

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**

**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**



**Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu  
Health Sciences Research Committee**

**BÜYÜME FAKTÖRÜ İÇEREN  
JELATİN YARA ÖRTÜLERİNİN HAZIRLANMASI  
VE KARAKTERİZASYONU**

**PROJE NO: SBAG-2261**

Prof. Dr. Nesrin Hasırcı  
Doç.Dr.Kezban Ulubayram  
Prof. Dr.Ercüment Kuterdem  
Prof.Dr.Vasıf Hasırcı  
Doç. Dr. S.İsmet Delioğlu Gürhan  
Dr.Cemile Ertan  
Dr.Kemal Şerbetçi  
Y.Kim.Ebru Aksu

**Ekim 2002  
ANKARA**

## İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	4
ABSTRACT.....	5
Tablo .....	6
Şekil .....	7
1. GİRİŞ.....	8
1.1 GENEL BİLGİLER.....	8
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	10
2.1 Materyal.....	10
2.2 Yöntem.....	10
2.2.1 Jelatin Süngerlerin Hazırlanması .....	10
2.2.2 Jelatin Süngerlerin Karakterizasyonu .....	11
2.2.2.1 Yoğunluk analizleri .....	11
2.2.2.2 Termal analizleri .....	12
2.2.2.3 Mekanik analizleri .....	12
2.2.2.4 Çapraz bağlayıcıların jelatin sünger yıkımına etkileri .....	13
2.2.3 Sitotoksosite Testleri .....	13
2.2.4 In Vivo Uygulamalar .....	14
2.2.4.1 EGF içeren sünger yapıların hazırlanması .....	14
2.2.4.2 In vivo deneyler .....	14
2.2.4.3 Histoloji analizleri .....	15
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	16
3.1 Jelatin Süngerler .....	16
3.2 Jelatin Süngerlerin Karakterizasyonu .....	17
3.2.1 Yoğunluk analiz sonuçları .....	17
3.2.2 Termal analiz sonuçları .....	18
3.2.3. Mekanik analiz sonuçları .....	19
3.2.4 Çapraz bağlayıcıların jelatin süngerlerin yıkımı üzerine etkisi .....	22
3.3 Sitotoksosite Testleri .....	25
3.4 In Vivo Uygulama Sonuçları .....	29
3.4.1 Makroskopik gözlemler .....	29
3.4.2. Histolojik bulgular .....	29
4. SONUÇ .....	32
KAYNAKÇA.....	33

## ÖZ

Jelatin, doğal bir polimer olup eczacılık ve medikal uygulamalarda özellikle biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen yara örtüleri ve ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Jelatin granülleri sulu ortamlarda şişerek çözünür ve in vivo da ise hızla yıkılır. Bununla birlikte bu malzemelerin, aldehit, karbodiimit veya şekerle çapraz bağlanmaları dayanımını uzun süre sağlayabilir ancak bu malzemelerin biyouyumlulukları çapraz bağlayıcının çeşidinden ve çapraz bağlanma derecesinden etkilenmektedir.

Bu çalışmanın birinci bölümünde, glutaraldehit, (GA), 1-ethyl-3-(3-dimetil amino propil) karbodiimit (EDAC), and D-fruktoz gibi değişik çapraz bağlayıcılar kullanılarak sünger yapıda jelatin yara örtüleri hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcıların çeşitleri ve miktarlarının jelatin süngerlerin termal ve mekanik özelliklere, stabilitelere, sitotoksiteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Fibroblast hücreler kullanılarak yapılan in vitro çalışmaları, canlı hücre sayısının GA ile çapraz bağlı sünger yapılarda EDAC ile olanlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise, sünger yapıdaki jelatin yara örtülerine büyüme faktörü olarak EGF eklenmiştir. Hazırlanan yara örtülerinin iyileşme üzerine etkileri tavşanlar üzerinde test edilmiş ve sırtta açılan tam deri defektlerine uygulanmıştır. Belli aralıklarla iyileşmekte olan doku örnekleri alınmış ve histolojik olarak incelenmiştir. Histoloji sonuçları, hazırlanmış yara örtülerinin, biyouyumlu olduklarını, mononükleer hücre infiltrasyonu veya yabancı cisim reaksiyonuna sebebiyet vermediklerini göstermiştir. Oluşan yeni dermisin kalitesinin normal deridekine yakın olduğu tespit edilmiştir. Bunların yanısıra, EGF içeren sünger örtülerin uygulandığı yaralarda iyileşmenin daha hızlı ve daha düzgün olduğu gözlenmiştir.

## **ABSTRACT**

Gelatin is a natural polymer used in pharmaceutical and medical applications, especially in the production of biocompatible and biodegradable wound dressings and drug delivery systems. Gelatin granules hydrate, swell and solubilize in water and rapidly degrades in vivo. However, durability of these materials could be prolonged by crosslinking by aldehydes, carbodiimides and aldose sugars, but biocompatibilities of collagenous biomaterials are profoundly influenced by the nature and extent of crosslinking.

In the first part of this study, gelatin sponges were prepared by using various crosslinkers such as glutaraldehyde (GA), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), and D-fructose. The effects of the type and the amount of crosslinker on thermal and mechanical properties, stability, and cytotoxicity were investigated. In vitro studies carried out with fibroblast cells demonstrated higher cell viability for the samples crosslinked with GA than the ones crosslinked with EDAC.

In the second part of the study, EGF was added into the gelatin sponge structures as growth factors. The prepared wound dressings were tested for wound healing in in-vivo experiments and were applied on the full-thickness skin defects created on rabbits. At certain intervals the healing tissues were biopsied and processed for histological examinations. Results of the histological investigations showed that the prepared dressings were biocompatible, did not cause any mononuclear cell infiltration nor foreign body reaction. The quality of the dermis was almost as good as the normal skin. Besides, faster and more proper healing was observed for the wounds on which EGF containing sponges were applied.

## TABLÖLAR

1. Hazırlanan jelatin sünger yapılar ve kullanılan çapraz bağlayıcı miktarları .....	11
2. Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren jelatin süngerlerin yoğunluk değerleri	17
3. Jelatin Süngerlerin Mekanik Özellikleri .....	20
4. Jelatin Süngerlerin Yıkım Süreleri .....	25
5. Toksikite Test Sonuçları .....	27

## ŞEKİLLER

1. Jelatin süngerler.....	16
2. DSC termogramları; (A) GS, (B) GS-GA1, (C) GS-GA3, (D) GS-EDAC4, (E) GS-EDAC6.....	19
3. Jelatin süngerlerdeki gerilme direnci değişimi.....	21
4. Jelatin süngerlerdeki elastik modülüs değişimi.....	21
5. GS ve GS-F örneklerin biyoyıkım grafikleri.....	23
6. GA içeren GS örneklerin biyoyıkım grafikleri.....	23
7. EDAC içeren GS örneklerin biyoyıkım grafikleri.....	24
8. Hücrelerin mikroskop altında görünüşleri (A) Kontrol, (B) GS, (C) GS-F, (D)GS-GA1, (E) GS-GA3, (F) GS-EDAC1, (G) GS-EDAC4, (H) GS-EDAC6 ....	28
9. Operasyondan bir hafta sonra kontrol grubu (#1). Oluşumu tamamlanmamış granülasyon dokusu (*) ve genişlemiş kan damarları gözlenmiştir. M Trichrome x 4.....	30
10. Operasyondan bir hafta sonra GS-GA1-EGF (# 4) grubu. Yara bölgesi daha iyi organize olmuş granülasyon dokusu ile dolmuştur. Kollajen fibriller (Co) kendi karakteristik yapıları doğrultusunda organize olmuşlardır. C; crute, M Trichrome x 4.....	30
11 Operasyondan on gün sonra kontrol grubu (#1). Yara yüzeyi ince bir epidermis (E) tabakası ile kaplanmıştır. Dermiste (D) ince kollojen fibriller (ok) gözlenmiştir. HEx4 .....	31
12 Operasyondan on gün sonra GS-GA1-EGF grubu (# 4). Epidermis (E) oluşumu tamamlanmıştır. Dermisin (D) yapısında olgunlaşmış kollajen fibriller (Co) gözlenmiştir. Yara bölgesi tamamen iyileşmiştir. M Trichrome x 4 .....	31

# 1.GİRİŞ

## 1.1 GENEL BİLGİLER

Yara iyileşmesi birbirin izleyen ve kısmen iç içe girmiş dönemlerden oluşan dinamik ve kompleks bir prosestir. Bu dönemler; inflamasyon, granülasyon, neovaskularizasyon, reepitelizasyon, ekstrasellüler matriks ve bağ dokusunun yeniden oluşmasını içerir (1). Bazı durumlarda yara kendiliğinden iyileşebildiği gibi bazen de; venöz basınç yüksekliği, atardamar darlığı, mikroorganizmaların varlığı, diyabet, neoplazi, radyasyon gibi fiziksel ve kimyasal faktörler iyileşmede sorunlar oluşturmaktadır (2). Büyük doku kaybı olduğunda ya da kronik yaralarda örneğin yanık, travma, diyabetik, dekübütüs ülseri gibi durumlara etkili iyileştirme programı; doku onarım prosesine iyi anlamayı ve uygun yara örtüsü seçimini gerektirir (3). Bu durumlarda yara yüzeyi uygun bir örtüsü ile kapatılarak bir taraftan yaranın nemli tutulması sağlanırken diğer taraftan dokunun dış etkenlerden korunması gereklidir. Yapısına ve kompozisyonuna bağlı olarak yara örtüleri; yara bölgesinde oluşan eksüdayı emerek kötü koku ve enfeksiyonu önler, ağrıyı azaltır, yarayı nemli tutarak granülasyon dokusunun oluşumunu ve epitelizasyon işlemini hızlandırır.

Birçok maddenin (yağ, şeker, vb.) yara iyileşmelerinde kullanıldığı çok eski çağlardan beri bilinmektedir (4,5). Daha sonra pamuk (Gamgee, 1880) gazlı bezle (Lumiene, 1903) birlikte antibiyotikli melhemler, bir takım antiseptik sıvılar bunların yerini almıştır. Günümüzde ise geleneksel metodların yerine yaranın türüne ve bölgesine göre yara örtüleri almıştır. Bunların arasında; poliüretan ( Op-site<sup>R</sup>) (6,7), silikon ( biobrane<sup>R</sup>) (8), polivinilprolidon (Aquagel<sup>R</sup>, Nu-gel<sup>R</sup>) (9,10), karboksimetilselüloz (Comfeel<sup>R</sup>) aljinat (11), polisakkaritler (12,13), kollajenden hazırlanmış (biyobrane<sup>R</sup>, EZ Derm<sup>R</sup>) (8) en yaygın olarak kullanılanlardır. Yara örtü materyalleri yaranın türüne göre film, sünger, fibril, mikroküre, hidrojel, adhesiv jel veya hidrokolloil yapıda olan malzemelerdir. Yara örtü materyali üzerine çalışmalar hergün gelişen teknoloji ve artan talep ile yoğun bir şekilde sürmektedir. Epidermis ve dermis model alınarak çift katlı (silikon-kollajen) yara örtü materyali üzerine ilk çalışmalar Yannas tarafından MIT’de başlamış olup (14-19) daha sonra bu yara örtüsü Suzuki (20) ve Matsuda tarafından geliştirilmiştir (21-22).



Son yıllardaki araştırmalar ise ‘akıllı malzeme ve doku mühendisliği ürünleri (modern yara örtüleri) zerine yoğunlaşmıştır (23-26). Burada hedef, klasik yara örtülerin görevlerini üstlenirken aynı zamanda hızlı ve kozmetik iyileşmeyi sağlayan, hücre proliferasyonunu hızlandırıcı ve doku gelişimini sağlayan düşük maliyetli yara rtleridir. Smith and Nephew araştırma laboratuvarlarında son çalışmada kronik yaralar için insan fibroblastları in-vitro da doku haline getirilmiş ve rn (Dermograft<sup>R</sup>) klinik uygulamaya girmiştir (27). Diğer yeni bir ürün ise, enfekte olmuş yaralar için geliştirilen ve antibakteriyal içeren kollajen yara örtüsüdür (28). Bu materyal de klinik uygulamaya girmiştir.

Diğer taraftan moleküler geniğiğin gelişmesiyle, terapötik ajanların büyük bir sınıfı olan polipeptit ve proteinler oldukça önem kazanmıştır. Son yıllarda, peptitler, proteinler, hormonlar, büyüme faktörleri tedavi amaçlı kullanılmaktadır (29-37). Recombinant DNA teknolojisiyle bu makromoleküllerin üretimi mümkün olurken, araştırmalar bunların etkili olan formülasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak polipeptitlerin tamamen etkili olan formülasyonu henüz gerçekleşmemiştir (38-39). Polipeptidler içinde büyüme faktörleri (TGF, EGF, NGF, FGF) yara iyileşmelerinde önemli bir yer tutmaktadır (39). Büyüme faktörleri hücre bölünmesini, farklılaşmasını, gen ekspresyonunu aktive ettikleri gibi doz etkilerine bağlı olarak hücre bölünmesini engelleyebilirler (40). Dolaysıyla bu ürünlerin uygun doz formülasyonunun hazırlanması, diğer sistemik etkileri yok etmek için oldukça önemlidir. Ayrıca, biyolojik ortamda dayanıklı olmamaları (gastrointesiyinal kanaldaki proteolitik enzimlerle kısa sürede parçalanır ve aktivetelerini kaybederler), biyolojik yarılanma sürelerinin kısa olması, uygulanmalarını oldukça zorlaştırır. Örneğin, büyüme faktörleri arasında özellikle anjiogenezde önemli rol oynayan PDGF, dolaşım sisteminde izlenememiştir, intra venöz olarak enjekte edildiğinde yarı ömrünün iki dakikadan daha az olduğu belirtilmiştir (41).

Bu araştırmada amaç, iyileşmesi zor olan (kronik) yaralar için doğal, biyobozunur, immünojenik etki göstermeyen jelatinden, poröz yapıda yara örtüsü hazırlanması, karakterize edilmesi ve geliştirilmesidir. Hücre çoğalmasını aktive etmek ve iyileştirmeyi hızlandırmak için epidermal büyüme faktörü (EGF, jelatin mikroküreler içinde olarak) sünger yapılar eklenmiştir. Büyüme faktörünün jelatin mikroküreler içinde eklenmesi, biyolojik ömürlerini uzatmak açısından önemlidir.

Jelatin, biyoyumlu, biyoyıkımlı, düşük immünojenik etkisi ve kolay işlenebilir olması nedenleriyle bu araştırmanın ana materyali olarak seçilmiştir. Jelatin yapıların yıkım süresi,

yapının kimyasal özelliklerine, kullanılan çapraz bağlayıcının tip ve miktarına göre değişmektedir. Çapraz bağlayıcı olarak gluraldehit kullanımı çok yaygın olmakla birlikte, toksik etki gösterdiği birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin yanı sıra, daha az toksik etki gösterdiği belirtilen ve suda çözünen karbodiimid ve fruktoz kullanılarak farklı sünger yapılar hazırlanmıştır. Farklı çapraz bağlayıcılar ile hazırlanan sünger yapıların yıkım zamanları, özkütleleri, termal ve mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır. Farklı çapraz bağlayıcılar içeren jelatin süngerlerin toksisiteleri, hücre kültür deneyleri ile incelenmiştir. Hazırlanan yara örtüleri, tavşanların sırtlarında açılan tam deri defektlerine uygulanmıştır. Belli aralıklarla iyileşmekte olan doku örnekleri alınmış ve histolojik olarak incelenmiştir. EGF içeren sünger örtülerin uygulandığı yaralarda iyileşmenin daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.1 MATERYAL**

Jelatin Difco Laboratuvarlarında (USA) mikrobiyolojik kültür besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmak amacıyla üretilmiştir. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid ( $C_8H_{17}N_3.HCl$ , EDAC), D-fruktoz, Sigma'dan (St Louis, USA) alınmıştır. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) (insan rekombinant) Sigma dan (USA) ve glutaraldehit (%50 sıvı çözelti),(GA) BDH Limited'den (Poole, England) alınmıştır. Giemsa Merck'den (Almanya) alınmıştır. Sodyum fosfat, di-sodyum hidrojen fosfat-2-hidrat, sodyum azid, %2 sodyum potasyum tartart, %2 sodyum karbonat, 0.1 N NaOH, folin-fenol kimyasalı, %2  $CuSO_4.5H_2O$ , vankomisin (Lilly) ve diğer tüm kimyasallar analitik formdadır. Sıvı çözeltiler distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Fosfat tamponu (0.01 M, pH 7.4), sodyum fosfat ve disodyum hidrojen fosfat-2-hidrat kullanılarak hazırlanmıştır.

## 2.2 YÖNTEMLER

### 2.2.1. Jelatin Süngerlerin Hazırlanması

Hazırlanan sıvı jelatin çözeltilere (% 3 w/v, 50 ml, 60°C de ısıtılmış) farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı (glutaraldehit, karbodiimid ve şeker) eklenmiştir. Bu karışımlar, dakikada 2000 dönüm hızı ile 30 dakika karıştırılmış ve elde edilen çözelti, 1,5 cm kalınlığındaki petri kaplarına dökülerek sıvı azot üzerinde, dondurarak kurutma tekniği ile 12 saat kurutulmuştur. Hazırlanan jelatin sünger yapılar ve içerikleri Tablo1.de verilmiştir.

Tablo1. Hazırlanan jelatin sünger yapılar ve kullanılan çapraz bağlayıcı miktarları

Örnekler	Çapraz bağlayıcı	Çapraz bağlayıcı miktarı	Çapraz bağlayıcı (mmol)
GS	-	-	-
GS-GA <sub>1</sub>	Glutaraldehit	0.5 % (v/v), 5 mL	0.25
GS-GA <sub>2</sub>	Glutaraldehit	1 % (v/v), 5 mL	0.50
GS-GA <sub>3</sub>	Glutaraldehit	5 % (v/v), 1 mL	0.50
GS-EDAC <sub>1</sub>	EDAC	0.5 % (w/v), 1 mL	0.013
GS-EDAC <sub>2</sub>	EDAC	0.5 % (w/v), 3 mL	0.026
GS-EDAC <sub>3</sub>	EDAC	0.5 % (w/v), 5 mL	0.078
GS-EDAC <sub>4</sub>	EDAC	5 % (w/v), 1 mL	0.26
GS-EDAC <sub>5</sub>	EDAC	5 % (w/v), 3 mL	0.78
GS-EDAC <sub>6</sub>	EDAC	5 % (w/v), 5 mL	0.13
GS-F	Fruktoz	0.075 g	0.42

### 2.2.2 Jelatin süngerlerin Karakterizasyonu

#### 2.2.2.1. Yoğunluk Analizleri

Hazırlanan süngerler, cerrahi bıçak kullanılarak küpler halinde (~1cm<sup>3</sup>) kesilmiş ve tüm boyutları mikrometre ile ölçülmüştür. Elde edilen örneklerin yoğunlukları, ağırlık ve hacim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Her tür sünger için dokuz farklı örnek hazırlanmış ve ortalama yoğunluk değerleri, maksimum ve minimum değerler hesaba katılmadan hesaplanmıştır.

### 2.2.2.2. Termal Analizleri

Jelatin süngerlerin termal özellikleri Dupont 2000 Diferansiyel taramalı kalorimetre (Differential Scanning Calorimeter, DSC) cihazıyla ölçülmüştür. Örneklerin (3-5 mg) termal analizleri azot atmosfer ortamında, 10-300°C sıcaklık aralığında, ısıtma hızı 10 °C/dk olarak yapılmıştır.

### 2.2.2.3. Mekanik Analizleri

Süngerlerin mekanik testler için hazırlanması: Süngerler 20x50 mm boyutlarında ve 10 mm kalınlığında dikdörtgen prizma şeklinde kesilmiştir. Tüm ölçümler mikrometre kullanılarak yapılmıştır. Tüm mekanik testler 23±2°C ve %50±5 kısmi nem ortamında yürütülmüştür. Her kompozisyon için dokuz örnek test edilmiştir. Her örnek için çekme mukavemeti ve elastik modülü değerleri hesaplanmıştır. Ortalama değerler, maksimum ve minimum değerler hesaba katılmadan bulunmuştur. Mekanik test ölçümleri LLYOD LRX 5K (LLYOD Instruments, ENGLAND) cihazıyla yapılmıştır. Bu cihaz WindapR programını kullanan bilgisayar kontrolü altında çalışmaktadır. Örneklerin cihaza yerleştirilmesinde dikey çeneler kullanılmıştır. Dikdörtgen örneklerin bir ucu cihazın sabit kısmına diğer ucu ise hareketli kısmına tutturulmuş ve hareketli kısma 2 mm/dk sabit çekme hızı uygulanmıştır. Uygulan yük cihaza bağlı bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir. Yüke bağlı deformasyon eğrisi her bir örnek için elde edilmiştir. Çekme mukavemeti,

$$\sigma = F/A$$

denklemini kullanarak ölçülmüştür. Burada,  $\sigma$  çekme mukavemeti, F uygulanan maksimum yük, A ise örneğin ilk alanını göstermektedir. Yük deformasyon eğrisi gerilim-gerinim eğrisine çevrilmiştir. Gerilim, birim alan başına uygulanan yük (F/A, pascal), gerinim ise birim uzunluk başına gelen deformasyon ( $\Delta l/l_0$ ) olarak tanımlanmaktadır. Gerilim-gerinim eğrisinde elastik bölgedeki düz çizginin eğimi, maddenin elastik modülü değerini vermektedir.

İstatistiksel İşlem : ‘One Way Anova’ testi kullanılarak ortalama, standart sapma tesbit edilmiş ve farklı süngerlerin mekanik özellikleri arasındaki anlamlı farklar saptanmıştır.

#### 2.2.2.4. Çapraz bağlayıcıların jelatin sünger yıkımına etkisi

Çapraz bağlama, tam bir bozunma ve çözünürlük için gereken zamanın belirlenmesiyle saptanır. Bu değişim moleküler seviyede bir çapraz bağlanmayı göstermemekle birlikte çözünürlüğün azalması çapraz bağlanmanın varlığını göstermektedir. Çözünmüş jelatin miktarı matriks bozunurluğunu, çözünmemiş jelatin miktarı ise çapraz bağlanmanın varlığını gösterir. Çapraz bağlanmanın varlığını saptamak amacıyla, 1cm<sup>3</sup> lük sünger örnekler fosfat tampon çözeltilerine daldırılmış (0.01 M, 10 ml, pH=7.4) ve 37°C de sabit sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Mikrobiyal üremeyi önlemek amacıyla da ortama 200 mg sodyum azid eklenmiştir. Belli aralıklarla ortamdaki 500 µL çözelti alınarak 0.45 µmlik porlara sahip filtreden geçirilmiştir. Çözünmüş jelatin miktarı spektrofotometrik olarak λ=660 nm de Lowry Protein Analiz Metodu uygulanarak saptanmıştır.

#### 2.2.3. Sitotoksikite Testleri

Biyomedikal ürünlerin sitotoksikite testlerinin yapılması, gerek ürünün geliştirilmesi gerekse biyoyoumluluğunun kabul edilebilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle, hazırlanan jelatin süngerlerin proliferatif ve sitotoksik etkileri, insan derisinden alınmış biopsi materyalinden epidermisin mekanik ve enzimatik yöntemlerle ayrılması ile elde edilen fibroblast hücreleri (HSA<sub>n</sub>2) kullanılarak incelenmiştir. Fibroblast hücreler Şap Enstitüsü koleksiyonundan alınmıştır. Canlı hücre sayımı için Trypan blue boyama yöntemi kullanılmış ve hücre morfolojileri Giemsa boyama metodu ile incelenmiştir.

Jelatin süngerler (herbir sünger çeşidi için 10 adet) küp şeklinde (1cmx 1cmx1cm) kesilerek tartıldıktan sonra 5.5 saat UV ile sterilize edilmişlerdir. HSA<sub>n</sub>2 hücreleri [10% fütal calf serum, gentamisin, vancomisin ihtiva eden Dulbecco's Modified Eagles ve HAM's F12 (1:1) ortamında], 24-kısımlı plakalara ekilmiş (2x10<sup>4</sup> hücre/kısım) ve kültür ortamları (1 mL) ilave edilmiştir. Hücreler, 37°C de, 95-99 % humidity ve 5 % CO<sub>2</sub> ortamında 24 saat inkübe edildikten sonra sterilize edilmiş yara örtü materyalleri eklenmiştir. Kontrol plakalara jelatin sünger eklenmemiştir. 48 saat sonunda kültür ortamları uzaklaştırılarak hücreler Giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Canlı hücre sayısını bulmak için, yara örtü materyalleri kültür ortamlarından çıkarılmış, hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele

edilerek kültür kabından ve birbirlerinden ayrıldıktan sonra serumlu kültür ortamında ayrıştırılmış ve Trypan blue boyası ile boyanarak mikroskop altında sayılmıştır. Aynı zamanda yara örtüsü içermeyen (kontrol) örneklerde de hücreler sayılarak karşılaştırılmıştır. Deneyler yedi kez tekrar edilerek istatistik testleri yapılmıştır. Jenerasyon sayısı (n), ikilenme zamanı (d) ve % ölüm değerleri aşağıda verilen eşitliklerden hesaplanmıştır.

$$\text{Jenerasyon sayısı, } n = (\log C_T - \log C_0) / \log 2$$

$C_T$  : plakadaki yaşayan hücre sayısı,  $C_0$  : başlangıçta ekilen hücre sayısı

$$\text{Hücre sayısının ikilenme zamanı, } d = t / n$$

t: inkübasyon zamanı (48 saat), n: jenerasyon sayısı

$$\% \text{ ölüm} = (C_{\text{control}} - C_{\text{test}} / C_{\text{control}}) \times 100,$$

$C_{\text{test}}$  : örnek içeren plakadaki canlı hücre sayısı

$C_{\text{control}}$  : örnek içermeyen (kontrol) plakadaki canlı hücre sayısı

## 2.2.4. In-vivo Uygulamalar

### 2.2.4.1 EGF İçeren Jelatin Süngerlerin Hazırlanması

Gerekli miktarlarda EGF (50µL heparin içeren 1mL fosfat tampon çözeltisi içinde), hazırlanma sırasında jelatin çözeltilerine eklenmiş ve dondurup-kurutma tekniği ile yara örtü materyalleri hazırlanmıştır. Jelatin süngerler 1cm<sup>2</sup> büyüklüğünde kesilerek sterilize edilmiş ve hayvan deneyleri için hazırlanmıştır. Bu süngerlerden herbiri 15 µg EGF içermekte olup GS-GA1-EGF olarak isimlendirilmiştir.

### 2.2.4.2. In vivo deneyleri

Yaklaşık 2-3 kg ağırlığındaki 3 aylık erkek tavşanlar in-vivo deneyleri için kullanılmıştır. Hayvanlar standart diyetle beslenmiş ve üniversitenin hayvan evinde ayrı kafeslerde barındırılmıştır. Tavşanlar, bir defa olmak üzere, kas içine, ketamin hidroklorit ve

rompum karışımı (3mL) enjekte edilerek uyutulmuştur. Sırt kısmındaki kıllar, elektrikli traş makinesiyle çıkarılmış ve deri, batikon alkol solüsyonuyla sterilize edilmiştir. Tavşanların sırtında, steril muşta yardımıyla, tam kalınlıkta dört tane yara (çap=0.8 cm, alan=0.50 cm<sup>2</sup>) açılmıştır. Birinci yara kontrol olarak bırakılmış, ikinci yara ise jelatin sünger (GS-GA1) ile kapatılmıştır. Üçüncü ve dördüncü yaralar sırasıyla, EGF içeren süngerlerle (GS-GA1-EGF) kapatılmıştır. Bu süngerlerdeki EGF miktarı 15µg'dır. Süngerler yerleştirildikten sonra, bütün yaralar, ticari olarak mevcut olan, poliüretan film (OpSite) ile örtülmüştür.

Tavşanların sağlığı ve yara alanları hergün kontrol edilmiş, gözlemler kaydedilmiştir. Yaraların uzunluğu ve genişliği periyodik olarak ölçülmüştür. Sistemlerin biyolojik uyumu ve tesirini belirlemek için, bütün yara alanını içeren örnekler, operasyonun 7. ve 11. gününden sonra genel anestezi altında çıkarılmıştır. Örnekler, histoloji uygulamaları için formaldehite bırakılmıştır. Verilerden sağlıklı sonuç alabilmek amacıyla, her örneğe ait, herbir zaman aralığı için 5 adet deney yapılmıştır.

#### **2.2.4.3. Histolojik Deneyler**

Bütün yara alanını içeren deri örnekleri çıkarılmış ve örnekler, %10'luk formalin tampon çözeltisine daldırılmıştır. Yerleştirmeye hazırlık için, bunlar dereceli etanol serileri içerisinde dehidre edilmiştir. Örneklerin, 5-7 mikrometre kalınlığındaki kısımları hazırlanmış ve Hematoksilen, Fosin ve Masson's Trichrome ile boyanmıştır. Fotomikrografikler, Olympus BH-7 ışık mikroskobu ile elde edilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 Jelatin süngerler

Jelatin, biyoyumlu ve biyobozunur olması yanısıra toksik ve allerjik özellik göstermemesi nedeniyle farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda geniş kullanım alanlarına sahiptir. Bu çalışmada, yara örtülerinin hazırlanmasında doğal bir polimer olan jelatin kullanılmıştır. Jelatin biyolojik sistemlerin kollajen içeren kısımlarından elde edilmektedir. Fizyolojik koşullarda kollajen az miktarda da olsa antijenik özellik gösterdiğinden jelatin kollajene tercih edilmektedir. Jelatin süngerler hazırlanışında yüzey aktif maddeler ve organik çözücüler kullanılmamıştır. Elde edilen süngerler beyaz renkli, oldukça yumuşak, poröz ve elastik yapıya sahiptir (Şekil 1). Yumuşak ve poröz özelliklerinden dolayı süngerlerin yara bölgesinde dokuya herhangi bir zarar vermesi beklenmemektedir. Sünger yapıların yüksek emme kapasiteleri yara bölgesinde sıvı birikimini önlemeye yardımcı olacaktır. Böylelikle yara sıvısı (eksüda) ve hücre artıkları emilerek sünger yapı içinde tutulacaktır. Sünger yapılar yara boşluğunu doldurarak yara bölgesindeki hücrelerin içeri difüzlenmesi, tutunması ve çoğalması için bir iskelet oluştururlar. Bu yapılar için en önemli özellik biyoyıkımlı olmalarıdır. Hücreler çoğalıp yara boşluğunu doldurduğunda bu iskelet parçalanır ve taze oluşan doku ile yer değiştirir. Dolayısıyla yara iyileşmesi gerçekleştikten sonra örtü materyalinin ikinci bir operasyonla uzaklaştırılmasına gerek kalmamaktadır.

Şekil1. Jelatin sünger A) Fotoğraf B) Taramalı Elektron Mikrograf



## 3.2. Jelatin Süngerlerin Karakterizasyonu

### 3.2.1 Yoğunluk Analiz Sonuçları

Hazırlanan süngerlerin ortalama yoğunlukları Tablo 2. de verilmiştir. Her örnek için dokuz ölçüm yapılmış olup ortalama değerler hesaplanmıştır. Elde edilen değerler oldukça düşük olup  $6 \text{ mg/cm}^3$ - $8 \text{ mg/cm}^3$  değerleri arasında değişmektedir. Süngerlerin hayli poröz yapılarından dolayı bu düşük değerler beklenen değerlerdir. Çapraz bağlayıcı kullanılmayan süngerlerin yoğunluğu  $7.04 \text{ mg/cm}^3$  olarak bulunmuştur. Çapraz bağlayıcı kullanılması bu değeri önemli derecede değiştirmemiştir. Bununla birlikte GA miktarındaki artış, yoğunluğun  $7.04 \text{ mg/cm}^3$  den  $8.14 \text{ mg/cm}^3$  e yükselmesine yol açmıştır. Sonuç olarak denilebilir ki çapraz bağlayıcı miktarındaki artış, süngerlerin yoğunluklarında çok az bir artışa yol açmıştır. EDAC ile hazırlanan örnekler için böyle bir yorum yapmak mümkün değildir.

Tablo 2. Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren jelatin süngerlerin yoğunluk değerleri

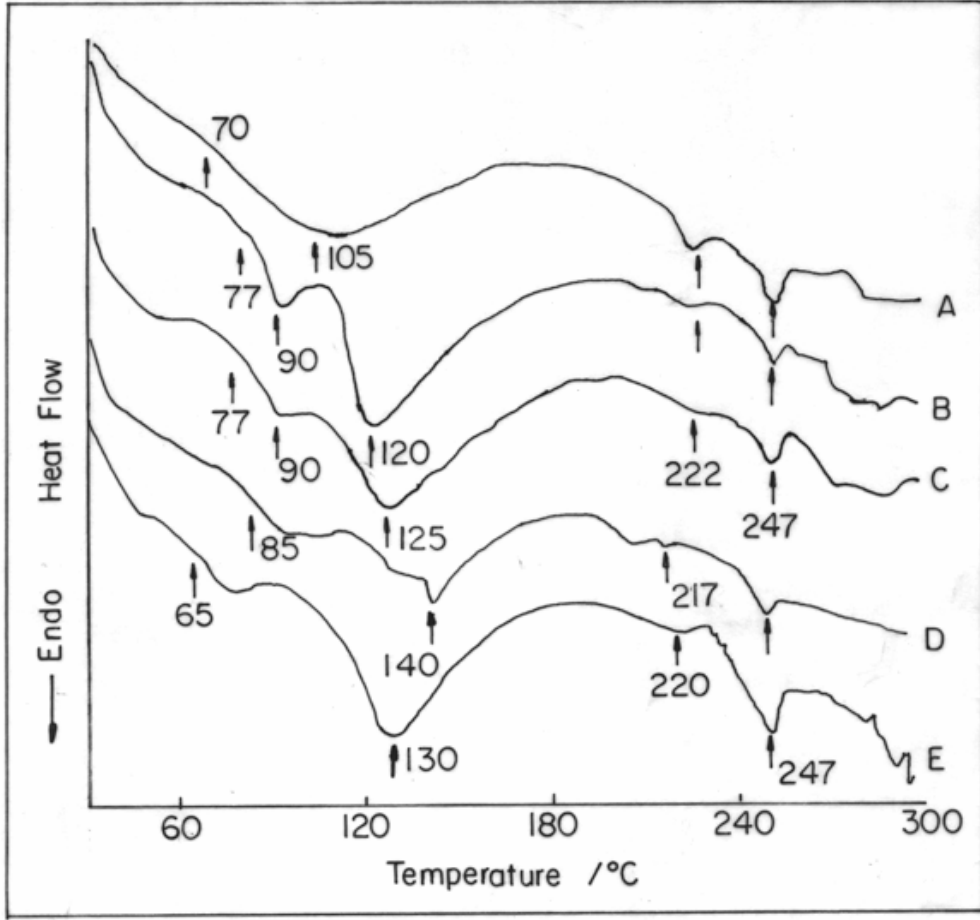
Örnekler	Çapraz bağlayıcı (mmol)	Yoğunluk ( $\text{g/cm}^3$ )
GS	-	$0.00704 \pm 0.00037$
GS-GA <sub>1</sub>	0.250	$0.00639 \pm 0.00045$
GS-GA <sub>2</sub>	0.500	$0.00748 \pm 0.00070$
GS-GA <sub>3</sub>	0.500	$0.00814 \pm 0.00150$
GS-EDAC <sub>1</sub>	0.026	$0.00620 \pm 0.00110$
GS-EDAC <sub>2</sub>	0.078	$0.00690 \pm 0.00033$
GS-EDAC <sub>3</sub>	0.131	$0.00770 \pm 0.00054$
GS-EDAC <sub>4</sub>	0.260	$0.00600 \pm 0.00044$
GS-EDAC <sub>5</sub>	0.780	$0.00650 \pm 0.00029$
GS-EDAC <sub>6</sub>	1.300	$0.00760 \pm 0.00080$
GS-F	0.420	$0.00770 \pm 0.00087$

### 3.2.2 Termal Analiz Sonuçları

Hidroksil veya amid grupları gibi hidrofilik karakterde yapılar içeren polimerler su ortamında molekül içi bağlar oluşturmaktadır. Bu bağların oluşması ‘camsı geçiş sıcaklığı’ ( $T_g$ ) karakterlerini oldukça etkilemektedir. Bazı protein ve polisakkaritlerde  $T_g$  ve erime olayı, ana zincirin ayrışması gerçekleşene kadar gözlenmemektedir. Bunu sağlayan ise hidrojen bağlarının stabilitesidir.

Literatürde jelatin için iki  $T_g$  sıcaklığı gösterilmiştir. Bu iki  $T_g$  değerinin görülmesine sebep olarak da jelatin bünyesindeki amino acid içeriğine model olan blok kopolimer gösterilmiştir. İlk  $T_g$  sıcaklığı  $90^{\circ}\text{C}$ - $100^{\circ}\text{C}$  arasında olup peptid zincirdeki  $\alpha$ -amino acid bloklarını göstermektedir. İkinci  $T_g$  sıcaklığı ise  $180^{\circ}\text{C}$ - $200^{\circ}\text{C}$  arasında olup imino asit, prolin ve hidroksi prolinin glisinle olan bloklarını göstermekte ve uygulanan metoda göre değişmektedir. İkinci  $T_g$  sıcaklığının, jelatinin tüm fiziksel karakterlerinden sorumlu olduğu varsayıldığından birçok çalışmada ikinci  $T_g$  değeri belirtilmiştir. Saf ve kuru jelatin örnekleri için  $T_g$  değeri dilatometrik metod ile  $95^{\circ}\text{C}$  de, viskoelastik metod ile  $120^{\circ}\text{C}$  de ve kayma modulus ölçümleri metodu ile  $190^{\circ}\text{C}$  de belirtilmiştir. %9.6 nem içeren jelatin örnekleri için ise mekanik özellikler ölçülerek,  $T_g$  değerleri  $-85^{\circ}\text{C}$ ,  $130^{\circ}\text{C}$ , ve  $180^{\circ}\text{C}$  de saptanmıştır. Bazı yayınlarda ise jelatin örnekleri için  $T_g$  değerleri  $175^{\circ}\text{C}$  (çapraz bağlayıcı kullanılmaksızın) ve  $196^{\circ}\text{C}$  de (çapraz bağlayıcı kullanılarak) gösterilmiştir. Tüm bu değerler jelatinin kompleks yapısını göstermektedir.

Bu çalışmada hazırlanan GS (jelatin sünger) örnekleri için ilk  $T_g$   $70^{\circ}\text{C}$  de gözlenmiştir (Şekil 9-10). Bu değer GS-GA örnekleri için  $77^{\circ}\text{C}$  ye yükselmiş ve  $90^{\circ}\text{C}$  civarında pik vermiştir. İkinci bir endotermik absorpsiyon piki ise  $120^{\circ}\text{C}$  (GS-GA<sub>1</sub>) ve  $125^{\circ}\text{C}$  (GS-GA<sub>3</sub>) de gözlenmiştir. Gözlenen bu ikinci endotermik absorpsiyon pik, suyun ilgili sıcaklıklarda uzaklaştırılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. İkinci  $T_g$  piki tüm örneklerde  $217$ - $222^{\circ}\text{C}$  de oluşmuş ve  $247^{\circ}\text{C}$  den sonra tüm örneklerde bozunma gözlenmiştir.



Şekil 2. DSC termogramları; (A)GS, (B)GS-GA1, (C)GS-GA3, (D)GS-EDAC4, (E)GS-EDAC6

### 3.2.3 Mekanik Analiz Sonuçları

Yara örtülerinin, uygulanacak bölgedeki dokuya mükemmel bir uyum sağlayabilmesi için bazı mekanik özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Örtünün özellikle elastik modülüs değeri derinin rahat bir şekilde hareket edebilmesi açısından çok önemlidir. Örneğin sert yapıdaki bir yara örtüsü yeterince elastik olmadığından özellikle eklem bölgelerinde deri hareketine izin vermemektedir. Diğer önemli bir mekanik özellik de çekme mukavemetidir. Çok zayıf yapıdaki yara örtüsü uygulama sırasında parçalanabilir ki bu istenen bir özellik değildir. Bu çalışmada, hazırlanan süngerlerin gerilim direnci ve elastik modülü değerleri test edilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Her tür sünger için dokuz örnek hazırlanmış ve test edilmiştir. Hesaplanan maksimum gerilim direnci ve elastik modülüs ortalama değerleri Tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. Jelatin Süngerlerin Mekanik Özellikleri

Örnekler*	Çapraz bağlayıcı (mmol)	Maksimum gerilme direnci (MPa)	Elastik Modulus (MPa)
GS	-	0,0135±0.0030	0,6451±0.1101
GS-GA1	0.25	0,0142±0.0024	0,6526±0.0506
GS-GA2	0.50	0,0138±0.0035	0,7146±0.1172
GS-GA3	0.50	0,0130±0.0040	0,8550±0.0927
GS-EDAC1	0.13	0.0136±0.0035	0,8343±0.0756
GS-EDAC4	0.26	0.0123±0.0026	0,6657±0.0507
GS-EDAC5	0.78	0.0104±0.0027	0,4756±0.0459
GS-EDAC6	1.30	0.0093±0.0030	0,4500±0.0782
GS-F	0.42	0.0114±0.0051	0.6590±0.1423

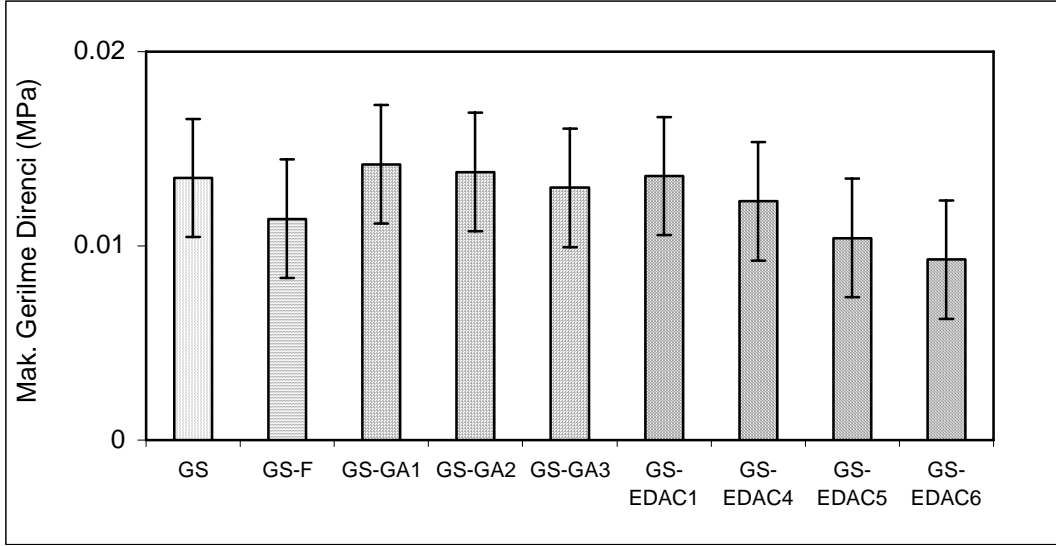
\*Herbir örnek için 9 ölçüm alınmıştır

Hiç bir çapraz bağlayıcı kullanılmadan hazırlanan jelatin süngerlerin gerilme direnci değerleri 0.0135 MPa olarak bulunmuştur. GA ile çapraz bağlanan örneklerde, GA miktarının artması gerilme direnci değerlerinde önce bir artış (GS-GA1 örneği için 0.0142 MPa) ve daha sonra azalma göstermiştir ((GS-GA3 örneği için 0.0130 MPa). Sonuçlar yorumlandığında, GA eklenmesinin gerilme direncinde önemli bir değişime yol açmamış olduğu söylenebilir. Değerler, deneysel hata limitleri içinde 0.0135 MPa civarında sabit kalmıştır ( $P < 0.747$ ). EDAC ile hazırlanan örneklerde gerilme direnci 0.0136 MPa dan 0.0093 MPa değerine düşme göstermiştir. EDAC ilavesi ile gerilme direnci değerlerindeki azalma EDAC'ın yapıya kovalent bağlanmaması ve ortamda kalarak yumuşatıcı etki göstermesi olarak açıklanabilir. GA ise yapıya kovalent bağlandığı için etkin bir azalma gözlenmemiştir. Gerilme direnci sonuçları Şekil 3 te gösterilmiştir.

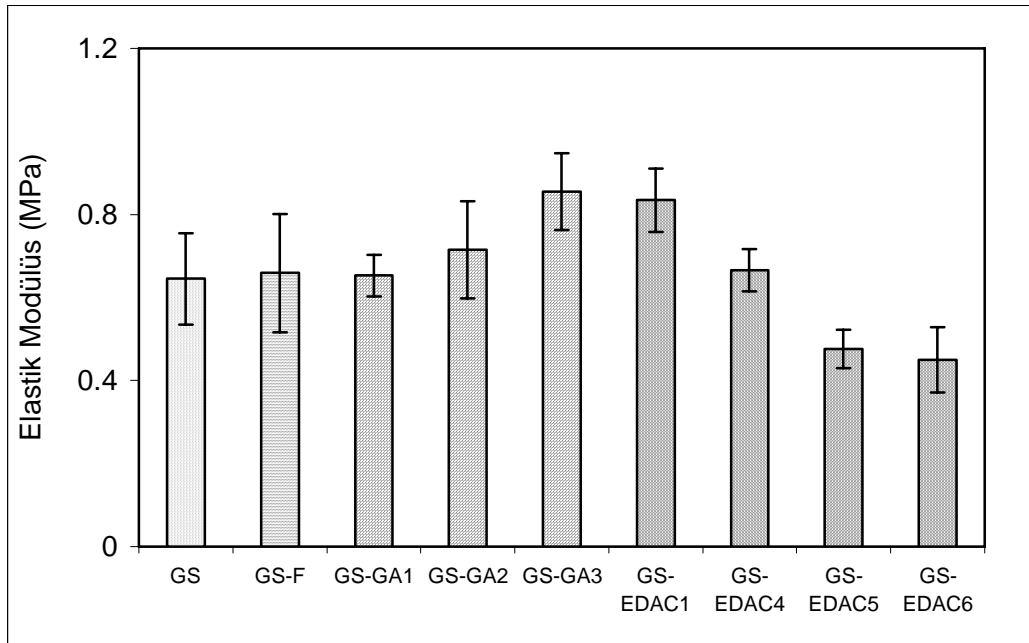
GA miktarının artması ile elastik modülüs değeri 0.645 MPa dan 0.855 MPa'a yükselmiştir ( $P < 0.001$ ). GA ile çapraz bağlanan jelatin daha sert (daha az elastik) bir yapıya sahiptir. Buna GA'nın oluşturduğu ekstra amid bağları sebep olmaktadır. EDAC ile hazırlanan

örneklerde EDAC miktarı arttıkça, elastik modülüs 0.8343 MPa dan 0.4500 MPa değerine düşme göstermiştir. Değerlerdeki düşme, yapı içinde üre türevlerinin varlığı sonucu olabilir (Şekil 4).

GS-F örneği, hiç çapraz bağ içermeyen GS örneğine benzer özellikler göstermiş ve mekanik sonuçları çok yakın değerler vermiştir.



Şekil 3. Jelatin süngerlerdeki gerilme direnci değişimi



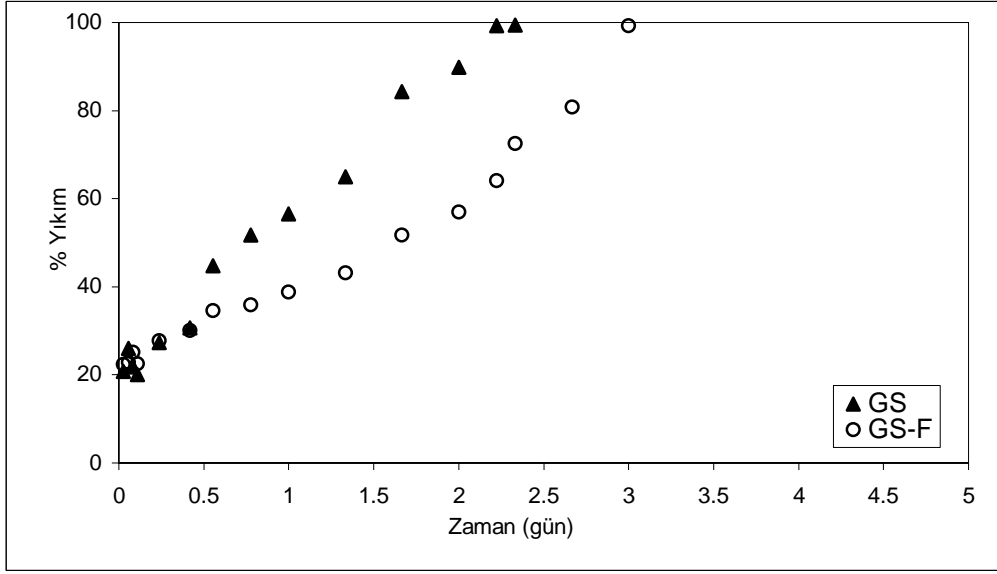
Şekil 4. Jelatin süngerlerdeki elastik modülüs değişimi

### 3.2.4 Çapraz bağlayıcıların jelatin süngerlerin yıkımı üzerine etkisi

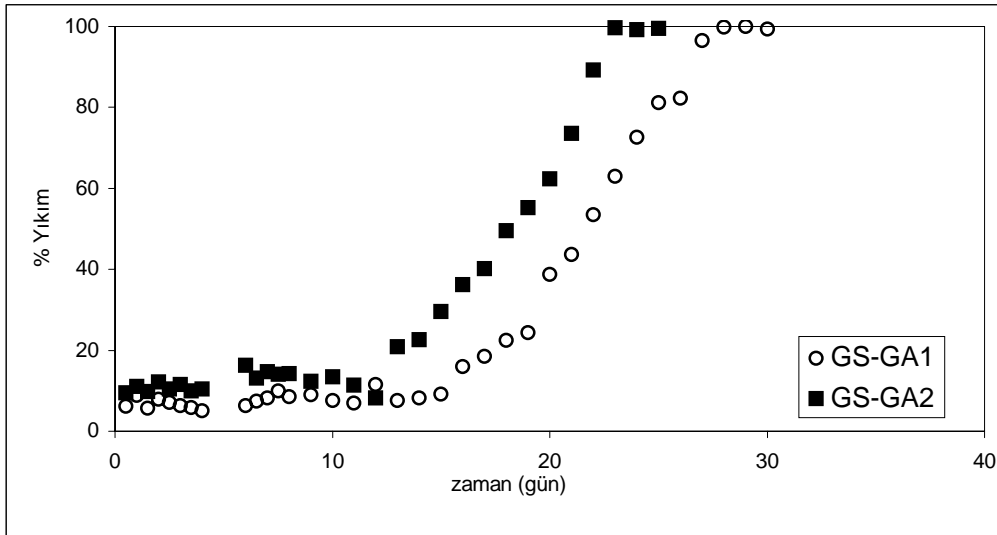
Jelatinin medikal alanlarda kullanılmasını sınırlandıran tek özelliği sıvı ortamlardaki yüksek çözünürlüğüdür. Dolayısıyla vücut sıcaklığında da çok hızlı bir şekilde bozunmaktadır. Bu yüzden malzemenin yıkım süresini azaltacak herhangi bir çapraz bağlayıcıyla muamele edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, glutaraldehit, karbodiimid, formaldehid gibi çapraz bağlayıcılar çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama üç boyutlu ağ yapıların oluşmasını sağlamaktadır (örneğin mikroküre yüzeylerinde, matriks veya sünger yapılarında). Fakat çapraz bağlayıcıların reaksiyona girmeyen kısımları, toksik yan etkilere yol açabilmektedir. Bu yüzden medikal malzemelerin hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı türü ve miktarı çok büyük bir önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, yara örtü malzemesi olarak jelatin süngerlerin hazırlanması ve bunların biyolojik ortamda arzu edilen sürede kalabilmesi için gereken koşulların araştırılmasıdır. Bu amaçla değişik miktarlarda glutaraldehit, şeker ve karbodiimid ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerin çözünürlükleri araştırılmıştır. Bu amaçla süngerler tampon çözeltilere daldırılmış, daha sonra bu çözeltilerden bozunmuş protein miktarı tayin edilerek yüzde değerlere çevrilmiştir (Şekil 5-7). Kullanılan çapraz bağlayıcı çeşidine ve miktarına bağlı olarak jelatin süngerlerin yıkım süreleri saat ile gün arasında değişmektedir (Tablo 4). Çapraz bağlayıcı kullanılmayan süngerlerin (GS) yıkım süreleri çok daha kısa olmaktadır. Bu süngerlerin yarısı bir gün içinde yıkılmakta, ve 3.5 gün içinde ise tamamı çözünmektedir. Fruktoz içeren jelatin süngerlerin yıkım süreleride oldukça kısa olup, hemen hemen GS ile aynı özellik göstermektedirler (Şekil 5). Bu tür süngerlerin % 30 'u ilk 12 saat içinde yıkılmakta ve 4.5 gün içerisinde ise tamamen çözünmektedirler.

Literatürde jelatin yapıların biyoyıkım sürelerinin, GA ile çapraz bağlandığı zaman uzadığı gösterilmiştir. GA ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerde elde edilen yıkım grafikleri Şekil 6 da gösterilmiştir. GS-GA1 örnekleri için %50 yıkım 18. günde, %100 yıkım ise 24. günde gözlenmiştir. GS-GA2 örnekleri için ise aynı yıkım miktarları 22. ve 28. günde gözlenmiştir. GA miktarının 0.25 mmoldan 0.50 mmola çıkarılması tam yıkım sürelerinin artmasına yol açmıştır.

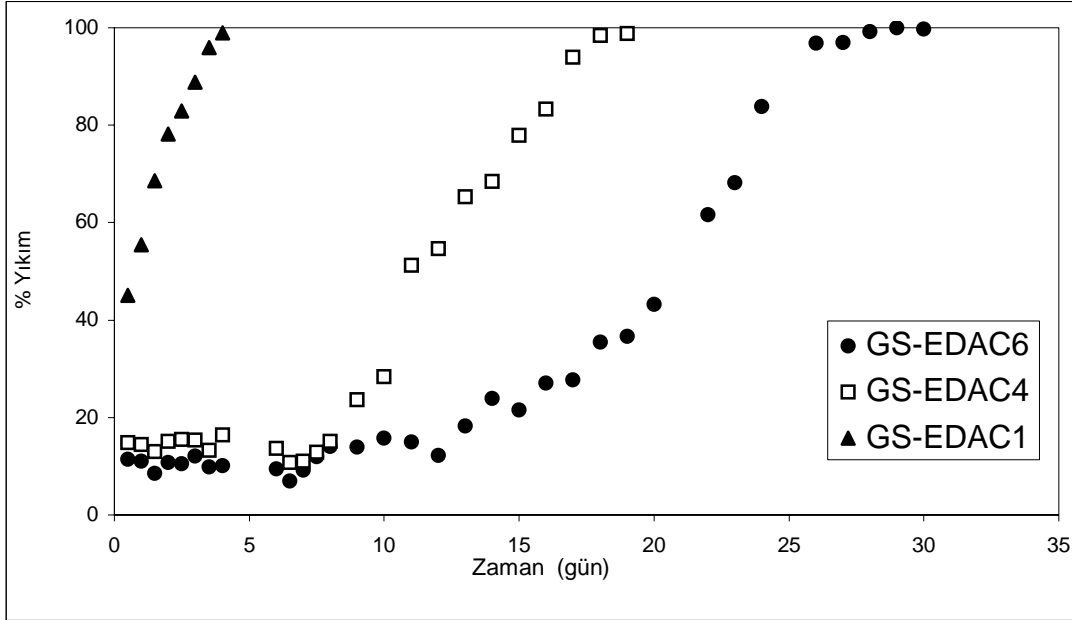


Şekil 5. GS ve GS-F örneklerin biyoyıkım grafikleri



Şekil 6. GA içeren GS örneklerin biyoyıkım grafikleri

EDAC kullanılarak hazırlanan jelatin süngerlerde EDAC miktarına bağlı olarak farklı yıkım süreleri gözlenmiştir (Şekil 7). GS-EDAC<sub>1</sub> örneği 4 gün içerisinde tamamen yıkılmıştır. Bu sonuç bize jelatin süngere katılan 0.026 mmol EDAC'ın kovalent bir bağ oluşturması için yeterli olmadığı, uzun süreli bir stabilite sağlamadığını göstermektedir. EDAC miktarı arttıkça süngerlerin daha dayanıklı olduğu ve yıkım sürelerinin artırdığı gözlenmiştir. GS-EDAC<sub>4</sub> örneği ve GS-EDAC<sub>6</sub> örneği için % 50 yıkım sırasıyla 12. ve 21. günlerde gözlenmiş, % 100 yıkım ise 19. ve 28. günlerde oluşmuştur. Elde edilen verilerden anlaşılacağı gibi, çapraz bağlayıcı kullanılmasıyla ve çapraz bağlayıcı miktarlarını ayarlayarak, jelatin süngerlerin biyoyıkım sürelerini kontrol etmek ve istenilen düzeye getirmek mümkün olmaktadır. Tüm örnekler için %50 ve %100 yıkım değerleri Tablo 4 de verilmiştir.



Şekil 7. EDAC içeren GS örneklerin biyoyıkım grafikleri



Tablo 4. Jelatin Süngerlerin Yıkım Süreleri

Örnek	Çapraz bağlayıcı (mmol)	% 50 Yıkım (gün)	% 100 Yıkım (gün)
GS	-	1.2	3.5
GS-GA <sub>1</sub>	0.25	18	24
GS-GA <sub>2</sub>	0.50	22	28
GS-EDAC <sub>1</sub>	0.026	1	4
GS-EDAC <sub>4</sub>	0.26	12	19
GS-EDAC <sub>6</sub>	1.3	21	28
GS-F	0.42	2.5	4.5

### 3.3 Sitotoksosite Testleri

Kimyasal olarak çapraz bağlı biyomalzemelerde; reaksiyona girmeyen çapraz bağlayıcıların ve/veya diğer moleküllerin matriks yıkımı sırasında yapıdan sızması toksisiteye neden olmaktadır. Bu çalışmada, jelatin süngerlerin hazırlanmasında kullanılan değişik çapraz bağlayıcıların fibroblast hücreleri üzerine etkisi in vitro sistemlerde incelenmiştir. Bu nedenle çapraz bağlanmış jelatin süngerler hücre ortamına konarak toksik etkileri incelenmiştir. Bu metod oldukça basit olmakla birlikte sünger yapıdan ortama sızan kimyasalların, hücre ile direk etkileşimlerinin incelenmesi ve toksisite değerlendirmelerinin yapılmasında oldukça yararlıdır.

Jelatin süngerlerin sitotoksosite sonuçları Şekil 8 ve Tablo 5 verilmiştir. GS-GSA1 hariç bütün süngerler 48 saatlik inkübasyon süresince değişik ölçülerde toksik etki göstermişlerdir. Kontrol grup için jenerasyon sayısı 1.9601 ve hücre sayısının iki katına çıkma zamanı olan d değeri 24.48 saat olarak hesaplanmıştır. Hücre morfolojileri Şekil.8-A da verilmiştir. GS içeren ortamda, n değeri 0.8775 olup bu değer kontrol grubu değerinden düşüktür. Bu beklenmeyen sonuç, GS'nin hızlı yıkımı nedeniyle ortamın viskozitesinin artması ve besinlerin hücrelere difüzyonunun zorlaşması, dolayısıyla canlı hücre sayısının azalmasına neden olduğu şeklinde açıklanabilir. GS-F örneği içinde, n değerinin aynı nedenlerle düşük olduğu düşünülmektedir.

Her iki örnek içinde hesaplanan % ölüm değerlerine bakıldığında, bu örneklerde hücre ölümünün, kontrol grubundan da fazla olduğu izlenmiştir (Şekil.8B ve C).

GS-GA1 içeren ortamda, jenerasyon sayısı, kontrol gruba çok yakındır. Aynı zamanda hücre proliferasyonun ve morfolojilerinde normal olduğu görülmüştür (Şekil.8D). Sonuç olarak bu örnekteki GA miktarının hücre üzerine toksik bir etkisi olmadığı söylenebilir. Ancak GA miktarının 0.25 mmol den 0.50 mmol'a artması, GS-GSA3 örneğindeki n değerlerinde büyük ölçüde azalmaya neden olmuştur (Şekil.9E).

EDAC içeren süngerlerin hücre üzerine etkisi Şek.8 (F-H) de verilmiştir. GS-EDAC1 and GS-EDAC4 örnekleri için aynı n ve % ölüm değerleri bulunmuştur. GS-EDAC6 örneği içeren ortamda % ölüm 91.8 dir. Ortamdaki hücre sayısı başlangıçta ekilen hücre sayısında altında olduğu için jenerasyon sayısı 0 olarak belirtilmiştir. GS-EDAC6 örneği, hücre kültürü üzerine oldukça toksik etki göstermektedir.

EDAC çapraz bağlayıcının, membran yapılarında kullanıldığında, çok iyi yıkama ile temizlendiğinde, hücre üzerine olumsuz bir etki göstermediği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [53]. Ancak bu çalışmada EDAC ile hazırlanan örnekler sünger yapıda olduğu ve yıkama sırasında bu yapı bozulduğu için yıkama işlemi yapılmamıştır. Ve bunun sonucu olarak üre türevlerinin yapıda kalarak toksisiteye neden olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan GS-GA1 ve GS-EDAC4 örneklerinde eşit miktarda çapraz bağlayıcı olmasına rağmen canlı hücre sayısı ve morfolojileri GS-GA1 örneğinde daha iyi olduğu görülmüştür. Bunun nedeni GA'nın EDAC'ten daha reaktif olması ve tamamen yapıda yer alarak çapraz bağ oluşturmasıdır. EDAC ise sünger yapılarında üre türevi olarak kalmakta ve hücre kültür ortamında ise sünger yapıdan sızarak toksisiteye neden olabilmektedir.

Bu nedenlerden dolayı eğer jelatin malzeme hazırlanması sırasında yıkama işlemi yapılamayacaksa, çapraz bağlayıcı olarak GA'nın daha uygun olduğu düşünülmektedir. Özetle, jelatin süngerlerin toksisitelerinin çapraz bağlayıcıların miktarına, çeşidine ve çapraz bağlama prosesine bağlı olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 5. Sitotoksisite Test Sonuçları

Örnek	Çapraz bağlayıcı (mmol)	n	d (saat)	Ölüm (%)
Kontrol	-	1.9601	24.48	-
GS	-	0.8775	54.70	52.7
GS-GA1	0.25	1.9764	24.29	0
GS-GA3	0.50	0.2740	175.18	68.8
GS-EDAC1	0.026	0.5462	87.88	62.4
GS-EDAC4	0.26	0.5462	87.88	62.4
GS-EDAC6	1.30	0	-	91.8
GS-F	0.42	0.7395	64.91	57.0

Şekil 8. Hücrelerin Mikroskop altında görünüşleri (A) Kontrol, (B) GS, (C) GS-F, (D) GS-GA1, (E) GS-GA3, (F) GS-EDAC1, (G) GS-EDAC4, (H) GS-EDAC6

### **3.4. In-vivo Uygulama Sonuçları**

#### **3.4.1. Makroskopik gözlemler**

Tavşanların sırt bölgesine açılan tüm deri defektlerine, hazırlanan yara örtüleri uygulanmış ve belli aralıklarla, yara bölgesi, yara alanındaki değişiklikler ve enfeksiyon olasılığı incelenmiştir. Bir hafta sonraki gözlemler: 1 numaralı lezyonda yara merkezi siyaha yakın depresiv hemorajik bir kuruta sahiptir. 2.lezyon ise 1.numaralı lezyona benzemekte olup daha az yara derinliğine sahip olduğu gözlenmiştir. 3. ve 4. yani GS-GA1-EGF örtülü lezyonlar ise çok ince bir hemorajik kruta sahip olmakla birlikte yara bölgesi vaskularize olmuş ve deri defekti gözlenmemiştir. On gün sonraki gözlemler: 1. ve 2. lezyonlar halen kalın hemorajik kruta sahip olmakla birlikte yara alanları henüz kapanmamıştır. 3 ve 4. Lezyonlarda ise yara defekti kapanmış ve yara alanı azalmıştır. Yara bölgesi etrafında ise vaskularizasyonun arttığı gözlenmiştir.

#### **3.4.2. Histolojik Bulgular**

Yara örtülerinin uygulanmasından bir hafta sonra, kontrol grubunda yara bölgesindeki dokunun oluşmadığı (Şekil.9), büyüme faktörlü yara örtüsü (GS-GA1-EGF) uygulanan bölgenin daha iyi organize olmuş granülasyon dokusu ile dolduğu gözlemlenmiştir (Şekil.10). On gün sonraki sonuçlar, kontrol grubunda yara yüzeyinin ince bir dermis ile kaplandığını (Şekil.11), büyüme faktörlü yara örtüsü uygulanan bölgenin epidermis oluşumunun düzgün bir şekilde tamamlandığını (Şekil.12) göstermektedir. EGF içeren yara örtüleri, yara iyileşmesinde hem makroskopik hem de histolojik olarak büyük bir gelişme göstermiştir. Yaralar bir haftada doku gelişimi ile kapanmış ve on gün sonunda çok olumlu iyileşme gözlemlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda, hazırlanmış sünger sistemlerin biyoyumlu olduğu bulunmuştur. Herhangi bir safhada, mononuclear hücre infiltrasyonu veya yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Yara örtülerinin etkisi yaklaşık olarak iki hafta sonra belirginleşmiştir. GS-GA1-EGF uygulanmış lezyonlarda, yara boşluğu, normal dermise benzer yapıdaki bir dermis tabakasıyla dolmuştur. Yara alanında yeni oluşmuş dermisin niteliği EGF varlığına bağlanmaktadır. Sonuç olarak, EGF içeren sünger sistemler, yara iyileşmesinde çok belirgin olumlu etki göstermiştir.

Şekil 9. Operasyondan bir hafta sonra kontrol grubu (#1). Oluşumu tamamlanmamış granülasyon dokusu (\*) ve genişlemiş kan damarları gözlenmiştir. M Trichrome x 4

Şekil 10. Operasyondan bir hafta sonra GS-GA1-EGF grubu. Yara bölgesi daha iyi organize olmuş granülasyon dokusu ile dolmuştur. Kollajen fibriller (Co) kendi karakteristik yapıları doğrultusunda organize olmuşlardır. C; crute, M Trichrome x 4

Şekil 11. Operasyondan on gün sonra kontrol grubu. Yara yüzeyi ince bir dermis (E) tabakası ile kaplanmıştır. Dermiste (D) ince kollojen fibriller (ok) gözlenmiştir. HEx4

Şekil 12. Operasyondan on gün sonra GS-GA1-EGF grubu. Epidermis (E) oluşumu tamamlanmıştır. Dermisin (D) yapısında olgunlaşmış kollajen fibriller (Co) gözlenmiştir. Yara bölgesi tamamen iyileşmiştir. M Trichrome x 4

## 4. SONUÇ

Bu çalışmada değişik çapraz bağlayıcılar kullanılarak jelatin yara örtüleri hazırlanmış ve çapraz bağlayıcıların hücre üzerine etkileri, hücre kültür deneyleri ile araştırılmıştır. Sünger formundaki jelatin yapıların hazırlanmasında, yoğun yıkama ve saflaştırma işlemlerinin yapılamadığı durumlarda, ve eşit miktarlarda kullanıldığı zaman, glutaraldehitin karbodiimitten daha uygun bir çapraz bağlayıcı olduğu, hücre kültür deneyleri ile, hücre morfolojisi ve hücre sayılarındaki artış oranları ile gösterilmiştir.

Tavşanlarda yaratılan yaralar üzerinde yapılan in vivo uygulamaları ve alınan doku örnekleri üzerinde yapılan histolojik araştırmalar, bu materyallerin tamamen biyoyumlu olduklarını göstermiştir. Mononüclear hücre infiltrasyonu veya yabancı cisim reaksiyonu gözlenmemiştir. Böylece, jelatin yara örtülerinin güvenilirliği, in vivo deneyleriyle kanıtlanmıştır. Jelatin yara örtülerinin diğer özellikleri aşağıdaki gibidir: hazırlanması kolaydır, dokuyla direkt etkileşim içerisinde olan parçalardan hiçbirisi toksik değildir, vücut sıvısını emme kapasitesi yüksektir, makromoleküllerin salım hızı kontrol edilebilir derecededir, biyolojik yıkımlı olduğundan uygulamada acı oluşturmamaktadır, yarayı dış fiziksel etkilere, mikrobiyel enfeksiyona karşı korumaktadır. Ayrıca, makroskopik olarak gözlemlendiğı gibi, yara iyileşme hızını olumlu yönde etkilemektedir. Yeni oluşan dermis tabakasının niteliğı hemen hemen normal deri kadar iyidir. Sünger yapılarına eklenen büyüme faktörleri yara iyileşmesinde çok olumlu etkilere sahiptir. Bu çalışmada tek tip büyüme faktörü, EGF, kullanılmıştır. İyileşmeyi tam anlamıyla ilerletmek için uygulanan EGF miktarı çok iyi ayarlanmalıdır. Ayrıca, tek tip büyüme faktörü yerine, büyüme faktörlerinin bir karışımı uygulanabilirse, daha düzgün ve daha hızlı iyileşme gözlemek de mümkün olabilir.



## KAYNAKÇA

1. Clark RF, Henson Pm, The molecular and Cellular Biology of Wound Repair, Newyork, NY:Plenum Pub. Corp., (1988).
2. Bale S, A guide to wound debriment. *J. Wound Care*, 6:179-182, (1997).
3. Thomas S, A structured approach to the selection of dressings, <http://www.smtl.co.uk> (1997).
4. Whipple A.O, The story of healing and wound repair, C. Thomas (ED), Springfield (1963).
5. Gutrine D. History of medicine, London (1964).
6. T.D.Turner, Semiocclusive and occlusive dressings, in: Enviroment for Healing:The Role of Occlusion, International Congress and Symposium Series.88, Royal Society of Medicine, ondon (1985).
7. I.A. Buchan, J.K. Andrews, S.M. Lang, J.G. Boorman, J.V.K. Harvey and B.G.H. Lamberty, Clinical and laboratory investigation of the composition and properties of human skin wound exudate under semi-permeable dressings, *Burns*, 7:326-334 (1980).
8. K. Ulubayram and N. Hasırcı, "Polymeric Materials in Wound Healing" A. Hıncal and S. Kaş (ed), Biomedical Science and Technology, Plenum Press, New York, p.145-153, 1998.
9. Chen J., Yang Y., Qian P., Ma Z., Wu W., Sung P., Wang X., Li J., *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 42, 915 (1993)
10. <http://www.deltamedical.com/jjmi/nugel.htm>
11. G. Blaine, Experimental observation on absorbable alginate products in surgery, *Ann Surg*, 125:102-107 (1947).
12. H.G. Archer, S.E. Barnett, S.J. Irving, K.R. Midleton and D.V. Seal, A controlled model of moist wound healing: comparison between semi-permeable film, antiseptic and sugar paste, *J Exp Path* 83:17,(1989).
13. S.E. Barnett and S.J. Varley, The effects of calcium alginate on wound healing, *Ann Royal, Coll,Surg, Eng*, 69:153-155 (1987)
14. I.V.Yannas and J.F.Burke, Design of an artificial skin. I.Basic design principles, *J.Biomed Mater Res* 14:65-81 (1980).
- 15 I.V. Yannas, J.F. Burke and M. Warpehoski, Prompt, long-term functional replacement of skin, *Trans Am Soc Artif. Intern Organs*, 27:19-23 (1981).
16. J.F. Burke, I.V. Yannas and W.C. Quinby, Successful use of physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury, *Ann.Surg*, 194:413-428 (1981).
17. V. Yannas, J.F. Burke, P.L. Gordon, C. Huang and R.H. Rubenstein, Design of an artificial skin II. Control of chemical composition, *J Biomed. Mater Res*, 14:107 (1980).
- 18.V. Yannas, J.F. Burke, D.P. Origill and E.M. Skraubut, Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin, *Science*, 215:174-176 (1982).
19. V. Yannas, What criteria should be used for designing artificial skin replacement and how well do the current grafting materials meet these criteria, *J Trauma*, 24:29-39 (1984).
20. S. Suzuki, K. Matsuda, N. Isshiki, Y. Tamada and Y. Ikada , Experimental study of newly developed bilayer artificial skin, *Biomaterials*, 11:356-360 (1990).
21. K. Matsuda, S. Suzuki, N. Isshiki, K. Yoshioka, R. Wada, S.H. Hyon and Y. Ikada, Evaluation of a bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic, *Biomaterials*, 13:2 (1992).
22. K. Matsuda, S. Suzuki, N. Isshiki, K. Yoshioka, R. Wada, T. Okada and Y. Ikada, Influence of glycosaminoglycans on the collagen sponges component of a bilayer artificial skin, *Biomaterials*, 11:351-355 (1990).

23. M.L. Sabolinski, O. Alveraz, M. Auletta, G. Mulder, N.L. Parenteau, Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers, *Biomaterials*, 17:311-320, (1996).
24. S. Suzuki ve arkadaşları, Review of Acellular and cellular artificial skins, *Tissue Eng.*, 2(4):267-275, (1996).
25. M.S. Agren, H. Everland, Two hydrocolloid Dressings evaluated in Experimental full-thickness wounds in the skin, *Acta Derm Venereol*, 77:127-131.
26. M Hanthamrongwith, W.H. Reid, M.H. Grant, Chondroitin-6-sulphate incorporated into collagen gels for the growth of human keratinocytes: The effect of cross-linking agents and diamines, *Biomaterials*, 17:775-780, (1996)
27. <http://www.medline> "Future wound care technology".
28. <http://www.matimop.org.il>
29. Ikada Y.,Muniruzzaman Md, Hijikata S, and Tabata Y, Neovascularization effect of biodegradation gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 1999, 10(1):79-94.
30. Powel EM, Sobarzo MR, Saltzman WM, 1990, Controlled release of nerve growth factor from a polymeric implant, *Brain research*, 515, 309-311.
31. Johnson OFL, 1996, A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone, *Nature Med*, 2, 795-799.
32. Tabata Y, Hijikata S and Ikada Y, 1994, Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels, *J Control. Rel.*, 31, 189-199.
33. Yamamura K, Sakuraj J, Yano K, Nabeshima T, and Yotsuyanayi T, 1995, Sustained release of bFGF from the synthetic prosthesis using hydroxypropylchitosan acetate, *J Biomed Mat Res*, 29, 203-206.
34. Grangier JL, Puygrenier M, Gauter JG, Couvreur P, 1991, Nanoparticles as carriers growth hormone releasing factor, *J Cont. Release*, 15, 3-13.
35. Greisler HP, 1996, Growth factor release from vascular grafts, *J Cont. Rel.*, 39, 267-280.
36. Langer R, 1996, Controlled release of a therapeutic protein, *Nature Medicine*, 2(7), 742-743.
37. Biodegradable Polymers for Controlled Release of Peptides and Proteins. Roerdink F.H. and Kroom A.M (eds) *Drug Carrier Systems*, Usa, John Wiley & Sons ltd, 1989,111-129.
38. Hutchinson, F.G, Furr B.J.A., *Biodegradable Polymer Systems for the Sustained release of Polypeptides*, *Controlled Release*, 1990, 13:279-294.
39. Nimni M.E., *Polypeptide growth factors:targeted delivery sistem*, *Biomaterials*, 1997,18:1201-1225.
40. Bowen-pope D.F., Malpas, T.W, Foster D.M and Ross R, Platelet-derived growth factor in-vivo levels, activity and rate of clearance. *Blood*, 1984, 64:458-469.
- 41.Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman Md, Ikada Y., Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic growth factor, *J Biomater. Sci.Polymer Edn*, 1999, 10(1):79-94.

