

**CİLT YENİLENMESİ İÇİN YENİ BİR FİBRİN MATRİS
OLUŞTURULMASI, KİMYASAL/FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ VE
DOKU İSKELESİ OLUŞTURMA POTANSİYELİ AÇISINDAN
İNCELENMESİ**

**GENERATION OF A NOVEL FIBRIN MATRIX FOR SKIN
REGENERATION, ANALYSIS OF ITS CHEMICAL/PHYSICAL
PROPERTIES AND ITS POTENTIAL AS A TISSUE
SCAFFOLD**

Aslı TAŞPOLATOĞLU

Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

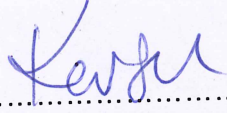
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

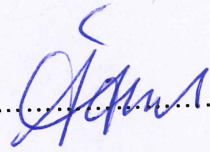
2018

ASLI TAŞPOLATOĞLU' nun hazırladığı " **Cilt Yenilenmesi İçin Yeni Bir Fibrin Matris Oluşturulması, Kimyasal/Fiziksel Özellikleri ve Doku İskelesi Oluşturma Potansiyeli Açısından İncelenmesi** " adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

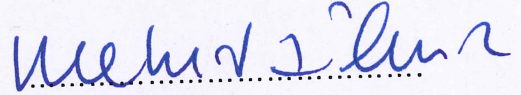
Prof Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN
Danışman


.....

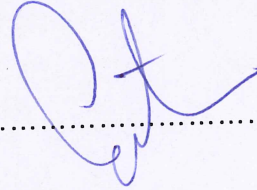
Prof Dr. İbrahim VARGEL
Üye


.....

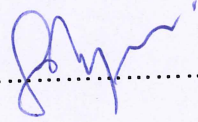
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Üye


.....

Doç. Dr. Dilara ZEYBEK
Üye


.....

Prof. Dr. Serenay ELGÜN
Üye


.....

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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 18.01.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

18 / 01 / 2018



ASLI TAŞPOLATOĞLU

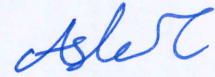
ETİK

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

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

beyan ederim.

18/01/2018



ASLI TAŞPOLATOĞLU

ÖZET

CİLT YENİLENMESİ İÇİN YENİ BİR FİBRİN MATRİS OLUŞTURULMASI, KİMYASAL/FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ VE DOKU İSKELESİ OLUŞTURMA POTANSİYELİ AÇISINDAN İNCELENMESİ

Aslı TAŞPOLATOĞLU

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Ocak 2018, 100 sayfa

Deri hasarları, yanık veya diyabete bağlı kronik yaraların iyileştirilmesi, yaşlanmaya bağlı deride oluşan deformasyonların giderilmesi amacıyla kullanılan pek çok yara örtüsü, dolgu malzemesi ve hücre temelli doku mühendisliği ürünleri mevcuttur. Bu ürünler alerji gibi bazı istenmeyen sonuçlar doğurabilmekte ayrıca pahalı ve kısıtlı iyileştirici etkiye sahip olma gibi dezavantajları bulunmaktadır. Dolayısıyla, deri yenilenmesi için etkin, risk oluşturmayan ve düşük maliyetli biyomalzemelere ihtiyaç vardır.

Bu tezde, kullanımı ve elde edilmesi kolay, yeni bir fibrin matris üretimi amaçlanmıştır. Bunun için, plateletten zengin plazmadan (PZP) kolayca, kalsiyum klörür veya trombinin tek tek jel oluşturucu madde olarak kullanılmasıyla gözenekli bir matris elde edilmiştir. Bu jel matrislerin kimyasal/fiziksel özellikleriyle deri yenilenmesi için kullanılabilirliği HS27 insan fibroblast hücreleri kullanılarak araştırılmıştır.

Plateletten zengin fibrin matris (PZFM), PZP' den elde edilen doğal bir iskele olarak, içerdiği çok sayıdaki platelet nedeniyle, zengin bir büyüme faktörü ve sitokin kaynağı olarak bilinmektedir. Bu çalışmada matrisler genellikle birlikte kullanılan trombin ve kalsiyum klorürün tek tek kullanımıyla oluşturulmuştur. Trombin ile ve kalsiyum klorür ile oluşturulan PZFM' ler, altmış dakikada sırasıyla, $83 \pm 0,0019$ ve $198 \pm 0,0038$ oranında şişme göstermişlerdir. Matrislerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan analizleri; bunun trombinle oluşan matris için $19,4 \pm 4,74 \mu\text{m}$ ve kalsiyum klörürle oluşan matrisin $35 \pm 5,8 \mu\text{m}$ olan farklı gözenek yapısından kaynaklanabileceğini göstermiştir. Trombinle oluşan PZFM' lerin 28 günde PBS ve % 10 FBS içeren DMEM içinde, kalsiyum klörürle oluşan matristen daha çok çözüldüğü belirlenmiştir. Matrislerde fibrin moleküllerinin çapraz bağlanması FTIR (Fourier transimiyon infrared spektroskopisi) ile incelenmiş ve termal dayanıklılıkları termogravimetrik analizle incelenmiştir.

Bu çalışmada, PZFM iskelelerde 21 gün üretilen hücrelerin çoğalması MTT testi ile, kollajen I ve kollajen III üretimleri ise immünhistokimyasal olarak hematoksilen/eozin boyama ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Matrislerde çoğalan hücreler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Fibroblastların her iki jelde de tutunup çoğaldıkları ancak sadece kalsiyum klorürle oluşturulan matrislerde üç haftalık bir sürede bütünlüklerini korudukları ve kollajen üretmeye başladıkları saptanmıştır.

Sonuç olarak, üretilen üç boyutlu PZFM' lerin hücre canlılığını ve aktivitesini destekleyici özellikleriyle, deri yenilenmesini gerektiren durumlarda kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Plateletten zengin fibrin matris (PZFM), fibroblast, kalsiyum klorür, trombin, deri yenilenmesi

ABSTRACT

GENERATION OF A NOVEL FIBRIN MATRIX FOR SKIN REGENERATION, ANALYSIS OF ITS CHEMICAL/PHYSICAL PROPERTIES AND ITS POTENTIAL AS A TISSUE SCAFFOLD

Aslı TAŞPOLATOĞLU

Master of Science, Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

January 2018, 100 pages

There are a considerable amount of wound dressings, fillers and tissue engineered products for the treatment of skin damages, burns, diabetic wounds or skin aging. These products sometimes lead to adverse reactions like allergy and they have the disadvantages of having high cost and limited curing effect. Therefore, there is a need for affordable biomaterials that may be used in skin regeneration efficiently without any risk.

The aim of this thesis is to produce a new, cost efficient and easy to prepare kind of fibrin matrix. Therefore, a porous matrix derived from platelet-rich plasma is produced by simply using either calcium chloride or thrombin as gelling agent. The chemical/physical properties and also the potential of these matrices as a skin regenerating biomaterial is analysed using HS27 human fibroblast cells.

As a natural scaffold produced from natural fibrin molecules obtained from platelet-rich plasma as PRFM is known to be a good source for growth factors and cytokines due to the high number of platelets that it contains. Here, the matrix is produced by simply

using calcium chloride or thrombin instead of common combined use. PRFMs obtained by thrombin had a swelling ratio of $83 \pm 0,0019$ in 60 minutes and calcium chloride as gelling agent. PRFM had a swelling ratio of $198 \pm 0,0038$ in 60 minutes. Analyses of both PRFMs by scanning electron microscopy (SEM), have revealed that this difference is due to the difference in pore sizes of calcium chloride PRFM ($19,4 \pm 4,74 \mu\text{m}$) and thrombin PRFM ($35 \pm 5,8 \mu\text{m}$). Thrombin unduced PRFMs degraded more than calcium chloride induced PRFM in PBS and DMEM containing 10% FBS in 28 days. The cross linking of fibrin molecules in the matrices were detected by FTIR (Fourier transformed infrared) spectroscopical analysis and their thermal resistance was measured by thermogravimetical analysis.

In this study, the cells cultured for 21 days on these PRFM scaffolds were analysed for their proliferation by MTT test and their collagen I and collagen III production by immunocytochemistry via hemotoxylin/eosin staining and transmission electron microscopy (TEM). Cells growing in the matrix were monitored by scanning electron microscopy (SEM). It is found that fibroblasts attached and proliferated in both matrices, but only the cells on calcium chloride induced matrices have remained intact and synthesized collagen in a three weeks period.

It is concluded that, these three dimensional PRFMs, have cell viability and activity promoting properties and thus they may be used in situations which require skin regeneration.

Key words: Platelet-rich fibrin matrix (PRFM), fibroblast, calcium chloride, thrombin, skin regeneration

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi, öneri ve yardımlarıyla yanımda olan, yol gösterme ve yönlendirmeleriyle bana destek olan tez danışmanım, değerli hocam **Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN'e**,

Her zaman bilgilerini benimle paylaşan, karşılaştığım zorlukları benimle göğüsleyen, desteğini her zaman hissettiğim canım arkadaşım **Şeyma BEKTAŞ' a**,

Çalışmalarım boyunca en büyük desteği veren, beni daima çalışmaya teşvik eden ve her zaman en yanımda hissettiğim **Efe Can DAĞLI' ya**,

Aynı yolda yürürken ellerinden gelen yardımı yaparak beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım **Bircan ÇOBAN ve Ezgi BEKTAŞ' a**,

Çalışmalarımı yürütürken maddi manevi yanımda olan ve deneylerimde ilerlememe imkan sunan **Erdal ERDOĞAN ve Aslıgül KURT' a**,

Histolojik analizlerime bilgisi ve desteği ile katkı sağlayan, bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sunan **Doç. Dr. Dilara Zeybek' e ve ekibine**,

Eğitim hayatım boyunca her zaman okumaya yönlendiren, hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan ve varlıklarıyla güç bulduğum, canım babam **Turhan TAŞPOLATOĞLU** ve canım annem **Sevil TAŞPOLATOĞLU' na**,

Tezimdeki karakterizasyon çalışmalarımı tamamlamama yardımcı olan **ODTÜ MERLAB çalışanlarına**,

Çalışmamda emeği geçen ve yardımı dokunan herkese sonsuz teşekkürler.

Aslı TAŞPOLATOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deri Dokusunun Histofizyolojisi	3
2.2. Deri kayıp ve hasarları	6
2.3. Yara Onarımı ve İyileşme Evreleri	7
2.4. Yara İyileşmesinde Etkili Büyüme Faktörleri	10
2.5. Deri Doku Yenilenmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri	12
2.5.1. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri.....	13

2.5.2. Hücre Temelli Terapi	13
2.5.3. Plateletten Zengin Plazma (PZP)	13
2.5.4. Biyomimetik İskeleler ve Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımı	16
2.5.4.1. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doğal Polimerik İskeleler	17
2.5.4.1.1. Fibrin	18
2.5.4.1.1.1. Fibrin Polimerizasyonu.....	19
2.5.4.1.1.2. Hemostaz.....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Hücreler	28
3.2. CaCl₂ ve Trombinli Fibrin Matrislerin Üretimi	29
3.2.1. CaCl ₂ 'li Fibrin Matrisin Üretimi ve Uygun CaCl ₂ Konsantrasyonun Bulunması	32
3.2.2. Trombinli Fibrin Matrisin Üretimi.....	32
3.3. CaCl₂ ve Trombinli Fibrin Matrislerin Karakterizasyonu	33
3.3.1. Şişme Testi	33
3.3.2. Çözülme Testi	33
3.3.3. Jelleşme Testi	34
3.3.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi	34
3.3.5. Termogravimetrik Analiz (TGA)	34
3.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	35
3.4. Hücresel Çalışmalar	35
3.4.1. Hücre Kültürü	35
3.4.2. Hücrelerin Pasajlanması	35
3.4.3. Hücrelerin Dondurulması.....	36
3.4.4. Dondurulan Hücrelerin Çözdürülmesi.....	37
3.4.5. Tripan Mavisi ile Hücre Sayısının Belirlenmesi	37
3.4.6. Kandaki Platelet Sayısının Belirlenmesi	39

3.4.7. L929 ve HS27 Hücre Hatlarının Kalibrasyon ve Çoğalma Eğrilerinin elde edilmesi	40
3.5. CaCl₂'li ve Trombinli Fibrin Matrislerde İnsan Fibroblast Hücre Hattının (HS27) Kültürü	41
3.6. MTT Analizi	41
3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	42
3.8. Histolojik İncelemeler	42
3.8.1. Hematoksilen/Eozin Boyaması (H&E)	43
3.8.2. Kollajen Tip I ve Tip III için İmmü floresan Boyama	43
3.8.3. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	45
3.9. İstatistiksel Analizler	47
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Fibrin Matris Üretiminde Uygun CaCl₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi	48
4.2. CaCl₂ ve Trombinli Fibrin Matrislerin Karakterizasyonu	49
4.2.1. Jelleşme Testi Sonuçları	49
4.2.2. Şişme Testi Sonuçları	51
4.2.3. Çözülme Testi Sonuçları	54
4.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi Sonuçları	56
4.2.5. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları	58
4.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	60
4.3. Hücresel Çalışmalar	61
4.3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri	61
4.3.2. Fibrin Matrisler ile Yürütülen Hücre Kültürü Çalışmaları	66
4.3.2.1. MTT Analiz Sonuçları	66
4.3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları	67
4.3.2.3. Histolojik İncelemeler	69

5. SONUÇLAR.....	85
6. KAYNAKLAR.....	87
EK	97-99
ÖZGEÇMİŞ	100



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1- Deri dokusunun yapısı.....	3
Şekil 2- Fibrinojenin kristalografik yapısı	20
Şekil 3- Fibrin yapıdaki çapraz bağlanmalar.....	22
Şekil 4- Fibrin polimerizasyonu.....	23
Şekil 5- Pıhtılaşma Basamakları.....	26
Şekil 6- Üretilen matrislerin görüntüsü.....	31
Şekil 7- CaCl_2 ile (a) ve trombin ile (b) üretilen fibrin matrisler.	31
Şekil 8- Hücre sayısının belirlenmesinde hücre sayımı yapılacak alanlar..	38
Şekil 9-Platelet sayımı sırasında Neubauer sayım çemberinde kullanılacak alanlar.	39
Şekil 10- Fibrin matris üretiminde kullanılacak olan ve hücreler için en uygun CaCl_2 konsantrasyonunun tespiti.....	48
Şekil 11- Farklı CaCl_2 konsantrasyonları ile üretilen fibrin matrislerin jelleşme süreleri.	50
Şekil 12- % Şişme oranı-Zaman grafiği.....	52
Şekil 13 – CaCl_2 ve trombin ile üretilen fibrin matrislerin PBS içerisinde, 37°C ' deki çözülmesi	54
Şekil 14- CaCl_2 ve trombin ile üretilen fibrin matrislerin DMEM + %10 FBS içerisinde, 37°C ' deki çözülmesi	55
Şekil 15- CaCl_2 ile üretilen fibrin matris, trombin ile üretilen fibrin matris ve kontrol grubu olarak kullanılan plateletten zengin plazmaya ait FTIR spektrumları.....	57
Şekil 16- CaCl_2 ile üretilen fibrin matrise ait termogram	58
Şekil 17- Trombin ile üretilen fibrin matrise ait termogram	59
Şekil 18- CaCl_2 (a) ve trombin (b) ile üretilen fibrin doku iskelesinin SEM mikrografları	60
Şekil 19- L929 fare fibroblast hücrelerinin çoğalma eğrisi	61
Şekil 20- L929 fare fibroblast hücre hattı kalibrasyon eğrisi	62
Şekil 21- L929 fare fibroblast hücrelerinin özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan grafik	62

Şekil 22- HS27 insan fibroblast hücrelerinin çoğalma eğrisi.....	63
Şekil 23- HS27 insan fibroblast hücre hattı kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 24- HS27 insan fibroblast hücrelerinin özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan grafik	64
Şekil 25- Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HS27 hücrelerine ait Kristal viyole boyama mikrografları.....	65
Şekil 26- Trombinli ve CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisler içerisindeki hücre kültürleri ile kontrol olarak direkt hücre kültür kaplarına ekilen hücrelerin çoğalma grafikleri.....	66
Şekil 27- CaCl_2 ile ve trombin ile üretilen fibrin matrisler içerisinde kültüre alınan HS27 hücrelerinin SEM mikrografları..	68
Şekil 28 - CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 1. gününe ait ışık mikrografları	69
Şekil 29 - CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 14. güne ait ışık mikrografları.....	70
Şekil 30- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait ışık mikrografları.....	71
Şekil 31- Hücre eklenmeyen CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin ışık mikrografları...72	
Şekil 32- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 1. güne ait floresan mikrografları (Kollajen I ve kollajen III)	72
Şekil 33- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait floresan mikrografları (Kollajen I ve kollajen III)	73
Şekil 34- CaCl_2 ile oluşturulan PZFM' nin gözeneklerine tutunmuş fibroblast hücreleri	74
Şekil 35- Fibroblast hücrelerinde sitoplazmada glikojen tanecikleri	74
Şekil 36- CaCl_2 ' li PZFM içinde kollajen lifler.	75
Şekil 37-Daha büyük büyütmede çizgilenme ile kollajen lifleri.....	75
Şekil 38- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin	76
Şekil 39- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 14. güne ait ışık mikrografları	77
Şekil 40- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait ışık mikrografları	77
Şekil 41- Hücre eklenmeyen trombin ile elde edilen fibrin matrisin ışık mikrografları. 78	
Şekil 42- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 1. güne ait floresan mikrografları (Kollajen I ve kollajen III)	78
Şekil 43- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait floresan mikrografları (Kollajen I ve kollajen III)	79

<i>Şekil 44- Fibrin jel aralıklarında fibroblast hücreleri.....</i>	<i>80</i>
<i>Şekil 45-Fibroblast hücrelerinin membran bütünlüğü kaybolmuş ve dağılmış sitoplazmaya sahip fibroblastlar..</i>	<i>80</i>
<i>Şekil 46- Fibroblast hücrelerinin çekirdeği, çevresinde dağılmış sitoplazması ve lipid damlaları.....</i>	<i>81</i>
<i>Şekil 47- Fibroblast sitoplazmasında otofajik fagozom.....</i>	<i>81</i>
<i>Şekil 48- Yassı çekirdeği ve çok ince sitoplazması ile fibrin jelin gözeneklerine yerleşmiş fibroblast hücresi.</i>	<i>82</i>
<i>Şekil 49- Yassı çekirdeği ile fibrin jelin gözenğine yerleşmiş hücre</i>	<i>82</i>

ÇİZELGELER DİZİNİ

<i>Tablo 1- Yara İyileşmesinde Görevli Hücresel ve Hücrelerarası Matris Proteinlerinin Görevi.....</i>	<i>8</i>
<i>Tablo 2- Yara iyileşmesinde etkili olan temel bütüme faktörleri ve sitokinler</i>	<i>11</i>
<i>Tablo 3- Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doğal Biyomalzemeler</i>	<i>18</i>
<i>Tablo 4- Pıhtılaşma faktörleri.....</i>	<i>24</i>
<i>Tablo 5- Üretilen matrislerin kullanılan CaCl_2 molaritelerine göre jelleşme süreleri...</i>	<i>51</i>
<i>Tablo 6- Matris örneklerinin belirli zaman aralıklarında ölçülen ağırlıkları</i>	<i>52</i>

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: Alan
dk	: Dakika
E _{sw}	: Matrislerin şişme yüzdesi
F	: Fibroblast
FXIII	: Fibrin Stabilize Edici Faktör
h	: Yükseklik
HS27	: İnsan Fibroblast Hücre Hattı
H&E	: Hematoksilen/Eozin
L929	: Fare Fibroblast Hücre Hattı
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
n	: Sayılan En Küçük Kare Sayısı
N	: Platelet Sayısı
N _{ort}	: Ortalama Hücre Sayısı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sa	: Saat
SF	: Sulandırma Faktörü
t	: Zaman
t _d	: Popülasyon ikilenme süresi
vWF	: von Willibrand Faktör
W _t	: t zamanındaki ağırlık

W_0 : Kuru ağırlık
 X_{ort} : Ortalama hücre sayısı
 X : Hücre Sayısı
 μL : Mikrolitre
 μ : Spesifik Büyüme Hızı
 $^{\circ}C$: Santigrat Derece
% : Yüzde
 α : alfa
 δ : delta
 λ : lamda

Kısaltmalar

ADP : Adenozin Difosfat
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adenozin Trifosfat
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimetil Sülfoksit
ECM : Hücre Dışı Matris
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
FBS : Fötal Sığır Serumı
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL : İnterlökin

KGF : Keratinosit Büyüme Faktörü

MMP : Matris Metalloproteinaz

MTT : (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür)

PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi

PDGF : Platelet kökenli Büyüme Faktörü

RPM : Revolutions Per Minute

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

PFP : Plateletten Fakir Plazma

TGA : Termogravimetrik Analiz

TGF : Transform edici Büyüme Faktörü

TNF- α : Transform edici Büyüme Faktörü- alfa

PZFM : Plateletten Zengin Fibrin Matris

PZP : Plateletten Zengin Plazma

TX : Texas Red

UV : Ultraviyole

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Fibrin; damar hasarı, damara yakın çevre dokunun zedelenmesi ile kan plazması proteini olan fibrinojen öncülünden oluşmakta ve böylece kan kaybının önüne geçilmektedir. Tamamen doğal, biyobozunur, gözenekli yapıya sahip ve hücreler ile uyumlu bir yapıya sahip olması sebebi ile deri yenilenmesi, yara iyileştirilmesi gibi durumlarda tercih edilmektedir. Etkili sonuçlar vermesi sebebi ile fibrin materyali ile pek çok klinik çalışma yapılmakta ve piyasada mevcut yara örtüsü veya dolgu malzemesi olarak kullanılan fibrin temelli ürünler bulunmaktadır. Bu ticari ürünlere yara örtüsü olarak BioSeed-S®, AcuDres®, Allox® ve Cyzact® örnek verilebilir. Baxter firmasına ait Tisseel®, Ethicon firmasına ait Evicel® ve Factor Medical firmasına ait Selphyl® ise fibrin dolgu ürünlerinden bazılarıdır. Mevcut ürünlerin etkili sonuçlar verdiği bilinse de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, allojenik ya da zenojenik kaynaklı veya farklı biyomalzemeler ile kompozit olmaları, barındırdıkları hücrelerin otolog olmaması nedeniyle infeksiyon, alerjik reaksiyon oluşturabilmelerine ek olarak büyüme faktörü içeren ve doku oluşturabilen tiptekilerin maliyetleri çok yüksektir. Büyüme faktörlerinin pahalılığının yanında yarılanma sürelerinin oldukça kısa oluşları da bu ürünleri sınırlandırır. Özellikle alerjik reaksiyon ve infeksiyon ihtimalini bertaraf etmek amacıyla hücresiz ve hastanın kendi kanından elde edilen fibrin temelli ürünler tercih edilmektedir. Ancak, deri dokusunun yenilenmesi istenilen bölgesine sadece fibrin temelli bir uygulama yapılması yerine içerisinde hücre barındıran ve büyüme faktörleri açısından daha zengin bir fibrin materyalinin kullanılması başarılı olabilir. Dolayısıyla, plateletten zengin fibrin matris (PZFM) içerisine gömülmüş fibroblast hücrelerinin olduğu bir biyomalzemenin doku yenilenmesini artırıcı özellikte olması mümkün olabilir.

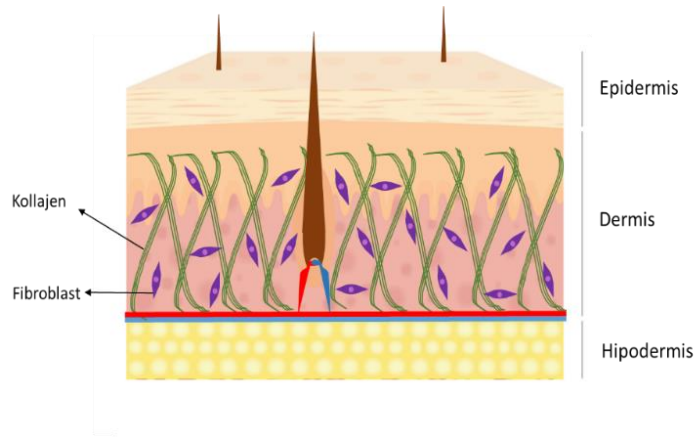
Tez çalışması kapsamında, bilinen fibrin matrislerden farklı şekilde üretilen PZFM içerisine gömülmüş fibroblast hücrelerinin cilt yenilenmesi için doku iskelesi oluşturulması amaçlanmıştır. Fibroblast hücrelerinin tercih edilme sebebi, deri dokusundaki ECM elemanlarının %70' ini kapsayan kollajenin üretimini sağlayan hücre olması ve fibrin ile fibronektin aracılığı ile bağlanabilir yapıda olmasıdır. Ayrıca fibrini

oluşturan plazmanın plateletten oldukça zengin olması, içinde bulunduracak olduğu ve doku rejenerasyonunda önemli etkileri bulunan büyüme faktörlerinin de daha fazla olduğu anlamına gelmektedir. Klinik uygulamalarda kullanılan plateletten zengin plazma elde edilmesinden farklı olarak üretilen PZFM, tam kandaki platelet yoğunluğunun yaklaşık on katı kadar platelet içermektedir. Plateletten zengin plazma (PZP) ve daha çok büyüme faktörü içeren plateletten fakir plazma (PFP)'nın birlikte kullanımı ile elde edilen plazmaya yalnızca CaCl_2 ve yalnızca trombin eklenerek elde edilen iki farklı PZFM' in karşılaştırılması yapılmış ve doku iskelesi oluşturma potansiyeli çeşitli analizlerle incelenmiştir. Mevcut fibrin matrislerin trombin ve CaCl_2 birlikte kullanımı ile elde edildikleri bilinmektedir. Trombinin saf bir şekilde elde edilmesindeki basamak fazlalığı, vücutta kullanımıyla ilgili çeşitli tartışmaların olması, özellikle insan trombininin yüksek maliyetli oluşu fibrin temeli tedavilerin ulaşılabilirliğini de kısıtlamaktadır. Bu tezin kapsamında kullanılan CaCl_2 oldukça uygun maliyetlerde temin edilebilmektedir. Maliyeti yüksek olan insan trombini ise jelleşmenin gözlemlendiği en düşük dozda kullanılmıştır ve hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışma ile deri dokusunun yenilenmesinde etkisi oldukça yüksek olan fibrinin, maliyetinin düşürölmesi ve ulaşılabilirliğinin arttırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Dokusunun Histofizyolojisi

Deri insan vücudunun en büyük organıdır. Bir kişinin vücut ağırlığının yaklaşık olarak %16'sını oluştururken vücutta 1.8m²' lik bir yüzey alanını kaplar ve ortalama kalınlığı 1-2 mm'dir. Deri dokusu; homeostazın ve vücudun korunması için gerekli çeşitli hayati fonksiyonlara sahip, metabolik açıdan aktif bir organdır. Kimyasal, fiziksel ve biyolojik uyarılara karşı bariyer görevi görür, vücut sıvılarının kaybını önler ve vücut sıcaklığını düzenlemeye yardımcı olur [2]. Deri aynı zamanda bir duyu organı olarak hizmet eder ve kişinin çevresini algılayabileceği bir yüzey sağlar. Ayrıca antimikrobiyal peptit ve D vitamini üretiminde önemli bir rol oynar. Ayrıca, ultraviyole (UV) radyasyonunu absorblayan bir pigmentasyon sistemi ile vücudu zararlı ışıklardan korumaktadır [3]. Memeli derisi tipik olarak üç ana katmandan oluşmuştur: Epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan yağ tabakası) (Şekil 1). Epidermis, derinin en dışında bulunan ve yoğun keratinosit hücrelerinden oluşan bir tabakadır. Dermis ise, epiderminin altında, çoğunlukla fibroblast hücrelerinin bulunduğu, deriye yapısal bütünlük ve elastikiyetini sağlayan bir tabakadır. Epidermis ile dermis tabakasını birbirinden ayıran ve ekstraselüler matrisce zengin bir bölge bulunmaktadır. Derinin en iç tabakası olan hipodermis; yağ dokudan oluşur, deriyi mekanik etkilerden korur ve termoregülasyonu sağlar.



Şekil 1- Deri dokusunun yapısı

Epidermis

Embriyonik dönemde ektodermden köken alan epidermis tabakası, cildin en dış tabakasını oluşturur. 0.05 -1.55 mm arasında değişen kalınlıklara sahiptir. En ince bulunduğu yer göz kapakları (0.05 mm), en kalın bulunduğu yer ise avuç içi ve tabanlar (1.55 mm)' dir [4]. Epidermis %97 gibi bir oranla keratinosit hücrelerinden oluşur. Keratinosit haricinde melanositler, Langerhans hücreleri, merkel hücreleri de bulunmaktadır. Epidermis, keratinositlerin farklılaşması ile dört katmana ayrılmıştır. Bu tabakalar dıştan içe: korneum tabaka, granüler tabaka, spinozum tabaka ve bazal tabakadır [5]. Avuç içi ve ayak tabanı gibi derinin kalın olduğu bölgelerde korneum tabakası ve granüler tabaka arasında beşinci tabaka olarak lusidum tabakası bulunur [6].

En dışta bulunan korneum tabakasını oluşturan biyokimyasal olarak aktif korneosit hücreleri; çekirdeklerini kaybetmiş, sitoplazmalarında yoğun bir keratin biriktirmiştir ve hücre içi lipidlerle birlikte geçirgenlik bariyeri görevi görür. Bu hücreler, vücudun hızlı su kaybını ve mikroorganizmaların vücuda girişini engeller.

Korneum tabakasının altında bulunan granüler tabaka, keratinosit hücrelerinden oluşur ve bu hücreler bölünme yeteneklerini kaybetmişlerdir [5].

Granüler tabakanın altında bulunan spinozum tabakası ise bölünebilen keratinosit hücrelerinden oluşur; ancak bu hücrelerin bölünme yetenekleri sınırlıdır. Bu tabakada keratinositlerin aralarına dağılmış olarak bulunan langerhans hücreleri (dentritik hücreler) de vardır ve derinin immün yanıt oluşturmalarını sağlar. Langerhans hücreleri spinozum tabakasındaki hücrelerin % 3-5' ini oluşturur [7].

Bazal tabaka epidermisin en içteki tabakasıdır ve bu tabakadaki hücreler bazal membrana tutunurlar. Bazal tabaka % 10'u kök hücre görevi gören mitotik olarak aktif bazal hücreler, pigment melenini üreten ve cilde rengini veren melanosit hücleri ile sinirsel uyarımı sağlamak için sinir büyüme faktörü sentezleyerek dokunma hissinin oluşmasını sağlayan nöroendokrin özellikteki merkel hücrelerinden oluşmaktadır. Bazal tabakada bölünerek çoğalan keratinosit hücreleri (bazal hücreler) üst katmanlara aktarılır ve üst katmanlarda ölürek yaklaşık olarak 28 günde bir deriden döküntüler şeklinde atılır [8].

Dermis

Epidermis ile hipodermis tabakaları arasında bulunan dermis tabakası bulunduğu yere göre farklı kalınlıklarda olabilmektedir. Örneğin sırt derisinde 4mm kalınlığa ulaşırken genellikle 2mm' den daha ince olduğu görülmektedir. Dermis bünyesinde deri dokusunu besleyen kan damarlarını, sinirleri, keratinize yapıları (kıl folikülleri, tırnaklar), ter ve yağ bezlerini, dokunma duyusu için sinir reseptörü olan Meissner cisimciğini, basıncı algılayan Pacini cisimciğini bulundurur [9]. Dermis tabakası epidermis tabakasını besin ve yapısal olarak destekleyici bir göreve sahiptir.

Dermis tabakası retiküler dermis ve papiller dermis olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. İnce papiller tabaka epidermisin hemen altında bulunur. Retiküler tabaka ise papiller tabakanın tabanından hipodermise doğru devam eder [4].

Dermal tabakanın ana bileşenleri dermal fibroblastlar tarafından yapılan kollajen lifler, elastik lifler ve ekstrasfibril yapılarıdır. Kollajen lifleri dermisin yaklaşık % 70' ini oluşturur. Derideki tüm kollajen miktarı ise kollajen tip I için %80 kollajen tip III için %20' dir [7]. Kollajen I ve III' ün dermisdeki oranları yaralanmalar sonucunda değişim göstermektedir. Çünkü hasar görmüş bölgeler oluşan boşluklar kollajen veya lifler yerine ekstrasfibriler yapılar ile doldurulur. Bu da yenilenmiş dokunun eski elastikiyetini kaybetmesine sebep olabilmektedir. Papiller dermis tabakası ince ve daha gevşek kollajen liflerini barındırırken retiküler dermis tabakası cilt yüzeyine paralel olarak yerleşmiş daha yoğun ve kalın kollajen liflerden oluşur. Papiller dermis tabakasında kollajen tip I ve III, elastik lifler, bağ dokusu hücreleri, kollajen tip VII bağlayıcı ince fibriller bulunurken, retiküler dermis tabakası genellikle 100µm çapa yaklaşan yoğun paketlenmiş kollajen tip I demetlerinden oluşur. Retiküler tabakadaki bu kalın kollajen demetleri yüzey gerilimine paralel olarak yerleşmiş olduğundan cilde gerilim kuvvetine karşı direç kazandırır. Dermis tabakasının % 2' lik bir kısmını oluşturan elastik lifler ise esas olarak retiküler tabakada bulunarak deriye esneklik kazandırır. Ekstrasfibriler matris lifler arasındaki boşluğu doldurur ve çoğunlukla proteoglikanlardan ve hyalüronanlardan oluşan bir mukopolisakkarid jeldir. Dolayısıyla, ekstrasfibriler matris, sıvıların, moleküllerin ve inflamatuvar hücrelerinin hareketini kolaylaştıran ve basınca direnç gösteren hidrojel benzeri bir yapı kazandırır [10].

Hipodermis

Dermis tabakasının altında kasın üzerinde bulunan ve çoğunlukla yağ hücrelerinden (adiposit) oluşan hipodermis; soğuğa karşı yalıtımı sağlar, şiddetli darbelere karşı yastık etkisi oluşturur, enerji deposudur ve hatta endokrin organ olarak görev yapmaktadır [9]. Adipositler kollajen ve büyük kan damarlarından oluşan fibröz septa ile birbirlerinden ayrılmış yağ lobüleri içerir. Bu septa ağı yağ lobüllerini sabit tutarken yapısının korunmasına destek verir [8].

2.2. Deri kayıp ve hasarları

Termal yanıklar, diyabetik ülserler, bası ülserleri, cerrahi müdahaleler gibi bazı durumlarda deri hasar veya kayıpları görülebilmektedir. Ayrıca yaştan ilerlemesine bağlı olarak derideki kollajen liflerinin degradasyonu ve fibroblast hücrelerinin yeterli miktarda kollajen üretememeleri gibi sebeplerle deride oluşan kırışıklık veya sarkmalar oluşmaktadır.

Deri dokusu problemlerinde en yaygın görülen örnek diyabetik ülserlerdir. Diyabet, dünyada giderek artan bir insidansa sahip küresel bir sağlık problemidir. Hiperglisemi (yüksek kan şekeri)'nin kalıcı hale gelmesi ile damarlar ve sinirler üzerinde dejeneratif etkiler gözlenir. Bunun sonucu olarak kardiyovasküler hastalıklar, beyin-damar hastalıkları, retinopati ve periferik nöropati gibi çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Diyabet hastalarında ayak tabanı yüzeyinde periferik nöropati sebebi ile travmatik ayak yaralarının açılma ihtimali söz konusudur. Periferik vasküler hastalıklar yara iyileşmesini engeller ve enfeksiyon riskini artırır. Bu olaylar basamaklı olarak, uzuv kayıplarına, ve hatta ölümlere sebep olabilmektedir [11].

Yaşlılık, damar hastalıkları, yetersiz beslenme, sigara kullanımı, böbrek fonksiyon bozukluğu, radyasyona maruz kalma, enfeksiyon ve bağışıklık sisteminin baskılanması gibi pek çok durum da diyabet gibi yeterli düzeyde yara iyileşmesini engellemektedir. Yara bölgesindeki yetersiz damarlanma sebebi ile oksijensiz kalan yarada enfeksiyona eğilimli olma durumu ve uzun süren bir inflamasyon süreci gözlemlenir. İnflamasyon hücrelerinin yara bölgesinde uzun süre kalması da ECM'yi parçalayan, fibroblast ve keratinosit hücrelerine zarar veren radikaller üreterek normal bir hücre proliferasyonuna

izin vermez. Sonuç olarak; genel denge; MMP (matris metalloproteinaz) ve ECM degradasyonuna neden olan diğer enzimlere üstün gelerek, fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu dolayısıyla yara iyileşmesini engeller [12].

Deri dokusu kayıplarında oldukça rastlanan bir diğer durum ise yanıklardır. Klinikte deri yanıkları deriyi etkilediği derinliğe göre derecelendirilerek değerlendirilir. Birinci derece yanıklar yalnızca epiderminin, ikinci derece yanıklar epidermisle birlikte derminin ince bir bölümünü, üçüncü derece yanıklar ise derminin büyük bölümünün veya tamamının kaybedilmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Deri hasarlarının dermis tabakasına kadar ilerleyip derinleşmesi durumunda derinin kendiliğinden iyileşerek eski halini alması ve yaranın kapanması pek mümkün olmamaktadır.

Kronik, yani iyileşmeyen, yaraların altında yatan nedenler laboratuvar ortamında simüle edilebilmekte ve hayvan modelleri kullanılarak incelenmektedir [13]. Mevcut yetersizliklerin anlaşılması amaçlanarak araştırmacılar hücre ve gen tedavileri, biyomimetik dermal iskeleler (scaffold), özel bandajlar ve çeşitli tıbbi cihazlar geliştirmişlerdir.

Yaşın ilerlemesi ile deride görülen sarkma ya da kırışıklıkların giderilmesi için kozmetik amaçlı, enjekte edilebilir uygulamalar da bulunmaktadır. Bu uygulamalarda genellikle uygun fiyatlı olmaları sebebi ile doğal /sentetik dolgu malzemeleri kullanılmaktadır. Ancak etkinin uzun süre devam edebilmesi ve doğal bir yenilenme olabilmesi istendiğinde hücre temelli tedaviler tercih edilmektedir. ECM degradasyonu sebebi ile deride oluşan hacimsel deformasyonların giderilmesi, hücre içeren doğal biyomalzemelerin kullanılması ile mümkün olmaktadır.

2.3. Yara Onarımı ve İyileşme Evreleri

Deri kayıpları ve hasarlarında, yaralanan dokunun kapanması ve eski halini alması yenilenme veya onarım ile gerçekleşmektedir. Yenilenme (rejenerasyon), yaralı bölgenin işlevsel ve morfolojik olarak eski haline geri gelmesi iken onarım, yaralı bölgenin bağ doku ile doldurulması şeklinde gerçekleşir. Fötal dönemdeki yara iyileşmesinde normal bir kollajen birikimi ve deri oluştuğu görülürken, yetişkin yara iyileşmesinde yara bölgesinin hızlı bir şekilde bağ doku lifleri ile dolmaya başladığı

görülmektedir. Yetişkin yarasındaki bu durum infeksiyon riskine karşı mikroorganizmaların yaradan uzak tutulmaya çalışılması amacıyla alınan bir tedbir olarak düşünülmelidir. Yetişkin yaralarında yara bölgesinde ECM' nin düzenli bir yerleşme göstermeden bölgenin bağ doku ile doldurulması deri dokusunun oluşamamasına sebep olmakta ve yenilenmeden çok doku onarımı ile sınırlı kalmaktadır [14] [15].

Yara iyileşmesi; kan hücreleri, parenkimal hücreler, ekstraselüler yapılar, sitokinler, büyüme faktörlerinin birlikte görev aldığı dinamik bir süreçtir. Bu süreç birbirleriyle örtüşmeler gösteren dört ayrı evrede gerçekleşmektedir. Bu evreler sırası ile hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon (yeniden şekillenme)' dur. Yara iyileşmesinde görevli hücreler ve hücrelerarası matris proteinlerinin görevi Tablo 1' de verilmiştir [16].

Tablo 1- Yara İyileşmesinde Görevli Hücreler ve Hücrelerarası Matris Proteinlerinin Görevi

Yara Elemanları	Yara Bölgesinde ilk Görülme Zamanı	Yara İyileşmesindeki Etkileri
Plateletler	<i>Hemen görülür.</i>	<i>Hemostazda PDGF, TGF-α, TGF-β, EGF gibi büyüme faktörlerinin ve proteolitik enzimlerin salınımı gerçekleştirir.</i>
Nötrofiller	<i>6. saatte görülmeye başlar. En fazla görüldüğü saat 24-48. Saatleri arasındır. 72. Saatten sonra kaybolmaya başlar.</i>	<i>Yara bölgesindeki bakteri ve yabancı cisimlerin temizlenmesini sağlar</i>
Makrofajlar	<i>En fazla 3-5 gün arasında görülür.</i>	<i>PDGF, TGF-β, TGF-α, FGF, IL-1, EGF ve TNF-α büyüme faktörlerinin salınımını gerçekleştirir.</i>
Fibroblastlar	<i>48-72. saatleri arasında görülür.</i>	<i>Kollajen, proteoglikan ve elastin sentezler; TGF-β, PDGF, KGF, FGF, IGF-1, IFN büyüme faktörlerinin salınımını gerçekleştirir, yaranın yeniden yapılanmasını sağlar.</i>
Keratinositler	<i>Epidermal migrasyon başladığında görülür.</i>	<i>Epidermal iyileşmeyi ve mitozu sağlar; fibronektin sentezini gerçekleştirir; TGF-β, TGF-α, IGF-1 büyüme faktörlerini üretir.</i>
Endotel Hücreleri	<i>48-72. saatler arasında görülür.</i>	<i>Fibronektin sentezi; büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF-β, IGF-1) üretimi</i>
Fibronektin	<i>Erken dönemde görülür.</i>	<i>Hücre migrasyonu için yapısal destek ve kollajen düzenlenmesini sağlar.</i>

Kollajen	<i>Tip III: 2 gün sonra, Tip I: Birkaç hafta sonra görülür.</i>	<i>Hücreler arası etkileşimi düzenleyerek yapısal destek sağlar.</i>
Proteoglikanlar	<i>En fazla sentez 2. haftada görülür.</i>	<i>ECM komponentidir ve kollajen sentezinin düzenlenmesinde, hücreler arası etkileşimlerde görev alır.</i>
Hyaluronik Asit	<i>Erken dönemde görülür. En fazla sentezi 4. gündedir.</i>	<i>Hücre hareketlerini artırır.</i>

PDGF (Platelet kökenli Büyüme Faktörü), TGF (Transforme edici Büyüme Faktörü), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), FGF-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü), IL-1 (İnterlökin-1), TNF- α (Transforme edici Büyüme Faktörü- alfa), KGF (Keratinosit Büyüme Faktörü)

1-Hemostaz Evresi

Yara bölgesindeki iyileşme, yaralanmadan hemen sonra plateletlerin ve inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçü ile başlar. Bu hücreler bölgeye diğer hücrelerin migrasyonunu başlatmak ve yeni kan desteğinin oluşması için PDGF (Platelet kökenli Büyüme Faktörü) ve TGF- β (Transforme edici Büyüme Faktörü-beta) gibi önemli sinyal faktörleri sağlar [17]. Hemostaz evresinin asıl amacı pıhtı oluşumunu sağlamaktır. Bu da damarların büzülmesi, platelet agregasyonu ve fibrin birikimi sonucunda oluşur. Tüm bunlar kan damarlarıyla birlikte fibrin bir ağ yapısı oluşumuna sebep olur. Pıhtı oluşumu, yara iyileşmesi öncesi daha fazla sıvı ve elektrolit kaybının önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Hemostatik pıhtılaşma gerçekleşinceye kadar iyileşme süreci devam etmez [18].

2-İnflamasyon Evresi

İnflamasyon fazı, doku seviyesinde damar geçirgenliğinin ve damar içindeki lökositlerin göçünün arttırılmasından sorumludur [19]. Yara bölgesinde ilk görülen hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller fagositoz yolu ile yara bölgesindeki ölü dokuları ortadan kaldırır ve antibakteriyel etki sağlarlar. Nötrofillerden sonra belirgin olarak görülen diğer hücreler makrofajlardır. Dolaşımdaki monositlerin dokuya geçmesi ile oluşan makrofajlar apoptotik hücreleri yok etmek, hücre çoğalmasını ve doku düzenlenmesini desteklemek gibi görevler üstlenmişlerdir. Ayrıca fibroblast hücrelerinin ürettikleri ECM'nin sentezi için gerekli büyüme faktörlerinin salınımını gerçekleştirirler.

İnflamasyon evresinde; hemostatik evrede gerçekleşen damarların daralması kendini sıklıkla bölgede kızarıklık sıcaklık, şişme ve ağrı olarak gösterir [17] [20].

3-Proliferasyon Evresi

Yara oluşumundan 4-21 gün sonra proliferasyon evresi görülür ve bu evrede epitel yüzey ile hasar gören damarlar yeniden oluşur. Endotel hücreleri mevcut kan damarlarından kılcal damar oluştururlar. Bölgedeki hücrelerin kaybı veya hasarı sebebi ile yarada kollajen ve ECM sentezi yapacak başka hücelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bölgeye fibroblastlardan önce keratinositler gelir ve proliferasyonu başlatarak korneum tabakasında koruyucu dış bariyeri oluşturur. Makrofajların uyarması sonucunda, kemik iliğinden gelen fibroblast hücreleri ise miyofibroblastlara farklılaşarak zamanla yara kenarlarını biraraya getirip yaranın kapanmasına yardımcı olurlar. Ayrıca fibroblastlar ile miyofibroblastlar birlikte kollajen sentezi yaparak bölgedeki bağ doku ile doldurulmasına yardımcı olurlar [21].

4-Maturasyon (Yeniden Şekillenme) Evresi

Yaralanmadan yaklaşık 21 gün sonra yara iyileşme evrelerinin sonuncusu olan maturasyon süreci başlar. Bu evrede fibroblastlar baskın rol üstlenirken kollajen üretim ve yıkımı dengeye ulaşır. Dermal ve subdermal dokuların gerilime karşı direnç kazanabilmesi için yeniden şekillendirilir. Bu da, oluşturulmuş olan ince kollajen lif dizilerinin deri gerilimine paralel doğrultuda düzenlenen daha dayanıklı kollajen lifler ile yer değiştirmesi sonucu oluşur. Yara dokusu normal dermisin dayanımına ulaşamaz ancak iyileştirmeler ile derinin gerilme dayanımı en üst seviyeye çıkarılır [21] [19].

2.4. Yara İyileşmesinde Etkili Büyüme Faktörleri

Yara iyileşme sürecinin tüm evrelerinde, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimleri önemli yer tutmaktadır. Bir o kadar önemli olan diğer etken ise büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. İnflamatuar hücreler ile fibroblastların yara bölgesine migrasyonunu, hücre proliferasyonunu artırıcı etki sağlayarak, damarlanmayı stimüle ederek ve ECM oluşumunda düzenleyici rol oynayarak yara iyileşmesine katkı sağlayan büyüme faktörleri ve sitokinlere ait ayrıntılı bilgiler Tablo 2 'de belirtilmiştir [16] [22] [23].

Tablo 2- Yara iyileşmesinde etkili olan temel büyüme faktörleri ve sitokinler

Sitokin	Hücre	Etkisi	Kronik Yara	Akut Yara
EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)	Plateletler, Makrofajlar, Fibroblastlar	Keratinosit ve fibroblastlar için mitojenik etki yapar, keratinositlerin migrasyonunu sağlar. Re-epitelizasyonda etkilidir.	Azalmış düzeyde bulunur.	Artmış düzeyde bulunur.
KGF (Keratinosit Büyüme Faktörü)	Fibroblastlar	Keratinosit migrasyonu, farklılaşmasını ve proliferasyonunu sağlar.	-	-
FGF-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü)	Keratinositler, Mast hücreleri, Fibroblastlar, Eldotel hücreleri, Düz kas hücreleri, Kondrositler	Keratinositler ve fibroblastlar için mitojenik ve kemotaktiktir, anjiyogenezi stimüle eder. Matris oluşumunda, yeniden şekillenme evresinde ve re-epitelizasyonda etkilidir.	Azalmış düzeyde bulunur.	Artmış düzeyde bulunur.
TNF-α (Transforme edici Büyüme Faktörü-alfa)	Nötrofiller, Makrofajlar.	Keratinosit ve fibroblastlar için mitojenik etki yapar, keratinositlerin migrasyonunu sağlar. İnflamasyon ve re-epitelizasyonda etkilidir.	Artmış düzeyde bulunur	Artmış düzeyde bulunur.
TGF-β (Transforme edici Büyüme Faktörü-beta)	Plateletler, Keratinositler, Makrofajlar, Lenfositler, Fibroblastlar	Kemotaktiktir ve anjiyogeneze fibroz bağ doku oluşumunu stimüle eder. İnflamasyon evresinde, re-epitelizasyonda, matris oluşumunda ve yeniden şekillenme evresinde etkilidir.	Azalmış düzeyde bulunur.	Artmış düzeyde bulunur.
PDGF (Platelet kökenli Büyüme Faktörü)	Plateletler, Keratinositler, Makrofajlar, Eldotel hücreleri, Fibroblastlar	Kemotaktiktir, migrasyonu, farklılaşmayı, anjiyogenezi ve yara kapanmasını stimüle eder. İnflamasyon, re-epitelizasyon, matris oluşumu ve yeniden şekillenme evresinde etkilidir.	Azalmış düzeyde bulunur.	Artmış düzeyde bulunur.

VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	<i>Plateletler, Nötrofiller, Keratinositler, Eldotel hücreleri, Düz kas hücreleri, Fibroblastlar</i>	<i>Granülasyon dokusu oluşumunda etkilidir.</i>	<i>Azalmış düzeyde bulunur.</i>	<i>Artmış düzeyde bulunur.</i>
IL-1 (İnterlökin-1)	<i>Nötrofiller, Monositler, Makrofajlar, Keratinositler</i>	<i>Nötrofil, fibroblast ve keratinositler için kemotaktiktir, Nötrofilleri aktive eder. İnflamasyon ve re- epitelizasyonda etkilidir.</i>	<i>Artmış düzeyde bulunur</i>	<i>Artmış düzeyde bulunur.</i>
IL-6 (İnterlökin-6)	<i>Nötrofiller, Makrofajlar</i>	<i>Nötrofil, fibroblast ve keratinositler için kemotaktiktir, Nötrofilleri aktive eder. İnflamasyon ve re- epitelizasyonda etkilidir.</i>	<i>Artmış düzeyde bulunur</i>	<i>Artmış düzeyde bulunur.</i>

2.5. Deri Dokusu Yenilenmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri

Doku rejenerasyonu için kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin başında yanık, derin deri kayıpları gibi durumlarda kullanılan en iyi yara kapatma ve rejenerasyon materyali hastanın kendisinden alınan yani otogreft deri yamalarıdır. Ancak bu durum geniş yüzeyler için yeterli olmamakta ve hasta için sancılı bir durum oluşturabilmektedir [24]. Allogreft olarak isimlendirilen kadavralardan alınan deri dokusunun hasarlı bölge yüzeyine kapatılması ile yapılan uygulamalar da mevcuttur. Bu uygulamalarda da problem bir süre sonra hasta vücudunun yamayı reddetmesi ve infeksiyon riskinin yüksekliğidir. Xenogreft olarak isimlendirilen tavşan, domuz gibi farklı kaynaklardan deri dokusunun alınıp hasarlı bölgenin yenilenmesi için kullanılması da bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde de vücudun immünolojik yanıt oluşturarak yamayı reddetmesi gibi durumlar sıklıkla görülmektedir [25]. Uygulanan bu yama tedavilerinin donörde oluşturduğu yara, cerrahi uygulama aşamalarının fazlalığı, iyileşmesi istenen bölgeyi kısa bir süre kapatabilmesi gibi sebepler ile farklı tedavi yöntemleri önem kazanmıştır [26].

Hasarlı bölgenin yenilenmesinin gerçekleştirilebilmesi için yama tedavilerinden farklı olarak, negatif basınçlı yara tedavisi, gen tedavisi, hücre temelli tedaviler, plateletten zengin plazma (PZP) uygulamaları, biyomimetik iskele bazlı tedaviler, sitokin ve

büyüme faktörleri desteği gibi çeşitli uygulamalar bulunmaktadır. Ancak bu uygulamaların da tek başlarına yeterli olmadığı düşünülmektedir [26].

2.5.1. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri

Hücreler arasındaki sinyaller yara iyileşmesinde temel bir role sahiptir. Kronik yaraların hücresel bileşenler ve normal hücre yolaklarındaki değişimlerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin uygulanması, yara iyileşmesini normalize etmesi sebebiyle kullanılmaktadır. VEGF, FGF-2 ve PDGF gibi sitokinler, kök hücre toplama ve gelişmiş damarlanma üzerindeki etkileri sayesinde yara iyileşmesini hızlandırabilmektedirler. Ancak, yenilenmesi istenilen hasarlı bölgeye uygulanacak olan sitokinlerin miktarı oldukça önemlidir. Gen tedavisi, kontrollü salım yapan biyomimetik yara örtüleri gibi uygulamalar ile verilecek olan sitokin miktarları ayarlanmaya çalışılmaktadır. Ayrıca uygulamalarda büyüme faktörlerinin yarılanma sürelerinin oldukça kısa olması göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

2.5.2. Hücre Temelli Terapi

Deri yamaları uygulamalarında bağışıklık cevabı, doku reddi, geniş bölgeler için yeterli olmama gibi sınırlamalar mevcuttur. Ancak kişiden alınan (otolog) küçük bir doku parçası ile *in vitro* şartlarda kültür edilerek çoğaltılan epitel hücrelerinin hasarlı bölgeye uygulaması bu sınırlamaları ortadan kaldırmaktadır. Fibroblast, keratinosit gibi deri dokusunun temel hücrelerinin ve kendi kendini yenileyebilen ve nispeten bağışıklığı düzenleyici etkiye sahip kök hücrelerin kullanımı yara iyileşmesinde oldukça etkilidir. Yalnız derideki yaranın derinleşmiş olduğu bölgelerde yalnızca keratinosit, fibroblast veya diğer hücrelerin bulunması sitokin ve büyüme faktörleri açısından yetersiz kalmaktadır. Bu durumda yaranın, sitokinleri ve büyüme faktörlerini barındıran biyomimetik özellikteki malzemeler ile desteklenmesi düşüncesi ortaya çıkmaktadır.

2.5.3. Plateletten Zengin Plazma (PZP)

Plateletler dinlenme halindeyken, yaklaşık 2 µm çapında ve disk şeklindedir. Kemik iliğinde bulunan megakaryosit hücrelerinin sitoplazmik parçacıklarından oluşurlar. Kan

dolaşımında 1,5 haftalık ömürleri olan plateletler 1µL insan kanında 15×10^4 - 40×10^4 kadar bulunur. Kan pulcukları veya trombosit olarak da isimlendirilen çekirdeksiz bu hücreler, hasarlı bölgede bulunan kan damarlarında kanı pıhtılaştırarak aşırı kan kaybını önlerler. Hücre içerisinde çok sayıda mitokondri, sağlam bir hücre içi iskelet yapısı oluşturan birkaç mikrotübül ve üç çeşit granül (α , δ ve λ) bulundurulur. Platelet içerisinde α (alfa) granülleri sayıca fazladır. Alfa granülleri içerisinde tromboplastin, trombospondin, fibrinojen, pıhtılaşma faktörleri, plazminojen ve doku yenilenmesinde önemli olan otuz civarında biyoaktif protein ve büyüme faktörü bulundurulur. Kanın pıhtılaşmasında, damar onarımında ve platelet birikmesinde α granülleri önemli rol oynamaktadır. δ (delta) granülleri sayıca daha azdır ve ADP, ATP, profosfat, ve plazmadan yaklaşık 100 kat daha fazla serotonin içerir. Lamda granülleri ise lizozomlara benzer birkaç hidrolitik enzim içerir, pıhtının eritilmesinde görevlidir. Küçük boyutlu ve çekirdeksiz olmalarına rağmen plateletler metabolik etkinliklerini yerine getirirler. Ayrıca farmakolojik olarak aktif durumda olup 25 veya daha fazla sayıda enzimleri bulunmatadır [27]. Plateletlerin α granüllerin büyüme faktörleri dışında farklı içerikler de bulundurulur. Bunlar platelet birikmesi, aktivasyonu ve fibroblastların yayılımında kullanılan fibrinojen, faktör IV, faktör V, osteokalsin, fibronektin, vitronektin, trombospondin-1, adenosindifosfat, platelet aktive edici faktör, von Willibrand Faktör (vWF) ve serotonin gibi elemanlardır [28].

Plateletlerin asıl görevi kanama esnasında kan damarlarındaki yırtıkları yamayarak kapatmak ve kanın pıhtılaşmasını sağlayarak kanamanın önüne geçmektir. Plateletler normalde dolaşımdayken birbirlerine, diğer hücrelere veya kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotele yapışmazlar. Ancak yaralanma sırasında damarın negatif yüklü iç yüzeyinin pozitif yüke dönüşmesi ile değişen elektrik yükü sonucu yapışma özelliği gösterirler [27].

Plateletten zengin plazma (PZP), tüm kandaki platelet sayısının daha yüksek olduğu kan plazmasının bir kısmına verilen isimdir [29]. PZP, antikoagülanlı kanın santrifüjlenmesi sonucu elde edilen süpernatant PZP ve PFP (plateletten fakir plazma)'yi içermektedir. Süpernatantın bir kez daha santrifüjlenmesi ile iki faz gözlenir ve "buffy coat" olarak isimlendirilen beyazımsı kısım PZP, süpernatant kısmı ise PFP'yi oluşturmaktadır.

PZP; sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve matris proteinleri açısından zengin bir kaynaktır. PFP de yapısında sitokin ve büyüme faktörleri barındırmaktadır. PZP bünyesinde platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü- β ve epidermal büyüme faktörü (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü I ve II (FGF-I, FGF-II) 'dir [30]. Bu büyüme faktörlerinin yarı ömürleri oldukça kısadır.

Deri hasarı bulunan bölgeye platelet kökenli büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- β ve epidermal büyüme faktörü gibi bazı büyüme faktörlerinin uygulanmasının iyileşme üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir [31] [32]. Diyabetik ayak ülserleri, venöz bacak ülserleri gibi çeşitli kronik yaralar üzerinde yapılan klinik çalışmalar sonucunda standart tedavi yöntemleri veya kontrol gruplarına kıyasla PZP ile desteklenen tedavilerde iyileşmenin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür [33] [34] [35]. PZP, keratinosit ve fibroblastların birlikte kullanıldığı bir başka çalışmada ise hücre ve PZP kombinasyonunun tüm deri katmanlarını içeren yaraların iyileşmesinde sinerjik bir etki yarattığı sonucuna varılmıştır [36]. Crovetti ve arkadaşları da kronik yaraları bulunan yirmi dört hasta ile yaptıkları klinik çalışma sonucunda PZP tedavisinin yara iyileşmesindeki tüm fazlarda belirgin hızlanma olduğunu göstermişlerdir [37]. PZP kullanımının plastik ve kozmetik cerrahide de kullanıldığı bilinmekte ve etkili sonuçlar alındığı belirtilmektedir. Göz kapağı estetiklerinde, yüz germe operasyonlarında, cilt yamalarında, insizyonların dikişsiz kullanımında tercih edilmektedir [38].

PZP genellikle otolog kandan hazırlanır ve hem akut hem de kronik yaraları tedavi etmek için kullanılır [39] [40]. PZP, trombin ve kalsiyum klorürün ilavesi ile jel oluşturabilir. PZP jel, hemostazı destekler ve büyüme faktörleri için bir depo görevi görür. Buna ek olarak, PZP jel, iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla hücreler ile birlikte kullanılarak iskele görevi görebilmektedir. Carter ve arkadaşlarının PZP uygulamaları üzerine yaptıkları sistematik bir inceleme ve meta-analiz sonucu PZP uygulanmasının yaraların, özellikle de kronik yaraların iyileşmesini hızlandıracağını sonucuna ulaşılmıştır [41]. Ayrıca çalışma, PZP 'nin uygulanmasının akut yaralarda enfeksiyon riskini azalttığını bulmuştur.

2.5.4. Biyomimetik İskeleler ve Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Etkili doku iyileşmesi ve deri yenilenmesi için hücrelerin, biyolojik olarak uyumlu materyallerin ve hücre sinyallerinin bulunduğu bir sistem gerekmektedir. Bu sistem, doku mühendisliği kavramı ile ortaya çıkmakta ve diğer tedavi yöntemlerinin eksiklerini giderebilecek potansiyel taşımaktadır [42] [43].

Doku iskelesi olarak isimlendirilen biyomimetik iskeleler günümüzde çeşitli biyouyumlu malzemeler ile farklı teknikler kullanılarak üretilmekte ve pek çok tedavide kullanılmaktadır. Özellikle kronik yaralarda, iyileşmenin olmadığı ya da çok yavaş gerçekleştiği durumlarda yaranın çeşitli yollarla stimüle edilerek iyileşme potansiyeli kazandırılması ve aynı zamanda açık yaranın örtülerek infeksiyon riskinin azaltılmasının amaçlandığı; hücreli, hücresiz, ilaç yüklü/yüksüz, doğal veya sentetik polimerlerden üretilen sayısız çalışmalar ve ürünler mevcuttur.

Klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan AlloDerm® (LifeCell Corporation, NJ, USA) gibi doğal dermal matrisler insan kaynaklı ECM yapısındadır. ECM yapısını taklit eden aljinat, fibrin, kollajen gibi doğal malzemeler ile üretilen doku iskeleleri de kullanılmaktadır. Dermal matrisler yaranın örtülmesini ve yerleşik hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusunun oluşumunun hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar [44]. Integra® (Integra LifeSciences Corp, NJ, ABD) gibi sentetik, hücre içermeyen doku iskeleleri ise hücre çoğalması için iskele görevi görür, yara için dış bariyer oluşturur ve bölgenin yeniden şekillenmesine olanak tanır. Yeni oluşan dokuda uygun düzende kollajene rastlanırken elastik lifler ve sinir gibi diğer dermal elementlerin eksikliği görülür. Biyomimetik hidrojeller ise dermal rejenerasyon için umut verici bir alternatif olarak görülmektedir. Bu hidrojeller hücreler ile desteklenerek hücre temelli tedavileri de içinde barındırabilir, bünyelerinde yüksek su tutma özellikleri ile de yara bölgesinin nemli kalmasını sağlamaktadırlar [44] [45].

Biyomimetik iskelelere hücreler, büyüme faktörleri ve antimikrobiyal ajanlar gibi diğer faktörlerin eklenmesi ile hasarlı bölgenin mikroçevresi değiştirilir ve yara kapanması teşvik edilir. En uygun materyalin yapısı ve bileşimi, hasarlı bölgeye salınan moleküller ve kullanılan hücre tiplerinin bulunması için bu alanda yoğun araştırmalar yapılmaktadır [46].

2.5.4.1. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doğal Polimerik İskeleler

Deri doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemenin dış bariyer oluşturarak yarayı enfeksiyonlara karşı korumak, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak çözünebilen yüksek oranda gözenekli olan, iyileşme sürecini hızlandırma özelliğinde olması ve maliyetinin de uygun olması beklenmektedir [47]. Bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda doğal polimerik malzemelerin iskele olarak kullanılması önem kazanmaktadır. Doğal malzemeler biyolojik olarak aktiftir ve hücre adezyonunu ve büyümesini teşvik eder. Ayrıca doğal malzemelerin biyolojik olarak parçalanabilir olması ve matris içerisindeki hücrelerin veya çevre dokulardan gelen hücrelerin kendi ECM' lerini üreterek çözünmüş iskelenin yerini almasına izin vermektedirler [48].

Deri dokusu bünyesinde çoğunlukla keratinosit, fibroblast hücreleri barındırmakla beraber başta kollajen olmak üzere elastin, fibronektin, laminin ve hiyaluronik asit, kondroitin-6-sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat gibi glikozaminoglikanları da barındırmaktadır. Hücre iskelelerinin üretiminde genellikle doğal polimerler tercih edildiğinden ECM elemanlarından faydalanılarak çeşitli doku mühendisliği ürünü çalışmaları yapılmaktadır [49].

Doğal malzemeler olarak hücresiz (deselülarize) iskelelerin kullanımı da yaygındır. Bu iskeleler immün yanıt oluşumunun engellenmesi için hücrelerin dokulardan çeşitli kimyasallar kullanılarak uzaklaştırılması ile elde edilen ECM' lerdir [50].

Doku iskele üretiminde tercih edilen bir diğer biyomalzeme grubu ise ECM dışı kaynaklardan elde edilen biyomalzemelerdir. Deri doku mühendisliğinde kullanılan doğal biyomalzemeler Tablo 3' de elde edilme kaynaklarına göre gruplandırılarak verilmiştir [49].

Tablo 3- Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doğal Biyomalzemeler

ECM Temelli		ECM dışı Kaynak
Deselülarize Matris	Biyomolekül İzolasyonu	-Fibrin -İpek -Kitosan -Aljinat -Dekstran -Agaroz -Selüloz -Glikojen
-Deselülarize dermal matris -Deselülarize adipoz matris	-Kollajen -Fibronektin -Laminin -Elastin -Glikozaminoglikanlar Hyaluronik Asit Kondroitin Sülfat	

2.5.4.1.1. Fibrin

Çözünebilir özelliğinde olan fibrinojen bir plazma proteindir ve kan pıhtılaşmasına bağlı olarak çözünemeyen iplikçikler halinde bulunan fibrin proteinine dönüşebilmektedir. Pıhtılaşma basamağının temel proteini olan ve kan plazma proteini fibrinojen; trombin ve Ca^{2+} 'nin etkisi ile fibrin formunu alır ve kanda çözünmeyen bir pıhtı oluşur. Bu pıhtı yara iyileşmesi, deri rejenerasyonunda etkili ve mekanik açıdan dayanıklı olan bir malzemedir [51]. Fibrin, gözenekliliği, biyobozunurluğu, elastikiyeti ve biyouyumluluğu sebebi ile doku mühendisliği çalışmalarında biyopolimer iskele olarak kullanılmıştır [52]. Hücreler fibrin iskeleye bağlanma özelliği göstermektedir. Bu bağlanma fibrin yapısında bulunan αC bölgeleri ile fibronektin etkileşimi sonucu gerçekleşir. αC bölgeleri bağlanma açısından fibrinojende etkin değildir, fibrin formunda bağlanma gözlenir [53].

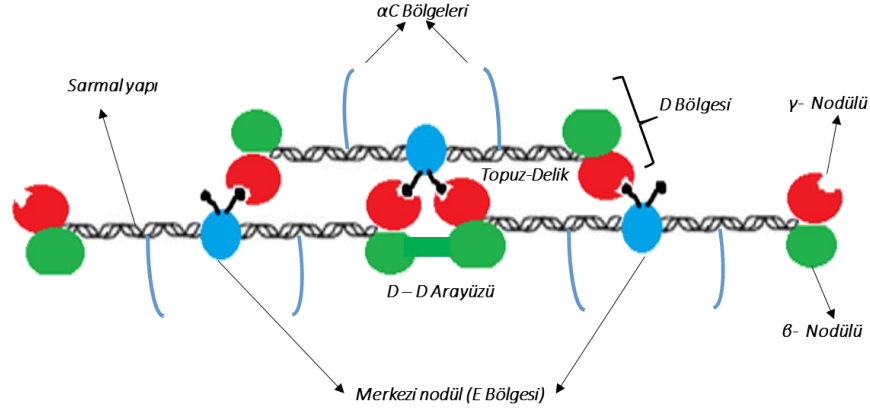
Fibrin polimeri tek başına kullanıldığı gibi farklı doğal ya da sentetik malzemeler ile birlikte kullanılarak da hücrelere iskele ortamı sağlayıp yağ, kemik, kalp, kıkırdak, karaciğer, sinir, göz, deri, tendonlar gibi farklı dokuların yenilenmesinde kullanılabilmekte ve etkili sonuçlar alınmaktadır [54] [55] [56]. Uzunlamasına hizalanmış fibrin lifleri bulunan fibrin pıhtıların, travmatik periferik sinir yaralanmalarında aksonal gelişimde iskele olarak kullanılabilir [57]. Geer ve ark. [58] fibrini deri mühendisliği için kullanmış ve keratinosit hücrelerinin büyümesi ve migrasyonu üzerine

alışmalar yaparak yara dokusunun yeniden epitelizasyonu için *in vitro* bir model oluşturmuştur. Ayrıca Carriel ve ark. [59] ise fibrin-agaroz ile elde ettiği bir iskele kullanarak yaptığı çalışma ile bu fibrinin *in vivo olarak* uzun vadede doğal deri dokusunu yeniden üretebilme potansiyelini düşündürmüştür.

Fibrin enjekte edilebilir olma, biyolojik olarak çözülme özelliği açısından deri dokusundaki yenilenmeyi ve yara iyileşmesini destekleyen bir özelliktedir. Fibrinin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda fibroblast hücrelerinin büyümesini stimüle ettiği bilinmektedir. Bu sebeplerle piyasada çeşitli hücreli ve hücresiz fibrin temelli doku mühendisliği ürünleri ve klinik çalışmalar bulunmaktadır [60] [61] [62]. Ayrıca fibrinojen ve trombin karıştırılarak oluşan fibrin dolgular kanamayı durdurmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [63]. Piyasada da çeşitli fibrin dolgu ürünler bulunmaktadır ve bunlar farklı mekanik ve hemostatik özelliklere sahiplerdir [64].

2.5.4.1.1.1. Fibrin Polimerizasyonu

Fibrinojen 45nm boyunda, fibrin öncülü bir kan plazması proteindir. İnsan kan plazmasında 1,5-3mg/L konsantrasyonda bulunan bir glikoproteindir. Birbirlerine 29 adet disülfür bağı ile bağlı iki ift A, iki ift B, iki çift  zincirinden oluşur. A, B ve  zincirleri sırası ile 610, 461 ve 411 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlıkları 67, 55 ve 47.5 kD' dur. Her biri ayrı bir gen üzerinden kodlanan bu fibrinojen zincirleri merkezi nodül olarak da isimlendirilen merkezi E bölgesine sarmal yapılar ile bağlıdır. E bölgesi bu sarmal yapıyı oluşturan 6 zincire ait N terminal uçlarının kökenini oluşturur. Sarmal yapının iki ucundaki D bölgesi bulunur ve C terminal uçlarında ayrı ayrı katlanmış  – ve - nodülleri bulunur. Fibrinojenin düzenlenerek fibrine dönüşmesinde, çapraz bağ oluşturulmasında ve platelet etkileşiminde D ve E bölgeleri önemli rol oynamaktadır. A zincirinin C terminal ucu ise C olarak adlandırılır. Fibrinojenin kristal yapısı ve bağlantı noktaları şekil 2'de gösterilmiştir [65] [66] [67].



Şekil 2- Fibrinojenin kristalografik yapısı

Üç fibrin molekülünden oluşan kısa bir oligomer şekli. Her monomere ait merkezi nodül (mavi), α , β ve γ zincirlerinden oluşan sarmal yapı (siyah), lateral D bölgelerinin temel bölümünü oluşturan γ^- (kırmızı) ve β^- (yeşil) nodülleri ve α C bölgeleri (mavi-çizgi) gösterilmiştir.

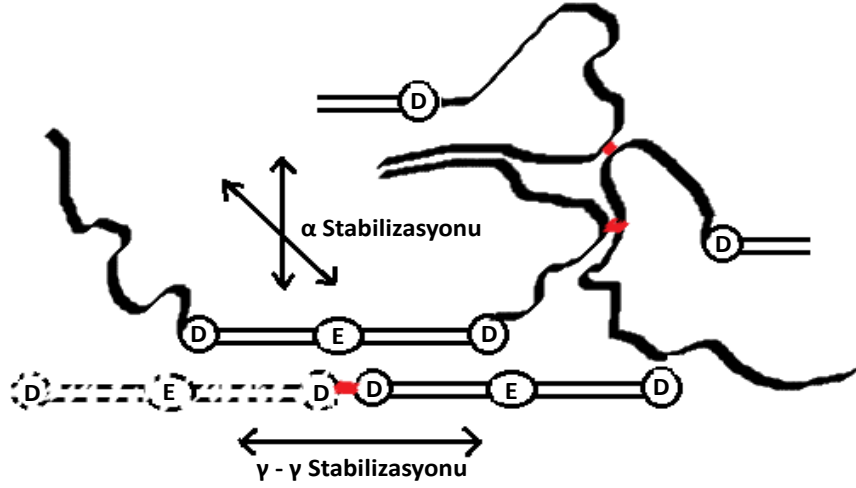
Fibrinojen molekülünün merkezindeki bölgede (E bölgesi) fibrinopeptit A ve B tarafından korunan iki adet polimerizasyon bölgeleri (topuz A ve B) bulunur. Trombinin ortamda bulunması ile fibrinopeptit yapıları, fibrinojenin $A\alpha$ ve $B\beta$ zincirlerinin amino terminal bölgelerinden ayrılır ve fibrinojen molekülü fibrin monomerine dönüşür. Dışta bulunan iki adet D bölgesi üzerindeki a ve b delikleri (polimerizasyon bölgeleri) merkezi E bölgesindeki topuz A ve B ile komplementerdir ve bağlanma gösterirler. Bu bağlanmalar A : a ve B : b şeklinde gösterilebilir. Monomerik fibrin molekülleri polimerizasyon bölgeleri aracılığı ile kendiliğinden biraraya gelerek çubuk şeklindeki fibrin liflerini oluşturur [53].

Fibrin yapının çapraz bağlanmaları fibrin stabilize edici faktör (FXIII) aracılığı ile olur ve FXIII bir transglutaminaz katalizörüdür. FXIII' in kan plazmasında serbestçe dolaşan formu (pFXIII) ve plateletlerin alfa-granülleri içerisinde taşınan hücresel formu (cFXIII) olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. FXIII; ikişer adet A ve B alt birimlerinden oluşan tetromerik (A_2B_2) bir yapıya sahiptir. A ve B alt birimlerinin birbirinden ayrılması ile FXIII aktif hale geçer [68] [69]. A alt biriminin katalitik özelliği bulunmaktadır. İki alt biriminin birbirinden ayrılması trombin ve Ca^{2+} 'nin birbirini takip ettiği fizyolojik süreç içerisinde gerçekleşir. İlk olarak trombin A alt biriminin N-ucu üzerindeki Arg37 ve Gly38 kalıntıları arasındaki peptit bağının hidrolizini sağlayarak aktivasyon peptidinin serbest

bırakılmasına neden olur. Ardından Ca^{2+} 'un ortamda bulunması ile B altbirimleri yapıdan ayrılır ve FXIII-A₂' dimeri enzimatik olarak aktif bir duruma (Gly38-FXIII-A₂*) geçer. Bu konformasyonel değişim sırasında A alt birimi üzerindeki sistein aktif bölgesinin maskelenmesi engellenmiş olur ve substratları ile reaksiyona girmesi sağlanır. Hücresel FXIII'in (cFXIII) aktivasyonu için proteolitik bir gölünme gerektirmeden yalnızca Ca^{2+} miktarının artırılması yapıyı aktif forma dönüştürür [69] [70].

Fibrin polimeri fibrin stabilize edici faktör (FXIII) için ideal bir substrattır. FXIII; trombin ve Ca^{2+} ile aktive olarak FXIIIa formuna dönüşür, fibrin çapraz bağlanmalarını gerçekleştirerek γ dimerleri ile α polimerlerini oluşturur. γ dimerleri; bir γ zincirinin γ 406 lizini ile başka bir γ zincirinin γ 398/399 glutamini arasında hızlı karşılıklı molekül içi izopeptit kovalent bağ oluşumu ile gerçekleşir [71]. Alfa zincirleri arasındaki çapraz bağlanma daha yavaş gerçekleşir. Çapraz bağlanma birden fazla glutamin ve lizin arasında oluşarak α polimerleri ile sonuçlanır [53] [72]. Oluşan çapraz bağlanmaların fibrin yapıya kararlılık kazandırdığı, pıhtı sertliğine katkıda bulunduğu, dayanımını ve fibrinolize karşı direncini sağladığı bilinmektedir [73] [74] [66].

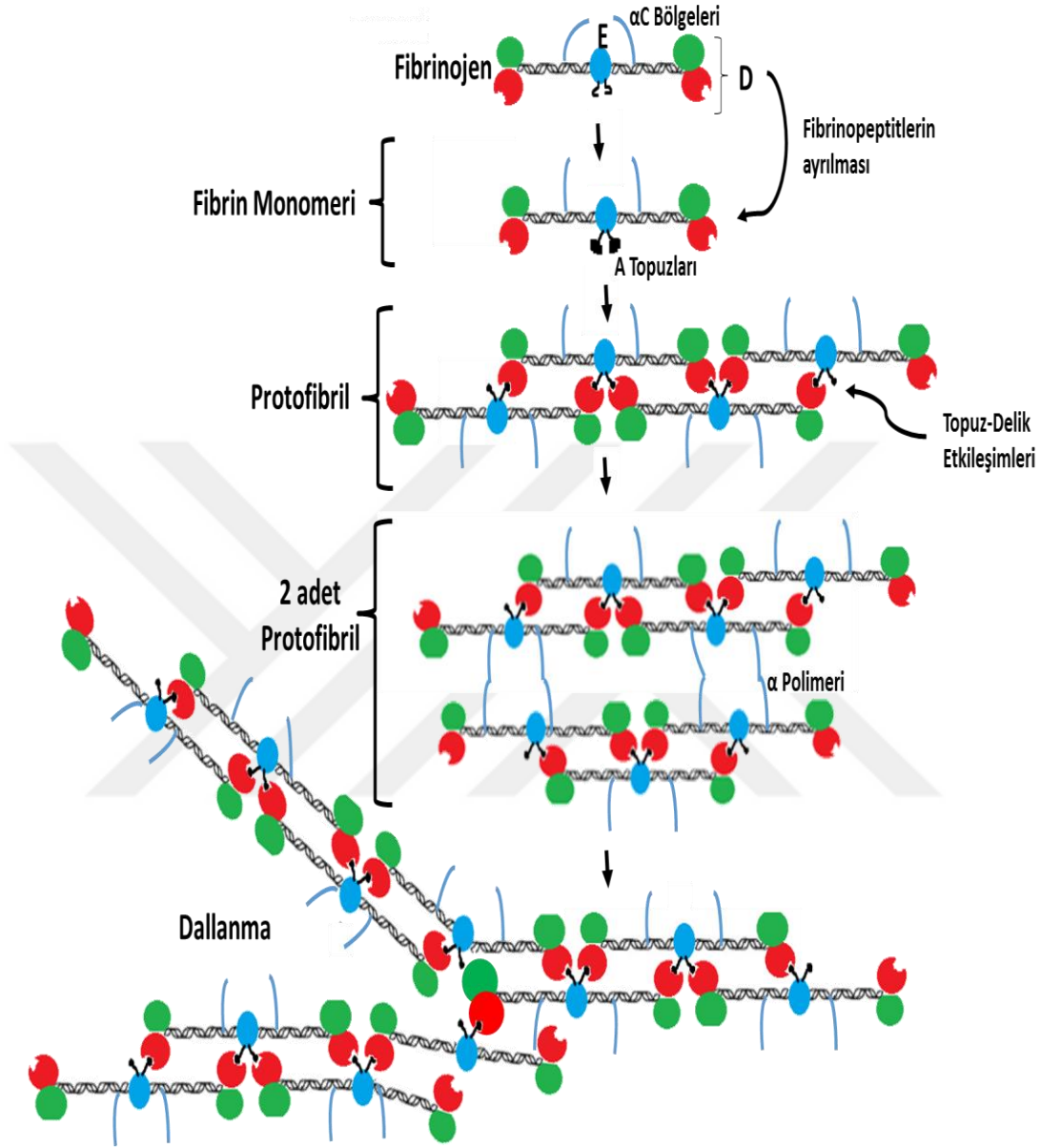
Şekil 3' de farklı moleküllerin polimerizasyonu sırasında oluşan kovalent olmayan D-D ve E-D bağlantıları kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. γ zincirlerinin çapraz bağlanması ile iki farklı fibrin molekülüne ait D-D bağlanması stabilize olur (koyu siyah ile belirtilmiştir). D bölgelerinin uzantısı olarak gösterilen α bölgeleri serbest şekilde dağılmaktadır ve bu da fibrin polimerine elastikiyet özelliği kazandırmaktadır. Her molekülün α bölgesi ile diğer iki molekülün α bölgeleri çapraz bağlanma (kırmızı) göstererek fibrinin üç boyutlu yapısının oluşumunu sağlamaktadır [75].



Şekil 3- Fibrin yapıdaki çapraz bağlanmalar

Kesikli çizgiler ile gösterilen kovalent olmayan D-D ve E-D bağlantılarını, kırmızı ile belirtilen çizgiler ise kovalent bağları göstermektedir.

Şekil 4' de fibrinojen monomerinden fibrin polimerine geçiş basamakları ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4- Fibrin polimerizasyonu

2.5.4.1.1.2. Hemostaz

Hemostaz, kanın pıhtılaşmasına bağlı olarak kanamanın durdurulmasıdır. Kan kaybının önlenmesi sırası ile damar çapının daraltılması, plateletlerin oluşturduğu tıkaç ve fibrinojenin çözünmeyen fibrin ipliklere dönüşmesi sonucu gerçekleşen pıhtılaşma mekanizması ile gerçekleşir.

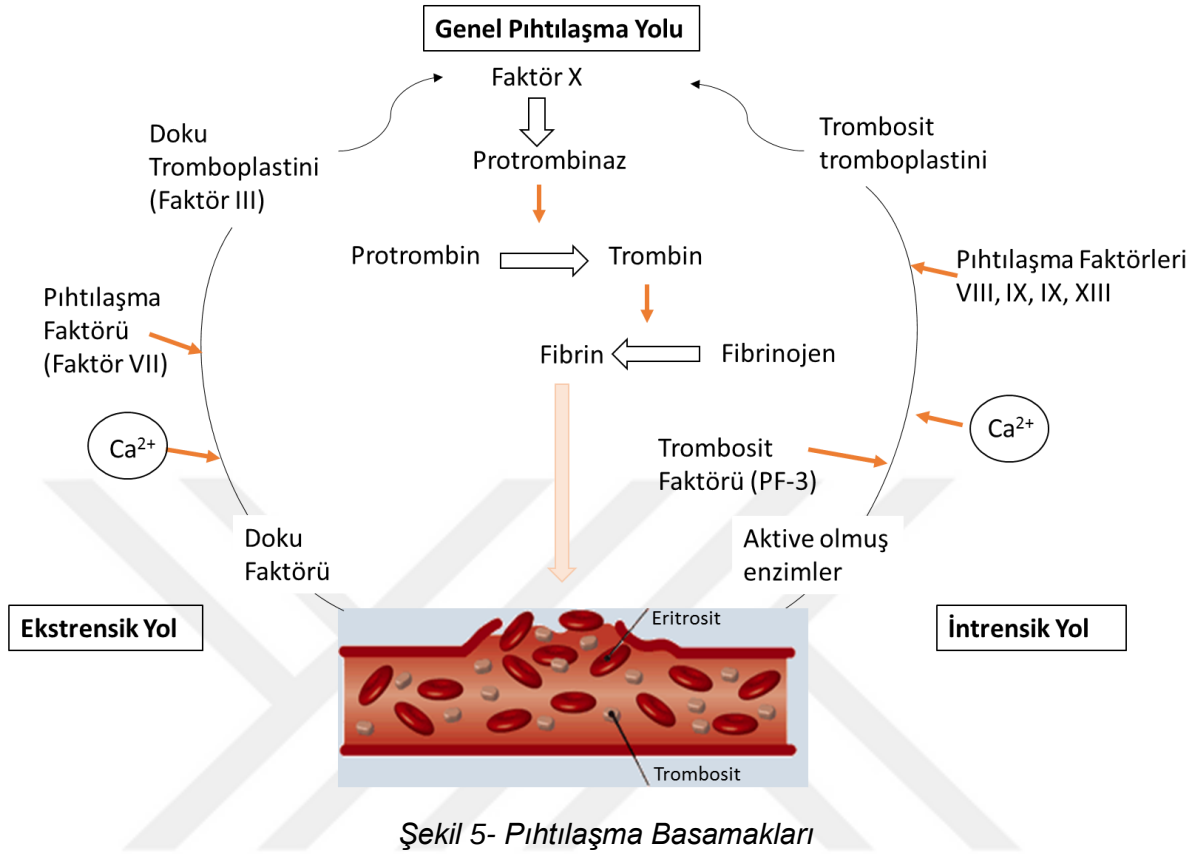
Doku hasarı ile gerçekleşen bir pıhtılaşma şu şekilde özetlenebilir: Hasar görmüş damarın iç yüzeyinde bulunan endotel hücrelerinden endotelinler olarak adlandırılan bölgesel hormonlar, plateletlerden ADP, doku faktörü, prostasiklin gibi kimyasallar salınır. Bölgesel hormonlar düz kasların kasılmasını ve damarın büzüşmesini sağlar, fibroblastların çoğalmasını uyarır. ADP plateletlerin bölgeye tutunmasını, doku faktörü ise pıhtılaşma sürecinin başlamasını sağlar. Hasar gören damarın elektrik yükünün değişmesi ile damarın yapışkan özellik göstermesiyle plateletlerin bölgeye yapışması gerçekleşir. Plateletler fibrinojen aracılığı ile de birbirlerine tutunarak platelet tıkaçını oluştururlar. Platelet agregasyonu 12 saniye içinde başlar; ancak oluşan platelet tıkaçı; kan basıncı ve dış faktörlere karşı dayanıklı değildir. Sağlam bir yapının oluşabilmesi için pıhtı tabakasının oluşması gerekir. Pıhtı tabakası bir dizi reaksiyon sonucu çözünür fibrinojenin çözünmez fibrin ipliklerine dönüşmesi sonucu oluşur. Oluşan fibrin iplikleri eritrosit ve plateletleri de içine hapsederek geçirgen olmayan bir tabaka meydana getirir. Bu tabaka pıhtı olarak isimlendirilmektedir. Pıhtı oluşumunda yaklaşık 13 adet pıhtılaşma faktörüne ihtiyaç duyulur (Tablo 4).

Tablo 4- Pıhtılaşma faktörleri

Faktör	Adı	Yol	Özelliği	Sentez Yeri
<i>Faktör I</i>	<i>Fibrinojen</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>Protein</i>	<i>Karaciğer</i>
<i>Faktör II</i>	<i>Protrombin</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>İnaktif enzim</i>	<i>Karaciğer (K vit. Bağımlı)</i>
<i>Faktör III</i>	<i>Tromboplastin (doku faktörü)</i>	<i>Ekstrensik</i>	<i>Kofaktör</i>	<i>Hasarlı doku, aktif platelet</i>
<i>Faktör IV</i>	<i>Kalsiyum</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>İyon</i>	
<i>Faktör V</i>	<i>Proakselerin</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>Kofaktör</i>	<i>Karaciğer, platelet</i>
<i>Faktör VII</i>	<i>Prokonvertin</i>	<i>Ekstrensik</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer (K vit. Bağımlı)</i>

<i>Faktör VIII</i>	<i>Antihemofilik Faktör A</i>	<i>İntrensik</i>	<i>Kofaktör</i>	<i>Platelet, endotel hücre</i>
<i>Faktör IX</i>	<i>Christmas Faktör</i>	<i>İntrensik</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer (K vit. Bağımlı)</i>
<i>Faktör X</i>	<i>Stuart-Power faktör</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer (K vit. Bağımlı)</i>
<i>Faktör XI</i>	<i>(PTA) Plazma tromboplastin antedant</i>	<i>İntrensik</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer</i>
<i>Faktör XII</i>	<i>Hegeman faktör</i>	<i>İntrensik</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer</i>
<i>Faktör XIII</i>	<i>Fibrin stabilize edici faktör</i>	<i>Her ikisi</i>	<i>Enzim</i>	<i>Karaciğer, platelet</i>

Tüm bu pıhtılaşma faktörleri kullanılarak oluşan pıhtının oluşum evreleri Şekil 5' de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir [76] [77].



Pihlaşma; sırası ile protrombin aktivatörü (protrombinaz kompleksi)' nün oluşması, protrombinin trombine dönüşmesi ve fibrinojenin fibrine dönüşmesi olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Protrombin aktivatörünün oluşması aynı anda başlayan iki farklı yolla sağlanır. Bunlar damar duvarının hasarı sonucu aktif hale gelen ekstrensik yol ve kanın travması veya damar duvarında açığa çıkan kollajenin teması ile aktive olan intrensik yollardır. Pihlaşmanın ilk basamağı olan protrombin aktivatörü kompleksinin oluşması ekstrensik ve intrensik yollar için aynıdır. Her ikisinde de aktif haldelki faktör X, tromboplastin (yaralanmış dokudan gelen tromboplastin (Faktör III) ve plateletlerden gelen tromboplastin), plateletlerden gelen fosfolipidler, aktif faktör V ile Ca²⁺ varlığında platelet yüzeyinde protrombin aktivatörü oluşmuş olur. Protrombinin trombine ardından fibrinojenin fibrine dönüştürülmesi ekstrensik ve instrensik yol için ortaktır. Ca²⁺ ve protrombin aktivatörü varlığında protrombin trombine dönüşür. Protrombin aktivatörde bu dönüşümü sağlayan asıl faktör aktif faktör X' dur. Faktör V bu dönüşümü hızlandırır. Oluşan trombin platelet aktivasyonunu artırarak pozitif geri bildirimde bulunur,

kalsiyum iyonları ile birlikte karaciğerde üretileni kan plazma proteini olan fibrinojeni çözünmez özellikteki fibrine dönüştürür. Fibrin lifleri ağ şeklini alır ve eritsosit ile plateletlerin birarada olduğu pıhtı yapısı oluşur. Plateletlerdeki aktin miyozin filamentleri sebebi ile kan pıhtısı bir saat içerisinde sıkışır ve hacmini yarısına kadar küçülür. Pıhtılaşma evreleri Şekil 5 ile ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir [76] [77].

Kan pıhtılaşmasında kullanılan faktörlerin üretiminde K vitaminine ihtiyaç duyulmaktadır. K vitamini eksiliği olan kişilerde kanamalara sebep olabilmektedir [27].



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların ayrıntılarına yer verilmiştir. Çalışmada kullanılan CaCl_2 ve trombin ile elde edilen iki farklı fibrin matrisin üretimi ve üretilen bu matrislerin kimyasal/fiziksel özellikleri ile doku iskelesi oluşturma potansiyelleri farklı deneysel çalışmalar ile incelenmiştir. Fiziksel/kimyasal özelliklerin belirlenmesinde Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, şişme testi, jelleşme testi, çözülme testi, Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi analizi kullanılmıştır. Üretilen jel yapısındaki matrislerin doku iskelesi oluşturma potansiyellerinin tespitinde ise MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) analizi ve çeşitli Hematoksilen/Eozin boyaması immün işaretlemeler ve geçirimli elektron mikroskop (TEM) incelemelerinden faydalanılmıştır.

3.1. Kullanılan Malzemeler ve Hücreler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, HS27 insan fibroblast hücre hattı ise ATCC (American Type Culture Collection, ABD) hücre bankasından tedarik edilmiştir.

Hücre hatlarının kültüründe, spektrofotometrik analiz sonuçlarını etkilememesi için fenol red içermeyen besi ortamı tercih edilmiştir. Besi ortamı olarak hücre hatları ile uyumlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanılmıştır. DMEM, besi ortamı içerisine eklenen L-Glutamin ve antibiyotik (penisilin/streptomisin) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından fetal sığır serumu (FBS) ise Biological Industries (İsrail) firmasından temin edilmiştir.

Hücrelerin tripsinisasyonu için kullanılan tripsin/EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

Hücre dondurma işleminde kullanılan DMSO (Dimetil Sülfoksit), hücre sayımında canlılık tespiti için kullanılan tripan mavisi, hücre morfolojisini incelemek için kullanılan kristal viyole Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

Hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini kantitatif olarak gösteren MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) kimyasalı, Serva (Almanya) firmasından temin edilmiştir. MTT çözücüsü olarak kullanılan izopropil alkol ve %37'lik HCl (hidroklorik asit) çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir.

Kandan elde edilen plazmanın jelleşmesi için kullanılan trombin ve CaCl_2 Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

Matrislerin şişme testinde ve hücre kültüründe yıkama işleminde kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS) tabletleri Ambresco (ABD) firmasından tedarik edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskopisi öncesi hücrelerin üç boyutlu matris içerisinde fiksasyonunun sağlanması için kullanılan gluteraldehit çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

Üç boyutlu hücreli fibrin matrislerin histolojik boyamaları yapılmadan önce matrislerden rahat kesit alınabilmesi için kullanılan doku dondurma solüsyonu Leica (Avusturalya) firmasından temin edilmiştir. Boyama kısmında ise hücrelerin matris içerisindeki konumlarını gözlemleyebilmek için kullanılan Hematoksilen/Eozin (H&E) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Floresan boyamalar için kullanılan kollajen tip I ankoru Sigma-Aldrich (Almanya) ve kollajen tip III antikorları Abcam (İngiltere) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. CaCl_2 ve Trombinli Fibrin Matrislerin Üretimi

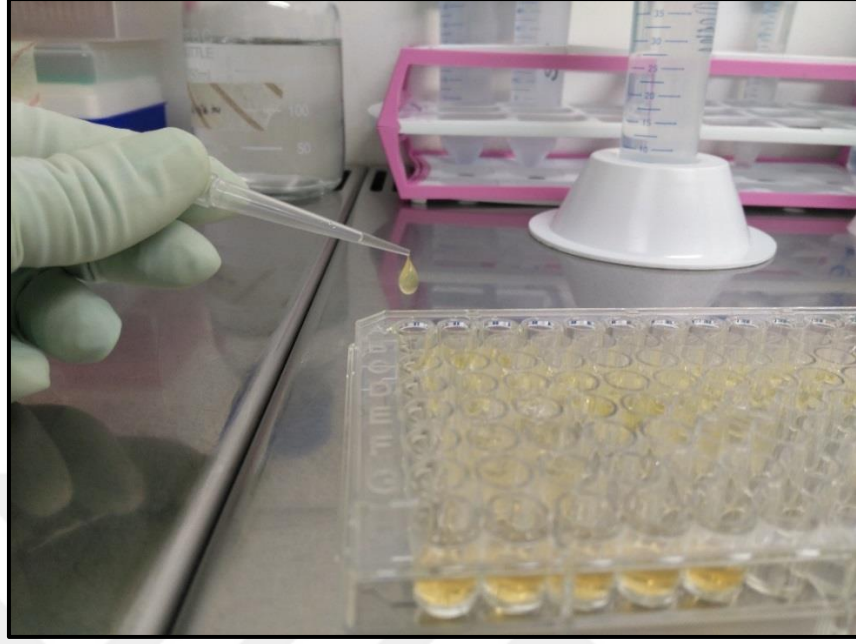
Bu çalışmada, kandan elde edilen plateletten zengin plazma ile fibrin matris üretimi gerçekleştirilmiştir. Fibrin matrislerin üretiminde kullanılan kan, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan etik kurul onayında belirtilen şartlara uygun olarak Hacettepe Üniversitesi Kan Bankası'ndan temin edilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Kan Bankası'na kan bağışında bulunacak olan donörlerin kanının %10 kadarı donörün onayı ile deneylerde kullanılmak üzere ayrılmış ve geri kalan kan yine kan bankasına bağışlanmıştır. Sodyum sitratlı kan zaman kaybedilmeden soğuk zincir ile laboratuvar ortamına getirilip 1100 RPM (Revolutions

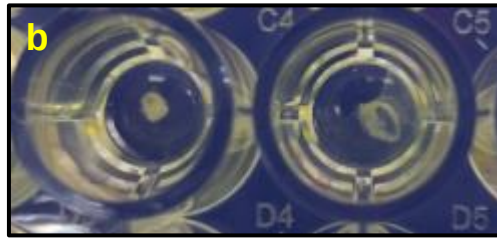
Per Minute)' de 22 °C'de 6 dakika boyunca santrifj (Hettich 320R, Almanya) edilmiştir. Santrifj sonunda tüpteki kan, alt faz eritrositler, ortadaki ince beyaz faz platelet ve akyuvarlar, en üstteki fazda ise açık sarı renkli plateletten fakir plazma olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Platelet ve alyuvarların bulunduğu orta faz (buffy coat) ve en üstteki plateletten fakir plazma fazı pastör pipeti ile eritrositlerin çekilmemesine dikkat edilerek farklı bir santrifj tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen bu plateletten zengin plazma fibrin matris oluşumunda kullanılmıştır.

Literatürdeki plateletten zengin plazma eldesi çalışmalarında en yüksek platelet eldesini sağlayan yöntem uygulanmış ve kan düşük hızda santrifj edilip, plateletler süpernatant ile sulandırılarak elde edilmiştir [78] [79]. Deneylerde kullanılan platelet yoğunluğu tüm kandaki platelet yoğunluğunun yaklaşık on katıdır. Normal kan içerisindeki platelet yoğunluğu yaklaşık $1,5-4 \times 10^5$ platelet/ μL ' dir ve tedavi amaçlı kullanılacak olan platelet miktarının en az 1×10^6 platelet/ μL olması gerekmektedir. Bu tez kapsamında yürütölen çalışmalarda kullanılan platelet miktarı yaklaşık 3×10^6 platelet/ μL ' dir ve tedavi amaçlı kullanıma uygundur.

Platelet sayımı deneysel çalışmalara başlanmadan önce manuel olarak yapılmıştır ve uygun platelet miktarı olması durumunda deneylere dahil edilmiştir. Üretilen fibrin matrisler Şekil 6 ve Şekil 7' da gösterilmiştir.



Şekil 6- Üretilen matrislerin görüntüsü



Şekil 7- CaCl_2 ile (a) ve trombin ile (b) üretilen fibrin matrisler

3.2.1. CaCl₂'li Fibrin Matrisin Üretimi ve Uygun CaCl₂ Konsantrasyonunun Bulunması

Planlandığı gibi CaCl₂'li fibrin matrisin deneysel çalışmalarda kullanılabilmesi için kullanılan CaCl₂'nin farklı miktarıyla oluşturulan deney düzeneği kurulmuş ve hücreler üzerinde etkisine bakılarak en uygun miktara karar verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edebilmek için, her CaCl₂ miktarı için üç tekrarlı çalışılmıştır. Deneyde 96 gözlü petri kabı kullanılmıştır ve her göze 100µL fibroblast hücresi (3×10^4) içeren plazma eklenmiştir. 20mM, 40mM, 60mM, 80mM ve 100mM'lık farklı konsantrasyonlarda çalışılarak elde edilen üç boyutlu matris içerisine ve iki boyutlu yüzeye sahip hücre kültür kapları yüzeyine ekilen fare fibroblast hücreleri (L929)' nin hücre canlılıkları karşılaştırılmıştır. Hücre peleti CaCl₂ eklenmeden önce plazma ile karıştırılıp, homojenize edildikten sonra ve CaCl₂ eklenerek jelleşme gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılıklarına MTT analizi ile bakılmış ve elde edilen kantitatif sonuçlar doğrultusunda hücre canlılıkları için en uygun CaCl₂ konsantrasyonuna karar verilmiştir.

3.2.2. Trombinli Fibrin Matrisin Üretimi

Trombin çözeltisi hazırlanmadan önce liyofilize olarak Sigma-Aldrich firmasından temin edilen trombin, laminar akışlı kabin (Nüve, MN120, Türkiye) içerisinde 1 saat UV altında steril edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucunda 100 µL plazma içerisine eklenen 40 µL trombin çözeltisinin (5 ünite/ml) jelleşme için yeterli olduğu belirlenmiştir. PZFM üretmek için kullanılan son trombin konsantrasyonu 0,2 ünite/mL' dir.

Trombin Çözeltisinin Hazırlanışı:

Steril toz trombin laminar akışlı kabin içerisinde çalışılarak, toplamda hazırlanacak miktarın %10'u dH₂O, %90'ı PBS olacak şekilde çözüldü.

20 ünite/ 31,25 mg toz trombin 400 µL dH₂O ve 3600 µL PBS içerisinde çözüldü ve bölünerek -80 °C'de (Sanyo, Japonya) saklandı.

100 µL plazma, fare fibroblast hücre peleti ile karıştırılır, homojenize edilir ve 40 µL trombin çözeltisi eklendi ve jelleşme sağlandıktan sonra besi ortamı eklenerek kültüre alındı.

3.3. CaCl₂ ve Trombinli Fibrin Matrislerin Karakterizasyonu

Bu bölümde üretilen fibrin matrislerin şişme potansiyellerine, çözülme durumlarına, jelleşme zamanlarına bakılmış, ayrıca FTIR Spektroskopisi analizi ile trombin ve CaCl₂ matrisleri arasındaki bağ oluşumları incelenerek karşılaştırılmıştır. Sıcaklık arttırıldığında jellerin dayanıklılığını belirlemek için TGA analizi ve gözenek boyutlarıyla morfolojik yapılarının incelenmesi için ise SEM analizi yapılarak jellerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Şişme Testi

Çalışma kapsamında üretilen fibrin matrislerin şişme deneyleri, jellerin dH₂O içerisinde olduğu durumda ve oda sıcaklığında gerçekleşmiştir. 10, 20, 30, 60, 120 ve 240' ıncı dakikalarda, dH₂O içerisinden çıkarılan örneklerin üstündeki nem alındıktan sonra, hassas terazide (Mettler Toledo, AL204, İsviçre) tartılmış ve tekrar dH₂O içerisine konulmuştur. Tartımlar için üç tekrarlı örnek kullanılmış ve deney gravimetrik tayin yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Matrislerin şişme yüzdesi (E_{sw}) Flory-Huggins şişme formülü ile (Eşitlik 1) hesaplanmıştır. Matrisler iki gün açık havada bekletilerek kurutulmuş ve deneye başlanmadan önce kuru ağırlıkları (W_0) ölçülmüştür. Eşitlikte gösterilen W_t , t zamanındaki ağırlık ile ifade edilmiştir [80] [81] [82].

$$E_{sw} (\%) = (W_t - W_0) / W_0 \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

3.3.2. Çözülme Testi

Çözülme testi, üretilen matrislerin besi ortamı ve %99 PBS +%1 antibiyotik içerisinde bekletilmesi sonucu yapısal bozunmalarının incelenmesi için yapılmıştır. Besi ortamı hücre kültüründe kullanıldığı gibi %10 serum + %1 antibiyotik %89 DMEM oranlarında hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarının etkilenmemesi için fenol red içermeyen DMEM tercih edilmiştir. Üretilen matrisler bir ml besi ortamı ve PBS içerisinde 1.5ml'lik santrifüj tüpleri içerisinde 37°C' deki etüvde (Nüve, EN120, Türkiye) 28 gün boyunca bekletilmiştir. Üç tekrarlı olarak hazırlanan örnekler; 1, 7, 14, 21 ve 28'inci günlerde santrifüj tüpleri içerisindeki üst sıvılar çekilerek UV Spektrofotometrede

(Shimadzu, UV-1280, Japonya) 278nm’ de kuvarz küvetlerde okutulmuştur. Absorbans olarak 278nm proteinlerin fenil gruplarının absorbansını verdiği için tercih edilmiştir [83].

3.3.3 Jelleşme Testi

Jelleşme testi ile kan bankasından alınarak elde edilen fibrin matrislerin jelleşme süreleri tespit edilmiştir. Hücre canlılığı ve proliferasyonu için en uygun CaCl_2 miktarı daha önce belirlenmiş olsa da hücresel uygulamalarda jelleşme süresi oldukça önemli olduğu için, çeşitli CaCl_2 konsantrasyonlarında hazırlanan fibrin matrislere jelleşme testi yapılmıştır. Deney 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120mM’ lik konsantrasyonlarda hazırlanan matrisler ile üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler spektrofotometrede (Molecular Devices, SpectraMax® M Series, Amerika) 550nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.3.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi

Üretilen fibrin matrislerin yapısal karakterizasyonu ve kimyasal bağlanmalarının incelenebilmesi için FTIR spektroskopisi (Thermo Scientific, Nicolet iS10, ABD) yapılmıştır. Hücresiz olarak hazırlanan trombinli ve CaCl_2 ’ li fibrin matrisler ile kontrol olarak kullanılacak olan plazma bir gün boyunca liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuş ardından spektrumları alınmıştır. FTIR spektrumları 2000–1000 cm^{-1} dalgaboyu aralığında değerlendirilmiştir.

3.3.5. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Deneylerde kullanılan fibrin matrislerin sıcaklığın etkisiyle yapılarında oluşan ağırlık kaybı termogravimetrik analizör (Perkin Elmer, SII Exstar 6000 TG-DTA6300, Amerika) ile incelenmiştir. 40-600 °C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile açık hava atmosferinde yürütülmüştür. TGA öncesinde örnekler bir gün boyunca liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuştur.

3.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üretilen fibrin matrislerin yüzey morfolojileri 1.2nm çözünürlükteki QUANTA 400F Field Emission (Amerika) taramalı elektron mikroskobu ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar, Elektron Mikroskopi Laboratuvarı' nda incelenmiştir. Örnekler analize götürülmeden önce PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra bir gün boyunca liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuştur. SEM ile görüntüleme öncesi ise örneklerin yüzeyleri iletkenlik kazandırılması amacıyla altın-paladyum ile kaplanmıştır. SEM görüntüleri ile Image J programı kullanılarak fibrin matrislerin gözenek çapları belirlenmiştir.

3.4. Hücresel Çalışmalar

Bu bölümde deneylerde kullanılan hücre hatlarının kültür şartlarından, pasajlama, dondurma, çözündürme aşamalarından, tripan mavisi ile hücre sayımı ve canlılığının belirlenmesinden, kandaki platelet sayısının belirlenmesinden ve hücre hatlarının çoğalma eğrileri ile ikilenme sürelerinin bulunmasından bahsedilmiştir.

3.4.1. Hücre Kültürü

Deneylerde Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınan L929 fare fibroblast hücre hattı ve ATCC (American Type Culture Collection, ABD) hücre bankasından tedarik edilen HS27 insan sünnet derisinden elde edilmiş fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

L929 fare fibroblast hücrelerinin ve HS27 insan fibroblast hücrelerinin kültüründe Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) %10 (v/v) FBS ve 100 U/mL penisilin+100 mg/mL streptomisin, 2mM L-glutamin ile zenginleştirilerek kullanılmıştır. Hücrelerin inkübasyonu 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde (Heraus Instruments, BBD 6220, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi, kültürdeki hücrelerin çoğalarak bulunduğu hücre kültür flasklarının yüzeyini tamamen kapladığı durumlarda hücre morfolojisinin bozulmaması için ya da

deneylerde fazla miktarda hücreye ihtiyaç olduğu durumlarda hücre üretmek amacıyla yapılmıştır.

Hücrelerin yeterli konfluensiye gelip gelmediği invert mikroskop (Meiji Techno Co. Ltd., TC5300, Japonya) ile incelenir. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmak üzere laminar kabin içerisine alınır. Besi ortamı aspire edilir, besi ortamı içerisindeki FBS' in hücrelerin kaldırılmasında kullanılan tripsin enzimini inhibe etmemesi için PBS ile yıkama işlemi yapılarak besi ortamı ve içerisindeki FBS tamamen flask yüzeyinden uzaklaştırılır. 37°C' ye getirilmiş olan tripsin enzimi flask yüzeyini kaplayacak miktarda flask içerisine aktarılır ve maksimum 5 dakika 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde (Sanyo, MCO-18AC, Japonya) bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaları beklenir. Mikroskop incelemesi yapılarak hücrelerin yüzeyden kalkarak yüzdükleri görülür ve zaman kaybetmeden tripsin enziminin inhibisyonu sağlanır. İnhibisyon 37°C'deki besi ortamı içerisinde bulunan %10 oranındaki FBS ile yapılır. Besi ortamı ile hücreler flask yüzeyinde kalmayacak şekilde santrifüj tüpü içerisinde toplanır. 1360 RPM'de 5 dakika santrifüj (Hettich 320R, Almanya) edilerek hücrelerin santrifüj tüpü dibine çökmeleri sağlanır. Santrifüj sonucu oluşan üst sıvı (süpernatant) uzaklaştırılır. Dipte kalan hücreler (pelet) bir miktar besi ortamı ile süspanse edilir ve 4 adet yeni hücre kültür flasklarına bölüştürülür, üzerlerine besi ortamı ilave edilerek kültüre bırakılır.

3.4.3. Hücrelerin Dondurulması

Deneyler sırasında çoğaltılan hücre hatları ilerideki çalışmalarda kullanılmak amacıyla dondurulmuştur. Dondurma işlemi kültür flasklarında %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin tripsinizasyonu ile başlar ve kaldırılan hücrelerin iki ayrı santrifüj tüpünde 1360 RPM'de 5 dakika santrifüj (Hettich 320R, Almanya) edilerek santrifüj tüpü dibine çökmeleri sağlanır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerden birindeki pelete besi ortamı eklenir ve hücre sayımı yapılır. Hücre sayısı belirlendikten sonra diğer santrifüj tüpü içerisindeki pelet (%40 FBS + %10 DMSO + %50 DMEM) oranında hazırlanan dondurma solüsyonu ile süspanse edilir. Hücre sayıları, tarih ve hücre ismi hücre dondurma viyalleri üzerine yazıldıktan sonra hücre süspansiyonu viyallere bölüştürülerek Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisine alınır ve -80 °C'ye

(Sanyo, Japonya) bırakılır. Mr. Frosty hücreleri dakikada 1°C soğutarak hücreleri yavaş yavaş dondurur ve canlılıklarını korur. Donan hücre vialleri en fazla 6 ay süre ile kalmak şartıyla Mr. Frosty içerisinde çıkarılarak -80°C' ye bırakılır. Daha sonra kullanılacak ise -196 °C'deki sıvı azot içerisine aktarılır.

3.4.4. Dondurulan Hücrelerin Çözdürülmesi

Derin dondurucuda (-80°C) (Sanyo, Japonya) ya da sıvı azot tankında dondurularak saklanan hücrelerin tekrar deneylerde kullanılması için hızlı bir çözündürme işlemi yapılır. Bu işlemin hızlı olabilmesi için daha besiy ortamı 37°C' deki su banyosunda ısıtılır. Derin dondurucudan (Sanyo, Japonya) ya da sıvı azot tankından çıkarılan vialler hızlıca su banyosu içerisine daldırılır ve yarı yarıya çözülmesi sağlanır. Dondurma tüpü içerisindeki hücre süspansiyonu pipet yardımıyla çekilerek 37°C' ye getirilmiş olan besiy ortamı içerisine aktarılır ve 1360 RPM' de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler tüp dibine çöktürülür. Süpernatant aspire edilir, pelet 37°C' ye getirilmiş besiy ortamı ile yavaşça pipetlenir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra istenen miktarda hücre kültür flaskına aktarılır. Kültür için inkübatöre yerleştirilir, hücrelerin homojen dağılabilmesi için sağa sola hareket ettirilir.

3.4.5. Tripan Mavisi ile Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre ekimi ve hücrelerin dondurulması sırasında belli sayıda hücre ile işlem yapabilmek için tripan mavisi ile boyanan hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlenir.

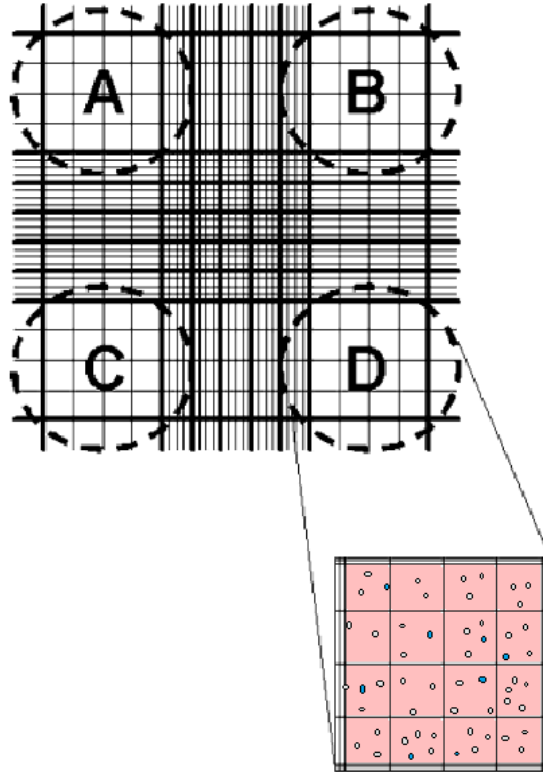
Hücre peleti 10 ml besiy ortamı ile homojenize edilir ve içerisinde 10µL'lik örnekler alınarak mikrotüpe aktarılır. Tüp içerisine vortekslenen %4'lük (w/v) tripan mavisi çözeltisinden de 10µL alınarak hücreler %50 oranında seyreltilir. Bu karışımdan 10µL alınarak Neubauer hücre sayım çemberi içerisine aktarılır ve mikroskop altında Şekil 8 'de gösterilen A, B, C ve D alanlarında görülen hücreler, mikroskobun 100X' lik büyütmesi ile sayılır ve bulunan değer 4'e bölünerek ortalama hücre sayısı (X_{ort}) bulunur. Tripan ile maviye boyanmamış hücreler canlı hücreleri, mavi hücreler ise hücre zar bütünlüğü bozularak boyayı içerisine almış olan ölü hücreleri göstermektedir. Hücre sayısı hesaplanırken eşitlik 2' den faydalanılır. Eşitliğe göre A mililitredeki toplam hücre

sayısını, SF sulandırma faktörünü, 10^4 ise çarpım sabitini göstermektedir. Örnekteki canlı hücre yüzdesinin bulunması için ise eşitlik 3' ten faydalanmıştır.

$$A = X_{\text{ort}} \times SF \times 10^4 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

$$\text{Canlı Hücre Yüzdesi} = \text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Sulandırma faktörü hücre süspansiyonu %50 oranında sulandırıldığı için sulandırma faktörü 2 olduğundan SF yerine 2 yazılarak ml'deki hücre sayısı bulunmuştur. Toplam hücre miktarı bulunurken de, ml'deki hücre sayısı (A) ile hücre süspansiyon hacmi (10 ml) çarpılır [84].

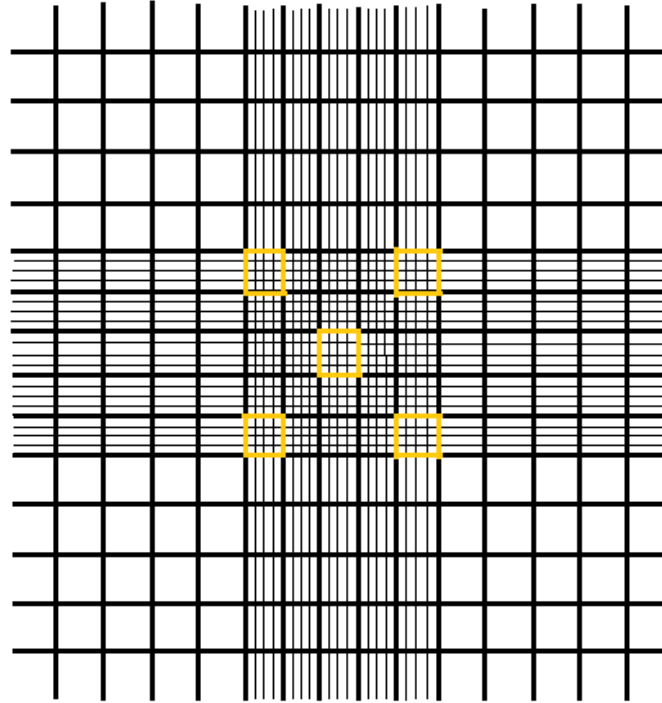


Şekil 8- Hücre sayısının belirlenmesinde hücre sayımı yapılacak alanlar (A, B, C, D).

Mavi ile gösterilen hücreler ölü hücreleri simgelemektedir.

3.4.6. Kandaki Platelet Sayısının Belirlenmesi

Kan bankasından soğuk zincir ile getirilen kan %1 (w/v)' lik amonyum oksalat ile 1:20 oranında sulandırılarak oda sıcaklığında 1,5 saat bekletilerek eritrositler liziz edilir. Homejenize edilir ve içerisinden 10 μ L alınarak Neubauer sayım çemberine aktarılır ve 20 dakika boyunca platelelerin sayım çemberi yüzeyine oturması beklenir. Şekil 9' de gösterilen Neubauer sayım çemberinin ortasındaki büyük karenin içinde turuncu ile işaretlenmiş bölmelerde bulunan her birinde 16 olmak üzere toplam 80 adet küçük karenin içindeki plateletler sayılır. Sayım yapılırken üst ve soldaki çizginin üzerindeki plateletler sayıma dahil edilmez.



Şekil 9- Platelet sayımı sırasında Neubauer sayım çemberinde kullanılacak alanlar

Turuncu çizgiler ile belirtilmiştir.

Sayım yapıldıktan sonra hesaplamaya geçilir. Hesaplamada; platelet sayısı (N), dilüsyon faktörü, sayılan en küçük karelerin sayısı (n), en küçük karenin alanı (A) ve

Neubauer sayım çemberinin tabanı ile lamel arasında kalan yükseklik (h) kullanılır. Bu yükseklik Neubauer sayım çemberinin üzerinde 0.1 mm olarak belirtilmiştir.

Platelet sayımları Eşitlik 4' e göre hesaplanmıştır.

$$1 \mu\text{L Kandaki Tompalm Platelet Sayısı} = \frac{N \times \text{Dilüsyon Faktörü}}{A \times h \times n}$$

(Eşitlik 4)

Platelet sayımı açısından uygun bulunan kan örnekleri hücre kültürü laboratuvarına getirilerek uygun şartlarda santrifüj edilir. Üst faz ve orta faz steril bir şekilde laminer akış kabini altında yeni bir tüpe alınır, homojenize edilir ve fibrin matris yapımında kullanılacak olan bağlayıcı ajan eklenir.

3.4.7. L929 ve HS27 Hücre Hatlarının Kalibrasyon ve Çoğalma Eğrilerinin Çıkarılması

L929 ve HS27 hücre hatlarının kalibrasyon ve çoğalma eğrilerinin oluşturulmasında MTT yönteminden faydalanılmış ve üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. L929 hücre hattı her göze 3×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve 5 günlük çoğalma eğrisi oluşturulmuştur. HS27 hücre hattı ise her kuyuya 1×10^5 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve 7 günlük çoğalma eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri için, hücrelerin ekildikten sonra en az 4 saat inkübatörde bekletilerek yüzeye tutunmaları sağlanmış sonra MTT analizine geçilmiştir. Kalibrasyon eğrileri hücrelerin ilk ekim sırasındaki sayısının verdiği absorbans değerinin bulunması için kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak spesifik çoğalma eğrileri oluşturulmuştur. Çoğalma eğrilerindeki üstel üreme fazında (logaritmik faz), hücrelerin ikilenme süresi hesaplanırken eşitlik 5' teki formüller kullanılmıştır.

$$\frac{dx}{dy} = \mu x \quad \ln \frac{x_2}{x_1} = \mu(t_2 - t_1) \quad t_d = (\ln 2 / \mu) \quad (\text{Eşitlik 5})$$

x= hücre sayısı μ = spesifik çoğalma hızı t= zaman t_d = ikilenme süresi

3.5. CaCl₂'li ve Trombinli Fibrin Matrislerde İnsan Fibroblast Hücre Hattının (HS27) Kültürü

HS27 hücrelerinin plateletten zengin fibrin matrisler içerisinde üretiminin üreme üzerinde etkisi 21 gün boyunca kültür edilen hücrelerin MTT analizi yapılarak incelenmiştir. Kültürasyon 1, 7, 14 ve 21' inci günlerde MTT alınarak değerlendirme yapılacağı planlandığından 4 ayrı koldan aynı koşullarda üretilen hücreler ile yapılmıştır. Hücre kültür kaplarına 1 ml fibrin matris içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

3.6. MTT Analizi

Trombin ve CaCl₂ ile üretilen plateletten zengin fibrin matrisler içerisinde ve standart hücre kültür kaplarında hücre canlılıkları, mitokondriyal aktiviteleri ve fibrin matrislerin hücre üremesi üzerindeki etkileri MTT analizi ile incelenmiştir. MTT tuzu canlı bir hücrede hücrenin mitokondriyal enzimleri tarafından formazan kristallerine indirgenir. Bu enzim mitokondriyal dehidrogenaz enzimidir ve MTT' yi mor formazan kristallerine dönüştürür. Bu kristallerin çeşitli çözücülerle çözülmesi ve optik okuyucularda okutulmasıyla kantitatif bir sonuç elde edilir. Bu sonuç hücre canlılığı ve aktivitesiyle ilişkilidir. MTT analizinin aşamaları maddeler halinde verilmiştir.

1. İnkübatörden çıkarılan kültür kaplarındaki besi ortamları çekildi.
2. Her göze % 10 MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) içeren fenol red ve serum bulunmayan besi ortamından 600µL eklendi.
3. Kültür kaplarının yüzeyi alüminyum folyo ile sarılarak MTT çözeltisinin ışıktan etkilenmesi engellendi.
4. 3 saat süre ile inkübatörde (37°C %5 CO₂) bekletildi.
5. Gözlerdeki kullanılmış MTT çözeltisi çekilerek atıldı.

6. Formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak amacıyla her göze 400 µL 0.04 M HCl içeren isopropanol eklenerek 37°C' deki çalkalamalı ısıtıcıda (Biosan, ES20, Letonya) üzeri alüminyum folyo kaplı olarak 15 dk bekletildi.
7. Pipetaj yapılarak örnekler toplandı ve yeni bir kültür kabına aktarılarak 570nm de 690nm referansta spektrofotometrede (Molecular Devices, SpectraMax® M Series, Amerika) ölçüldü.

3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Hücrelerin trombin ve CaCl₂ ile üretilen fibrin matrisler içerisindeki yerleşimleri, hücre-hücre ve hücre fibrin etkileşimlerinin belirlenebilmesi için hücre kültürünün 1, 14 ve 21'inci günlerinde SEM (QUANTA 400F Field Emission, Amerika) analizi yapılmıştır.

SEM analizi öncesi kültürden alınan örneklerin besi ortamları aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Örnekler 3 kez PBS ile yıkanmış ardından hücrelerin fiksasyonu için %2,5'luk (v/v) glutaraldehit içerisinde +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. SEM analizi gününe kadar PBS içerisinde +4°C'de saklanmıştır. Analizden bir gün önce liyofilizatörde (Christ, Almanya) gece boyunca kurutulmuş, örneklerin iletkenlik özelliği kazanması için altın-paladyum ile kapnarak SEM ile görüntülenmiştir.

3.8. Histolojik İncelemeler

Trombin ve CaCl₂ li plateletten zengin fibrin matrisler içerisinde kültüre alınan HS27 örnekleri 1, 14 ve 21' inci günlerde hematoksilin/eosin ve immünfloresan boyamaları yapılmak üzere ayrılmıştır. Ayrılan örneklerin besi ortamları uzaklaştırılıp 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Örnekler kriyo-kesitler alınarak boyanacağından doku dondurma solüsyonu (Leica, Avusturalya) içerisine alınarak sıvı azotta yaklaşık 2 dakika bekletilerek dondurulmuştur. Kesitler, kriyostat (Leica, CM1900 UV, Avusturalya) ile 5 µm kalınlığında alınmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.8.1. Hematoksilen/Eozin Boyaması (H&E)

Hematoksilen boyaması nükleusların gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Hematoksilen bazik özelliktedir ve nükleusları mor renge boyar. Asidik özellikte olan eozin boyaması ise bağ dokunun pembeye boyanmasını sağlar. H&E boyama protokolü sırası ile verilmiştir:

1. Kesitler %96' lık Etil alkolde iki kez 5'er dakika bekletildi.
2. %80' lik Etil alkolde 5 dakika bekletildi.
3. Akan çeşme suyunda yıkandı.
4. Mayer'in Hematoksileni içerisinde 5 dakika bekletildi.
5. Akan çeşme suyunda yıkandı.
6. Amonyaklı suya batırıp çıkarılarak fazla boyanın atılması sağlandı.
7. Akan çeşme suyunda yıkandı.
8. Eozin içerisinde 60 saniye bekletildi.
9. %80' lik Etil alkolde 5 dakika bekletildi.
10. Kesitler %96' lık Etil alkolde iki kez 5'er dakika bekletildi.
11. Kesitler ksilende 1 saat bekletildi.
12. Ksilende bazlı kapatıcı ile kapatıldı, kurutuldu ve ışık mikroskobu ile incelendi.

3.8.2. Kollajen Tip I ve III için İmmü floresan Boyama

Fibrin matrisler içerisindeki fibroblast hücrelerinin ürettiği kollajen liflerin daha spesifik olarak görüntülenebilmesi için fibrin matrislerden alınan kriyo-kesitlere floresan boyamalar uygulanarak, floresan mikroskobunda (Leica, Almanya) incelenmiştir. Çekirdekleri boyayan DAPI mavi renk, kollajen tip I 'i gösteren FITC yeşil, kollajen tip III'ü gösteren Texas red ise kırmızı görüntü vermektedir.

Immünfloresan boyama aşamaları sırası ile aşağıda verilmiştir:

1. Lam üzerindeki kesitler pozitif ve negatif boyamalar yapılacak şekilde belirlendi. ve Dakopen ile işaretlendi.
2. Kesitler PBS ile hazırlanan %4' lük paraformaldehit (pH 7.4) içerisinde, oda sıcaklığında fikse edildi.
3. 3 kez TBS ile yıkama yapıldı.
4. Kesitlerin üzerine TBS-BSA (1xTBS + %2lik BSA) içerisinde 1/200 oranında hazırlanan keçi serumu damlatıldı ve 30 dakika bekletilerek spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için bloklama işlemi yapıldı.
5. Primer antikor olarak farede üretilen kollajen tip I (Sigma-Aldrich), 1/200 oranında hazırlanarak pozitif olarak belirlenen bölgelere damlatıldı, negatif olarak belirlenen bölgelere de 1/200 oranındaki keçi serumu yenilenerek 1 saat bekletildi.
6. 3 kez TBS ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor olarak keçide üretilen ve fareye karşı FITC bağlı sekonder antikor Sigma- Aldrich) 1/200 oranında (5µl sekonder antikor, 10µl normal insan serumu, 985µl TBS-BSA) hazırlandı, kesitlerin üzerine eklenir ve karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. İnsan serumu eklenmesinin sebebi insana ait hücreler kullanılmasıdır ve bloklanma olmayan bölgeler varsa bağlanarak spesifik olmayan bağlanmaları engeller.
8. 3 kez TBS ile yıkama yapıldı.
9. Kollajen tip III boyamasına başlamadan öncelikle spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için, maymun serumu yine TBS-BSA içerisinde (1xTBS + %2lik BSA) 1/200 oranında hazırlanır ve kesitlere dökülerek 45 dakika bekletildi.
10. Primer antikor olarak tavşanda üretilen kollajen tip III (Abcam) 1/200 oranında hazırlanarak pozitif olarak belirlenen bölgelere damlatıldı, negatif olarak belirlenen bölgelere de 1/200 oranındaki maymun serumu yenilenerek 1,5 saat bekletildi.

11. 3 kez TBS ile yıkama yapıldı.
12. Sekonder antikor olarak maymunda tavşana karşı üretilen ve Texas Red (TX) bağlı sekonder antikor (Abcam) 1/200 oranında (5µl sekonder antikor, 10µl normal insan serumu, 985µl TBS-BSA) hazırlandı, kesitlerin üzerine eklendi ve karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. İnsan serumu eklenmesinin sebebi insana ait hücreler kullanılmasıdır ve bloklanma olmayan bölgeler varsa bağlanarak spesifik olmayan bağlanmaları engeller.
13. 3 kez TBS ile yıkama yapıldı.
14. Örnekler kurutulmadan DAPI çekirdek boyası damlatılır, üzeri lamer ile kapatıldı ve floresan mikroskopunda, uygun ışık kaynaklarında inceleme yapıldı.

3.8.3. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Hücre içeriklerinin gözlemlenebilmesi ve kollajen üretiminin tespiti için geçirimli elektron mikroskopunda trombin ile ve CaCl_2 ile üretilen PZFM'lerin 21'inci günlerine ait örnekler üzerinde incelemeler yapılmıştır.

TEM görüntülemesi öncesi yapılan hazırlıklar şu şekildedir:

Dondurulan PZFM örneklerinden birer örnek geridöndürülüp elektron mikroskop takibine alındı. Fosfat tamponu (pH=7,4) içindeki %2.5'luk gluteraldehitte oda sıcaklığında 1 saat 15 dakika tespit edildikten sonra tampon solusyonunda yıkandı. Daha sonra gluteraldehit ile tespit edilen PZFM parçalarına 30 dakika fosfat tamponlu %1'lik osmium tetroksit ile ikinci tespit uygulandı. Osmium muamelesi sonucu kararan fibrin matrisler 0,1M fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 kez yıkandı. PRFM'ler fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkandıktan sonra %2'lik agara gömüldü. Ardından dehidratasyon için artan derecelerde alkol serilerinden geçirildi (%50 etil alkol 10 dk, %60 etil alkol 10 dk, %70 etil alkol 10 dk, %80 etil alkol 10 dk, %90 etil alkol 10 dk, %96 etil alkol 15 dk, %96 etil alkol 15 dk, %100 etil alkol 20 dk, %100 etil alkol 20 dk) ve propilen oksit ile muamele edildi. Araldite/Epon812 (Cat no: 13940, EMS Hatfield, PA, USA) kullanılarak gömme yapıldıktan sonra 48 saat 60°C etüvde polimerize edildi. İki mikron kalınlığında alınan kesitler metilen mavisi-azur II ile boyandı

ve DFC7000T dijital kamera (Leica, Wetzlar, Germany) bağılı ışık mikroskobu (Leica DM6B) ile incelendi. Ultramikrotom (Leica ultracut R) ile alınan 70nm kalınlığındaki kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEOL-JEM 1400 elektron mikroskobu ile incelendi ve CCD kamera (Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA) ile fotoğraflandı.

Metilen mavisi-Azur II boyası

A Solüsyonu :

Metilen mavisi (BDH Chemicals, K.N: 29608) 1 gr

di-sodium tetraborate crystals ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (BDH Chemicals) 1 gr

Distile su 100 ml

B Solüsyonu :

Azur II (BDH Chemicals, K.N: 30157) 1 gr

Distile su 100 ml

Metilen mavisi-Azur II boyası : A solüsyonundan 50 ml ve B solüsyonundan 50 ml karıştırılarak üstüne 90 ml distile su eklenerek hazırlandı.

Fosfat tampon solüsyonu:

X Solüsyonu :

Sodium phosphate dibasic dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

(Sigma, Riedel-deHaenn, K.N: 04272) 35,6 gr

Distile su 1000ml

Y Solüsyonu:

Sodyum dihidrojen orthophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (BDH Chemicals, K.N: 30132) 31,2 gr.

Distile su 1000 ml

Fosfat tampon solüsyonu: X solüsyonundan 80 ml ve Y solüsyonundan 20 ml karıştırılır, elde edilen 100 ml solusyon üstüne 100 ml distile su eklendi.

%2'lik gluteraldehit solüsyonu:

Fosfat tampon solüsyonu 92 ml

%25'lik gluteraldehyde 8 ml

92 ml fosfat tampon solusyonunun içine 8 ml %25'lik gluteraldehit eklenerek %2'lik gluteraldehit elde edildi.

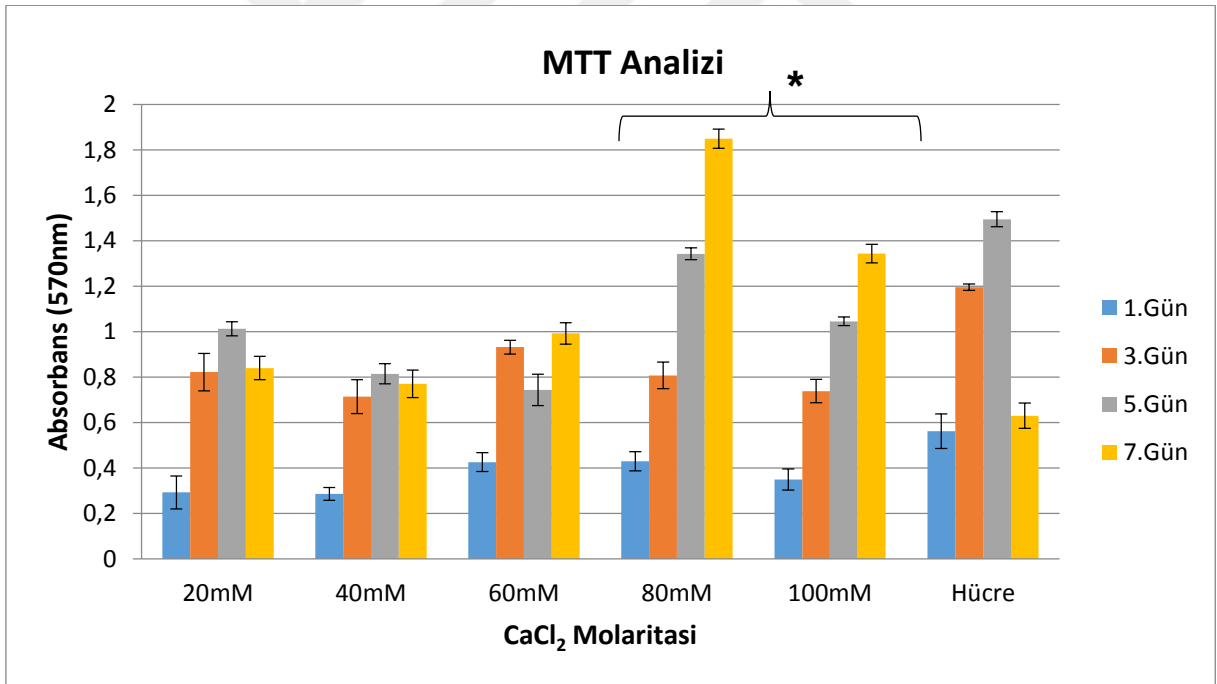
3.9. İstatistiksel Analiz

Deney sonuçları arasında önemli bir farklı olup olmasının belirlenebilmesi ve istatistiksel olarak değerlendirilebilmesi için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca deneylerde üç tekrarlı olarak çalışılmış ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma değerleriyle sunulmuştur.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fibrin Matris Üretiminde Uygun CaCl_2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücreler için en uygun CaCl_2 miktarının bulunabilmesi için çeşitli konsantrasyonlardaki CaCl_2 ile yapılan fibrin matrisler üretilmiştir. Bu matrisler içerisinde kültürü gerçekleştirilen L929 fibroblast hücrelerinin canlılık ve mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile değerlendirilmiş ve matris üretiminde kullanılacak olan en uygun CaCl_2 konsantrasyonuna karar verilmiştir. Çeşitli CaCl_2 konsantrasyonları ile üretilen matrisler içerisindeki hücrelere ait 1, 3, 5 ve 7'inci günlere ait MTT analiz sonuçları Şekil 10' da verilmiştir.



Şekil 10- Fibrin matris üretiminde kullanılacak olan ve hücreler için en uygun CaCl_2 konsantrasyonunun tespiti. * $p < 0,05$

Kontrol grubu olarak kullanılan hücre grubu, doğrudan hücre kültür flasklarına ekilen hücrelerdir. Bu gruptaki hücrelerin 7. günde kontakt inhibisyon sonucu sayılarının azaldığı düşünülmektedir. Grafik değerlendirildiğinde fibrin matris içerisindeki

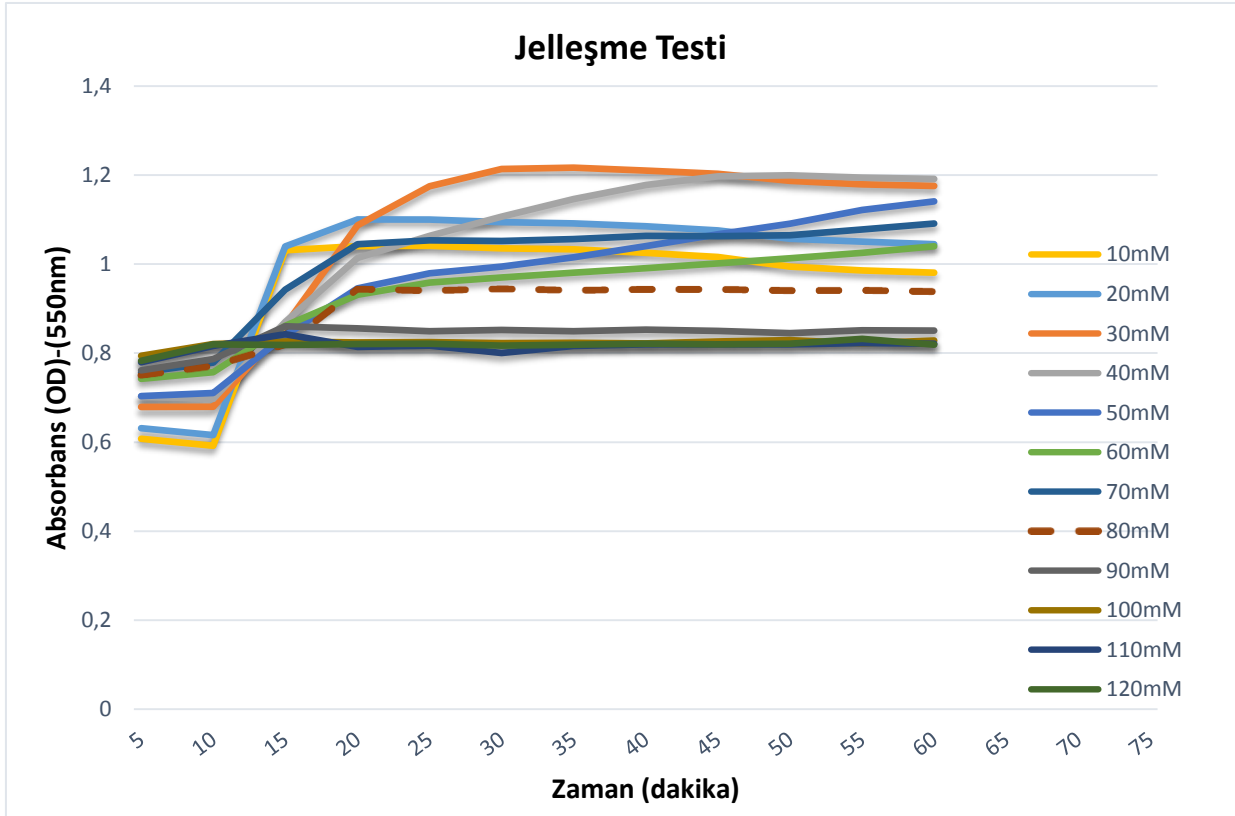
hücrelerin istikrarlı bir şekilde artış gösterme durumu yalnızca 80mM ve 100mM'lık CaCl_2 konsantrasyonlarında olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında üç boyutlu fibrin matris içerisine ekilen hücrelerin adaptasyon süreci sebebi ile ilk günlerde yeterli sayıya ulaşamamış olması normaldir. Ancak 80mM ve 100mM'lık konsantrasyonlar haricindeki matrislerde hücre canlılıkları 5. veya 7. günlerde düşme eğilimindedir. Bu durumun kullanılan CaCl_2 miktarına bağlı olarak yüzey alanının değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü kalsiyum konsantrasyonunun artırılması fibrin lif çaplarını arttırdığı belirtilmiştir [85] [86]. Ayrıca düşük CaCl_2 konsantrasyonu ile oluşan ince lifler birbirlerine yakın konumlanacağından daha küçük gözeneklere sahip fibrin yapısı oluşur [87] [88]. Gözenek çaplarının hücrelere yetersiz gelmesi sebebi ile hücreler sıkışmış ve kontakt inhibisyona uğramış olabilirler. 100mM CaCl_2 konsantrasyonu ile üretilen fibrin matrislerin 80 mM CaCl_2 konsantrasyonu ile üretilenlere kıyasla günler arası hücre artış oranları daha azdır. Bu durumun 100mM CaCl_2 miktarının hücreler üzerinde toksik etkiye sebep olmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Cao ve arkadaşları yaptığı çalışmada 100mM, 500mM ve 1M konsantrasyonları ile hazırlanan besiyerlerinde kültür edilen Schwan hücrelerinin maruz bırakıldıkları bu konsantrasyonların önemli miktarda hücre kaybına neden olabileceğini bulmuşlardır [89]. 80mM'lık CaCl_2 konsantrasyonunun hücrelerin üremesi ve canlılığı için en uygun konsantrasyon olduğu saptanmıştır.

4.2. CaCl_2 ve Trombinli Fibrin Matrislerin Karakterizasyonu

4.2.1. Jelleşme Testi Sonuçları

Jelleşme testi ile kan bankasından alınarak elde edilen farklı molaritelerdeki CaCl_2 ile üretilen fibrin matrislerin jelleşme süreleri tespit edilmiş ve Şekil 11' da gösterilmiştir. Jelleşme süresi hücrelerin matris içerisinde homojen bir şekilde dağılabilmeleri için önemlidir. Ayrıca *in vitro* şartlarda besi ortamının eklenebilmesi için jelleşmenin tamamlanmış olması gerekir ve bu sürenin uzaması hücrelerin uygun olmayan şartlarda uzun süre beklemesi anlamına gelir ki, bu hücre canlılığı ve kalitesi için istenmeyen bir durumdur. Bu sebeplerle yapılan jelleşme testi ile hücre canlılığını kültür

ortamında en iyi durumda koruyan 80mM'lık CaCl_2 konsantrasyonunun jelleşme testinde de uygun olup olmadığı incelenmiştir. Transparan plazma, çapraz bağlayıcının eklenmesi ile opak bir görünüm almaya başlar ve bu da jelleşmenin olduğu anlamına gelir. Opaklaşmanın zamanı da spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Fibrin pıhtılaşması üzerine yapılan çalışmalarda da spektrofotometrik yöntemin kullanıldığı görülmektedir [83] [90].



Şekil 11- Farklı CaCl_2 konsantrasyonları ile üretilen fibrin matrislerin jelleşme süreleri

Üretilen fibrin matrislerin jelleşme süreleri Tablo 5' te verilmiştir. Şekil 11' a ait grafiğin değerleri Ek1' de sunulmuştur.

Tablo 5- Üretilen matrislerin kullanılan CaCl_2 molaritelerine göre jelleşme süreleri

CaCl_2 Molaritesi (mM)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Jelleşme Süresi (dk)	20 ± 0	16,6 ± 2,9	28,3 ± 2,9	41,6 ± 5,8	56,6 ± 5,8	70 ± 0	25 ± 0	20 ± 0	25 ± 0	11,6 ± 2,9	11,6 ± 2,9	5 ± 0

Fibrin matris üretiminde kullanılan CaCl_2 miktarının artırılması ile jelleşme süresinin arttığı bilinmektedir [91] [86]; ancak yapılan çalışmalarda 70mM CaCl_2 kullanımından itibaren diğer artan konsantrasyonlarda jelleşme süresinin düştüğü görülmüştür. Jelleşme deneyi sonunda hücre canlılığını etkilemeyecek sürede jelleşmenin olduğu farklı CaCl_2 konsantrasyonların olduğu görülmüştür; ancak çalışmalar kapsamında kullanılacak olan matris ile yapılan kültür çalışmalarında hücre canlılığı ve çoğalma kinetiği açısından da uygun olması beklenmektedir.

Jelleşmenin 20 dakikada tamamlanması hücre canlılığı için bir problem oluşturmamaktadır [92]. 100mM' dan daha yüksek molarite ile üretilen matrislerde jelleşme CaCl_2 'nin hücreler üzerinde toksik etki oluşturduğu, "4.1. Fibrin Matris Üretiminde Uygun CaCl_2 Konsantrasyonun Belirlenmesi" bölümünde belirtilmiştir. Bu iki kriter göz önünde bulundurulduğunda tez kapsamında 80 mM CaCl_2 çalışma konsantrasyonu ile üretilen jellerin kullanılması uygun görülmüştür.

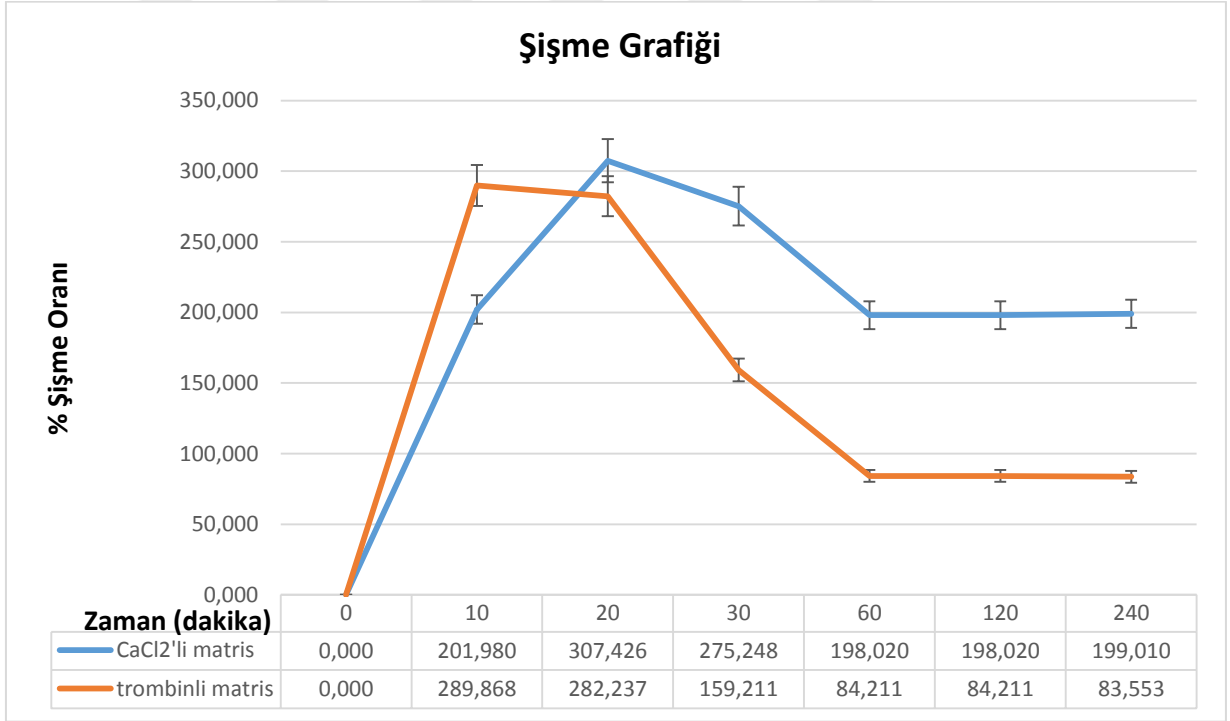
Ayrıca yüksek sıcaklığın jelleşme süresini kısalttığı bilinmektedir [83] [93] [94] [95]. Deneyin 25⁰C' de gerçekleştirilmiş olmasının da jelleşme süresinin uygun sürelerde gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir.

4.2.2. Şişme Testi Sonuçları

CaCl_2 ve trombin ile üretilen PZFM' lerin matrislerin yapılarına alabileceği maksimum su miktarının belirlenmesi için oda sıcaklığında dH₂O içerisinde gravimetrik ölçümler yapılmıştır. Üç örnek kullanılarak yapılan paralel deneylerden elde edilen, matris örneklerinin gram cinsinden ölçüm sonuçları Tablo 6' te verilmiştir. Eşitlik 1 yardımıyla hesaplanan şişme oranları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 12).

Tablo 6- Matris örneklerinin belirli zaman aralıklarında ölçülen ağırlıkları

	Zaman (dk)	0	10	20	30	60	120	240
CaCl₂'li Matris	n = 1	0,0065 g	0,0192 g	0,0273 g	0,026 g	0,0217 g	0,0197 g	0,0191 g
	n = 2	0,0071 g	0,022 g	0,029 g	0,0251 g	0,0197 g	0,0212 g	0,0203 g
	n = 3	0,0066 g	0,0198 g	0,026 g	0,0247 g	0,0188 g	0,0193 g	0,021 g
	Ort.	0,0067 g	0,0203 g	0,0274 g	0,0253 g	0,0201 g	0,0201 g	0,0201 g
Trombinli Matris	n = 1	0,0045 g	0,0186 g	0,0189 g	0,012 g	0,011 g	0,01 g	0,0086 g
	n = 2	0,0051 g	0,0212 g	0,021 g	0,0136 g	0,0096 g	0,0088 g	0,0082 g
	n = 3	0,0056 g	0,0195 g	0,0182 g	0,0138 g	0,0079 g	0,0092 g	0,0098 g
	Ort.	0,0050 g	0,0197 g	0,0194 g	0,0131 g	0,0095 g	0,0093 g	0,0089 g



Şekil 12- % Şişme oranı-zaman grafiği

CaCl₂ ile üretilen matrisler için dH₂O' daki su tutma, ilk 20 dakikada en üst seviyeye çıkmıştır. 20 dakikadan sonra matrisler su verdikleri için şişme oranında düşüş görülmüştür. Altmış dakikadan sonra şişme oranlarında bir değişim gözlenmemiştir. CaCl₂ ile üretilen fibrin matrisler her ne kadar belirli bir miktar su salmış olsa da %

denge şişme oranı $198 \pm 0,0038$ olarak hesaplanmış ve ilk ağırlığının neredeyse iki katına ulaştığı görülmüştür.

Trombin ile üretilen matrisler dH_2O ' da ilk 10 dakika sonunda en yüksek değere ulaşmıştır. Matrislerden 10. dakikadan 20. dakikaya kadar geçen sürede çok küçük bir su salımı olmuş; ancak 20. dakikadan sonra hızlı bir su kaybı göstermişlerdir. Altmışıncı dakikadan itibaren matris yapısı absorplayabileceği tüm suyu absorbe ettiği için, şişkinlik oranında çok büyük bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Trombin ile üretilen matrislerin şişme durumları ilk ağırlıkları ile karşılaştırıldığında %83 oranında artış görülmüştür. Yüzde olarak, denge şişme oranı $83 \pm 0,0019$ olarak hesaplanmıştır.

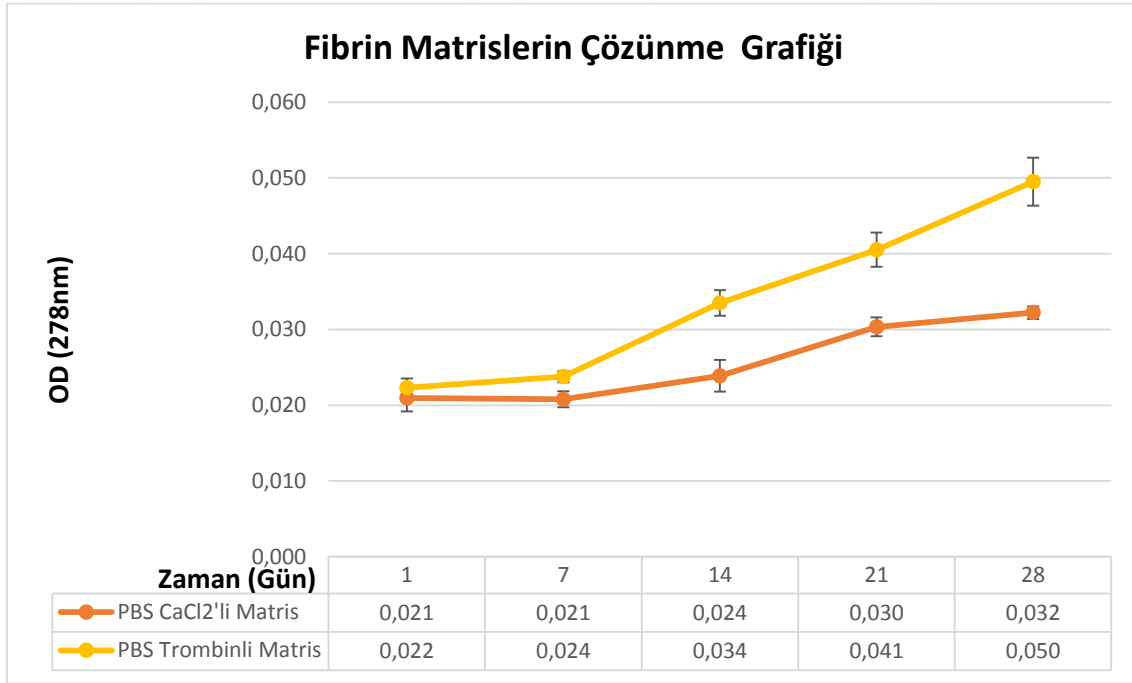
İki farklı matris için elde edilen sonuçların matrislerin gözenek çapları arasındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gözenek çapı küçüldükçe su tutma oranında artış olmaktadır ve bu sebeple gözenek çapı trombin ile üretilen matrislere oranla daha küçük olan $CaCl_2$ ile üretilen matrislerin bünyelerinde daha fazla su barındırdığı anlaşılmıştır. $CaCl_2$ ile ve trombin ile üretilen PZFM'lere ait por büyüklükleri "3.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi" bölümünde yer almaktadır.

Alınan suyun absorblanmasının ardından kademeli bir şekilde oluşan su kaybı gözenekli yapılarda sıklıkla gözlenen bir durumdur. İçerisine su alarak hidrate olmuş polimerlerin yumuşaması sebebiyle molekül zincirlerde görülen yeniden düzenlenme matrisin son durumunda daralmaya sebep olabilir. Daha yoğun çapraz bağları bulunan matrisler yapılarında oluşacak daralmaya karşı direnç gösterirler [96]. Ma ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar da gözenek çapı daha büyük olan trombin ile üretilen fibrinlerin $CaCl_2$ ile üretilen fibrinlere göre daha fazla su salımı gerçekleştirmiş olmaları açıklamaları desteklemektedir [96].

$CaCl_2$ ile ve trombin ile üretilen PZFM' ler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

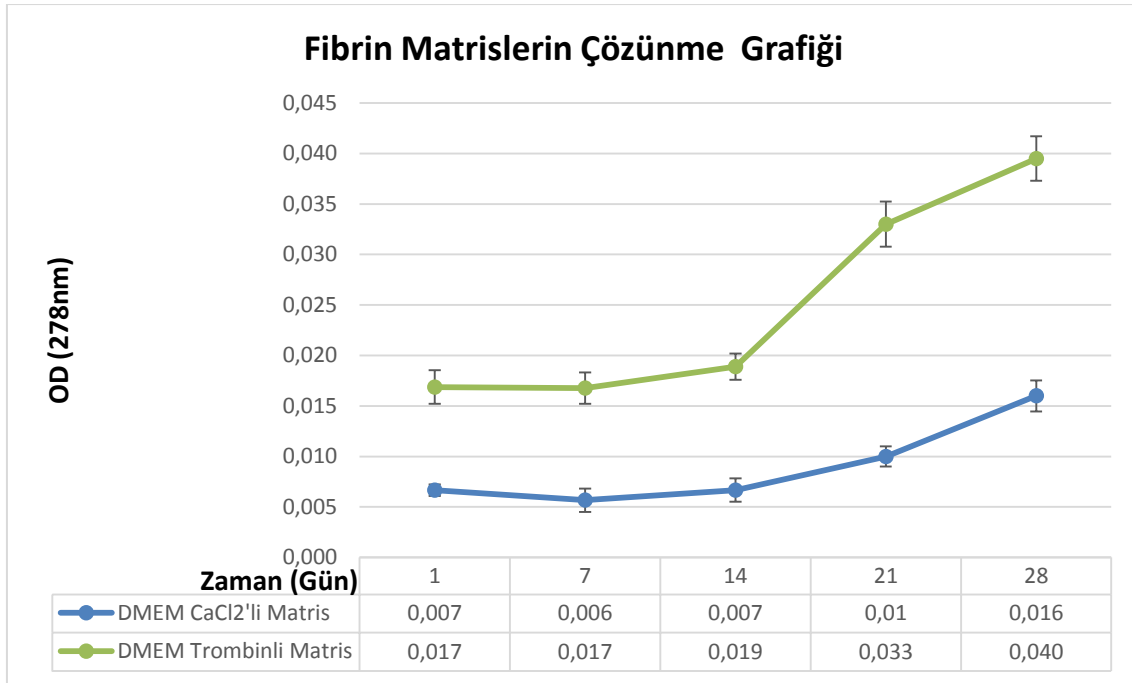
4.2.3. Çözülme Testi Sonuçları

CaCl₂ ve trombin ile üretilen plateletten zengin fibrin matrislerin PBS ve serum içeren DMEM içerisinde 37 °C' de çözümleri incelenmiştir. 28 gün boyunca etüvde bekletilip 1, 7, 14, 21 ve 28' inci günlerde, örneklerden alınan üst sıvıların spektrofotometrik (278nm) ölçüm sonucunda elde edilen OD – zaman grafikleri Şekil 13 ve Şekil 14' te gösterilmiştir. 278 nm proteinlerin fenil gruplarının absorbansını ölçen dalga boyu olduğu için tercih edilmiştir [83].



Şekil 13 – CaCl₂ ve trombin ile üretilen fibrin matrislerin PBS içerisinde, 37 °C' deki çözülmesi

Matrislerin etüvde PBS içerisinde 28 gün bekletilmeleri sonucunda, trombin ile üretilen matrislerdeki çözülmenin CaCl₂' li matrislere göre daha fazla olduğu görülmüştür. PBS ortamına alınan matrisler için bir gün sonra yapılan ölçümlerde aynı miktarda belirgin olmayan bir çözülme görülmüştür. 1. günden 7. güne kadar neredeyse değişmeyen çözülme, yedinci günden sonra trombinli matriste daha fazla olmak üzere artış göstermiştir (p<0,05).



Şekil 14- CaCl₂ ve trombin ile üretilen fibrin matrislerin DMEM + %10 FBS içerisinde, 37 °C' deki çözülmesi

Fibrin matrislerin etüvde DMEM içerisinde 28 günlük bekleyişleri sonucunda yapılarında bozulmaların olduğu görülmüştür. Bu çözümlerin trombin ile üretilen fibrin matrislerde CaCl₂ ile üretilenlere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. İki matriste de çözümlerin 1. gün ölçümlerinde başladığı görülmüş; ancak çözümlerde yaklaşık 14. güne kadar belirgin bir artışa rastlanmamıştır. 14. günden sonra başlayan çözülme artışı trombinli matriste belirgin biçimde artmış, CaCl₂' li matristeki çözülme daha az oranda olmuştur (p< 0,05).

CaCl₂ ile üretilen matrislerin çözülmesinin trombin ile üretilenlere göre daha az oluşunun gözenek boyutlarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gözenek boyutunun küçük olması içerisinde alınacak sıvı miktarını hacimsel olarak azalttığı için suyun çözündürücü etkisini de azaltmış olabilir.

Zhao ve arkadaşları tarafından benzer şekilde insan plazması kaynaklı fibrin matrisin PBS ve DMEM içerisindeki kütle kaybı ölçümleri tez kapsamındaki deney sonuçlarıyla uyushmaktadır. PBS ve DMEM içerisinde kısmi kütle kayıplarının giderilmesi için degradasyonu katalizleyen enzimlerin inhibitörü olarak bilinen aprotinin kullanmışlar;

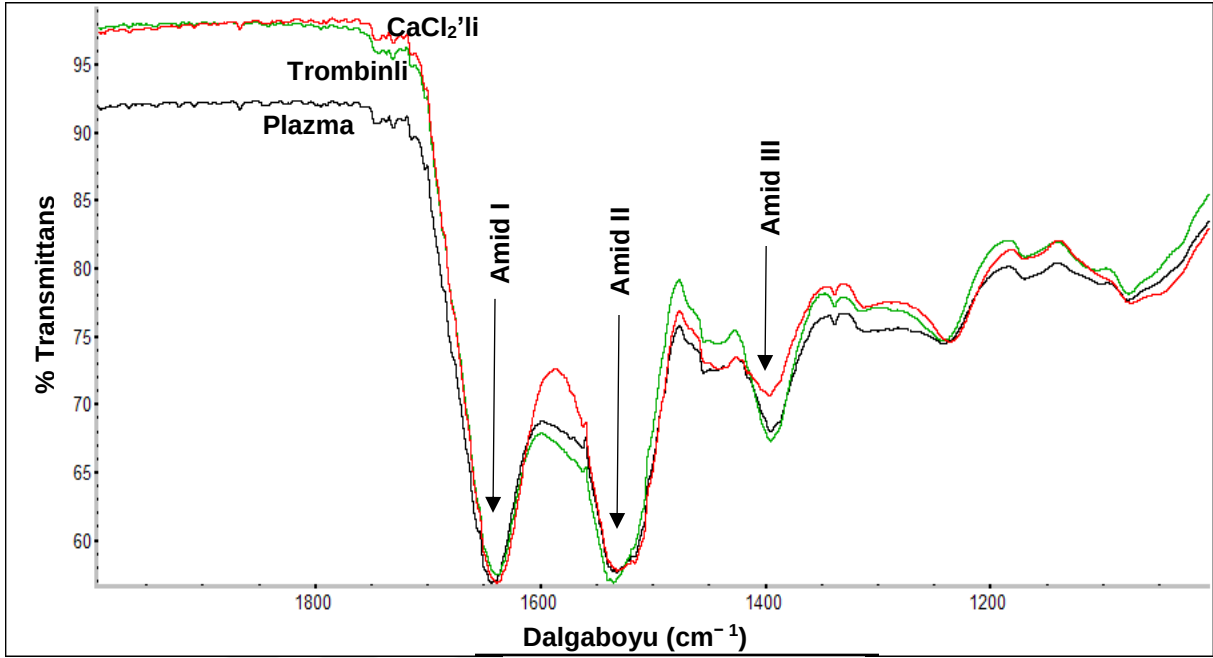
ancak ağırlık kaybı üzerinde etkisinin az olduğunu görmüşlerdir [83]. Çözülmenin PBS içerisinde daha fazla olması PBS'in yüksek iyonik gücünden ve FXIIIa aracılığı ile oluşturulan çapraz bağların azlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak yapılan 28 günlük deney sonucunda PBS ve DMEM içerisindeki bu çözümler kısmi olarak gerçekleşmektedir ve tüm matriste görülen ciddi bir azalmaya neden olmamaktadır. Normalde fibrin matrislerin degradasyonu plasminojen aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Plasminojen; plasmin aktivatörlerinin etkisiyle bir serin proteaz olan plasmine dönüşmekte ve plasmin de fibrin pıhtının çözülmesine yani fibrinolize sebep olmaktadır [97] [98].

Hücreli fibrin matrislerin kültürlerinde matrislerin hızlı bir kütle kayıplarının olmaması ve çözülmenin fibroblastların kendi hücre dışı matris (ECM)' lerini üretmeleri ile eş zamanlı gerçekleşmesi yeni ve doğal bir dokunun oluşabilmesi için oldukça önemlidir. Bu herhangi bir enzim kullanılmadan vücut ortamına yakın olan çözeltiler içerisinde matrislerin hızlı bir şekilde çözülmediğini göstermektedir.

4.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi Sonuçları

Tez çalışması kapsamında doku iskelesi olarak kullanılan trombin ile ve CaCl_2 ile üretilen plateletten zengin fibrin matrislerin FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca CaCl_2 ve trombinin birlikte kullanılarak elde edildiği standart fibrin pozitif kontrol olarak, plateletten zengin fibrin ise negatif kontrol olarak karşılaştırmaya dahil edilmiştir.

Moleküller arası bağlanmaların incelenmesi için yapılan analizlerin sonuçları Şekil 15' te gösterilmiştir.



Şekil 15- FTIR spektrumları

CaCl₂ ile üretilen fibrin matris (kırmızı), trombin ile üretilen fibrin matris (yeşil) ve kontrol grubu olarak kullanılan plateletten zengin plazma (siyah)'ya aittir.

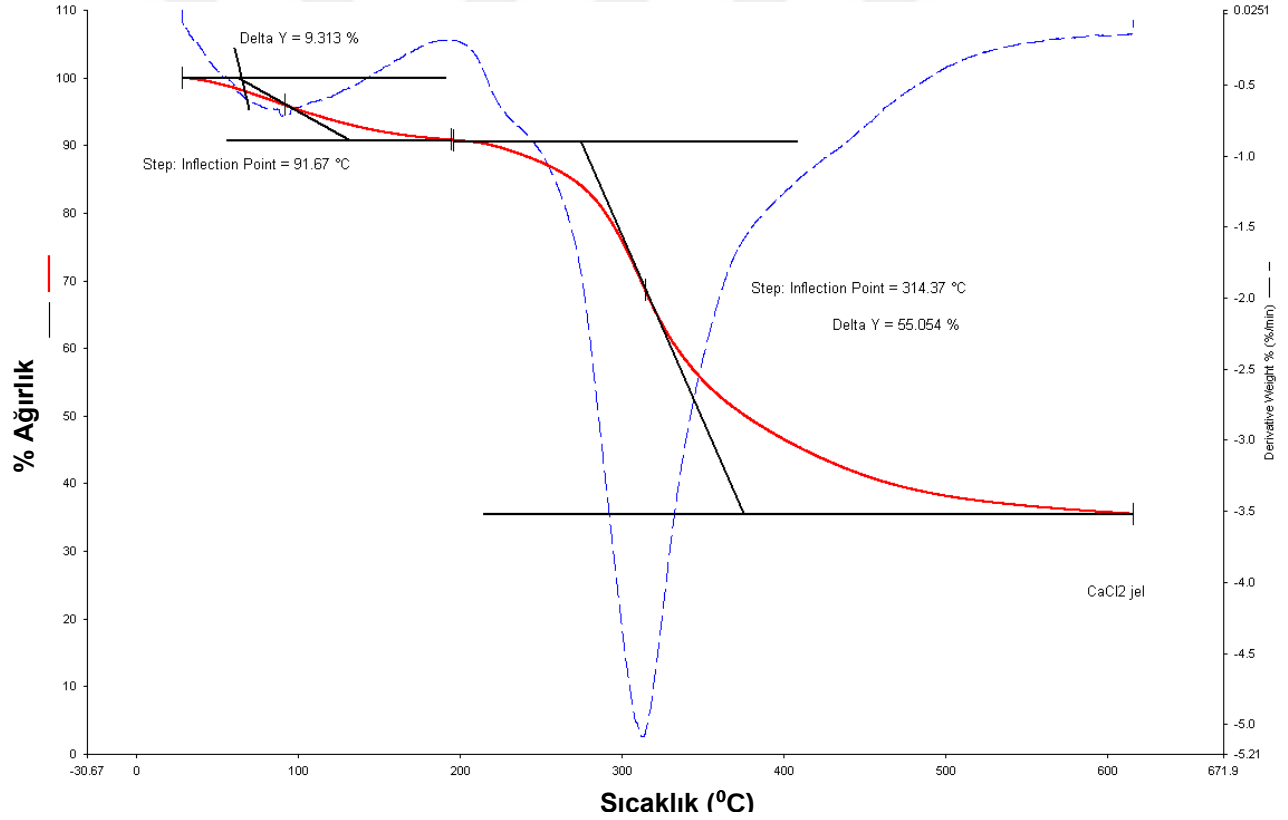
FTIR spektrumu kullanılarak çıkarılan grafikler transmittans-dalgaboyu grafikleri olduğundan değerlendirilecek pikler aşağı yöne uzanan piklerdir. Trombin ve CaCl₂ ile üretilen fibrin matrislerin ve kontrol grubu olarak kullanılan plazmanın FTIR spektrumlarında gözlemlenen 1600- 1700 cm⁻¹ bant aralığı (Amid I)' deki karbonil (C=O) germe gruplarının gerilme titreşimlerini, 1500-1600 cm⁻¹ bant aralığı (Amid II)' ndaki N-H bükülme, ve C-N germe titreşimlerinden ve 1200-1400 cm⁻¹ bant aralığı (Amid III)' deki N-H titreşimlerini göstermektedir [99] [100] [101]. Amid grupları aminoasitleri birbirine bağlayan bağlar olarak bilinmektedir [102] [103].

CaCl₂ ve trombin ile üretilen iki ayrı fibrin matrisin FTIR piklerinin sıklık derecesi plazma ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu her iki matriste de çapraz bağların oluştuğunu göstermektedir. Üretilen iki farklı matris için FTIR spektrumları arasında önemli bir farka rastlanmamaktadır. Yalnızca CaCl₂ ile üretilen fibrin matrise ait amid III bandının sıklığı trombinli matrise ve plazmaya göre daha fazladır. Sıklık

oluşan çapraz bağlanmaları gösterdiğinden CaCl_2 ile üretilen matrislerde çapraz bağlanmanın daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

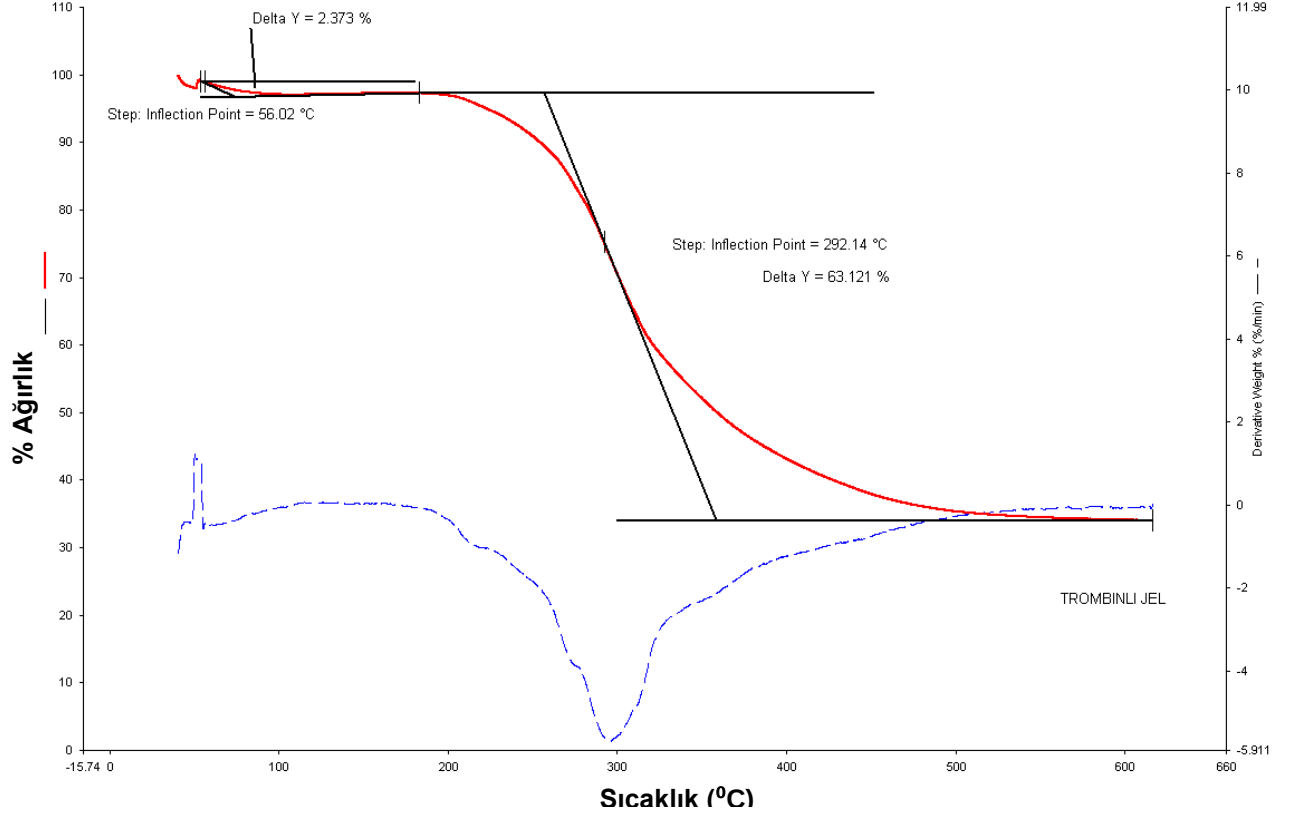
4.2.5. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları

CaCl_2 ile ve trombin ile üretilen iki ayrı plateletten zengin fibrin matrislerin bir gün boyunca liyofizatörde kurutulduktan sonra gerçekleştirilen termal analizleri 40-600 °C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile açık hava atmosferinde yürütülmüştür. Şekil 16 ve Şekil 17’ daki termogramlar elde edilmiştir.



CaCl_2 ile üretilen fibrin matrise ait termogramda (Şekil 16) 91,67 °C’ de meydana gelen %9,313 oranındaki bir kütle kaybı gözlemlenmiştir. Bu fibrin matris yapısında bulunan nemin buharlaşarak uzaklaştığını göstermektedir. Fibrin matris yapısındaki

ikinci kayıp 314,37 °C' de %55 oranında meydana gelmiştir. CaCl₂ ile üretilen plateletten zengin fibrin matrislerin 600°C sıcaklıkta %100 oranında kütle kaybına uğrayarak ardında hiçbir kalıntı bırakmadığı termogravimetrik analiz ile gösterilmiştir.



Şekil 17- Trombin ile üretilen fibrin matrise ait termogram

Trombin ile üretilen fibrin matrise ait termogramda (Şekil 17) fibrin matris yapısında bulunan %2,373 'lik nemin buharlaşarak uzaklaştığı sıcaklık 56,02 °C' dir. Fibrin matris yapısındaki ikinci kayıp 292,14 °C' de %63,121 oranında meydana gelmiştir Trombin ile üretilen plateletten zengin fibrin matrislerin 580,9°C sıcaklıkta %100 oranında kütle kaybına uğrayarak ardında hiçbir kalıntı bırakmadığı termogravimetrik analiz ile gösterilmiştir.

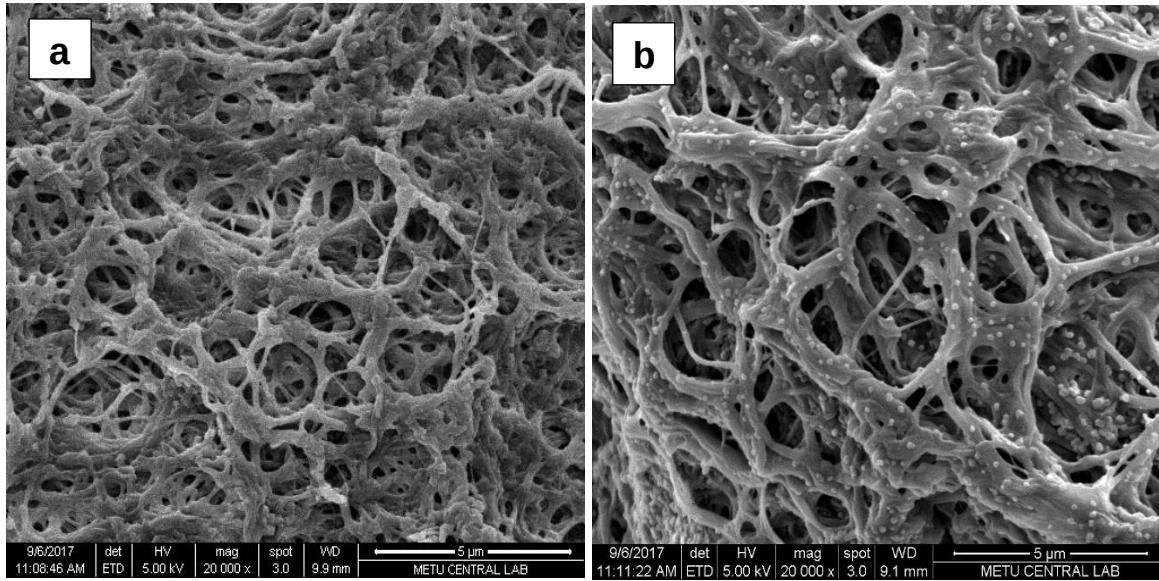
CaCl₂'li fibrin matrisin 314 °C'lik sıcaklıkta %55 lik kütle kaybı yaşadığı ve trombinli fibrin matrisin 292 °C'lik sıcaklıkta %63 lük bir kütle kaybı yaşadığı göz önünde

bulundurulduğunda CaCl_2 'li fibrin matrisin yapısında bulunan çapraz bağlanmaların daha etkili olduğu görülmektedir.

Vedakumari ve ark.'larının fibrin ile yaptıkları termogravimetrik analiz sonuçlarında ilk %8' lik bir kütle kaybının 90-105 °C aralığında, ikinci kütle kaybının ise 215 °C' de %55 oranında olduğu sonucuna ulaşmışlardır [99]. Sonuçlar tez kapsamında yürütülen TGA sonuçlarına yakın olmakla beraber ürettiğimiz matrislerin özellikle de CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisin daha etkili çapraz bağlanmalar yaptığı sonucuna varılmıştır.

4.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

CaCl_2 ve trombin ile üretilen fibrin matrislerin taramalı elektrom mikroskop (SEM) analizleri Şekil 18' de gösterilmiştir. Image J programı kullanılarak yapılan ölçümler sonucu CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisin ortalama gözenek çapı $19,4 \pm 4,74 \mu\text{m}$ olarak, trombin ile üretilen fibrin matrisin ortalama gözenek çapı ise $35 \pm 5,8 \mu\text{m}$ olarak tespit edilmiştir.

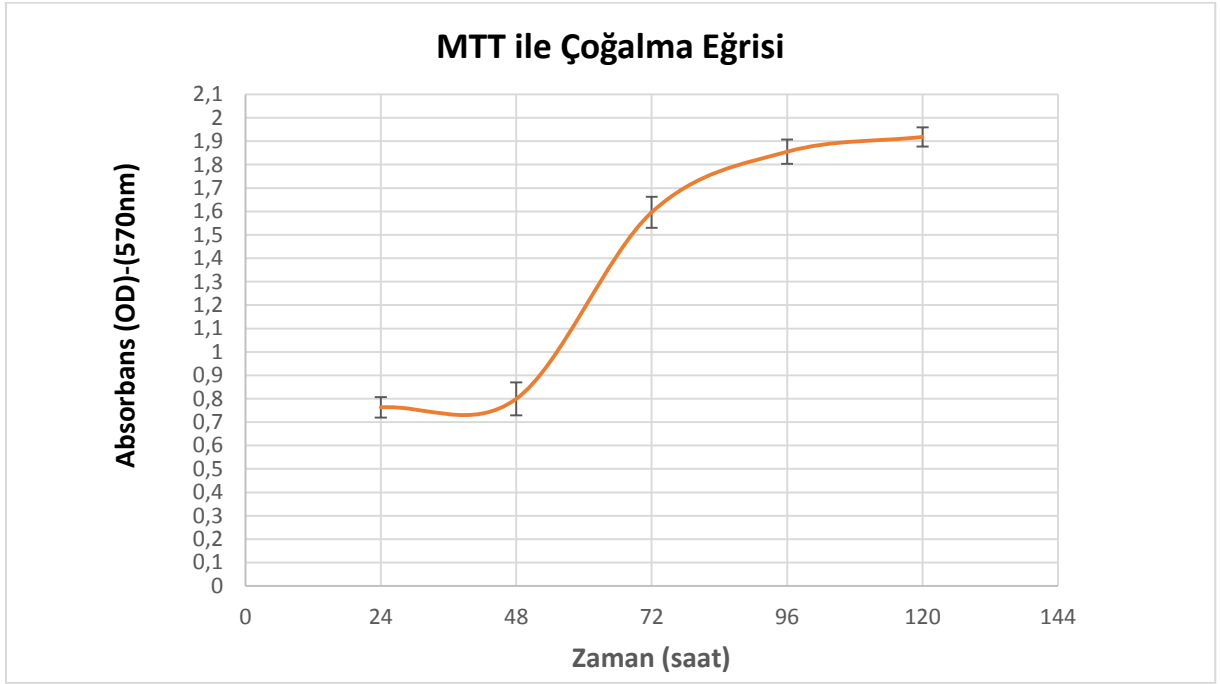


Şekil 18- CaCl_2 (a) ve trombin (b) ile üretilen fibrin doku iskelesinin SEM mikrografları, 20000x

4.3. Hücresel Çalışmalar

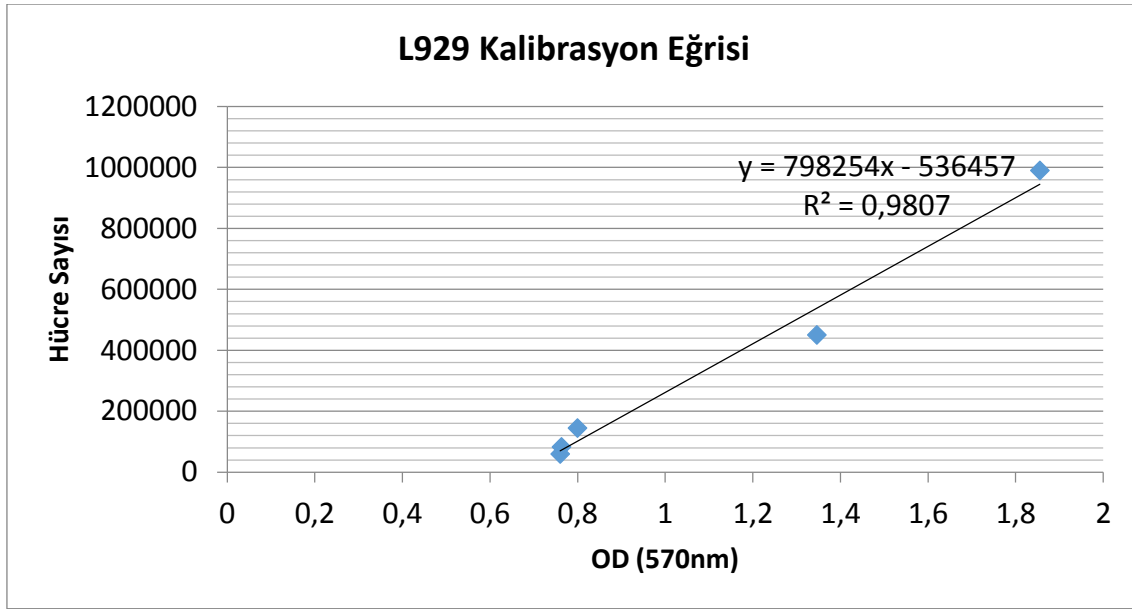
4.3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

Bu bölümde deneysel çalışmalar kapsamında kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı ve yeni doğan sünnet derisinden izole edilen HS27 insan dermal fibroblast hücre hattı için yapılan karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. L929 hücre hattı için çizilen çoğalma eğrisi Şekil 19’ de, HS27 hücre hattı için çizilen çoğalma eğrisi Şekil 22’de gösterilmiştir.

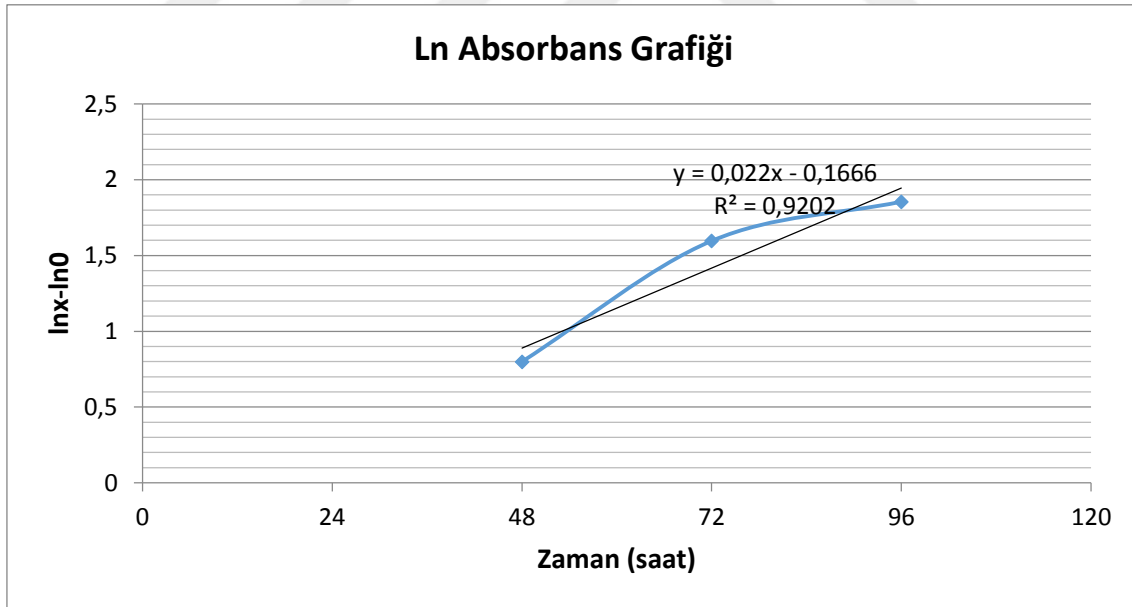


Şekil 19- L929 fare fibroblast hücrelerinin çoğalma eğrisi

L929 fare fibroblast hücrelerin çoğalması incelendiğinde, hücrelerin ikinci ve dördüncü günler arasında üstel üreme fazında (logaritmik faz) oldukları belirlenmiştir. Bu aralıkta çizilen $\ln x - \ln 0$ değerlerinin zamana karşı grafiği (Şekil 21) ile spesifik üreme hızı (μ) ve ikilenme süreleri (t_d) hesaplanmıştır. Çizilen eğrinin eğimi spesifik üreme hızını (μ) vermektedir ve bu değer ile $t_d = (\ln 2 / \mu)$ formülü kullanılarak ikilenme süreleri hesaplanmıştır. Grafik çizimi için gerekli olan $\ln 0$ değeri kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 20) belirli hücre konsantrasyonlarında yapılan MTT analizi sonucunda hücre sayısına karşılık gelen absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur.

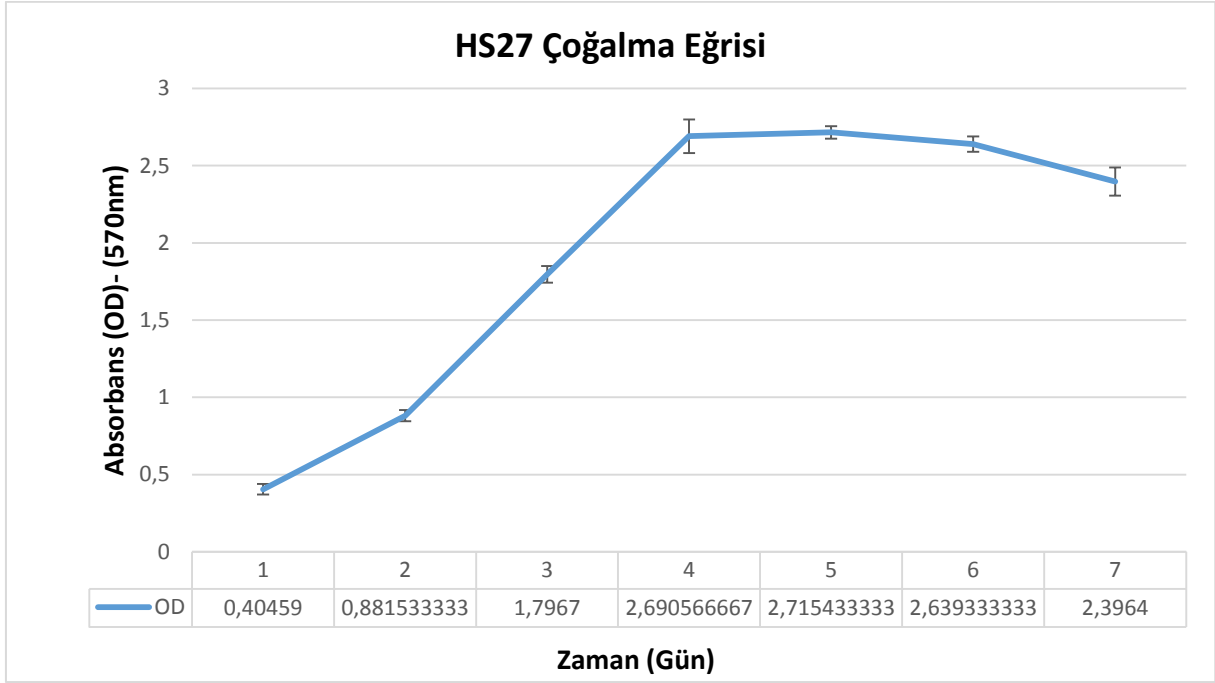


Şekil 20-. L929 fare fibroblast hücre hattı kalibrasyon eğrisi



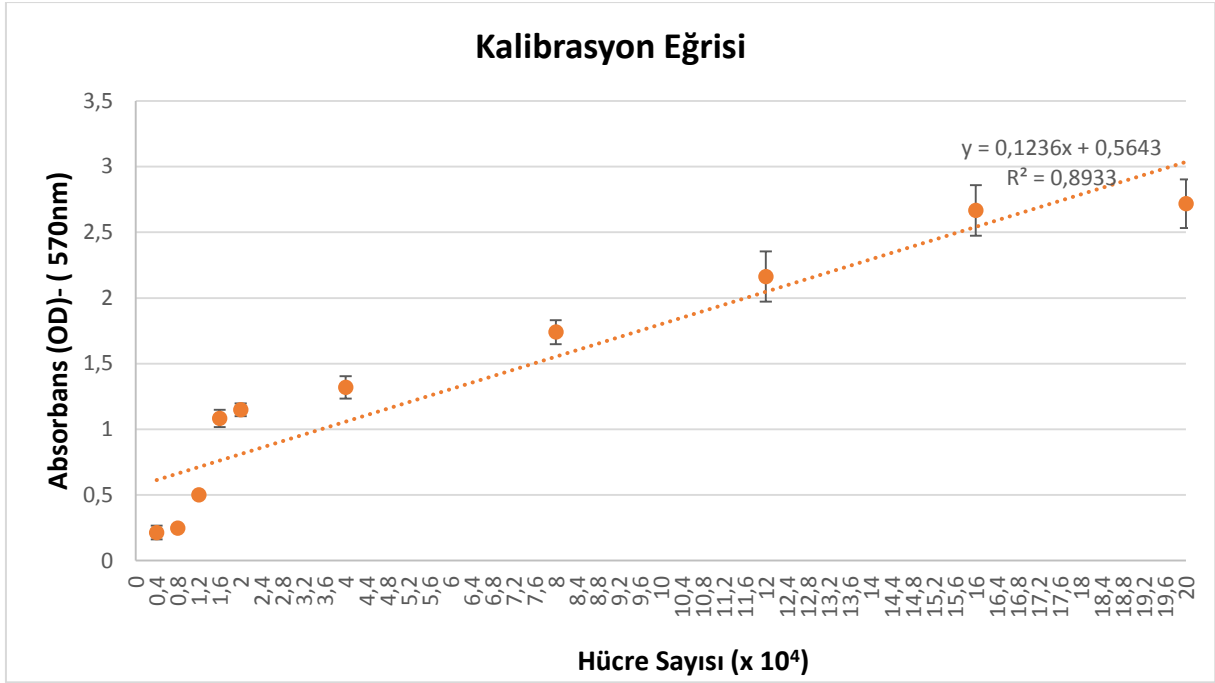
Şekil 21- L929 fare fibroblast hücrelerinin özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan grafik

L929 fare fibroblast hücreleri için spesifik üreme hızı $0,022 \text{ sa}^{-1}$, ikilenme süresi ise $t_d = \ln 2 / 0,022$ işleminden 31,5 saat olarak tespit edilmiştir.

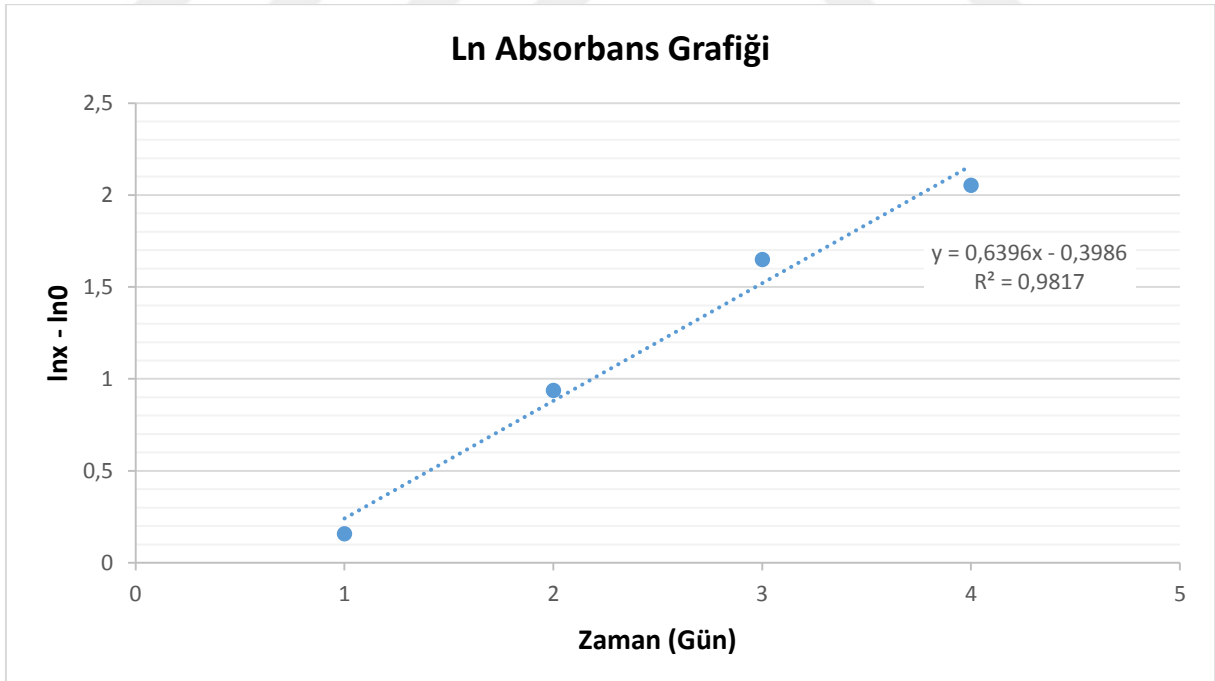


Şekil 22- HS27 insan fibroblast hücrelerinin çoğalma eğrisi

HS27 insan fibroblast hücre çoğalma eğrisi sonucunda, hücrelerin birinci ve dördüncü günler arasında üstel üreme fazında (logaritmik faz) oldukları belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinden (Şekil 23) de faydalanılarak bu aralıkta çizilen $\ln x - \ln 0$ değerlerinin zamana karşı grafiği (Şekil 24) ile spesifik üreme hızı (μ) ve ikilenme süreleri (t_d) hesaplanmıştır.



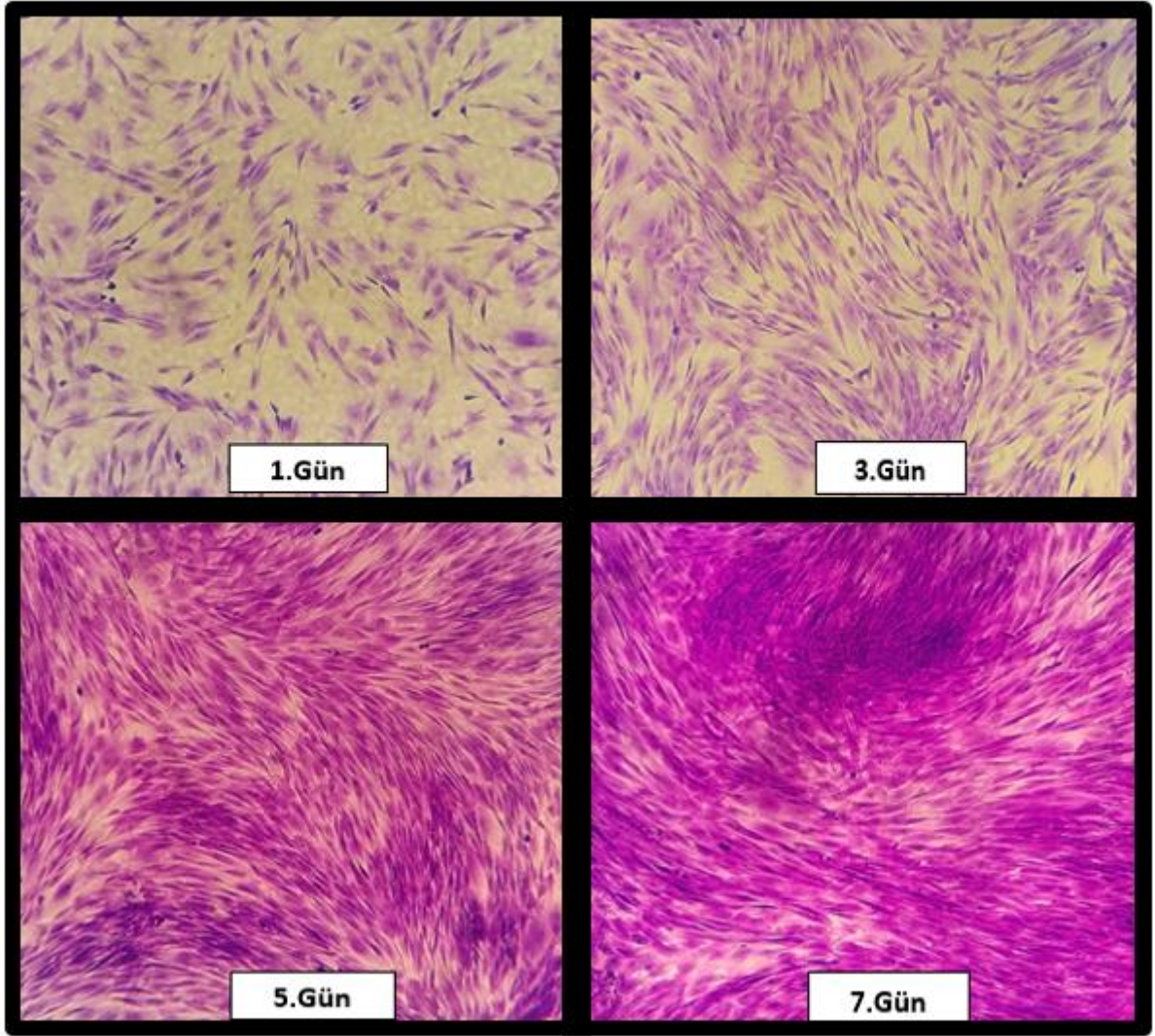
Şekil 23- HS27 insan fibroblast hücre hattı kalibrasyon eğrisi



Şekil 24- HS27 insan fibroblast hücrelerinin özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan grafik

HS27 insan fibroblast hücreleri için spesifik üreme hızı $0,6396 \text{ gün}^{-1}$ dır. İkilenme süresi $t_d = \ln 2 / 0.6396$ işleminden 1,084 gün, saat olarak hesaplandığında $1,084 \times 24$ işleminden 26 saat olarak tespit edilmiştir.

HS27 hücrelerinin kültürüne ait 1, 3, 5. ve 7. günlerdeki iğsi, fibroblastik morfolojisi ve çoğalma eğrisiyle de uyumlu olan hücre yoğunluğu Şekil 25' deki kristal viyole boyama mikrograflarıyla gösterilmiştir.

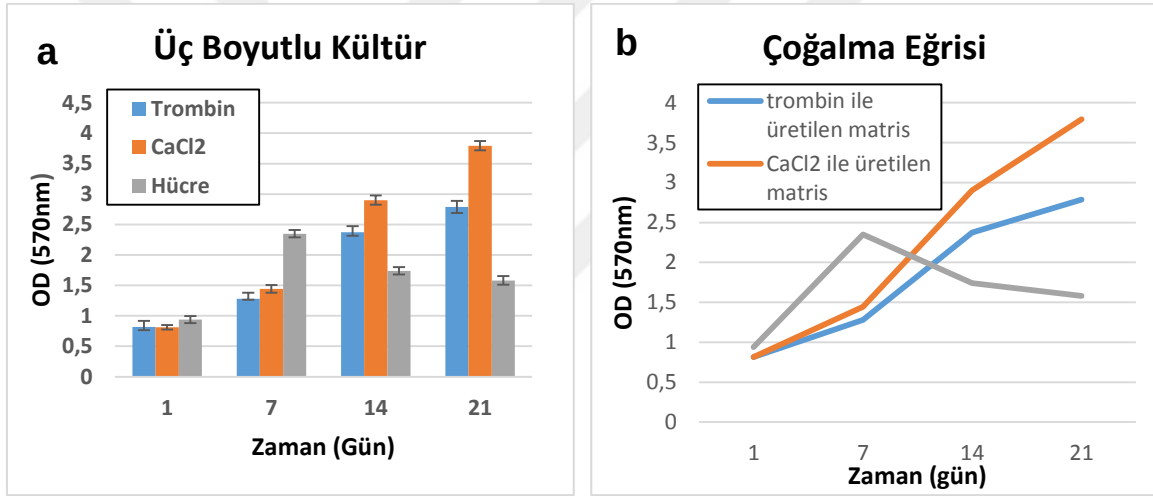


Şekil 25- Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HS27 hücrelerine ait kristal viyole boyama mikrografları, 5. pasaj, 200X

4.3.2. Fibrin Matrisler ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları

4.3.2.1. MTT Analiz Sonuçları

80mM CaCl₂ ve trombin ile hazırlanan plateletten zengin fibrin matrisler içerisinde insan fibroblast hücre hattının (HS27) 21 günlük kültürü gerçekleştirilmiş ve 7 günde bir hücrelerin üç boyutlu bu matrisler içerisindeki mitokondriyal aktiviteleri incelenerek (MTT analizi) matrisleri doku iskelesi olarak kullanılma potansiyellerine bakılmıştır. Üç paralel örnek çalışılan matrislerin değerlendirilmesinde kontrol grubu olarak yine üç örnek paralel çalışılan direkt hücre kültür kaplarına ekilen hücreler kullanılmıştır. Matris içerisine ve direkt hücre kültür kabı yüzeyine ekilen hücre miktarı $1 \times 10^6/\text{ml}$ 'dir.



Şekil 26- Trombinli ve CaCl₂ ile üretilen fibrin matrisler içerisindeki hücre kültürleri ile kontrol olarak direkt hücre kültür kaplarına ekilen hücrelerin çoğalma grafikleri

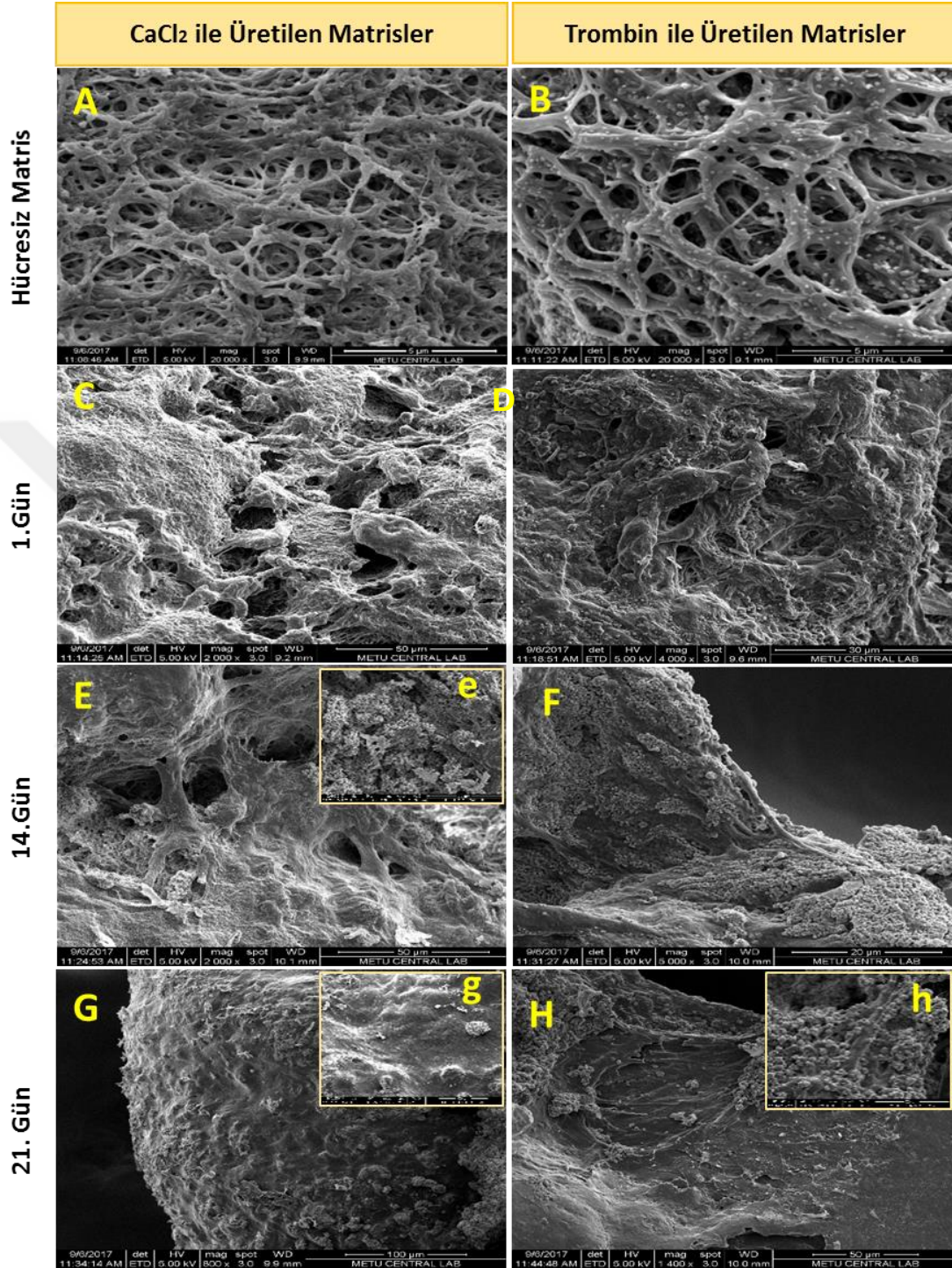
MTT sonuçlarının günlere göre karşılaştırılmalı grafiği (a) ve MTT sonuçları ile elde edilen çoğalma eğrileri (b) gösterilmiştir.

Hücreler direkt olarak hücre kültür kaplarına ekildiklerinde genellikle “S” şeklinde bir çoğalma eğrisi gösterirler [104]. Matrisler içerisinde hücre çoğalma eğrilerinin “S” şeklinde olmaması fibrin matrislerin hücre sel uyumluluk açısından oldukça iyi bir özeliğe sahip olduğunu göstermektedir [83]. Direkt hücre kültür kabına ekilen hücrelerin iki boyutlu kültür için sayıca fazla (1×10^6) ve yüzey alanlarının üç boyutlu kültürlerle kıyasla oldukça sınırlı olması sebebi ile ilerleyen günlerde kontakt inhibisyona uğrayarak sayılarında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Üç boyutlu kültürlerin ise

proliferasyon için daha geniş alana sahip olması; hücrelerin kontakt inhibisyona uğramadan, durgunluk fazına girmeden çoğalmaya devam etmesine imkan tanımaktadır. Ayrıca fibrin matrislerin, plazmadan gelen çoğalma faktörleri gibi aktif içerikleri de hücre proliferasyonunu arttırmıştır [105]. SEM analizi sonuçlarındaki hücrelerin matris yüzeylerine tutunup zamanla çoğaldıkları göz önünde bulundurulduğunda her iki matrisin de hücreler için uygun bir ortam oluşturduğu görülmüştür. Ancak, CaCl_2 ile üretilen matriste hücre canlılığının daha yüksek olması, bu matrisin trombinli matrise göre hücre kültür ortamında daha az çözülmesi gibi nedenlerle hücrelerin etkilenebileceğini düşünölmüştür. İstatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında p değeri 0,002 olarak belirlenmiş ve iki matris arasında kuvvetli bir fark bulunmuştur.

4.3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları

Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan incelemelere ait mikrograflar Şekil 27' de gösterilmiştir. HS27 insan fibroblast hücreleri trombin ile ve CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisler içerisinde 21 gün boyunca kültür edilmiştir. 1, 14 ve 21. günlere ait örnekler ile hücresiz matrislerin taramalı elektron mikroskop incelemeleri yapılmıştır. Analiz sonucunda üretilen fibrin matrisler içerisinde gömülen hücrelerin 1. günde yüzeye tutunmaya başladıkları görülürken 14. günde yüzeye iyice tutunup yayılan bir morfoloji göstererek çoğaldıkları, 21. günde ise fibrin yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde çoğaldıkları gözlemlenmiştir. Bu durum iki fibrin matrisin de hücreler için uygun yüzeyler oluşturduklarını göstermektedir. Zhao ve arkadaşlarının fibrin matrisler ile yapmış oldukları 11 günlük fibroblast kültürü çalışmalarında da SEM analizinin ilk günlerine ait görüntülerde hücrelerin neredeyse küre şeklinde, ilerleyen günlerde ise iyi bir yayılım morfolojisi gösterdikleri belirtilmiştir [83].

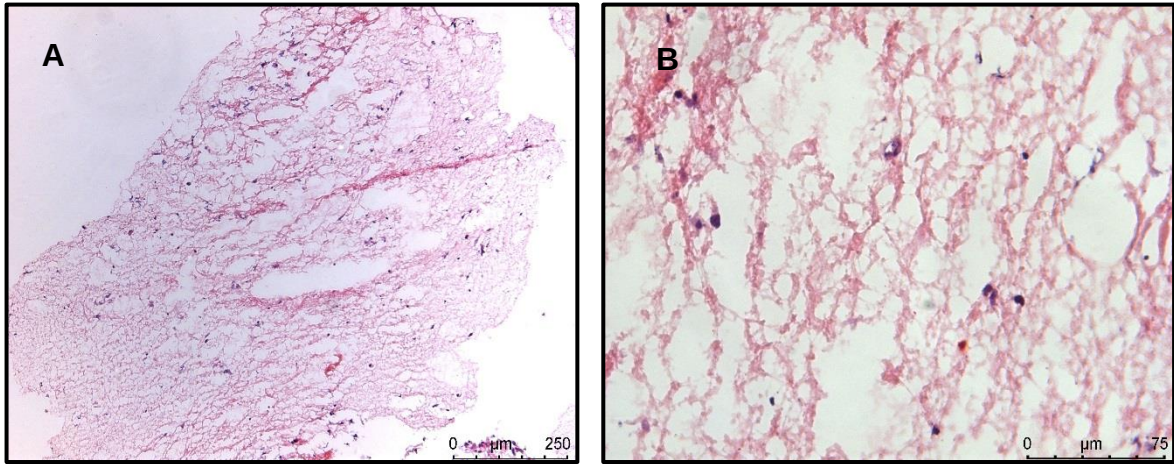


Şekil 27- CaCl₂ ile ve trombin ile üretilen fibrin matrisler içerisinde kültüre alınan HS27 hücrelerinin SEM mikrografları

Hücresiz matrisler: A ve B (20000x), 1. gün: C (2000x) ve D (4000x), 14. gün: E (2000x), e (4000x) ve F (5000x), 21. gün G (800x), g (1600x), H (1400x) ve h (6000x).

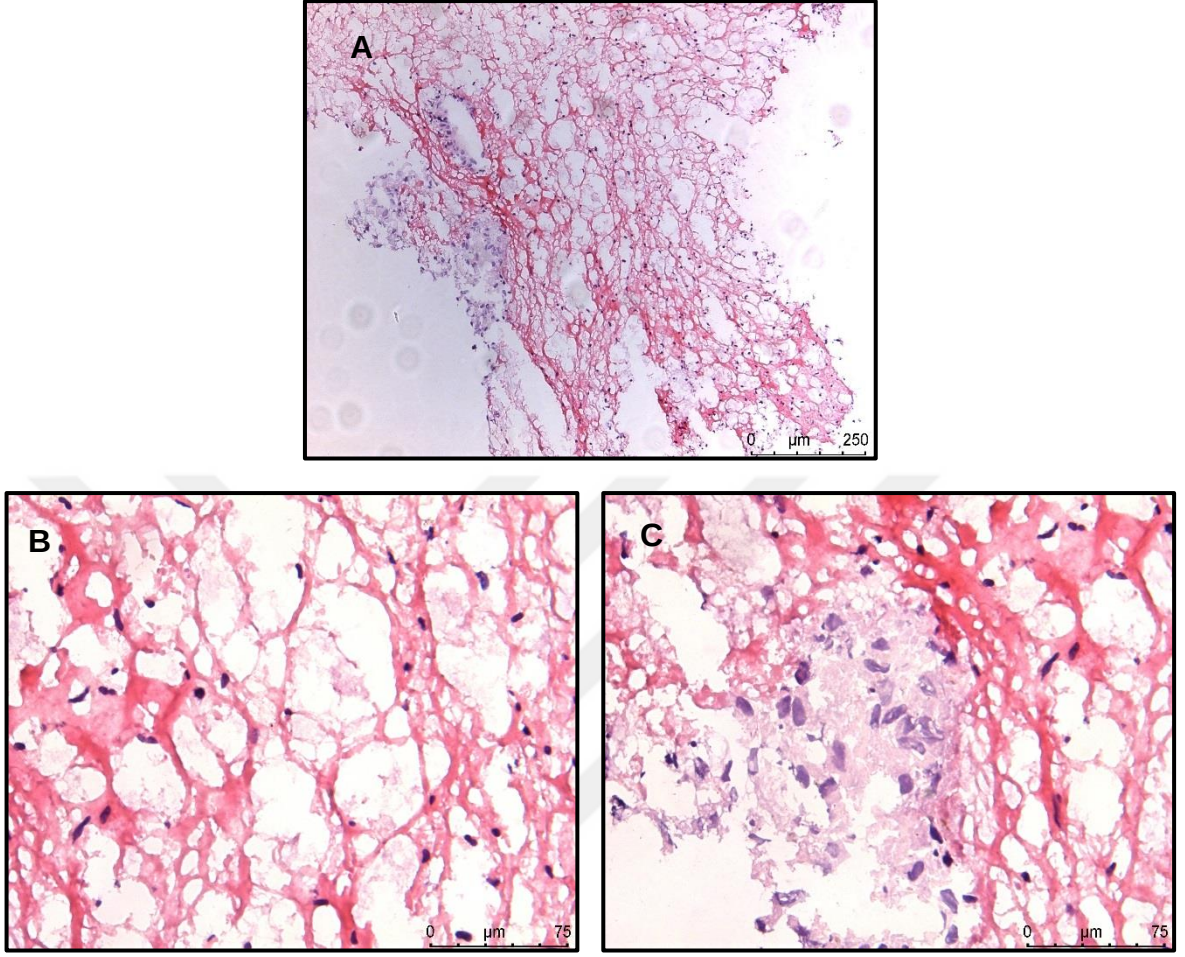
4.3.2.3. Histolojik İncelemeler

Trombin ile ve CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisler içersine gömülen ve 21 gün boyunca kültürleri yapılan HS27 insan fibroblast hücrelerinin 1, 14 ve 21. günlere ait histolojik ve immünfloresan boyamaları yapılmıştır. Hücreli matrislere ek olarak hücresiz matrisler de kontrol grubu olarak boyamalara dahil edilmiştir. CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisler ışık mikroskobu altında incelendiğinde fibrin matris arasında fibroblast hücrelerine ait içsi çekirdekler izlenmiştir. 1' inci güne ait örneklerde hücrelerin matrisi oluşturan fibrin lifleri aralarına yaygın olarak dağıldığı saptanmıştır. 14 ve 21' inci güne ait örneklerde hücre sayısının arttığı izlenmiştir. Yine 14 ve 21' inci güne ait örneklerde matrisin dış tarafında hücrelerin sitoplazmalarının birbirleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Matrisin iç tarafında fibrin lifleri arasında gözenekler içinde yerleşmiş ökromatik içsi çekirdekli fibroblastlar izlenmiştir. Bu örneklerde dış tarafta yerleşen fibroblastların çekirdeklerinin heterokromatik (aktif) ve daha büyük ve hücrelerin de daha iri olduğu saptanmıştır. Floresan işaretlemelerde matrisde kollajen lif işaretlenmesi gözlenmemiştir.



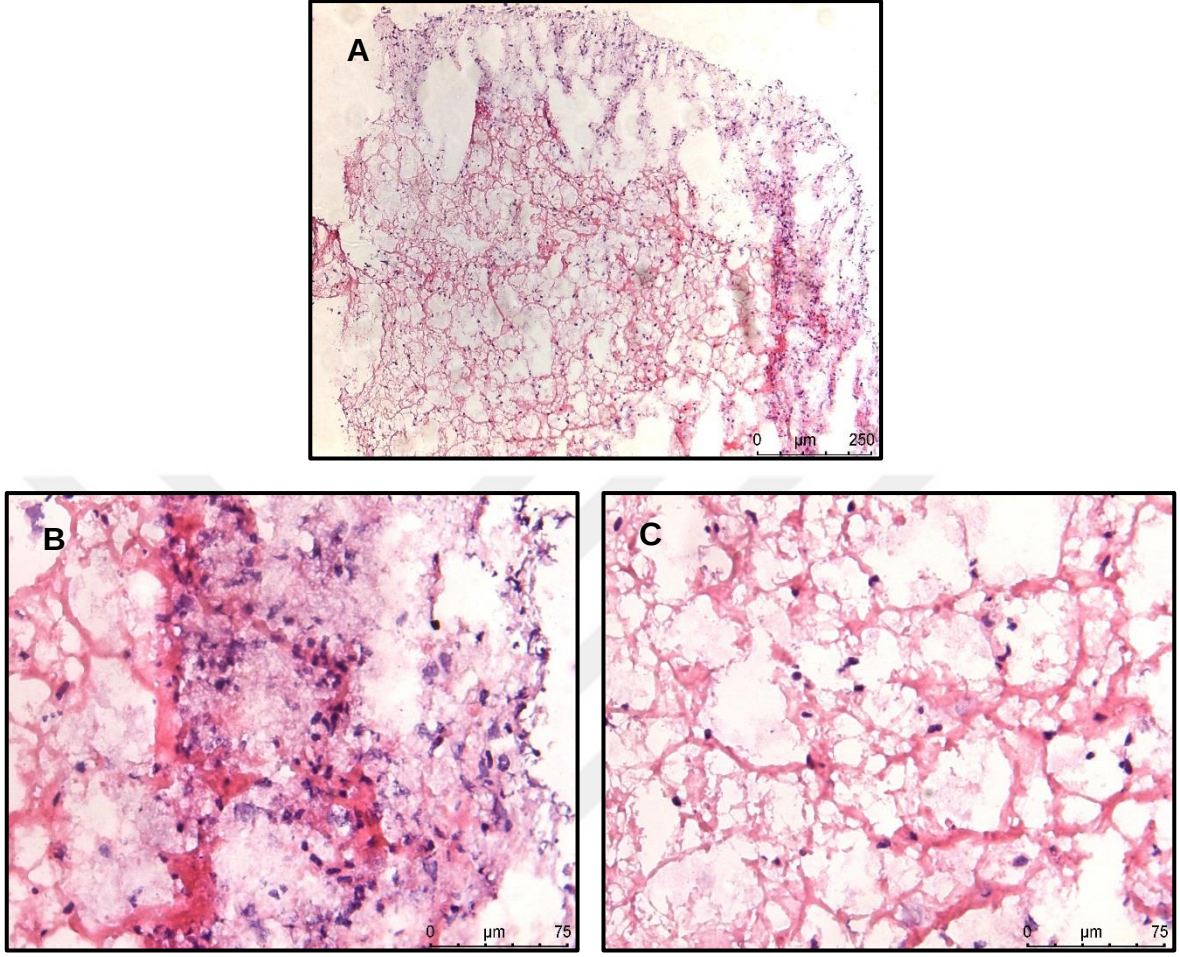
Şekil 28 - CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 1. gününe ait ışık mikrografları

(Hematoksilen-eosin, A: X100, B: X400)



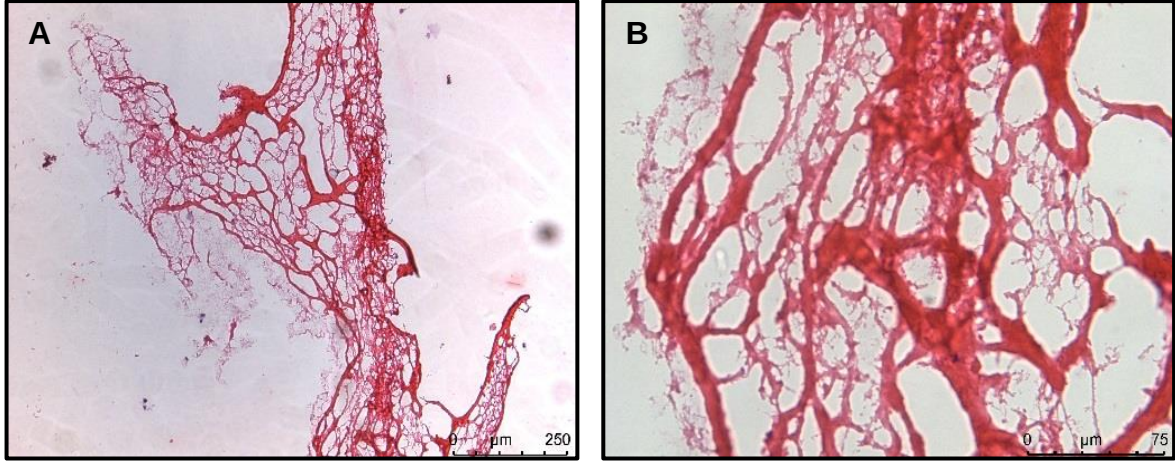
Şekil 29 - CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 14. güne ait ışık mikrografları

(Hematoksilen-eosin, A: X100, B, C: X400)

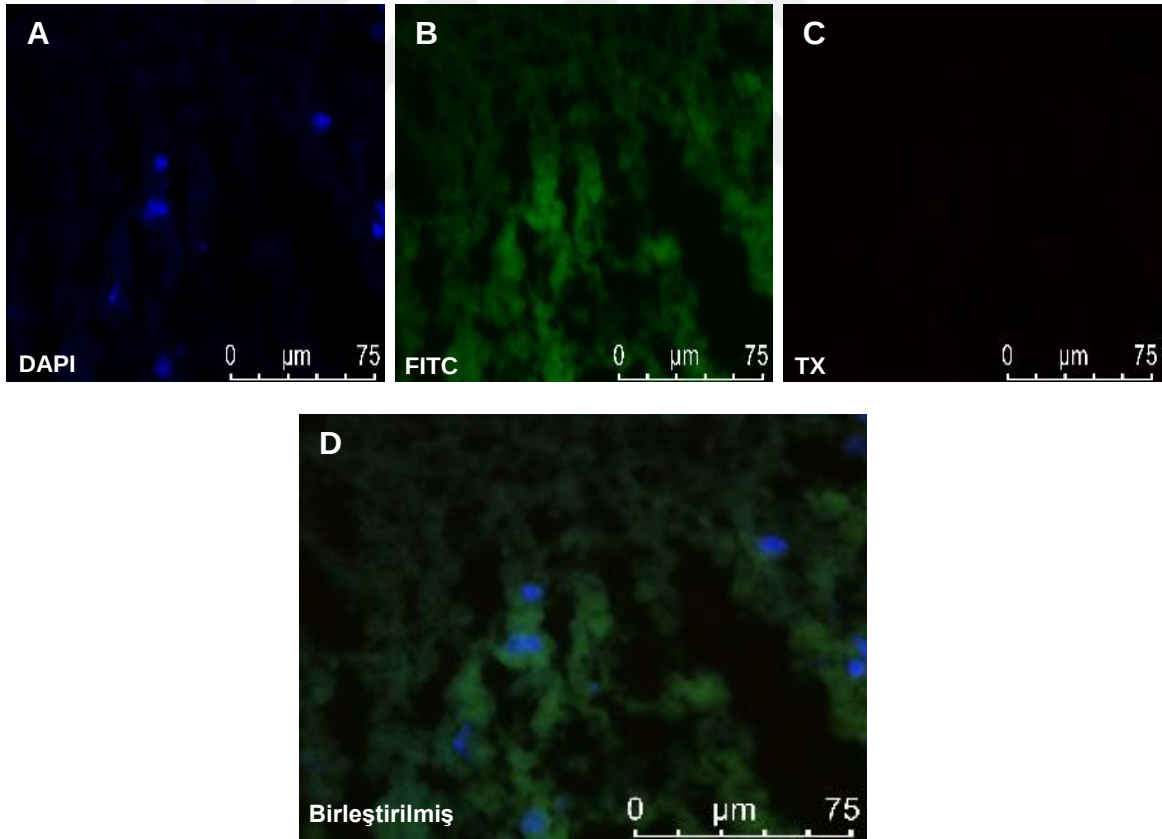


Şekil 30- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait ışık mikrografları

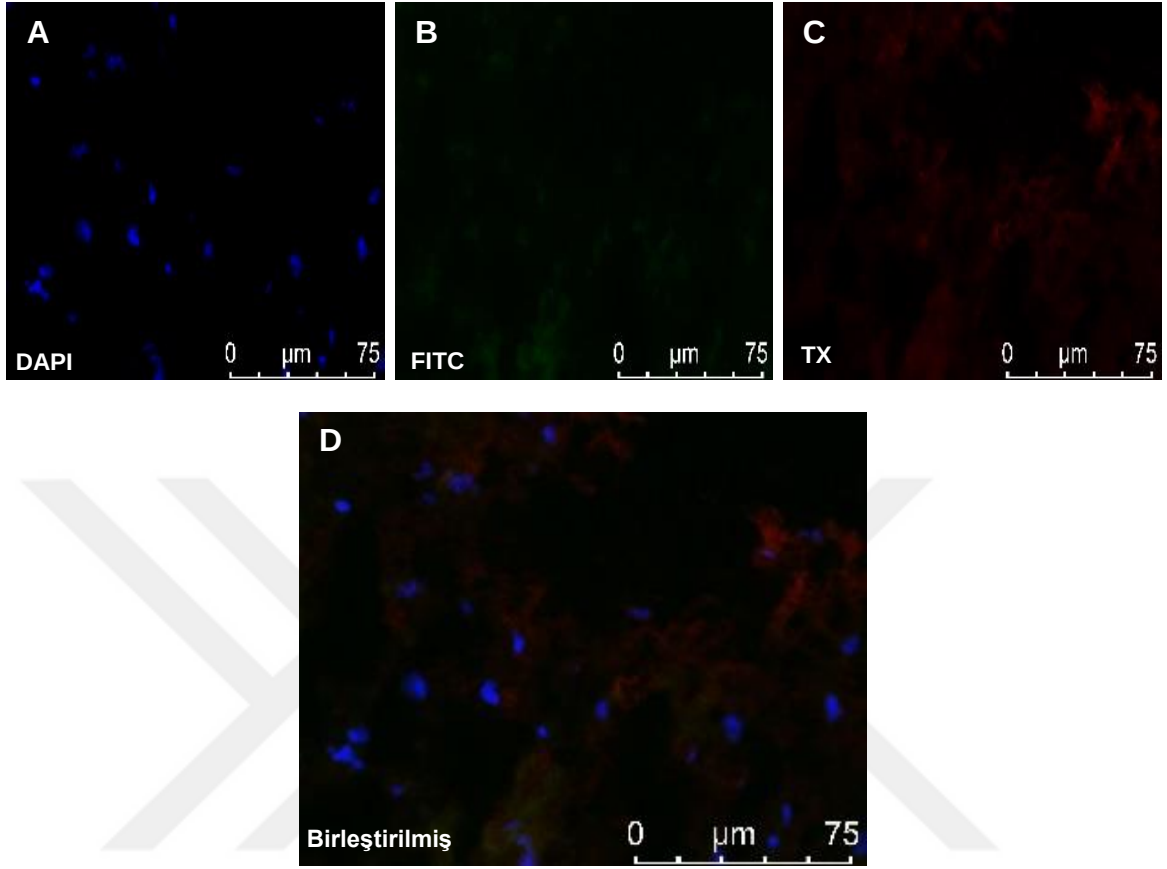
(Hematoksilen-eosin, A: X100, B, C: X400)



Şekil 31- Hücre eklenmeyen CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin ışık mikrografları
(Hematoksilen-eosin, A: X100, B: X400)

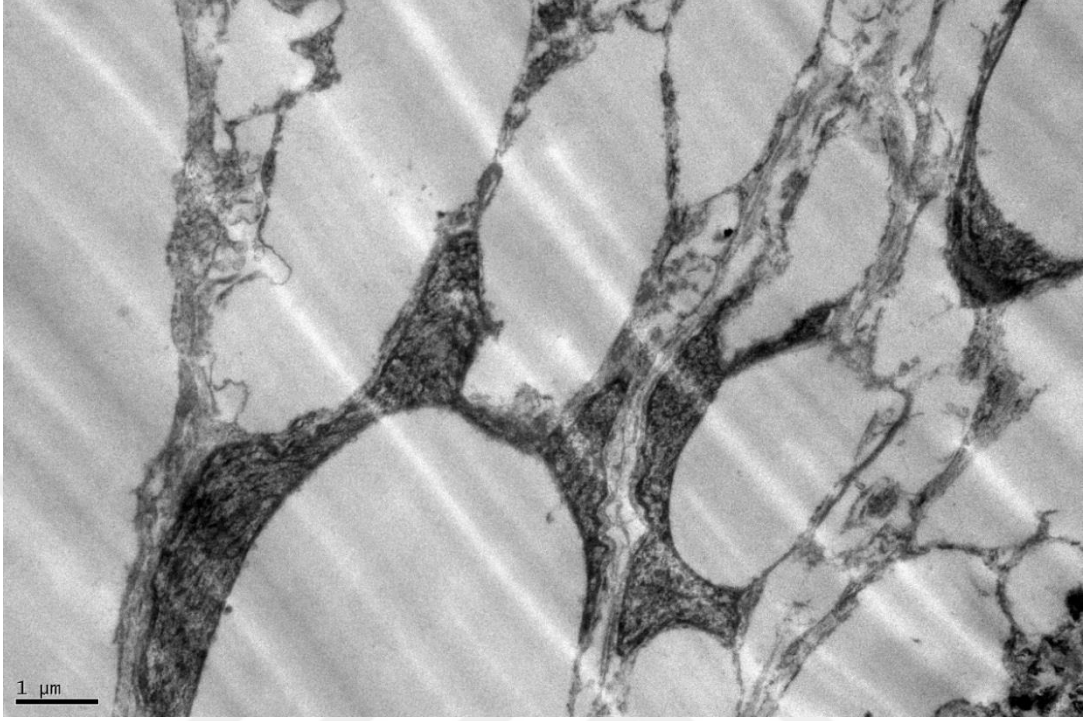


Şekil 32- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 1. güne ait floresan mikrografları
(Kollajen I ve kollajen III, Indirekt immunfloresan, A: DAPI, B: FITC, C: Texas Red, D: Birleştirilmiş görüntü X 630)

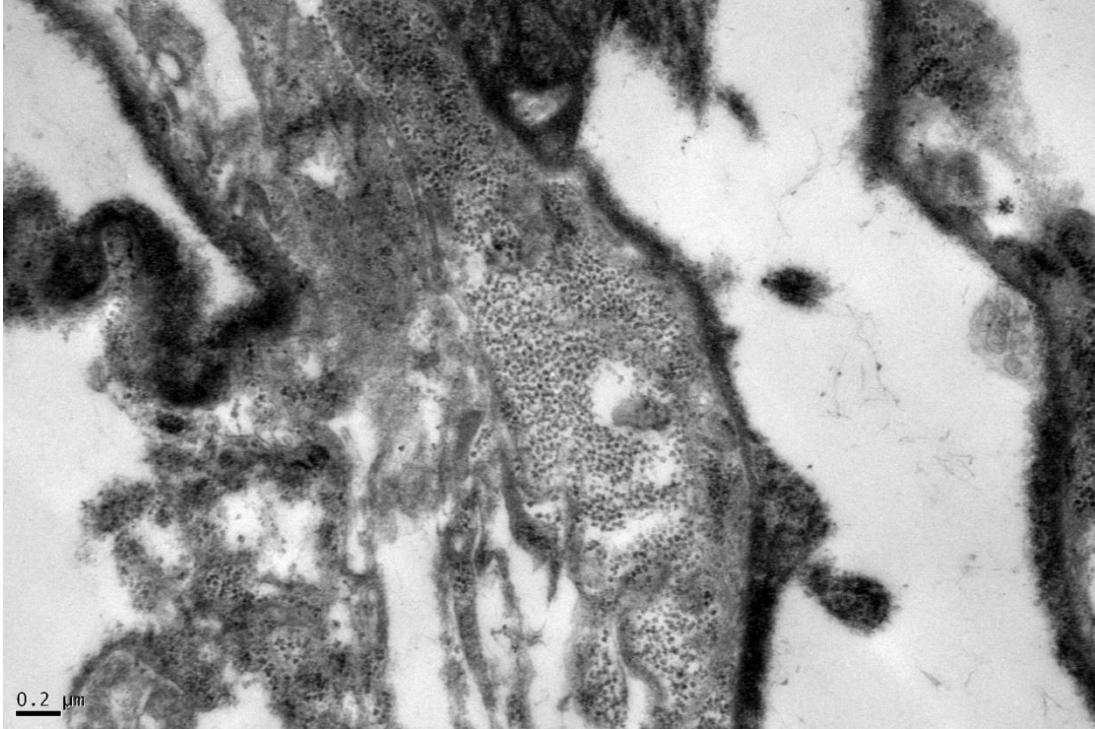


Şekil 33- CaCl_2 ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait floresan mikrografları
Kollajen I ve kollajen III, Indirekt immünfloresan, A: DAPI, B: FITC, C: Texas Red,
D: Birleştirilmiş görüntü X 630)

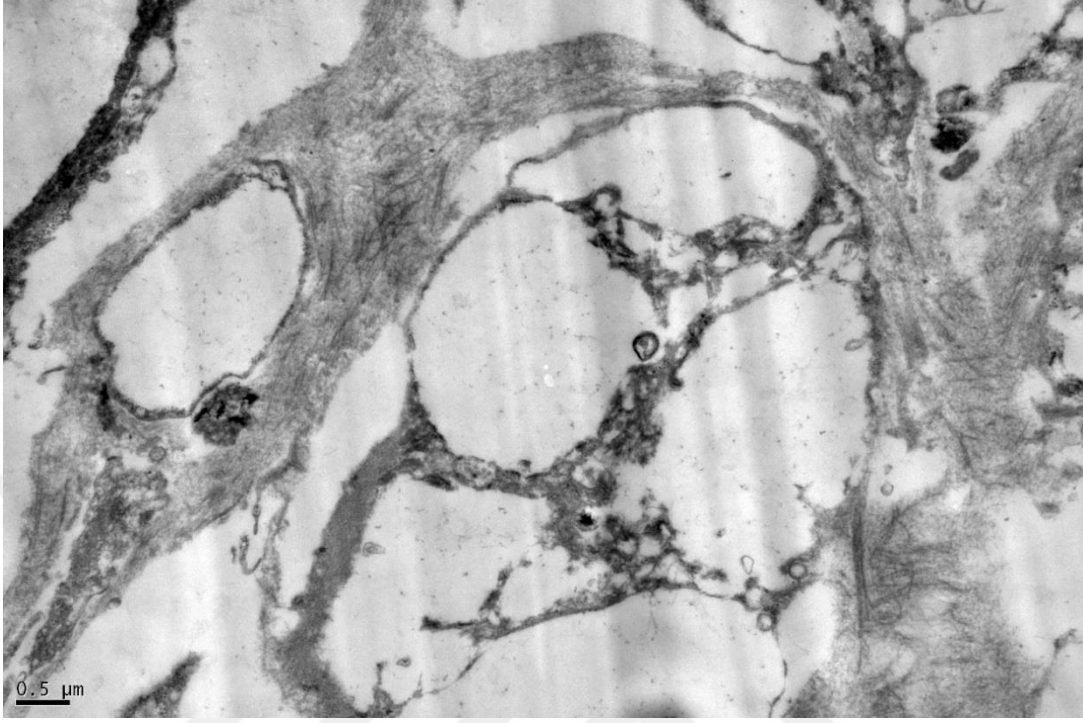
CaCl_2 ile üretilen PZFM' ler içerisinde 21 gün boyunca kültür edilen örneklerin TEM incelemeleri incelenmesinde oluşturulan fibrin liflerin tüm alanda aynı kalınlıkta olduğu görülmüştür. Fibrin matris gözeneklerinde fibroblast hücreleri gözlenmiştir(Şekil 34). Fibroblast hücrelerinin çekirdeklerini ince bir sitoplazma ile çevrili olduğu ve trombin ile oluşturulan PZFM'ye göre hücrelerin daha sağlıklı olduğu görülmüştür. Örneğin dış kısmına yerleşen hücrelerin sitoplazmasının glikojenden zengin olduğu izlenmiştir(Şekil 35). Ayrıca Fibroblast hücreleri etrafında kollajen liflerine rastlanmıştır(Şekil 36, Şekil 37).



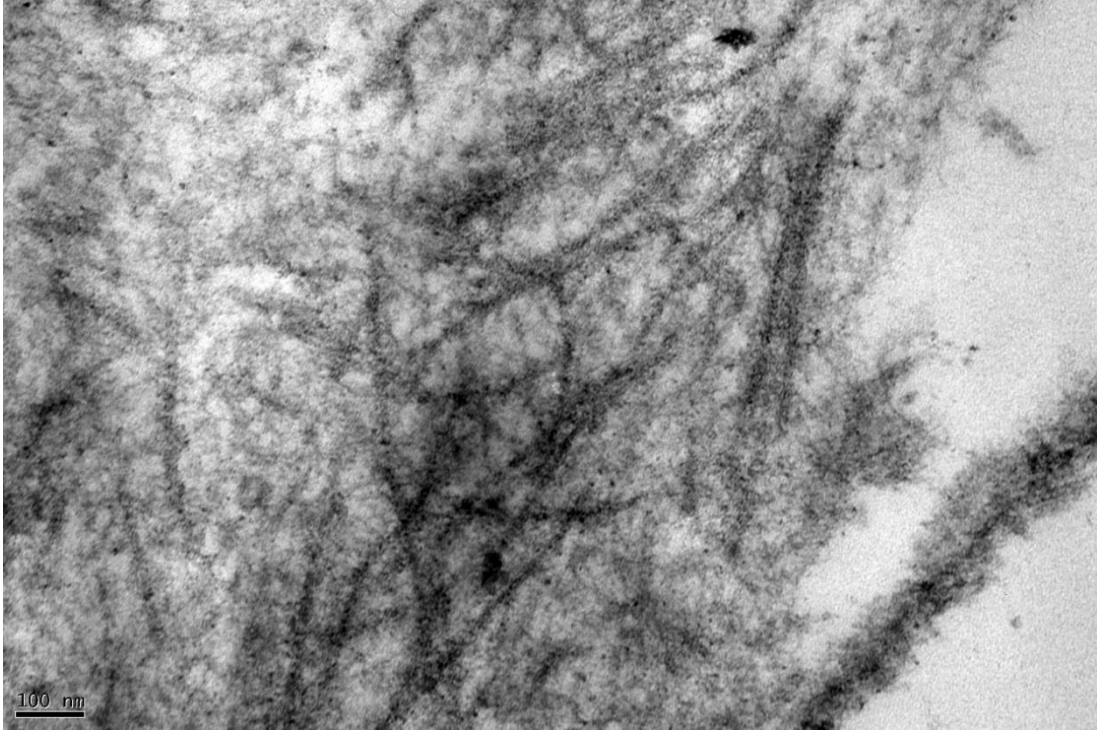
Şekil 34- CaCl_2 ile oluşturulan PZFM' nin gözeneklerine tutunmuş fibroblast hücreleri
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X 15 000)



Şekil 35- Fibroblast hücresinde sitoplazmada glikojen tanecikleri
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X 40 000)

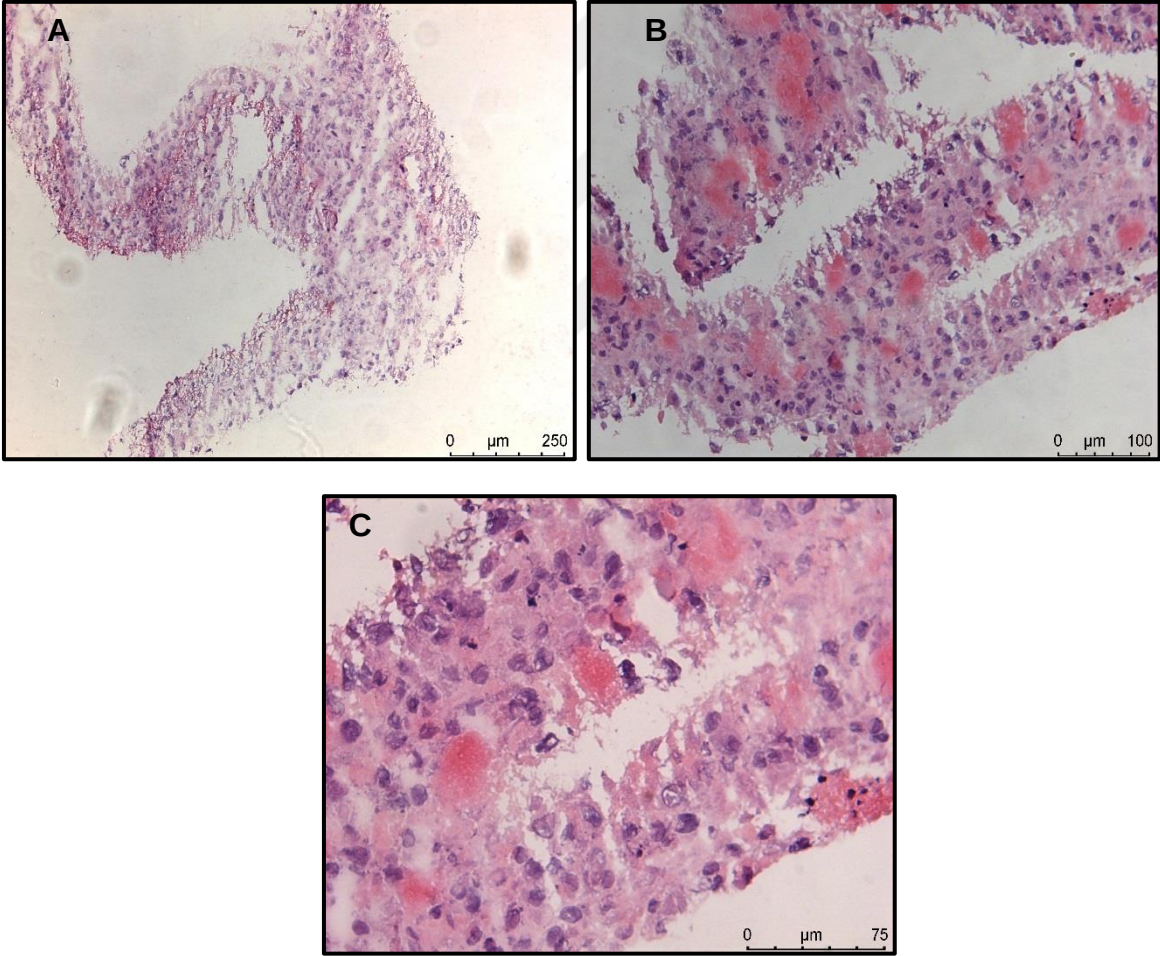


Şekil 36- CaCl_2 'li PZFM içinde kollajen lifler
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X 20 000)

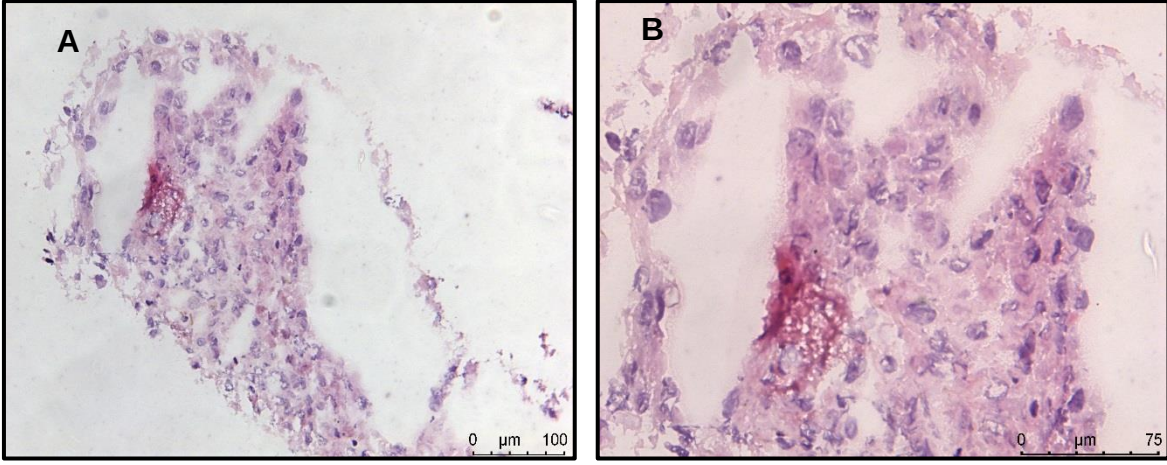


Şekil 37-Daha büyük büyütmede çizgilenme ile kollajen lifler
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X120 000)

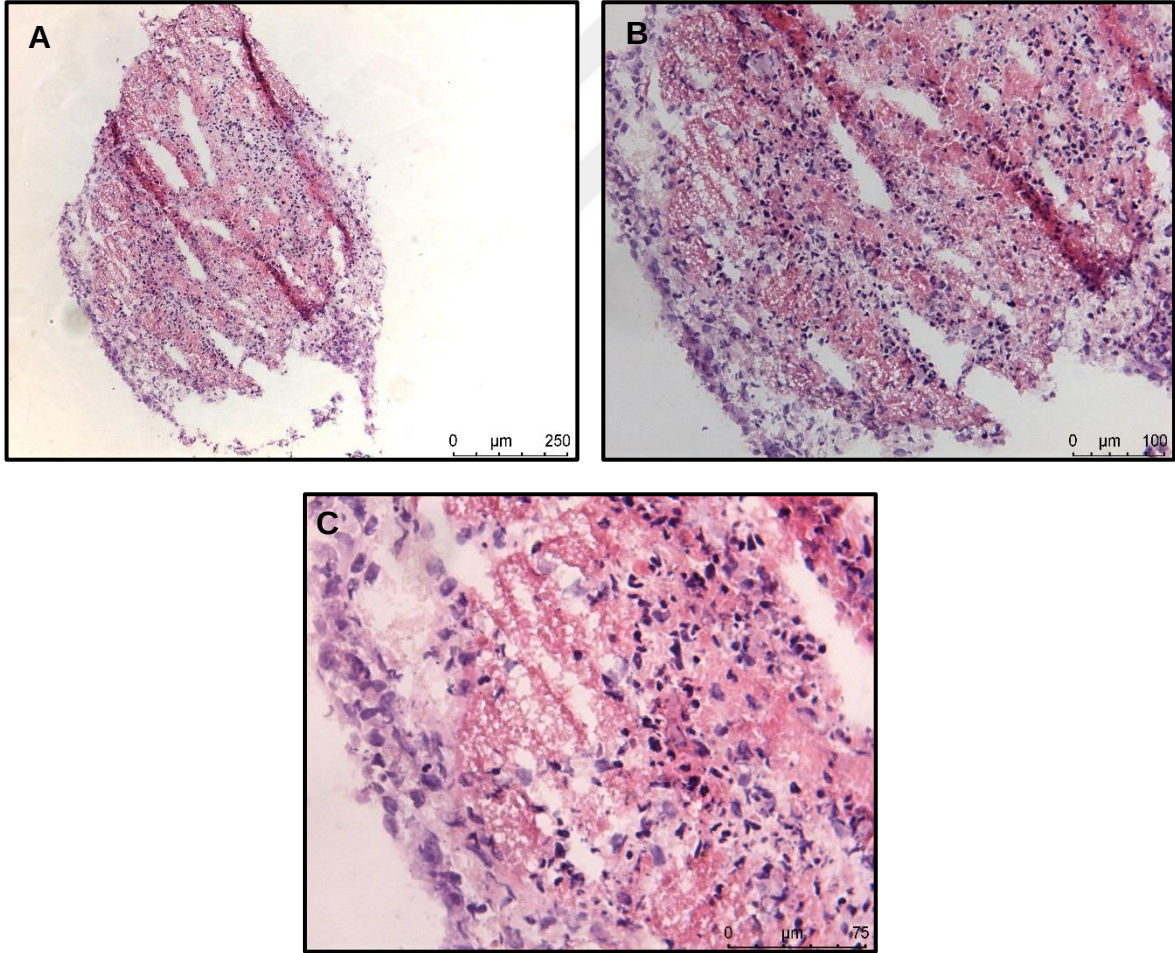
Trombin ile elde edilen fibrin matrisler ışık mikroskobu altında incelendiğinde fibrin matris arasında fibroblast hücrelerine ait ökromatik iri çekirdekler izlenmiştir. 1. güne ait örneklerde hücrelerin matriste yaygın olarak dağıldığı saptanmıştır. Tüm örneklerde hücreler birbirine çok yakın yerleşmiş olarak izlenmiştir. 14 ve 21' inci güne ait örneklerde hücre sayısının arttığı izlenmiştir. 21' inci güne ait örneklerde matrisin iç tarafında ökromatik içsi küçük çekirdekli fibroblastlar izlenmiştir. Trombin ile elde edilen örneklerde heterokromatik ve büyük çekirdekli aktif fibroblastlar daha yoğun olarak görülmüştür. Floresan işaretlemelerde matriste kollajen lif işaretlenmesi gözlenmemiştir.



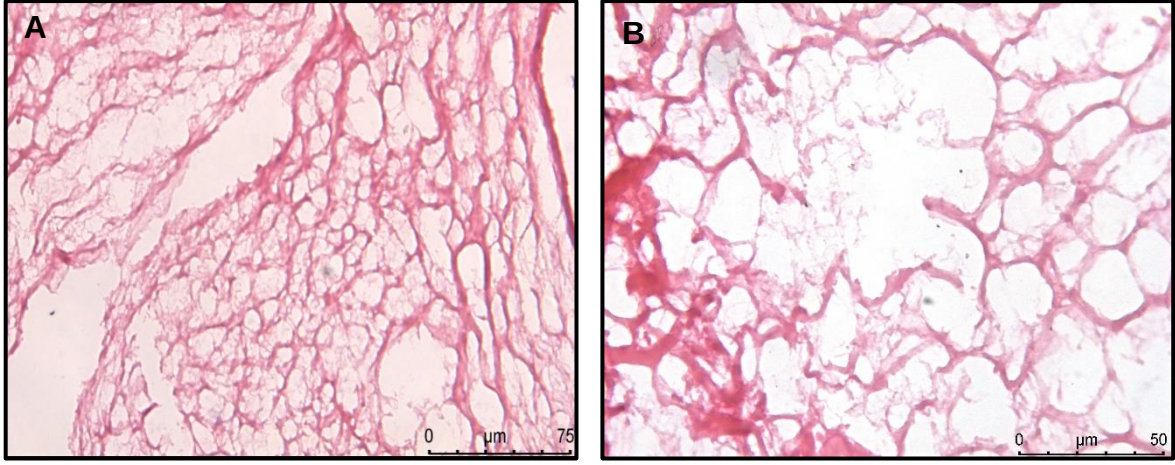
Şekil 38- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 1. gününe ait ışık mikrografları
(Hematoksilen-eosin, A: X100, B: X200, C:X400)



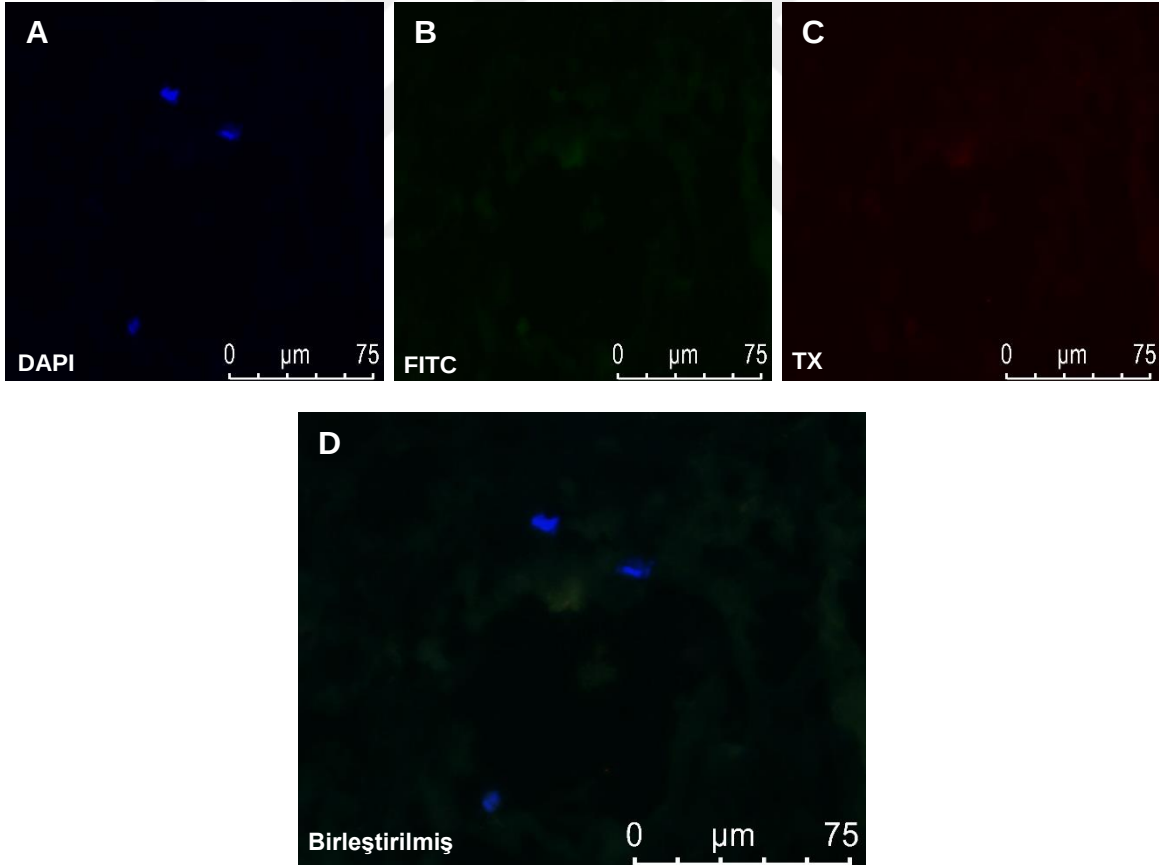
Şekil 39- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 14. güne ait ışık mikrografları
(Hematoksilen-eosin, A: X200, B, C: X400)



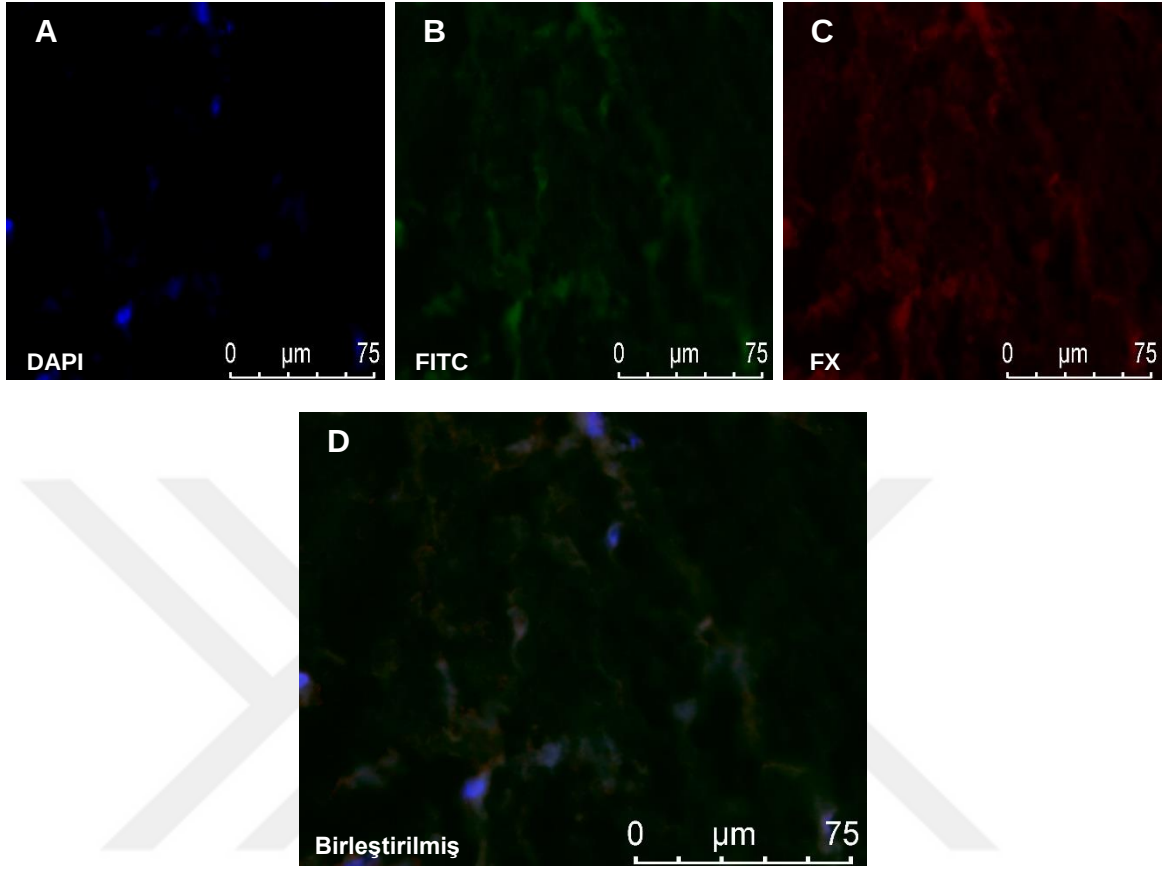
Şekil 40- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait ışık mikrografları
(Hematoksilen-eosin, A: X100, B: X200, C: X400)



Şekil 41- Hücre eklenmeyen trombin ile elde edilen fibrin matrisin ışık mikrografları
(Hematoksilen-eosin, A: X400, B: X630)



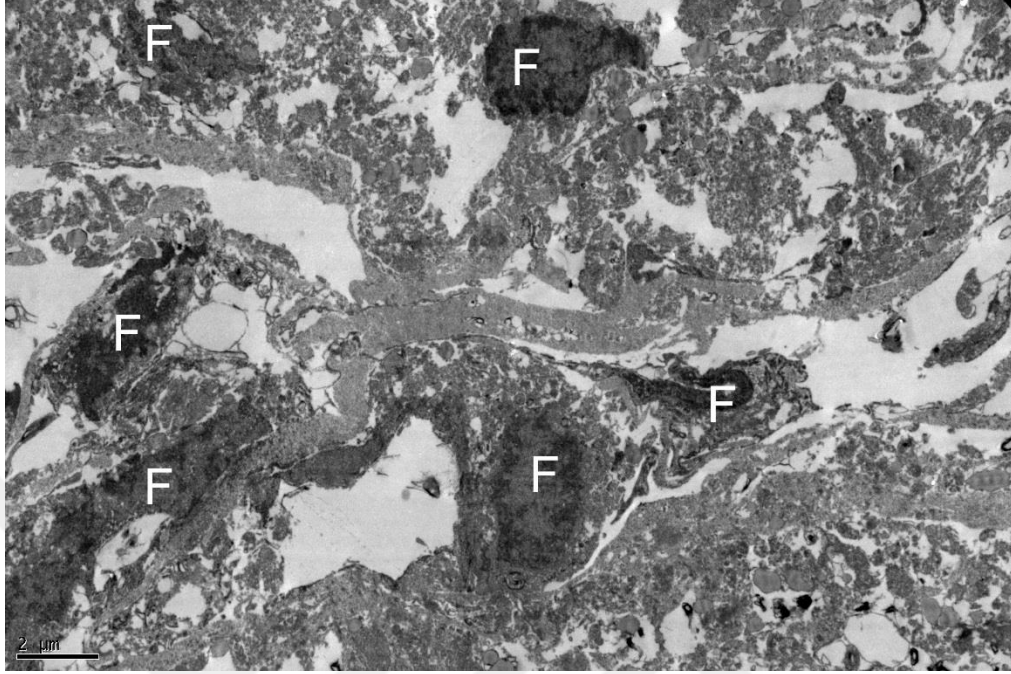
Şekil 42- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 1. güne ait floresan mikrografları
(Kollajen I ve kollajen III, Indirekt immunfloresan, A: DAPI, B: FITC, C: Texas Red, D: Birleştirilmiş görüntü X 630)



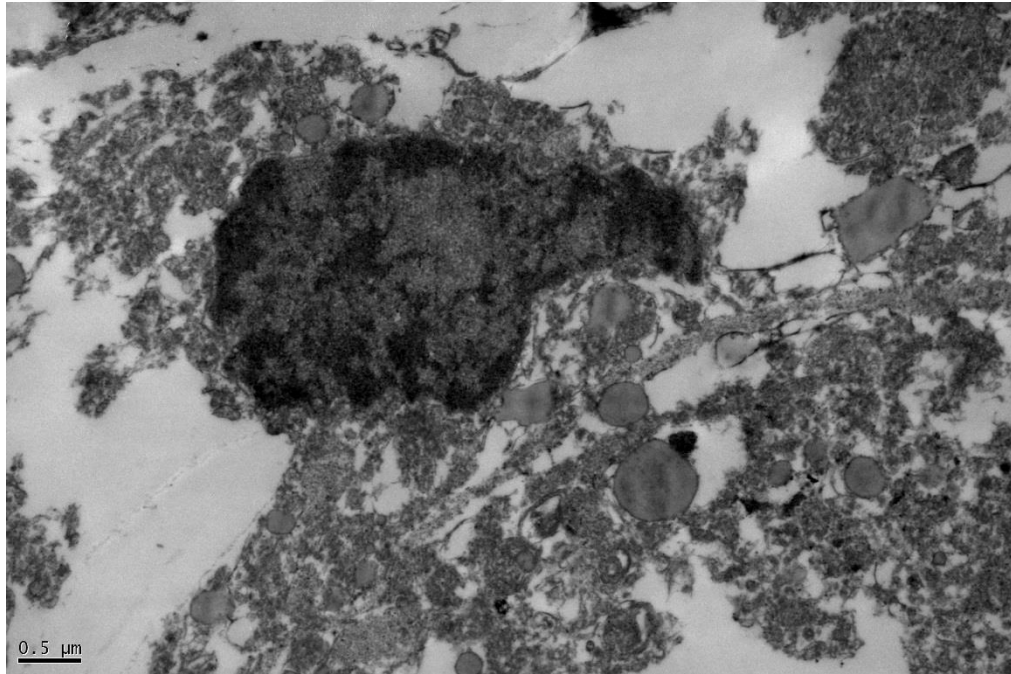
Şekil 43- Trombin ile elde edilen fibrin matrisin 21. güne ait floresan mikrografları

(Kollajen I ve kollajen III, Indirekt immünfloresan, A: DAPI, B: FITC, C: Texas Red, D: Birleştirilmiş görüntü X 630)

Trombinli PZFM içerisinde kültür edilen fibroblastların 21' inci günlerine ait örnekler TEM ile incelenmiştir. Gözeneklerinde fibroblast hücreleri çekirdekleri ile birlikte gözlemlenmiştir (Şekil 44). Bazı fibroblast hücrelerin çekirdekleri yuvarlak bazılarının ise oldukça yassı olduğu, fibroblast hücrelerinin membran bütünlüğünün yer yer kaybolarak sitoplazmalarının dağıldığı izlenmiştir. Hücrelerin dağılmış sitoplazmasında lipid damlaları ve sitoplazmada membranların sitoplazma içeriğini çevreleyerek otofajik fagozomları oluşturduğu görülmüştür. Bazı alanlarda ise fibrin jelin boşluklarının içini çepeçevre yassı fibroblast hücre çekirdeğinin kapladığı gözlemlenmiş ve bu hücrelerin sitoplazmalarının oldukça ince olduğu izlenmiştir (Şekil 48). İncelenen örneklerde kollajen fibril gözlenmemiştir.

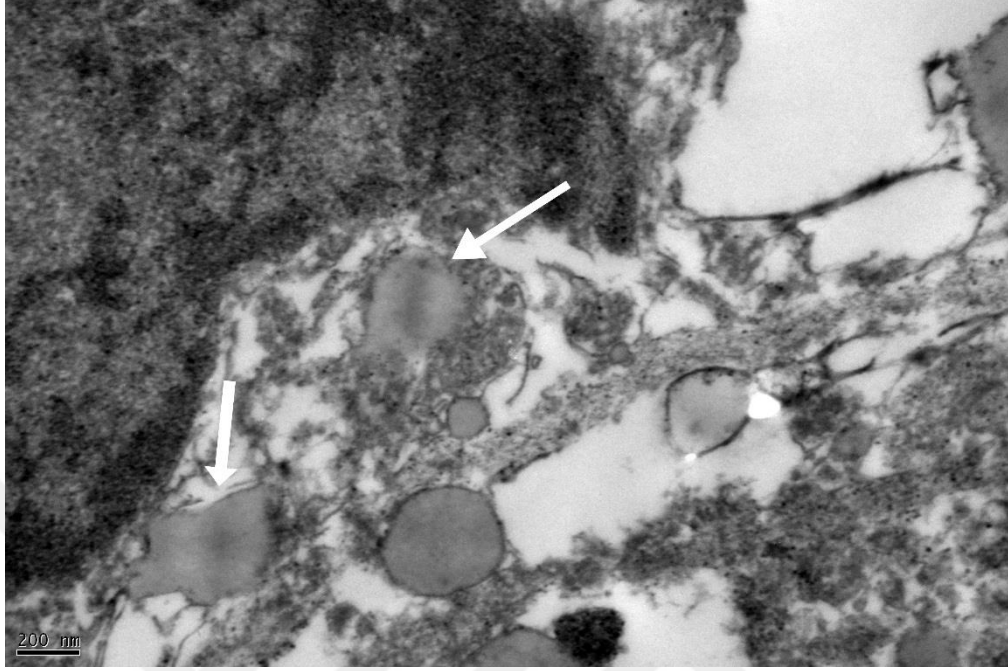


Şekil 44- Fibrin jel aralıklarında fibroblast (F) hücreleri izlenmektedir
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X 8000)

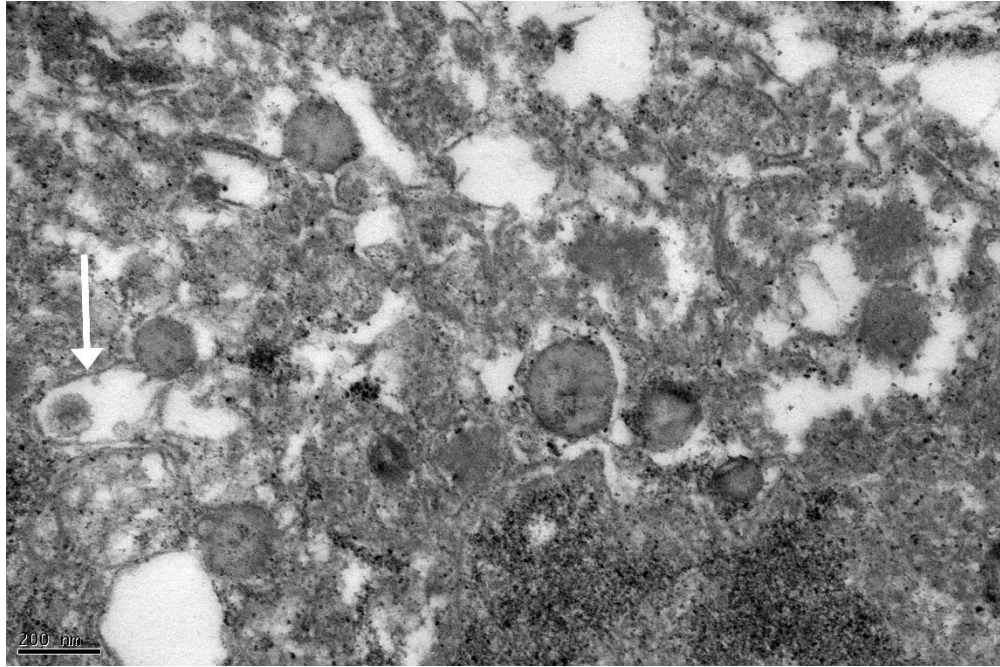


Şekil 45-Fibroblast hücrelerinin membran bütünlüğü kaybolmuş ve dağılmış sitoplazmaya sahip fibroblastlar

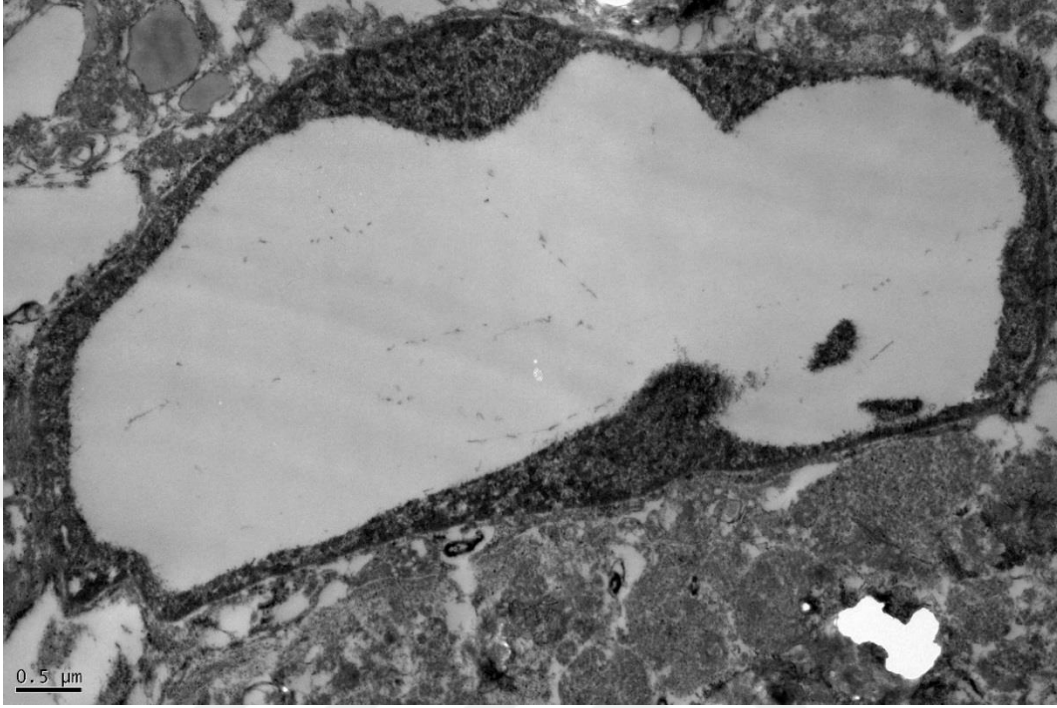
Dağılan sitoplazmada lipid damlaları gözlenmektedir (Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000)



Şekil 46- Fibroblast hücrelerinin çekirdeği, çevresinde dağılmış sitoplazması ve lipid damlaları
(Uranil asetat-Kurşun sitrat X60 000)

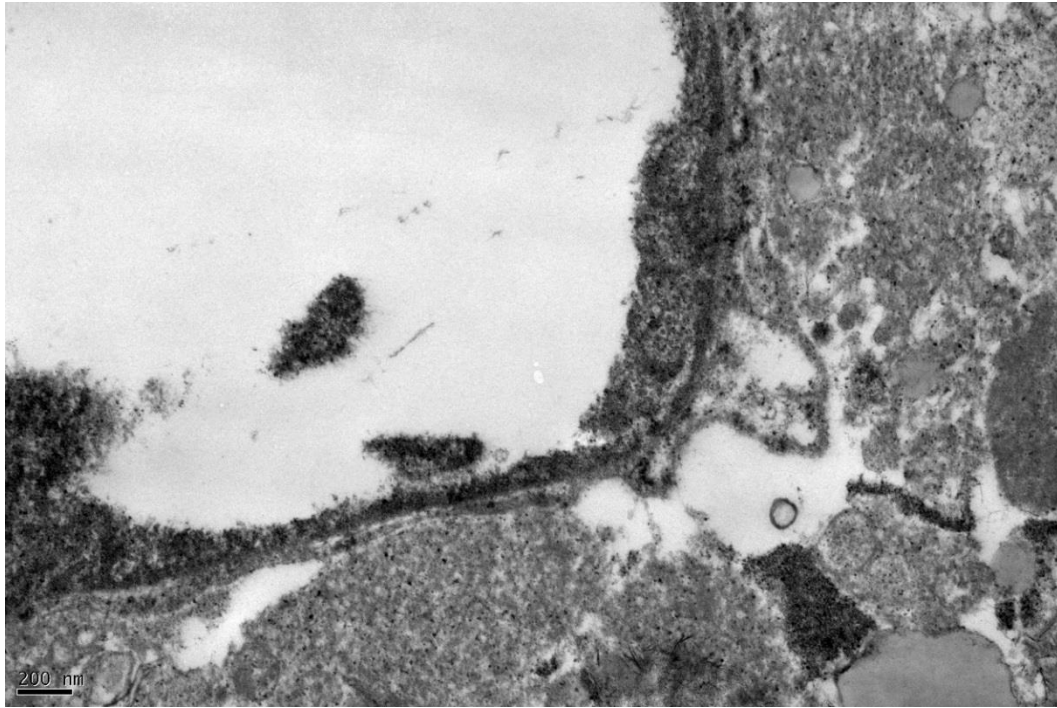


Şekil 47- Fibroblast sitoplazmasında otofajik fagozom
Fagozom yapısı ok ile gösterilmiştir. (Uranil asetat-Kurşun sitrat X80 000)



Şekil 48- Yassı çekirdeği ve çok ince sitoplazması ile fibrin jelin aralıklarına yerleşmiş fibroblast hücresi

(Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000)



Şekil 49- Yassı çekirdeği ile fibrin jelin gözeneğine yerleşmiş hücre

Kollajen lifler gözlenmemiştir (Uranil asetat-Kurşun sitrat X 50 000).

Hematoksilen/eozin boyamalarında CaCl_2 ile ve trombin ile üretilen PZFM' lere ait örnekler içerisinde kültür edilen HS27 insan fibroblastlarının MTT ve SEM analizleriyle paralel bir şekilde sonuç verdiğini, hücrelerin geçen günlerle orantılı olarak sayılarını arttırdıkları görülmektedir. Hematoksilen/eozin mikrografları incelendiğinde trombinli PZFM' lerde hücrelerin birbirlerine daha yakın konumlanarak etkileşim içerisinde oldukları görülmüştür. Bunun birkaç sebebi olabileceği düşünülmüştür:

- Trombin ile üretilen PZFM' lerin gözenek çapları CaCl_2 ' li PZFM' lere oranla daha büyük olması sebebi ile hücre dağılımları farklılık göstermiştir. Hücrelerin ilk ekimi sırasında büyük gözeneklerin iç yüzeyine rahatlıkla yerleşmesi ileriki günlerde artan hücrelerin birbirleri ile etkileşimlerini sağlamış olabilir.
- Trombin ile üretilen PZFM' lerin CaCl_2 PZFM' lere oranla daha küçük hacimde olmaları birim yüzey başına düşen hücre miktarını arttırması sebebi ile (Şekil 7) hücrelerin birbirlerine daha yakın konumlandığı yorumu yapılabilir.
- TEM analizi sonucunda trombinli PZFM' lerin lif kalınlığının CaCl_2 ' li PZFM' lere oranla daha kalın olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin tutunabileceği yüzey alanını arttıracağı anlamına gelmekte ve hücrelerin yakın konumlanmalarına neden olabileceği düşünülmüştür.

Fibrin jel üretiminde kullanılan trombinin yoğunluğu azaldıkça daha sıkı forma geçtiği ve hacimce küçüldüğü, lif yapısının kalınlaştığı [106] [107] ve değişen trombinin konsantrasyonunun hücreler üzerinde etkili olmadığı belirtilmiştir [106]. Murry ve arkadaşları da aynı şekilde trombinin düşük konsantrasyonlarında hücre göçünü uyardığı, hücre çoğalması veya kollajen üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir [108].

CaCl_2 'li fibrin matrislerde dış yüzeye yakın taraflardaki hücrelerin daha fazla olduğu ve birbirleri ile yakın konumlandığı görülmektedir. Bunun sebebinin CaCl_2 ile elde edilen matrislerdeki hacimsel farklılık olabileceği düşünülmüştür. Matris içerisine difüze olan besi ortamının sınırlanmasına sebep olmuş ve matrisin orta bölgelerinde hücre çoğalması durgunluk göstermiş olabilir. Ayrıca Praeger ve arkadaşlarının hücre dışı kalsiyum konsantrasyonunun yeni doğan sünnet derisi fibroblastları üzerindeki etkilerine dayanan araştırma sonucunda hücrelerin başlangıçtaki çoğalma oranlarında

değişim olmadığını yalnızca üstel fazda bir uzamanın görüldüğünü belirtmişlerdir [109]. Fibrin matrisin iç bölümlerindeki fibroblastların dıştakiler kadar çoğalma göstermemesinin sebebi üstel fazda görülen gecikme olabilecei düşünülmüştür.

İmmün işaretlemeler ile görülen hücre çekirdekleri hematoksilin/ eozin boyamaları ile paraleldir. Hücre çoğalması iki matris için de DAPI boyamaları ile gösterilmiştir. Ancak kollajen I ve III' e spesifik kullanılan antijenler ile kaplanan örneklerde belirgin bir boyamaya rastlanmamıştır.

PZFM örneklerinin TEM ile incelemesinde trombinli PZFM' de fibroblastlar etrafında kollajen liflerine rastlanmamakla birlikte hücrelerin bütünlüğünü koruyamayarak sitoplazmalarının dağıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 46). CaCl_2 li PZFM' de ise kollajen lifler izlenmiş ve hücrelerin trombinli PZFM'deki hücrelere kıyasla daha sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir. Tuan ve arkadaşları da fibroblastların fibrin jel içerisindeki kollajen üretimlerini incelemiş ve bir miktar kollajenin kültürün ikinci gününde biyokimyasal olarak tespit edilebildiğini; ancak organize durumdaki kollajen liflerinin kültürün ilerleyen zamanlarında TEM mikrograflarında gösterilebildiğinden bahsetmiştir. Ayrıca fibroblastların aktif olarak fibrin matrisini yeniden düzenleyebileceği ve daha sonra bunu bir kollajen içeren skar-benzeri doku ile yeniden şekillendirebileceği bildirilmiştir [110].

Fibroblastların matris içerisinde kültürüne dayalı çalışmalarda kollajenin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile veya biyokimyasal yöntemlerle tespit edildiği görülmüştür [1] [110]. CaCl_2 ile üretilen PZFM içerisinde kültür edilen hücrelerin daha uzun süreler kültür edilmesi sonucunda kollajen sentezinin belirgin şekilde gerçekleşeceği ve immün işaretlemelerle daha iyi bir görüntüleme elde edilebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

1. Hücre çoğalmasını destekleyen en uygun CaCl_2 konsantrasyonunun 80mM olduğu sonucuna varıldı.
2. CaCl_2 ile üretilen PZFM' lerin trombin ile üretilenlere göre hacimsel olarak daha büyük olduğu gözlemlendi.
3. Fibrin matrisin jelleşmesi ile hücre canlılığı ve çoğalması için de uygun olan CaCl_2 derişiminin 80mM olduğu saptandı (20 dk).
4. Şişme oranları CaCl_2 ile üretilen matris için $198 \pm 0,0038$ ve 60 dakika, trombin ile üretilen matris için $83 \pm 0,0019$ ve 60 dakika olarak bulundu.
5. PBS ve DMEM içerisinde, CaCl_2 ile üretilen matrisin diğer matrise göre daha az çözüldüğü görüldü.
6. SEM analizi sonucunda bulunan CaCl_2 ile ve trombin ile üretilen fibrin matrislere ait ortalama gözenek çapları sırası ile $19,4 \pm 4,74 \mu\text{m}$ ve $35 \pm 5,8 \mu\text{m}$ olarak belirlendi.
7. Üretilen iki farklı matris için FTIR spektrumları arasında önemli bir farka rastlanmadı.
8. CaCl_2 ile üretilen matrisin trombin ile üretilen fibrin matrise göre sıcaklığa karşı dayanıklılığının daha çok olduğu belirlendi.
9. Üretilen iki PZFM karşılaştırıldığında CaCl_2 ile üretilen fibrin matrisde hücre canlılığının trombinliye kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi.
10. Hem CaCl_2 ile hem de trombin ile üretilen PZFM' lerin hücre tutunmasını desteklediği tespit edildi.
11. Kollajen üretiminin tespiti için; kollajen I ve kollajen III antikorları kullanılarak immunfloresan boyaması yapıldı; ancak kollajene rastlanmadı. TEM ile yapılan incelemeler sonucunda CaCl_2 ile üretilen PZFM' lerde kollajen liflerine rastlandı. Trombinli PZFM' lerde kollajen görülmemekle birlikte hücre yapılarında bozulmalar, sitoplazmik dağılmalar gözlemlendi.

12. Sonuç olarak, trombin ve CaCl_2 ile üretilen iki farklı PZFM' nin hücre çoğalması ve canlılığını destekleyici özelliklerde olduğu; ancak TEM analizleri sonucu trombin kullanımının hücreler üzerinde olumsuz etkilerinin görülmesi sebebi ile CaCl_2 kullanımının hücre çoğalması ve sağlığı için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Büyüme faktörleri ile zengin, hücre çoğalmasını arttıran ve oldukça uygun bütçe ile üretilen bir matris olan CaCl_2 li PZFM' nin etkinliği, deney hayvanları üzerinde daha uzun süreli çalışmalar yapılarak desteklenebilir. Bu tez çalışmasının gelecekte derideki yaşlanmaya karşı veya deri hasar ve kayıplarında uygulanan çalışmalara yön verebileceği düşünülmektedir. Hastadan otolog olarak elde edilebilecek hücre ve plazma ile üretilen matrislerin klinikte kullanımı söz konusu olabilir. Ayrıca CaCl_2 ile üretilen fibrin matrislerin yalnızca deri dokusu üzerinde değil içerdikleri kalsiyum sebebi ile kemik dokusu yenilenmesinde de önemli etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Vavken P., Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis, *The Knee*, cilt 18, p. 42–46, **2011**.
- [2] Telser A.G. ve ark., Elsevier's integrated histology, Philadelphia (PA), Mosby Inc, **2007**.
- [3] Charruyer A. ve ark., Stem cells and tissue-engineered skin, *Skin Pharmacology and Physiology*, p. 55, 22 2 2009.
- [4] Habif T.P., Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy, Hanover, Elsevier Inc., **2010**.
- [5] Narisawa Y. ve ark., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry: SAGE Journals*, cilt 40, p. 65-71, **1992**.
- [6] Kumar V. ve ark., Robbins basic pathology, Elsevier Health Sciences, **2012**.
- [7] Gawkrödger D.J. ve ark., Dermatology: an illustrated colour text, Elsevier Inc., **2012**.
- [8] James W.D., Andrews' diseases of the skin clinical dermatology, Elsevier Inc., **2011**.
- [9] Marks J. ve ark., Lookingbill and Marks' principles of dermatology., Elsevier Inc., 2013.
- [10] Ovalle W.K. ve ark., Netter's essential histology, Elsevier Health Sciences , 2013.
- [11] Hambleton I.R. ve ark., All-cause mortality after diabetes-related amputation in Barbados: a prospective case-control study., *Diabetes Care*, cilt 2, no. 32, p. 306-7, **2009**.
- [12] Eming S.A. ve ark., Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms., *Journal of Investigative Dermatology*, cilt 3, no. 127, p. 514–25., **2007**.
- [13] Galiano R.D. ve ark., Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing., *Wound Repair and Regeneration*, cilt 4, no. 12, p. 485–92, **2004**.

- [14] Kumar V., *Temel Patoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, **2000**.
- [15] Clark M. ve ark., Tissue engineering for cutaneous wounds, *Journal of Investigative Dermatology*, no. 127, p. 1018-29, **2007**.
- [16] Karukonda S.R.K. ve ark., The effects of drugs on wound healing: part 1, *International Journal of Dermatology*, no. 39, p. 250-257, **2000**.
- [17] Diegelmann R. E. M. ve ark., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, cilt 9, p. 283–289, **2004**.
- [18] Rajsekhar S., Unseen aspects of wound healing: an overview, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, cilt 2, no. 4, p. 275–287, **2011**.
- [19] Monaco J. ve ark., Acute wound healing: An overview, *Clinics in Plastic Surgery*, no. 30, p. 1-12, **2003**.
- [20] Han S-K., *Innovations and Advances in Wound Healing*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, **2016**.
- [21] Orsted K. ve ark., Basic Principles of Wound Healing, *Wound Care Canada* , cilt 2, no. 9, p. 4–12, **2011**.
- [22] Willi P. ve ark., *Advances in wound healing materials science and skin engineering*, Shrewsbury: Smithers Rapra Technology, **2015**.
- [23] Middleton J. E., *Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*, New York: Nova Science Publishers, **2011**.
- [24] Supp S ve ark., Engineered skin substitutes: practices and potentials, *Clinics in Dermatology*, no. 23, pp. 403-12, **2005**.
- [25] Atiyeh S. ve ark., New technologies for burn wound closure and healing—Review of the literature, *Burns*, no. 31, p. 944-56, **2005**.
- [26] Böttcher-Haberzeth S., Tissue engineering of skin, *Burns*, no. 36, p. 450-60, **2010**.
- [27] Akay, M.T., *Genel Histoloji*, Ankara, Palme, **2008**.
- [28] Haynesworth S., Platelet-rich plasma stimulates stem cell chemotaxis, proliferation and potentiates osteogenic differentiation, *The Spine Journal*, cilt 2, no. 5, p. 68-72, **2006**.

- [29] Lacci K.M. ve ark., Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing, *The Yale Journal of Biology and Medicine*, no. 83, p. 1, **2010**.
- [30] Rozman B. ve ark., Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries, *Acta Dermatovenereologica Alpina Panonica Et Adriatica*, cilt 4, no. 16, p. 156, **2007**.
- [31] Lynch S.E. ve ark., Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds, *The Journal of Clinical Investigation*, no. 84, p. 640-646, **1989**.
- [32] Galiano R.D. ve ark., Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells, *American Journal of Pathology*, no. 164, p. 1935-1947, **2004**.
- [33] Martinez-Zapata M.J., Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 10, **2012**.
- [34] Krupski E.C. ve ark., A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report, *Journal of Vascular Surgery*, no. 14, p. 526-532, **1991**.
- [35] Anitua E. ve ark., Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, no. 84, p. 415-421, **2008**.
- [36] Law J.X. ve ark., Platelet-rich plasma with keratinocytes and fibroblasts enhance healing of full-thickness wounds, *Journal of Tissue Viability*, cilt 26, no. 3, p. 208-215, **2017**.
- [37] Crovetti G., Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds, *Transfus Apher Sci*, cilt 2, no. 30, p. 145-51, **2004**.
- [38] Welsh W.J., Autologous platelet gel-Clinical function and usage in plastic surgery, *Cosmetic Dermatology*, cilt 6, no. 7, p. 13-19, **2007**.
- [39] Kazakos K. ve ark., The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds, *Injury*, no. 40, p. 801-805, **2009**.
- [40] Driver R. ve ark., A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers, *Ostomy Wound Manage*, no. 52, p. 68-70, **2006**.

- [41] Carter J. ve ark., Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis, *Eplasty*, no. 11, p. 38, **2011**.
- [42] Kamel E. ve ark., Tissue Engineering of Skin, *Journal of the American College of Surgeons*, no. 217, p. 533-55, **2013**.
- [43] Gurtner G.C. ve ark., Wound repair and regeneration, *Nature*, cilt 7193, no. 453, p. 314–21, **2008**.
- [44] Rennert R.C. ve ark., Biological therapies for the treatment of cutaneous wounds: phase III and launched therapies, *Expert Opinion on Biological Therapy*, cilt 11, no. 13, p. 1523–41, **2013**.
- [45] Lam M.T. ve ark., Effective delivery of stem cells using an extracellular matrix patch results in increased cell survival and proliferation and reduced scarring in skin wound healing, *Tissue Engineering Part A*, cilt 5–6, no. 19, p. 738–47, **2013**.
- [46] Garg R.K. ve ark., Capillary force seeding of hydrogels for adipose derived stem cell delivery in wounds, *Stem Cells Translational Medicine*, cilt 9, no. 3, p. 1079-89, **2014**.
- [47] Boyce S., Cultured skin substitutes: a review, *Tissue engineering*, no. 2, p. 255-66, **1996**.
- [48] Nair C. ve ark., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, no. 32, p. 762-798, **2007**.
- [49] Albanna H. ve ark., Natural Biomaterials for Skin, *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine Tissue Engineering*, Academic Press, p. 145-158, **2016**
- [50] Chan K. ve ark., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissuespecific specific considerations, *European Spine Journal*, no. 4, p. 467-479, **2008**.
- [51] Janmey J. ve ark., Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications, *Journal of the Royal Society Interface*, no. 6, p. 1-10, **2009**.
- [52] Ahmed T.E. ve ark., Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B Reviews*, no. 14, p. 199–215, **2008**.
- [53] Weisel J., Fibrinogen and Fibrin, Adv. Protein. Chem., *Advances in Protein Chemistry*, cilt 70, p. 247–299, **2005**.

- [54] Lai V.K. ve ark., Mechanical behavior of collagen fibrin co-gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen, *J Journal of Biomechanical Engineering- ASME*, no. 134, **2012**.
- [55] Kuehn C. ve ark., Young porcine endocrine pancreatic islets cultured in fibrin and alginate gels show improved resistance towards human monocytes., *Pathologie Biologie*, no. 62, p. 354–364, **2014**.
- [56] Brougham C.M. ve ark., Incorporation of fibrin into a collagen-glycosaminoglycan matrix results in a scaffold with improved mechanical properties and enhanced capacity to resist cell-mediated contraction, *Biomaterialia*, no. 26, p. 205-214, **2015**.
- [57] Gessmann J. ve ark., Alignment of the fibrin network within an autologous plasma clot, *Tissue Engineering Part C Methods*, no. 22, p. 30-37, **2016**.
- [58] Geer J. ve ark., Fibrin promotes in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration, *Tissue Engineering.*, no. 8, p. 787-798, **2002**.
- [59] Carriel V. ve ark., Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials, *Cells Tissues Organs*, no. 196, p. 1-12, **2012**.
- [60] Johnsen I. ve ark., Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant, *Vasa*, no. 34, p. 25-9, **2005**.
- [61] Sclafani. A.P., Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds, *J Journal of Cosmetic Dermatology*, cilt 1, no. 9, p. 66-71, **2010**.
- [62] Anthony P., Sclafani ve M. Steven A. McCormick, Induction of Dermal Collagenesis, Angiogenesis, and Adipogenesis in Human Skin by Injection of Platelet-Rich Fibrin Matrix, *Archives of Facial Plastic Surgery*, cilt 14, no. 2, p. 132-136, **2012**.
- [63] Corral M. ve ark., Clinician reported ease of use for a novel fibrin sealant patch for hemostasis: results from four randomized controlled trials, *Current Medical Research and Opinion*, no. 32, p. 367–375, **2016**.
- [64] Hickerson W.L. ve ark., A comparison of the mechanical, kinetic, and biochemical properties of fibrin clots formed with two different fibrin sealants, *Blood Coagul Fibrinolysis*, no. 22, p. 19-23, **2011**.
- [65] Weisel W. ve ark., Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications, *Blood*, p. 1712-1719, **2013**.

- [66] Lord S.T., Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis, *Current Opinion in Hematology*, cilt 14, p. 236–241, **2007**.
- [67] Mosesson M.W., Fibrinogen and fibrin structure and functions, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, cilt 3, p. 1894–1904, **2005**.
- [68] Muszbek L. ve ark., Blood coagulation factor XIII: structure and function, *Thrombosis Research*, cilt 94, p. 271-305, **1999**.
- [69] Greenberg C.S. ve ark., Characterization of the fibrin polymer structure that accelerates thrombin cleavage of plasma factor XIII, *The Journal of Clinical Investigation*, cilt 75, p. 1463-70, **1985**.
- [70] Hornyak T.J. ve ark., Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor, *Biochemistry*, cilt 31, p. 423-9, **1992**.
- [71] Chen R. ve ark., alpha-alpha-Cross-linking sites in human and bovine fibrin, *Biochemistry*, cilt 10, p. 4486-91, **1971**.
- [72] Lorand L., Factor XIII: Structure, Activation, and Interactions with Fibrinogen and Fibrin, *Annals New York Academy Of Sciences*, p. 191-311, **2001**.
- [73] Gladner J.A. ve ark., Effects of crosslinking on the rigidity and proteolytic susceptibility of human fibrin clots., *Thrombosis Research*, cilt 30, p. 273-88, **1983**.
- [74] Standeven K.F. ve ark., Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness, *Blood*, cilt 110, p. 902-7, **2007**.
- [75] Canfield E. ve ark., Immunochemical Studies Of A α Chain Crosslinking, *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, And Fibrinolysis*, New York, Plenum, p. 55-61, **1990**.
- [76] Martini F.H., Fundamentals of Anatomy-Physiology, New Jersey, Prentice Hall, **1995**.
- [77] Keeton W.T. ve ark., Biological Science, New York, W. W. Norton and Company, **1993**.
- [78] Lucarelli E. ve ark., A Recently Developed Bifacial Platelet-Rich Fibrin Matrix, *European Cell and Materials*, cilt 20, p. 13-23, **2010**.

- [79] Perez G.M. ve ark., Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma, *Hindawi Publishing Corporation*, p. 1-8, **2014**.
- [80] Lin Peng W. ve ark., Preparation and Evaluation of Porous Chitosan/Collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering, *Journal of Bioactive And Compatible Polymers*, cilt 21, p. 207-220, **2006**.
- [81] Singaravelu S., Biomimetic interconnected porous keratin–fibrin–gelatin 3D sponge for tissue engineering application, *International Journal of Biological Macromolecules*, cilt 86, p. 810–819, **2016**.
- [82] Lam N.T. ve ark., Fabrication of a matrigel–collagen semi-interpenetrating scaffold for use in dynamic valve interstitial cell culture, *Biomedical Materials*, cilt 12, no. 4, p. 1-25, **2017**.
- [83] Zhao H. ve ark., Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma, *Biomedical Materials*, cilt 3, p. 1-9, **2008**.
- [84] Stoddart M.J. ve ark., Mammalian Cell Viability-Methods and Protocols, Hertfordshire, Humana Press, **2011**.
- [85] Dubey N. ve ark., Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties, *Biomaterials*, cilt 22, p. 1065–1075, **2001**.
- [86] Ryan A. ve ark., Structural Origins of Fibrin Clot Rheology, *Biophysical Journal*, cilt 77, p. 2813–2826, **1999**.
- [87] Magatti D. ve ark., Modeling of Fibrin Gels Based on Confocal Microscopy and Light-Scattering Data, *Biophysical Journal*, cilt 104, no. 5, p. 1151-1159, **2013**.
- [88] Hertig F. ve ark., Iodixanol as a Contrast Agent in a Fibrin Hydrogel for Endodontic Applications, *Frontiers in Physiology*, cilt 8, no. 152, p. 1-6, **2017**.
- [89] Cao N. ve ark. Influence of Calcium Ions on Cell Survival and Proliferation in the Context of an Alginate Hydrogel, *Chemical Engineering*, cilt 2012, p. 1-9, **2012**.
- [90] Wolberg S. ve ark., Analyzing fibrin clot structure using a microplate reader, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, cilt 13, p. 1-7, **2002**.
- [91] Sadeghi-Ataabadi M. ve ark., Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering C*, no. 70, p. 372–380, **2017**.

- [92] Freshney R.I., Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc.Publication, **2007.**
- [93] K. M, Dynamic viscoelastic study of the formation of fibrin networks in fibrinogen-thrombin systems and plasma, *Biorheology* , cilt 10, p. 61–73, **1973.**
- [94] Shah G.A. ve ark., Physiological studies on fibrin network structure, *Thrombosis Research*, cilt 40, p. 181–8, **1985.**
- [95] Kaminski M. ve ark., Studies on the mechanism of thrombin interaction with fibrin, *Journal of Biological Chemistry.* , cilt 258, p. 10530–5, **1983.**
- [96] Ma L. ve ark., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials*, cilt 24, p. 4833–41, **2003.**
- [97] Gabriel D.A. ve ark. The effect of fibrin structure on fibrinolysis, *The Journal of Biological Chemistry*, cilt 267, p. 24259–63, **1992.**
- [98] Collet J.P. ve ark., Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure, *Blood*, cilt 82, p. 2462–9, **1993.**
- [99] Vedakumari S. ve ark., Fibrin nanoparticles as Possible vehicles for drug delivery, *Biochimica et Biophysica Acta*, cilt 1830 , p. 4244–4253, **2013.**
- [100] Muthukumar T. ve ark., Synthesis and characterization of biosheet impregnated with Macrotyloma uniflorum extract for burn/wound dressings, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, cilt 102 , p. 694-699, **2013.**
- [101] Adigüzel Y. ve ark., Screening of Proteins in Cells and Tissues by Vibrational Sptroscopy, *Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening*, IOS Press, p. 53-108, **2012.**
- [102] Surewicz H. ve ark., *Biochimica et Biophysica Acta*, cilt 952, p. 115-130, **1988.**
- [103] Singh M. ve ark., Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation, *SPIE*, cilt 1980, **1993.**
- [104] Cetin Y. ve ark. Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay, *Food and Chemical Toxicology*, cilt 43, no. 5, p. 755-64, **2005.**

- [105] Lio K. ve ark., Hyaluronic acid induces the release of growth factors from platelet-rich plasma, *Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology*, cilt 4, p. 27-32, **2016**.
- [106] Rowe L. ve ark., Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels, *Acta Biomaterialia*, cilt 3, no. 1, p. 59–67, **2007**.
- [107] Rowe L. ve ark., Influence of Thrombin Concentration on the Mechanical and Morphological Properties of Cell-seeded Fibrin Hydrogels, *Acta Biomaterialia*, cilt 3, no. 1, p. 59–67, **2007**.
- [108] Murray M.M. ve ark., The Effect of Thrombin on ACL Fibroblast Interactions with Collagen Hydrogels, *Journal of Orthopaedic Research*, cilt 24, no. 3, p. 508-15, **2006**.
- [109] Praeger F.C. ve ark., Influence of increased extracellular calcium concentration and donor age on density-dependent growth inhibition of human fibroblasts., *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, cilt 182, no. 3, p. 315-21, **1986**.
- [110] Tuan T.-L. ve ark., n VitroFibroplasia: Matrix Contraction, Cell Growth, and Collagen Production of Fibroblasts Cultured in Fibrin Gels, *Experimental Cell Research*, cilt 223, no. 1, p. 127-134, **1996**.
- [111] Xian J., ve ark., Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing, *Cytotherapy*, cilt 17, p. 293-300, **2015**.
- [112] Hsia H.C. ve ark., The fiber diameter of synthetic bioresorbable extracellular matrix influences human fibroblast morphology and fibronectin matrix assembly, *Plastic and Reconstructive Surgery*, cilt 127, p. 2312–2320, **2011**.
- [113] Cuschieri J. ve ark., Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin, *The Journal of Immunology*, cilt 168, p. 1389-1396, **2002**.
- [114] Carr Jr., Effect of homo poly (L-amino acids) on fibrin assembly: role of charge and molecular weight, *Biochemistry*, cilt 28, p. 1384–1388, **1989**.
- [115] Ware, A.G., Fibrinogen; with special reference to its preparation and certain properties of the product, *Archives of Biochemistry* , cilt 13, p. 231–236., **1947**.
- [116] Weslen S. ve ark., Vedakumari, Fibrin nanoparticles as Possible vehicles for drug delivery, *Biochimica et Biophysica Acta*, cilt 1830 , p. 4244–4253, **2013**.

- [117] Corte C. L. ve ark., Role of Fibrin Structure in Thrombosis and Vascular Disease, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, London, Academic Press, p. 75-127, **2011**.
- [118] Guehennec L. ve ark., Influence of calcium chloride and aprotinin in the in vivo biological performance of a composite combining biphasic calcium phosphate granules and fibrin sealant, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, cilt 18, p. 1489–1495, **2007**.
- [119] Shen L. ve ark., Effects of calcium ion and covalent crosslinking on formation and elasticity of fibrin gels, *Thrombosis Research*, cilt 6, no. 3, p. 255–265, **1975**.
- [120] Rokosova B. ve ark., Effect of calcium on cell proliferation and extracellular matrix synthesis in arterial smooth muscle cells and dermal fibroblasts, *Experimental and Molecular Pathology*, cilt 44, no. 3, p. 307-17, **1986**.
- [121] Maeno S. ve ark., The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture, *Biomaterials*, cilt 26, no. 23, p. 4847-4855, **2005**.
- [122] Ganguly P. ve ark., Differential effect of thrombin on the growth of human fibroblasts, *The Journal of Cell Biology*, cilt 1, no. 85, p. 70–82, **1980**

EK

CaCl ₂	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM	60mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM
1.örnek	0,6062	0,6431	0,6778	0,7133	0,7118	0,755	0,7547	0,7585	0,7694	0,7925	0,7809	0,8006
2.örnek	0,6049	0,6272	0,6633	0,6898	0,6905	0,7401	0,7554	0,7476	0,7562	0,795	0,779	0,7275
3.örnek	0,6111	0,6242	0,6961	0,7051	0,7081	0,7318	0,7604	0,7458	0,7584	0,7946	0,7786	0,8202
5.dk												
Ortalama	0,6074	0,6315	0,679067	0,702733	0,703467	0,7423	0,756833	0,750633	0,761333	0,794033	0,7795	0,782767
Standart												
Sapma	0,00327	0,010157	0,016437	0,011927	0,011381	0,011755	0,003109	0,006872	0,007072	0,001343	0,001229	0,048855
1.örnek	0,6002	0,6348	0,6748	0,7158	0,7161	0,7619	0,7779	0,7728	0,7916	0,8215	0,8148	0,809
2.örnek	0,5844	0,6064	0,6622	0,669	0,7005	0,7584	0,7752	0,765	0,7798	0,8236	0,8066	0,8232
3.örnek	0,591	0,6061	0,7011	0,7066	0,7136	0,7502	0,7832	0,7759	0,7892	0,8156	0,8277	0,8273
10.dk												
Ortalama	0,591867	0,615767	0,679367	0,697133	0,710067	0,756833	0,778767	0,771233	0,786867	0,820233	0,816367	0,819833
Standart												
Sapma	0,007936	0,016484	0,019848	0,024795	0,008379	0,006005	0,00407	0,005616	0,006236	0,004148	0,010637	0,009603
1.örnek	1,01859	0,9412	0,8063	0,8745	0,8766	0,8259	0,8794	0,8226	0,9827	0,8273	0,8227	0,8034
2.örnek	1,0019	1,0865	0,7731	0,8764	0,8344	0,8728	0,9656	0,8004	0,8044	0,8235	0,8094	0,8305
3.örnek	1,0726	1,0917	1,0068	0,8594	0,8097	0,885	0,9823	0,8348	0,7941	0,8285	0,8957	0,82
15.dk												
Ortalama	1,03103	1,0398	0,862067	0,8701	0,840233	0,861233	0,942433	0,819267	0,8604	0,826433	0,8426	0,817967
Standart												
Sapma	0,036955	0,08543	0,126437	0,009315	0,033829	0,031202	0,055223	0,017441	0,10604	0,00261	0,046464	0,013664
1.örnek	1,0249	1,1185	1,1757	1,0319	1,0173	0,904	1,0266	0,9547	0,9887	0,8218	0,8121	0,8091
2.örnek	1,0183	1,0902	0,942	1,0904	0,9461	0,9613	1,0347	0,9365	0,7901	0,8271	0,8079	0,8262
3.örnek	1,0786	1,0927	1,1447	0,9188	0,8738	0,9285	1,0738	0,9392	0,7884	0,8243	0,822	0,8259
20.dk												
Ortalama	1,0406	1,100467	1,087467	1,0137	0,945733	0,931267	1,045033	0,943467	0,855733	0,8244	0,814	0,8204

Standart												
Sapma	0,033074	0,015667	0,126928	0,087236	0,071751	0,02875	0,02524	0,009822	0,115156	0,002651	0,007239	0,009787
1.örnek	1,0241	1,1215	1,2022	1,0845	1,0605	0,9318	1,0364	0,9514	0,9853	0,8263	0,8236	0,8035
2.örnek	1,0205	1,0883	1,125	1,1709	0,9806	0,9993	1,0641	0,9336	0,7803	0,8233	0,8021	0,8264
3.örnek	1,079	1,0911	1,1971	0,9345	0,8963	0,9449	1,0593	0,9346	0,7811	0,8254	0,8257	0,8333
25.dk												
Ortalama	1,0412	1,1003	1,174767	1,0633	0,979133	0,958667	1,053267	0,939867	0,8489	0,825	0,817133	0,821067
Standart												
Sapma	0,032785	0,018413	0,043175	0,119617	0,08211	0,035794	0,014803	0,010001	0,118127	0,001539	0,013062	0,015599
1.örnek	1,0175	1,1159	1,1984	1,1261	1,0839	0,9415	1,0369	0,9599	0,9812	0,8223	0,7825	0,8062
2.örnek	1,0134	1,0822	1,192	1,2374	0,9946	1,0275	1,0632	0,9382	0,7882	0,8215	0,7915	0,8242
3.örnek	1,0745	1,086	1,2509	0,9567	0,9048	0,9422	1,0569	0,9335	0,7861	0,8244	0,8279	0,8211
30.dk												
Ortalama	1,035133	1,0947	1,213767	1,106733	0,994433	0,9704	1,052333	0,943867	0,851833	0,822733	0,800633	0,817167
Standart												
Sapma	0,034154	0,018458	0,032317	0,141349	0,08955	0,049451	0,013732	0,014083	0,11204	0,001498	0,024039	0,009623
1.örnek	1,0152	1,1136	1,195	1,186	1,121	0,951	1,03397	0,9523	0,9821	0,8205	0,8238	0,8014
2.örnek	1,0102	1,0788	1,1963	1,2536	1,0064	1,043	1,0747	0,9335	0,7857	0,8276	0,8047	0,8262
3.örnek	1,0754	1,0825	1,2593	0,9986	0,9186	0,9487	1,0593	0,9349	0,7802	0,8223	0,8203	0,8295
35.dk												
Ortalama	1,0336	1,091633	1,216867	1,146067	1,015333	0,9809	1,05599	0,940233	0,849333	0,823467	0,816267	0,819033
Standart												
Sapma	0,036286	0,019113	0,036754	0,132107	0,101495	0,053792	0,020566	0,010473	0,115012	0,003691	0,010169	0,01536
1.örnek	1,0075	1,108	1,1878	1,2335	1,1621	0,9637	1,0397	0,9591	0,9871	0,8257	0,8289	0,8026
2.örnek	1,0023	1,0715	1,1899	1,2512	1,0226	1,0541	1,0831	0,9313	0,7881	0,8293	0,8013	0,8242
3.örnek	1,0654	1,075	1,2537	1,0495	0,937	0,9547	1,06697	0,9374	0,7836	0,8103	0,829	0,8366
40.dk												
Ortalama	1,025067	1,084833	1,210467	1,178067	1,040567	0,990833	1,063257	0,9426	0,852933	0,821767	0,819733	0,821133
Standart												
Sapma	0,035026	0,020139	0,037456	0,111693	0,11362	0,054975	0,021937	0,014611	0,116214	0,010092	0,015964	0,017206

1.örnek	0,995	1,0988	1,1782	1,2558	1,1868	0,9785	1,0401	0,9588	0,9838	0,8255	0,8247	0,81241
2.örnek	0,9923	1,0629	1,1825	1,2459	1,0473	1,0667	1,0851	0,9323	0,7824	0,8262	0,808	0,8224
3.örnek	1,0614	1,066	1,2477	1,0909	0,9676	0,9606	1,06387	0,9362	0,7844	0,8269	0,8262	0,8243
45.dk												
Ortalama	1,016233	1,0759	1,2028	1,197533	1,067233	1,001933	1,063023	0,942433	0,8502	0,8262	0,819633	0,819703
Standart												
Sapma	0,039139	0,019892	0,038944	0,09248	0,110951	0,056799	0,022512	0,014307	0,115705	0,0007	0,010103	0,006387
1.örnek	0,9728	1,078	1,1635	1,2579	1,1879	0,9944	1,03674	0,9488	0,979	0,8292	0,8259	0,8114
2.örnek	0,9734	1,0452	1,172	1,2376	1,0748	1,0805	1,0806	0,93334	0,7826	0,8289	0,8043	0,8228
3.örnek	1,0375	1,0483	1,2267	1,1034	1,0103	0,9648	1,0778	0,9364	0,7742	0,8296	0,8294	0,8296
50.dk												
Ortalama	0,994567	1,057167	1,1874	1,199633	1,091	1,013233	1,065047	0,939513	0,845267	0,829233	0,819867	0,821267
Standart												
Sapma	0,037183	0,018109	0,034299	0,083956	0,089901	0,060105	0,024554	0,008187	0,115893	0,000351	0,013594	0,009196
1.örnek	0,9623	1,0717	1,1543	1,2532	1,1868	1,0098	1,0497	0,9495	0,988	0,8218	0,8318	0,8067
2.örnek	0,9622	1,0386	1,1654	1,2304	1,1185	1,0934	1,0999	0,9342	0,7866	0,8254	0,808	0,8356
3.örnek	1,0325	1,0412	1,2187	1,1005	1,06	0,9729	1,0832	0,9387	0,7805	0,8195	0,829	0,8286
55.dk												
Ortalama	0,985667	1,0505	1,179467	1,1947	1,121767	1,025367	1,0776	0,9408	0,8517	0,822233	0,822933	0,8321
Standart												
Sapma	0,040559	0,018406	0,034427	0,082372	0,063463	0,06174	0,025564	0,007863	0,118079	0,002974	0,013008	0,00495
1.örnek	0,9546	1,0652	1,1495	1,2498	1,1849	1,0221	1,0569	0,9539	0,9835	0,8288	0,8254	0,8013
2.örnek	0,9574	1,0327	1,162	1,2258	1,1444	1,1048	1,1195	0,9299	0,78653	0,8279	0,8015	0,8291
3.örnek	1,0303	1,0366	1,2149	1,0985	1,0939	0,9936	1,0974	0,9303	0,7813	0,8288	0,8366	0,82675
60.dk												
Ortalama	0,980767	1,044833	1,175467	1,191367	1,141067	1,040167	1,091267	0,938033	0,850443	0,8285	0,821167	0,81905
Standart												
Sapma	0,04292	0,017746	0,034717	0,081315	0,045591	0,05776	0,031747	0,013742	0,11526	0,00052	0,017929	0,015417

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Aslı TAŞPOLATOĞLU

Doğum Yeri : İzmir

Medeni Hali : Bekar

E-posta : taspolatoglu.asli@gmail.com

Adresi : Üçyol/İZMİR

Eğitim

Lise : 2005 - 2009 Yunus Emre Anadolu Lisesi / İZMİR

Lisans : 2009 – 2014 Hacettepe Üniversitesi – Biyoloji Bölümü / ANKARA

Yabancı Dil ve Düzeyi

Almanca : Orta Düzey

İngilizce : İleri Düzey

İş Deneyimi

2014-2017- Doku Biyoteknoloji LTD.ŞTİ.

Deneyim Alanları

Primer hücre kültürü, Kök hücre kültürü, Stromal Vasküler Fraksiyon

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/01/2018

Tez Başlığı / Konusu: Cilt Yenilenmesi İçin Yeni Bir Fibrin Matris Oluşturulması, Kimyasal/Fiziksel Özellikleri ve Doku İskelesi Oluşturma Potansiyeli Açısından İncelenmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 112 sayfalık kısmına ilişkin, 12/01/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

12.01.2018

Adı Soyadı: Aslı Taşpolatoğlu
Öğrenci No: N14123044
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Ayşe Keleşir Özden
(Unvan, Ad Soyad, İmza)