

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak
Doku İskelelerinin Biyouyumluluk ve Mekanik
Özelliklerinin Analizi**

Merve PERPELEK

**Biyomekanik
Yüksek Lisans Tezi**

İzmir-2018

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2015970004

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak
Doku İskelelerinin Biyouyumluluk ve Mekanik
Özelliklerinin Analizi**

Merve PERPELEK

**Biyomekanik
Yüksek Lisans Tezi**

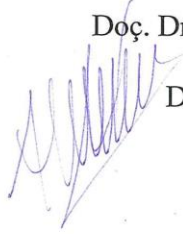
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI

İzmir-2018

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2015970004

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik Anabilim
Dalı, Biyomekanik Yüksek Lisans programı öğrencisi Merve PERPELEK
“Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak Doku İskelelerinin
Biyouyumluluk ve Mekanik Özelliklerinin Analizi” konulu Yüksek Lisans
tezini 07/06/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI
BAŞKAN
DEÜ Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU

ÜYE

DEÜ Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU

ÜYE

İYTE Kimya Mühendisliği Böl.

Doç. Dr. Aylin ZİYLAN

ÜYE

DEÜ Malz. Müh. Böl.

Prof. Dr. Bülent YARDIMOĞLU

ÜYE

İYTE Makine Müh. Böl.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kıkırdak Doku	4
2.2. Kıkırdak Türleri	4
2.2.1. Elastik Kıkırdak	4
2.2.2. Fibröz Kıkırdak	4
2.2.3. Hiyalin Kıkırdak	4
2.3. Eklem Kıkırdağı	5
2.3.1. Eklem Kıkırdağının Yapısı	6
2.3.1.1. Kondrositler	6
2.3.1.2. Ekstrasellüler Matriks	6
2.3.1.2.1. Kollajen	7
2.3.1.2.2. Proteoglikanlar	7
2.3.1.2.3. Kollajen Olmayan (non-kollajenöz) Proteinler	8
2.3.1.2.4. Eklem Sıvısı	8
2.3.1.3. Kıkırdak Dokunun Katmanları	8
2.3.1.3.1. Yüzeyel Katman	9
2.3.1.3.2. Geçiş Katmanı	9
2.3.1.3.3. Orta Katman	9
2.3.1.3.4. Kalsifiye Katman	9
2.4. Eklem Kıkırdağının İşlevleri ve Biyomekanik Davranışı	11
2.5. Kıkırdak Rejenerasyonu	12
2.5.1. Kıkırdak Hasarları ve Geleneksel Tedavi Yöntemleri	13
2.5.2. Doku Mühendisliği Uygulamaları	14
2.6. Kıkırdak Doku Mühendisliği	15
2.7. Kitosan	16

2.8. Salyangoz Salgıları ve Kullanım Alanları	17
2.8.1. Salyangoz Salgıları ile İlgili Yapılan Çalışmalar	18
2.8.2. Helix Aspersa Salyangozu ve Salgı Özellikleri	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları	21
3.4. Çalışma Materyali	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	21
3.6. Veri Toplama Araçları	22
3.6.1. Doku İskelelerinin Hazırlanması	24
3.6.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması	24
3.6.1.2. Kitosan ve Slime Doku İskelelerinin Hazırlanması	24
3.6.1.3. Kitosan ve Mukus Doku İskelelerinin Hazırlanması	24
3.6.2. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	25
3.6.2.1. SEM Analizi	25
3.6.2.2. Sıvı Değişim Yöntemi ile Açık Gözeneklilik Ölçümü	25
3.6.2.3. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesinin Ölçümü	25
3.6.2.4. Basma Testi ile Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi	26
3.6.2.5. FT-IR Analizi	27
3.6.2.6. Biyobozunurluk Deneyi	27
3.6.2.7. Antimikrobiyal Test	28
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	28
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	28
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	29
3.10. Etik Kurul Onayı	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. SEM Analizi	30
4.2. Sıvı Değişim Yöntemi ile Açık Gözeneklilik Ölçümü	33
4.3. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesinin Ölçümü.....	34
4.4. Basma Testi ile Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi	35
4.5. FT-IR Analizi	36
4.6. Biyobozunurluk Deneyi	38
4.7. Antimikrobiyal Test	39
5. TARTIŞMA	45

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	54
8. EKLER	61
8.1. Ek-1. Arbis Özgeçmiş	61
8.2. Ek-2. Etik Kurul Onayı	64



TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemelerin listesi	22
Tablo 2: Doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları ve standart sapma değerleri	31
Tablo 3: Doku iskelelerinin % gözeneklilik ve standart sapma değerleri	34
Tablo 4: Antimikrobiyal testler sonucu disklerin etrafında oluşan zon çapları	44



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Kıkırdak türlerinin hücre yapıları(hiyalin kıkırdak, elastik kıkırdak, fibröz kıkırdak...	5
Şekil 2: Hyalin kıkırdağın histogenezi. A; mezenkim doku, B; Mezenkim hücrelerinin bölünerek çoğalması, C; Kondroblastların birbirinden uzaklaşması, D; Kıkırdak hücrelerinin bölünmesi ve izogen grupların oluşması	5
Şekil 3: Eklem kıkırdağı	6
Şekil 4: Eklem kıkırdağı ve içeriği	8
Şekil 5: Eklem kıkırdağı yapısı ve katmanları. SZ; yüzeysel katman, MZ; orta katman, DZ; geçiş katmanı, CZ; kalsifiye katman, SB; subkondral kemik	10
Şekil 6: Eklem kıkırdağı katmanları ve katmanlara göre kollajen II, GAG, basma modülü özellikleri	11
Şekil 7: Kıkırdağın yük sönümlemesi	12
Şekil 8: Normal eklem kıkırdağı ve osteoartritli eklem kıkırdağı	14
Şekil 9: Eklem kıkırdağı onarımı için kullanılan doku mühendisliği üçlüsü	15
Şekil 10: Kitin'in kimyasal yapısı	17
Şekil 11: Kitosan'ın kimyasal yapısı	17
Şekil 12: Helix aspersa	19
Şekil 13: Kitosan ve salyangoz salgı (mukus, slime) çözeltileri	24
Şekil 14: Elde edilen mukus ve slime katkılı doku iskeleleri	25
Şekil 15: Su tutma kapasiteleri ölçülen doku iskeleleri	26
Şekil 16: Mekanik test cihazı	27
Şekil 17: %1 kitosan ve slime grubu doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a: 100x, b: 250x, c:1000x büyütme).....	30
Şekil 18: %1 kitosan ve mukus grubu doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a: 100x, b: 250x, c: 1000x büyütme).....	31
Şekil 19: Kitosan ve kitosan-mukus doku iskelelerinin gözenek çapı dağılımını gösteren histogramlar	32
Şekil 20: Kitosan ve kitosan-slime doku iskelelerinin gözenek çapı dağılımını gösteren histogramlar	33
Şekil 21: %1 Kitosan, mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi gruplarının şişme yüzdeleri (***<0,001; ****<0,0001).....	35

Şekil 22: Kontrol ve mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi grupları için Elastik Modül değerleri (*<0,05; **<0,01; ***<0,001; ****<0,0001).....	34
Şekil 23: %1 Kitosan ve deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları	37
Şekil 24: Mukus ekstraktı, %1 kitosan ve mukus deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları	37
Şekil 25: Slime ekstraktı, %1 kitosan ve slime deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları	36
Şekil 26: Kontrol ve mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi grupları için % ağırlık kaybı (****<0,0001).....	39
Şekil 27: Salyangoz salgı çözeltilerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>S.mutants</i> bakteri türlerine etkisi(genel görünüm)	39
Şekil 28: %3 mukus salgı çözeltilerinin <i>S.epidermidis</i> bakteri türüne etkisi	40
Şekil 29: %3 slime salgı çözeltilerinin <i>S.epidermidis</i> bakteri türüne etkisi	40
Şekil 30: %0.5 mukus salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	41
Şekil 31: %0.5 slime salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	41
Şekil 32: %1 mukus salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	42
Şekil 33: %1 slime salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	42
Şekil 34: %3 mukus salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	43
Şekil 35: %3 slime salgı çözeltilisinin <i>P. fluorescens</i> bakteri türüne etkisi	43

KISALTMALAR

GAG	Glikozaminoglikan
ECM	Ekstrasellüler Matriks
Na ⁺	Sodyum İyonu
K ⁺	Potasyum İyonu
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
PLA	Polylactic Acid
PGA	Polyglycolic Acid
PCL	Polycaprolactone
PLGA	Polylactic-co-glycolic Acid
PLLA	Poly-L-lactic acid
HAp	Hidroksiapatit
HA	Hyaluronik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
FT-IR	Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
PBS	Phosphate Buffered Saline
CH ₃ COOH	Asetik Asit
ETOH	Etanol
<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.mutants</i>	<i>Streptococcus mutants</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, daima yol gösteren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI'ya,

Hem bilimsel hem hayata bakış açısı olarak her gün yeni şeyler öğrendiğim, her zaman daha iyi şeyler başarmam için beni motive eden, bana anlayış gösteren, eğitimim yanında manevi anlamda da desteğini sürekli hissettiren çok değerli hocam Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU'na,

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvarını kullanmama izin veren, her türlü imkânı ve kolaylığı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU'na,

Antimikrobiyal deneylerim için gerekli olan *Pseudomonas fluorescens* bakterilerini kullanmama izin veren Prof. Dr. Figen KOREL'e,

Antimikrobiyal deneylerimi ve FT-IR analizlerimi gerçekleştirdiğim BİYOMER'e,
SEM analizlerimi gerçekleştirdiğim MAM'a,

Deneylerim esnasında bana her koşulda yardımcı olan, aksiliklerle karşılaştığımda çözüm önerileri sunan, varlığını hep hissettiren Dr. Sedef TAMBURACI'ya,

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve hiçbir yardımdan kaçınmayan arkadaşlarıma, bölüm arkadaşlarıma, araştırma görevlilerimize,

Bu aşamada bana sürekli moral veren ve destek olan, öz abim gibi sevdiğim Özgür ŞAMPIYON'a,

Hayatım boyunca bana en büyük desteği veren, bana güvenen, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, sevgilerini hep hissettiren, isteklerimin, hayallerimin arkasında duran ve durmama yardımcı olan, hayattaki en değerli varlığım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SALYANGOZ SALGILARI VE KITOSAN TEMELLİ KIKIRDAK DOKU İSKELELERİNİN BİYOUYUMLULUK VE MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN ANALİZİ

Merve PERPELEK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyomekanik Anabilim Dalı, merveperpelek@gmail.com, Balçova –İZMİR

ÖZET

Kıkırdak hasarları ortopedi alanında oldukça sık görülen klinik bir durumdur. Ototograft, allograft olarak bilinen geleneksel tedavi yöntemleri olmasına rağmen, bu tedaviler donör morbiditesi, enfeksiyonlar ve immünojenik reaksiyonlar gibi risk faktörlerine sahiptir. Yapılan son araştırmalar cerrahi işlemlerin yerine geçebilecek yöntemler oluşturmaya yöneliktir. Bu durum araştırmacıları doku mühendisliği alanına yöneltmiştir.

Bu çalışmada kitosan, kitosan-slime ve kitosan-mukus içerikli doku iskeleleri üretilmesi ve oluşturulan yapıların, kıkırdak doku için uyumluluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Kitosan-slime ve kitosan-mukus doku iskeleleri farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %3) salyangoz (*Helix aspersa*) salgıları eklenerek oluşturulmuştur. Doku iskeleleri liyofilizasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve doku iskelelerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal kompozisyonu Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiştir. Ayrıca şişme oran testi, gözeneklilik deneyi, biyobozunurluk deneyi, biyomekanik (basma testi) analizler ve beş bakteri türü kullanılarak antimikrobiyal testler yapılmıştır.

Amaçlandığı gibi salyangoz salgıları içeren doku iskeleleri üretimi gerçekleştirilmiştir. Polimere eklenen salgı oranları arttıkça mekanik dayanımın ve biyobozunurluğun arttığı, şişme oranının ise azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde salgı oranının fazla olduğu yapıların gözenek çaplarında, kontrol grubuna göre azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak yapılan gözeneklilik deneyinde bütün grupların %80'in üzerinde gözenekliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte yapılan antimikrobiyal testler sonucunda salgıların beş bakteri türünden, iki bakteri türüne etki ettiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Kitosan, *Helix aspersa*, Mukus, Slime, Kıkırdak Doku Mühendisliği

BIOCOMPATIBILITY AND MECHANICAL PROPERTY ANALYSIS OF CARTILAGE SCAFFOLDS BASED ON SNAIL SECRETIONS AND CHITOSAN

Merve PERPELEK, Dokuz Eylul University, Faculty of Health Sciences,
Biomechanics Department, merveperpelek@gmail.com, Balçova –İZMİR

ABSTRACT

Cartilage damage is an highly observed clinical situation in orthopaedic events. Although there are traditional techniques known as autografting, allografting these treatments have risk factors such as donor site morbidity, infections and immunogenic reactions. In the recent years, researchers aimed to create new methods to replace surgical procedures. This situation led the researchers to the tissue engineering applications.

In this study, it was aimed to produce scaffolds containing chitosan, chitosan-slime and chitosan-mucus and to investigate the compatibility of the formed structures to cartilage tissue. Chitosan-slime and chitosan-mucus tissue scaffolds were created by adding snail(*Helix aspersa*) secretions at different amounts (0.5%, 1% and 3%). Scaffolds were obtained by using the lyophilization method and morphology of tissue scaffolds were determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) and chemical composition by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). In addition, swelling ratio test, porosity test, biodegradation test, biomechanical analysis (compression tests) and antimicrobial tests for five different strains were performed.

As a result, scaffolds containing snail secretions have been produced as intended. As the secretion ratios added to the polymer increased, the mechanical strength and biodegradation increased and the swelling rate decreased. It was determined that the pore diameters of the structures with higher secretion rate in the obtained SEM images were decreased compared to the control group. Furthermore, porosity for all scaffolds was more than 80%. Also, the antimicrobial tests have been indicated that the snail secretions effect two bacterial strains out of five.

Key Words: Chitosan, *Helix aspersa*, Mucus, Slime, Cartilage Tissue Engineering

1. GİRİŞ VE AMAC

Hem ülkemizde hem de dünyada birçok insan kıkırdak yaralanmaları sebebi ile sorunlar yaşamakta ve bu durum yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. İç vasküler ağın bulunmaması nedeniyle bu doku kendini onarıp yenileyememektedir. Kıkırdak hasarlarının tedavi yöntemi için birçok seçenek bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler immünojenik tepkiler ve yüksek enfeksiyon riski gibi sorunlara sahiptir. Ayrıca hasar boyutuna göre hastalar protez kullanmak durumunda kalabilir. Doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar ve geliştirilen yöntemler bu nedenle oldukça önemli bir role sahiptir.

Bu çalışmada, doğal malzeme olan salyangoz (*Helix Aspersa*) salgılarını kullanarak doku iskelesi elde edilmesi ve bu doku iskelelerinin kıkırdak doku rejenerasyonu için uyumluluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Doku iskelelerinin oluşturulması için, salyangozların hareketi esnasında arkasında bıraktığı salgı (iz mukusu, slime) ve dorsal ve lateral ayak epitelinde bulunan bezler tarafından üretilen salgı (adeziv mukus) kullanılmıştır. Çalışmada; kitosan, slime-kitosan ve mukus-kitosan kullanılarak doku iskeleleri oluşturulmuştur. Doku iskeleleri dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemi ile oluşturulup, doku iskelelerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal kompozisyonu Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiştir. Ayrıca şişme oran testi, gözeneklilik deneyi, biyobozunurluk deneyi, biyomekanik (basma testi) ve antimikrobiyal testler yapılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda salyangoz salgıları eklenerek elde edilen doku iskelelerinin kontrol grubuna göre mekanik dayanımı arttırdığı ve yapıların daha hızlı bozunmalarını sağladığı görülmüştür. Doku iskelelerinde oldukça iyi oranlarda gözeneklilik elde edilmiştir. Ancak salgı oranı arttıkça gözenek çaplarının ve yapıların su tutma özelliğinin azaldığı tespit edilmiştir. İçeriğinde kollajen, elastin, glikozaminoglikan ve allontoin bulunan salyangoz salgılarının yapılan antimikrobiyal test sonuçlarında *S.epidermis* ve *P.fluorescens* bakteri türünde etkili olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan salyangoz salgıları ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasına karşın doku iskelesi kullanımı olarak yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu açıdan, elde edilen sonuçlar literatüre önemli bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca üretilen doku iskelelerinin *in vitro* hücre kültürü ve *in vivo* deney hayvanı çalışmaları ile daha da geliştirilerek, kıkırdak hasarları için kullanılabilecek bir potansiyele sahip olabileceği öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Doku

Kıkırdak dokusu hücre, lif ve hücrelerarası amorf maddeden meydana gelen bir yapıdır. Lif ve hücrelerarası maddenin oluşturduğu yapıya matriks (ekstrasellüler matriks) adı verilmektedir. Matriks içeriğinde proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar bulunmaktadır. Proteoglikanlar, kıkırdak dokunun sertliğini sağlamaktadır. Kıkırdak hücrelerine kondrosit, bunların yerleştikleri yapılara ise lakuna adı verilmektedir. Kıkırdak dokunun etrafı perikondrium adı verilen sağlam bir fibröz bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu kılıf ayrıca kıkırdak metabolizması için gerekli olan bir yapıdır.

2.2. Kıkırdak Türleri

Matriks yapısına bağlı olarak, kıkırdak çeşitleri elastik kıkırdak, fibröz kıkırdak ve hiyalin kıkırdak olarak sınıflandırılmaktadır. Kıkırdak türlerinin hücre yapıları Şekil 1’de gösterilmektedir [1].

2.2.1. Elastik Kıkırdak

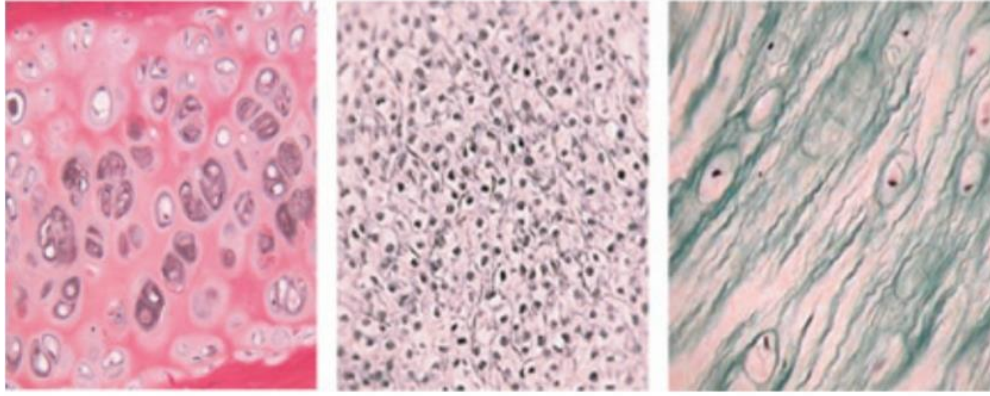
Yapısında elastik liflerin çoğunlukta olduğu, elastik özellik gösteren ve perikondrium içeren kıkırdak türüdür. Dış kulak, epiglottis, lariks gibi bölgelerde bulunan bir dokudur. Yapısal olarak hiyalin kıkırdağa benzemekte ancak lif yapısı olarak farklılık göstermektedir. Elastik kıkırdağın hücreleri yuvarlağımsı ve kapsüllüdür. Ayrıca hücrelerin sitoplazmalarında mevcut olan yağ ve glikojen miktarı, hiyalin kıkırdağın hücrelerine oranla daha azdır.

2.2.2. Fibröz Kıkırdak

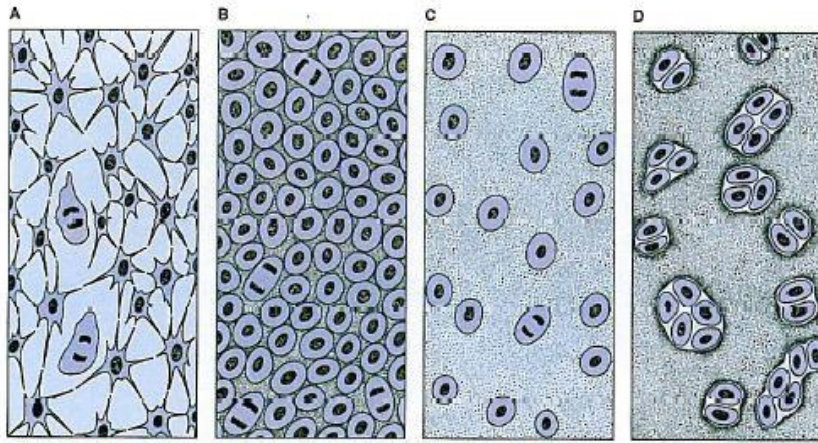
Fibröz kıkırdağın içeriğinde oldukça yoğun kollajen tip I lifleri bulunmaktadır. Bu lifler gerilmeye karşı dirençli bir yapıya sahiptir. Fibröz kıkırdağın bulunduğu yerlere intervertebral diskler ve simfizis pubis örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca tendon ve ligamentlerin kemiklere birleştiği yerlerde de bu kıkırdak tipi görülmektedir. Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ve hiyalin kıkırdak doku arasında bir karaktere sahiptir. Fibröz kıkırdak hücreleri tek ve ikili gruplar halinde bulunmaktadır.

2.2.3. Hiyalin Kıkırdak

Hiyalin kıkırdak vücutta en yoğun olarak bulunan kıkırdak tipidir. Hareketli eklemlerin yanında, solunum sisteminin burun, trakea, bronş gibi bölgelerinde, kaburgaların sternal uçlarında bulunan bir dokudur. Embriyonun iskeleti tamamen hiyalin kıkırdaktan oluşmaktadır. Gelişmenin ileri aylarında iskelet sistemindeki kıkırdak, yerini yavaş yavaş kemik dokuya bırakır. Hiyalin kıkırdağın histogenezi Şekil 2’de görülmektedir.



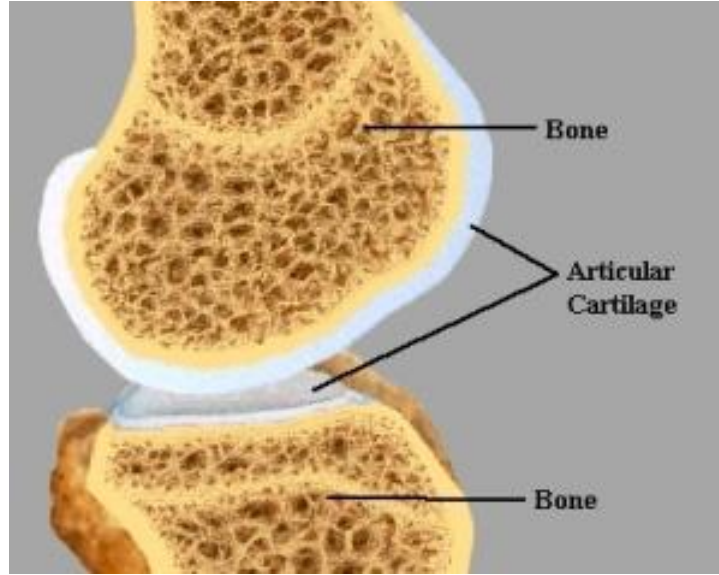
Şekil 1: Kıkırdak türlerinin hücre yapıları(hiyalin kıkırdak, elastik kıkırdak, fibröz kıkırdak)



Şekil 2: Hyalin kıkırdağın histogenezi. A; mezenkim doku, B; Mezenkim hücrelerinin bölünerek çoğalması, C; Kondroblastların birbirinden uzaklaşması, D; Kıkırdağ hücrelerinin bölünmesi ve izogen grupların oluşması

2.3. Eklem Kıkırdağı

Eklem kıkırdağı yapısında sinir, damar ve lenfatik dokular bulunmamaktadır [2]. Eklem kıkırdağının %65-80'i su, %10-20'si kollajen (%95 tip II kollajen), %10-15'i proteoglikanlar, %5'i hücre ve diğer matriks bileşenlerinden meydana gelmektedir [3]. Kıkırdağın beslenmesi difüzyon yolu ile gerçekleşmektedir. Sinovyal dokunun dış kısmı daha kanlı olduğundan, önce sinovyal dokudan sinovyal sıvıya doğru difüzyon olmakta daha sonra ise kıkırdaktaki membrandan (6-8 nm porlardan) geçilerek kondrositlere ulaşılacak şekilde ikinci bir difüzyon gerçekleşmektedir [2]. Şekil 3'te eklem kıkırdağının yapısı gösterilmektedir [4].



Şekil 3: Eklem kıkırdağı

2.3.1. Eklem Kıkırdağının Yapısı

Eklem kıkırdağı; histolojik olarak, ekstrasellüler matriks ve matriks içinde bulunan kıkırdak hücrelerinden meydana gelir. Kondrojenik hücreler, hem kondroblastlara hem de öncü hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Kondroblastlar bol miktarda veziküller içeren aktif hücrelerdir. Kondrositler, kondroblastların olgunlaşıp matriks ile sarılı hale gelmesiyle oluşan ve büyük çekirdeği olan hücrelerdir [3]. Eklem kıkırdağının içeriği Şekil 4'te şematize edilmiştir [5].

2.3.1.1. Kondrositler

Kondrositler, kıkırdak doku içerisinde lakunalara gömülü halde bulunurlar. Hiyalin kıkırdağın hacminin %1-6'sını oluşturmaktadır. Olgun kondrositler Tip II kollajen, proteoglikan ve spesifik non-kollajenöz proteinleri sentezler [2]. Bazı kondrositlerin ECM'ye uzanan uzantıları vardır ve kondrositler mekanik ortamı algılamada rol oynayarak yüke tepki olarak matriks özelliklerini değiştirmektedir. Kondrositler, olgun bireylerde kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelerden meydana gelmektedir. Embriyogenez sırasında, MSC'ler kondrositlere dönüşmeye başlar ve bir kıkırdak matriksi salgılar. Bu süre zarfında hücreler bölünmeye devam etmektedir [6].

2.3.1.2. Ekstrasellüler Matriks

Ekstrasellüler matriksin içeriğinin yaklaşık %40'ı kollajenden meydana gelmekte ve birincil olarak tip II kollajen içermektedir. Ayrıca matriks içinde proteoglikanlar, glikoproteinler, kollajen dışı proteinler ve hücre dışı sıvı bulunmaktadır.

2.3.1.2.1. Kollajen

Eklem kıkırdağında, kollajen II, VI, IX, X ve XI tipleri bulunmaktadır. Ekstrasellüler matriks ise % 90-95 oranında tip II kollajenden oluşmaktadır. Tip II kollajen, diğer kollajen tiplerine göre su ile daha fazla etkileşime olanak sağlayan yüksek miktarda bağlı karbonhidrat grubu içermektedir. Tip IX ve tip XI, bir örgü oluşturmak için birbirine geçen fibrilleri meydana getirir. Bu oluşum, diğer makromoleküllerin fiziksel olarak tutulmasını sağlamakla kalmayıp aynı zamanda gerilme mukavemeti oluşturmaktadır. Tip IX kollajenin örgü yapısının stabilitesine katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Tip X ise matrisin kalsifiye alanlarının yakınında bulunmaktadır [7,8].

2.3.1.2.2. Proteoglikanlar

Proteoglikanların içeriğinde yaklaşık % 95 polisakkarit ve yaklaşık % 5 protein bulunmaktadır. Protein çekirdeği bir veya daha fazla glikozaminoglikan zinciri çeşidi ile ilişkilidir. GAG zincirleri, bir amino şeker disakkaritlerinden ve başka bir şekerden yapılmış dallanmamış polisakkaritlerdir. GAG denilen protein zincirlerinin oluşturduğu yapıya agregan adı verilmektedir. Disakkaridin en az bir bileşeni negatif yüklü bir sülfat veya karboksilat grubuna sahiptir, bu nedenle GAG'lar katyonları çekerken ve su ile etkileşimi kolaylaştırırken birbirlerini ve diğer anyonları itmeye eğilimlidir. Hiyaluronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat genellikle eklem kıkırdağında bulunan GAG'lardan bazılarıdır [8,9,10].

Eklem kıkırdağında hem geniş agregasyon monomerleri hem de daha küçük proteoglikanlar vardır. Agregasyon proteoglikanlar veya agreganlar, protein çekirdeğine bağlı keratan sülfat ve kondroitin sülfat GAG'ları olan monomerlerden oluşur. Çoğu agregan moleküllerinde, bağlantı proteinleri monomerlerin birçoğunu bir hiyaluronik asit zincirine bağlar. Agreganlar ECM'nin interfibriler boşluğunun çoğunu doldururlar ve su çekebilme yetenekleri sayesinde eklem kıkırdağında esneklik ve stres dağılımının çoğundan sorumludurlar [8,9].

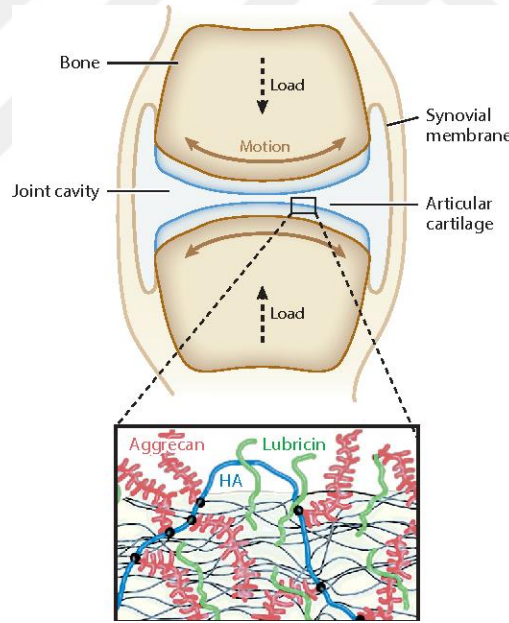
Daha küçük proteoglikanlar; dekorin, biglikan ve fibromodulin içerirler. Daha büyük protein çekirdeklerine ve daha az sayıda GAG zincirine sahiptirler. Agreganların aksine, bu moleküller dokunun fiziksel özelliklerine sahip değildir, ancak hücre fonksiyonunda ve kollajen matriksinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir [5,8].

2.3.1.2.3. Kollajen Olmayan (non-kollajenöz) Proteinler

Eklem kıkırdağında bir dizi kollajen olmayan protein ve glikoprotein bulunmaktadır. Bu moleküllerin bazıları hem ECM matrisini stabilize etmeye hem de kondrosit matriks etkileşimlerine yardımcı olur. Bu polipeptidler kondrositleri çevreleyen matrikse bağlanır. Çoğu dokuda yaygın olarak bulunan bu proteinler, eklem kıkırdağında da gözlenir ve glikoproteinler ile benzer işlevler gerçekleştirdiği düşünülmektedir [6,9].

2.3.1.2.4. Eklem Sıvısı

Eklem sıvısı, dokunun ıslak ağırlığının % 80'ini oluşturan, hiyalin kıkırdağın önemli bir parçasıdır. Bu sıvı; suya ek olarak, ECM'de negatif yüklü GAG'ları dengelemek için gazlar, metabolitler ve çok miktarda katyon (Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} gibi) içermektedir. Bu katyonlar kıkırdağın hem mekanik hem de fizyo-kimyasal davranışları için büyük öneme sahiptir. Avasküler yapıdaki kıkırdağın beslenmesi ve oksijen ihtiyacı bu sıvıdan sağlanır. Dokular arası sıvı değişimi, doku ECM bileşenleriyle etkileşime girse bile, dokuya, sıkıştırmaya direnç gösterme ve deformasyondan sonra normal şekle geri dönme yeteneği sağlamaktadır [5].



Şekil 4: Eklem kıkırdağı ve içeriği

2.3.1.3. Kıkırdak Dokunun Katmanları

Eklem kıkırdağı, matriks morfolojisi ve biyokimyası arasındaki farklılıklara göre dört katmandan (yüzeyel, geçiş, orta ve kalsifiye) oluşmaktadır. Her katman, üç ayrı bölgeye sahiptir: perisellüler bölge, territorial bölge ve interterritorial bölge. Perisellüler bölge ve territorial bölgede ECM'ye kondrosit bağlanması ve yüklenme sırasında hücrelerin korunması gerçekleşir. Perisellüler bölge nankollajenöz bağlayıcı proteinler içermektedir. Territorial

bölgenin bir kısmı, perisellüler kılıfı takip eden ancak iki veya daha fazla kondrositi kapsayacak şekilde uzanabilen kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Hücrelerden uzaklaştıkça, territorial bölgede kollajen hizalanması daha azdır ve fibriller kondrosit(ler) etrafında bir sepet yapısı oluşturmak için birbirlerine çapraz olarak dizilir. İnterterritorial bölgede fibril çapında artış ve fibrillerin daha paralel şekilde dizilimi gerçekleşir. Bu bölge, dokunun esas olarak mekanik özelliklerinden sorumludur [9].

2.3.1.3.1. Yüzeyel Katman

Yüzeyel katman en ince bölgedir ve iki ayrı katmandan oluşmaktadır. Baskın olarak kollajen liflerden oluşan asellüler tabakası (lamina splendens) eklemi örter. Daha dipte olan ikinci tabaka, eklem yüzeyine paralel uzun eksenleri olan düzleştirilmiş kondrositlerden oluşur. Bu bölgedeki kondrositler, yüksek konsantrasyonda kollajen ve düşük konsantrasyonda proteoglikan sentezlerler [11]. Ayrıca bu bölgede bol miktarda fibronektin ve su mevcuttur. Moleküllerin bu kombinasyonu ve fibrillerin paralel yerleşimi matriksin bu alanda çekme ve kayma mukavemetinin daha fazla olmasını sağlar. Yüzeyel katman aynı zamanda dokunun basınç dayanımı açısından oldukça önemlidir [6].

2.3.1.3.2. Geçiş Katmanı

Yüzeyel katmandan daha fazla hacim işgal eden bu katman; endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve mitokondri gibi sentetik organelleri içeren küresel kondrositlerden oluşmaktadır. Bu alandaki ECM daha büyük kollajen fibriller, daha fazla proteoglikan, daha az kollajen ve yüzeyel katmana göre daha az su içermektedir. İnterterritorial fibriller, bu bölgede eklem yüzeyine eğik veya rasgele hizalanmıştır [8,9].

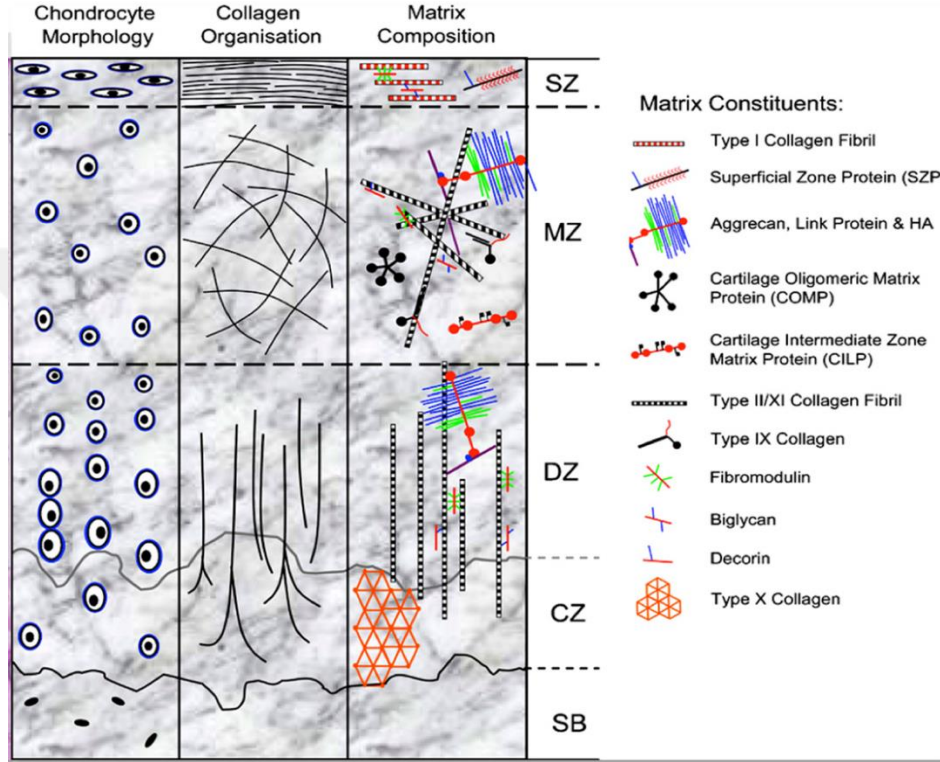
2.3.1.3.3. Orta Katman

Genellikle en büyük ve en geniş çaplı kollajen fibrilleri içeren, proteoglikanların en çok olduğu ve en az suya sahip katmandır. Hücreler, geçiş katmanında olduğu gibi küreseldir. Ancak sütunlarda eklem yüzeyine dik olarak kümelenir. Matriksin geçiş katmanı her sütunu çevreler [8,9]. Bu bölgedeki hücreler, yüzeyel katmandaki kondrositlerden on kat yüksek sentetik aktivite gösterirler [12,13]. Aynı zamanda, bu alanda, interterritorial liflerin dizilimi, eklem yüzeyine dik olarak hizalanacak şekilde tekrar değişir [8,9].

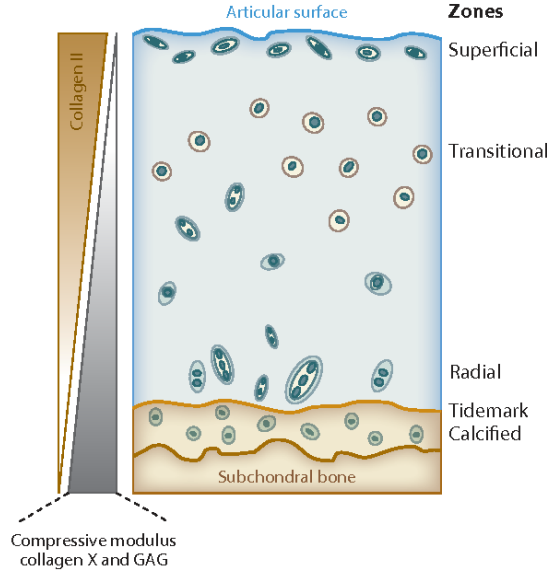
2.3.1.3.4. Kalsifiye Katman

Kalsifiye kıkırdak katmanı subkondral kemiğe en yakın yerde bulunmakta ve yumuşak hiyalin kıkırdaktan kemiğe geçiş olarak işlev görmektedir. Yumuşak kıkırdak ile çok daha sert kemik arasındaki ara yüzeye bağlı olarak bu bölgede belirgin kayma gerilmesi oluşabilir [7].

Kondrositler burada daha küçüktür ve neredeyse hiç endoplazmik retikulum yoktur. Bazı yerlerde, kalsifiye bir matrikse gömülmüş ve böylece çok düşük bir metabolik aktivite gösteren küçük hacimli hücreler bulunmaktadır [8,9]. Bu hücreler, önemli yapısal bütünlüğü oluşturan ve subkondral kemik boyunca şok absorpsiyonu sağlayan tip X kollajeni sentezleyen özel bir yapıya sahiptir [11]. Eklem kıkırdağının yapısı ve katmanları Şekil 5 ve Şekil 6’da belirtilmektedir [13,5].



Şekil 5: Eklem kıkırdağı yapısı ve katmanları. SZ; yüzeyel katman, MZ; orta katman, DZ; geçiş katmanı, CZ; kalsifiye katman, SB; subkondral kemik



Şekil 6: Eklem kıkırdağı katmanları ve katmanlara göre kollajen II, GAG, basma modülü özellikleri

2.4. Eklem Kıkırdağının İşlevleri ve Biyomekanik Davranışı

Eklem kıkırdağı, benzersiz viskoelastik özelliklere sahip ince bir bağ doku tabakasıdır. Başlıca işlevi, düşük sürtünmeli bir eklem yüzeyi sağlamak ve gelen yüklerin altta bulunan subkondral kemiğe iletilmesini kolaylaştırmaktır. Eklem kıkırdağı, yüksek sıklık yüklerine dayanma kabiliyetine sahiptir [14,15,16].

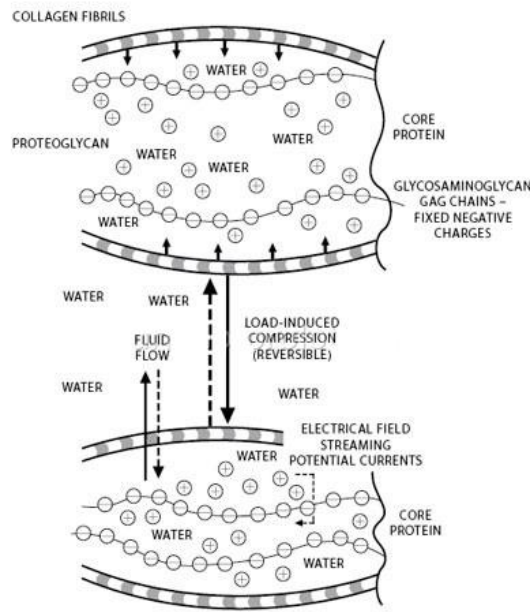
Eklem kıkırdağının biyomekanik davranışını anlayabilmek için, doku bifazik bir ortam olarak düşünülmelidir: Sıvı faz ve katı faz. Su, sıvı fazın temel bileşenidir ve dokunun ıslak ağırlığının % 80'ine katkıda bulunur. Sıvı fazda ayrıca sodyum, kalsiyum, klor ve potasyum gibi inorganik iyonlar da bulunur. Katı faz, gözenekli ve geçirgen olan ECM ile karakterize edilir [17,18,19]. Proteoglikan agregatları ve eklem sıvısı arasındaki ilişki, negatif elektrostatik itme kuvvetleri yoluyla kıkırdağa karşı basınç direnci sağlar [20,21,22].

Eklem yüklenmesi sırasında eklem temas kuvvetlerinin hızlı bir şekilde uygulanması, eklem sıvı basıncında ani bir artışa neden olur. Basıncıdaki bu lokal artış, sıvının ECM'den dışarı çıkmasına neden olmakta ve matris üzerinde büyük bir sürtünme direnci meydana getirmektedir [18,19,21,23,24]. Basınç yükü kaldırıldığında, eklem sıvısı dokuya geri akar. Şekil 7'de kıkırdak üzerine gelen yüklerin sönümlenmesi şematize edilmiştir [25].

Ayrıca eklem kıkırdağı viskoelastik bir özellik sergiler ve sabit bir yüke veya deformasyona maruz kaldığında zamana bağlı davranış gösterir [26]. Eklem kıkırdağında, akışa bağlı ve akıştan bağımsız olmak üzere viskoelastisiteden sorumlu iki mekanizma mevcuttur.

Akışa bağlı mekanizma, dokular arası sıvı akışına ve bu akışla ilişkili sürtünme direncine bağlıdır [27,28]. Dokular arası sıvı akışından kaynaklanan bu direnç bifazik viskoelastik davranış olarak bilinir. Makromoleküler hareketin neden olduğu viskoelastiklik bileşeni ise akıştan-bağımsız olarak veya kolajen-proteoglikan matrisinin asıl viskoelastik davranışı olarak bilinir. Sonuç olarak, akışkan basıncı toplam yük desteğinin önemli bir bileşenini sağlar ve böylece katı matris üzerine etki eden gerilimi azaltır.

Kıkırdağın orta katmanı boyunca kompleks bileşimi ve organizasyonu, kaymaya karşı dirençli özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunur. Rastgele dağılmış kollajen fibrillerinin gerilmesi, kıkırdağın makaslama stresine tepki sağlar [29,30]. Çekme kuvvetine dirençli özellikler, kollajen fibrillerin hassas moleküler düzenlemesinden kaynaklanır. Kollajen fiberin stabilizasyon ve nihai gerilme dayanımı, iç ve moleküller arası çapraz bağlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 7: Kıkırdağın yük sönümlemesi

2.5. Kıkırdak Rejenerasyonu

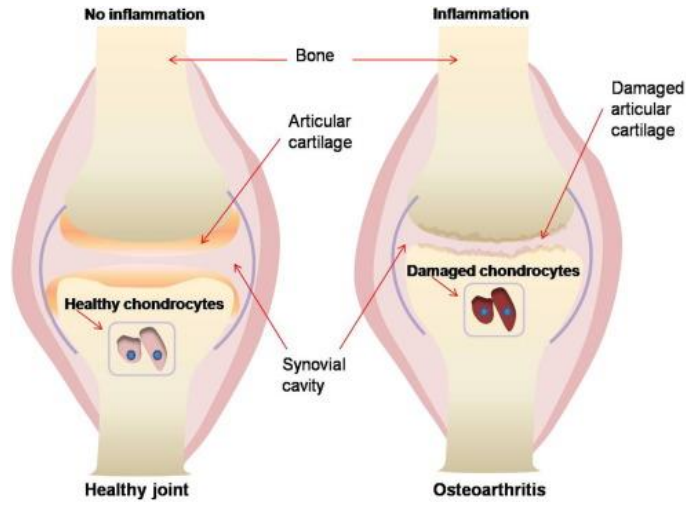
Kıkırdak, darbe kuvvetlerini emmek, yükü altta bulunan kemiğe aktarmak ve eklem düşük sürtünmeli hareketine izin vermek gibi çeşitli temel fonksiyonlara sahiptir. Bununla birlikte, doğuştan meydana gelen hasarlar, hastalık veya travma gibi sebepler kıkırdak dejenerasyonuna neden olduğunda, eklem kıkırdağında kan damarları bulunmaması sebebi ile, kandaki hücrelerin ve kimyasal faktörlerin sağladığı doku onarım işlemi gerçekleşmez. Eğer herhangi bir sebep ile hasar gören veya bozulan bölge küçük ise perikondrium,

kondroblastlar tarafından (kondrojenik aktivite) yapılan yeni kıkırdak doku ile kaplanmaktadır. Fakat hasar gören bölge daha büyük ise kıkırdak doku kendini onarıp yenileyemez.

2.5.1. Kıkırdak Hasarları ve Geleneksel Tedavi Yöntemleri

Travmadan kaynaklanan kıkırdak lezyonları sıklıkla spor aktiviteleri sırasında ortaya çıkar. Bunun dışında ilerleyen yaşlarda meydana gelen kıkırdak hasarları da mevcuttur. Şekil 8'da normal ve osteoartritli eklem kıkırdağı görülmektedir [31]. Kondral lezyonlar, kıkırdağın içinde kalan subkondral kemiği etkilemez ve avasküler bir yapı olduğu için bu lezyonlar kendiliğinden iyileşmez. Osteokondral hasarlarda ise mezenkimal kondroprogenitör hücreler lezyonu kaplar ve vaskülarize subkondral kemiğe nüfuz ederek kıkırdak oluşturabilirler. Oluşan yapı doğal hiyalin kıkırdağın fonksiyonel özelliklerini birebir içermeyen bir fibröz doku olsa bile, bazı tamirler meydana gelebilir [21,33].

Kıkırdak hasarlarının tedavisi için en çok kullanılan yöntem subkondral kemiğin delinerek yeni kıkırdak doku oluşumunun uyarılmasıdır. Subkondral kemik delinerek, vasküler sistemden kaynaklanan MSC'lerin eklem girmesi sağlanır. Bu hücreler subkondral kemiğin yüzeyini kaplar ve kıkırdak oluşturabilirler. Oluşan yapı doğal hiyalin kıkırdağın fonksiyonel özelliklerini birebir içermeyen bir fibröz doku olsa bile, bazı tamirler meydana gelebilir. Diğer bir yöntem ise daha az yüklenmeye maruz kalan bir bölgeden alınan kıkırdağın hasarlı bölgeye eklenmesidir. Bu yönteme transplantasyon adı verilir. Eğer doku kişinin kendisinden alınıyorsa otogreft, bir donörden alınıyor ise allogreft adı verilir. Otogreftler, genellikle patelladan, femoral kondilden veya proksimal fibuladan alınan kıkırdaklardır [34]. Ancak farklı bölgelerden alınan dokular eklem yüzeylerine uygulanan yüklenmelere dayanamaz [6]. Allogreft transplantasyonlar ise doku uyumsuzluğu sebebi ile immünolojik reaksiyonlara sebep olmaktadır [6,35]. Başka bir tedavi yöntemi olan mikro kırık oluşturma ise kıkırdaktan fibrokartilaj veya hiyalin kıkırdaktan bir doku oluşmasını uyarır. Hiyalin benzeri kıkırdak oluşumu durumunda bile mekanik özellikler ve doku yapısı doğal dokununkinden farklıdır [34]. Sonuç olarak, bu yaklaşımın klinik değeri ve kullanım endikasyonları belirsizliğini korumaktadır. Lazer veya elektriksel stimülasyon, sürekli pasif hareket ve farmakolojik ajanların kullanıldığı tedaviler, kıkırdağın onarılması için daha az invaziv teknikler sunar. Bu tedaviler için optimal ilaç ve doz seçimi hala araştırılmaktadır. Ayrıca kullanılan yöntemler küçük kusurlar için (3 mm'den az) iyi sonuçlar vermektedir [6]. Bu yöntemlerin büyük hasarlar için sonuç vermemesinin yanı sıra sonuç olarak istenilen doğal dokular da elde edilememektedir.



Şekil 8: Normal eklem kıkırdağı ve osteoartritli eklem kıkırdağı

2.5.2. Doku Mühendisliği Uygulamaları

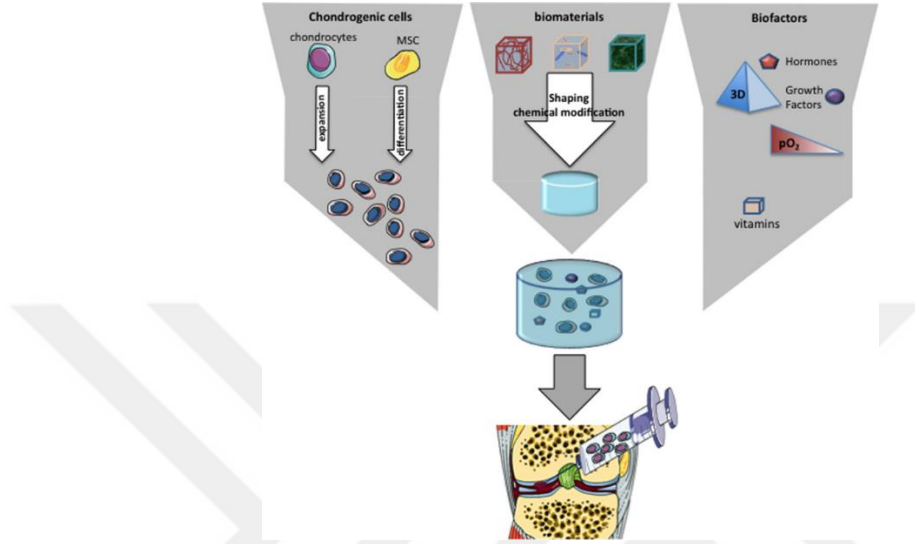
İmmünolojik reaksiyonlar, doku ve organ nakli için başlıca engeller olmaya devam etmektedir. Ayrıca, transfer edilen doku, doğal dokunun tüm fonksiyonlarını içermez ve çeşitli komplikasyonlar doğurabilir. Biyolojik olmayan materyallerin enfeksiyon, dokuya uyumsuzluk ve sınırlı dayanıklılık gibi sorunlar göstermesi sebebi ile doku mühendisliği sadece doku ve organ nakli için değil, aynı zamanda hastalıkların tedavisi için de ümit verici ve önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir [36].

Doku mühendisliği, değişen dokuların işlevlerini önemli ölçüde yenileyebilen, biyolojik ikame maddeleri geliştirmek için mühendislik ve biyolojik bilim ilkelerini birleştiren yeni bir disiplindir [37]. Bu disiplin, biyo-malzemelerin, hücrelerin ve biyolojik veya çevresel faktörlerin "doku mühendisliği üçlüsü" olarak da bilinen bir birleşmesine dayanmaktadır. Bu birleşimin eklem kıkırdağı tedavisi için şematize edilmiş hali Şekil 9'da gösterilmektedir [38]. Son zamanlarda doku mühendisliği alanında biyolojik olarak kullanılabilen doku iskeleleri, uygun hücre kaynakları ve / veya biyo-aktif sinyal moleküllerinin kullanımı hastalarda ağrı oluşturan tedavilerin yerini almaktadır [39].

Kemik, kıkırdak, tendon, sinirler, damarlar, deri, mide-bağırsak ve ürogenital sistemlerin dokuları dahil olmak üzere farklı dokuların mühendisliği için pek çok çalışma yapılmıştır.

Çeşitli biyo-malzemeler (sentetik polimerler; PLA, PGA, PLLA, PLGA, PCL; doğal polimerler; kollajen, HAp, HA, aljinat gibi) ve değişik teknikler kullanılarak üretilen doku iskeleleri, vücutta farklı doku ve organları yenileme amacı ile tasarlanmaktadır. Doku tipine bakılmaksızın, doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hazırlanan bir iskelenin uygunluğunu belirlemek için birkaç önemli husus mevcuttur. Bunlar; biyo-uyumluluk, biyo-bozunurluk,

mekanik özellikler, doku iskelesi yapısı ve üretim tekniğidir [40]. Doku iskeleleri uygun bozunma hızında olmalı, vücuda uyumlu bileşenlerden oluşmalı ve gerekli mekanik dayanımı sağlamalıdır. Ayrıca hücrelerin yerleşmesine izin veren, oksijen ve besin difüzyonuna imkan sağlayan gözenekli yapıya sahip olmalıdır. İskele tasarlarlarken hedef, hücrelerin yaşayıp, çoğalabildiği ve yeni bir doğal matris oluşuncaya kadar doğal ekstrasellüler matriks yapısının yerini alabilecek ideal yapıyı elde etmektir [41].



Şekil 9: Eklem kıkırdağı onarımı için kullanılan doku mühendisliği üçlüsü

2.6. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak doku mühendisliği hastalık veya travma nedeniyle hasar görmüş kıkırdak dokusunun rejenerasyonu için bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Kıkırdak, rejeneratif yeteneklerden yoksun olduğu için hasar bölgesine uygun hücreleri, biyomateriyalleri ve sinyal faktörlerini sağlayan yaklaşımların geliştirilmesi önemlidir [42,43,44,45]. Yapısında sinir, damar ve lenfatik dokular bulunmayan kıkırdak, yoğun bir hücre dışı matriks (ECM) içine gömülü, seyrek olarak dağılmış kondrositlerden oluşur. Bu ECM, esas olarak *in vivo* işlev için yeterli mekanik özellikler sağlayan tip II kollajen ve proteoglikanlardan oluşur. Kendi kendini tamir etme kabiliyeti sınırlı olduğundan kıkırdak, doku mühendisliği için ideal bir alandır [42]. Kıkırdak doku mühendisliğinde amaç, elde edilen yapay kıkırdağın normal eklem kıkırdağıyla aynı biyomekanik ve yapısal özelliklere sahip olmasıdır. Eklem ancak bu şekilde yüksek gerilme altında kaldığı *in vivo* ortamda normal işlevlerini sürdürebilir [43].

Kemik ve kıkırdak tamiri, progenitör ve enflamatuar hücrelerin göç etme ve iyileşme süreçlerini tetiklemesine izin veren, lokal hasar bölgelerinde sinyaller sağlayan çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edilen karmaşık bir biyolojik olay zinciridir. Doku mühendisliğinde bir yaklaşım, hücresel adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasını

uyarmak için büyüme faktörlerinin verilmesini ve böylece kemik ve kıkırdak yenilenmesini desteklemeyi içerir. Böyle bir yaklaşımda, büyüme faktörleri; optimal olarak tasarlanmış, biyolojik olarak parçalanabilen doku iskeleleri ile birlikte lokal olarak ortopedik bölgelere verilebilir. Doku iskelelerinin rolü, hücresel infiltrasyon için geçici bir substrat ve üç boyutlu matriks oluşturmaktır. Bu süreçte hücreler, materyalin bozunması ile birlikte özel doku tipleri haline gelip büyüyebilirler [44].

Dokuları ve organları rejenere etmek için yapılan hücre kültürü ve polimer doku iskeleleri çalışmaları oldukça umut verici tekniklerdir. Doku mühendisliği uygulamaları için birçok biyobozunur polimer kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Malzemeler arasında, polikaprolakton, poli (laktik-ko-glikolik asit), poli (etilen glikol), poli (vinil alkol), poliüretan, aljinat, jelatin, kollajen ve kitosan gibi doğal veya sentetik polimerler bulunur. Bunlar arasında doğal polimerler, doğal dokulara karşı biyolojik ve kimyasal benzerlikleri nedeniyle özel ilgi görmektedir. Bu bağlamda, kitosan biyouyumluluk, biyobozunurluk, toksik etki göstermemesi, antibakteriyel, fizyolojik inertlik, hemostatik, antitümoral ve antikolesteremik gibi özelliklere sahip olması sebebi ile kıkırdak doku mühendisliğinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [45].

2.7. Kitosan

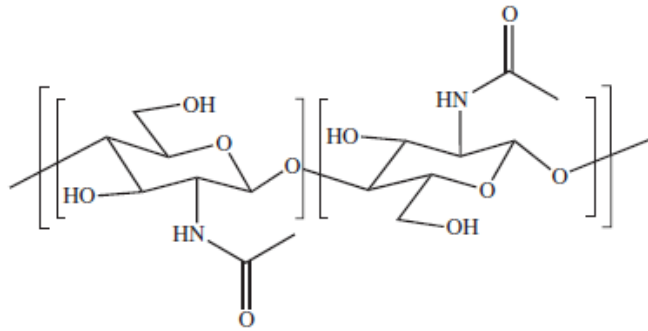
Kitosan, doku mühendisliği alanında oldukça sık kullanılan, β (1-4) 2-amino-2-deoksi-D-glikozun tekrar eden ünitelerinden oluşan, bazı böceklerin kabuklarından üretilen ve bir polisakkarit olan kitinin N-deasetilasyonu ile elde edilen doğrusal, katyonik bir biyopolimerdir. Şekil 10'da kitinin, Şekil 11'de kitosanın kimyasal yapısı verilmektedir [46]. Biyolojik uyumluluğu, biyolojik bozunabilirliği ve antibakteriyel aktivitesi nedeniyle doku iskelesi oluşturmada sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, ekstrasellüler matriksteki bazı glikozaminoglikan (GAG) yapılarına benzerliği, minimal yabancı cisim reaksiyonu ve hücre adezyon özelliklerinden dolayı doku mühendisliği alanında kabul görmektedir [47,48]. Kitosanın en umut verici özelliklerinden biri, hücre nakli ve doku rejenerasyonunda kullanılmak üzere gözenekli yapılar oluşturabilme özelliğidir [49].

Örneğin; üç boyutlu, gözenekli kitosan doku iskelesi asetik asit içinde çözdürülüp dondurulan çözeltinin liyofilize edilmesiyle oluşturulabilir [50].

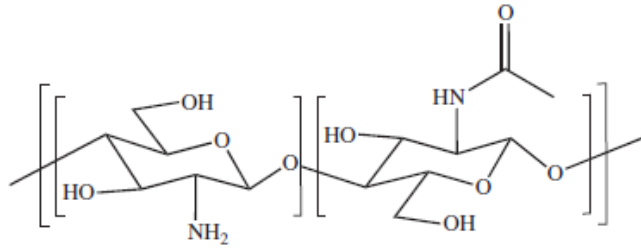
Ek olarak, mikroyapı, kristalinite ve mekanik kuvvet gibi özellikler; kitosan konsantrasyonu, donma hızı, molekül ağırlığının ve başlangıç malzemesinin deasetilasyonunun değiştirilmesiyle kontrol edilebilir. Kitosan ayrıca farmakolojik maddelerin kontrollü salımı için de kullanılabilir [51].

Kitosanın sentetik polimerlere kıyasla birincil potansiyel avantajları kıkırdak dokuyla kimyasal benzerliği ve glikozaminoglikanlarla etkileşime girmesidir. Kitosan filminde yetiştirilen kondrositlerin küresel bir morfoloji sergilediği ve tip II kollajen ve agregan eksprese ettiği zaten gösterilmiştir [52]. Kitosan, pozitif yükleri nedeniyle, hücre zarının negatif kısmı ile etkileşime girebilir ve bu da yeniden yapılanmaya olanak verir.

Sözü edilen özellikleri nedeniyle kitosan, eksik veya hasarlı doku ve organın yerini tutabilecek, hücre bağlanmasına ve çoğalmasına olanak sağlayan üç boyutlu yapıların elde edilebileceği uygun bir biyopolimerdir.



Şekil 10: Kitin'in kimyasal yapısı



Şekil 11: Kitosan'ın kimyasal yapısı

2.8. Salyangoz Salgıları ve Kullanım Alanları

Salyangoz salgıları, antik çağlardan beri tıp alanında yanık ve apseleri tedavi etmek için kullanılmıştır.

18. yüzyılda, çeşitli salyangoz formülasyonlarının dermatolojik bozukluklarla birlikte tüberküloz ve nefritle ilişkili semptomlar için kullanımı tavsiye edilmiştir. 19. yüzyılda ise salyangozlar, çeşitli ilaçların içeriğinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de bu salgılar kozmetik alanında, cilt yenileme, akne ile mücadele, yaşlanmayı önleme ve yara iyileştirme amaçları ile kullanılmaktadır.

2.8.1. Salyangoz Salgıları ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Salyangoz salgıları ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. 2008 yılında Brieva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *in vitro* yaklaşımlar kullanılarak *Cryptomphalus aspersa* salyangoz türünün salgısının rejeneratif özellikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak salgının antioksidan özellikler içerdiği, fibroblast çoğalmasını indüklediği, yara iyileşmesi ve doku plastisitesi için gerekli olan ECM oluşumunu desteklemesiyle tamamlayıcı bir mekanizma sağladığı bulunmuştur [53].

Tsoutsos ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise, derin ve kısmi yüz yanıkları için *Helix aspersa* salgısı içeren bir krem ve yanık merhemi kullanılarak araştırma yapılmıştır. Derin, kısmi yüz yanıkları olan (grup A) 27 erişkin hasta, salyangoz salgısı içeren krem ile; 16 hasta (grup B) ise yanık merhemi kullanılarak tedavi edilmiş ve iyileşme oranları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, *Helix aspersa* salgısı içeren kremin, yanıkların apoptozunu ve yüz yanıklarının epitelizasyonunu hızlandırdığı görülmüştür. Aynı zamanda yanık sonrası ağrı üzerinde de azaltıcı bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [54].

Otsuko-Fuchino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *Achatina fulica* salyangoz türünün salgısından saflaştırılan ve bir glikoprotein olan Achanin'in antibakteriyel özelliği incelenmiştir. Achanin'in sadece gram-pozitif bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* üzerinde değil, aynı zamanda gram-negatif bakteriler *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde de güçlü etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir [55].

Etim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı salyangoz türlerinin (*Archachatina marginata saturalis*, *Archachatina marginata ovum* ve *Achatina fulica*) salgılarının, yaralardan izole edilen *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp ve *Pseudomonas* sp bakterilerine karşı etkinliği araştırılmıştır. Üç salyangoz tipi arasında, *Archachatina marginata saturalis* ve *Archachatina marginata ovum*'un organizmalara karşı *Achatina fulica*'dan daha fazla inhibitör aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Salyangoz salgısının, uygun bir şekilde araştırıldığı takdirde yara tedavisinde kullanılan pahalı sentetik antibakteriyel ajanlara alternatif olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [56].

E-kobon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Achatina fulica* salyangoz mukusundan antikanser peptidleri izole edilerek salgının antitümör özelliği incelenmiştir. Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve normal epitel hücre hattı (Vero) kullanılmıştır. Sonuç olarak farklı yapılara sahip 16 çeşit katyonik ve amfipatik antikanser peptidi öngörülmüştür. Elde edilen bu peptitlerin geliştirilecek olan yeni antikanser ilaçlarında kullanılabileceği belirtilmiştir [57].

Bir diğerk çalışmada ise Pitt ve arkadaşları *Helix aspersa* salyangoz mukusunun antibakteriyel özelliğini araştırmıştır. Birçok bakteri türü ile yapılan çalışmada *Helix aspersa* mukusunun *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türüne karşı etkili olduğu ortaya konmuştur [58].

Angulo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak jelatin/kitosan doku iskelesi hazırlanmış ve bu doku iskelelerine değışik oranlarda salyangoz (*Helix aspersa*) mukusu ve aloe vera ilave edilmiştir. Daha sonra doku iskelelerine karakterizasyon testleri yapılmıştır. Sonuç olarak bu doku iskelelerinin *in vitro* doku gelişimini kolaylaştırmak için kullanılabileceğı belirtilmiştir [59].

2.8.2. *Helix Aspersa* Salyangozu ve Salğı Özellikleri

Kara salyangozları grubuna giren *Helix aspersa* nemli bölgelerde, özellikle bahçelerde yasayan, uzayıp kısalabilen iki çift tentakülü, bir çift gözü ve bir ağız olan, kuvvetli bir kastan oluşan ayak üzerinde hareket edebilen, hermafrodit (iki eşeyli) bir yumusakçadır [60]. 32-38 mm çapında ve 29-33 mm yüksekliğinde kabuğı 4-5 döngüye sahiptir. Kabuğı; kalın, az çok parlak, son döngüsü özellikle kalın ve düzensiz çizgilidir.



Şekil 12: *Helix aspersa*

Yapılan araştırmalar *Helix aspersa* türünün iki tip salgısı olduğunu ortaya koymuştur. Mukus adı verilen salgı dorsal ve lateral ayak epitelinde bulunan bezler tarafından üretilir ve adeziv özellik gösterir. Slime ise salyangozların hareketi esnasında arkalarında bıraktığı salgıya verilen isimdir. İz mukusu olarak bilinir ve ayak tabanındaki bezler tarafından üretilir. Mukus ile slime arasında bulunan temel fark; mukusun içerisinde daha fazla spesifik protein olması ve bu sayede adeziv özellik göstermesidir. Salyangoz salgıları içerisinde vücut ile uyumlu birçok bileşen bulunmaktadır. Bunlar; allantoin, kollajen, elastin, glikolik asit, GAG,

vitamin A,E ve C'dir [61,62]. Kollajen ve elastin, cildin sıkılığını arttırmaya, glikolik asit ölü derilerin atılmasına, allantoin ise yara izlerinin ve çatlakların azalmasına yardımcı olur.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışmada, salyangoz salgıları ve kitosan kullanılarak kıkırdak doku için uyumluluğun araştırıldığı doku iskeleleri elde edilmiştir. Üretilen doku iskeleleri üç farklı oranda hazırlanarak optimizasyon araştırmaları yapılmıştır. Bu nedenle, yapılan çalışma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma için literatür taramaları Mayıs 2017’de başlamış ve tez süresince devam etmiştir. Gerekli malzemelerin temini Ocak 2018’de tamamlanmış ve deneylere Şubat 2018’de başlanmıştır. Şubat 2018-Mart 2018 arasında, İYTE Kimya Mühendisliği Bölümü’nde planlanan çalışmalar yapılmış ve doku iskelelerinin hazırlanması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Mart 2018-Mayıs 2018 tarihleri arasında elde edilen doku iskelelerinin karakterizasyon deneyleri yapılmıştır. Tez sunumu Haziran 2018 tarihinde yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Tamamlanmış olan bu araştırmada, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik doku iskelesi üretimi ve bu doku iskelelerinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, araştırmanın evreni kıkırdak doku mühendisliği ve örnekleme de kıkırdak doku iskeleleridir. Bu çalışma için üç farklı oran kullanılarak doku iskelesi üretilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Tez çalışmasında doku iskeleleri, salyangoz salgıları ve kitosan kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışma grupları olarak; saf kitosandan elde edilen doku iskeleleri kontrol grubu, kitodan-slime elde edilen doku iskeleleri ve kitosan-mukus kullanılarak oluşturulan doku iskeleleri deney grupları olarak planlanmıştır.

Doku iskeleleri liyofilizasyon yöntemi ile elde edildikten sonra karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Bunlar SEM, gözeneklilik deneyi, şişme oran testi, biyomekanik (basma testi) analizler, FT-IR, biyobozunma deneyi ve antimikrobiyal testlerdir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Doku iskelelerinin hazırlanması esnasında kullanılan malzemeler (kitosan, salyangoz mukusu, slime) ve bu malzemelerin kullanım oranları; doku iskelelerinin üretim parametreleri (vakum, sıcaklık, nem) çalışmadaki bağımlı değişkenleri oluşturmaktadır.

Doku iskelelerinin karakterizasyonu için yapılan analizler ise (SEM, gözeneklilik deneyi, şişme deneyi, FT-IR, biyobozunurluk deneyi, mekanik analiz, antimikrobiyal testler) çalışmadaki bağımsız değişkenlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Tezde kullanılan cihaz ve malzemelerin listesi Tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemelerin listesi

Mevcut Türü, Modeli	Altyapı/Ekipman	Mevcut Kurum/Kuruluş	Olduğu	Projede Kullanım Amacı
-20°C derin dondurucu/GLE30		İYTE Mühendisliği	Kimya	Doku iskelelerinin dondurulması için kullanılmıştır.
+4°C Buzdolabı/Beko		Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyomekanik AD.		Kullanılacak bir takım kimyasallar saklanmıştır.
Etüv / Dedeoğlu		İYTE Mühendisliği	Kimya	Doku iskelelerinin
FT-IR / Perkin Elmer		İYTE Mühendisliği Bölümü	Kimya	Doku iskelesi kimyasal grup analizi yapılmıştır.
SEM / Quanta Feg		İYTE Mühendisliği Bölümü	Kimya	Yüzeyel yapılar ve hücre morfolojisi incelenmiştir
Basma-Çekme cihazı / (TA XT Plus, Texture Analyser)		İYTE Gıda Mühendisliği Bölümü		Doku iskelelerinin mekanik özellikleri incelenecektir.
Liyofilizatör / Labconco		İYTE Mühendisliği Bölümü	Kimya	Doku iskelelerinin elde edilmesi için kullanılmıştır
Etanol (EMSURE, M= 46,07 g/mol)		İYTE Mühendisliği	Kimya	Gözeneklilik deneyi için kullanılmıştır.
Sodyumhidroksit (Merck, M=40,00 g/mol)		İYTE Mühendisliği	Kimya	Doku iskelelerinin nötralizasyonu için kullanılmıştır.

Kitosan (Sigma Aldrich, Medium Molecular Weight)	İYTE Kimya Mühendisliği	Doku iskelelerinin hazırlanması için kullanılmıştır
Helix aspersa mukus	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik AD.	Doku iskelelerinin hazırlanması için kullanılmıştır
Helix aspersa slime	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik AD.	Doku iskelelerinin hazırlanması için kullanılmıştır
Asetik Asit (MERCK)	İYTE Kimya Mühendisliği	Doku iskelelerinin hazırlanması için kullanılmıştır
Phosphate Buffered Saline (İnvitrogen, PBS Tablet)	İYTE Kimya Mühendisliği	Biyobozunma ve şişme deneyi için kullanılmıştır.
Vakumlu etüv (J.P.Selecta, 2000 W)	İYTE Kimya Mühendisliği	Gözeneklilik deneyi için kullanılmıştır.
Sodyumazit (from chicken egg white, activity $\geq$ 40,000 units/mg protein, Sigma-Aldrich)	İYTE Kimya Mühendisliği	Biyobozunma deneyi için kullanılmıştır
<i>Streptococcus epidermis</i>	İYTE BİYOMER	Antimikrobiyal test için kullanılmıştır
<i>Escherichia coli</i>	İYTE BİYOMER	Antimikrobiyal test için kullanılmıştır
<i>Staphylococcus aureus</i>	İYTE BİYOMER	Antimikrobiyal test için kullanılmıştır
<i>Streptococcus mutants</i>	İYTE BİYOMER	Antimikrobiyal test için kullanılmıştır
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	İYTE BİYOMER	Antimikrobiyal test için kullanılmıştır

3.6.1. Doku İskelelerinin Hazırlanması

3.6.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması

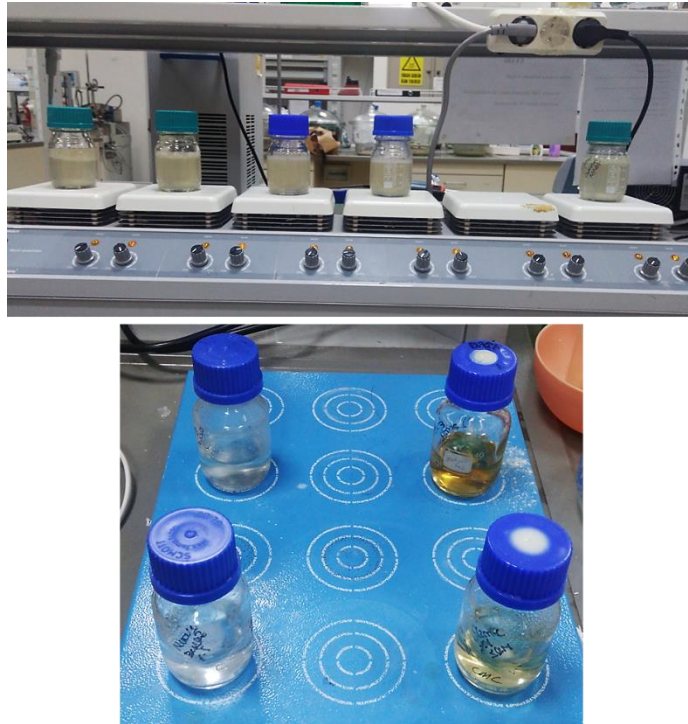
1g kitosan (Medium Molecular Weight, Sigma Aldrich), %1'lik 100 ml CH_3COOH (Merck) çözeltisi içerisinde bir gece boyunca çözölmüştür. Daha sonra, oluşun çözelti 24'lük polistiren kaplara dökölüp -20°C 'de 24 saat dondurulmuştur. Donmuş numunelere 48 saat liyofilizasyon işleml (-46°C , 0.018 bar) uygulanması ile gözenekli yapılar elde edilmiştir.

3.6.1.2. Kitosan ve Slime Doku İskelelerinin Hazırlanması

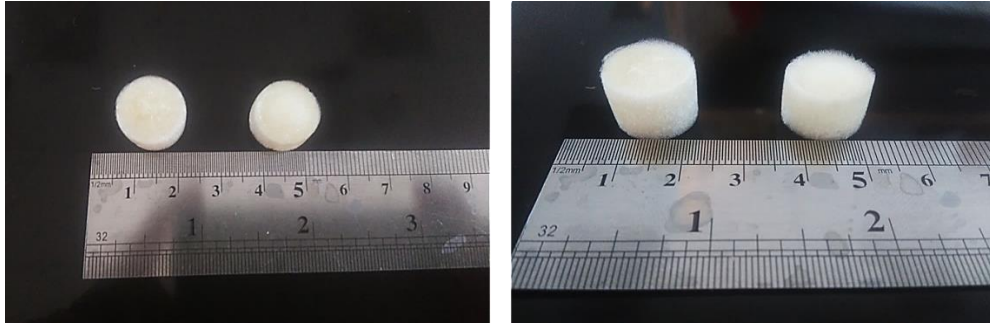
%1'lik CH_3COOH (Merck) çözeltisinin 80 ml'sinde 1g kitosan; 20 ml'sinde 0.5g, 1g ve 3g slime ayrı ayrı çözödürölmüş ve daha sonra kitosan ve slime çözeltileri birleştirilerek bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşun çözelti 24'lük polistiren kaplara dökölüp -20°C 'de 24 saat dondurulmuştur. Donmuş numunelere 48 saat liyofilizasyon işleml (-46°C , 0.018 bar) uygulanması ile gözenekli yapılar elde edilmiştir.

3.6.1.3. Kitosan ve Mukus Doku İskelelerinin Hazırlanması

%1'lik CH_3COOH çözeltisinin (Merck) 80 ml'sinde 1g kitosan; 20 ml'sinde 0.5g, 1g ve 3g mukus ayrı ayrı çözödürölmüş ve daha sonra kitosan ve mukus çözeltileri birleştirilerek bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşun çözelti 24'lük polistiren kaplara dökölüp -20°C 'de 24 saat dondurulmuştur. Donmuş numunelere 48 saat liyofilizasyon işleml (-46°C , 0.018 bar) uygulanması ile gözenekli yapılar elde edilmiştir.



Şekil 13: Kitosan ve salyangoz salgı (mukus, slime) çözeltileri



Şekil 14: Elde edilen mukus ve slime katkılı doku iskeleleri

3.6.2. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.6.2.1. SEM Analizi

Doku iskelelerinin morfolojisi ve slime, mukus ekstraktlarının gözenek yapısına etkisi taramalı elektron mikroskobu (SEM Quanta Feg) ile incelenmiştir. Desikatör içerisinde muhafaza edilen doku iskeleleri pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilerek sputter-coater ile argon gazı kullanılarak yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir.

3.6.2.2. Sıvı Değişim Yöntemi ile Açık Gözeneklilik Ölçümü

Hazırlanan doku iskelelerinin gözenekliliklerinin belirlenmesi için her gruptan üç örnek kullanılmıştır. Doku iskeleleri, 20 ml ETOH (EMSURE, M= 46,07 g/mol) bulunan tüplere yerleştirilerek vakumlu etüvde (J.P.Selecta, 2000 W) 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra örnekler vakumlu etüvden çıkarılarak etanolün yükselme seviyeleri mikropipet yardımı ile belirlenmiştir. Son olarak doku iskeleleri tüplerin içinden alınmış ve tüplerde kalan etanol seviyeleri ölçülmüştür. Alınan ölçümler ile doku iskelelerinin gözeneklilikleri hesaplanmıştır.

$$\varepsilon = \frac{V1 - V3}{V2 - V3} \times 100$$

ε : % Gözeneklilik, V1: 20 ml, V2: ETOH yükselme seviyesi, V3: Tüplerde kalan ETOH seviyesi

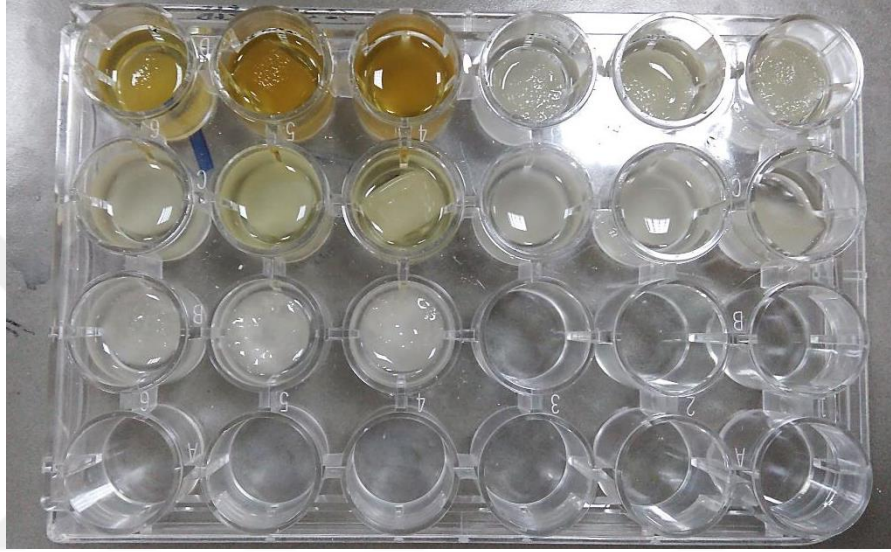
3.6.2.3. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesinin Ölçümü

Şişme deneyi için öncelikle her gruptan üç örneğin kuru ağırlığı tartılmıştır. Tartılan örnekler polistiren plakalara konarak 1 M NaOH (Merck, M=40,00 g/mol) çözeltisi ile 30 dakika boyunca nötralizasyon işlemi yapılmıştır. Örnekler, nötralizasyon işlemi boyunca vakumlu etüvde (J.P.Selecta, 2000 W) oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlem ile kitosanda bulunan açık uçlar kapatılarak doku iskelelerinin sıvı içerisinde çözünmesi engellenmiştir. Nötralizasyon işlemi sonrasında NaOH çözeltisini plakalardan uzaklaştırmak için, örnekler

PBS (İnvitrogen, PBS Tablet) çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından, doku iskelelerinin üzerine 2 ml PBS (İnvitrogen, PBS Tablet) çözeltisi eklenerek plakalar 37 °C'ye ayarlanan etüve (Dedeoğlu) konmuştur. 4, 24 ve 48. saatlerde sıvı içerisinde bulunan doku iskelelerinin ağırlıkları tartılarak ölçümler alınmıştır. Şişme oranı, inkübasyon öncesi ve sonrası zamana bağlı ağırlık değişimine bakılarak belirlenmiştir.

$$R = \frac{w1 - w0}{w0} \times 100$$

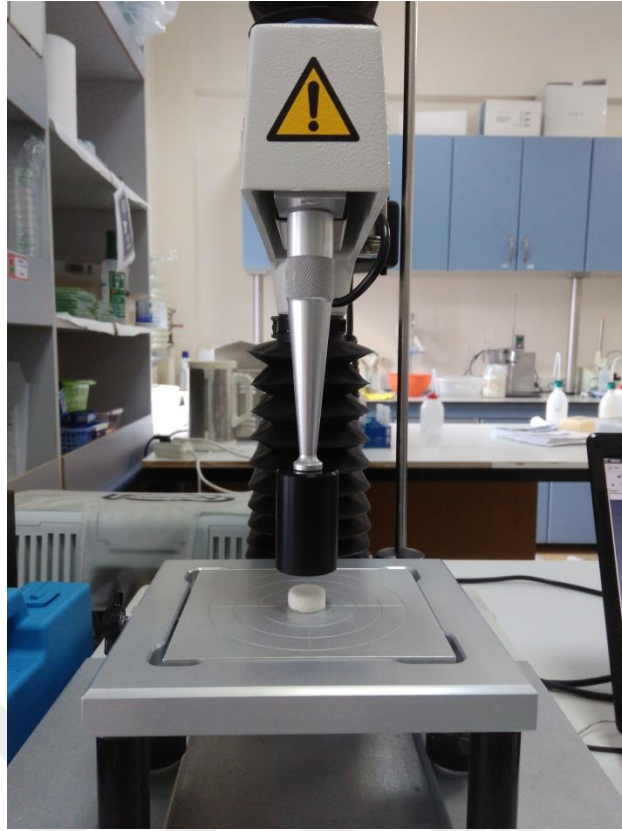
R: % Şişme oranı, w1: Islak ağırlık, w0: Kuru ağırlık



Şekil 15: Su tutma kapasiteleri ölçülen doku iskeleleri

3.6.2.4. Basma Testi ile Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Hazırlanan kitosan, kitosan-slime, ve kitosan-mukus doku iskelelerinin mekanik özelliklerini belirlemek için basma testleri ASTM D 5024 standardına göre yapılmıştır. Basma testi için her gruptan beş örnek kullanılmış ve kuru malzemelere uygulanmıştır. Farklı oranlarda salyangoz salgıları eklenerek hazırlanan ve saf kitosandan oluşturulan doku iskelelerinin elastik modül değerleri belirlenmiştir. Deney; %1 kitosan, %1 kitosan-%0.5 mukus, %1 kitosan-%0.5 slime, %1 kitosan-%1 mukus ve %1 kitosan-%1 slime grupları için 5 kg force, 5 mm/dk basma hızı uygulanarak yapılmıştır. %1 kitosan-%3 mukus ve %1 kitosan-%3 slime grupları için ise 5 kg force yeterli gelmediği için 50 kg force kullanılmıştır. Basma deneyi doku iskelelerinin yüksekliğinin %75'ine kadar yük uygulanacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 16: Mekanik test cihazı

3.6.2.5. FT-IR Analizi

Doku iskelelerinin ve salyangoz salgı ekstraktlarının kimyasal kompozisyonu FT-IR (Perkin Elmer) analizi ile belirlenmiştir. $650-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki IR ışınlarının molekülün yapmış olduğu titreşimleri soğurması ile açığa çıkan yapılar belirlenmiştir. FT-IR analizi ile kitosan polimer yapısının slime ve mukus ekstraktları ile etkileşimi incelenmiştir.

3.6.2.6. Biyobozunurluk Deneyi

Kitosan'ın biyobozunur özellikte doğal bir polimer olması nedeniyle vücut sıvısı ortamı içinde biyobozunma davranışının incelenmesi ve biyobozunma oranının belirlenmesi gerekmektedir. Biyobozunma testleri lizozim (Lysozyme, from chicken egg white, activity $\geq 40,000$ units/mg protein, Sigma-Aldrich) enzimi içeren PBS içerisinde zamana karşı yapılmıştır. Deney için her gruptan 12 örneğin kuru ağırlığı tartılmış ve sonrasında 1 M NaOH çözeltisi ile nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Nötralizasyon işlemi sonrasında NaOH çözeltisini plakalardan uzaklaştırmak için, örnekler PBS çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından örnekler PBS çözeltisi içinde 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örneklerin kurutularak zamana karşı ağırlık ölçümü yapılmıştır. Bu yöntemle bozunma yüzdesi hesaplanmıştır.

$$R = \frac{w_0 - w_1}{w_0} \times 100$$

R: % Ağırlık Kaybı, w0: Kuru ağırlık, w1: Islak ağırlık

3.6.2.7. Antimikrobiyal Test

Salyangoz salgılarının antimikrobiyal özelliklerinin belirlenebilmesi için 0.5 mcfarland yoğunluğundaki gram negatif *E. Coli*, gram pozitif *S.aureus*, gram pozitif *S.epidermidis*, gram pozitif *S.mutants* ve gram negatif *P. fluorescens* kolonileri katı agara ekilmiştir. Boş diskler steril ortamda agar üzerine yerleştirilmiş ve diskler üzerine farklı oranlarda hazırlanan (%0.5, %1, %3) salyangoz salgı solüsyonları damlatılmıştır. Kontrol grupları olarak amoksisilin antibiyotik diskleri agara yerleştirilmiştir. Petriler 24 saat 37°C de inkübe edilmiştir. (*P. fluorescens* bakterileri 25 °C’de inkübe edilmiştir.) 24 saat sonunda diskler etrafında antimikrobiyal zonlar oluşmuş ve zonların çapları üç tekrarlı olarak ölçülmüş, ortalama zon çapları hesaplanmıştır. Zon çapı ölçümlerine göre elde edilen değerler Tablo 2’de belirtilmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada şişme, gözeneklilik, biyobozunurluk ve antimikrobiyal analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Mekanik deney için ise her gruptan beş örnek kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Two-way ANOVA ve One-way ANOVA istatistik yöntemleri kullanılarak analiz

edilmiştir. İstatistiksel kararlarda; değler $p<0.05$ olduğunda istatistiksel farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında, elde edilecek doku iskelelerinin beklenen şekilde oluşturulamaması bir risk faktörü olarak görülmüştür. Bu durumda kullanılacak olan malzemele oranları değiştirilerek yeni doku iskeleleri üretilmesi planlanmıştır. Ancak doku iskeleleri belirlenen oranlar kullanılarak istenilen şekilde elde edilmiştir.

Doku iskelelerinin karakterizasyon süreçlerinde ise hiçbir sınırlılıkla karşılaşılmaış, analizler başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

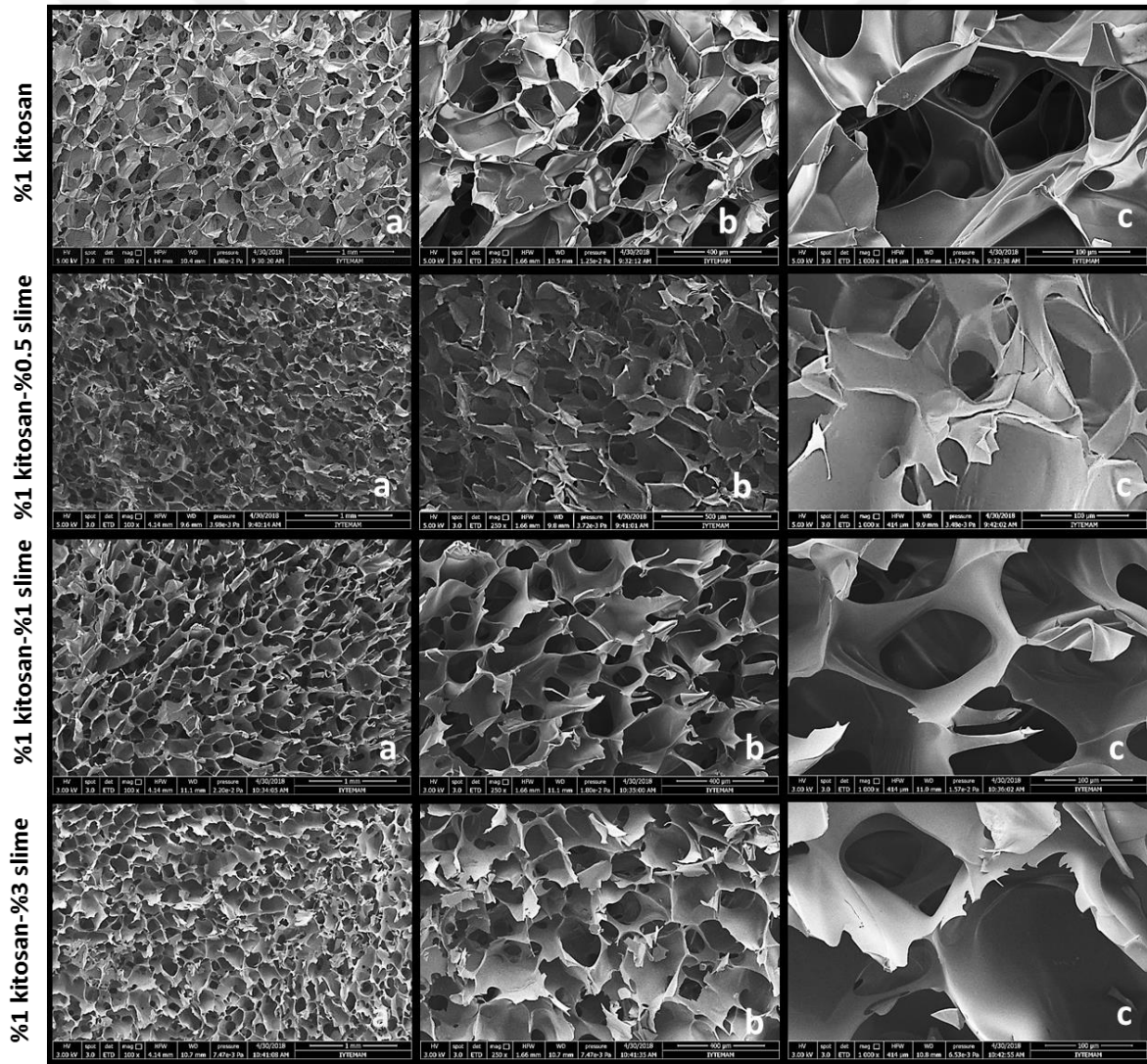
3350-GOA protokol numaralı çalışmamız 08.06.2017 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'na 2017/15-09 karar numarası ile onaylanmıştır. Etik kurul onay belgesi Ek 3'te sunulmaktadır.

4. BULGULAR

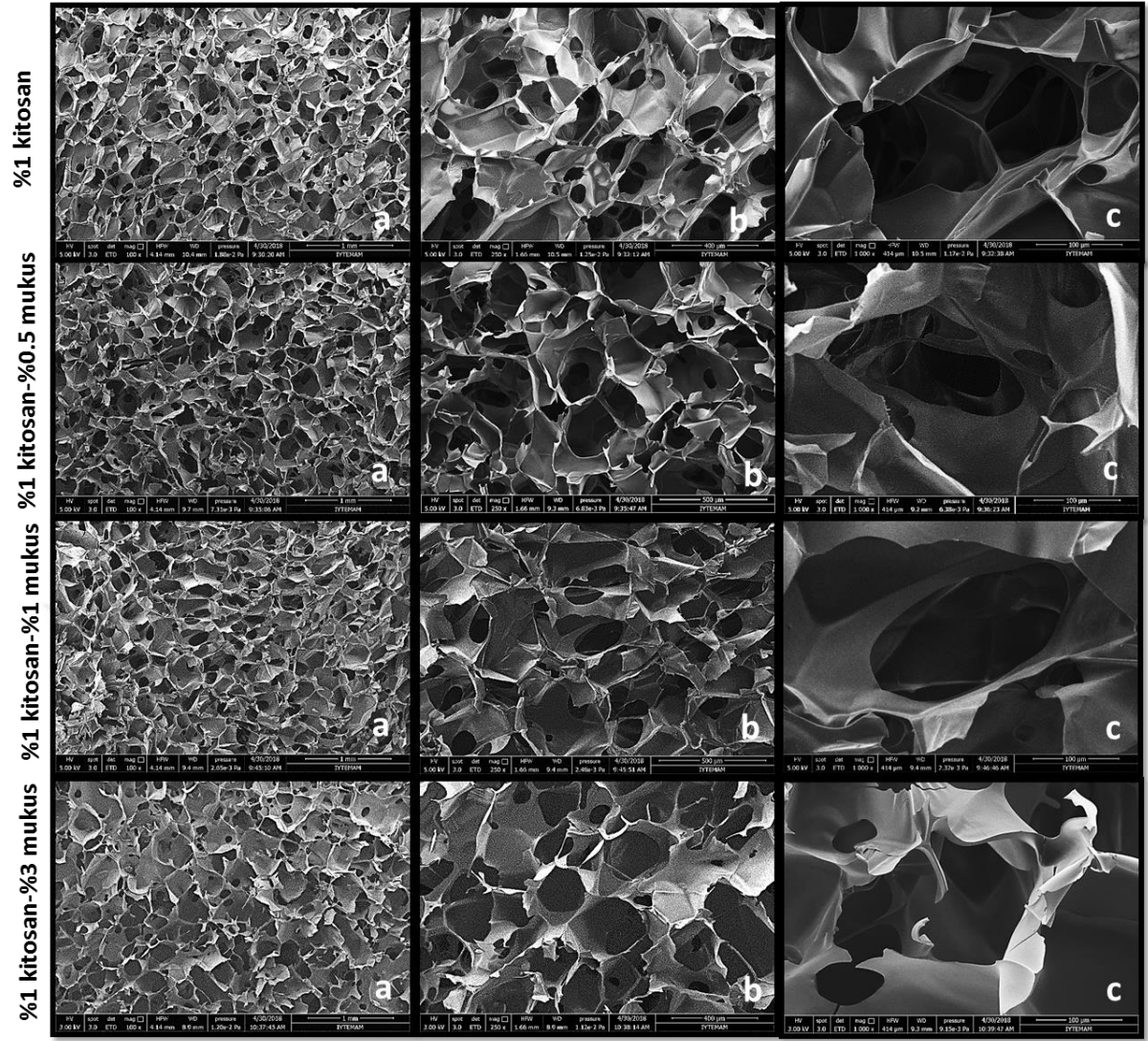
Çalışmada kontrol grubu (kitosan) ve deney grupları (slime-kitosan ve mukus-kitosan) olarak elde edilen doku iskelelerinin her oranı için (%0.5, %1, %3) analizler tekrarlanmıştır. Bölüm 3.6’da anlatılan karakterizasyon işlemleri sonucunda elde edilen veriler bu bölümde sunulmaktadır.

4.1. SEM Analizi

Slime ve mukus katkılı kitosan doku iskelelerinin morfolojisi SEM analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 17-18’de verilmektedir. SEM görüntüleri üzerinden Image J programı kullanılarak doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları ölçülmüştür. Elde edilen gözenek çapları Tablo 2’de gösterilmiştir. Ayrıca gözenek çaplarının dağılımları histogramla gösterilmiştir (Şekil 19-20).



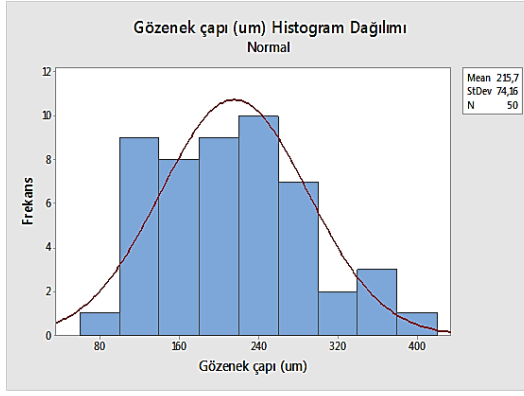
Şekil 17: %1 kitosan ve slime grubu doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a: 100x, b: 250x, c:1000x büyütme)



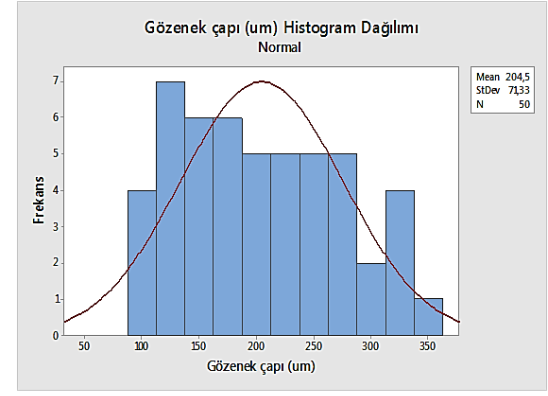
Şekil 18: %1 kitosan ve mukus grubu doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a: 100x, b: 250x, c: 1000x büyütme)

Tablo 2: Doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları ve standart sapma değerleri

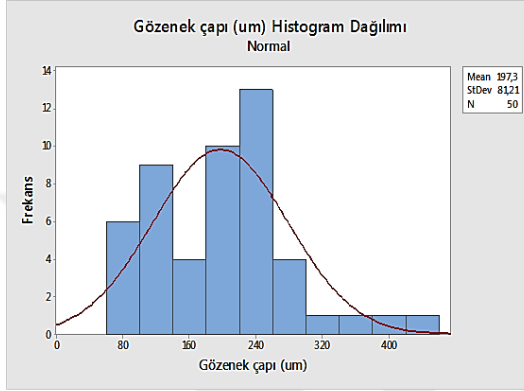
Doku İskelesi Grupları	Ortalama Gözenek Çapı (µm)
%1 kitosan	215,7±73,4
% 1 kitosan-%0.5 slime	160,2±60,6
% 1 kitosan-%1 slime	182±58,3
% 1 kitosan-%3 slime	144,3±36
% 1 kitosan-%0.5 mukus	204,4±70,6
% 1 kitosan-%1 mukus	197,2±80,4
% 1 kitosan-%3 mukus	175,6±73,7



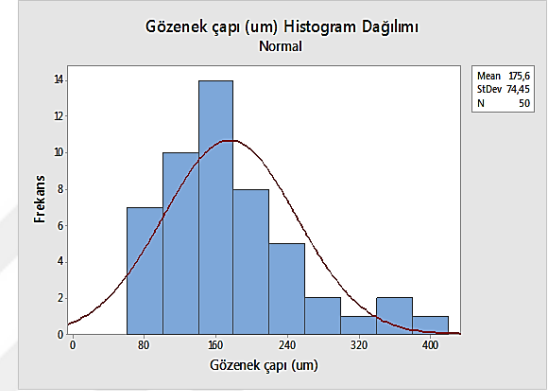
%1 kitosan



%1 kitosan-%0.5 mukus

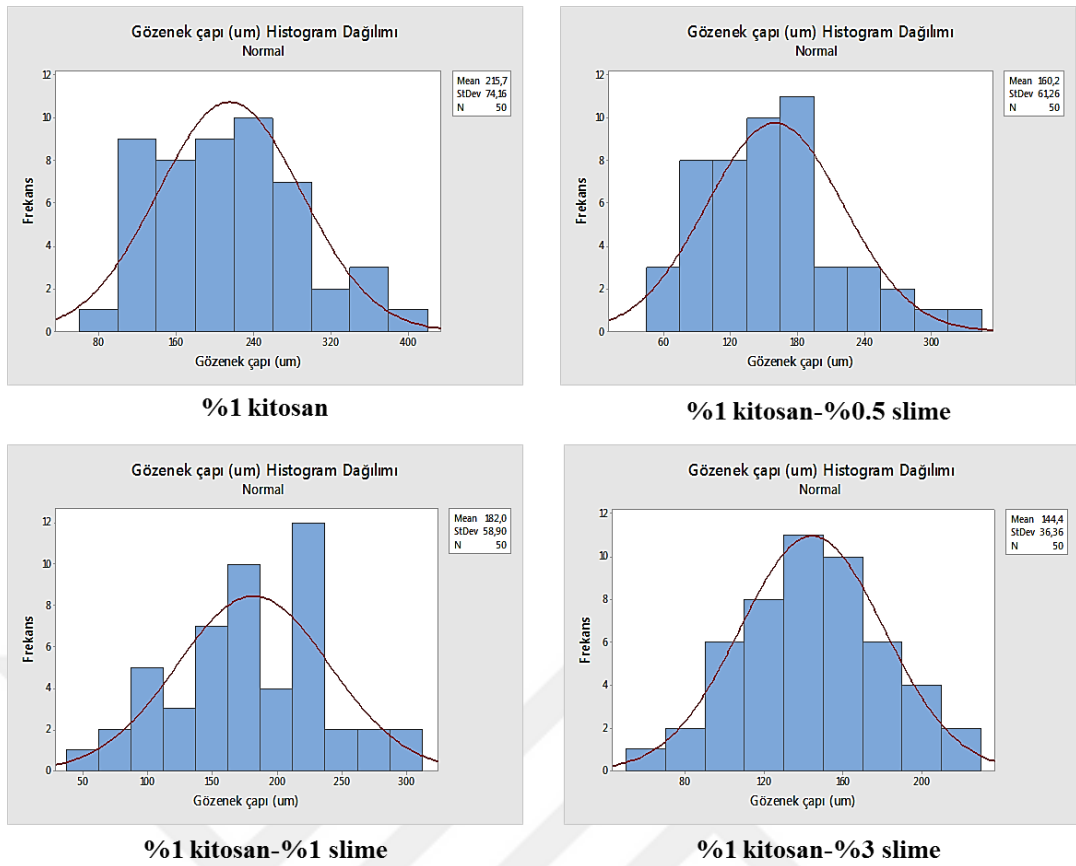


%1 kitosan-%1 mukus



%1 kitosan-%3 mukus

Şekil 19: Kitosan ve kitosan-mukus doku iskelelerinin gözenek çapı dağılımını gösteren histogramlar



Şekil 20: Kitosan ve kitosan-slime doku iskelelerinin gözenek çapı dağılımını gösteren histogramlar

Sonuçlara bakıldığında elde edilen doku iskelelerinin gözenek dağılımlarının düzgün olduğu ve gözenekler arasında belirgin geçişler olduğu görülmektedir. Ayrıca salyangoz salgıları kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin gözenek çaplarını küçülttüğü ancak duvar kalınlıklarını arttırdığı SEM görüntülerinde oldukça net gözükmemektedir. Böylece artan yüzey alanı hücre tutunumu ve çoğalması için daha uygun bir ortam sağlayacaktır. Doku iskelelerinin gözenek çaplarının ise hücre tutunumu ve çoğalmasına izin verecek boyutlarda olduğu belirlenmiştir.

4.2. Sıvı Değişim Yöntemi ile Açık Gözeneklilik Ölçümü

Doku iskelelerinin gözeneklilik oranlarının belirlenebilmesi için sıvı değişim yöntemi kullanılarak açık gözeneklilik ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 3'te görüldüğü gibi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deney sonucunda hem kontrol grubunda hem de salyangoz salgısı katkılı doku iskelesi gruplarında %80'in üzerinde açık gözeneklilik elde edilmiştir.

Tablo 3: Doku iskelelerinin % gözeneklilik ve standart sapma değerleri

Doku İskelesi Grupları	% Gözeneklilik
%1 kitosan	81,1±1,6
%1 kitosan-% 0.5 slime	88,9±0
%1 kitosan-%1 slime	88,9±0
%1 kitosan-%3 slime	87,8±1,5
%1 kitosan-% 0.5 mukus	88,9±0
%1 kitosan-%1 mukus	84,9±1,1
%1 kitosan-%3 mukus	90,1±0,5

4.3. Doku İskelelerinin Su Tutma Kapasitesinin Ölçümü

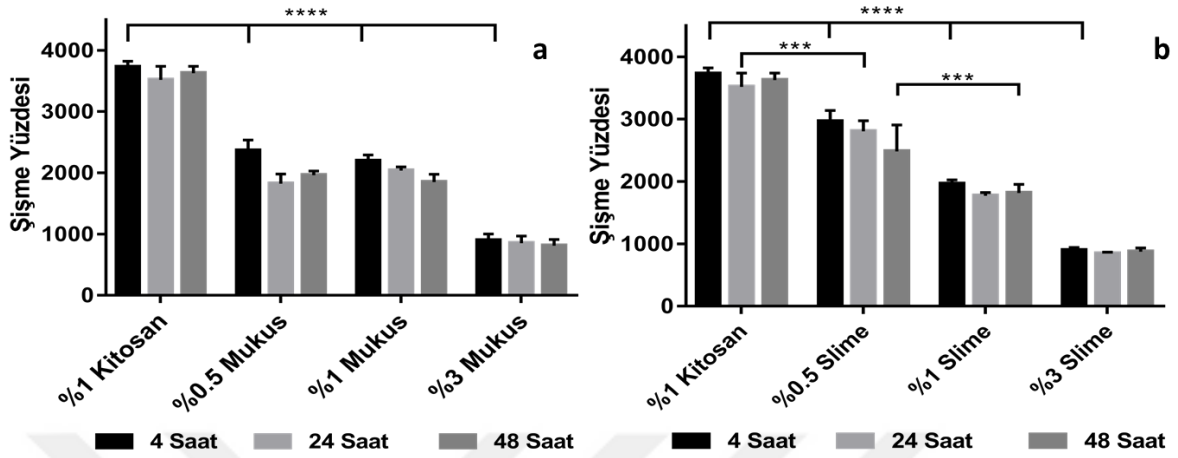
Üretilen doku iskelelerinin şişme davranışları 4, 24 ve 48. saatlerde ıslak ağırlıkların tartılması ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 21’de gösterilmektedir.

Bu çalışmada üretilen doku iskeleleri için yapılan şişme deneylerinde kontrol grubunun deney gruplarına kıyasla daha iyi şişme davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. Şişme yüzdesi %1 kitosan için %3518,1-3728,7; % 1 kitosan-%0.5 slime için %2483,2-2965,3; % 1 kitosan-%1 slime için %1771,8-1961,5; % 1 kitosan-%3 slime için %845,9-898; % 1 kitosan-%0.5 mukus için %1825,3-2366,2; % 1 kitosan-%1 mukus için %1849,9-2197; % 1 kitosan-%3 mukus için %812,1-898,5’tir.

Şişme deneyinin sonuçları istatistiksel olarak Two-way ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ ile tanımlanmıştır. Şekil 21(a)’da 4. saatte deney gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı farkı şekilde “*****” ile gösterilmiştir. Ayrıca yapılan istatistik incelemeler sonucunda 4, 24 ve 48. saatlerde bütün gruplar arasında anlamlı fark (****) mevcut olmasına rağmen %1 kitosan-%0.5 mukus ve %1 kitosan-%1 mukus grupları arasında ise istatistiksel olarak bir farka rastlanmamıştır. Şekil 21(b)’de 4. saatte deney gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı farkı şekilde “*****” ile gösterilmiştir. 24. saatte %1 kitosan ve %1 kitosan-%0.5 slime arasındaki fark ile 48.saatte %1 kitosan-%0.5 slime ve %1 kitosan-%1 slime arasındaki fark “*****” ile belirtilmiştir. Ayrıca yapılan istatistik incelemeler sonucunda 4,24 ve 48. saatlerde bütün gruplar arasında anlamlı fark (****) mevcuttur.

Sonuçlara bakıldığında kontrol grubunun deney gruplarına oranla daha fazla su tutabilme kapasitesinin olduğu görülmektedir. Polimere eklenen salgi oranları arttıkça bu

özelliğın azaldığı belirlenmiştir. Salyangoz salgılarının hidrofobik yapısı su tutma kapasitesinde azalmaya neden olmuştur.



Şekil 21: %1 Kitosan, mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi gruplarının şişme yüzdeleri (***<0,001; ****<0,0001)

Sonuçlara bakıldığında kontrol grubunun deney gruplarına oranla daha fazla su tutabilme kapasitesinin olduğu görülmektedir. Polimere eklenen salgı oranları arttıkça bu özelliğın azaldığı belirlenmiştir. Salyangoz salgılarının hidrofobik yapısı su tutma kapasitesinde azalmaya neden olmuştur.

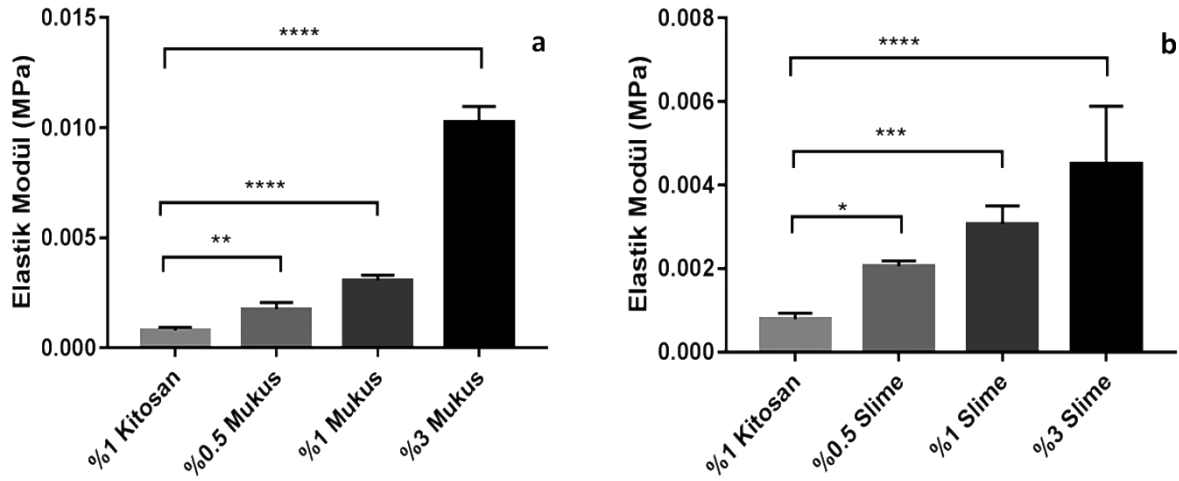
4.4. Basma Testi ile Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Doku iskeleleri ile yapılan mekanik test sonucunda elde edilen yapıların Elastik Modülü hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 22’de belirtilmektedir.

Elde edilen sonuçlarda kontrol grubu olan kitosanın ortalama elastik modülü 0,00080 MPa olarak bulunmuştur. Mukus ve slime katkılı doku iskelesi gruplarında ise ortalama elastik modülü değerleri %1 kitosan-%0.5 mukus için 0,0018 MPa, %1 kitosan-%0.5 slime için 0,0021 MPa, %1 kitosan-%1 mukus için 0,0031 MPa, %1 kitosan-%1 slime için 0,0031 MPa, %1 kitosan-%3 mukus için 0,0103 MPa ve %1 kitosan-%3 slime için 0,0045 MPa’dır.

Mekanik deneyin sonuçları istatistiksel olarak One-way ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ ile tanımlanmıştır. Şekil 22(a)’da, %1 kitosan ve %1 kitosan-%0.5 mukus arasındaki fark “***”; %1 kitosan ve %1 kitosan-%1 mukus, %1 kitosan ve %1 kitosan-%3 slime arasındaki fark ise “****” ile ifade edilmiştir. Şekil 22(b)’de, %1 kitosan ve %1 kitosan-%0.5 slime arasındaki fark “*”; %1 kitosan ve %1

kitosan-%1 slime arasındaki fark “****”, %1 kitosan ve %1 kitosan-%3 slime arasındaki fark ise “****” ile ifade edilmiştir.



Şekil 22: Kontrol ve mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi grupları için Elastik Modül değerleri (*<0,05; **<0,01; ***<0,001; ****<0,0001)

4.5. FT-IR Analizi

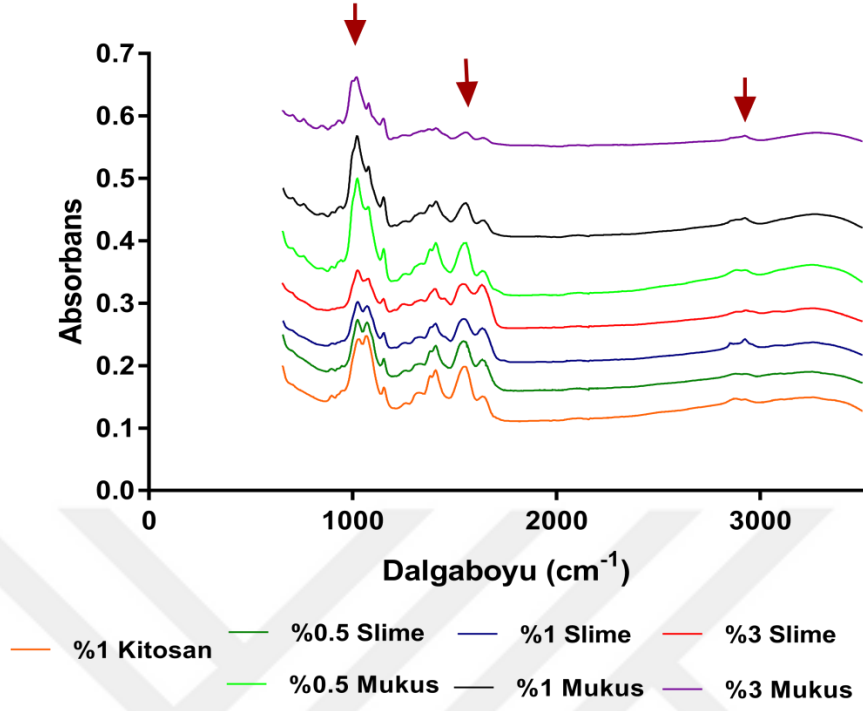
Elde edilen doku iskelelerinin ve salyangoz salgı ekstraktlarının kimyasal kompozisyonu FT-IR analizi ile belirlenmiştir. Kitosan ve salgı katkılı doku iskelelerinin kimyasal yapısı şekil 23,24 ve 25’te görülmektedir. FT-IR analizi sonucunda, elde edilen doku iskelelerinin kimyasal yapısının kontrol grubu ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca mukus ve slime ekstraktları için yapılan analizlerde elde edilen farklı piklerden iki salgının kimyasal yapısı arasındaki fark belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada kitosan için 2953cm^{-1} ’deki pikin CH gerilme titreşim bantlarından kaynaklandığı, 1653 ve 1559cm^{-1} ’deki bantların C-NH₂’ye tekabül ettiği bulunmuştur. CH₂ ve CH₃ titreşimleri ise 1418 ve 1360cm^{-1} ’de pik vermiştir. 1157 ile 1063cm^{-1} ’deki bantların C-O-C bağlantısı olduğu gözlemlenmiştir. C-N bandı ise 920cm^{-1} ’de pik vermiştir.

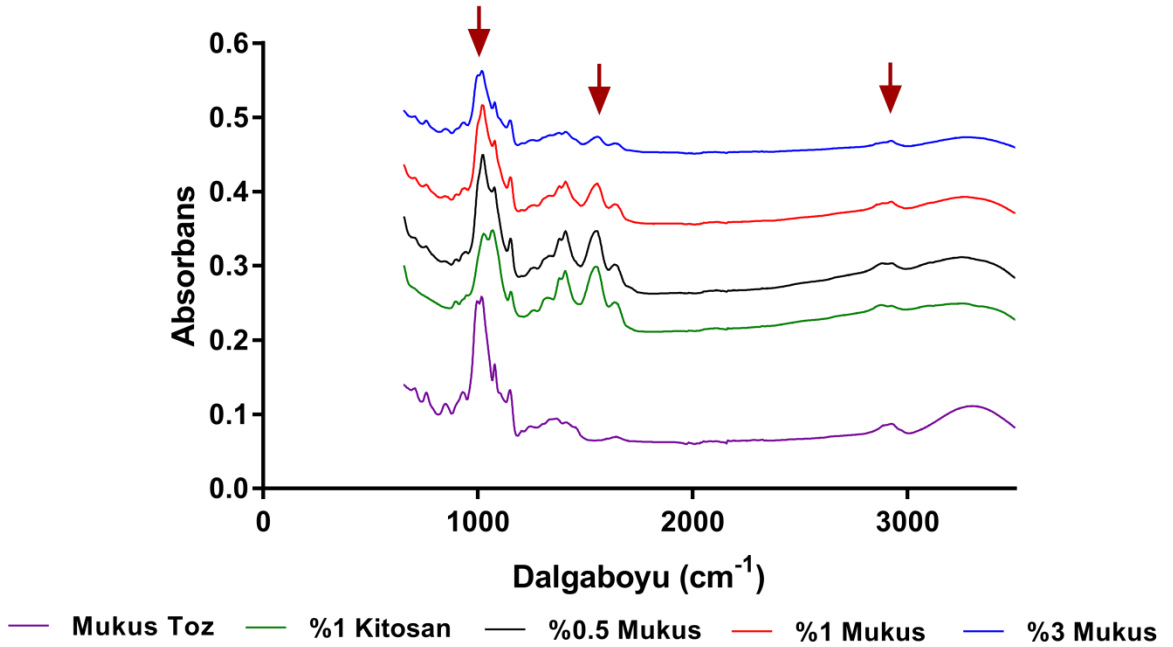
Mukus ekstraktının kimyasal yapısı incelendiğinde ise OH bandının 3338cm^{-1} ’de pik verdiği görülmüştür. 1431 ve 1464cm^{-1} ’in ise CH, OH veya COO- genişliğine denk geldiği düşünülmektedir. 1677cm^{-1} ve 1464cm^{-1} ise Amide I ve Amide II bantlarını göstermektedir.

Slime ekstraktı için FT-IR analizi ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen pikler IR tablosundan yararlanarak değerlendirilmiştir. CH titreşim bantlarının 3000 ve 3103cm^{-1} ’de, OH bandının ise 3283cm^{-1} ’de pik verdiği görülmüştür. C-

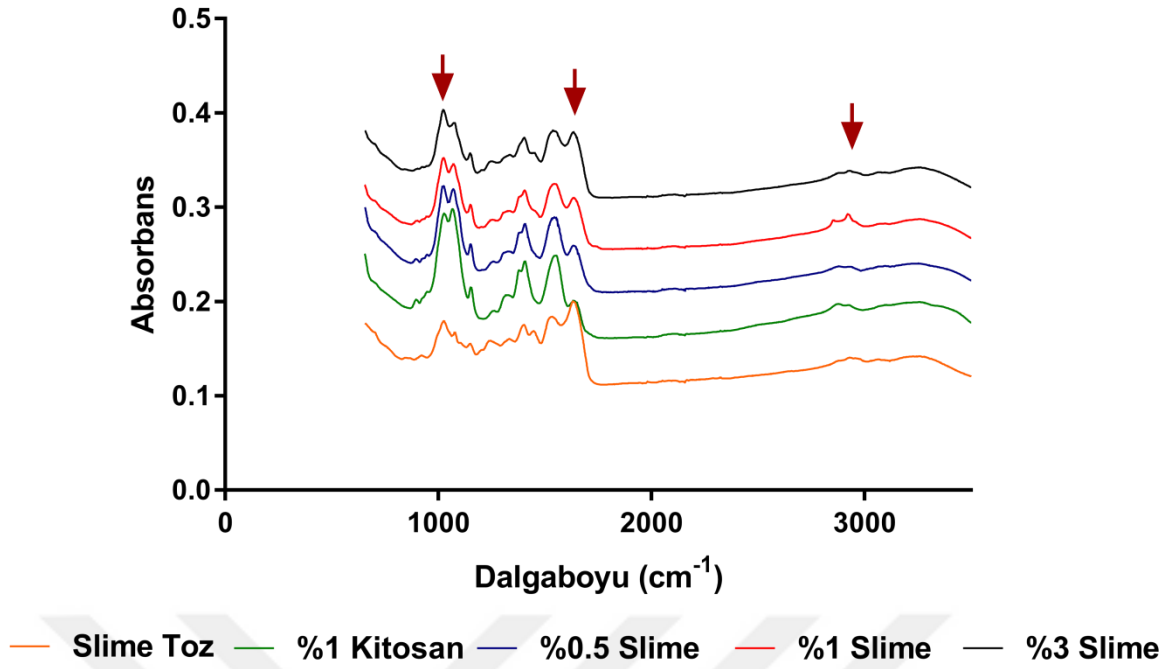
N bandı ise 1157 ve 1353 cm^{-1} 'de pik vermiştir. 1085 ve 1308 cm^{-1} 'de ise C-O bandı gözlemlenmiştir.



Şekil 23: %1 Kitosan ve deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları



Şekil 24: Mukus ekstraktı, %1 kitosan ve mukus deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları

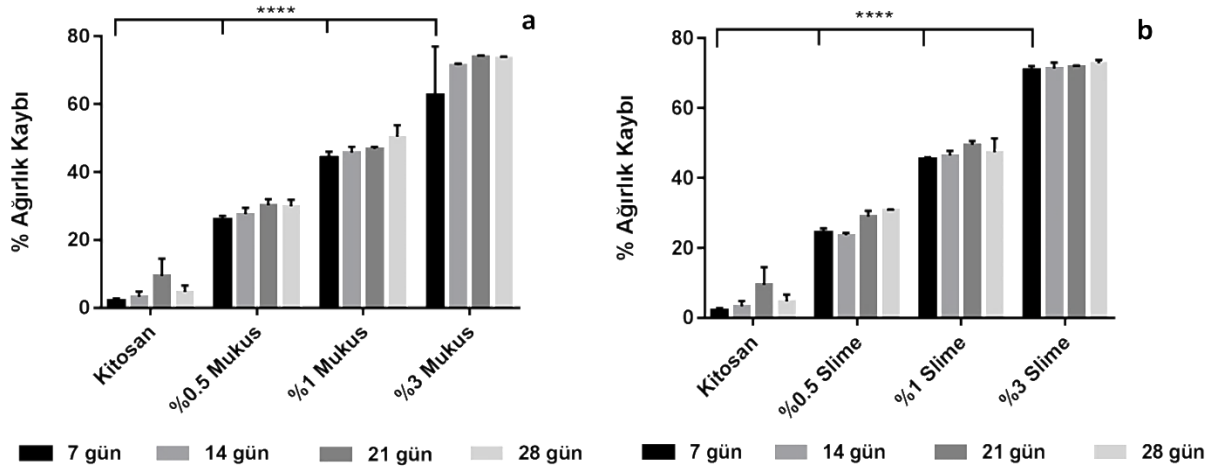


Şekil 25: Slime ekstraktı, %1 kitosan ve slime deney gruplarının FT-IR analizi sonuçları

4.6. Biyobozunurluk Deneyi

Kontrol ve deney gruplarının % ağırlık kayıpları 7, 14, 21 ve 28. günler için belirlenmiştir. Deney sonuçları Şekil 26'da gösterilmektedir. Gerçekleştirilen biyobozunma deneyinde deney grupları oldukça yüksek bozunma davranışı sergilemiştir. Kitosan için 7 ve 28 gün inkübasyon sürelerinde ortalama bozunma değeri %1,8-9,4 iken, bu değerler % 1 kitosan-%0.5 slime için %23,6-30,7; % 1 kitosan-%1 slime için %45,3-49,5; % 1 kitosan-%3 slime için %70,7-72,8; % 1 kitosan-%0.5 mukus için %24,4-30,2; % 1 kitosan-%1 mukus için %44,2-50,4; % 1 kitosan-%3 mukus için %62,7-74,1'dir.

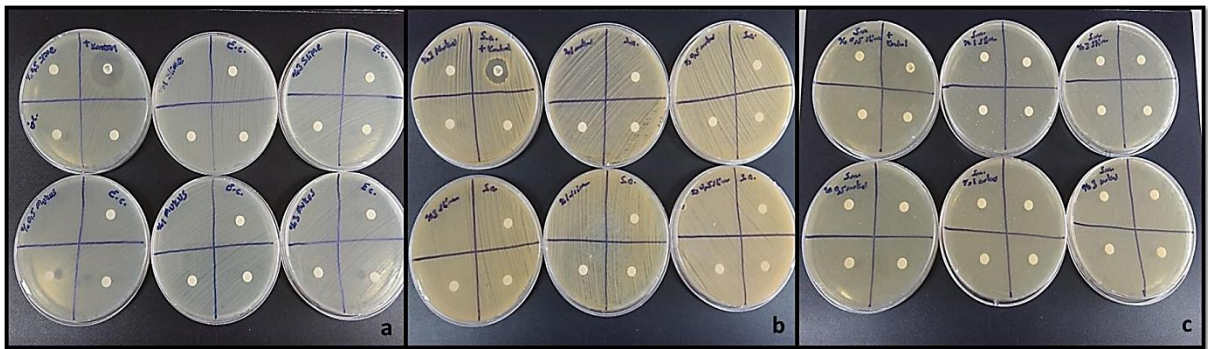
Biyobozunma deneyinin sonuçları istatistiksel olarak Two-way ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ ile tanımlanmıştır. Şekil 26(a) ve (b)'de 7. günde deney gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı farkı “****” ile gösterilmiştir. Ayrıca yapılan istatistik incelemeler sonucunda 14, 21 ve 28. günlerde de bütün gruplar arasında anlamlı fark (****) mevcuttur. Elde edilen ağırlık kaybı sonuçlarına bakıldığında salyangoz salgılarının kontrol grubuna kıyasla bozunmayı hızlandırdığı görülmektedir. Ayrıca eklenen salgı ekstraktı oranı arttıkça doku iskelelerinin bozunma hızının arttığı da gözlenmiştir.



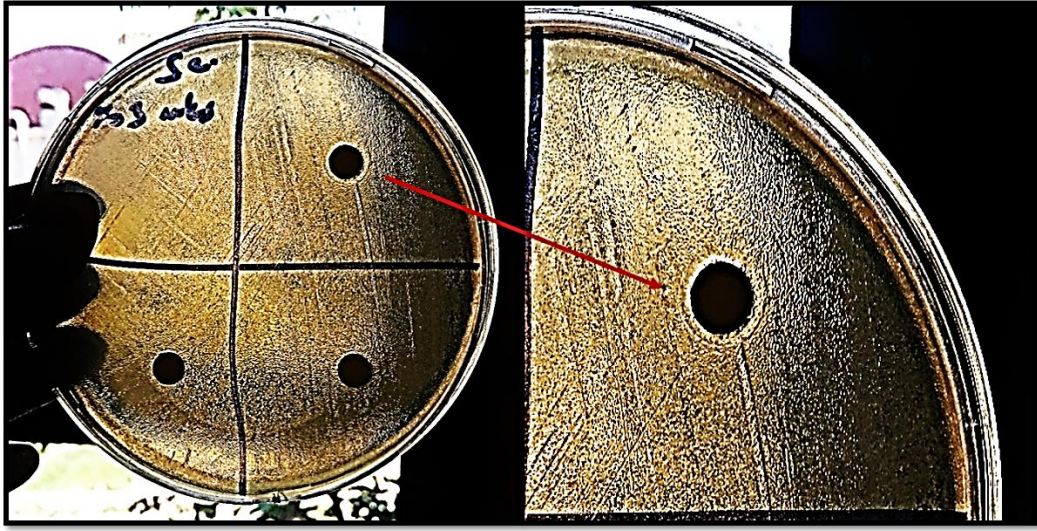
Şekil 26: Kontrol ve mukus(a) ve slime(b) katkılı doku iskelesi grupları için % ağırlık kaybı (****<0,0001)

4.7. Antimikrobiyal Test

Salyangoz salgılarının antibakteriyel aktivitesi beş bakteri türü kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında sadece *P. fluorescens* ve *S.epidermidis* bakteri türlerindeki disklerin etrafında zonlar oluştuğu görülmektedir. *S.aureus*, *S.mutants* ve *E.coli* türlerinde salgı katkılarının herhangi bir antimikrobiyal etkisi gözlenmemiştir. *P. fluorescens* bakteri türünde salgı çözeltilerinin her oranında, *S.epidermidis* bakteri türünde ise sadece %3'lük katkı oranlarında zonlar oluşmuştur. Sonuçlar şekil 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ve 34'te belirtilmektedir. Disk difüzyon deneyi ile elde edilen zon çapları Tablo 5'te verilmiştir. Zon çaplarının çok küçük olması sebebi ile zonların belirgin bir şekilde görülebilmesi için fotoğraların kontrast ayarları düzenlenmiştir.



Şekil 27: Salyangoz salgı çözeltilerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *S.mutants* bakteri türlerine etkisi(genel görünüm)



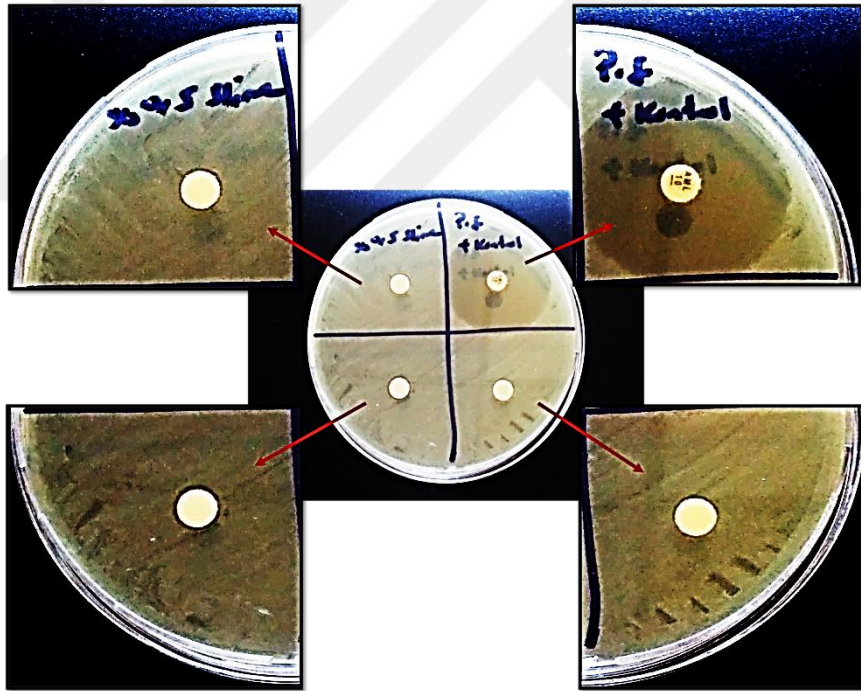
Şekil 28: %3 mukus salgı çözeltisinin *S.epidermidis* bakteri türüne etkisi



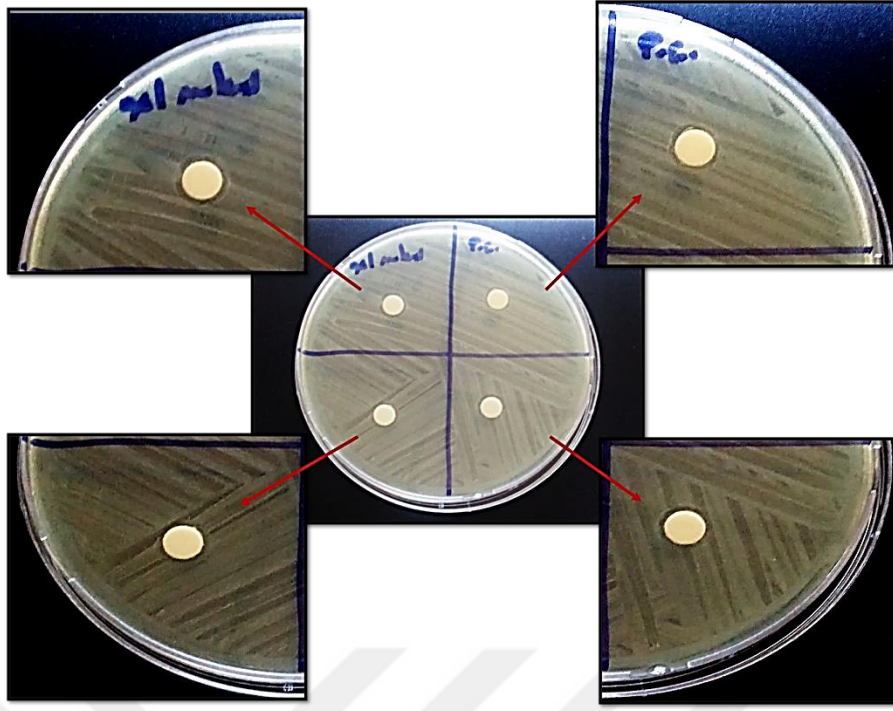
Şekil 29: %3 slime salgı çözeltisinin *S.epidermidis* bakteri türüne etkisi



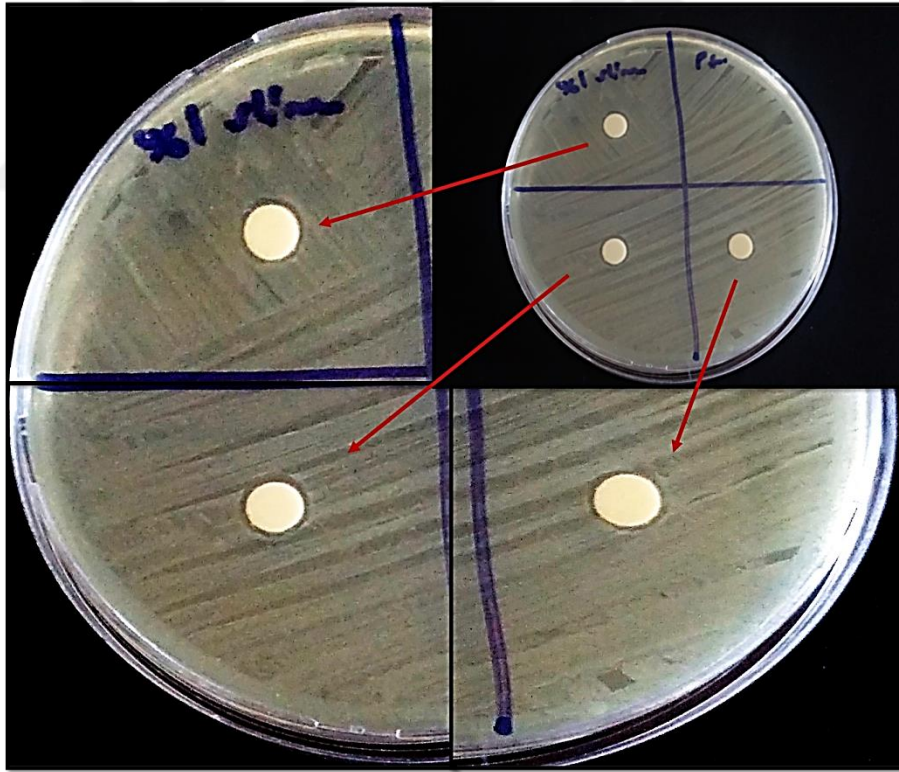
Şekil 30: %0.5 mukus salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi



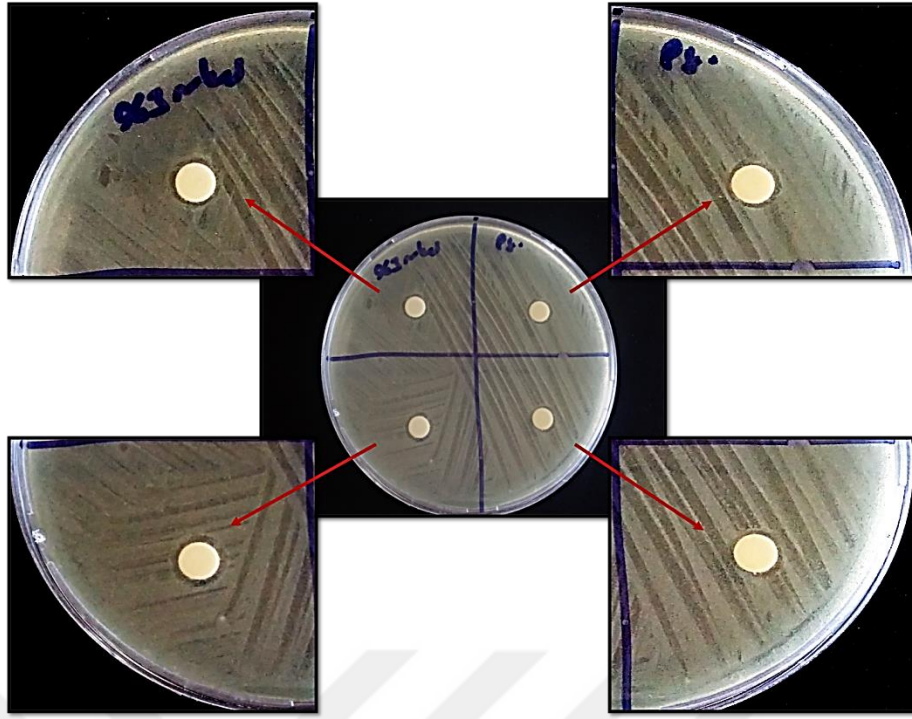
Şekil 31: %0.5 slime salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi



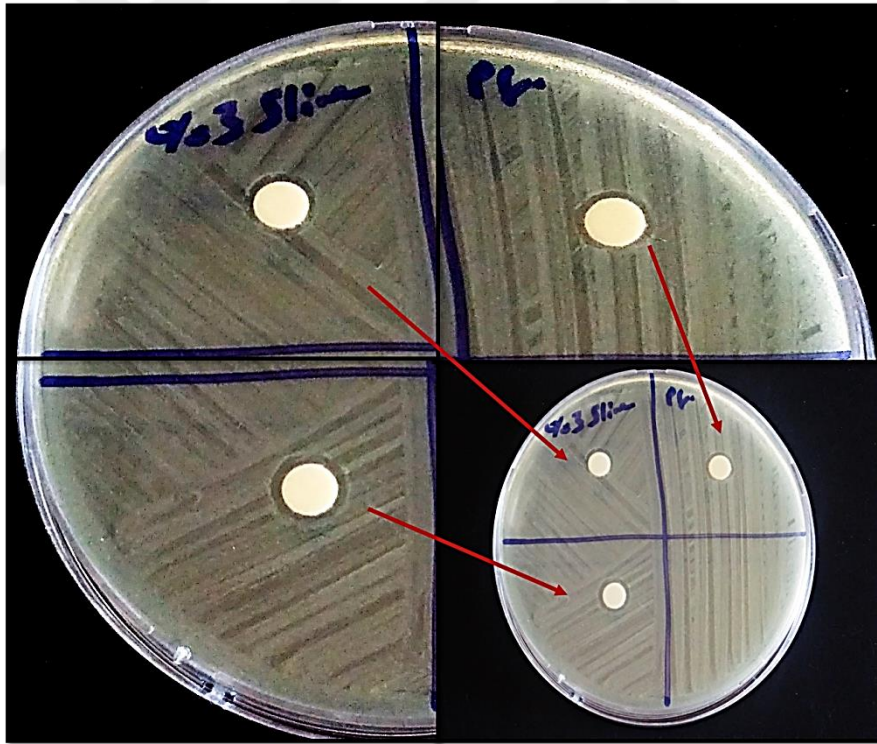
Şekil 32: %1 mukus salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi



Şekil 33: %1 slime salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi



Şekil 34: %3 mukus salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi



Şekil 35: %3 slime salgı çözeltisinin *P. fluorescens* bakteri türüne etkisi

Tablo 4: Antimikrobiyal testler sonucu disklerin etrafında oluşan zon çapları

Kullanılan Bakteri Türü	Salyangoz Salgı Türü ve Konsantrasyonu		Oluşan Zon Çapı
<i>S.aureus</i>	Amoksisilin(Kontrol)		+
<i>S.aureus</i>	Slime	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>S.aureus</i>	Mukus	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>S.mutants</i>	Amoksisilin(Kontrol)		+
<i>S.mutants</i>	Slime	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>S.mutants</i>	Mukus	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>E.coli</i>	Amoksisilin(Kontrol)		+
<i>E.coli</i>	Slime	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>E.coli</i>	Mukus	%0.5	-
		%1	-
		%3	-
<i>S.epidermidis</i>	Amoksisilin(Kontrol)		1,1 cm
<i>S.epidermidis</i>	Slime	%0.5	-
		%1	-
		%3	1 mm
<i>S.epidermidis</i>	Mukus	%0.5	-
		%1	-
		%3	1 mm(Sadece 1 disk)
<i>P. fluorescens</i>	Amoksisilin(Kontrol)		1,5 cm
<i>P. fluorescens</i>	Slime	%0.5	1 mm
		%1	1 mm
		%3	1,35 mm
<i>P. fluorescens</i>	Mukus	%0.5	1 mm
		%1	1,5 mm
		%3	1,85 mm

5. TARTIŞMA

Salyangoz salgıları ile ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen, bu salgıları kullanarak doku iskelesi elde edilmesi ile ilgili literatürde oldukça büyük bir açık vardır. Çalışma boyunca yapılan araştırmalar sonucunda konu ile ilgili sadece bir kaynağa rastlanmıştır. Angulo ve arkadaşları kitosan/jelatin kullanarak doku iskelesi hazırlamış ve bu yapının içine %0.07 ve %0.15 oranında salyangoz mukusu ve aloe vera ekstraktı eklemişlerdir. Daha sonra elde edilen yapıların karakterizasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir [59]. Bu çalışmada ise kitosan ve farklı oranlarda (%0.5, %1, %3) salyangoz salgıları kullanılarak doku iskeleleri liyofilizasyon yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Kullanılan polimer ve salgı ekstraktları iyi bir şekilde entegre olmasına rağmen %1 kitosan-%3 slime doku iskelesinde salgı ekstraktının bir süre sonra polimer fazdan ayrıldığı gözlemlenmiştir. Literatürdeki çalışmaya benzer şekilde elde edilen salgı katkılı kitosan doku iskelelerinin morfolojisi, gözenekliliği, mekanik özellikleri, fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

Doku iskelelerinin gözenekliliği, gözenek boyutu ve yapısı; mekanik özellikleri, hücre tutunumu, çoğalımı ve doku oluşumu için önemli etkenlerdir. Gözenekler arası bağlantı, hücrelerin doku iskelesine tutunumunu kolaylaştırır. Aynı zamanda, gözeneklilik ve ortalama gözenek çapı, damarlanma için uygun ortamı sağlayarak kan yolu ile sağlanan oksijen ve besin maddelerinin transferi için kritik rol oynar.

Literatür çalışmaları göz önüne alındığında, Sherwood ve ark.larının kıkırdak rejenerasyonu için gözenekliliğin % 90 olması gerektiğini belirtmiş, Xie ve ark. ise doğal kıkırdak yapısını daha iyi taklit edebilmek için bu oranın daha düşük (%71) olması gerektiğini belirtmiştir [63,64,65]. Yapılan çalışmada mukus ve slime katkılı doku iskelelerinin tüm gruplarında %80'in üzerinde yüksek gözeneklilik elde edilmiştir. Kontrol grubu olan kitosanın gözeneklilik değeri %81,1; deney gruplarında ise gözeneklilik değerleri % 1 kitosan-%0.5 slime için %88,9; % 1 kitosan-%1 slime için %88,9; % 1 kitosan-%3 slime için %87,8; % 1 kitosan-%0.5 mukus için %88,9; % 1 kitosan-%1 mukus için %84,9; % 1 kitosan-%3 mukus için %90,1'dir. Doku iskelelerine eklenen salgı katkısının gözeneklilik oranını arttırdığı görülmektedir. Bunun yanı sıra salgı ekstraktı yüklü kitosan doku iskelelerinin homojen bir mikroyapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Morfolojideki homojenite yapının mekanik dayanımını da olumlu etkilemiştir.

Optimum gözenek büyüklüğünün, neovaskülarizasyon için 5 µm, fibroblastın doku iskelesi içinde büyümesi için 5-15 µm, hepatositlerin büyümesi için 20 µm, osteokondüksiyon için 200-350 µm, deri rejenerasyonu için 20-125 µm ve kırıkta hücrelerinin doku iskelesinde tutunması ve büyüebilmesi için uygun gözenek boyutu aralığının 150-200 µm olduğu belirlenmiştir [66-71].

Griffon ve ark. yaptığı çalışmada değişik gözenek çaplarına sahip ($\leq 10\mu\text{m}$, 10-50 µm, 70-120 µm) kitosan doku iskeleleri üretilmiş ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon testleri ile gözenek çapının hücre tutunumuna ve çoğalmasına olan etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak gözenek büyüklüğünün artmasıyla hücrelerin doku iskelelerine daha iyi tutunduğu, matriks ve kondrogenez oluşumunun artış gösterdiği bulunmuştur [72].

Nettles ve ark. yaptığı çalışmada liyofilizasyon yöntemi kullanılarak kitosan doku iskeleleri elde edilmiş ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın SEM karakterizasyonlarında ortalama gözenek çapının 67.6 µm olduğu belirlenmiştir [73].

Tan ve ark. yaptığı çalışmada jelatin/kitosan/hyaluronon kullanılarak kompozit doku iskeleleri üretilerek yapıya PLGA mikropartikülleri entegre edilmiştir. Doku iskelelerinin karakterizasyonları ve hücre kültürü işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM analizi sonucunda yalnızca kitosan kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin gözenek çapı 200 µm olarak ölçülmüştür [74].

Bu çalışmada SEM analizi sonucu, kontrol grubu kitosanın ortalama gözenek çapı $215,7\pm 73,4$ olarak bulunmuştur. Mukus ve slime katkılı gruplarda ise bu değerler % 1 kitosan-%0.5 slime için $160,2\pm 60,6$; % 1 kitosan-%1 slime için $182\pm 58,3$; % 1 kitosan-%3 slime için $144,3\pm 36$; % 1 kitosan-%0.5 mukus için $204,4\pm 70,6$; % 1 kitosan-%1 mukus için $197,2\pm 80,4$; % 1 kitosan-%3 mukus için $175,6\pm 73,7$ olarak ölçülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde, elde edilen gözenek çaplarının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ile deney grupları karşılaştırıldığında, yapılara eklenen salyangoz salgısı oranları arttıkça gözenek çaplarında azalma ve gözenek duvarlarında genişleme meydana geldiği görülmektedir. Ayrıca iki salgı türü arasında mukusun gözenek çapına olan etkisinin belirgin bir azalma trendi gösterdiği gözlenmiştir. Bunun nedeni, yüksek konsantrasyonda (%3) slime katkısının kitosanın yapısına tam olarak dahil olamamasıdır.

Elde edilen SEM görüntüleri ve ölçülen gözenek çaplarından elde edilen histogramlar incelendiğinde, doku iskelelerinde homojen mikroyapı elde edilmiş, benzer yapıdaki gözenek

dağılımları ve gözenekler arasında belirli bir geçiş olduğu gözlenmiştir. Eklenen salgı oranları arttıkça gözenek dağılımlarının kitosana göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. %1 mukus-%0.5 mukus ve %1 kitosan-%3 slime doku iskeleleri kontrol grubu ile daha benzer bir dağılıma sahiptir. Ancak %1 kitosan-%3 slime doku iskelelerinde eklenen salgı polimer yapıya dahil olamamaktadır. Yüksek gözeneklilik ve uygun gözenek çapı aralığında üretilen mukus ve slime katkılı kitosan doku iskelelerini, hücre tutunumu, hücrelerin beslenmesi ve çoğalımı için uygun yapılar olduğu düşünülmektedir.

Hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için geçici destek matrisleri gibi davranan doku iskelelerinde bir diğer önemli özellik şişme davranışıdır. Doku iskelesi vücutta defekt bölgeye yerleştirildiğinde, ilk olarak vücut sıvısı ile temas geçer ve malzeme yüzeyinde protein tutunumunu tetikler. Daha sonra malzeme yüzeyinde hücre tutunumu gerçekleşir. Ayrıca, doku iskelesinin şişme yeteneği; suyu tutması, vücut sıvılarını adsorbe etmesi, besin ve metabolitleri hücrelere aktarmasında önemli bir rol oynar.

Vishwanath ve ark.larının yaptığı çalışmada farklı oranlarda (90:10, 80:20, 60:40, 50:50) kitosan ve ipek fibrin kullanılarak kompozit doku iskeleleri üretilmiştir. Elde edilen doku iskelelerinin şişme özellikleri incelendiğinde, kitosan oranının fazla olduğu doku iskelelerinin su tutma kapasitelerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir (~222–262%) [75].

Angulo ve ark. yaptığı çalışmada kitosan/jelatin doku iskelelerine aloe vera ve salyangoz mukusu eklenerek oluşturulan doku iskeleleri için şişme deneyi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak %0,07 oranında aloe vera ve mukus eklenen doku iskelelerinin su tutma özelliği (%600-%1000), %0,15 oranında aloe vera ekstraktı ve mukus eklenen doku iskelelerine göre daha iyi sonuç vermiştir [59].

Sonuçlara bakıldığında salyangoz salgılarının, elde edilen yapıların hidrofilikliğini ve dolayısıyla su tutma özelliğini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca eklenen salgı oranı arttıkça hidrofilik özelliğin daha da azaldığı görülmektedir. Bunun sebebi salgıların hidrofobik özellik göstermesi ile açıklanabilir. Salyangoz salgıları su tutma kapasitesini azaltmasına rağmen elde edilen şişme değerlerinde literatür ile uyumlu sonuçlar bulunmuştur.

Mekanik dayanım da, doku iskelesi tasarımında göz önünde bulundurulması gereken bir diğer özelliktir. Oluşturulan doku iskeleleri doğal dokunun verdiği stresi karşılayacak dayanıklılıkta olmalıdır. Ayrıca, doku iskelelerinin gözenek boyutu, dağılımı ve mikroyapıdaki homojenite, mekanik özellikler üzerinde oldukça etkilidir.

Correia ve ark. yaptığı çalışmada kitosan ve hiyaluronik asit (%1, %5, %10) kullanılarak doku iskeleleri oluşturulmuş ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen yapıların mekanik dayanımları basma testi yapılarak tespit edilmiştir. Mekanik deneyler hem kuru doku iskeleleri için hem de vücut sıvısı (PBS) içerisinde bekletilen doku iskeleleri için gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, basma modülünün en yüksek olduğu değer, kontrol grubu olan kitosan doku iskelelerinde gözlenmiştir. Basma modülleri 291,03 kPa (kuru doku iskelesi) ve 2,84 kPa (ıslak doku iskelesi) olarak hesaplanmıştır [76].

Angulo ve ark. ise kitosan/jelatin doku iskelelerine salyangoz mukusu ve aloe vera ekstraktı ekleyerek oluşturdukları doku iskelelerine çekme deneyi uygulamışlardır. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubu olan kitosan/jelatin doku iskelelerinin Elastik modülü değerinin (4,99 MPa) deney gruplarına oranla daha iyi olduğu belirlenmiştir. Deney gruplarında ise elastik modülün en iyi olduğu grup %0,15 oranında salyangoz mukusu ve aloe vera ekstraktı eklenen doku iskelesidir (1,65 MPa) [59].

Bu çalışmada yapılan mekanik deney beş tekrarlı ve ASTM-D 5024-95a standardına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney grupları ve kontrol grubu kıyaslandığında, eklenen salgı oranının artması ile elde edilen yapıların mekanik dayanımının arttığı görülmektedir. Ancak deney esnasında %3'lük slime doku iskelesinde, polimere eklenen salgının yapıdan ayrıldığı ve ekstrakt haline geldiği; %3'lük mukus doku iskelesinde ise eklenen salgının malzemeyi gevreklettiği, kırılır hale getirdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, mukus ve slime katkılarının mekanik dayanım üzerinde olumlu etki gösterdiği, ayrıca duvar kalınlığının en fazla olduğu gruplarda mekanik dayanımın da en iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların geliştirilmesi gerektiği gözlenmiştir.

Oluşturulan doku iskelelerinin ve salgı ekstraktlarının kimyasal karakterizasyonu için FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar literatür ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

İbrahim ve ark. çalışmasında kitosan spektrumunda 3421 cm^{-1} 'deki pikin NH_2 ve OH germe titreşimlerine bağlı olduğunu, 2920 ve 2881 cm^{-1} 'deki bantların, CH gerilme titreşiminden kaynaklandığını, 1650 ve 1560 cm^{-1} 'deki bantların, yetersiz miktarda C-NH₂'ye bağlı olduğunu söylemiştir. CH₂ ve CH₃ titreşimleri sırasıyla 1423 ve 1380 cm^{-1} bantlarında verilmiştir. 1154 ile 1032 cm^{-1} bölgelerindeki bantların, C-O-C bağlantısı olduğu belirtilmiştir. 1150 ile 1000 cm^{-1} aralığında, aynı zamanda, şeker halkalarıyla bağlantılı "kombinasyon titreşim" bantlarının olduğunu, son olarak ise C-N karakteristik bandın 898 cm^{-1} 'de ortaya çıktığını bildirmişlerdir [77].

Mansur ve ark. ve Costa ve ark. yaptıkları çalışmalarda kitosan numunesi için, sakkarid yapısına (kitosanın tekrar eden birimi olarak) ilişkin 844 ve 1151 cm^{-1} civarında ana karakteristik pikleri gözlemlemişlerdir [78,79]. Ek olarak, 1740, 1480 ve 1346 cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon pikleri sırasıyla amid I, II ve III pikleri olarak rapor edilmiştir. 1382 ve 1417 cm^{-1} 'deki keskin piklerin, CH_3 simetrik deformasyon modundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca, 1081 ve 1122 cm^{-1} 'deki geniş bantların kitosandaki C-O esneme titreşimini gösterdiği ve 3447 cm^{-1} 'de bir başka pikin, amin N-H simetrik titreşimini gösterdiği söylenmektedir. Don ve ark. ise yaklaşık 2947 cm^{-1} 'de görülen pikin tipik C-H germe titreşimlerine bağlı olduğunu belirtmiştir [80].

Helix aspersa mukusu için Skingsley ve ark. yaptığı çalışmada, profilin Arion ater salyangozu ile benzer amid bileşenleri gösterdiğini ancak 1400 cm^{-1} civarında bir banttan yoksun olduğunu söylemiştir. Bunun da CH veya OH bükülmesinde ya da COO^- uzamasında değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir. 1800 cm^{-1} ve 2000 cm^{-1} arasında düşük seviyede bir aromatik bozukluk olduğu bildirilmektedir. 3510 cm^{-1} 'de OH bandı yapısı gözlemlenmiştir. 1640 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} sırasıyla Amide I ve Amide II'yi temsil etmektedir [81].

Pancake ve ark. yaptığı çalışmada ise 1735 cm^{-1} pikinin karboksil grubunu temsil ettiği, 1640, 1530 ve 1240 cm^{-1} 'in amid bağları pikleri olduğu söylenmiştir. 1240 ve 1000 cm^{-1} piklerinin ise sülfat grubuna denk geldiği belirtilmiştir [82].

Elde edilen FT-IR analizi sonuçlarında ok ile işaretlenen bölgelerde piklerin bir kısmı daha keskin bir hal almış bir kısmı ise genişlemiştir. Bu verilere bakılarak yapıların birbiri ile etkileşim gösterdiği anlaşılmaktadır.

Biyobozunurluk, uzun vadeli başarı için herhangi bir doku iskelesinin tasarımında dikkate alınması gereken önemli bir kriterdir. Biyobozunma, bir biyolojik sistemde implante edilen biyomalzemelerin kademeli olarak parçalandığı kimyasal süreci ifade eder. Bu durum, doku iskelelerini çeşitli enzimler ve diğer aktif maddeleri içeren doku sıvılarına maruz bırakarak gerçekleştirilir. İmplant edilen greft materyalleri zamanla bozunmaya uğrar ve doku oluşumunu başlatır. Bununla birlikte, implant alanında yeni dokunun büyüme hızını ve sürdürülebilirliği karşılaması gereken optimum bir bozulma oranı esastır.

Kitosanın daha yüksek deasetilasyon derecesi, lizozim tarafından daha hızlı bozunmaya yol açar. N-asetil glukozamin dizilimleri lizozimin etkisi ile hidrolize edilir ve bozulmuş ürünler GAG ve glikoprotein metabolik yollarına dahil edilir ve atılır. Ayrıca yüksek deasetilasyon derecesine sahip formların (örn. % 85) biyobozunurluğu daha uzun sürede gerçekleşir. Deasetilasyon derecesi düştükçe bozunma hızı artar.

Mallick ve ark. yaptığı çalışmada farklı oranlarda kitosan-PLLA ve farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak doku iskeleleri elde edilmiştir. Üretilen doku iskelelerinin biyobozunma ölçümleri yapıldığında en fazla ağırlık kaybı (%39) kontrol grubu olan kitosanda gözlemlenmiştir [83].

Angulo ve ark. yaptığı çalışmada ise kitosan/jelatin doku iskelelerine aleo vera ve salyangoz mukusu eklenerek oluşturulan doku iskeleleri için biyobozunma deneyi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak %0,15 oranında aloe vera ve mukus eklenen doku iskelelerinin biyobozunurluğu %0,07 oranında aloe vera ve mukus eklenen doku iskelelerine göre daha iyi sonuç vermiştir [59].

Slime ve mukus kullanılarak oluşturulan doku iskelelerinin bozunma hızını %9,4'ten %74,1'e arttırdığı görülmektedir. Ayrıca eklenen salgı oranı ile bozunma hızı arasında doğru orantı olduğu söylenebilir. Elde edilen sonuçların literatür ile de uyumlu olduğu görülmektedir.

Kıkırdak doku için biyobozunma hızının daha az olması gerekmektedir. Bu sebeple elde edilen yapılar için ilerleyen aşamalarda çapraz bağlayıcı kullanarak yapının biyobozunum hızının azaltılabileceği düşünülmektedir. Bozunum hızları göz önünde bulundurulduğunda doku iskelelerinin kemik doku rejenerasyonu için uygunluğu araştırılabilir.

Salyangoz salgıları için yapılan bir diğer karakterizasyon antimikrobiyal testtir. Dolashka ve ark. salyangoz salgılarından peptid izole ederek gram pozitif *Propionibacterium acnes* (strain 266 (IA), *Propionibacterium acnes* KPA171202) ve gram negatif *E.coli* NBIMCC, *Helicobacter pylori* bakteri türlerindeki etkilerini araştırmıştır. Sonuç olarak elde edilen peptidlerin bakteri türlerinde zon oluşturduğu gözlemlenmiştir [84].

Pitt ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada *Helix aspersa* salyangoz mukusunun antimikrobiyal özelliğini araştırmıştır. Birçok bakteri türü ile yapılan çalışmada *Helix aspersa* mukusunun *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türüne karşı etkili olduğu ortaya konmuştur [58].

Çalışmada ise salyangoz salgılarının antimikrobiyal özelliğini araştırmak için *S.epidermidis*, *E.coli*, *S.aureus*, *S.mutants* ve *P. fluorescens* olmak üzere beş bakteri türü kullanılmıştır. *S.aureus*; Pigmentli, çoğunlukla aerob üreyen, sporları olmayan, gram pozitif, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteri türüdür. Antibiyotiklere karşı diğer bakteri türlerine göre daha çok direnç gösterir. Deride ve mukozada enfeksiyonlara, bademcik iltihabına, faranjiet, gıda zehirlenmesine sebep olmaktadır. *S.epidermidis*; gram pozitif, bir bakteri türüdür. Bazı zamanlarda insan ve hayvan cildinin mukoz membranlarında görülmektedir.

Penisilin ve metisilini de içeren geniş bir antibiyotik grubuna karşı direnç gösterir. Bu bakteri türüne en çok bağışıklık sistemi düşük olanlarda, intravenöz ilaç kullananlarda, yenidoğanlarda, yaşlılarda ve kateter kullananlarda rastlanmaktadır. *E.coli*; memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan bakteri gram negatif bir bakteri türüdür. En çok vücut sıcaklığında çoğalır. İshal, idrar yolu iltihabı, menenjit gibi hastalıklara neden olmaktadır. *S.mutants*; çoğunlukla insan ağızında bulunan gram-pozitif bir bakteri türüdür. Diş çürüklerinin oluşmasında büyük bir etmendir. *P. fluorescens*; gram negatif bir bakteri türüdür. 4°C’de üreyip 41 °C’de üreyemez. Hastane mikrobu olarak bilinen *Pseudomonas aeruginosa*’nın patojen olmayan türüdür.

Bu bakteriler ile gerçekleştirilen antimikrobiyal testlerde; %0.5, %1, %3 oranında hazırlanan salyangoz salgı çözeltilerinin *P. fluorescens* ve *S.epidermidis* bakterilerine karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir. *P. fluorescens* için diskler etrafında her oranda zon oluşurken, *S.epidermidis* bakteri türünde yalnızca %3’lük oranlarda zon oluştuğu gözlemlenmiştir. Oran arttırılarak deneyler tekrarlanırsa salyangoz salgılarının *S.epidermidis* bakteri türüne olan etkisinin artacağı söylenebilir.

Yapılan çalışmada üretilen doku iskeleleri için *in vitro* hücre kültürü çalışmaları da planlanmıştır. Ancak bütün karakterizasyon işlemlerinin tamamlanması tahmin edilen süreden daha uzun sürdüğü için çalışmanın bu aşaması gerçekleştirilememiştir. Bir sonraki aşamada elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, üretilen doku iskelelerinin sitotoksik etkisi, biyoyumluluğu, hücre yapışmasına ve çoğalmasına ne derece uygun olduğu *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile belirlenecektir. Böylelikle farklı oranlarda salyangoz salgısı kullanılarak hazırlanan yapıların hücreler üzerine olan etkisi araştırılacaktır. Ayrıca histolojik analizler ile doku iskelelerinde oluşan kollajen ve GAG yapıları Masson Trichrome ve Toluidin Blue boyamaları ile gözlemlenebilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmada üretilen doku iskelelerinin kıkırdak dokuya uygunluğunu arttırmak için, kıkırdak doku ile benzer içeriğe sahip olan salyangoz salgıları kullanılmıştır.
- Salyangoz salgıları; sitotoksik etki göstermeyen, biyouyumlu, biyobozunur, antibakteriyal özellik gösteren ve yapısında kıkırdak dokuda bulunan glikoproteinleri içeren kitosan ile birlikte kullanılmıştır.
- Doku iskelelerinde kullanılan salyangoz salgılarının doz optimizasyonları literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Elde edilen farklı katkı oranlarının doku iskeleleri üzerindeki etkileri karakterizasyon testleri ile incelenmiştir.
- Yapılan SEM analizinde, polimere eklenen salgı katkısı oranları arttıkça gözenek çaplarında kontrol grubuna göre bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan gözeneklilik deneylerinde üretilen doku iskelelerinin %80'in üzerinde gözenekliliğe sahip olduğu belirlenmiştir.
- Doku iskelelerinin şişme analizlerinde ise salyangoz salgılarının polimere dahil olması ile yapıların su tutuma kapasitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Salgı oranları arttıkça hidrofilik özelliğin azaldığı görülmektedir. Ancak, elde edilen su tutma kapasitelerinin literatür ile kıyaslandığında yeterli düzeyde olduğu görülmektedir.
- Polimere eklenen salyangoz salgıları biyobozunurluk üzerinde oldukça olumlu sonuçlar vermiştir. Yapılan analizler sonucunda salgı oranları arttıkça biyobozunurluğun arttığı saptanmıştır.
- Bununla birlikte biyomekanik analizler sonucunda kitosan ve salyangoz salgıları kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin kontrol grubuna göre daha iyi mekanik sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Eklenen salgı oranı arttıkça mekanik dayanımın arttığı görülmüştür. Ancak %3 slime oranı ile hazırlanan doku iskelelerinin mekanik deney sırasında toz haline geldiği, eklenen salgının polimer fazdan ayrıldığı gözlemlenmiştir. %3'lük mukus oranı ile hazırlanan doku iskelelerinde ise mekanik dayanımın en iyi olduğu grup olmasına rağmen, malzeme içinde kırılmalar meydana getirdiği ve yapıyı gevreklettiği görülmüştür. Vücut içerisindeki ortamı taklit etmek amacı ile simüle

vücut sıvısı içerisinde inkübe edilen doku iskelelerine ıslak basma testi uygulanması planlanmaktadır.

- Antimikrobiyal özellikleri araştırılan salyangoz salgıları *S.aureus*, *S.mutants*, *E.coli*, *S.epidermidis* ve *P. fluorescens* bakteri türlerinden; *S.epidermidis* ve *P. fluorescens* üzerinde etki göstermiştir. *S.epidermidis*'de yalnızca %3'lük oranlarda zon oluşturan salgılardan, *P. fluorescens*'in bakteri türünde her oranda olumlu sonuçlar alınmıştır. *P. fluorescens*'in hastane mikrobunun bulaşıcı olmayan bir türü olduğu bilinmektedir. Elde edilen bu sonuçlarla salyangoz salgılarının antimikrobiyal özelliklerine ilişkin daha farklı çalışmalar planlanabilir.
- Çalışmanın bir sonraki aşamasında *in vitro* hücre kültürü deneyleri yapılarak sitotoksosite, biyouyumluluk araştırmaları yapılacak ve elde edilen yapıların hücre tutunumuna ne derece izin verdiği, çoğalmayı nasıl etkilediği, kıkırdak hücreleri üzerinde nasıl bir etkisi olduğu belirlenecektir. Ayrıca histolojik boyamalar ile doku iskelelerinde oluşan kollajen ve GAG yapılarının oluşumu gözlemlenecektir. Ayrıca salyangoz salgılarının farklı hücre tipleri (fibroblast, osteoblast) üzerine olan etkilerinin de *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile araştırılması planlanmaktadır.
- *In vitro* analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek bir sonraki aşama olan *in vivo* (deney hayvanı) çalışmaları gerçekleştirilecektir. Bu sayede elde edilen yapıların vücut içerisinde nasıl bir etkisi olduğu gözlemlenebilecektir.
- Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, doku iskelelerinin hazırlanması için farklı polimerler veya çapraz bağlayıcılar kullanılması da düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] kıkırdak doku görevleri ve cesitleri Web sitesi: www.yenibiyoloji.com, Erişim tarihi: 20/05/2018.
- [2] Tüzün F. Hareket Sistemi Hastalıklar. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, 1997; 245-260.
- [3] Brinker MR, O'Connor DP. Basic sciences. In: Miller MD, editor. Review of orthopaedics. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 1-132.
- [4] generation of cartilage from periosteum in vivo a clear clue how to start epiphyseal cartilage regrowth using minimal invasive techniques breakthrough/articular cartilage diagram, Web sitesi: <http://www.naturalheightgrowth.com>, Erişim tarihi: 20/05/2018.
- [5] Jahn S, Seror J, Klein J. Lubrication of articular cartilage. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2016; 18:235–58.
- [6] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage, Biomaterials 2000;21:431-440.
- [7] Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. J Orthop Sports Phys Ther 1998;28:203-15.
- [8] Buckwalter JA. Articular cartilage. AAOS Inst Course Lect 1983;32:349-70.
- [9] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. AAOS Inst Course Lect 1998;47:477-86.
- [10] Wirth CJ, Rudert M. Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. Arthroscopy 1996;12:300-8.
- [11] Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management, British Medical Bulletin 2008;87: 77–95.
- [12] Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E. Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopy stereology and quantitative audioradiography. J Orthop Res 1996;14:424-32.
- [13] Di Bella C, Fosang A, Donati DM, Wallace GG, Choong PF. 3D bioprinting of cartilage for orthopedic surgeons: reading between the lines, Front Surg. 2015;13:2-39.

- [14] Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998;28:192-202.
- [15] Howell DS, Treadmwell BV, Trippel SB. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, eds. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management.* Philadelphia, PA: WB Saunders; 1992:233-252.
- [16] Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64:460-466.
- [17] Ateshian GA, Warden WH, Kim JJ, Grelsamer RP ve ark. Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments. *J Biomech.* 1997;30:1157-1164.
- [18] Mow VC, Ateshian GA, Ratcliffe A. Anatomic form and biomechanical properties of articular cartilage of the knee joint. In: Finerman GAM, Noyes FR, eds. *Biology and Biomechanics of the Traumatized Synovial Joint: The Knee as a Model.* 2nd ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1992:55-81.
- [19] Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech.* 1984;17:377-394.
- [20] Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP. Form and function of articular cartilage. In: Simon SR, ed. *Orthopaedic Basic Science.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994:1-44.
- [21] Maroudas A. Physiochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, ed. *Adult Articular Cartilage.* Kent, United Kingdom: Cambridge University Press; 1979:215-290.
- [22] Mow VC, Ratcliffe A. *Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus.* 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997.
- [23] Frank EH, Grodzinsky AJ. Cartilage electromechanics: I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength. *J Biomech.* 1987;20:615-627.
- [24] Maroudas A, Bullough P. Permeability of articular cartilage. *Nature.* 1968;219:1260-1261.
- [25] Hauser RA, The acceleration of articular cartilage degeneration in osteoarthritis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Prolotherapy.* 2010;(2):305-322.

- [26] Woo SLY, Lee TQ, Gomez MA, Sato S ve ark. Temperature dependent behavior of the canine medial collateral ligament. *J Biomech Eng.* 1987;109(1):68-71.
- [27] Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments. *J Biomech Eng.* 1980;113:73-84.
- [28] Simon BR, Coats RS, Woo S L-Y. Relaxation and creep quasi linear viscoelastic models for normal articular cartilage. *J Biomech Eng.* 1984;106:159-164.
- [29] Hayes WC, Mockros LF. Viscoelastic properties of human articular cartilage. *J Appl Physiol.* 1971;31:562-568.
- [30] Setton LA, Mow VC, Howell DS. Changes in the sheer properties of the canine knee cartilage resulting from anterior cruciate transaction. *J Orthop Res.* 1995;13:473-482.
- [31] Manoto SL, Maepa MJ, Motaung, SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J Biol Sci.* 2018 May;25(4):672-679.
- [32] Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 2010;35:403–440.
- [33] Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003;22:81–91.
- [34] O'Driscoll SW. Current concepts review—the healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80:1795–812.
- [35] Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:15–28.
- [36] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transpl Immunol.* 2005;15:81–9.
- [37] Langer R, Vacanti J.P. Tissue engineering, *Science*, 1993;260(5110): 920-6.
- [38] Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments, *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 2016;59:139–144.
- [39] Seo SJ, Mahapatra C, Singh KR, Knowles JC ve ark. Strategies for osteochondral repair:Focus on scaffolds, *Journal of Tissue Engineering* 2014;5:1-14.

- [40] O'Brien FJ. Biomaterials&scaffold for tissue engineering, *Materials Today*, 2011;14(3):88-95.
- [41] Li WJ, Laurencin CT., Caterson EJ, Tuan RS ve ark. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002;60(4):613-621.
- [42] Chung C, Burdick JA, Engineering cartilage tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 243–262.
- [43] Senköylü A, Korkusuz F. Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları TOTBİD Dergisi, 2004; 3: 3-4.
- [44] Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59:339–359.
- [45] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK. ve ark. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances* 2008; 26:1–21.
- [46] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal* 2013;49:780–792.
- [47] Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2010;31:3976-3985.
- [48] Ngoenkam J, Faikrua A, Yasothornsrikul S, Viyoch J. Potential of an injectable chitosan/starch/ β -glycerol phosphate hydrogel for sustaining normal chondrocyte function, *Int. J. Pharm.* 2010;391:115-124.
- [49] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, 2000;21(24):2589-98.
- [50] Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, 2002;8(6):1009-16.
- [51] Aiedeh K, Gianasi E, Orienti I, Zecchi V. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin, *J. Microencapsul.* 1997;14:567-76.
- [52] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;51:586-5.

- [53] Brieva A, Philips N, Tejedor R, Guerrero A. ve ark. Molecular Basis for the Regenerative Properties of a Secretion of the Mollusk *Cryptomphalus aspersa*, *Skin Pharmacol Physiol* 2008;21:15–22.
- [54] Tsoutsos¹ D, Kakagia D, Tamparopoulos K. The efficacy of *Helix aspersa* Müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols, *Journal of Dermatological Treatment* 2009;20:219–222.
- [55] Otsuka-Fuchino H, Watanabe Y, Hirakawa C, Tamiya T. ve ark. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant african snail, *Camp. Biochem. Physiol.* 1992;101(3):607-613.
- [56] Etim LB, Chuku Aleruchi C, Godwin Attah Obande GA. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection, *British Microbiology Research Journal* 2016;11(2):1-9.
- [57] E-kobon T, Thongararm P, Roytrakul S, Meesuk L. ve ark. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2016;14:49–57.
- [58] Pitt SJ, Graham MA, Dedi CG, Taylor-Harris Pm. ve ark. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *helix aspersa*, *J Biomed Sci.* 2015;72(4):174-81.
- [59] Angulo DE, Sobral PJ. 2016. Characterization of gelatin/chitosan scaffold blended with aloe vera and snail mucus for biomedical purpose, *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;92:645-653.
- [60] İnan, M.S. 2004. Salyangoz biyolojisi ve yetistirme teknikleri. Web sitesi: <http://www.tarim.gov.tr>. Erişim tarihi: 20/05/2018.
- [61] Tsoutsos D, Kakagia D, Tamparopoulos K. The efficacy of *helix aspersa* müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols, *Journal of Dermatological Treatment* 2009;20:219–222.
- [62] Ng PT, Saltin SH, Davies MS, Johannesson K. ve ark. Snails and their trails: the multiple functions of trail-following in gastropods, *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2013;88(3):683-700.
- [63] Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R ve ark. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 2001;7:557–72.

- [64] Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC ve ark. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2002; 23:4739–51.
- [65] Xie J, Ihara M, Jung YM, Kwon IK ve ark. Mechano-active scaffold design based on microporous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for articular cartilage tissue engineering: dependence of porosity on compression force-applied mechanical behaviors. *Tissue Eng* 2006;12:449–58.
- [66] Brauker JH, CarrBrendel VE, Martinson LA, Crudele J. ve ark. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane micro architecture. *J. Biomed. Mater. Res* 1995;29:1517-1524.
- [67] Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. A Symp.* 1971;2:161-168.
- [68] Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering part I: traditional factors *Tissue Eng.* 2001;7(6):679-689.
- [69] Whang K, Healy KE, Elenz DR. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture, *Tissue Eng.* 1999;5:35-51.
- [70] Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989;86:933-937.
- [71] Zhang Q, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration *Acta Biomater.* 2014;10(5):2005-13.
- [72] Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell AJ, ve ark. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering, *Acta Biomaterialia* 2006;2:313–320.
- [73] Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Engineering* 2002;8(6):1009-16.
- [74] Tan H, Wu J, Lao L, Gao C. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 2009;5:328–337.
- [75] Vishwanath V, Pramanik K, Biswas A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2016;27(7), 657–674.

- [76] Correia C, Moreira-Teixeira LS, Moroni L, Reis RL ve ark. Chitosan Scaffolds Containing Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Eng Part C Methods*, 2011; 17(7):717-30.
- [77] Ibrahim M, Mahmoud AA, Osman O, Refaat A, El-Sayed ESM. Molecular spectroscopic analysis of nano-chitosan blend as biosensor. *Spectrochim. Acta. A*. 2010;77: 802–806.
- [78] Mansur HS, Costa HS. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Chem Eng J*. 2008;137(1):72–83.
- [79] Costa Jr EDS, Mansur HS. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinylalcohol)blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application. *Química Nova*. 2008;31: 1460–1466.
- [80] Don TM, King CF, Chiu WY, Peng CA. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. *Carb Polym*. 2006; 63(3):331–339.
- [81] Skingsley DR, White AJ, Weston A. Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy, *J. Moll. Stud*. 2000;66:363–371.
- [82] Pancake SJ, Karnovsky ML. The isolation and characterization of a mucopolysacchharide secreted by the snail, *otella lactea*, *The Journal of Biological Chemistry* 171;264(1):253-262.
- [83] Mallick SP, Pal K, Rastogi A, Srivastava P. Evaluation of poly(L-lactide) and chitosan composite scaffolds for cartilage tissue regeneration. *Designed Monomers and Polymers*, 2016;19(3):271–282.
- [84] Dolashka P, Dolashki A, Velkova L, Stevanovic S. Bioactive compounds isolated from garden snails, *J. BioSci. Biotechnol*. 2015:147-155.

8. EKLER

8.1. Arbis Özgeçmiş

MERVE PERPELEK

Doğum Yılı:	1991
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik Bölümü, 35340 İnciraltı/İZMİR
Telefon:	+90 555 637 86 15
Faks:	-
e-posta:	merveperpelek@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi/ Fizik Bölümü	Fizik	Lisans	2015
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Biyomekanik Anabilim Dalı	Biyomekanik	Yüksek Lisans	2018

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Fizik(teori), biyomekanik(deney ve teori), Hücre kültürü

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Son iki yılda verilen lisans dersleri

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Haftalık Saati		Öğrenci Sayısı
			Teorik	Uygulama	
2016-2017	Güz				
	İlkbahar				
2017-2018	Güz				
	İlkbahar				

8.2. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.

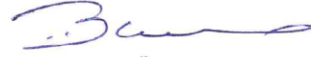
09.06.2017

Sayı : 1525

Sayın Doç.Dr.Ahmet KARAKAŞLI,

Kurulumuz tarafından 08.06.2017 tarih ve 3350-GOA protokol numaralı 2017/15-09 karar numarası ile görüşülen **“Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak Doku İskelelerinin Biyouyumluluk ve Mekanik Özelliklerinin Analizi”** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3350-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak Doku İskelelerinin Biyouyumluluk ve Mekanik Özelliklerinin Analizi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Ahmet KARAKAŞLI Ortopedi ve Travmatoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/15-09	Tarih:08.06.2017
	Doç.Dr.Ahmet KARAKAŞLI'nın sorumlusu olduğu "Salyangoz Salgıları ve Kitosan Temelli Kıkırdak Doku İskelelerinin Biyouyumluluk ve Mekanik Özelliklerinin Analizi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	