
Şekil 6.37. Mesane-vajina implantasyonu gerçekleştirilen çalışmada deneysel gruplara ait A) PMN, B) MN, C) bağ doku organizasyonu ve D) Damarlanmaya ait skorlamalar. * $p<0.05$, *** $p<0.01$ ve **** $p<0.0001$ temsil etmektedir.

Kontrol, PP, Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiber yerleştirilen gruplardan, abdomen bölgesinden alınan doku örneklerine ait kesitler polimorfonükleer lökositler (PMN), mononükleer hücreler (MN), bağ dokusu organizasyonu ile damarlanma açısından skorlanmıştır ve bu alanlarda dev hücre sayımı yapılmıştır. Skorlamaya ait veriler abdomen bölgesi için Çizelge 6.3'te ve grafikleri Şekil 6.38'de verilmiştir.

Çizelge 6.3. Abdomen bölgesinde, 10 farklı alanda sayılan ortalama PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma*

	Polimorfonükleer Lökositler	Mononükleer Hücreler	Bağ Dokusu Organizasyonu	Damarlanma
Kontrol	0	1,31	1,82	1,47
PP Doku İskelesi	0,47	1,91	2,37	1,91
Fib/PCL Fiber	0	2,61	2,61	2,72
E2Fib/PCL-Ag Fiber (E2 /Ag)	0,21/0,43	2,48/2,59	2,48/2,59	2,74/2,73

*(E2Fib/PCL-Ag fiber (E2/Ag); fiberin E2 ve Ag taraflarına ait skorlamalar birlikte verilmiştir).

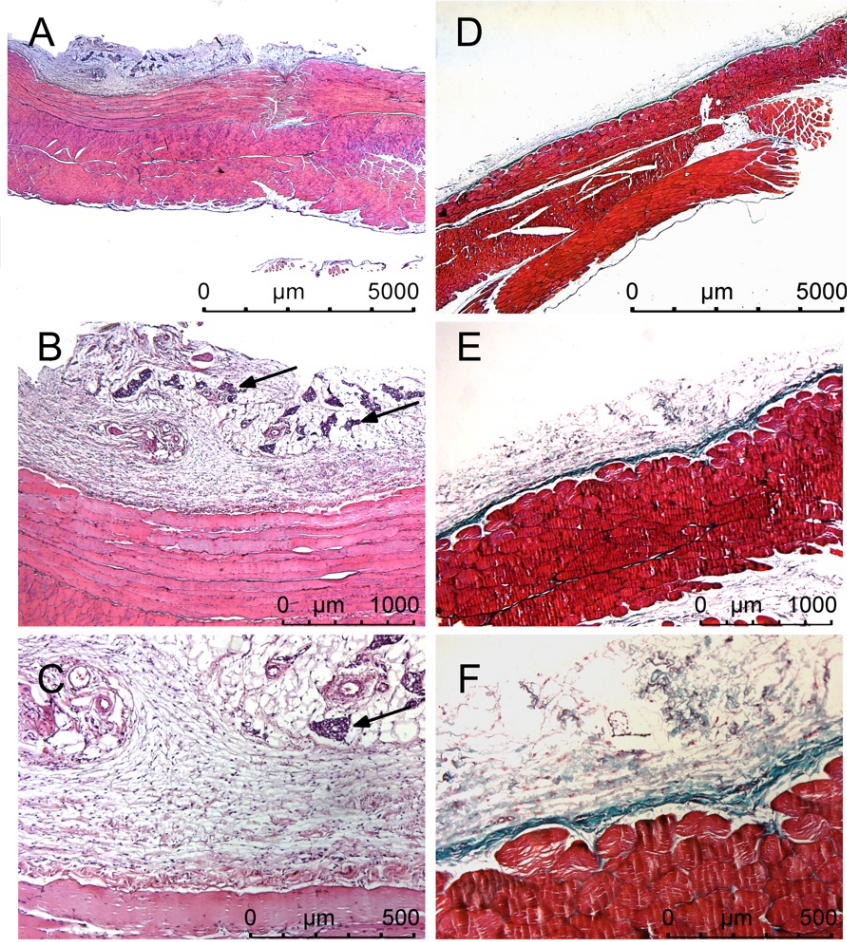


Şekil 6.38. Abdomen bölgesine ait 10 farklı alanda sayılan PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma verilerine ait grafik.

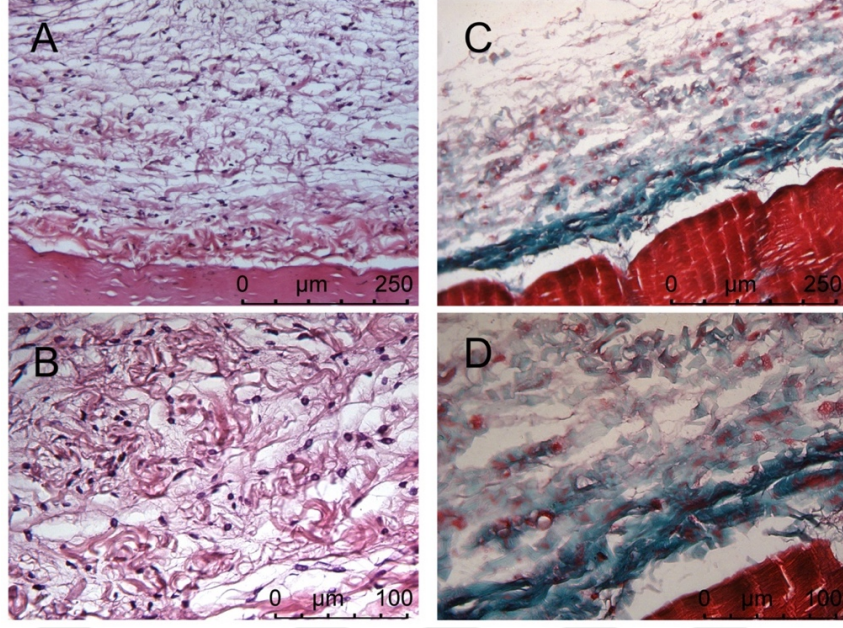
Kontrol grubunun abdomen dokusundan alınan örneklerinde iskelet kası ve kasın her iki tarafında gevşek bağ dokusu gözlenmektedir. Cilde bakan yüzeyde gevşek bağ dokusu içinde adipositler arasında meme bezi kesitleri bulunmaktadır. Diğer gruplarda örneklerin yerleştirilmesi hedeflenen alanda gevşek bağ dokusu normal histolojik görünümündedir (Şekil 6.39). Hücre infiltrasyonu, damarlanmada artış, kollajen fibrillerin düzenleniminde değişim gibi bulgular gözlenmemiştir (Şekil 6.40). Sütürün olduğu alanda sütür materyaline karşı doku reaksiyonu izlenmiştir.

Alınan örneklerin 4 tanesinde sütürlerin etrafında dev hücreler ve granulatöz inflamasyon gözlenmiştir. İki taraflı koyulan sütür arasındaki dokuda paralel olarak sıkı düzenlenmiş kollajen fibriller, damarlanmada artış izlenmiştir (Şekil 6.41).

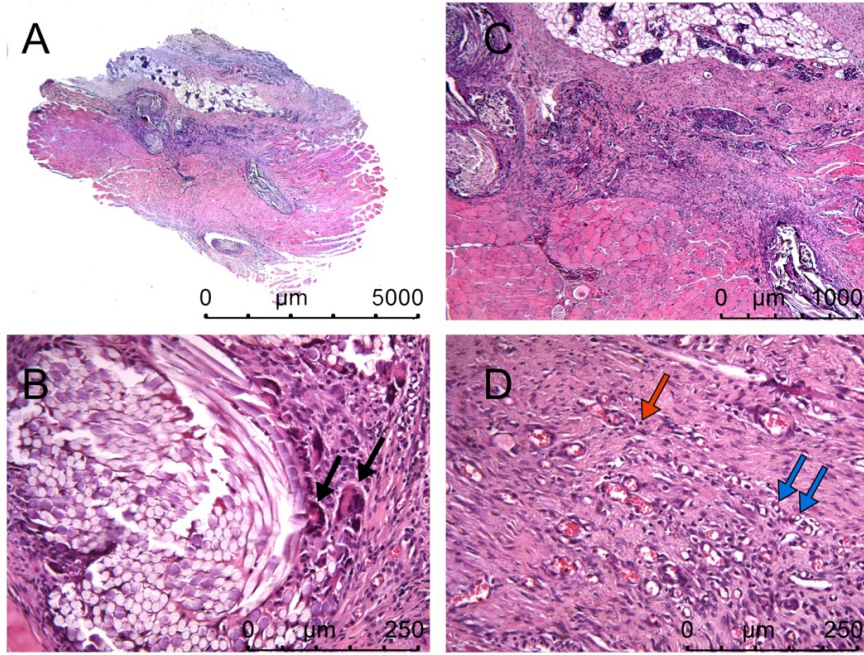
Tüm örnekler birlikte değerlendirildiğinde bu grupta hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonu ve damarlanma saptanmıştır (Çizelge 6.3).



Şekil 6.39. Kontrol grubunun abdomen dokusundan alınan örneklerinde iskelet kası ve kasın her iki tarafında gevşek bağ dokusu gözlenmektedir. Cilde bakan yüzeyde gevşek bağ dokusu içinde adipositler arasında meme bezi (ok) kesitleri yer almakta ve altında örneklerin yerleştirilmesi hedeflenen alanda gevşek bağ dokusu normal histolojik görünümünde izlenmektedir (A, B, C: Hematoksilen-eozin, D, E, F: Masson'un trikromu A, D: X12,5, B, E: X40, C, F: X100).

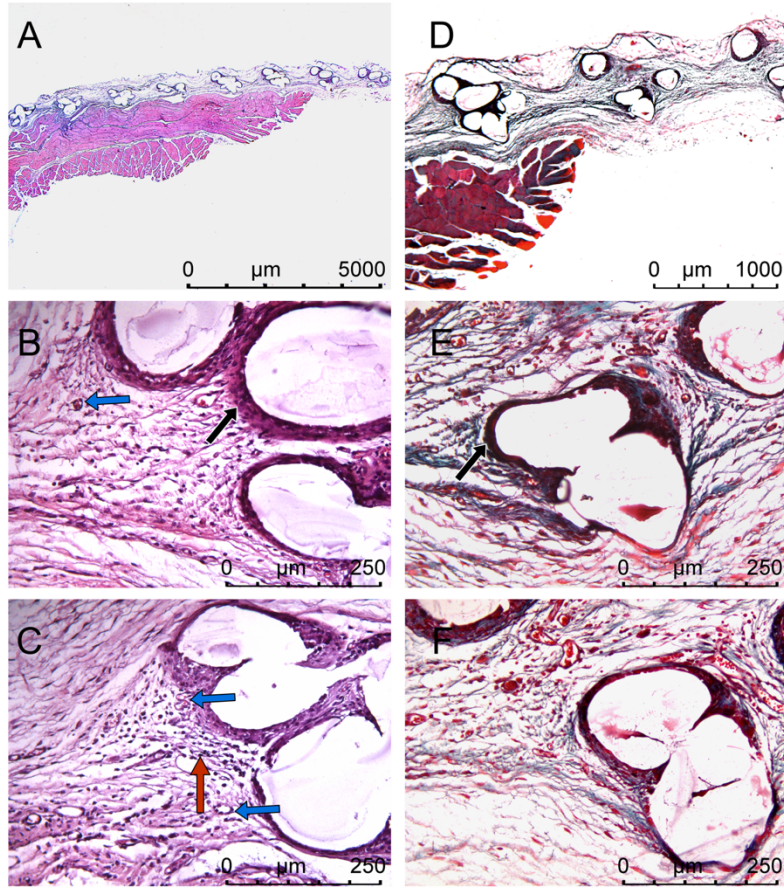


Şekil 6.40. Örneklerin yerleştirilmesi hedeflenen alanda normal histolojik yapısı ile gevşek bağ dokusu izlenmiştir. Bu alanda hücre infiltrasyonu, damarlanmada artış, kollajen fibrillerin düzenleniminde değişim bulunmamaktadır. (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X200, B, D: X400).



Şekil 6.41. Kontrol grubunda sütürlerin etrafında dev hücreler (siyah ok), iki taraflı koyulan dikiş arasındaki dokuda paralel olarak sıkı düzenlenmiş kollajen fibriller, damarlanmada (mavi ok) artış, mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok) izlenmektedir (Hematoksilen-eozin, A:X12,5, B, D:X200 C: X40).

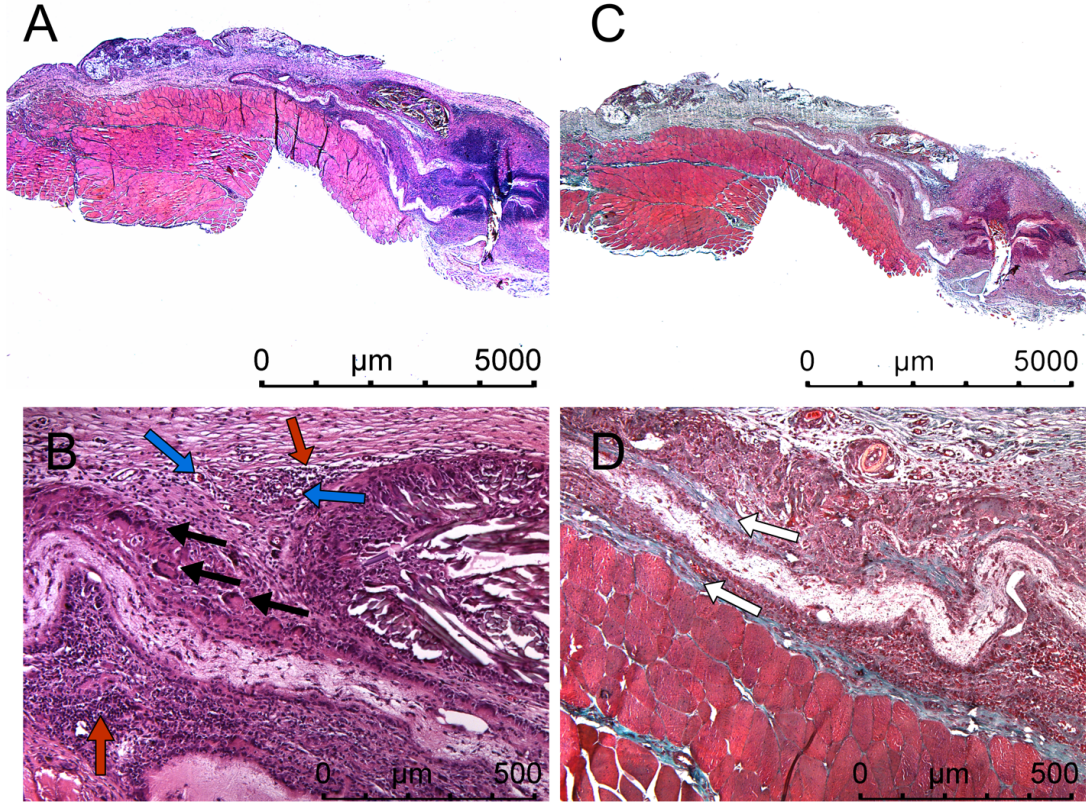
PP doku iskelesi uygulanan grubun abdomenden alınan örnekleri de mesane-vajina arasına koyulan örneklerle aynı özellikleri taşımaktadır ve kesitlerde kapsül ile çevrili iskeleye ait polipropilenin bıraktığı boş alanlar ve iskelenin makroporları arasını dolduran doku ile ayırt edilmektedir. PP doku iskelesi çevresinde orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlanmada artış, orta derecede organize olmuş bağ dokusu, kapsül varlığı ve dev hücreler (ort. $0,61 \pm 0,12$ dev hücre/alan) gözlenmiştir [181] (Şekil 6.42, Çizelge 6.3).



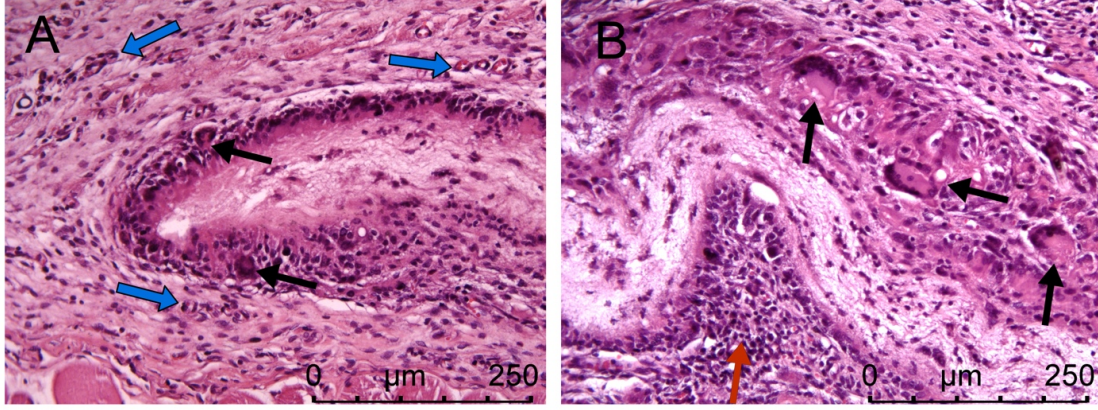
Şekil 6.42. PP doku iskelesi uygulanan grubun abdomen örneklerinde doku iskelesi çevresinin kapsül (siyah ok) ile çevrili olduğu ve polipropilenin bıraktığı boş alanlar ile iskelenin makroporları arasını dolduran doku gözlenmektedir. PP doku iskelesi çevresinde orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanmada (mavi ok) artış, orta derecede organize olmuş bağ dokusu izlenmektedir (A, B, C: Hematoksilen-eozin, D, E, F: Masson'un trikromu A: X12,5, B, C, E, F: X200, D: X40).

Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta cilt altında kasın üstünde bulunan bağ dokusu içinde fiber yapı gözlenmektedir. Fiberin her iki tarafı da epiteloid histiositler ile çevrelenirken, fiber içinde işçi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri bulunmaktadır (Şekil 6.43, Şekil 6.44). Bu grupta orta-ciddi derece mononükleer hücre infiltrasyonu,

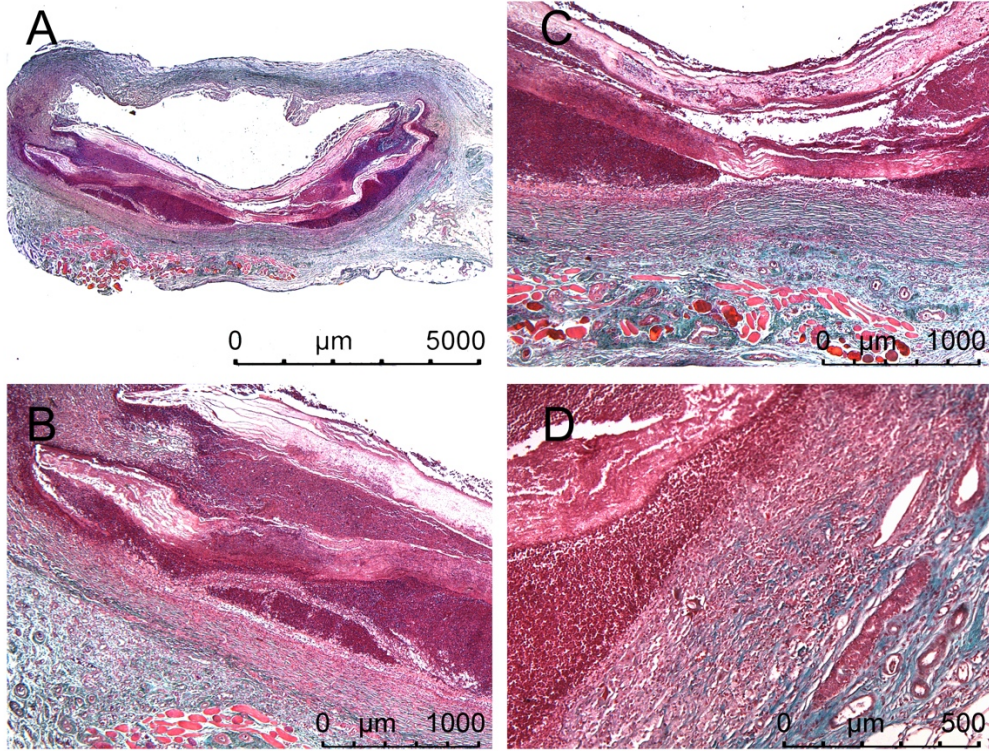
damarlanma ve dev hücreler (ort. $1,47 \pm 0,24$ dev hücre/alan) saptanmıştır. PP doku iskelesi uygulanan grubu göre daha fazla olduğu görülmüştür. Fiberin çevresindeki bağ dokusu orta-ciddi derecede organize olmuş bir bağ dokusudur (Çizelge 6.3). İncelenen 8 örnekten 7 tanesinde fiberi de içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun polimorfonükleer, mononükleer hücreler görülmüştür ve fiberin en dış kısmında kapsül ile sarılı abse oluşumu vardır [181] (Şekil 6.45).



Şekil 6.43. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta cilt altında kasın üstünde bulunan bağ dokusu içinde fiber yapı gözlenmektedir. Sütür çevresinde granulomatöz inflamasyon izlenmektedir. Fiber katlanmış olduğu için 2 tabaka halinde gözlenmektedir. Fiberin her iki tarafı da epiteloid histiositler ile çevrelenmiştir. Fiber içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri, ciddi derece mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanma (mavi ok) ve dev hücreler (siyah ok) izlenmektedir. Fiberin çevresindeki yabancı cisim reaksiyonu çevresinde organize olmuş bağ dokusu (beyaz ok) gözlenmektedir. (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B, D: X100).



Şekil 6.44. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta bağ dokusu içinde fibrin çevresinde epiteloid histiositler, fiber içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri, ciddi derece mononükleer hücre infiltrasyonu (kırmızı ok), damarlanma (mavi ok) ve dev hücreler (siyah ok) izlenmektedir. (Hematoksilen-eozin, X200).

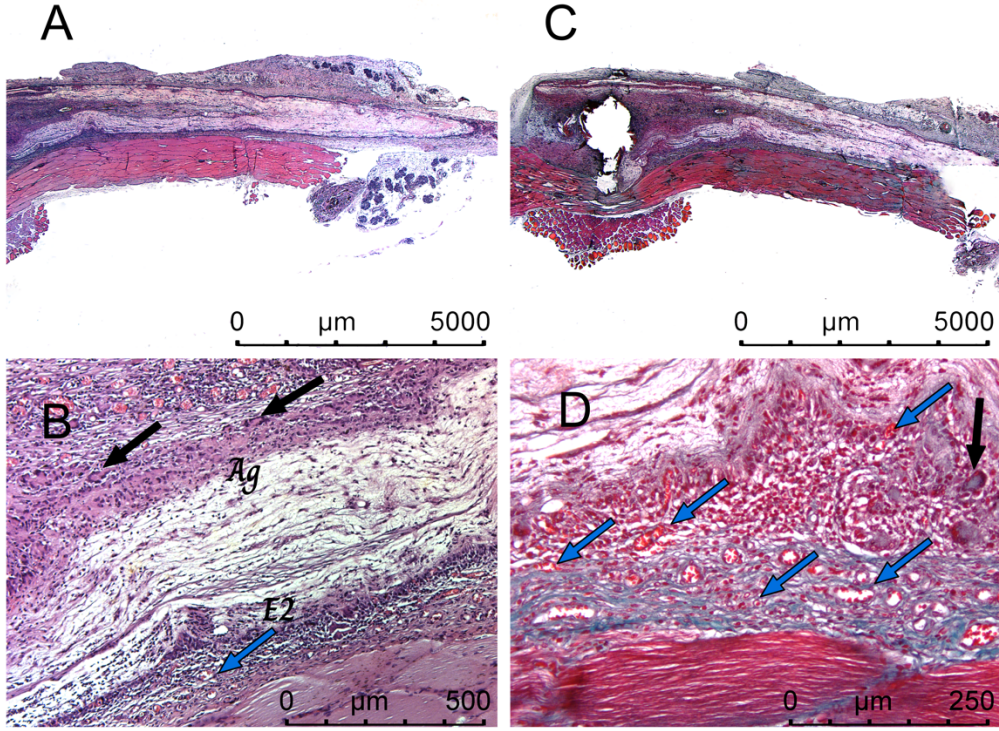


Şekil 6.45. Abdomene Fib/PCL fiber uygulanan grupta fibri içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse oluşumu gözlenmektedir (Masson'un trikromu, A: X12,5, B, C: X40, D: X100).

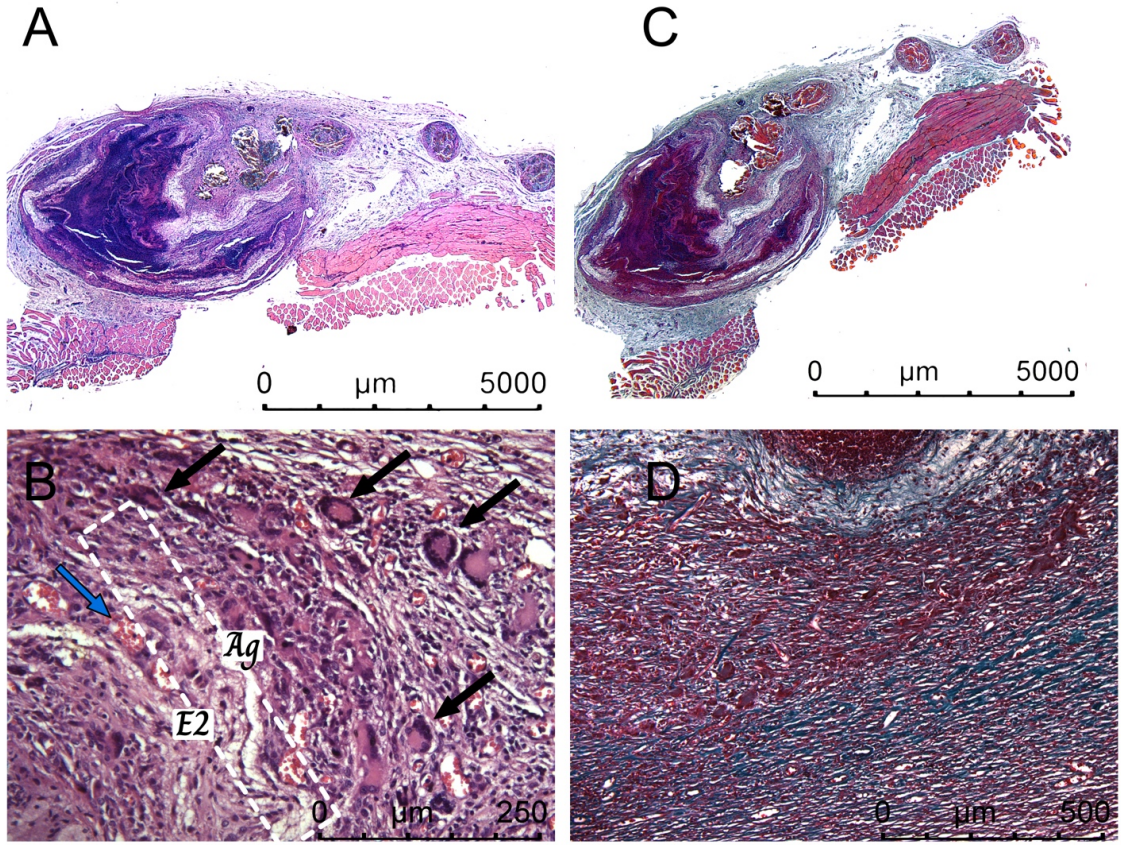
Abdomene E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fibrin cilde bakan yüzü Ag, iskelet kasına bakan yüzü ise E2 içeren kısım gelecek şekilde yerleştirilmiştir. E2Fib/PCL-Ag

fiberin tam olarak bozunmadığı, ancak bozunmanın yer yer başladığı ve fiberlerin yabancı cisim reaksiyonuna neden olarak çok çekirdekli dev hücreler ile sınırlandırılmaya çalışıldığı izlenmektedir. Literatürde yer alan ipek fibroin ve PCL fiber içeren *in vivo* çalışmalar, 28. günün sonunda Fib/PCL fiberlerin bozunma davranışı gösterdiğini desteklemektedir [185, 189]. Fiberin iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu gözlenmiştir. E2 tarafında epiteloid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın arttığı, Ag tarafında histiositlerin varlığı ancak epiteloid özellikte olmadığı, bu tarafta daha çok sayıda dev hücre olduğu belirlenmiştir. Fiberin içinde içsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri bulunmaktadır (Şekil 6.46). Bu grupta E2 tarafında orta-ciddi derecede mononükleer hücre infiltrasyonu, orta derecede damarlanma ve dev hücreler (ort. $0,8 \pm 0,22$ dev hücre/alan) belirlenmiştir. Ag tarafında orta-ciddi derecede mononükleer hücre infiltrasyonu, orta derecede damarlanma ve dev hücreler (ort. $6,36 \pm 0,99$ dev hücre/alan) belirlenmiştir. Doku reaksiyonu PP doku iskelesi ve Fib/PCL uygulanan gruplara göre bu grupta daha fazladır. Dev hücre sayısı bu grupta Ag tarafında diğer gruplara göre belirgin şekilde fazla olduğu saptanmıştır (Çizelge 6.3). Doku reaksiyonu PP doku iskelesi uygulanan gruba göre E2Fib/PCL-Ag grubunda daha fazladır. Literatürde Diedrich ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada, doku iskelesine ait doku yanıtı araştırılmıştır. Bu çalışmada da bozunma davranışı gösteren doku iskelesinin implante edildiği gruplarda hücre infiltrasyonu ve bağ doku oluşumunun PP doku iskelesi grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür [182]. Bu çalışmanın verileri de bizim elde ettiğimiz sonucu destekler niteliktedir.

İncelenen 8 örnekten 7 tanesinde fiberi de içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler görülmektedir ve en dışta kapsül ile sarılı abse oluşumu izlenmektedir (Şekil 6.47). Abse gözlenmesi açısından E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grup, Fib/PCL fiber uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta daha az örnekte abse oluşumu belirlenmiştir.



Şekil 6.46. Abdomene E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberin iki tarafındaki doku reaksiyonunun farklı olduğu izlenmiştir. Fiberin içinde iğsi çekirdekleri ile fibroblast hücreleri izlenirken E2 tarafında epiteloid histiositlerin fiberi çevrelediği, damarlanmanın (mavi ok) arttığı, Ag tarafında epiteloid özelliği kazanmamış histiositlerin varlığı ve bu tarafta daha çok sayıda dev hücre (siyah ok) izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B: X100, D:X200)



Şekil 6.47. Abdomene E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta fiberi de içine alan çevresi nekrotik hücreler, yoğun mononükleer hücreler ve en dışta kapsül ile sarılı abse izlenmektedir. E2: Fiberin E2 yüzü, Ag: Fiberin Ag yüzü (A, B: Hematoksilen-eozin, C, D: Masson'un trikromu A, C: X12,5, B: X200, D: X100).

Doku reaksiyonu açısından, tüm gruptaki PMN ve MN skorlamaları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grupta, PP doku iskelesi ve Fib/PCL fiber uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde doku reaksiyonu gerçekleştiği görülmektedir. Polimorfonükleer lökosit skorlamaları açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve PP doku iskelesi uygulanan grup ile E2Fib/PCL-Ag grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol grubu ve PP doku iskelesi uygulanan grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.0001$). Mononükleer hücre skorlamaları açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile PP doku iskelesi, Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,0001$). PP doku iskelesi ile Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan gruplar karşılaştırıldığında anlamlı

bir fark görülmüştür ($p < 0,0001$). Fib/PCL fiber ile E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan grubun E2 tarafı karşılaştırıldığında ise yine fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

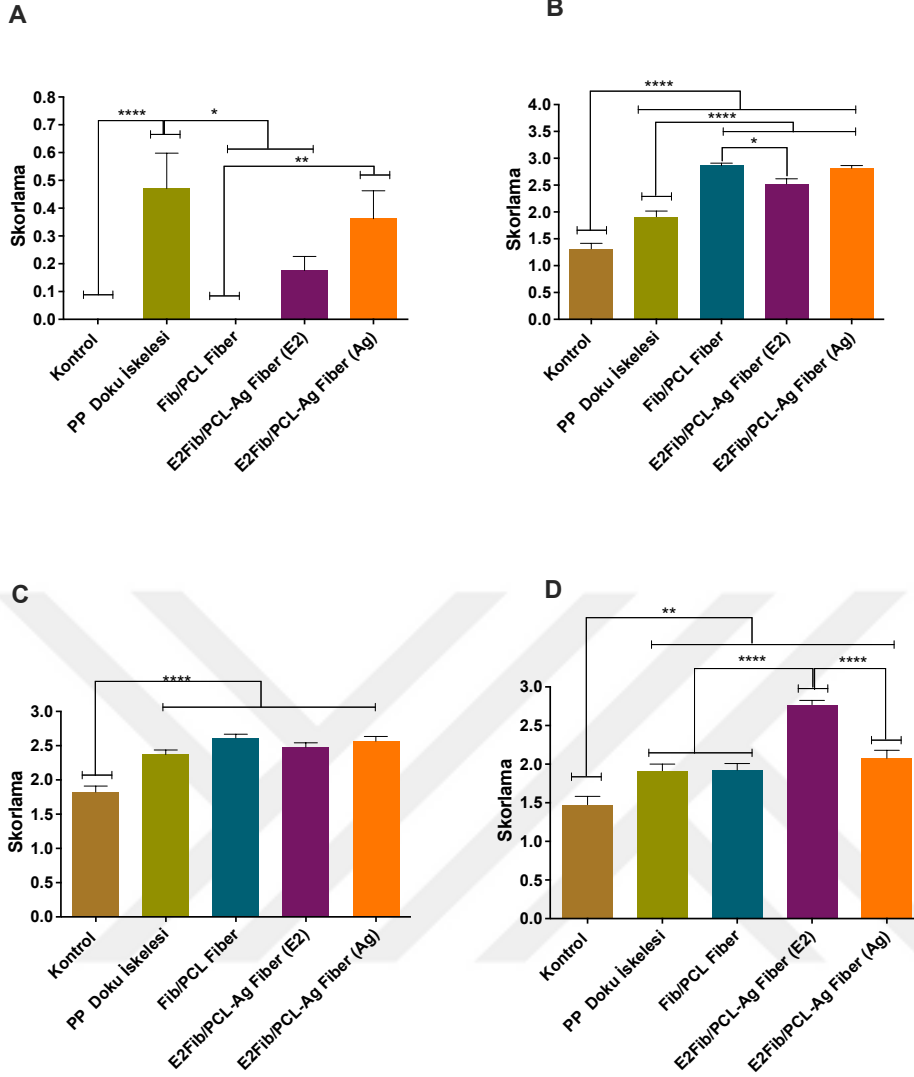
Gruplar arasındaki istatistiksel farklar, dev hücre sayısı/alan açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve PP doku iskelesi grubuna kıyasla, Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag gruplarında daha fazla dev hücrenin var olduğu görülmüştür.

PMN hücre, yabancı cisim reaksiyonuna bağlı olarak gelişen dev hücrelerin varlığı literatürde yapılan benzer çalışmalar ile birbirini destekleyen sonuçlar göstermiştir. Diedrich ve arkadaşlarının çalışmasında, PMN hücreleri 60. ve 180. günlerde sayılarak skorlanmıştır. PMN hücre sayısının 180. günde, 60. günden daha az olduğu görülmüştür. Bu veriler, bizim çalışmamızda 28. günde görülen erken dönem doku reaksiyonunun fazla olmasını açıkladığı düşünülmektedir [182].

Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag gruplarında, PP doku iskelesi grubuna kıyasla daha fazla PMN, MN ve dev hücre görülmesinin yabancı cisim reaksiyonuna ek olarak, fiberlerin kademeli bozunması ile ilintili olduğu literatürde yer almaktadır. Hjort ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kademeli implant bozunmasının bir sonucu olarak orta düzeyde ve zamanla azalan bir inflamatuvar yanıtın varlığından söz edilmektedir [191]. PP doku iskelelerinin ve Fib/PCL ve E2Fib/PCL-Ag fiberlerinin yerleştirilen bölgelerde doku ile bütünleştikleri ve fiberlerin tam olarak bozunmalarının gerçekleşmediği fakat yer yer bozunmaya başladıkları görülmüştür. Mikrograflarda görülen yer yer dalgalı görünümde yapının fiber içeriğindeki ipek fibroin ve PCL yapıların bozunmasıyla olduğu literatürde yer alan *in vivo* çalışmalar ile de desteklenmektedir [185]. *In vivo* deneylerde sıçan vücuduna yerleştirilen Fib/PCL fiberlerin morfolojileri 28. günün sonunda değişim göstermiştir ve bozunmaya başladıkları mikrograflarda görülen yer yer dalgalı yapıdan anlaşılmaktadır. Fiber yapıların bozunması kollajen gibi ECM elemanlarının bu yapı üzerine tutunmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Fiber yapıların çevresinde hücre infiltrasyonunun varlığı da bu verileri desteklemektedir. Ayrıca fiberlerin bozunma davranışı göstererek çevre dokulara entegre olduğu da mikrograflarda görülmektedir. Bu veriler, 28 günlük kısa dönem bir *in vivo* deneyde görülen doku yanıtının varlığını açıkladığı düşünülmektedir. Buna ek olarak tüm gruplarda doku interpozisyon flep eşleniğinin yerinin belirlenmesi amacıyla koyulan sütür materyaline karşı doku reaksiyonu gözlenmiştir.

Tüm gruplar bağ dokusu organizasyonu açısından kıyaslandığında, kontrol grubu ve diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). PP doku iskelesi, Fib/PCL fiber ve E2Fib/PCL-Ag fiber uygulanan gruplar arasında bağ dokusu organizasyonu açısından bir fark saptanmamıştır. Dokuya implante edilen biyomalzemelerin, dokuda yeni gelişen ECM elemanları için mekanik bir destek sağladığı Feola ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bildirilmiştir [192]. Bu çalışmadaki verilerin, kontrol grubunda oluşan bağ dokunun diğer gruplardan az olmasını kanıtladığı düşünülmektedir.

Tüm gruplar damarlanma skorlamaları açısından istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde, kontrol grubu, PP doku iskelesi yerleştirilen grup ve Fib/PCL fiber yerleştirilen grup, E2Fib/PCL-Ag fiber yerleştirilen grup ile kıyaslandığında, anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,01$). PP doku iskelesi ve Fib/PCL fiber uygulanan gruplar, E2Fib/PCL-Ag fiber grubunun E2 tarafı ile kıyaslandığında damarlanma açısından arada anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu farkın kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). E2Fib/PCL-Ag fiber grubunun E2 tarafı ve Ag tarafı birbiri ile karşılaştırıldıklarında ise görülen damarlanma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmakla birlikte, damarlanmanın E2 tarafında daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,0001$), (Şekil 6.48).



Şekil 6.48: Abdomen implantasyonu gerçekleştirilen çalışmada deneysel gruplara ait A) PMN, B) MN, C) bağ doku organizasyonu ve D) Damarlanmaya ait skorlamalar. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ ve **** $p < 0.0001$ temsil etmektedir.

PP doku iskelesi ile Fib/PCL fiber grubu arasındaki farkın az olması literatürde benzer bir çalışmanın desteği ile açıklanabilmektedir. PP doku iskelesi ya da Fib/PCL fiberin damarlanma üzerinde bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Bu çalışmada da elde ettiğimiz veriler bu yöndedir [182]. *In vitro* salım deneylerinde E2'nin ortama salımının gerçekleştiği kanıtlanmış, ardından E2'nin pro-anjiyogenik etkisi CAM deneyleri ile doğrulanmıştır. *In vivo* deneyde, E2Fib/PCL-Ag fiberden salımı gerçekleşen E2'nin bu gruplarda damarlanmayı artırdığı açıkça görülmektedir.

Mesane-vajina ve abdomen bölgelerinden alınan doku örnekleri PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu ve dev hücre sayısı açısından incelendiğinde, bölgeler arasında anlamlı

farklar olmadığı görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalarda üretilen malzemeler ya abdomen bölgesine [180, 181] ya da mesane-vajina bölgesine [182, 183] implante edilmektedir. Bu çalışmanın özgün yönlerinden biri aynı hayvan üzerinde her iki bölgeye de implantasyon yapılarak gruplar arasındaki farkın araştırılmasıdır.



7. YORUM

Elektro-eğirme yöntemi ile E2 ve AgNPs içeren Fib/PCL fiberler, homojen ve boncuksuz olarak 0,28-0,55 µm çap aralığında üretilmiştir. Fiberlerin EDX analizi yapılarak, fiber yapısında yaklaşık %2 oranında Ag olduğu belirlenmiştir. Fiberlerin FT-IR spektrumları incelendiğinde literatür ile uyumlu olarak, ipek fibroin ve PCL'in karakteristik piklerinin varlığı görülmüştür. Fiberlere ait DSC termogramları incelendiğinde, Fib/PCL fiber yapısına Ag eklenmesinin Tm değerlerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Fiberlere, L929 fibroblast hücreleri kullanılarak uygulanan *in vitro* MTT test sonucunda fiberlerin L929 hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği izlenmiştir.

Fib/PCL fiberlerden E2 ve Ag salım profilleri incelendiğinde ani salımın ardından sürekli bir salım profili sergilediği gözlenmiştir. E2 ve AgNPs içeren fiberler, vajina florasında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antibakteriyel etki göstermiş olup ortama salımı gerçekleşen Ag miktarının antibakteriyel etki için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. E2 içeren fiberlerin pro-anjiyogenik etkileri CAM deneyi ile araştırılmıştır. Fiberlerden E2 salımının gerçekleştiği ve E2'nin damar oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.

Üretilen Fib/PCL fiberlerin, doku interpozisyon flep eşleniği olarak *in vivo* doku yanıtın karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla fiberler aynı sıçanda hem mesane-vajina arasına hem de abdomene yerleştirilerek 28 gün izlenmiştir. Deney sonucunda elde edilen verilerde, bu iki vücut bölgesi arasında PMN, MN, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma ve dev hücre sayısı açısından belirgin bir fark saptanmamıştır. Her iki vücut bölgesinde de doku yanıtları birbirine benzer özellik göstermiştir. Bu sonuç benzer çalışmaları yapmak isteyen araştırmacılar için yol gösterici niteliktedir.

Bu tez kapsamında üretilen E2Fib/PCL-Ag fiberlerin antibakteriyel ve pro-anjiyogenik etkinliklerinin varlığı yapılan *in vitro*, *ex ovo* ve *in vivo* deneyler ile kanıtlanmıştır. E2Fib/PCL-Ag fiberlerin sitotoksik etki göstermediği hücre kültürü çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Buna ek olarak embriyolar üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı da CAM deneyleri ile ispatlanmıştır. Sıçanlarda yapılan *in vivo* deney, E2Fib/PCL-Ag fiberlerin doku interpozisyon flep olarak kullanılan ticari PP doku iskelesi ile karşılaştırılmasına

olanak sağlamıştır. Doku reaksiyonu açısından benzer özellik gösteren PP doku iskelesi ve E2Fib/PCL-Ag fiberler, damarlanma ve bağ dokusu organizasyonu açısından karşılaştırıldıklarında, E2Fib/PCL-Ag fiberlerin damarlanmayı ve bağ dokusu oluşumunu artırdığı görülmüştür.

Sonuç olarak geliştirilen E2Fib/PCL-Ag fiberlerin klinikte doku interpozisyon flep eşleniği olarak kullanımı için potansiyel olduğu ve ileriki aşamalarda yapılacak çalışmalar ile kliniğe translasyonunun mümkün olduğu düşünülmektedir.





8. KAYNAKLAR

- [1] M.S. Muhammad A. Malik, Muhammad TB Malik, Nauman Khalid, Adeen Akram, Changing trends in the etiology and management of vesicovaginal fistula, The Japanese Urological Association, 25 (2017) 25-29.
- [2] L.L. Wall, Obstetric vesicovaginal fistula as an international public-health problem, Lancet, 368 (2006) 1201-1209.
- [3] M.P. S. Rajaian, A. Panda, Vesicovaginal fistula: Review and recent trends, Indian J. Urol., 35(4) (2019) 250-258.
- [4] H.B.-S. M. Sværdborg, K.M. Bek, J.B. Nielsen A Modified Surgical Technique for Treatment of Radiation-induced Vesicovaginal Fistulas Urology, 79 (2012) 950-954.
- [5] J. Spurlock, Vesicovaginal Fistula, Medscape, (2016).
- [6] R.E.B. O.A. Ibeanu, Vesicovaginal Fistula Postgraduate Obstetrics and Gynecology, 29 (2009).
- [7] L.d. Bernis, Obstetric fistula: Guiding principles for clinical management and programme development, a new WHO guideline, International Journal of Gynecology and Obstetrics 99 (2007) 117-121.
- [8] S. Biadgilign, Y. Lakew, A.A. Reda, K. Deribe, A population based survey in Ethiopia using questionnaire as proxy to estimate obstetric fistula prevalence: results from demographic and health survey, Reproductive health, 10 (2013) 1-8.
- [9] Z. Gölbaşı, Adölesan Dönem Üreme Sağlığı Sorunlari Ve Etkileyen Faktörler, Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 8 (2010) 100-108.
- [10] M.S.M.T.M. M.A. Malik, N. Khalid, A. Akram Changing trends in the etiology and management of vesicovaginal fistula, International Journal of Urology, 25 (2018) 25-29.
- [11] M.G. Ö. Kaplan, Obstetrik ve Jinekolojik Operasyonlar Sonrasında Gelişen Vezikovajinal Fistüllerin RetrospektifDeğerlendirilmesi, Med J SDU, 21 (2014) 72-77.
- [12] Q.S. F. Parveen, Vesicovaginal fistula: a Challenge for Women in Developing Countries Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan 8(1998) 230-232.
- [13] M.B. V. Raut, Vesicovaginal Fistulae—an Experience From a Developing Country, J Postgard Med 39 (1993).
- [14] R.E.S.T.J.W. R.A Lee, Current Status of Genitourinary Fistula, Obstet Gynecol 72 (1988) 313-319.
- [15] R.E. Symond, Incontinance: Vesical and Urethral Fistulas. , Clin Obstet Gynecol 27 (1984) 499-514.
- [16] M.S.A. A. Mehmood, S. Rana, S. Raziq, L. Siddiq, M.Y. Shah, Vesico-vaginal Fistula: Interposition Flap, A Key to Success, J Ayub Med Coll Abbottabad 21 (2009).

- [17] S.M. D.H. Evans, V.A. Politano, D.E. Bejany, C.M. Lynne, A.E. Gousse, Interposition Flaps In Transabdominal Vesicovaginal Fistula Repairs: Are They Really Necessary?, *Urology*, 57 (2001) 670-674.
- [18] R.F. Zacharin, A History of Obstetric Vesicovaginal Fistula *Aust. N. Z. J. Surg* 70 (2000) 851-854.
- [19] P. Hilton, Vesico-vaginal Fistulas in Developing Countries, *Textbook of Perinatal Medicine* (2006).
- [20] A.A. N.F. Miller, Treatment of Vesicovaginal Fistulas *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, (1935).
- [21] W. Reid, The history, forms, and theories of the vaginal speculum, *Glasgow Medical Journal*, 46 (1896) 161.
- [22] L.L. Wall, Obstetric vesicovaginal fistula as an international public-health problem, *Lancet* 368 (2006) 1201-1209.
- [23] H.A.A. A.S. El-Azab, M. Farouk, Update on Vesicovaginal Fistula: A systematic Review, *Arab Journal of Urology* 17 (2019) 61-68.
- [24] E.A.G. R.A. Moses, State of the Art for Treatment of Vesicovaginal Fistula, *Curr Urol Rep*, 18 (2017).
- [25] A.E.G. B.L. Cohen, Current Techniques for Vesicovaginal Fistula Repair: Surgical Pearls to Optimize Cure Rate, *Current Urology Reports*, 8 (2007) 413-418.
- [26] H.R. Hadley, Vesicovaginal Fistula, *Current Urology Reports*, 3 (2002) 401-407.
- [27] W.C. Huang, L.N. Zinman, W. Bihrlle, Surgical repair of vesicovaginal fistulas, *Urologic Clinics*, 29 (2002) 709-723.
- [28] C.S. M. Stamatakos, T. Stasinou, K. Kontzoglou, Vesicovaginal Fistula: Diagnosis and Management, *Indian J Surg*, 76 (2014) 131-136.
- [29] O. Dicle, Pelvik Travmada Görüntüleme, *Trd Sem* 3(2015) 25-35.
- [30] J.T. Goh, A new classification for female genital tract fistula, *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*, 44 (2004) 502-504.
- [31] E.J.S. T. Capes, L. Romanzi, Y. Foma, E. Moshier, Comparison of two classification systems for vesicovaginal fistula, *Int Urogynecol J* 23 (2012) 1679-1685.
- [32] M.P. S. Rajaian, A. Panda, Vesicovaginal fistula: Review and recent trends, *Indian Journal of Urology*, (2019).
- [33] M.I. M. Breen, Controversies in the management of vesicovaginal fistula, *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 54 (2019) 61-72.

- [34] C.M.T. E.M. Mellano, Management of genitourinary fistula, *Curr Opin Obstet Gynecol* 26 (2014) 415-423.
- [35] W. Latzko, Postoperative Vesicovaginal Fistulas, *American Journal of Surgery*, (1942).
- [36] V.J. O’Conor, Review of Experience With Vesicovaginal Fistula Repair *The Journal of Urology* (1980).
- [37] M.B.M. R. Sotelo, A. Garcia-Segui, R. Dubois, M. Spaliviero, W. Keklikian, J. Novoa, H. Yaime, A. Finelli, Laparoscopic Repair of Vesicovaginal Fistula *The Journal of Urology*, 173 (2005) 1615-1618.
- [38] F.N. C.H. Nezhat, C. Nezhat, H. Rottenberg Laparoscopic Repair of a Vesicovaginal Fistula: A Case Report *Obstet Gynecol* 83 (1994) 899-901.
- [39] L.E. O. Melamud, B. Turbow, A. Shanberg, Laparoscopic vesicovaginal fistula repair with robotic reconstruction, *Urology*, 65 (2005) 163-166.
- [40] T.G.-W. G.S. Ashcroft, M.A. Horan, S.M. Wahl, M.W.J. Ferguson, Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response, *Am J Pathol* 155 (1999) 1137-1146.
- [41] R. Sotelo, M.B. Mariano, A. Garcia-Segui, R. Dubois, M. Spaliviero, W. Keklikian, J. Novoa, H. Yaime, A. Finelli, Laparoscopic repair of vesicovaginal fistula, *The Journal of urology*, 173 (2005) 1615-1618.
- [42] C.R.C. C.J. Hillary, The Choice of Surgical Approach in the Treatment of Vesicovaginal Fistulae, *Asian Journal of urology* 5(2018) 155-159.
- [43] H. Martius, Die operative Wiederherstellung der vollkommen fehlenden Harnrohre und des Schiessmuskels derselben, *Zentralbl Gynakol*, 52 (1928) 480.
- [44] E.R. W.M Altaweel, W. Alkhudair, Interposition Flaps in Vesicovaginal Fistula Repairs can Optimize Cure Rate *Urology Annals* 5(2013).
- [45] B.E.D. D. Lee, P.E. Zimmern Long-term Morbidity of Martius Labial Fat Pad Graft in Vaginal Reconstruction Surgery, *Urology*, 82 (2013).
- [46] J.L. Powell, Powell's Pearls: Heinrich Martius, MD (1885–1965), *Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery*, 15 (2009) 157-158.
- [47] E.A. Miller, G.D. Webster, Current management of vesicovaginal fistulae, *Current opinion in urology*, 11 (2001) 417-421.
- [48] N.A. NP Rangnekar, SA Kaul, HR Pathak Role of the Martius Procedure in the Management of Urinary–Vaginal Fistulas, *J Am Coll Surg*, 191 (2000) 259-263.
- [49] N.I.A. N.P. Rangnekar, S.A Kaul, H.R. Pathak, Role of the Martius Procedure in the Management of Urinary–Vaginal Fistulas, *J Am Coll Surg*, 191 (2000).

- [50] J.L. Powell, Powell's Pearls: Heinrich Martius, MD (1885–1965), *Journal of Pelvic Medicine and Surgery*, 15 (2009).
- [51] N.M.S. D.Yu Pushkar, G.R. Kasyan Management of urethrovaginal fistulae, *Current Opinion in Urology* 18 (2008) 389-394.
- [52] E.K. K.S. Eilber, L.V. Rodriguez, N. Rosenblum, S. Raz Ten-Year Experience With Transvaginal Vesicovaginal Fistula Repair Using Tissue Interposition *The Journal of Urology*, 169 (2003) 1033-1036.
- [53] K.J.B. S. Raz, V.W. Nitti, E. Sussman, Transvaginal Repair of Vesicovaginal Fistula Using a Peritoneal Flap, *The Journal of Urology*, 150 (1993) 56-59.
- [54] R.K.D. S.K. Tewary, A. Choudhary, S. Basu, R.K. Dey Modified Technique of Doubly Folded Peritoneal Flap Interposition in Transabdominal Vesicovaginal Fistula Repair: Our Experience of 36 Cases, *Urol Int*, (2020).
- [55] R. Turner-Warwick, The Use of The Omental Pedicle Graft in Urinary Tract Reconstruction *The Journal of Urology*, 116 (1976).
- [56] A.M.B.G. I. Kiricuta, The Repair of Extensive Vesicovaginal Fistulas With Pedicled Omentum: A Review Of 27 Cases, *The Journal of Urology*, 108 (1972).
- [57] G.R.M. T.M. Roth, J. Blythe, R.P. McGehee, Suprapubic Approach for Repair of a Massive Vesicovaginal Fistula Utilizing a Myocutaneous Gracilis Muscle Flap, *Journal of Pelvic Medicine and Surgery*, 9 (2002) 19-22.
- [58] D.E.R. S.D. Wexner, J.Genua, J.J. Noguera, E.G. Weiss, O. Zmora, Gracilis Muscle Interposition for the Treatment of Rectourethral, Rectovaginal, and Pouch-vaginal Fistulas Results in 53 Patients, *Annals of Surgery*, 248 (2008).
- [59] G.P. J. Fleischmann, Abdominal approach for gracilis muscle interposition and repair of recurrent vesicovaginal fistulas, *The Journal of Urology*, 140 (1988).
- [60] K.W. U. Patil, G. Laungani, Management of 18 Difficult Vesicovaginal and Urethrovaginal Fistulas With Modified Ingelman-Sundberg and Martius Operations, *The Journal of Urology*, 123 (1980).
- [61] D.P. L.L. Wall, P. Copas, N.T.M Galloway, Use of a pedicled rectus abdominis muscle flap sling in the treatment of complicated stress urinary incontinence, *Am J Obstet Gynecol*, 175 (1996) 1460-1466.
- [62] T.E.E. C. Fitzpatrick, Plastic Surgical Techniques in the Repair of Vesicovaginal Fistulas: A Review, *Int Urogynecol J*, 4 (1993) 287-295.
- [63] B.E.T. M. H. James, T. O. Davies, K. A. McCammon, The Urachal Flap: A Previously Unreported Tissue Flap in Vesicovaginal Fistula Repair, *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 19 (2013) 148-151.
- [64] J. Spurlock, Vesicovaginal Fistula *Medscape*, (2016).

- [65] R.H.B. R.J. Pope, E. Chipungu, L.H. Hollier Jr, J.P. Wilkinson The use of Singapore flaps for vaginal reconstruction in women with vaginal stenosis with obstetric fistula: a surgical technique, *BJOG*, 125 (2018) 751-756.
- [66] V.T.J. J.T.K. Wee, A New Technique of Vaginal Reconstruction Using Neurovascular Pudendal-Thigh Flaps: A Preliminary Report *Plastic and Reconstructive Surgery*, 83 (1989).
- [67] B.N.S. I.D. Tabakov, Large Post-Hysterectomy and Post-Radiation Vesicovaginal Fistulas: Repair by Ileocystoplasty, *The Journal of Urology*, 171 (2004) 272-274.
- [68] M.P. R. Angioli, L. Muzii, L. Mendez, R. Mirhashemi, F. Bellati, C. Croce, P. B. Panici, Guidelines of How to Manage Vesicovaginal Fistula *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 48 (2003) 295-304.
- [69] W.Y. Y. Chen, Y. Yang, J. Jin, S. Wu, Y. Xiao, Repair of Complex Vesicovaginal Fistulas by Combining a Rotational Bladder Flap and Full Thick Vascular Peritoneal Interposition, *Neurourology and Urodynamics*, 35 (2016) 934-938.
- [70] J.K.S. V. J. O’Conor, Vesicovaginal Fistula From The Standpoint Of The Urologist *The Journal of Urology*, 66 (1951).
- [71] J.K.S. V. J. O’Conor, G. J. Bulkley, J. B. Nanninga, Suprapubic Closure of Vesicovaginal Fistula *The Journal of Urology*, 109 (1973).
- [72] J.H.M. M.O. Schimpf, P.K. Tulikangas, J.R. wagner Vesicovaginal Fistula Repair Without Intentional Cystotomy Using the Laparoscopic Robotic Approach: a Case Report *JSLs*, 11 (2007) 378-380.
- [73] S.M. N.P. Gupta, A.K. Hemal, A. Mishra, A. Seth, P.N. Dogra, Comparative Analysis of Outcome Between open and Robotic Surgical Repair of Recurrent Supra-Trigonal Vesico-Vaginal Fistula *Journal of Endourology*, 24 (2010).
- [74] R.L. R.H. Counts, G. Kilic, T.G. Lee, Robotic Fistula Repair of Multiple Vesicovaginal Fistulas Using Sigmoid Epiploica: Case Report *Gynecol Pelvic Med* 2(2019).
- [75] A.S.G. B. Alagöl, E. Kaya, O. İnci The Use of Human Dura Mater as an Interposition Graft in the Treatment of Vesicovaginal Fistula, *International Urology and nephrology* 36 (2004) 35-40.
- [76] A.F.M. L.A. Evans, Hemostatic Agents and Tissue Glues in Urologic Injuries and Wound Healing, *Urol Clin N Am*, 33 (2006) 1-12.
- [77] J.S.W. J.C. Wheat, Advances in Bioadhesives, Tissue Sealants, and Hemostatic Agents, *Urol Clin N Am*, 36 (2009) 265-275.
- [78] A.F.M. N.F. Pursifull, Tissue glues and nonsuturing techniques, *Current Opinion in Urology*, 17 (2007) 396-401.

- [79] J.H.L. D.M. Albala, Recent Clinical and Investigational Applications of Fibrin Sealant in Selected Surgical Specialties, *J Am Coll Surg*, 202 (2006).
- [80] M. Brennan, Fibrin Glue, *Blood Reviews*, 5 (1991) 240-244.
- [81] M.L.S. B. Shekarriz, The Use of fibrin Sealant in Urology *The Journal of Urology*, 167 (2002) 1218-1225.
- [82] E.A. Lenselink, Role of fibronectin in normal wound healing *Int Wound J.*, 12 (2015) 313-316.
- [83] I.M. S. Kull, E. Briganti, P. Losi, D. Spiller, S. Tonlorenzi, G. Soldani, Glubran2 Surgical Glue: In Vitro Evaluation of Adhesive and Mechanical Properties, *Journal of Surgical Research*, 157 (2009) e15-e21.
- [84] H.W.Y. Y.J. Suh, S. Kim, J. Choe, H.J. Park, J.Y. Choi, K.E. Lee, Biocompatibility of n-butyl-2-cyanoacrylate (Histoacryl) in cervical structures of rats: prospective in vivo study, *Ann Surg Treat Res*, 96 (2019) 162-168.
- [85] G.V.K. A.S. Sawant, V. Kumar, Cyanoacrylate injection in management of recurrent vesicovaginal fistula: Our experience, *Indian J. Urol.*, 32 (2016) 323-325.
- [86] L.D.u. G. Muto, E. Castelli, A. Formiconi, F. Bardari, Cyanoacrylic Glue: A Minimally Invasive Nonsurgical First Line Approach For The Treatment Of Some Urinary Fistulas, *The Journal of Urology*, 174 (2005) 2239-2243.
- [87] S.K. W.E.A. Saad, U.C. Turba, S.S. Sabri, A.W. Park, J. Stone, J.F. Angle, A.H. Matsumoto, Ureteric Embolization for Lower Urinary Tract Fistulae: Use of Two Amplatzer Vascular Plugs and N-Butyl Cyanoacrylate Employing the “Sandwich” Technique, *Cardiovasc Intervent Radiol*, 36 (2013) 1068-1072.
- [88] C.L.P. A.H. Annor M.E. Tang, G.C. Ebersole, M.M. Frisella, B.D. Matthews, C.R. Deeken, Effect of enzymatic degradation on the mechanical properties of biological scaffold materials, *Surg Endosc*, 26 (2012) 2767-2778.
- [89] M.A.E. Y.A. Farahat, O.M. Elgamal, A.M. Tawfik, M.G. Bastawisy, M.H. Radwan, M. Rasheed, Application of Small Intestinal Submucosa Graft for Repair of Complicated Vesicovaginal Fistula: A Pilot Study, *The Journal of Urology*, 188 (2012) 861-864.
- [90] D.G.A. M.A. Traver, New Generation Tissue Sealants and Hemostatic Agents: Innovative Urologic Applications, *Reviews in Urology*, 8 (2006) 104-111.
- [91] C. Harper, Permacol™: clinical experience with a new biomaterial, *Hospital Medicine*, 62 (2001).
- [92] A.S. J.E. Robles, J. Rioja, X. Brugarolas, J.M. Berian, Collagen Graft Interposition in Vesicovaginal Fistula Treatment, *Urol Int*, 82 (2009) 116-118.

- [93] R.E.G. L.H. Quiroz, S.Shippey, G.W. Cundiff, T.Sanses, J.L. Blomquist, V.L. Handa, Abdominal sacrocolpopexy: anatomic outcomes and complications with Pelvicol, autologous and synthetic graft materials, *Am J Obstet Gynecol*, 198 (2008).
- [94] D.T.C. S.H. Hessami, Use of Biomaterial as Interposition Graft in the Treatment of Vesicovaginal Fistula, *Journal of Pelvic Medicine and Surgery*, 13 (2007).
- [95] M.M. J.B. Sharma, Topical Oxidized Cellulose for Tubal Hemorrhage Hemostasis During Laparoscopic Sterilization, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 82 (2003) 221-222.
- [96] E.M.R. A. Oto, C.M. O'Malley, J.A. Tkach, I.S. Gill, MR Characteristics of Oxidized Cellulose (Surgicel), *AJR*, 172 (1999) 1481-1484.
- [97] J.A.E.-C. G.S. Sandhu, S. Buckley, Oxidized cellulose (Surgicel) granulomata mimicking tumour recurrence, *British Journal of Neurosurgery*, 10 (1996) 617-619.
- [98] J.B.S. S. Mittal, N. Gupta, Successful closure of a bladder neck fistula complicated by urethral and vaginal stenosis, using oxidized cellulose (Surgicel) for reinforcement, *Int Urogynecol J*, 17 (2006) 426-428.
- [99] H. Serinçay, H.U. Güler, K. Ulubayram, N. Mangır, A scoping review of tissue interposition flaps used in vesicovaginal fistulae repair, *Therapeutic Advances in Urology*, 15 (2023) 17562872231182217.
- [100] J.B. P.A. Clavien, M.L. de Oliveira, J.N. Vauthey, D. Dindo, R.D. Schulick, E. de Santibanes, J. Pekolj, K. Slankamenac, C. Bassi, R. Graf, R. Vonlanthen, R. Padbury, J.L. Cameron, M. Makuuchi, The Clavien-Dindo Classification of Surgical Complications Five-Year Experience, *Ann Surg*, 250 (2009) 187-196.
- [101] A.E.Z. C. Acar, Üroonkolojik cerrahilerde komplikasyonların değerlendirilmesi ve önerilen kriterler, *Genel Üroonkoloji*, 11 (2012).
- [102] F.H. L. Ali, S. Khan, S. Hayat, K. Tariq, A. Hassan Comparison of Successful Outcome of Flap Versus No-flap in O'Connor and Sokol Technique for Vesicovaginal Fistula Repair *Khyber Med Univ J* 12 (2020) 225-228.
- [103] L.C. P. Abrams, A. Wagg, A. Wein, *Incontinence 6th Edition*, (2017).
- [104] D.N. T. Pshak, R. Terlecki, B.J. Flynn, Is Tissue Interposition Always Necessary in Transvaginal Repair of benign, Recurrent Vesicovaginal Fistulae?, *Urology*, 82 (2013) 707-712.
- [105] A.S. H. Shaker, M. Yassin, A. Idrissa, M.S. Mourad, Obstetric Vesico-Vaginal Fistula Repair: Should We Trim The Fistula Edges? A Randomized Prospective Study, *Neurourology and Urodynamics*, 30 (2011) 302-305.
- [106] V.V.D. D.Y. Pushkar, G.R. Kasyan, Management of Radiation-Induced Vesicovaginal Fistula, *European Urology*, 55 (2008) 131-138.
- [107] R.C. A. Steg, The Challenging Vesicovaginal Fistula, *Eur. Urol*, 9 (1983) 157-163.

- [108] M.S. S. Malde, A. Wilson, M. Pakzad, R. Hamid, J. Ockrim, P.J. Shah, T. Greenwell, The uses and outcomes of the Martius fat pad in female urology, *World J Urol*, 35 (2017) 473-478.
- [109] S.S.G. O. Singh, R.K. Mathur, Urogenital Fistulas in Women 5-year Experience at a Single Center, *Urol J.*, 7 (2010) 35-39.
- [110] A.B.-G. R. Warner, M. Pakzad, R. Hamid, J. Ockrim, T. Greenwell, The cost effectiveness of vaginal versus abdominal repair of vesicovaginal fistulae, *International Urogynecology Journal*, 31 (2019) 1363-1369.
- [111] S.M. V. Singh, A. Bansal, A. Akhtar, R.J. Sinha Prospective randomized comparison of repairing vesicovaginal fistula with or without the interposition flap: Result from a tertiary care Institute in Northern India, *Turkish Journal of Urology*, 45 (2019) 377-383.
- [112] H.W.B. S. H. Oakley, J.A. Greer, M.L. Richardson, A. Adelowo, L.Yurteri-Kaplan, F.M. Lindo, K.A. Greene, C.S. Fok, N.M. Book, C.M. Saiz, L.N. Plowright, H.S. Harvie, R.N. Pauls, Management of Vesicovaginal Fistulae: A Multicenter Analysis From the Fellows' Pelvic Research Network, *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 20 (2014) 7-13.
- [113] V.K. S. Milicevic, V. Ecim-Zlojutro, B. Jakovljevic, , Treatment of Vesicovaginal Fistulas: an Experience of 30 Cases, *Med Arh.*, 67 (2013) 266-269.
- [114] R.J.S. V. Singh, S. Mehrotra, D.K. Gupta, S. Gupta, Transperitoneal Transvesical Laparoscopic Repair of Vesicovaginal Fistulae: Experience of a Tertiary Care Centre in Northern India, *Curr Urol*, 3 (2013) 75-82.
- [115] E.K. K.S. Eilber, L.V. Rodriguez, N. Rosenblum, S. Raz, Ten-Year Experience With Transvaginal Vesicovaginal Fistula Repair Using Tissue Interposition, *The Journal of Urology*, 169 (2003) 1033-1036.
- [116] R.K.D. S.K. Tewary, A. Choudhary, S. Basu, R.K. Dey, Modified Technique of Doubly Folded Peritoneal Flap Interposition in Transabdominal Vesicovaginal Fistula Repair: Our Experience of 36 Cases, *Urologia Internationalis*, (2020).
- [117] K.J. M. Eisen, J.E. Altwein, F. Schreiter, R. Hohenfellner, Management of Vesicovaginal Fistulas With Peritoneal Flap Interposition, *The Journal of Urology*, 112 (1974).
- [118] M.M.E. M. Ezzat, V.Q. Tran, S.R. Aboseif, Repair of Giant Vesicovaginal Fistulas, *The Journal of Urology*, 181 (2009) 1184-1188.
- [119] P.C.H. R. Pope, R.H. Brown, C.Chalamanda, L.H.Hollier Jr, J. Wilkinson, A retrospective review to identify criteria for incorporating the Singapore flap and gracilis muscle flap into obstetric fistula repair, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 148 (2020) 37-41.

- [120] W.N. L.P. Maljaars, J.W.R. Roovers, R.J. Pope, Follow-up of Obstetric Fistula Repair Using Singapore Fasciocutaneous Flap and/or Gracilis Muscle Flap, *Neurourology and Urodynamics*, 41 (2022) 246-254.
- [121] M.T. F. Sharifiaghdas, The use of a rotational bladder flap for the repair of recurrent mixed trigonal–supratrigonal vesicovaginal fistulas, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 119 (2012) 18-20.
- [122] H.S. A. Safan, A. Abdelaal, M.S. Mourad, M. Albaz, Fibrin Glue Versus Martius Flap Interpositioning in the Repair of Complicated Obstetric Vesicovaginal Fistula. A Prospective Multi-Institution Randomized Trial, *Neurourology and Urodynamics*, 28 (2009) 438-441.
- [123] D.H.A. M.K. Shirvan, A. Ghoreifi, A Novel Method for Iatrogenic Vesicovaginal Fistula Treatment: Autologous Platelet Rich Plasma Injection and Platelet Rich Fibrin Glue Interposition, *The Journal of Urology*, 189 (2013) 2125-2129.
- [124] A.D. S. Choudhury, N. Gupta, D.K. Pal Interposing Layer of Fibrin Glue: A New Horizon in Vesico-vaginal Fistula Repair, *Urologia Journal* 89 (2021) 484-487.
- [125] S.W. G.C. Gurtner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound Repair and Regeneration *Nature* 453 (2008).
- [126] D.A. K. Acar, Yaşlılarda Yara Gelişimi Risk Faktörleri, Önleme ve Bakım Yaklaşımları Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi 19 (2015) 54-59.
- [127] G. Broughton, Wound Healing: An Overview, *Plast. Reconstr. Surg.*, 117 (2006).
- [128] G.S. C.K. Parsak, Ü. Çelik, Yara İyileşmesi, Yara Bakımı ve Komplikasyonları, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16 (2007).
- [129] B.W.K. (ed), *Clinical Regenerative Medicine in Urology* (2018).
- [130] J.J.B. A.R. Boccacini, Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds, *Expert Rev. Med. Devices* 2(2005) 303-317.
- [131] F.W. M. Abedalwafa, L. Wang, C. Li, Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (PCL) for Tissue Engineering Applications: a Review *Rev. Adv. mater. Sci* 34 (2012) 123-140.
- [132] S.M.L. M. Vert, G. Spenlehauer, P. Guerin Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 3(1992) 432-446.
- [133] D.W.H. M.A. Woodruff, The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- [134] M.S.N. M. Janmohammadi, Electrospun Polycaprolactone Scaffolds for Tissue Engineering: a Review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68 (2019) 527-539.

- [135] H.-C. Horng, W.-H. Chang, C.-C. Yeh, B.-S. Huang, C.-P. Chang, Y.-J. Chen, K.-H. Tsui, P.-H. Wang, Estrogen effects on wound healing, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 2325.
- [136] G. Schultz, Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing Associated with an Increase in TGF- β 1 Levels, *Nature Medicine* 3(1997).
- [137] A.J. G.M. Rubanyi, K. Kauser, Effect of Estrogen on Endothelial Function and Angiogenesis, *Vascular Pharmacology*, 38 (2002) 89-98.
- [138] C.J.H. N. Mangir, C.R. Chapple, S. MacNeil, Oestradiol-releasing Biodegradable Mesh Stimulates Collagen Production and Angiogenesis: An Approach to Improving Biomaterial Integration in Pelvic Floor Repair, *European Urology Focus* 5(2019) 280-289.
- [139] G.B. R. Soares, S. Guo, F. Gartner, J. Russo, F. Schmitt, Evidence for the Notch Signaling Pathway on the Role of Estrogen in Angiogenesis, *Mol Endocrinol*, 18 (2004) 2333-2343.
- [140] S. Shafaat, N. Mangir, C. Chapple, S. MacNeil, V. Hearnden, A physiologically relevant, estradiol-17 β [E2]-responsive in vitro tissue-engineered model of the vaginal epithelium for vaginal tissue research, *Neurourology and Urodynamics*, 41 (2022) 905-917.
- [141] W.H.P. L. Jeong, Preparation and Characterization of Gelatin Nanofibers Containing Silver Nanoparticles, *Int J Mol Sci*, 15 (2014) 6857-6879.
- [142] R.C.P. D.N. Rockwood, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D. Kaplan Materials Fabrication From Bombyx mori Silk Fibroin, *Nature Protocols*, 6 (2011).
- [143] D.S. A. Fakhrali, H. Salehi, M. Ghane, Electrospun PGS/PCL Nanofibers: From Straight to Sponge and Spring-like Morphology, *Polym Adv Technol* 31 (2020) 3134-3149.
- [144] A.H. L.A. Dobrzański, G. Chladek, W. Król, A. Mertas, Surface Properties and Antimicrobial Activity of Composite Nanofibers of Polycaprolactone with Silver Precipitations, *archives of Materials Science and Engineering* 70 (2014) 53-60.
- [145] N. Mangir, Developing biocompatible materials with improved angiogenic potential for surgical treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse, University of Sheffield, 2019.
- [146] A.W. Chow, R. Percival-Smith, K.H. Bartlett, A.M. Goldring, B.J. Morrison, Vaginal colonization with *Escherichia coli* in healthy women: Determination of relative risks by quantitative culture and multivariate statistical analysis, *American journal of obstetrics and gynecology*, 154 (1986) 120-126.
- [147] M.M. Harriott, E.A. Lilly, T.E. Rodriguez, P. Fidel Jr, M.C. Noverr, *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa, *Microbiology*, 156 (2010) 3635.

- [148] L. Bertuccini, R. Russo, F. Iosi, F. Superti, Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 30 (2017) 163-167.
- [149] A. Bauer, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *Am J clin pathol*, 45 (1966) 149-158.
- [150] S. Badylak, K. Kokini, B. Tullius, A. Simmons-Byrd, R. Morff, Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device, *Journal of Surgical Research*, 103 (2002) 190-202.
- [151] J.M. Lagaron, M.J. Ocio, A. Lopez-Rubio, *Antimicrobial polymers*, John Wiley & Sons 2011.
- [152] G.R. Mitchell, *Electrospinning: principles, practice and possibilities*, Royal Society of Chemistry 2015.
- [153] L. Liverani, A.R. Boccaccini, Versatile production of poly (ϵ -caprolactone) fibers by electrospinning using benign solvents, *Nanomaterials*, 6 (2016) 75.
- [154] A. Fakhrali, D. Semnani, H. Salehi, M. Ghane, Electrospun PGS/PCL nanofibers: From straight to sponge and spring-like morphology, *Polymers for Advanced Technologies*, 31 (2020) 3134-3149.
- [155] A. Bucciarelli, R.K. Pal, D. Maniglio, A. Quaranta, V. Mulloni, A. Motta, V.K. Yadavalli, Fabrication of nanoscale patternable films of silk fibroin using benign solvents, *Macromolecular Materials and Engineering*, 302 (2017) 1700110.
- [156] A. Ajisawa, Dissolution of Silk Fibroin With Calciumchloride/Ethanol Aqueous Solution, *J. Seric. Sci. Jpn*, 67 (1998) 91-94.
- [157] G. Cheng, X. Wang, S. Tao, J. Xia, S. Xu, Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (2015).
- [158] N. Mangır, C.J. Hillary, C.R. Chapple, S. MacNeil, Oestradiol-releasing biodegradable mesh stimulates collagen production and angiogenesis: an approach to improving biomaterial integration in pelvic floor repair, *European urology focus*, 5 (2019) 280-289.
- [159] S. Karagoz, N.B. Kiremitler, M. Sakir, S. Salem, M.S. Onses, E. Sahmetlioglu, A. Ceylan, E. Yilmaz, Synthesis of Ag and TiO₂ modified polycaprolactone electrospun nanofibers (PCL/TiO₂-Ag NFs) as a multifunctional material for SERS, photocatalysis and antibacterial applications, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188 (2020) 109856.
- [160] X. Chen, D.P. Knight, Z. Shao, F. Vollrath, Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR, *Polymer*, 42 (2001) 09969-09974.

- [161] M.Q. Luo, C.C. Zhang, S.Z. Lu, Preparation of Transparent Water-Insoluble Silk Fibroin Films, *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ, 2011, pp. 79-84.
- [162] A. Alessandrino, B. Marelli, C. Arosio, S. Fare, M.C. Tanzi, G. Freddi, Electrospun silk fibroin mats for tissue engineering, *Engineering in life sciences*, 8 (2008) 219-225.
- [163] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, P. Dumas, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of colloid and interface science*, 273 (2004) 381-387.
- [164] S. Calamak, E.A. Aksoy, N. Ertas, C. Erdogdu, M. Sagiroglu, K. Ulubayram, Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag⁺ release and antibacterial activity, *European Polymer Journal*, 67 (2015) 99-112.
- [165] A. Mohamed, V. Finkenstadt, S.H. Gordon, G. Biresaw, D.E. Palmquist, P. Rayas-Duarte, Thermal properties of PCL/gluten bioblends characterized by TGA, DSC, SEM, and infrared-PAS, *Journal of applied polymer science*, 110 (2008) 3256-3266.
- [166] P. Bhattacharjee, B. Kundu, D. Naskar, H.-W. Kim, D. Bhattacharya, T. Maiti, S. Kundu, Potential of inherent RGD containing silk fibroin-poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous matrix for bone tissue engineering, *Cell and tissue research*, 363 (2016) 525-540.
- [167] J. Typek, N. Guskos, A. Szymczyk, D. Petridis, FMR and DSC study of maghemite nanoparticles in PMMA polymer matrix, *Journal of non-crystalline solids*, 354 (2008) 4256-4261.
- [168] D.K. T.I. Valdes, F. Moussy, The Chick Chorioallantoic Membrane as a Novel in vivo Model for the Testing of Biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 62 (2001) 273-282.
- [169] S.D. N. Mangir, F. Claeysens, S. MacNeil, Using ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials, *ACS Biomater. Sci.Eng.*, 5 (2019) 3190-3200.
- [170] D.S. Dohle, S.D. Pasa, S. Gustmann, M. Laub, J.H. Wissler, H.P. Jennissen, N. Dünker, Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (2009) e1620.
- [171] S. Dikici, N. Mangır, F. Claeysens, M. Yar, S. MacNeil, Exploration of 2-deoxy-D-ribose and 17 β -Estradiol as alternatives to exogenous VEGF to promote angiogenesis in tissue-engineered constructs, *Regenerative Medicine*, 14 (2019) 179-197.
- [172] P. Sanpui, A. Murugadoss, P.D. Prasad, S.S. Ghosh, A. Chattopadhyay, The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite, *International journal of food microbiology*, 124 (2008) 142-146.
- [173] C.L. Fox Jr, S.M. Modak, Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 5 (1974) 582-588.

- [174] X. Tian, X. Jiang, C. Welch, T.R. Croley, T.-Y. Wong, C. Chen, S. Fan, Y. Chong, R. Li, C. Ge, Bactericidal effects of silver nanoparticles on lactobacilli and the underlying mechanism, *ACS applied materials & interfaces*, 10 (2018) 8443-8450.
- [175] R. Bera, S. Mandal, C.R. Raj, Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles, *Letters in applied microbiology*, 58 (2014) 520-526.
- [176] K.-H. Cho, J.-E. Park, T. Osaka, S.-G. Park, The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, *Electrochimica Acta*, 51 (2005) 956-960.
- [177] A. Panáček, M. Smékalová, R. Večeřová, K. Bogdanová, M. Röderová, M. Kolář, M. Kilianová, Š. Hradilová, J.P. Froning, M. Havrdová, Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142 (2016) 392-399.
- [178] A. Wady, A.L. Machado, V. Zucolotto, C. Zamperini, E. Berni, C.E. Vergani, Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles, *Journal of applied microbiology*, 112 (2012) 1163-1172.
- [179] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology advances*, 27 (2009) 76-83.
- [180] S.F. Badylak, J.E. Valentin, A.K. Ravindra, G.P. McCabe, A.M. Stewart-Akers, Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling, *Tissue Engineering Part A*, 14 (2008) 1835-1842.
- [181] S. Roman, I. Urbánková, G. Callewaert, F. Lesage, C. Hillary, N.I. Osman, C.R. Chapple, J. Deprest, S. MacNeil, Evaluating alternative materials for the treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse: a comparison of the in vivo response to meshes implanted in rabbits, *The Journal of Urology*, 196 (2016) 261-269.
- [182] C.M. Diedrich, Z. Guler, L. Hympanova, E. Vodegel, M. Zündel, E. Mazza, J. Deprest, J.P. Roovers, Evaluation of the short-term host response and biomechanics of an absorbable poly-4-hydroxybutyrate scaffold in a sheep model following vaginal implantation, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 129 (2022) 1039-1049.
- [183] L. Hympanova, R. Rynkevic, S. Roman, M.G.M. da Cunha, E. Mazza, M. Zündel, I. Urbánková, M.R. Gallego, J. Vange, G. Callewaert, Assessment of electrospun and ultra-lightweight polypropylene meshes in the sheep model for vaginal surgery, *European urology focus*, 6 (2020) 190-198.
- [184] Y. Chang, X. Sun, Q. Li, X. Ding, H. Liu, J. Wang, Silk fibroin scaffold as a potential choice for female pelvic reconstruction: a study on the biocompatibility in abdominal wall, pelvic, and vagina, *Microscopy research and technique*, 80 (2017) 291-297.

- [185] J.R. Dias, A. Sousa, A. Augusto, P.J. Bártolo, P.L. Granja, Electrospun polycaprolactone (PCL) degradation: An in vitro and in vivo study, *Polymers*, 14 (2022) 3397.
- [186] D. Mazloomdoost, L.B. Westermann, G. Mutema, C.C. Crisp, S.D. Kleeman, R.N. Pauls, Histologic anatomy of the anterior vagina and urethra, *Urogynecology*, 23 (2017) 329-335.
- [187] H. Fritsch, R. Hoermann, M. Bitsche, E. Pechriggl, O. Reich, Development of epithelial and mesenchymal regionalization of the human fetal utero-vaginal anlagen, *J Anat*, 222 (2013) 462-472.
- [188] J. Ding, M. Deng, X.-c. Song, C. Chen, K.-l. Lai, G.-s. Wang, Y.-y. Yuan, T. Xu, L. Zhu, Nanofibrous biomimetic mesh can be used for pelvic reconstructive surgery: A randomized study, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 61 (2016) 26-35.
- [189] J. Zhou, C. Cao, X. Ma, L. Hu, L. Chen, C. Wang, In vitro and in vivo degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds, *Polymer Degradation and Stability*, 95 (2010) 1679-1685.
- [190] C.M. Diedrich, Z. Guler, L. Hympanova, E. Vodegel, M. Zündel, E. Mazza, J. Deprest, J.P. Roovers, Evaluation of the short-term host response and biomechanics of an absorbable poly-4-hydroxybutyrate scaffold in a sheep model following vaginal implantation, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 129 (2022) 1039-1049.
- [191] H. Hjort, T. Mathisen, A. Alves, G. Clermont, J. Boutrand, Three-year results from a preclinical implantation study of a long-term resorbable surgical mesh with time-dependent mechanical characteristics, *Hernia*, 16 (2012) 191-197.
- [192] A. Feola, M. Endo, I. Urbankova, J. Vlacil, T. Deprest, S. Bettin, B. Klosterhalfen, J. Deprest, Host reaction to vaginally inserted collagen containing polypropylene implants in sheep, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212 (2015) 474. e471-474. e478.

EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

Seriñay H., Güler H.U., Ulubayram K., Mangır N. A Scoping Review of Tissue Interposition Flaps Used in Vesicovaginal Fistulae Repair. *Ther Adv Urol*, 15:1-14, 2023.

EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

- Halime Serinçay, Naşide Mangır, Kezban Ulubayram. “Vezikovajinal Fistül Tedavisinde Kullanılan Doku İnterpozisyon Fleplerinin Sistemik Derlemesi” 7. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 2021, Antalya.
- Halime Serinçay, Naşide Mangır, Kezban Ulubayram. “Vezikovajinal Fistül Onarımında Kullanılan Otolog ve Sentetik Doku İnterpozisyon Fleplerinin Klinik Sonuçları” 25. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, BIOMED 2021 (Çevrimiçi).