

**Doku Mühendisliği Yöntemi ile
Kollajen ve NaCMC Kullanılarak
Çift Katmanlı Deri Modeli Oluşturulması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 213M651

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. NESRİN HASIRCI

Araştırmacı(lar): AYLİN ŞENDEMİR ÜRKMEZ

**Bursiyer(ler): BEGÜM ZEYBEK
ILGIN KIMIZ**

HAZİRAN 2015

ÖNSÖZ

Deri insan vücudunun en geniş organıdır ve dış çevre ile vücut arasındadır ve bir koruyucu ve engelleyici görevi görür. Ancak, yanıklar, ülser ve dolaşım bozuklukları gibi hastalıklar büyük deri kayıplarına sebep olabilir ve zorlu yaraların tedavisi çok zordur. Son yıllarda gelişen ileri malzeme bilim ve mühendisliği yöntemleri ile geliştirilen deri modelleri, epidermisi taklit etmeyi başarsa da dermis tabakasının bileşenlerinin tümünü içeren bir model henüz geliştirilememiştir. Başarılı bir yapay deri modelinin insan derisinin morfolojik ve işlevsel olarak benzeri olması, dolayısıyla deriyi taklit eden mekanik özellikleri taşıması, vücuda yerleştirildikten sonra hızlı damarlanma sağlaması ve sağlam bir dermis-epidermis bağlantısı oluşturması beklenir.

Önerilen proje çerçevesinde iki katmanlı deri modeli oluşturulması, dış katmanın epidermisi iç katmanın da dermisi taklit etmesi planlanmıştır. Dış katmanı oluşturacak iskele olarak oksijen ve sıvı geçirgenliğine sahip, gözenekli kollajen sünger yapı seçilmiştir. Alt katmanın yapımında ise dermisen özelliklerini taşıyan sıvı emici ve sağlam bir hidrojel olması için sodyum karboksimetilselüloz (NaCMC) seçilmiştir. Üst katmanı oluşturacak kollajen süngere keratinosit hücreleri, alt katmanı oluşturacak NaCMC katmanına ise dermal fibroblastlar ekilerek oluşturulan çift katmanlı yapının ko-kültür ortamında geliştirilmesi planlanmıştır.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 1002 projesi olarak ve 213M651 numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLolar DİZİNİ	7
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	8
ÖZET	11
ABSTRACT	12
1. GİRİŞ	13
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	14
2.1. Deri	14
2.1.1. Derinin Tabakaları	14
2.1.2. Derinin Ekstraselüler Matriksi (ECM)	15
2.2. Deri Yaralanmaları.....	15
2.2.1. Yaraların Sınıflandırılması	16
2.2.2. Yara İyileşme Süreci.....	16
2.2.2.1. Keratinositlerin İşlevi ve Normal Yara İyileşme Süreci	17
2.2.2.2. Fibroblastların İşlevi ve Normal Yara İyileşme Süreci	17
2.3. Deri Doku Mühendisliği.....	17
2.3.1. Deri Doku Mühendisliği için Hücre Kaynakları	18
2.3.1. Deri Doku Mühendisliği için İskele Kaynakları.....	19
2.3.2. Doku Mühendisliği ile Üretilen Derinin Laboratuvarda (<i>in vitro</i>) Kullanımı	19
2.4. Ticari Yapay Deri Modelleri ve Deri Eşlenikleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. İskelelerin Üretimi	23
3.1.1. Kollajen İskelelerin Üretimi	23
3.1.1.1. Sıçan kuyruğundan kollajen tip 1 elde edilmesi	23

3.1.1.2. Liyofilizasyon ile kollajen iskele elde edilmesi	23
3.1.2. Kollajen ve Kollajen+Kondroitin Sülfat İskelelerin Üretimi	24
3.1.3. Kollajen ve Kollajen+Kondroitin Sülfat İskelelerin Çapraz Bağlanması.....	24
3.1.4. Sodyum Karboksimetil Selüloz (NaCMC) İskelelerin Üretimi.....	24
3.1.5. NaCMC ve Kollajen ile Çift Katmanlı İskelenin Üretilmesi	25
3.2. İskelelerin Karakterizasyonu	25
3.2.1. Sünger Kalınlığı	25
3.2.2. Sünger Yüzey Gözenekliliği	25
3.2.3. Kütle Gözenekliliği	25
3.2.4. <i>In situ</i> Bozunma testi	25
3.2.5. Kollajenaz Enzimi ile <i>In situ</i> Bozunma Testi.....	25
3.2.6. NaCMC İskelelerin Su Tutma Kapasitesi	26
3.2.7. Kollajen İskelelerin Saflığının Belirlenmesi (SDS-page ile)	26
3.2.8. Mekanik Testler	26
3.2.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi	26
3.2.10. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi	26
3.3. İskelelerin Sterilizasyonu	26
3.4. Hücre Kültürü	27
3.4.1. Keratinosit ve Fibroblast Hücre Hatlarının Kültürü	27
3.4.2. Hücre Sayısı Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	27
3.4.3. Keratinosit Hücrelerinin ThinCert™ İnsertleri Üzerine Kültüre Edilmesi.....	27
3.4.4. Fibroblast Hücrelerinin NaCMC İskeleler Üzerinde Kültüre Edilmesi.....	28
3.4.5. CellCrown™ İnsertler Üzerine Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Farklı Özellikteki Kollajen İskelelerde Ko-Kültürü.....	28
3.4.6. Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Çift Katmanlı İskelede Ko-Kültürü	29
3.5. Üç Boyutlu Kültürlerde Yapılan Analizler ve Hücre Karakterizasyonu	29
3.5.1. Hücre Büyüme Kinetiği	29
3.5.2. Mikroskopik ve Histolojik İncelemeler	29

3.5.2.1. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için hematoksilin ve eozin boyaması	29
3.5.2.2. İmmünohistokimyasal boyama.....	30
3.5.2.3. DAPI boyama	30
3.5.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	30
3.5.4. Büyüme Faktörü Ekspresyonlarının ELISA Kitleri ile Belirlenmesi	30
3.5.4.1. VEGF ekspresyonunun belirlenmesi.....	30
3.5.4.2. bFGF ekspresyonunun belirlenmesi	31
3.5.4.3. IL-8 ekspresyonunun belirlenmesi	31
3.6. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1. İskelelerin Karakterizasyonu	32
4.1.1. İskelelerin Stereomikroskopi ve SEM Fotoğrafları.....	32
4.1.2. İskelelerin Yoğunlukları.....	40
4.1.3. <i>In situ</i> Bozunma Testi	40
4.1.4. Kollajenaz Enzimi ile <i>In situ</i> Bozunma Testi.....	42
4.1.5. NaCMC İskelelerin Su Tutma Kapasitesi	42
4.1.6. Kollajen İskelelerin Saflığının Belirlenmesi (SDS-PAGE)	42
4.1.7. Mekanik Testler	43
4.1.8. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi	43
4.2. İskelelerin Sterilizasyonu	44
4.3. Hücre Kültürü	45
4.3.1. Hücre Morfolojileri.....	45
4.3.2. Hücre Sayısı Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	45
4.3.3. Keratinosit Hücrelerinin EMEM Ortamına Adaptasyonu.....	46
4.3.4. Keratinosit Hücrelerinin ThinCert™ İnsertleri Üzerine Kültüre Edilmesi.....	46
4.3.5. CellCrown™ İnsertler Üzerine Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Farklı Özellikteki Kollajen İskelelerde Ko-Kültürü.....	47
4.4. Üç Boyutlu Kültürlerde Yapılan Analizler ve Hücre Karakterizasyonu	47

4.4.1. Üç Boyutlu Kültürlerde Hücre Büyüme Kinetiği	47
4.4.2. Hücre Morfolojisi için Hematoksilen ve Eozin Boyaması	48
4.4.3. İmmünohistokimyasal Boyama	49
4.4.4. DAPI Boyaması	52
4.4.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	53
4.4.6. ELISA Sonuçları	54
4.4.6.1. VEGF ekspresyonunun belirlenmesi.....	54
4.4.6.2. bFGF ekspresyonunun belirlenmesi	56
4.4.6.3. IL-8 ekspresyonunun belirlenmesi	57
5. SONUÇ	58
KAYNAKÇA.....	60

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Derinin hücre dışı matriks bileşenleri	15
2.2 İnsan derisi yara çeşitleri	16
2.3 Yaraların sınıflandırılması ve özellikleri.....	16
2.4 Deri eşlenikleri için potansiyel biyomalzemeler	19
2.5 <i>In vitro</i> insan deri modeli çeşitleri.....	19
2.6 Deri eşleniklerinin sınıflandırılması	20
3.1 Kollajen iskelelerin hazırlanma koşulları	24
3.2 Hazırlanan NaCMC iskele yapılarının kompozisyonu ve hazırlanma koşulları	24
3.3 Çift katmanlı iskelelerin hazırlanma koşulları	25
4.1 NaCMC, Col ve ColCS iskelelerin yoğunlukları.....	40
4.2 NaCMC iskelelerin su tutma kapasiteleri	42
4.3 İskelelerin elastiklik modülü	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İnsan derisi a) Konfokal görüntüsü b) Yapay renklendirilmiş SEM görüntüsü.....	14
2.2 İnsan derisinin tabakaları.....	14
2.3 Yara iyileşme süreci	16
2.4 Doku mühendisliği kavramı.....	18
2.5 Melanoma hücreleri ile <i>in vitro</i> epidermal/dermal deri tümör modelinin şematik gösterimi.....	20
3.1 Kollajen iskele üretimi.....	23
3.2 Keratinosit hücrelerinin ThinCert™ insertleri üzerine kültür edilmesi.....	28
3.3 CellCrown™ insertler üzerine iki farklı metotla ko-kültür a) Fibroblastların 7 gün boyunca kültürü (M1) b) Fibroblastların 14 gün boyunca kültürü (M2)	28
3.4 CellCrown™ insertler üzerinde fibroblast ve keratinosit hücrelerinin ko-kültürü.....	29
4.1 Stereomikroskop ile çekilmiş büyük ve küçük porlu kollajen iskele görüntüleri.....	32
4.2 Farklı çapraz bağlama metotlarında kalın kollajen iskelelerin SEM görüntüleri	32
4.3 Çapraz bağlanmamış kollajen iskelelerin SEM görüntüleri	33
4.4. Liyofilizasyon sonrasındaki kollajen iskeleler: a) iskele kalınlıkları, b) iskele çapları.....	33
4.5. Çapraz bağlanmamış kollajen iskelelerinin görünümü (UXLCol)	34
4.6. Çapraz bağlanmamış kollajen-kondroitin sülfat iskeleleri (UXLColCS)	34
4.7. -20°C'de dondurulmuş, çapraz bağlanmamış NaCMC iskeleleri	35
4.8. %1 Epiklorohidrin ile çapraz bağlanan ve -20°C'de dondurulan NaCMC iskeleleri	36
4.9. -80°C'de dondurulan, çapraz bağlanmamış NaCMC iskeleleri.....	37
4.10. -80°C'de dondurulan ve %1 epiklorohidrin ile çapraz bağlanan NaCMC iskeleleri	38
4.11. XLNaCMC20-5 iskeleleri	38
4.12 BLCol iskeleri	39
4.13 BLColCS iskeleleri.....	39
4.14. Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış Kollajen iskelelerin <i>in situ</i> bozunma profilleri.	40
4.15. Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış ColCS iskelerin <i>in situ</i> bozunma profilleri	41

4.16. NaCMC ve çift katmanlı iskelerin in situ bozunma profilleri	41
4.17. Col ve ColCS iskelerin kollejenaz enzimi tarafından bozunma profilleri	42
4.18. Sprague-Dawley sıçan kuyruğundan izole edilen kollajenin, moleküler ağırlık merdiveni ve ticari Tip 1 kollajenle SDS-PAGE sonuçlarının karşılaştırması	43
4.19. Dehidrotermal çepraz bağlamadan önce ve sonra kollajen iskelelerin FTIR spektra analizi	43
4.20. İskelelerin vakum ve atmosferik basınç altında etanol ile sterilizasyonu sonrası SEM görüntüleri	44
4.21. İskelelerin etilen oksit ve hidrojen peroksit ile sterilizasyonu sonrası SEM görüntüleri	44
4.22. Hücrelerin Faz-kontrast ışık mikroskopunda morfolojilerinin görüntüsü. a) Detroit hücreleri, b) HS2 hücreleri.....	45
4.23. Keratinosit hücrelerinin kalibrasyon eğrisi.....	45
4.24. Fibroblast hücrelerinin kalibrasyon eğrisi	45
4.25. Keratinosit hücrelerinin %10 serum içeren EMEM ve DMEM-F12 ortamlarında üremeleri.....	46
4.26. Keratinositlerinin ThinCert™ insertleri üzerinde farklı inkübasyon koşullarındaki SEM görüntüleri	46
4.27. Küçük gözenekli kollajen iskele üzerinde keratinositlerin üremesi	47
4.28. Büyük gözenekli kollajen iskele üzerinde fibroblast hücrelerinin üremesi	47
4.29. NaCMC iskele üzerinde fibroblast hücrelerinin proliferasyonu	48
4.30. CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası hematoksilin ve eozin boyanmış görüntüleri.....	48
4.31. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı iskelelerde ko-kültürü sonrası hematoksilin ve eozin boyaması	49
4.32. CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyama.....	49
4.33. Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskelelerde kültürü sonrası immünohistokimyasal boyaması.....	50
4.34. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı NaCMC ve kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyaması.....	51
4.35. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı NaCMC ve ColCS iskelelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyaması.....	51

4.36 CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası DAPI boyama.....	52
4.37 Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı iskelelerde ko-kültürü sonrası DAPI boyama.....	52
4.38 Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskelelerde kültürü sonrası DAPI boyama.....	52
4.39. Keratinosit hücrelerinin küçük porlu kollajen iskele üzerinde kültürü sonrası SEM görüntüleri	53
4.40. Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskele üzerinde kültürü sonrası SEM görüntüleri	53
4.41. Hücrelerinin çift katmanlı iskelede kültürü sonrası SEM görüntüleri	54
4.42 VEGF ELISA testine göre standart grafiği	55
4.43. VEGF ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin salgıladıkları VEGF konsantrasyonları	55
4.42. bFGF ELISA testine göre standart grafiği	56
4.43. bFGF ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin salgıladığı bFGF konsantrasyonları	57
4.46. IL-8 ELISA testine göre IL-8 standart grafiği	57
4.47. IL-8 ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin IL-8 konsantrasyonları	57

ÖZET

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu çalışmada, insan derisini taklit etmek amacıyla, gözenekli kollajen ve sodyum karboskimetilselüloz (NaCMC) iskeleler kullanılarak iki katmanlı deri modelleri başarıyla üretilmiştir. Geliştirilen deri modelinde, gözenekli kollajen iskelenin dış katman olan epidermal tabakasını, ve gözenek boyutu dış katmana göre daha büyük olan NaCMC iskelenin ise iç katman olan dermal tabakayı oluşturması planlanmıştır. Hazırlanan iskeleler, sulu ortamda dayanıklı olabilmelerini sağlamak amacıyla dehidrotermal (DHT) işlem ile ve/veya gluteraldehit ile çapraz bağlanmıştır.

En uygun çapraz bağlama yöntemine karar vermek için, iskelelerin bozunma hızları ve mekanik direnç ve dayanımları analiz edilmiştir. Süngerimsi yapıdaki kollajen ve NaCMC iskeleler, kalınlık, yüzey gözenekliliği, kütle gözenekliliği, gözenek boyutu dağılımı, *in situ* ve enzimatik ortamdaki bozunma hızları, basma testi ile mekanik güçleri, FTIR-ATR ile kimyasal yapıları ve SEM ile topografyaları incelemiş ve özellikleri karakterize edilmiştir.

Dış tabakayı oluşturan küçük gözenekli kollajen iskelenin üzerine insan kökenli keratinosit hücreleri, alt tabakayı oluşturan büyük porlu NaCMC iskelenin üzerine insan dermal fibroblastları ekilmiş ve ko-kültivasyon yapılmıştır. İskelelerin insan dermal keratinositleri ve insan dermal fibroblastları ile olan *in vitro* etkileşimleri hücre kültür çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, üretilen çift tabakalı iskelelerin çapraz bağlama metodunun geliştirilmesi sonucunda deri doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir alternatif model olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : İki katmanlı insan deri modeli, deri doku mühendisliği, çapraz bağlama, kollajen, NaCMC.

SUMMARY

In this study supported by TÜBİTAK, bilayer scaffolds of porous collagen and sodium carboxymethyl cellulose were successfully prepared to mimic human skin. In this model skin that was developed, porous collagen served as the external component, the epidermal layer, and the NaCMC scaffold with larger pores than the exterior as the inner, dermal layer. In order to render the scaffolds stable in aqueous media they were crosslinked with the dehydrothermal (DHT) process and/or with glutaraldehyde.

In order to decide on the optimum crosslinkage procedure the degradation rate and mechanical resistance and strength were analyzed. The sponge-like collagen and NaCMC scaffolds were examined and characterized for their thickness, surface porosity, bulk porosity, pore size distribution, *in situ* and enzymatic degradation rates, with compression tests for their mechanical properties, with FTIR-ATR for their chemical structure, and with SEM for their topography

Human keratinocytes were seeded on small pore sized collagen scaffold that represented the external layer and human dermal fibroblasts were seeded on the larger pore sized lower, NaCMC, layer, and co-cultured. The *in vitro* interactions of the human dermal keratinocytes and human dermal fibroblasts were assessed with cell culture studies.

As a result it was demonstrated that the bilayer scaffold manufactured after the development of a crosslinking method could be accepted as an alternative model system for skin tissue engineering applications.

Keywords: Bilayer human skin model, skin tissue engineering, cross linking, collagen, NaCMC.

1. GİRİŞ

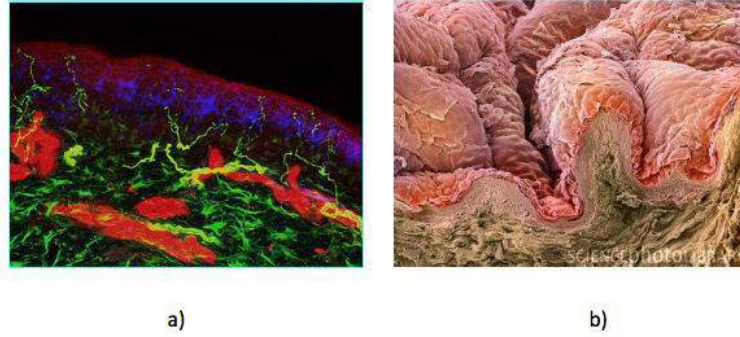
Deri insan vücudunun en geniş organı olup dış çevre ile arasında koruyucu bir engel niteliğindedir. Vücudu ve içerisindeki organları her türlü patojen ve mikroorganizmadan korumak, içeri ve dışarı sıvı geçişini denetlemektedir. Deri, mikrobiyal, termal, mekanik ve kimyasal etkilere doğrudan maruz kalmaktadır. Geçtiğimiz 30 yıl içinde insan derisini taklit eden bir yapının oluşturulması amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır (Brohem ve ark., 2011). Bu yapılar klinik uygulamalarda kullanılmak, akut ve kronik yara iyileşmelerini desteklemek amacıyla olduğu gibi yeni dermatolojik veya farmakolojik ajanların denenmesi için *in vitro* test modelleri olarak kullanılma amacıyla da geliştirilmektedir. Bu süreçte deri modelleri oluşturulurken doku mühendisliği yaklaşımları önem kazanmaktadır. Bu yaklaşımda, çeşitli biyolojik ve sentetik malzemelerden hücre taşıyıcılar (doku iskelesi) üretilmekte ve bunlarla hedef dokunun gerektirdiği hücreler *in vitro* koşullarda bir araya getirilmektedir (MacNail, 2007). Bu ikili yapıya büyümeyi hızlandırıcı, farklılaşmayı artırıcı biyoaktif ajanlar da katılarak yeni doku oluşumu hızlandırılmaya çalışılmaktadır. İdeal bir doku iskelesi, hücrelerin tutunmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına olanak sağlayacak fiziksel ve kimyasal yapıya ve yüzey özelliklerine sahip olmalıdır (Liu ve ark., 2007).

Bu proje ile geliştirilen iki katmanlı deri modelinde dış katman epidermisi iç katman da dermisi taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. Dış katmanı oluşturacak iskele malzemesi olarak seçilen kollajenden üretilen iskelenin, küçük gözenekli, uygun bozunma hızına sahip, gerekli oksijen ve sıvı geçirgenliği sağlayan ve mikroorganizmaların girişini engelleyici bir yapıda olması istenmektedir (Yannas and Burke, 1980). Alt katmanın ise dermisen özelliklerini taşıması, yani sıvı emici ve tutucu bir hidrojel olması, sağlam olması, yine uygun gözeneklilikte ve gözenek boyutlarına sahip bir yapı olması istenmektedir. Bu özellikleri taşıması gereken alt katmanın yara örtülerinde sıkça kullanılan ve biyoyumluluğu gösterilmiş olan sodyum karboksimetilselüloz'dan (NaCMC) yapılmasına karar verilmiştir (Ramli and Wong, 2011). Üst katmanı oluşturacak olan kollajen süngere insan kaynaklı keratinositler, alt katmanı oluşturacak NaCMC katmanına ise insan kaynaklı dermal fibroblastlar ekilerek ortaya çıkan çift katmanlı yapı kökültüre alınmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Deri

Deri hacim ve ağırlık bakımından vücudumuzdaki organların en büyüğüdür ve vücudumuzun tüm yüzeyini örtmektedir. Derinin başlıca görevleri: (1) vücut ve çevre arasında engel görevi görerek vücudu korumak (MacNail, 2008), (2) güneşten gelen radyasyonu absorbe etmek (Boyce, 2001), (3) su, yağ ve vitaminler için depolama merkezi olmak (Elias, 1983), (4) sıvı kaybını önlemek (Elias, 1996). Bu işlevlerine ek olarak, deri, vücut sıcaklığının düzenlenmesinde ve vücudun dış mekanik kuvvetlerden korunmasında da rol oynamaktadır (Yannas and Burke, 1980). Deri, canlılar arasında hatta bir insandan diğerine, ırk ve yaşa bağlı olarak çok değişik özellikler gösterir (Şekil 2.1).



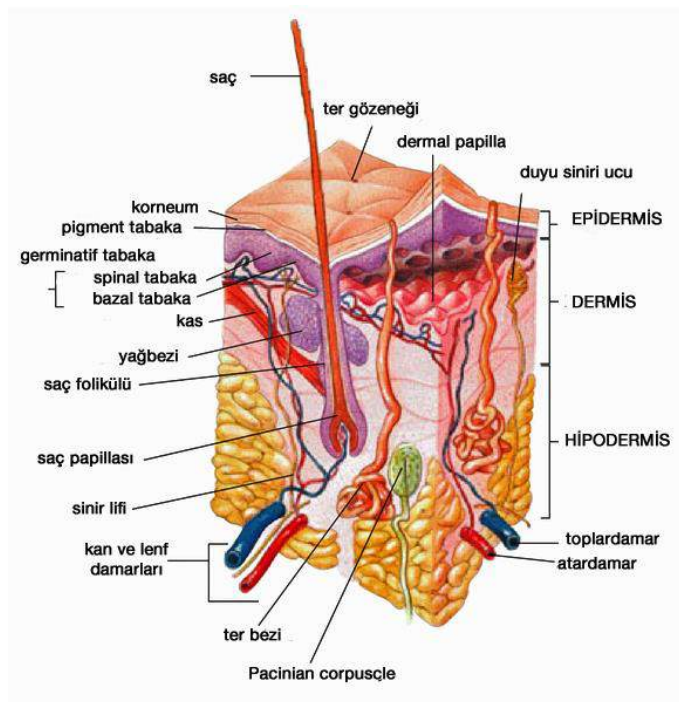
Şekil 2.1. İnsan derisi a) Konfokal görüntüsü (Kennedy, 2014)
b) Yapay renklendirilmiş SEM görüntüsü (Sciencephoto, 2014)

2.1.1. Derinin Tabakaları

Deri başlıca epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 2.2) (Zhong ve ark., 2010).

Epidermis ortalama kalınlığı 100 – 300 µm olan bir tabakadır ve altındaki dermis tabakasının çıkıntılarıyla iç içedir. Epidermal tabakada keratinosit hücreleri sürekli bölünür, biçim ve yapıları değişerek bazal tabaka adı verilen en alt kısımdan yüzeye doğru göç ederler. Böylece üst deri, tabakalaşmış bir yapı gösterir (Rheinwald and Green, 1975).

Dermiste kan ve lenf damarları, yağ ve ter bezleri, kıl follikülleri, deri kasları ve çeşitli duyuları alan sinirler bulunur. Deriye kıvam ve esnekliğini veren tabakadır. Esas yapıyı jelatinimsi bir madde oluşturur. Bu madde fibroblastlar tarafından salgılanır, hyalüronik asit, kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat ve diğer mükopolisakkaritlerden meydana gelir ve çok yüksek oranda su tutma kapasitesine sahiptir. Bu yapı içerisinde kollajen, elastik ve retiküler lifler ile değişik hücreler yer alır. Vücudun yapısal proteini kollajendir; yoğunlukla tendonlarda, ligamentlerde, kemiklerde ve dermiste bulunur. Derinin kuru ağırlığının %70'i kollajenden oluşur. Derinin esneklik ve dayanıklılığını dermiste en bol bulunan tip I ve tip III kollajen sağlar. Bu iki tip kollajen cilde mekanik dayanıklılık ve gergin bir görünüm verir (Rheinwald and Green, 1975).



Şekil 2.2. İnsan derisinin tabakaları (NCI arşivinden adapte edilmiştir).

Hipodermis tabakası damar ve sinir yönünden çok zengindir. Ayrıca tüm vücutta ve deride ısı düzenlemesinden sorumludur (Rheinwald and Green, 1977). Yapılan araştırmalarda deride erişkin kök hücre sayısının oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Green ve ark., 1979; O'Conner ve ark., 1981; Gallico ve ark., 1984)

2.1.2. Derinin Ekstraselüler Matriksi (ECM)

Deri matrisi iki ana makromolekül tipinden oluşmaktadır: (1) (1) proteinlerle kovalent bağ yapıp proteoglikanları oluşturan polisakkarit zincirlerinden oluşan glikozaminoglikanlar (GAG) (Uitto ve ark., 1989), ve (2) yapısal işlevler ve adhesiflikten sorumlu olan kollajen, elastin, fibronektin ve laminin (Tablo 2.1) içeren lifsi proteinler (Alberts ve ark., 2002).

Tablo 2.1. Derinin ekstraselüler matriks bileşenleri (Uitto ve ark., 1989)

Bileşen	İşlevi
Kollajenler	
Tip I	Çekme dayanımını sağlayan ana bileşen
Tip II	Yaşlanmayı geciktirici, gerginlik verici
Tip III	Gerilme özelliklerine katkı
Tip IV	Bazal membranın ana yapısal bileşeni
Tip V	Hücre yüzeyi ve çevre matriksi arasında arayüzey bağlantısı
Tip VI	Matriks toplanması
Tip VIII	Bağlama fibrillerinin yapısal bileşeni
Elastik fiberler	
Elastin	Esneklik ve deri elastikiyeti
Mikrofibriler bileşen	Elastik fiber oluşumuyla iskele oluşturma
Fibrillin	Mikrofibril yapısının stabilizasyonu
Bazal Membran Bağlantılı Makromoleküller	
Proteoglikanlar/GAGs	Su ve iyon bakımından denge; büyümenin düzenlenmesi, hücre göçü ve hücrelerin tutunması
Heparan sülfat Proteoglikan, Laminin	Hücre tutunması ve farklılaşması, akson uzaması
Fibronektin	Hücrelerin ekstraselüler matrikse tutunması
Nidojen / entaktin	Hücre bağlantısı

2.2. Deri Yaralanmaları

Yanma, cerrahi müdahale veya diabetik ülser gibi kronik hastalıklar sonucunda deri yaraları oluşmaktadır (Auger ve ark., 2009). Bu yaralar akut veya kronik olmaktadır (Tablo 2.2). Üç ay içinde iyileşmeyen yaralanmalar kronik yaralanma olarak adlandırılmaktadır ve akut yaralanmalar tedaviye hızlı cevap verirken kronik yaralanmaların iyileşmesi zordur (Herrick ve ark., 1992). Yara iyileşmesi dinamik bir süreçtir ve kan hücreleri, deri parankimal hücreleri ile ECM arasındaki oldukça karmaşık bağlantıyı içerir (Epstein ve ark., 1999). Deri mühendisliği uygulamalarının başarılı olabilmesi için bu sürecin iyi anlaşılması gerekir.

Tablo 2.2. İnsan derisinin yara çeşitleri (Hutmacher ve ark., 2005)

Yara Çeşitleri
1. Venöz ülser, diabetik ülser
2. Geniş ve derin yanıklar
3. Geleneksel iyileşmeye dayanıklı ülserler
4. Pyoderma gagenosum
5. Vitiligo

2.2.1. Yaraların Sınıflandırılması

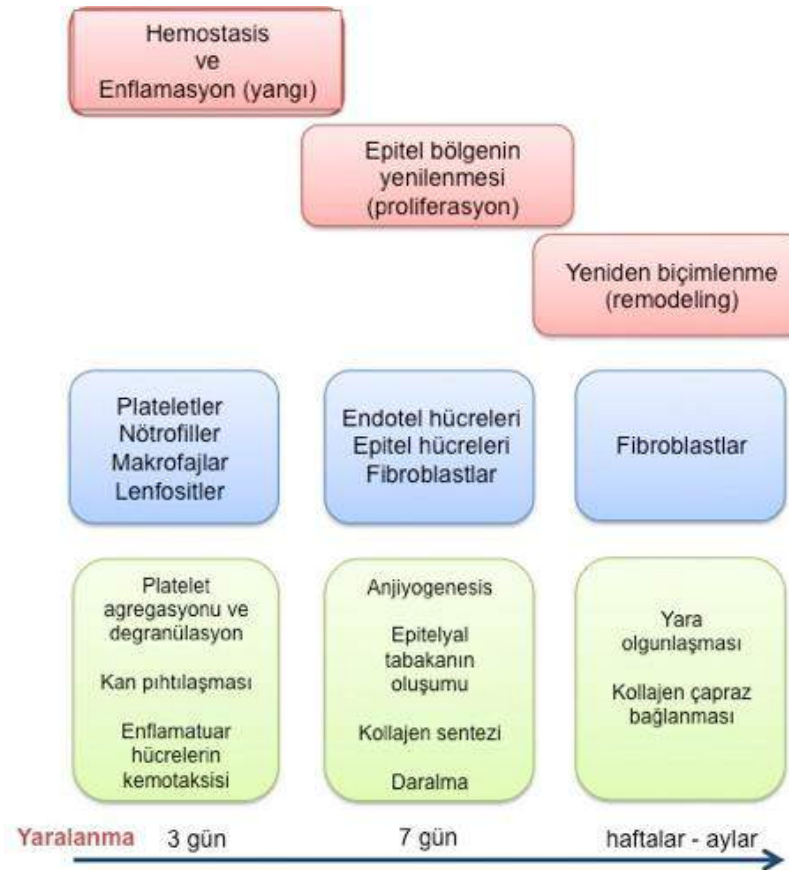
Yaralar artan derinliklerine göre sınıflandırılabilir: epidermal, yüzeysel (yarı-derin) ve derin yaralar (Tablo 2.3). Tedavi yaklaşımları da yaranın derinliğine göre farklıdır (Papini, 2004; Hutmacher ve ark., 2005; Shevchenko ve ark., 2010).

Tablo 2.3. Yaraların sınıflandırılması ve özellikleri (Shevchenko ve ark., 2010; Papini, 2004)

Epidermal yaralar	Yüzeysel/yarı-derin yaralar	Derin yaralar
Sadece epidermis etkilenir	Epidermis ve dermisin üst tabakası etkilenir	Epitel rejeneratif ögelerin tamamen yıkımı
Az ağrı	Şiddetli ağrı	Epitel bölgenin yenilenmesi ile yara bölgesinin daralması
Cerrahi müdahale gerekmez	Epitel bölgenin yenilenmesi ile yara iyileşmesi	Kozmetik deformasyonlar, fonksiyonel bozukluklar ve hareket kısıtlamaları
Yara izi bırakmadan epidermis hızlıca kendini yeniler	Saç folikülü ve ter bezleri korunur ve kendini yenilemeye yardımcı olur	1 cm çapından daha geniş yaralar; deri greftine gerek duyulur

2.2.2. Yara İyileşme Süreci

Yara iyileşmesi genellikle 4 basamaktan oluşur: hemostasis, enflamasyon (yangı), epitel bölgenin yenilenmesi (reepithelializasyon/proliferasyon) ve yeniden biçimlenme (remodelling). Bazı araştırmacılar hemostasis ve enflamasyonu tek aşama olarak kabul etmektedir (Şekil 2.3) (Shaw and Martin, 2009).



Şekil 2.3. Yara iyileşme süreci (Gendaszewska-Darmach and Kucharska, 2011)

2.2.2.1. Keratinositlerin İşlevi ve Normal Yara İyileşmesi

Normal epidermiste, mitotik yönden aktif keratinositler dermisin bazal tabasında yer alırlar ve bazal lamina ile direkt bağlantılıdır. Üremeleri yavaştır. Bazal tabakanın üzerinde keratinositler terminal farklılaşmaya başlarlar ve deri yüzeyine doğru göç ederek ölürlürl (Tomic-Canic ve ark., 2004). Keratinositler otokrin ve parakrin sisteme çok bağımlıdır ve yara iyileşme sürecinde bu durum çok önemlidir. Keratinositler birbirleriyle ve yara iyileşmesini başlatıcı diğer bağışıklık sistemi hücreleriyle iletişime geçerek yarayı onarırlar (Tomic-Canic ve ark., 1998). Hasardan birkaç saat sonra keratinositler çoğalma olmadan göçe başlarlar (Bartkova ve ark., 2003). Yara yüzeysel ise ve bazal membran bozulmamış ise üç gün içinde epitel hücreleri tekrar oluşur. Ancak, eğer yara derin ise yaranın kenarında bulunan keratinosit ve fibroblast hücreleri yaraya doğru göç eder (Mulvaney and Harrington, 1994). Yaralanmanın ikinci ve üçüncü gününde keratinositler çoğalmaya devam ederek yara yüzeyi boyunca göç etmeye devam ederler. Bu olay epitelyal uzantı olarak adlandırılır (Hübner ve ark., 1996).

Epitel dokunun tekrar oluşmasında keratinositler üç farklı grup olarak kategorize edilirler: (1) yaranın kenarında bulunan ve çoğalma potansiyeli fazla olan hücreler, (2) epitelyal uzantının başlangıcında bulunup integrin salgılayan hücreler, (3) bazal membranın ve epidermisin tekrar üretiminden sorumlu olan hücreler (Saarialho-Kere ve ark., 1995).

2.2.2.2. Fibroblastların İşlevi ve Normal Yara İyileşmesi

Fibroblastlar tarafından sürekli hücre dışı matriksin öncüleri (fiberler, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve glikoproteinler) salgılanmaktadır. Yaralanmadan yaklaşık iki veya üç gün sonra, fibroblastlar zarar görmemiş dokudan yara bölgesine doğru göç etmeye başlarlar ve böylece epitel bölgenin yenilenme fazı başlamış olur. (Stadelmann ve ark., 1998). Fibroblastlar yaralı bölgeye vardığında kendi fenotiplerini değiştirerek kollajen üretimini artırırlar (Agren ve ark., 1999). Fibroblastların yaralı bölgede göçü özellikle enflamasyon fazında oluşan fibrin pıhtı üzerinde bulunan fibronektine tutunarak gerçekleşir (Romo ve Pearson 2008).

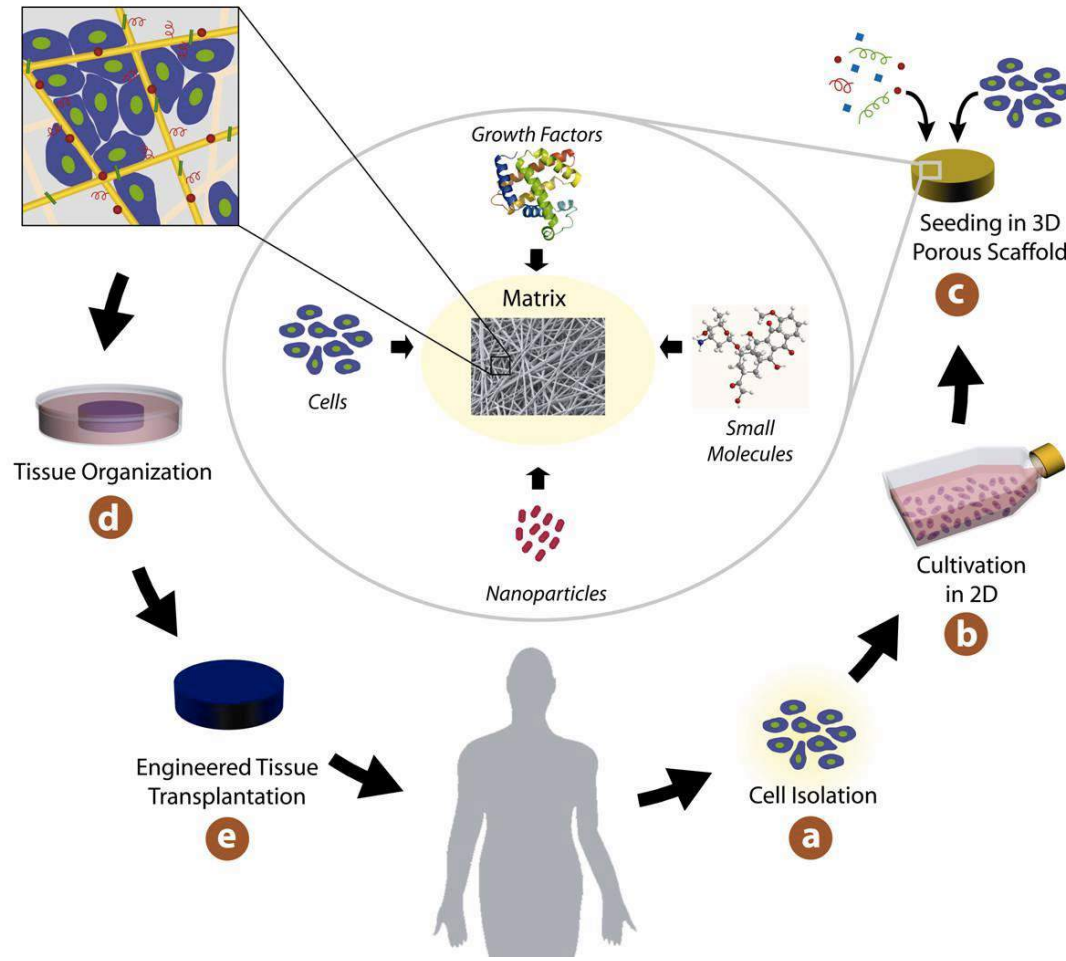
Epitel bölgenin yenilenme fazında aynı zamanda granülasyon dokusu da oluşmaya başlar. Yaralanmadan sonraki ikinci ile beşinci gün arasında bu granülasyon dokusu yaranın kenarında oluşmaya başlar ve yarayı tamamen kapatana kadar büyür (Clark, 1993). Bu doku düzgün bir organizasyona sahip değildir ve temel olarak yeni kan damarları, bağışıklık sistemi hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve geçici ECM'den oluşur (Kurkinen, 1980). Geçici ECM ise fibronektin, kollajen, proteoglikan ve hyalüronik asit (HA) gibi GAG'ları içerir (Romo and Pearson, 2008). Fibronektin ve HA granülasyon dokusunun temel bileşenleridir ve iyileşme süreci için sulu matriks sağlayarak göçü kolaylaştırır (Krawczyk, 1971). Daha sonra, normal dokuda bulunan ECM bu geçici matriks ile yer değiştirir (Hübner ve ark., 1996).

2.3. Deri Doku Mühendisliği

Deri doku mühendisliğinin amacı, doğal derinin normal anatomi ve fizyolojisinin yeniden yapılanmasını yapay bir destek ile sağlamaktır. Otolog keratinosit kültürleri 20 yıldan uzun süreden beri klinik kullanımdadır. Günümüze kadar geçen zamanda kültür ürünü suni deriler sadece kısmi olarak anatomik veya işlevsel yapıyı restore etmekte kullanılmıştır. Oysa deri doku mühendisliğinin potansiyeli ve sınırları bunun çok ötesindedir (Brohem ve ark., 2011). Bu yapılar klinik uygulamalarda kullanılmak, akut ve kronik yara iyileşmelerini desteklemek, yara iyileşmesi, *in vitro* melanoma, sedef hastalığı ve enfeksiyon modelleri, dermatolojik veya farmasötik uygulamalarda kullanılmak üzere model test sistemleri oluşturma amacıyla geliştirilmektedir (Cuono ve ark., 1986).

Doku mühendisliği hücrelerin doku iskelesi üzerine kültüre edilmesi temeline dayanır (Şekil 2.3). Uygun uyaran sağlandığı zaman yeni doku oluşumu gerçekleşir ve bu yeni doku hastada kaybedilen işlevin geri kazanılmasına yardım eder. İdeal bir doku iskelesi, hücre tutunmasına, farklılaşmasına ve çoğalmasına olanak sağlayacak mikro yapıya ve uygun yüzey kimyasına sahip olmalıdır (Liu ve ark., 2007). Yanıklar, yumuşak doku travmaları ve doku ölümüne yol açan hastalıklar büyük doku kayıplarına sebep olmaktadır. Kimi zaman vücudun %50-60'ından fazlasını etkileyebilen bu doku kayıpları hastanın kendisinden alınabilecek deri greftinin boyutlarından çok daha büyük olmakta ve otogreft yetersiz kalmaktadır (Metcalf and Ferguson, 2007). Diğer bir taraftan mühendislik yöntemleri ile geliştirilmiş modeller epidermisin tamamını taklit etmeyi başarsa da dermis tabakasının kıl, damar, ter bezi gibi bileşenlerinin hepsini içeren bir model henüz geliştirilememiştir. Bu konu günümüzde hala çözümlenmeye çalışılan önemli klinik sorunlarından biridir (Böttcher-Haberzeth, 2010).

Deri doku mühendisliğinde işlevsel doku modelleri oluşturulurken çeşitli biyolojik ve sentetik malzemeler *in vitro* ortamda hücreler ile optimum koşullarda bir araya getirilmektedir (MacNail, 2007). Yanık tedavilerinde ve diğer çalışmalarda ticari olarak satılan bazı deri modelleri vardır. Bazı modeller sadece epidermis veya sadece dermis tabakasının özelliklerini gösterirken bazıları dermis ve epidermis tabakalarını birlikte içermektedir (Herndon and Parks, 1986). Bunlarda kollajene ek olarak glikozaminoglikanlar, jelatin, hyalüronik asit, elastin, kitosan, fibrin, aljinat, polilaktik asit, poliglikolik asit, poliüretan ve polikaprolakton gibi farklı doğal ve sentetik biyomalzemelerin de tek başlarına veya birlikte kullanıldığı bilinmektedir (Burke ve ark., 1981) Süngersi yapıda olanlar liyofilizasyon ya da tanecik çözünmesi yöntemi ile elde edilirken bir kısmı da elektroçirme yöntemi ile lifsi bir yapıda üretilmektedirler (Metcalf and Ferguson, 2007). Üretilen yapı iskelelerine farklı fiziksel, kimyasal veya fiziksel+kimyasal çapraz bağlama yöntemleri uygulanarak güçlenmeleri sağlanmaktadır (Yannas and Burke, 1980).



Şekil 2.4. Doku mühendisliği kavramı (Dvir, 2014)

İdeal bir doku iskelesi hazırlanabilmesi için belli etkenler vardır: (1) kullanılan yöntem, yeni şekillenen dokunun iskele içine büyümesini ve damarlanmasını desteklemek amacıyla doku iskelesinin gözenekli yapıda ve gözenekleri arasında bağlantıları sağlayabilmeli, ayrıca istenilen şekil ve boyutlarda iskele hazırlanabilmesine izin vermelidir, (2) seçilen malzeme, biyoyumlu ve biyobozunur olmalı, malzemenin bozunma hızı yeni şekillenmekte olan dokunun oluşum hızıyla dengeli olmalı ve bozunma sonunda açığa çıkan yan ürünler toksisiteye yol açmadan metabolize edilebilmelidir, (3) hazırlanan doku iskelesi, hücre tutunması, farklılaşması, çoğalması ve hücre göçü için uygun yüzey kimyası ve yüzey topografisine sahip olmalı, (4) hazırlanan doku iskelesi, yeni doku şekillenmesi ve implantasyon aşamalarında deforme olmayacak düzeyde yeterli mekanik dayanıma sahip olmalıdır. Deri doku mühendisliği alanında daha çok polimer bazlı malzemeler kullanılarak, membran/matriks yapısında, süngerimsi yapıda ve lifsi ağ formunda doku iskeleleri kullanılmaktadır (Boyce ve ark., 2006; Sachlos and Czeruska, 2003).

2.3.1. Deri Doku Mühendisliği için Hücre Kaynakları

Doku mühendisliği uygulamalarında hücreler temel elemanlardır. Tedavi edilecek dokuya bağlı olarak kullanılacak hücrelerin morfolojisi, sayısı, gen ekspresyonu ve gelişimi hedef doku ile aynı olmalıdır (Schnabel ve ark., 2002). Hücreler kaynaklarına göre otolog, allojenik ve ksenojenik olarak sınıflandırılmaktadır (Thomson ve ark., 1998). Otolog hücreler hastanın kendisinden elde edilirler. İmmün reaksiyona neden olmadığı için otolog hücreler doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. Ancak, hastanın vücudunda yeni bir yaranın açılması ve sınırlı sayıda hücrenin alınabilmesi gibi sorunlar söz konusudur (Cotsarelis, 2006). Allojenik hücreler ise aynı türün farklı bireylerinden elde edilir. Uygun maliyetle çok sayıda hücrenin elde edilmesine rağmen hastada immün tepkiye yol açabilmektedir (Shores ve ark., 2007). Diğer bir hücre kaynağı olan ksenojenik hücreler ise farklı türlerden elde edilmektedir. Uygun maliyet ve erişimin kolay olması gibi avantajlarının yanında immün yanıt ve patojen faktörlerin bulaşması gibi dezavantajları vardır (Dalkiranoğlu, 2011).

Deri eşlenikleri için hücrelerin elde edilmesi içinde üç yer vardır: lokal, sistemik ve öncül hücre popülasyonları (Metcalf and Ferguson, 2007). Lokal hücreler fibroblastları, keratinositleri, melanositleri, adipositleri ve saç folikül hücrelerini içerir. Sistemik hücreler fibrosit gibi kan ve kemik iliğinde bulunan, aktif olmayan hücrelerdir (Bucala et al, 1994). Öncül hücreler ise kıl kökü, kemik iliği gibi kök hücre nişlerinde bulunur (Metcalf and Ferguson, 2007).

2.3.2. Deri Doku Mühendisliği için İskele Kaynakları

Deri doku mühendisliğinde iskeleler genellikle yarı sentetik veya doğal polimerler, kopolimerler veya iki ya da daha çok polimerin karışımı şeklinde üretilmekte, ya da polimerik kompozitler olarak geliştirilmektedir (Tablo 2.4). Kompozit kullanımı tek bileşenle üretilen iskelelerle karşılaştırıldığında iskeleye gelişmiş mekanik özellikler ve biyouyumluluk kazandırmaktadır (Pachence and Kohn, 2000; Murugan and Ramakrishna, 2007; Shevchenko ve ark., 2010).

Tablo 2.4. Deri eşlenikleri için potansiyel biyomalzemeler (Hutmacher ve ark., 2005; Roh ve ark., 2006; Zhong ve ark., 2010; Shevchenko ve ark., 2010)

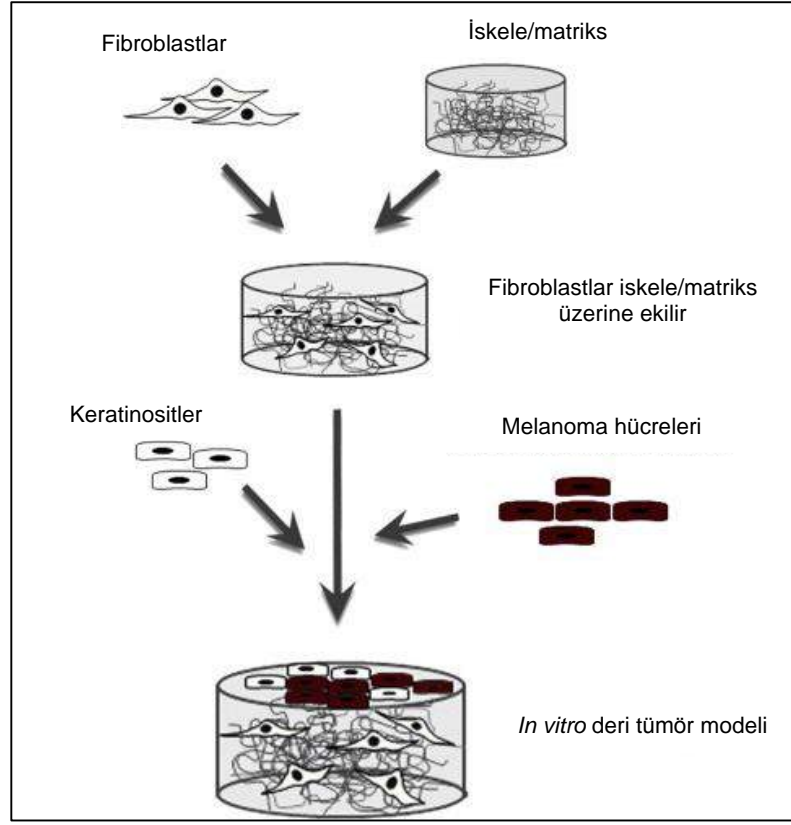
Sığır kollajeni	Fibronectin fonksiyonel bölgesi ile birlikte hyalüronan
Fibronectin	PLGA/kitosan hibrit, elektroğrılmış nanolifsi membran
Fibrin jel	Biyobozunur poliüretan mikrofiberleri
<i>Acetobacter xylinum</i> 'ca üretilen selüloz nanofibril	İpek fibroini / aljinat karışımı sünger
İnsan kollajen matriksi	Polivinil alkol/kitosan/ipek özü karışımı sünger
Elektroğirme ile üretilen poli(ϵ -kaprolakton)/jelatin nanolifsi iskele	Nano-titanyum oksit-kitosan ile jelatin ve hyalüronik asitten oluşan kompozit
Sığır kollajen I / kondrotin-4-6 sülfat/ kitosan liyofilize dermal matriksi	Polikaprolakton/kollajen karışımı; elektroğirme; nanolifsi membran
Öğütülmüş, hücreleştirilmiş ve diizosiyantle çapraz bağlanmış domuz dermisi	Liyofilize edilmiş sığır kollajen iskelesinin mikrobiyal transglutaminaz ile çapraz bağlanması

2.3.3. Doku Mühendisliği ile Üretilen Derinin Laboratuvarda (*in vitro*) Kullanımı

Üç boyutlu hücre modelleri arasında insan derisi belki de en fazla anlaşılan ve geliştirilen *in vitro* doku mühendisliği ürünüdür. Üç boyutlu deri gibi organotipik yapılar üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, *in vitro*'da üretilen doku eşleniklerinin kliniğe aktarımında köprü görevi yapacak, aynı zamanda kozmetik ürünlerin testinde ve hayvan denemelerinin azaltılmasında kullanılacak, translasyonel ürünlerdir. (Tablo 2.5 ve Şekil 2.5). Günümüzde bilimsel ve teknik talepleri karşılayan çok çeşitli üç boyutlu insan deri modelleri geliştirilmiştir (Shevchenko ve ark., 2010).

Tablo 2.5. *In vitro* insan deri modeli çeşitleri (Brohem ve ark., 2011; Groeber ve ark., 2011; Bellas ve ark., 2012; Mathes ve ark., 2014)

1. Hayvan denemelerini azaltmak için deri biyolojik araştırma modeli
2. Hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks bağlantılarının incelenmesi için model
3. Deri bariyer penetrasyon modeli
4. Sedef hastalığı deri modeli
5. Deri pigmentasyon modeli
6. Yara iyileşmesi ve anjiyogenez modeli
7. Alerjen deri tahrişi modeli
8. Enfeksiyon modelleri (<i>Candida albina</i> s, <i>Herpes</i>)
9. Foto-yaşlanma modeli, UV etkisi
10. Anti-kanser ilaçları test modeli
11. Cilt kanseri, melanoma çalışmaları için model (Şekil 2.4)
12. Kozmetik güvenlik denemesi için hayvan denemelerine alternatif model
13. Çeşitli reaktiflerin tahriş, aşındırıcılık, fototoksosite ve genotoksosite değerlendirmek için hayvanlar üzerinde test edilmesine alternatif yöntem geliştirme modeli



Şekil 2.5. Melanoma hücreleri ile *in vitro* epidermal/dermal deri tümör modelinin şematik gösterimi (Groeber ve ark., 2011)

2.4. Ticari Yapay Deri Modelleri ve Deri Eşlenikleri

Deri eşleniklerinin klinikteki kullanımı 1997 yılında, FDA onayı alan ilk deri doku mühendisliği ürünü olan TransCyte® ile başlamıştır. Bunu, 1998 yılında yine doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen ve ilk allojenik ürün olan Apligraf®'ın FDA onayı alması ve klinik uygulama aşamasına geçmesi, 2002 yılında ise ağır yanıkların tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan Integra®'nın medikal ürün pazarına sunulması izlemiştir. 2007 yılında sadece Apligraf®'ın yıllık satış geliri 60 milyon dolara ulaşmıştır (MacNail, 2007). Birbiriyle benzer özellikte olanların yanı sıra çok farklı bileşime sahip ürünlerin de bulunması nedeniyle piyasadaki ürünleri gruplandırmaya yönelik farklı kaynaklarda farklı sınıflandırmaları içeren bilgiler mevcuttur (Tablo 2.6.) (Shevchenko ve ark., 2010; Jones ve ark., 2002; Atiyeh ve ark., 2005; Horch ve ark., 2005; Clark ve ark., 2007; MacNeil, 2007; MacNeil, 2008; Patel and Fisher, 2008).

Tablo 2.6. Deri eşleniklerinin sınıflandırılması

Anatomik yapı	Dermo-epidermal (kompozit), Epidermal, Dermal
Uygulama süresi	Kalıcı, Yarı-kalıcı, Geçici
Malzeme çeşidi	Biyolojik: otolog, allojenik, ksenojenik Sentetik: biyobozunur, biyobozunur olmayan
Deri yerine kullanılan bileşim	Hücretsiz, Hücreli

Epidermal deri eşlenikleri, insan keratinosit hücrelerinin *in vitro* koşullarda seri kültürlenmesine olanak tanıyan yöntemlerin bulunması bu tekniklerin hızlı bir şekilde klinik uygulamalara transferini de beraberinde getirmiştir (Venugopal, Zhang and Ramakrishna, 2006). Epidermal deri eşleniği malzemelerin üretiminde ilk adım, donörden keratinosit hücrelerinin izolasyonu (deri biyopsisi) ve bu hücrelerin *in-vitro* kültürasyonu ile çoğaltılmasıdır. Kültür aşamasında uygulanmak üzere, hava-sıvı arayüz modeli, aerosol uygulaması ya da mikrotaşıyıcıların kullanılması gibi modellerle kültürasyonu verimini arttırmaya yönelik farklı yaklaşımlar belirtilmektedir. Her ne kadar hazırlanan malzemelerin yüksek maliyetli oluşu, hazırlanma sürelerinin uzun oluşu ve raf ömürlerinin kısıtlı olmasından (2-3 ay) dolayı stok problemi taşımaları gibi çeşitli dezavantajlar söz konusuysa da, zaman içerisinde yeni yatırımlar, bilimsel ve klinik araştırmalarla yaşam kurtarıcı özellikteki bu malzemelerin endüstriyel ölçekte üretim potansiyelinin artmasını sağlamaktadır. Epicel® ve Epibase®, hastanın kendi keratinosit hücreleri kullanılarak hazırlanan medikal deri ürünleridir. On beş günlük kültür işlemiyle çoğalarak tek tabaka haline gelen hücreler, epitel otoplast olarak geniş yanık yaraları olan hastalara uygulanmaktadır. MySkin®, destekleyici silikon membran üzerinde otolog keratinosit hücrelerinin kültürasyonu ile üretilen bu ürün, nöropatik ve diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır.

Derin yaralanmalarda, deri greftleri ile desteklenerek yara yatağına uygulansa da, tam anlamıyla dermal iyileşmeyi sağlayamadığı kaydedilmiştir. Bioseed-S®, fibrin dolgu malzemesi üzerinde, ortalama $3-6 \times 10^6$ hücre.mL⁻¹ otolog keratinosit subkültürü içeren ürün, terapiye-dirençli venöz bacak ülserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. CellSpray®, alt kültürü yapılan keratinosit hücrelerinin hastaya nakledileceği zaman hücre hasatının yapılarak yara yatağına spreyleneceği şeklindeki uygulamadır. Bu metodun, kısmi kalınlıktaki yaralara erken dönem müdahale ile olumlu etkiler yarattığı bildirilmiştir. Yara yatağına acil hücre desteği sağlayarak yara kapanmasını desteklese de, tam kalınlıktaki ve geniş çaplı yaralarda uygulanamamaktadır (Green, Rheinwald and Sun, 1977).

Dermal deri eşlenikleri, grubundaki ürünlerin büyük çoğunluğu allojenik ya da zenojenik kökenli, hücre içermeyen (hücresiz hale getirilen) ve dermal onarımı hızlandırmak amacıyla yaralı bölgeyi kollajen, elastin gibi ECM bileşenleri ile desteklemeye yönelik ürünlerdir. Alloderm®, dondurarak-kurutma tekniği uygulanarak hücresiz hale getirilen kadavra derisinden hazırlanan dermal matris bileşeni dir. Yara yatağına kolaylıkla uygulanabilir ve hücre içermediği için immün yanıt oluşumuna neden olmaz. Periodontal cerrahide ve dermal kayıpları içeren yaralanmalarda uygulandığı belirtilmiştir. Damarlanmayı ve dermal rejenerasyonu indükleyen ECM elemanlarını bünyesinde barındırdığından dolayı dermal yapılanma için iskelet görevi üstlenmektedir (MacNeil, 2008). Integra®, derin yanık yaralarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu ürün, yara yüzeyinde hızlı bir şekilde nem kontrolü ve bakteriyel koruma sağlar. Silikon membran yüzeyin, sığır tendon kollajeni ve bir glikozaminoglikan olan kondroitin-6-sülfat ile desteklenmesiyle üretilir. Damarlanmayı izleyen 3 haftalık bir süre boyunca yara yatağında, onarım dokusu "neodermis" şekillenmesinde astar görevi üstlenir. Yaraya naklinden sonra silikon membran uzaklaştırılır (Ralston ve ark., 1999). Biobrane®, domuz kollajeninin naylon malzeme ile desteklenmiş yarı geçirgen silikon film ile birleştirilmesiyle hazırlanan, 3 katmanlı, geçici bir yara örtüsüdür. Matris proteinlerini içerir ve yarayı kontrollü bir şekilde dış ortamdaki korur. Kısmi yaralanmalarda ve greft alma işlemi gibi cerrahi müdahale sonrasında açığa çıkan yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Yara kapanmasını takiben (ortalama 7 -14 gün) hasta vücudundan uzaklaştırılır. Dermagraft®, insan kökenli neonatal fibroblastların poliglaktin film üzerinde kültüre edilmesi ile hazırlanmaktadır. Fibroblastlar film üzerinde çoğalırken vitronektin, tenaskin, kollajen ve diğer ECM elemanı glikozaminoglikanları sentezlerler. Bu esnada poliglaktin film hidroliz yoluyla bozunmaya başlar. Yaralı bölgeye keratinosit göçünü uyarması, fibrovasküler onarımı desteklemesi ve raf ömrünün uzun olması (6 ay) önemli bir özelliğidir. Diyabetik ülserlerin ve venöz ülserlerin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu ürünün, hücrelerin allojenik olması nedeniyle immün reaksiyon gelişimi riski taşıması ve yüksek maliyetli olması gibi olumsuz özellikleri de mevcuttur (Stern ve ark., 1990; Marston ve ark., 2003).

Dermo-epidermal deri eşlenikleri ise hasara uğramış derinin doku mühendisliği desteği ile onarımı basitten en karmaşığa kadar pek çok farklı metotla gerçekleştirilmektedir. Hücre içeren ürünler aktif bir şekilde yaralı bölgenin onarımının hızlanmasını sağlarken aynı zamanda hasarlı bölgeye hücre desteği işlevi de görmektedir. Hücresiz (asellülarize) ürünler ise yarayı örtücü nitelikte olup sekonder enfeksiyonlara (bakteri, virüs vs.) karşı yarayı korurlar. Her ne kadar epidermal deri eşlenikleri tek başlarına yara yatağını dış ortamdaki koruma görevini sağlasa da orijinal derinin yapı ve işlevini yerine getirebilecek seviyede bir onarım dokusunun şekillenmesi aşamasında yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, epidermal örtülerin iyileşme sürecinde yaralı bölgede büzüşme ve yara dokusu oluşumuna neden olmaları ve kırılabilir bir yapıya sahip olmaları gibi olumsuz özellikleri mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalar da etkin bir yara onarımının dermis dokusunun varlığında gerçekleştiğini göstermiştir (Mansbridge, 2007). Dermo-epidermal eşlenikler hem epidermis hem de dermisi kapsayacak şekilde normal deri dokusunun histolojik yapısını üstün nitelikte taklit etme özelliğine sahip olan ve ekonomik açıdan maliyeti en yüksek doku mühendisliği ürünleridir. Bu ürünler genel olarak, dermis görevi üstlenenecek bir doku iskelesi ile bütünleştirilmiş allojenik deri hücrelerini içermektedir. Yaralı bölgeye büyüme faktörü, sitokinler ve ECM bileşenlerini katarak yara iyileşmesini hızlandırıcı niteliktedirler.

1998 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, bu özellikte bir malzeme hazırlanmış ve malzemenin içerdiği allojenik fibroblastlara karşı ev sahibi dokunun immünolojik tolerans gösterdiği belirtilmiştir (Dai ve ark., 2004). Söz konusu malzeme 3 haftadan fazla bir süre boyunca herhangi bir immün reaksiyon gelişmeksizin ev sahibi doku ile etkileşim halinde kalabilmiştir. Allojenik fibroblastların aksine yine allojenik kökenli keratinositler kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise keratinosit hücrelerine karşı immün reaksiyon gelişmiştir. Araştırmacılar, bu durumun insan lökosit antijeni (HLA) ekspresyonunun fibroblast ve keratinositlerde farklı olmasından kaynaklandığını ve immün cevabın oluşturulmasında fibroblastların keratinositlere göre daha toleranslı olduğunu belirtmişlerdir. Apligraf®, sığır kökenli Tip-I kollajen jel matris ve bu matrisin yüzeyinde sırasıyla allojenik neonatal keratinosit hücrelerinin oluşturduğu epidermis yapısı ve alt tabakada allojenik neonatal fibroblastları içeren bir üründür. Venöz ülserler, diyabetik ülserler ve skleroderma (bağ dokudaki kollajen artışına bağlı gelişen kronik ve otoimmün bir hastalık) yaralarının tedavisi için uygun özelliktedir. Ancak, 2 aylık *in vivo* uygulamanın sonunda allojenik hücrelerin immünolojik reaksiyon nedeniyle hayatta kalamadığı belirtilmiştir (Bello and Falabella, 2003).

NaCMC yara iyileşmesi çalışmalarında yüksek su tutma kapasitesi sayesinde nemlendirici ve koruyucu yara örtüsü olarak sıklıkla

kullanılmaktadır. Ancak genellikle *in situ* jeller olarak IntraSite™ Gel ve GranuGel™ gibi ticari kullanımları bulunmaktadır ve topikal olarak uygulanmaktadır (Sannino ve ark., 2005; Sannino ve ark., 2009).

Doku mühendisliği ile elde edilen deri modellerinin klinik kullanımlarının dışında klinik olmayan bir çok uygulaması vardır. Deri modelleri deri biyolojisi araştırmalarında, hayvan uygulamalarının azaltılmasında (Sauer et al, 2002), hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri (Ralston ve ark., 1997; Chakrabarty ve ark., 2001; Harrison ve ark., 2006), deriye giriş (penetration), yara iyileşmesi, damarlanma, pigmentasyon araştırmalarında (Bessou ve ark., 1996) ve melanoma (Meier ve ark., 2000), psoriasis (sedef hastalığı) (Barker ve ark., 2004) gibi deri hastalıklarının incelenmesinde kullanılmaktadır. Yakın dönemde yeni üç boyutlu modeller geliştirilmektedir, çünkü derinin özelliklerini yeterli miktarda taklit etmek için iki boyutlu modeller yetersiz kalmaktadır. Gelecekte, doku mühendisliği ile elde edilen deri eşleniği modeller daha işlevsel hale getirilecek ve bunlar otolog deri greftlerinin yerini alacaktır. Bunun yanı sıra yapay deri malzemelerine eklenecek melanosit, folikül hücreleri gibi diğer dermal hücreler, sinir ucu ve damar hücrelerinin de eklenmesiyle daha gerçek dokuya yakın sonuçlar alınacaktır. En önemli hedef ise kaybolan dokunun yerine konulması (replasmanı) yanında yenilenme sürecini (rejenerasyonu) uyuracak deri eşleniği malzemelerinin geliştirilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İskelelerin Üretimi

Bu çalışmada, liyofilizasyon yöntemi ile biyoyumlu, biyobozunur ve gözenekli kollajen, kollajen+ kondroitin sülfat ve NaCMC iskeleler üretilmiştir.

3.1.1.Kollajen İskelelerin Üretimi

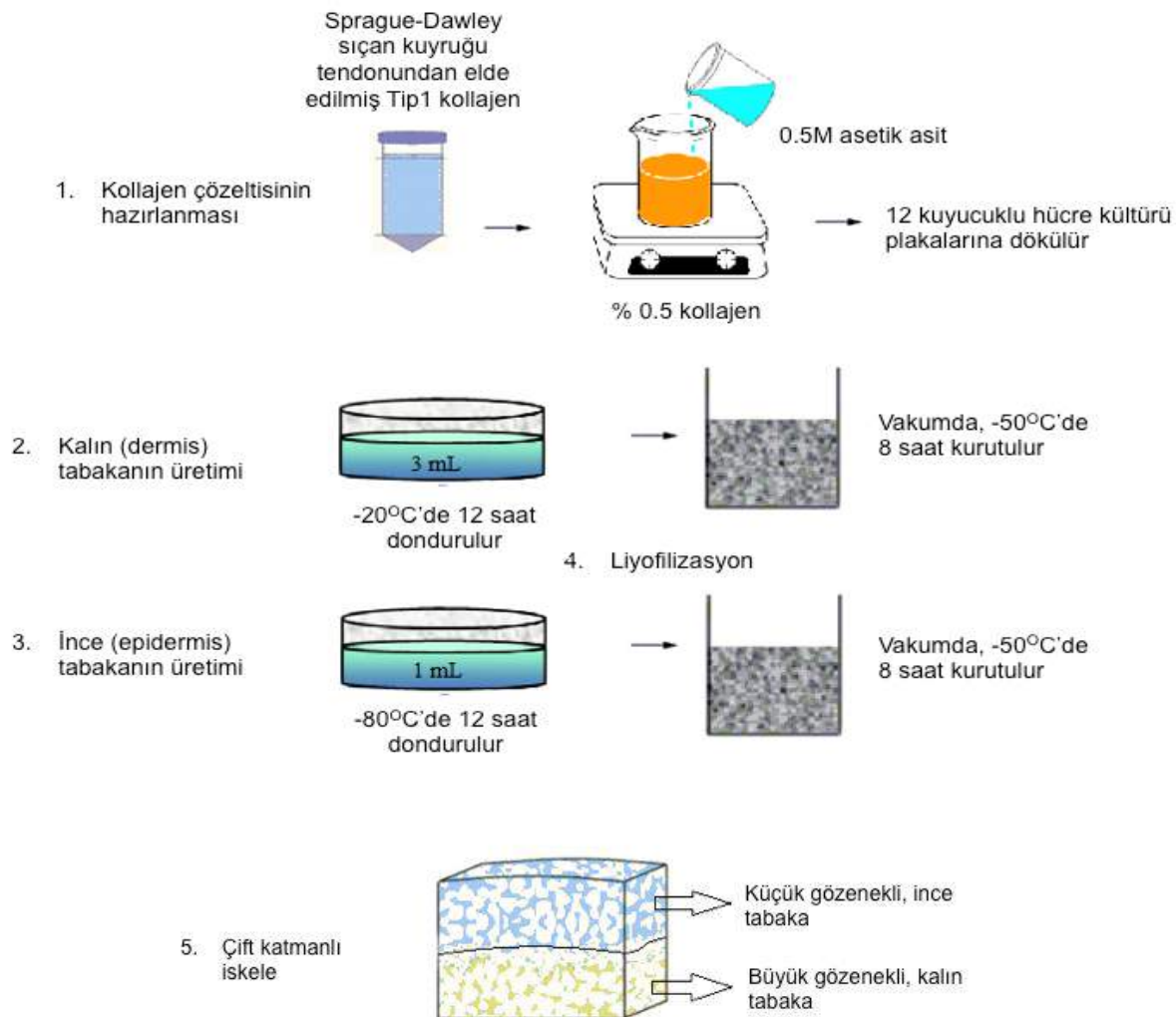
Kollajen iskelelerin üretiminde kullanılmak üzere, öncelikle sıçan kuyruğundan kollajen tip 1 izole edilmiştir.

3.1.1.1. Sıçan kuyruğundan kollajen tip 1 eldesi

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyler Yerel Etik Kurulu Etik-2013/2 no'lu kararla erkek Sprague-Dawley sıçan kuyruk tendonlarından kimyasal olarak kollajen ekstraksiyonu ($\approx 3 \text{ mg/mL}$) yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda kullanılan yöntem uygulanarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Kinikoglu, ve ark., 2011). Bu işleme göre, kuyrukları saran deri parçası kesilmiş ve tendonlar ayrılmıştır. Tendonlar asetik asit çözeltisi (2 L, 0.5 M) içerisinde 4°C 'de 2-3 gün çözülmeye bırakıldıktan sonra elde edilen çözelti cam yünü kullanılarak filtrelenmiş ve 4°C 'de, 1 hafta boyunca pH değeri 7.2 olan 5 L'lik hacimdeki fosfat tamponuna (12.5 mM NaH_2PO_4 ve 11.5 mM Na_2HPO_4) karşı 10000 kDa geçirgenlikteki diyaliz tüpü kullanılarak diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen çözelti 1600 g'de 10 dakika boyunca santrifüj (Sigma 3K30, Almanya) edilmiştir. Pellet halindeki çökeltiler bir gece 4°C 'de asetik asit (5 L, 0.15 M) içerisinde çözülmeye bırakılmış, ertesi gün bu çözeltinin içine 25 g NaCl eklenip tekrar bir gece 4°C 'de çözülmeye bırakılmıştır. Daha sonra, bu çözelti santrifüj edilerek kollajen pelletleri elde edilmiştir.

3.2.1. Liyofilizasyon ile kollajen iskele eldesi

Kollajenin 0.05 M - 0.5 M konsantrasyon bölgesindeki çözeltileri asetik asit (Merck, Almanya) içinde hazırlanmıştır. Mümkün olduğunca ince ve küçük gözenek büyüklüğünde kollajen yapı iskelesi elde edilmek istendiğinden kollajen çözeltileri düşük sıcaklıklarda dondurulmuş ve vakum altında liyofilize (Labconco Freezone 6, ABD) edilmiştir. Liyofilize olan kollajenler daha sonra desikatörde oda sıcaklığında korunmuştur. İşlem sonunda farklı kalınlık ve gözenek büyüklüğüne sahip iki farklı kollajen sünger elde edilmiştir (Şekil 3.1). Dondurma sıcaklığının gözenek boyutuna ve sünger yapısına etkileri bilindiğinden bu deneyler iki ayrı sıcaklıkta yapılmıştır. İnce kollajen sünger yapılar için -80°C 'de dondurma işlemi gerçekleştirilirken kalın sünger yapılarda bu sıcaklık -20°C olarak tutulmuştur.



Şekil 3.1. Kollajen iskele üretimi

3.1.2. Kollajen ve Kollajen+ Kondroitin Sülfat İskelelerin Üretimi

Kollajen (Col) ve Kollajen+kondroitin sülfat (ColCS), asetik asit (%0.5, ağırlık/hacim) içerisinde çözündükten sonra 12 kuyucuklu kaplara dökülerek -80°C'de dondurulmuştur. Donan çözeltiler vakum altında 8 saat boyunca liyofilize edilerek süngerler elde edilmiştir. Elde edilen süngerler kullanılabildiği kadar oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklanmıştır.

3.1.3. Kollajen ve Kollajen+ Kondroitin Sülfat İskelelerin Çapraz Bağlanması

Liyofilizasyon sonrası elde edilen süngerlere farklı çapraz bağlama yöntemleri (temelde dehidrotermal ve glutaraldehit) uygulanmıştır. Bu yöntemler birlikte ve ayrı ayrı olarak uygulanmış ve elde edilen süngerlerin özellikleri üzerine etkileri kıyaslanmıştır. *In situ* degradasyon sonucuna göre hangi yöntemin iyi olduğuna karar verilmiştir.

Dehidrotermal (DHT) çapraz bağlama: Kollajen süngerler 150°C 'de vakum altında 24 saat bekletilerek çapraz bağlanmaları sağlanmıştır.

Glutaraldehit (Glu) ile çapraz bağlama: Kollajen süngerler %1 glutaraldehit (Sigma Aldrich, USA) ile çapraz bağlanmıştır. Buhar yöntemi ve çözeltiye batırma yöntemleri uygulanmıştır.

Dehidrotermal/glutaraldehit çapraz bağlama: Liyofilize olmuş kollajen süngerlere dehidrotermal çapraz bağlama işleminin ardından glutaraldehit buharı uygulanmıştır. Hazırlanan kollajen sünger yapılarının hazırlanış koşulları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kollajen iskelelerin hazırlama koşulları

Kod	Kompozisyon (Asetik asit içinde hazırlanmış)	Çapraz Bağlama Yöntemi
UXLCol	%0.5 kollajen	Çapraz bağlanmamış
DHTCol	%0.5 kollajen	DHT
GluCol	%0.5 kollajen	Glu
DHTGluCol	%0.5 kollajen	DHT+Glu
UXLColCS	%0.5 Collagen+ Kondroitin Sülfat (98:2)	Çapraz bağlanmamış
DHTColCS	0.5% Collagen+ Kondroitin Sülfat (98:2)	DHT
GluColCS	0.5% Collagen+ Kondroitin Sülfat (98:2)	Glu
DHTGluColCS	0.5% Collagen+ Kondroitin Sülfat (98:2)	DHT+ Glu

3.1.4. Sodyum Karboksimetil Selüloz (NaCMC) İskelelerin Üretimi

NaCMC (Fluka, İsviçre) çeşitli konsantrasyonlarda (%1 - %5, ağırlık/hacim) distile su içerisinde çözüldükten sonra çözeltiler 40°C'ye ısıtılıp manyetik karıştırıcı üzerinde %1 epiklorohidrin çapraz bağlayıcısı eklenerek 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltiler 12 gözlü plakalar içerisine dökülüp, -20°C veya -80°C'de 1 gece dondurularak bekletildikten sonra liyofilize (Labconco Freezone Freeze-drier sistemi, ABD) edilmiştir. Elde edilen süngerler ayrıca 140°C'de ve 3 saat boyunca dehidrotermal yöntemi ile çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanan süngerler kullanılabildiği kadar oda sıcaklığında desikatör içerisinde muhafaza edilmiştir. Hazırlanan NaCMC iskele yapılarının kompozisyonu ve hazırlanış şartları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Hazırlanan NaCMC iskele yapılarının kompozisyonu ve hazırlanma koşulları

Kod	Kompozisyon	Çapraz Bağlama Yöntemi
UXLNaCMC80-1	%1 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
UXLNaCMC80-2.5	%2.5 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
UXLNaCMC80-5	%5 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
EPNaCMC80-1	%1 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	1% epiklorohidrin (EP)
EPNaCMC80-2.5	%2.5 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	1% EP
EPNaCMC80-5	%5 NaCMC -80°C'de dondurulmuş	1% EP
UXLNaCMC20-1	%1 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
UXLNaCMC20-2.5	%2.5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
UXLNaCMC20-5	%5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	Çapraz bağısız
EPNaCMC20-1	%1 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP
EPNaCMC20-2.5	%2.5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP
EPNaCMC20-5	%5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP
XLNaCMC20-1	%1 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP+ DHT
XLNaCMC20-2.5	%2.5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP+ DHT
XLNaCMC20-5	%5 NaCMC -20°C'de dondurulmuş	1% EP+ DHT

3.1.5. NaCMC ve Kollajen ile Çift Katmanlı İskelelerin Üretilmesi

Ön çalışmalarda yapılan deneyler %5'lik olarak hazırlanan NaCMC iskelelerin düzgün gözenekli ve diğerlerine göre daha iyi mekanik dayanımda olduğunu gösterdiği için, çift katmanlı yapıların oluşturulmasında bu süngerler kullanılmıştır.

Çift katmanlı yapıların oluşturulmasında NaCMC çözeltisi (2 mL, %5 ağırlık/hacim) daha önce bahsedildiği gibi epiklorohidrin (20 µL %1 hacim/hacim) ile çapraz bağlanmıştır. Col ya da ColCS süngerleri DHT ve Glu ile çapraz bağlandıktan sonra çapraz bağlanan NaCMC çözeltilerinin üzerine konulmuştur. Bu yapı -20°C'de dondurulduktan sonra vakum altında kuruyana kadar liyofilize edilmiştir. Elde edilen çift katmanlı süngerler, dayanıklılığı artırmak ve daha sıkı bağlanmaları amacıyla tekrar DHT yöntemi ile 140°C'de 3 saat boyunca çapraz bağlanmıştır. Çift katmanlı yapılar kullanılabildiği kadar oda sıcaklığında desikatörde saklanmıştır. Çift katmanlı iskelelerin hazırlanma koşulları Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Çift katmanlı iskelelerin hazırlanma koşulları

Kod	Kompozisyon	Çapraz Bağlama Yöntemi
BLCol	XLNaCMC20-5+ DHTGluCol	NaCMC: 1% EP+ DHT Col: DHT+ Glu
BLColCS	XLNaCMC20-5+ DHTGluColCS	NaCMC: 1% EP+ DHT ColCS: DHT+ Glu

3.2. İskelelerin Karakterizasyonu

3.2.1. Sünger Kalınlığı

Dehidrotermal yöntem ile çapraz bağlama yapılan kollajen süngerlerin kalınlığı 0.1 µm hassasiyetteki mikrometre (Erste Qualitat, Almanya) ile işlem öncesi ve sonrası ölçülmüştür. En az 3 en fazla 8 yerden ölçüm alınmış ve ortalama değerler bulunmuştur.

3.2.2. Süngerlerin Yüzey Gözenekliliği

Süngerlerin alt, üst ve yan yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir ve görüntülerdeki gözeneklilik NIH Image J programı ile analiz edilmiştir.

3.2.3. Kütle Gözenekliliği

Kütle gözenekliliği piknometre ile ölçülerek hesaplanmıştır. Hücreler için kullanılacak olan iskelelerde %90 gözeneklilik idealdir. Tüm çapraz bağlama yöntemleri içerisinde en yakın gözenekliliğe sahip olan yöntem belirlenmiştir.

3.2.4. *In situ* Bozunma Testi

Hazırlanan sünger yapıların bozunma profillerini çalışmak için önceden tartılan ve ağırlıkları belirlenen süngerler (NaCMC, Col ve ColCS süngerleri ve çift katmanlı süngerler) 37°C'de PBS (10 mM pH 7.4) içinde inkübe edildikten sonra belli zaman aralıklarında (1., 3., 7., 10., ve 14. günlerde) distile su ile 3 kere yıkandıktan sonra -20°C'de (NaCMC süngerleri ve çift katmanlı süngerler) ya da -80°C'de (Col ve ColCS süngerleri) dondurulmuştur. Örnekler vakum altında liyofilize edildikten sonra tartılmıştır. Süngerlerin bozunmaları ağırlık kaybından gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. Kollajenaz Enzimi ile *In situ* Bozunma Testi

Enzimatik bozunma analizi için Col ve ColCS iskelelerinin ağırlıkları ölçülmüş ve örnekler daha sonra 37°C'de 3 saat süreyle kollajenaz tip-II enzimi içeren çözelti (0,1 mg/mL steril PBS içinde pH 7.4) ile işleme tabi tutulmuştur. Örnekler belli aralıklarla distile su ile 3 kez yıkandıktan sonra -80°C'de dondurulmuştur. Ardından liyofilize edilerek ağırlık kaybı gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Geriye kalan ağırlık aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$\text{Kalan ağırlık (\%)} = \frac{W_0 - W_d}{W_d} \times 100$$

Bu eşitlikte W_0 : ilk ağırlık, W_d : enzim uygulaması sonrasında ölçülen ağırlıktır.

3.2.6. NaCMC İskelelerin Su Tutma Kapasitesi

Önceden tartılmış NaCMC iskelelerinin su tutma kapasitelerini ölçmek için iskeleler 37°C'de 24 saat boyunca PBS (6 mL, 10mM, pH 7.4) içerisinde inkübe edilmiştir. İskelelerin üzerindeki fazla su, kurutma kağıdı yardımıyla dikkatlice alındıktan sonra ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. İskelelerin su içerikleri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$SI (\%) = \frac{I_A - K_A}{I_A} \times 100$$

Bu eşitlikte, SI (%): Su İçeriği (%; ağırlık/ağırlık); I_A : Islak Ağırlık; ve K_A : Kuru Ağırlıktır.

3.2.7. Kollajen Saflığının Belirlenmesi (SDS-PAGE ile)

Kollajen saflığının belirlenmesi için sodyum dodesilsülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır. Bu amaç için, kollajen çözeltisi (20 µL, %0.2 ağırlık/hacim 0.15 M asetik asit içerisinde çözülmüş) merkaptolanol (20 µL) ile karıştırılarak 95°C'de 3 dakika denatüre edilmiştir. Elde edilen çözelti (20 µL) SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (ayırma jeli: %10 akrilamid/bisakrilamid, yükleme jeli: %4.2 akrilamid4/bisakrilamid). Örnekler 30 mA'de 2.5 saat yürütüldükten sonra bir gece boyunca %0.2 (ağırlık/hacim) Coomassie blue boyası içinde bırakılmış ve ertesi gün boya giderici çözelti (Su:Metanol:Asetik asit hacim olarak 4:5:1 oranında) ortamına bırakılarak arka plan boyaların yıkanması sağlanmıştır. Kollajene özel bantlar yıkama sonrasında beyaz ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.8. Mekanik Testler

Hazırlanan gözenekli iskelelere basma gerilimi uygulanmış, Elastisite Modülü ve basma dayanımı hesaplanmıştır. Basma deneyi çok küçük örneklerde bile kullanılabilir. İskelelerin basma altında güçleri 100 N yük (Stable Micro Systems Lloyd LRX 5K Lloyd Instruments Limited, UK) ve 10 mm/min yer değiştirme hızı uygulanarak ölçülmüştür. Her farklı örnek için en az 5 test yapılmıştır. Süngerlerin Elastisite Modülü (E^*) Harley ve ark. (2007)'nin belirttiği yöntemde 'Gerilme-Deformasyon' eğrisinin tanjant veya sekand eğimi olarak ve aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Elastisite Modülü } (E^*, \text{ Pascal}) = \text{Normal Gerilme (Pascal)} / \text{Deformasyon } (\%)$$

3.2.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Liyofilize edilen iskelelerden alınan yatay ve dikey kesitler karbon batlar üzerine yapıştırılarak üstleri vakum altında püskürtmeli cihazda (Hummer VII, Anatech, ABD) altın ile kaplandıktan sonra SEM (Nano-eye Mini-SEM, Saint-Tech, South Korea) mikrografı alınmıştır.

3.2.10. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Dehidrotermal ve etilen oksit uygulamaları sonrasında çapraz bağlanma seviyesinin ve kollajen denatürasyonunun belirlenmesi amacıyla FTIR (Perkin Elmer, İngiltere) spektroskopisi kullanılmıştır.

3.3. İskelelerin Sterilizasyonu

En uygun sterilizasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla her bir örnek farklı sterilizasyon yöntemlerine tabi tutulmuştur:

Etilen oksit sterilizasyonu: Üretimden sonra, örnekler yarı geçirgen torbalarla paketlenmiştir. Bağlı nemin %70 olduğu ortamda 8 saat boyunca 55°C'de %100 etilen oksite maruz bırakılmıştır (Axis-60, Kordon Tıp, Türkiye). Sterilizasyondan sonra etilen oksit kalıntılarını arındırmak amacıyla 120 dakika atmosfer basıncında 40°C'deki sıcak hava akımı ile havalandırılmıştır. En az 72 saat havalandırıldıktan sonra kullanılabilecek kadar plastik torbalarda saklanmıştır.

%70 etil alkol sterilizasyonu: *in vitro* çalışmalardan önce her bir örnek %70 etil alkol içerisinde +4°C'de bir gece bekletildikten sonra 2 kere steril PBS (Ca^{+} - Mg^{+} içermeyen) ile yıkanmıştır. Ardından süngerlerin her bir yüzü 1 saat UV ile sterilize edilmiştir.

3.4. Hücre Kültürü

E.Ü. Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarları stoklarında mevcut olan yetişkin primer epidermal insan keratinositlerinin (HS2, HUKUK, Ankara) ve deri fibroblastlarının (Detroit 551, HÜKÜK, Ankara) çoğaltılması ve kültürü yapılmıştır.

3.4.1. Keratinosit ve Fibroblast Hücre Hatlarının Kültürü

Keratinosit kültürü için kullanılan besi ortamı: %90 DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium–Ham's nutrient mixture F12, Lonza, ABD), %10 FBS (Fetal sığır serumu, Biochrom, Almanya), %1 L-glutamin (Biochrom, Almanya) ve %0.1 gentamisin (Gibco, İngiltere) dir. Tüm çalışmalarda pasaj numarası 4-12 arasındaki keratinosit hücreleri kullanılmıştır. Fibroblast kültürü için kullanılan besi ortamı: %90 EMEM (Eagle's Minimum Essential with L-glutamine, Merck, Almanya), %10 FBS (Fetal sığır serumu, Biochrom, Almanya), %1 sodyum pruvat (Biochrom, Almanya) ve %0.1 gentamisin (Gibco, İngiltere) dir. Tüm çalışmalarda pasaj numarası 2-8 arasındaki fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kültürü rutin olarak laboratuvarında uygulanan aseptik kültüre alma koşullarında (37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde) yapılmıştır. Hücrelerin besi ortamları iki günde bir değiştirilmiş, hücreler kültür kabının yüzeyini %80 – 85 oranında kapladıklarında tripsin/EDTA (% 0,05 / % 0,2 PBS içinde) (Gibco, İngiltere) çözeltisi kullanılarak pasajları yapılmıştır.

Çift tabakalı iskelede ko-kültürde kullanılacak besi ortamı fibroblast kültürü için kullanılan besi ortamı (EMEM) olduğundan, keratinosit hücrelerinin bu ortama uyum sağlamaları amacıyla hücreler EMEM ortamında üç pasaj kültüre edildikten sonra iskelelerin üzerine ekilmiştir. Keratinosit hücrelerinin olağan kültüründe kullanılan DMEM-F12 ortamı ile EMEM ortamında kültürleri sırasında üreme davranışlarında fark olup olmadığının saptanması amacıyla iskele ekiminden önce her iki ortamda üreme kinetikleri incelenip karşılaştırılmıştır.

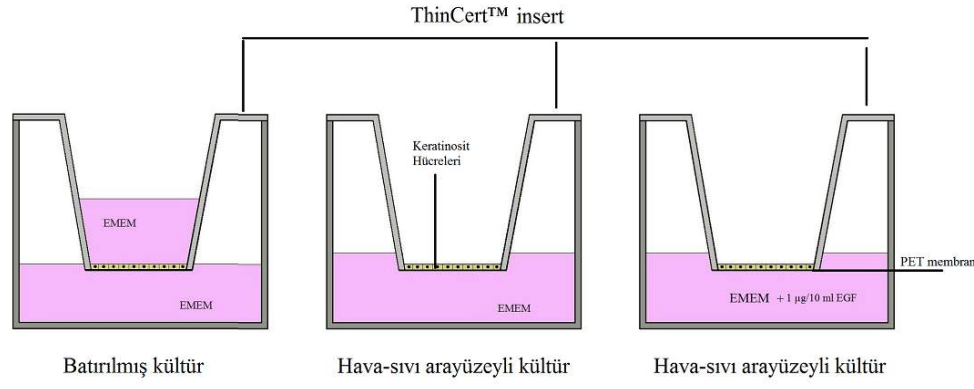
3.4.2. Hücre Sayısı Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Hücre sayıları belirlenirken MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT hücrelerin mitokondriyal enzim aktivitesini belirleyen kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerin mitokondriyal enzim aktiviteleri sayesinde sarı tetrazolyum tuzu 3-[4,5-dimetilliyazol-2-yl] 2,5 difenil tetrazolium bromür, mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Yeterli sayıya kadar çoğaltılan hücreler tripsin/EDTA (ağırlıkça %0,05) çözeltisi ile süspansiyon hale getirilmiştir. Kütlece %0,4 derişiminde Trypan blue çözeltisi eklenerek hücre sayımı yapılmış ardından 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Kültür iki saat 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) inkübasyona bırakılmış, 2 saat sonra her bir göze 100 µL %10 MTT (Sigma, Almanya) içeren taze kültür ortamı ilave edilmiştir. Ardından kültür 3 saat 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmış, bekleme süresi sonunda MTT çözeltisi pipetle uzaklaştırılmıştır. Hücre plaklarının her gözüne 100 µL DMSO (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek hücrelerin içerisindeki MTT'nin mitokondriyal enzimlerle etkileşimi sonucu ortaya çıkan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Spektrofotometre (SpektraMax, 190, VersaMax, ABD) ile 570-690 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve absorbans-hücre sayısı ilişkisi grafiğe çevrilmiştir.

3.4.3. Keratinosit Hücrelerinin ThinCert™ İnsertleri Üzerinde Kültüre Edilmesi

ThinCert™ (Greiner Bio-one, Almanya) hücre kültürü insertleri keratinosit hücrelerinin kültür koşullarının optimize edilmesi amacıyla kullanılmıştır. 1x10⁵ hücre/mL HS2 hücresi insertlerin membranı üzerine ekilmiştir. Farklı kültür yöntemleri denenerek hücre proliferasyonun en çok olduğu yöntem seçilerek bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Yöntemler kısaca Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

- 1) Batırılmış kültür (EMEM ortamı)
- 2) Hava-sıvı arayüzeyi kültürü (EMEM ortamı)
- 3) Hava-sıvı arayüzeyi kültürü (10 ng/mL EGF (Sigma, Almanya) eklenmiş EMEM ortamı)



Şekil 3.2. Keratinosit hücrelerinin ThinCert™ insertleri üzerine kültüre edilmesi

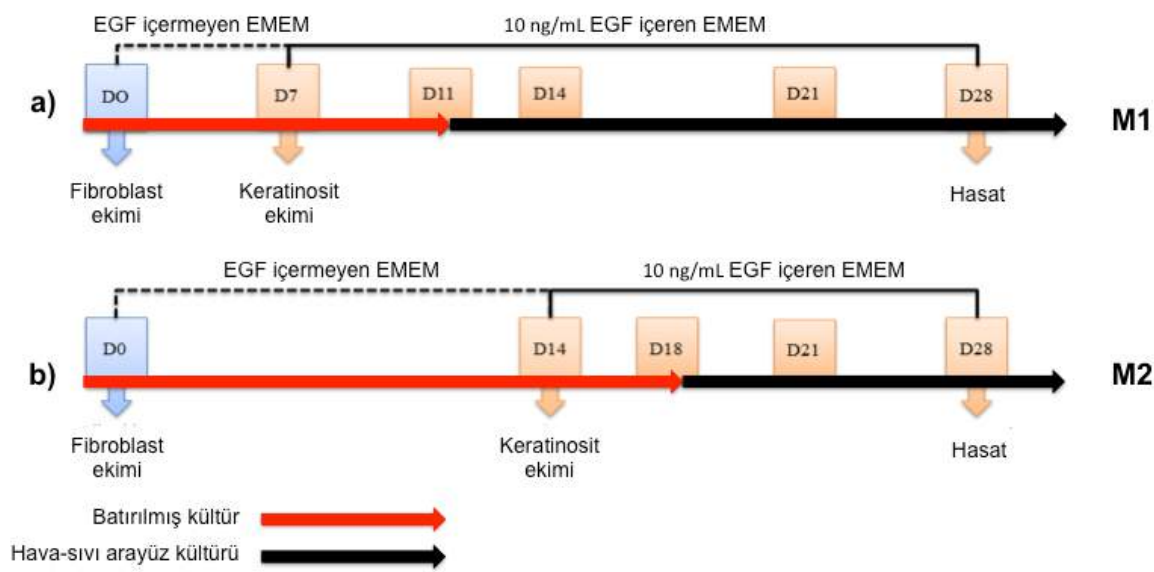
Şekil 3.2'de de görüldüğü üzere batırılmış kültürde insertlerin üzerindeki hücreler tamamen besi ortamı ile kaplanırken; hava-sıvı ara yüzeyindeki kültürlerde ise insert membranlara ekili hücrelerin üzerinde besi ortamı bulunmamaktadır. Bu durumda besin alış-verişi sadece altta bulunan ortamdan sağlanmaktadır.

3.4.4. Fibroblast Hücrelerinin NaCMC İskeleler Üzerinde Kültüre Edilmesi

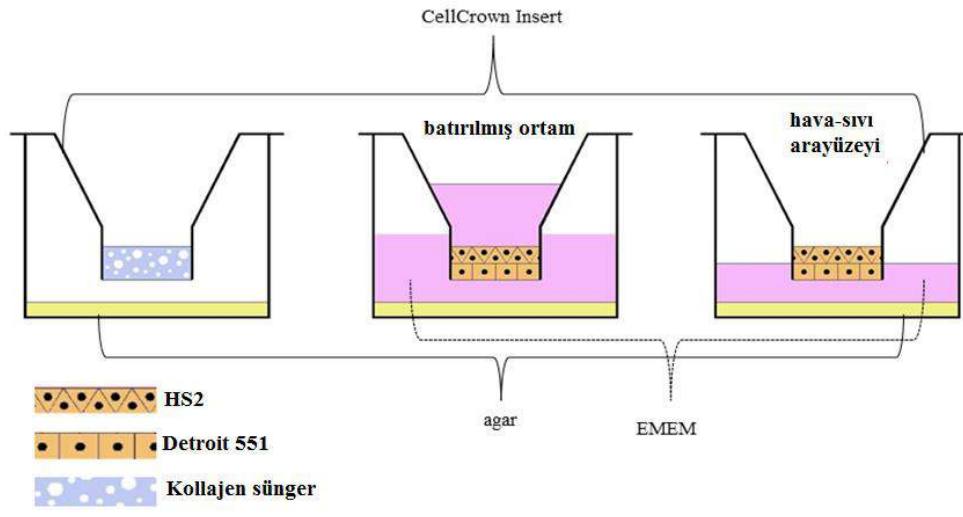
Hücrelerin iskele yerine polistren yüzeye tutunmalarını engellemek amacıyla yüzey %2'lik agar (Sigma, Almanya) ile kaplanmıştır. Sterilize edilmiş NaCMC süngerler agar kaplı kültür kaplarına yerleştirilerek 2 saat büyütme ortamı ile şartlandırılmıştır. Bu sürenin sonunda sünger içindeki fazla besiyeri steril gazlı beze emdirilerek sünger içine 5×10^5 hücre/mL konsantrasyonda 0,5 kaç mL fibroblast ekilmiştir. Hücre tutunması için bir saat 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) bekletildikten sonra süngerin üzerini tamamen kaplayacak kadar besi ortamı ilave edilmiştir.

3.4.5. CellCrown™ İnsertler Üzerine Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Farklı Özellikteki Kollajen Süngerlerde Ko-Kültürü

İki tip hücrenin ko-kültür üretim koşullarının optimize edilmesi amacıyla alt katman olarak büyük gözenekli kollajen sünger kullanılmış ve üzerine fibroblast hücreleri kültüre edilmiştir. Çalışmalar iki farklı kültür sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). İki yöntem arasında hücre ekim günlerinde fark vardır; böylece ko-kültür yapılırken iki farklı hücre tipinin birlikte ne kadar süre kültüre edileceği tespit edilmiştir. Hücre kültür plaklarının yüzeyi %2'lik agar (Sigma, Almanya) ile kaplanmıştır. Bu sayede hücrelerin kollajen sünger yerine polistren yüzeye tutunmaları önlenmiştir. Steril CellCrown™ (Scaffdex, Finlandiya) insert içine büyük gözenekli kollajen sünger yerleştirilmiştir. 2 cm çapındaki sünger üzerine 0,5 mL 1×10^5 hücre/mL fibroblast ekilmiştir. M1 olarak organize edilen sistemde 7 gün kültüre edilen fibroblastların üzerine 0,5 mL 1×10^6 hücre/mL keratinosit ekilmiştir. M2 olarak organize edilen sistemde ise 14 gün boyunca kültüre edilmiş fibroblastların üzerine 0,5 mL 1×10^6 hücre/mL keratinosit ekilmiştir. Fibroblast hücreleri EMEM ortamında kültüre edilmişlerdir. Daha önceden EMEM ortamına alıştırmış olan keratinosit hücreleri için de EMEM ortamı kullanılmıştır. Önceki çalışmada 10 ng/mL EGF (Sigma, Almanya) ve hava-sıvı ara yüzeyinin olumlu etkileri tespit edildiğinden keratinositli ko-kültür boyunca bu koşullar uygulanmıştır (Şekil 3.4). Her iki kültür işlemi 28 gün boyunca devam ettirilmiştir.



Şekil 3.3. CellCrown™ insertler üzerine iki farklı yöntemle ko-kültür. a) Fibroblastların 7 gün boyunca kültüre edilmesi (M1), b) Fibroblastların 14 gün boyunca kültüre edilmesi (M2)



Şekil 3.4. CellCrown™ insertler üzerinde fibroblast ve keratinosit hücrelerinin ko-kültürü

3.4.6. Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Çift Katmanlı İskelede Ko-Kültürü

ThinCert™ ve CellCrown™ ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda gerekli koşullar belirlenmiş ve bu bilgiler ışığında çift katmanlı iskelede ko-kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin iskele yerine polistren yüzeye tutunmalarını engellemek amacıyla yüzey %2'lik agar (Sigma, Almanya) ile kaplanmıştır. Sterilize edilmiş çift katmanlı iskeleler agar kaplı kültür kaplarına yerleştirilerek 2 saat büyütme ortamı ile şartlandırılmıştır. Bu sürenin sonunda iskele ters çevrilerek alt katmanı oluşturan NaCMC süngere 0,5 mL 5×10^5 hücre/mL fibroblast ekilmiş, bir saat 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) bekletildikten sonra süngerin üzerini tamamen kaplayacak kadar ortam ilave edilmiştir. Yerçekimi etkisiyle hücrelerin kollajen iskeleye göçünü engellemek amacıyla 24 saat sonra iskele ters çevrilmiştir. 4. günde üst katmanı oluşturan kollajen süngere 0,5 mL 1×10^6 hücre/mL keratinosit ekilmiş, bir saat 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde bekletildikten sonra süngerin üzerini tamamen kaplayacak kadar 10 ng/mL EGF (Sigma, Almanya) içeren ortam ilave edilmiştir. 7. gün itibarıyla çift katmanlı iskelenin kültivasyonuna hava-sıvı ara yüzeyinde devam edilmiştir. Kültivasyon toplam 14 gün sürmüştür.

3.5. Üç Boyutlu Kültürlerde Yapılan Analizler ve Hücre Karakterizasyonu

3.5.1. Hücre Büyüme Kinetiği

Kullanılan keratinosit ve fibroblast hücrelerinin farklı gözeneklilikteki kollajen süngerler üzerinde, fibroblast hücrelerinin NaCMC süngerler üzerinde kültürü sonrası hücre canlılığı MTT testi ile 7 gün boyunca incelenmiştir.

3.5.2. Mikroskopik ve Histolojik İncelemeler

Hücrelerin oluşturdukları yapıların histolojik olarak değerlendirilmesi iskele içinde hücre dağılımı ve fenotiplerin analizi açısından önemlidir. Öncelikle oluşturulan 3 boyutlu yapıların hücre konfigürasyonu ve histolojik özelliklerinin (benzerlikleri, farklılıkları, hücre ölümü olup olmadığı) incelenmesi açısından rutin hematoksilen-eozin boyamaları ve keratinositlere özel immunohistokimyasal boyamalar Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. Hücre morfolojisini incelemek için hematoksilen ve eozin boyaması

İskelelerin üzerindeki besi ortamı çekilerek iskeleler agarsız pleyte alınmış ve 3 defa PBS ile yıkanmıştır. %4'lük paraformaldehit (Affymetrix, ABD) ile 2 saat tespit edildikten sonra kullanılabilecek kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de sodyum azid (AppliChem, Almanya) içeren PBS içerisinde bekletilmiştir. Kriyomikrotom (Leica CM1100, Almanya) ile frontal olarak alınan 5 mikrometrelilik kesitler mikroskop lamı üzerine aktararak hematoksilen-eozin boyaması ile hücre morfolojileri analiz edilmiştir. Bunun için öncelikle kesitler 37°C 'de 15 dakika PBS içerisinde bekletilmiş ve bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Kesitler 5 dakika distile su içinde bekletildikten sonra 10 dakika hematoksilende (Atom Scientific LTD, İngiltere) bekletilmiştir. 5 dakika akan su altında yıkanarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Asit-alkole batırılıp çıkartıldıktan sonra tekrar 5 dakika akan su altında yıkanmıştır. 1,5 dakika eozinde (Surgipath, Almanya) bekletmenin ardından 5 dakika akan su altında yıkanarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Parlaklaştırma amacıyla sırasıyla %80 ve %95 etanolde birer dakika bekletilmiştir. Ksilene geçilmeden önce kesitlerin iyice kuruması sağlanmıştır. Son olarak da 10 dakika ksilende bekletmenin ardından kapatma amacıyla kullanılan entellan damlatılıp lamelle kapatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurumasının ardından kesitler ters ışık mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.5.2.2. İmmünohistokimyasal boyama

İskelelerin üzerinde hücreler kùltive edildikten sonra kùltürün içeriğinin incelenmesi için insan deri hücrelerinde eksprese edilen bazı proteinlerin belirlenmesi amacıyla boyama yapılmıştır. Keratinosit hücrelerinin kollajen sünger üzerindeki çoğalmalarını göstermek amacıyla monoklonal sitokeratin-8 (erken keratinosit belirteci) (Abcam, İngiltere) ve sitokeratin-14 (geç dönem ve tabakalanan keratinosit belirteci) (Abcam, İngiltere) kullanılmıştır. Fibroblast hücrelerinin NaCMC sünger üzerinde çoğalmalarını göstermek amacıyla kollajen tip-I (Abcam, İngiltere) ve kollajen tip-III (Abcam, İngiltere) kullanılmıştır. Çift tabaka kùltürlerde ise, üst tabaka için transglutaminaz (Abcam, İngiltere), dermis epidermis bağlantısının varlığını göstermek için laminin (Abcam, İngiltere) ve alt tabaka için de kollajen tip I (Abcam, İngiltere) ve kollajen tip III (Abcam, İngiltere) monoklonal antikoları kullanılmıştır. İskeleler üzerindeki hücre kùltürleri 2 defa PBS ile yıkanmış ve %4'lük paraformaldehit (Affymetrix, ABD) ile 2 saat sabitlendikten sonra boyanana kadar +4°C'de sodyum azid (AppliChem, Almanya) içeren PBS içerisinde bekletilmiştir. Kriyomikrotom (Leica, CM1100, Almanya) ile frontal olarak alınan 5 mikrometrelik kesitler lama aktarılmış ve 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ertesi gün kesitler işaretleme kalem (pap pen, Invitrogen, ABD) ile çizildikten sonra 37°C'de 30 dakika PBS içerisinde bekletilmiş ve bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Ardından oda sıcaklığına çıkarılan kesitler önce 10 dakika H₂O₂ ile muamele edilmiş, daha sonra PBS içinde 5 dakika bekletilmiştir ve bu işlem 3 defa tekrar (3x5') edilmiştir. Kesitler 1 saat bloklama çözeltisinde bekletildikten sonra PBS ile (3x5') muamele edilmiştir. Kesitlere primer antikolar uygulanmış ve 2 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. PBS ile tekrar (3x5') muamele edilmiştir. Biotin ile 30 dakika bekletildikten sonra PBS ile (3x5') muamele edilmiştir. Streptavidin ile 30 dakika bekletildikten sonra PBS ile (3x5') muamele edilmiştir. 3 dakika DAB (3,3'diaminobenzidine) çözeltisinde bekletildikten sonra 5 dakika PBS ile 3 kere 5 dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır. Son olarak kesitler 2,5 dakika Mayers çözeltisinde bekletilip 3 kere 5 dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır. Gömme ortamı (mounting medium) eklenerek kapama gerçekleştirilmiş ve kesitler kuruduktan sonra ters ışık mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.5.2.3. DAPI boyama

İskelelerin üzerindeki besi ortamı çekilerek iskeleler agarsız pleyte alınmış ve 3 defa PBS ile yıkanmıştır. %4'lük paraformaldehit (Affymetrix, ABD) ile 2 saat tespit edildikten sonra kullanılabilece kadar +4°C'de sodyum azid (AppliChem, Almanya) içeren PBS içerisinde bekletilmiştir. Kriyomikrotom ile frontal olarak 5 mikrometrelik kesitler alınmış ve kesitlerin üzeri DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) kaplama çözeltisi (Vector Laboratories, ABD) ile kaplanmıştır. Kuruyana kadar karanlıkta bekletildikten sonra floresan mikroskobu (Zeiss, Almanya) ile yakın mor ötesi filtrede (330-385 nm) incelenmiştir.

3.5.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Yüzeyler üzerinde kùltüre edilen hücrelerin morfolojileri SEM incelemeleri ile gösterilmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonra görüntüleme işlemleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (IYTE)'den hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama sırasında izlenen protokol şu şekildedir: İskelelerin üzerindeki üst sıvı çekildikten sonra 30 sn serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye) ile yıkanmıştır. 30 dk 4°C'de tampon A'da (0,6 mL glutaraldehit (Merck, Almanya) ile 2,4 mL sodyum kakodilat (Sigma, Almanya) karışım çözeltisi) bekletilmiştir. 30 dk 4°C'de tampon B'de (0,21 gr sükröz (Merck, Almanya) içeren 3 mL sodyum kakodilat çözeltisi içerisinde) bekletilmiştir. 30 dk 4°C'de tampon C'de (%2 osmiyum tetroksit (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren 0,1 M sodyum kakodilat içerisinde) bekletilmiştir. Örnekler 2 tekrarlı 5'er dk distile su ile yıkamanın ardından alkol serisinde 5'er dk bekletilerek susuzlaştırılmıştır. Alkol serisi sırasıyla % 35, %50, %70, %85, %95 ve 2 x %100 etil alkol yıkaması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler 5 dk heksametildisilazan (HMDS) (Aldrich, Almanya) içinde bekletilmiştir. HMDS çekildikten sonra örnekler kurumaları için çeker ocak içinde, oda sıcaklığında, kuruma bittikten sonra SEM incelemesine kadar desikatörde bekletilmiştir. IYTE'de örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilmiş ve 200 A° kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir.

3.5.4. Büyüme Faktörü Ekspresyonlarının ELISA Kitleri ile Belirlenmesi

Çift katmanlı kollajen ve NaCMC iskeleler üzerinde kùltüre edilen hücrelerinin beklenen büyüme faktörlerini salgılayıp salgılamadıklarının belirlenmesi için toplanan kùltür üst sıvısı örneklerinde VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü) ve IL-8 (interlökin-8) varlığının belirlenmesi amacıyla ticari ELISA kitleri kullanılmıştır.

3.5.4.1. VEGF Ekspresyonunun Belirlenmesi

Çift katmanlı iskeleler üzerinde kùltüre edilen hücrelerin VEGF ekspresyonlarının belirlenmesi için ticari ELISA kiti (Invitrogen, KHG0111, ABD) kullanılmıştır. Kit sandviç ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Anti-insan VEGF antikoru kaplı 96-gözlü plakların kullanılacak kuyucuklarına 50 µL inkübasyon tamponu eklenmiştir. Konsantrasyonları 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 188

pg/mL, 93.8 pg/mL, 46.9 pg/mL, 23.4 pg/mL ve 0 pg/mL olan standart VEGF çözeltilerinden 100'er µL ve standart dilüsyon tamponu ile seyreltilmiş (1:1) kültürden toplanan süpernatant örneklerinden 100'er µL eklenerek 3 tekrarlı deney deseni oluşturulmuştur. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler yıkama çözeltisi ile 4 defa yıkanmış, kuyucuklara biotinle konjuge edilmiş insan VEGF solüsyonundan 100 µL eklenmiş, bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örnekler yıkama çözeltisi ile 4 defa yıkandıktan sonra üzerlerine streptavidin-HRP çalışma çözeltisinden 100 µL eklenmiştir ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler tekrar yıkama çözeltisi ile 4 defa yıkanmıştır. Örnekler üzerine kromojen çözeltisinden 100 µL eklenip 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildikten sonra durdurma çözeltisinden 100 µL eklenmiş ve daha sonra spektrofotometrede (SpektraMax 190, VersaMax, ABD) 450 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Standartlardan elde edilen denkleme göre VEGF içeriği bilinmeyen kültür üst sıvısı örneklerinin VEGF konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.5.4.2. bFGF Ekspresyonunun Belirlenmesi

Çift katmanlı iskeleler üzerinde kültüre edilen hücrelerin bFGF ekspresyonlarının belirlenmesi için ticari ELISA kiti (BioLegend, 434309, ABD) kullanılmıştır. Kit sandviç ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kullanılan 96-gözlü pleyt anti-insan bFGF antikoru ile kaplıdır. Plakların kuyucukları 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. Standartların ekleneceği gözlere 50 µL besi ortamı ve örneklerin ekleneceği gözlere 50 µL Tampon A'dan eklenmiştir. Konsantrasyonları 800 pg/mL, 400 pg/mL, 200 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12.5 pg/mL ve 0 pg/mL olan standart çözeltilerden 50'şer µL ve kültürden toplanan kültür üst sıvısı örneklerinden 50'şer µL eklenerek 3 tekrarlı deney deseni oluşturulmuştur. 2 saat oda sıcaklığında 300 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilen plaka kuyucukları 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. İnsan bFGF antikor tespit çözeltisinden her bir kuyucuğa 100'er µL eklenmiştir. Bir saat oda sıcaklığında 300 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilen plaka kuyucukları 1X yıkama tamponu ile tekrar 4 kere yıkanmıştır. Örnekler üzerine avidin-HRP çözeltisinden 100'er µL eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında 300 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Plakların gözleri 1X yıkama tamponu ile 5 kere daha yıkandıktan sonra substrat çözeltisinden 100'er µL eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sırada bFGF içeren gözlerde mavi renk gözlemlenmiştir. Her göze 100 µL durdurma çözeltisi eklendiğinde rengin maviden sarıya döndüğü gözlemlenmiştir. Plaklar spektrofotometrede (SpektraMax 190, VersaMax, ABD) 450 nm'de okutulmuştur. Standartlardan elde edilen denkleme göre bFGF içeriği bilinmeyen kültür üst sıvısı örneklerinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.5.4.3. IL-8 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Çift katmanlı iskeleler üzerinde kültüre edilen hücrelerin IL-8 ekspresyonunun belirlenmesi için ticari ELISA kiti (BioLegend, 431507, ABD) kullanılmıştır. Kit sandviç ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Plakların kuyucukları 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. Kuyucuklara 50 µL Tampon A çözeltisinden eklenmiştir. Konsantrasyonları 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL ve 0 pg/mL olan standart IL-8 çözeltilerinden 50'şer µL ve kültürden toplanan kültür üst sıvısı örneklerinden 50'şer µL kuyucuklara eklenerek 3 tekrarlı deney deseni oluşturulmuştur. 2 saat oda sıcaklığında 200 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilen plakların kuyucukları 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. İnsan IL-8 tespit antikor çözeltisinden her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında 200 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilen pleytin gözleri 1X yıkama tamponu ile 4 kere daha yıkanmıştır. Örnekler üzerine avidin-HRP çözeltisinden 100'er µL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında 200 rpm'deki çalkalayıcıda inkübe edilen plakların kuyucukları 1X yıkama tamponu ile 5 kere yıkanmıştır. Örnekler üzerine daha sonra substrat çözeltisinden 100 µL eklenerek 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sırada IL-8 içeren gözlerde mavi renk gözlemlenmiştir. Her göze 100 µL durdurma solüsyonu eklendiğinde rengin maviden sarıya döndüğü gözlemlenmiştir. Plaklar spektrofotometrede (SpektraMax 190, VersaMax, ABD) 450 nm'de okutulmuştur. Standartlardan elde edilen denkleme göre IL-8 içeriği bilinmeyen süpernatant örneklerinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Students's t testi ile istatistiksel analizler yapılmış ve p değerinin 0.05'ten küçük ya da eşit olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

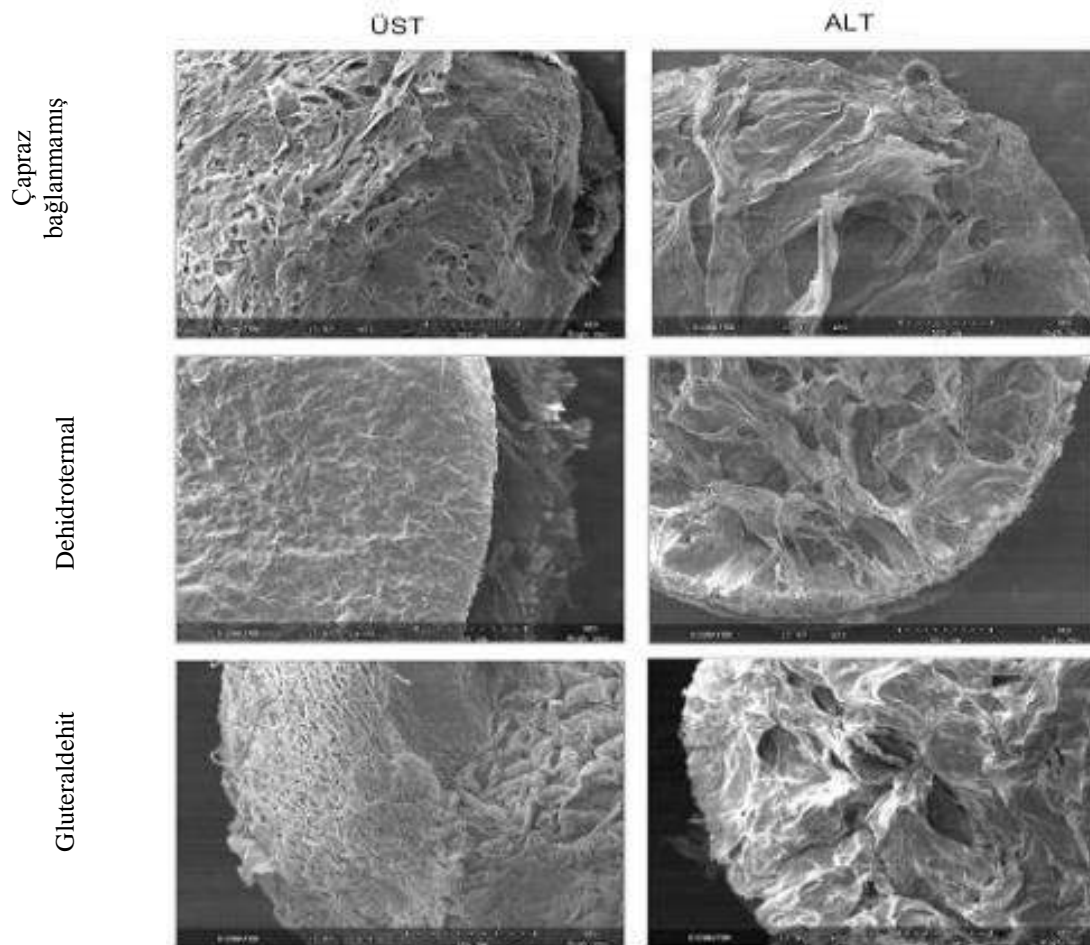
4.1. İskelelerin Karakterizasyonu

4.1.1. İskelelerin Stereomikroskopi ve SEM Fotoğrafları

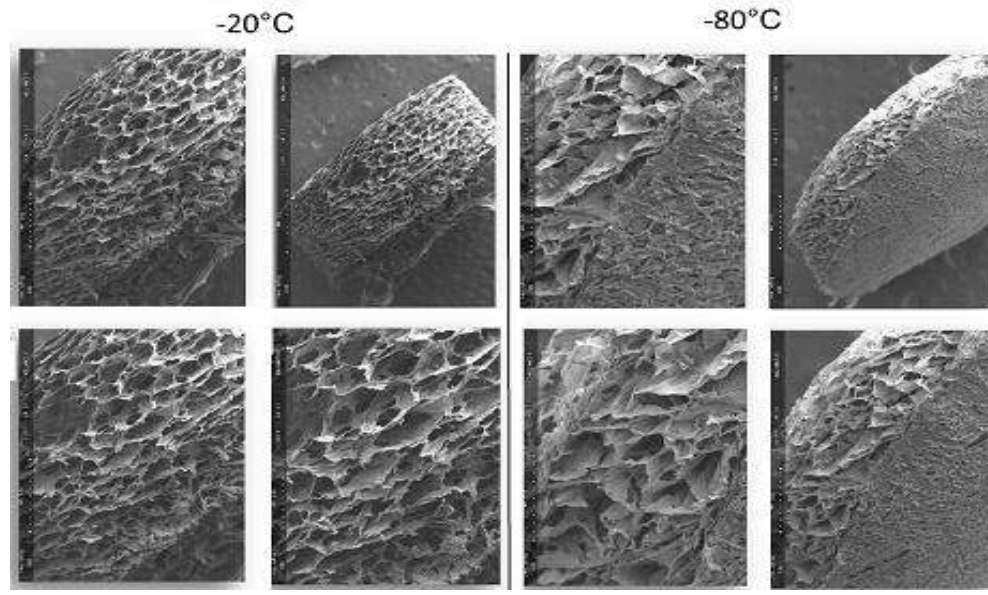
İskeleleri *in vitro* koşullarda denemeden önce hücre davranışında önemli bir etkiye sahip olan fiziksel özellikleri çalışılmıştır. Bu amaçla, tüm süngerlerin stereomikroskop ile morfolojileri ve SEM ile de yatay ve dikey kesitlerinin mikrografları alınarak iç yapıları incelenmiştir. Kollajen iskelelerde, büyük (ortalama 98 µm) ve küçük (ortalama 65 µm) gözenekli olmak üzere iki tip iskele üretilmiştir. İskelelerin gözenek büyüklüğü farklılığı, örneklerin dondurma sıcaklığının değiştirilmesi ile sağlanmıştır. Liyofilizasyondan önce -20°C'de dondurulan süngerler büyük gözenekli, -80°C'de dondurulan süngerler daha küçük gözenekli olarak elde edilmiştir (Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.). Yapılan analizler ile ileride NaCMC ile birlikte kullanılacak olan kollajen iskelenin optimum gözenek büyüklüğü, kalınlığı ve hücreler ile uyumu belirlenmiştir. İki farklı gözenek büyüklüğüne ve kalınlığına sahip kollajen sünger üretilmesinin amacı farklı gözenek büyüklüklerinin süngerlerin mekanik özelliklerine çok belirgin etkileri olması, küçük gözenekli yapıların büyük gözenekli yapıya oranla daha yüksek mekanik güce sahip olmasıdır. Deneme çalışmalarında da bunu sağlamak amacıyla farklı gözenek büyüklüğünde iskele üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Stereomikroskop ile çekilmiş büyük ve küçük gözenekli çapraz bağlı olmayan kollajen iskele görüntüleri (-20°C: büyük gözenekli: 98 µm), -80°C: küçük gözenekli: 65 µm))



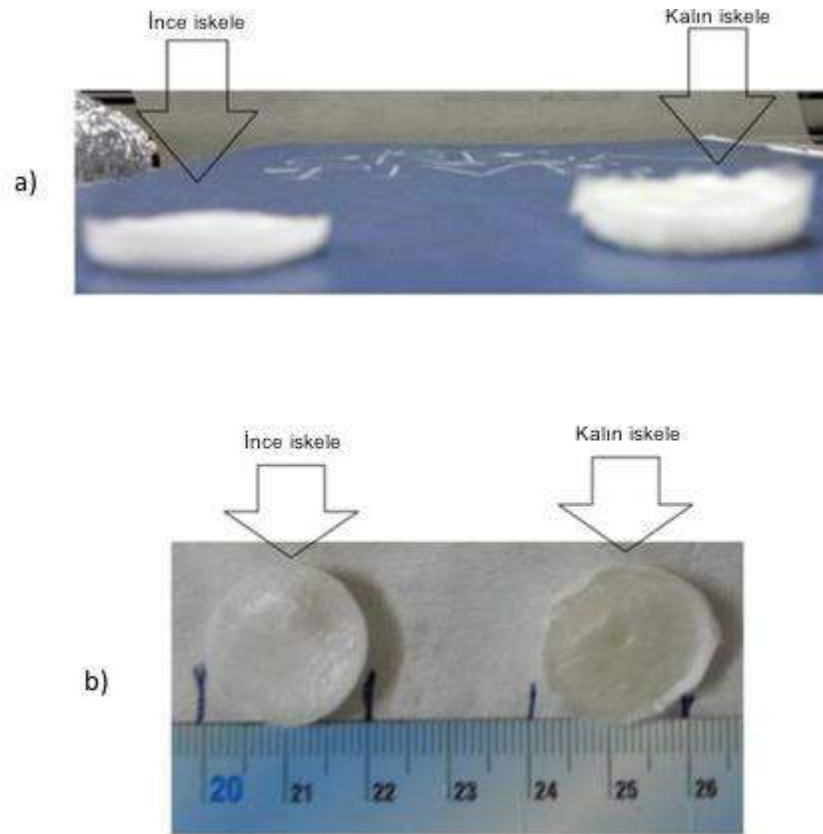
Şekil 4.2. Farklı çapraz bağlama yöntemleriyle üretilmiş, kollajen iskelelerin üst ve alt yüzeylerinin SEM görüntüleri (Dondurma sıcaklığı -20°C)



Şekil 4.3. Çapraz bağlanmamış kollajen iskelelerin SEM görüntüleri (-20°C: büyük gözenekli: 98 µm), -80°C: küçük gözenekli: 65 µm) .




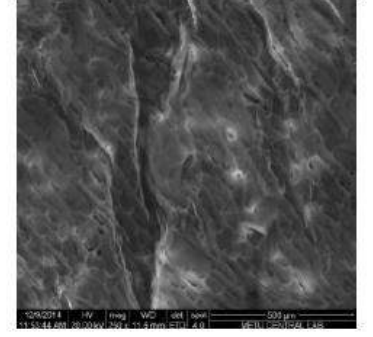
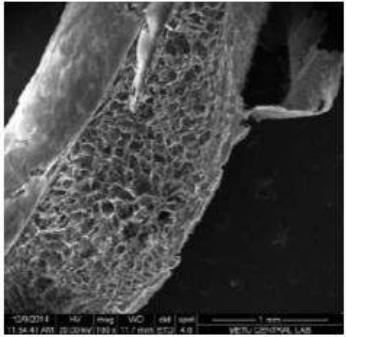
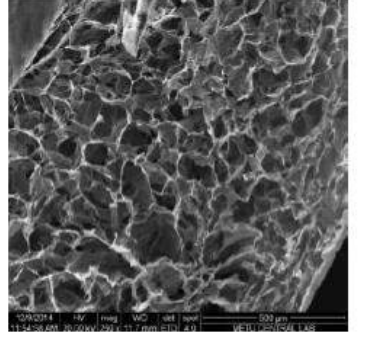
Şekil 4.2.de görüldüğü gibi, farklı çapraz bağlama yöntemleriyle üretilmiş olan kollajen iskelelerin alt ve üst yüzeylerinin SEM mikrografları birbirinden çok farklı değildir. Örneklerin yüzeylerinde ince bir tabaka gözlenmektedir. Örneklerin iç kısımlarının stereo- ve SEM mikrografları, gözeneklerin boyu ve birbirine bağlılığı hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.3). -20°C'de dondurularak hazırlanan iskelelerin gözenek büyüklük bölgesi 48-310 µm iken -80 °C'de dondurularak hazırlanan iskelelerin gözenek boyut bölgesi 21-190 µm ve ortalama gözenek boyutları da sırasıyla 98 µm ve 65 µm olarak bulunmuştur.

Epidermis yerine geçecek yapı, dermis yerine geçecek yapıya göre çok daha ince olmalıdır. Bu nedenle, ince bir epidermis tabakası üretilirken 1 ml kollajen çözeltisi (%0.5, w/v) kullanılırken kalın dermis tabakası için 3 kat fazla kollajen çözeltisi kullanılmıştır. Liyofilizasyon sonrası ince süngerlerin kalınlığı 1.6 ± 0.3 mm ve kalın süngerlerin kalınlığı 3.4 ± 0.3 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.4).




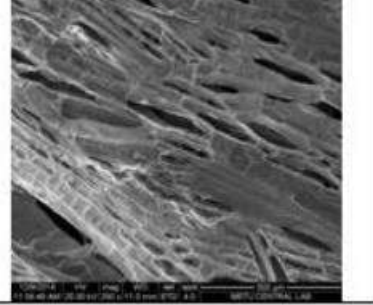
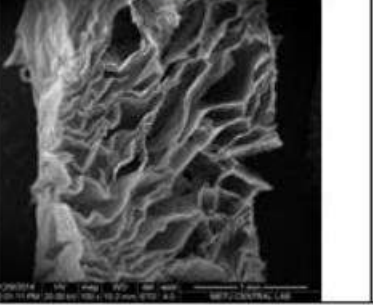
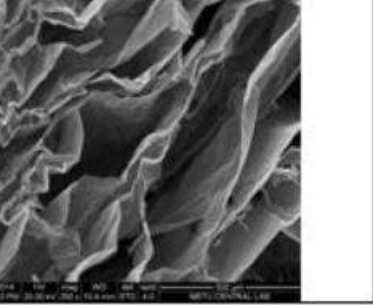


Şekil 4.4. Liyofilizasyon sonrasındaki kollajen iskeleler: a) iskele kalınlıkları, b) iskele çapları

-80°C'de dondurularak hazırlanan kollajen (Col) ve kollajen+kondroitin sülfat (ColCS) iskeleler, iki tabakalı deri modellerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu iskelelerin çapraz bağlama işlemi öncesi stereo- ve SEM mikrografları Şekil 4.5. ve Şekil 4.6 de verilmiştir. İskele kompozisyonuna kondroitin sülfat eklenmesi iskele morfolojisinde ve gözenek yapısında değişime neden olmuştur. Bu iskeleler, dehidrotermal ve glutaraldehit ile çapraz bağlama işlemi sonrasında iki tabakalı modellerde kullanılmıştır.

	Yüzey (2.25X)	Yüzey (8X)	Yan görünüşü (2.25X)
Stereo Resimleri			
	Yüzey (250X)	Dikey kesit (100X)	Dikey kesit (250X)
SEM Resimleri			

Şekil 4.5. Çapraz bağlanmamış kollajen iskelelerinin görünümü (UXLCol)

	Yüzey (2.25X)	Yüzey (8X)	Yan görünüşü (2.25X)
Stereo Resimleri			
	Yüzey (250X)	Dikey kesit (100X)	Dikey kesit (250X)
SEM Images			

Şekil 4.6. Çapraz bağlanmamış kollajen-kondroitin sülfat iskeleleri (UXLColCS)

NaCMC iskeleleri farklı konsantrasyondaki çözeltileri kullanılarak ve iki farklı sıcaklıkta dondurularak hazırlanmıştır. Şekil 4.7. çapraz bağlanmamış ve %1, %2,5 ve %5 derişimdeki çözeltileri kullanarak ve -20 derecede dondurularak liyofilize edilen hazırlanan örneklerin stereomikrografları ve SEM mikrograflarını göstermektedir. NaCMC derişimi değiştikçe, gözle de farkedilebileceği gibi gözenek büyüklüğü, dağılımı ve ve buna bağlı olarak örneklerin homojenliği ve sertlik özelliklerinde farklılıklar oluşmuştur. Derişimin artması ile örnekler daha homojen olmuş ve gözeneklerin birbiri ile bağlılığı artmıştır.

Aynı örneklerin epiklorohidrin ile çapraz bağlanması sonucu oluşan iskele yapılarının stereo fotoğrafları ve SEM mikrografları da örnekler arasındaki farkı göstermektedir (Şekil 4.8). Epiklorohidrin yapıya sağlamlık katmıştır. İskelelerin sulu ortamdaki dayanımları ve çözünme hızları daha sonraki bölümlerde verilecektir.










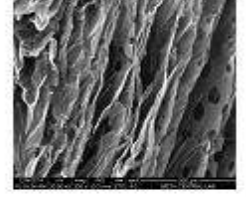
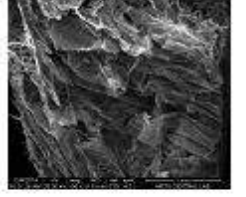
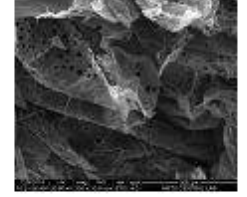
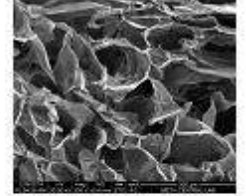
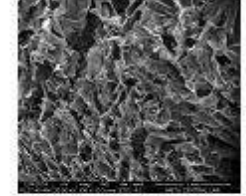
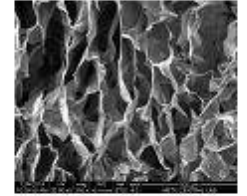
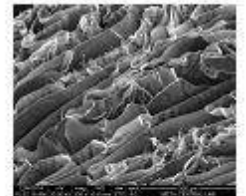
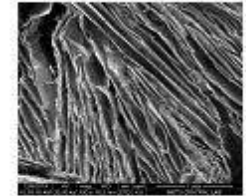
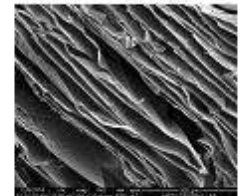
		Yüzey (2.25X)	Yüzey (8X)	Yan görünüşü (2.25X)
Stereo Resimleri	UXLNaCMC20-1			
	UXLNaCMC20-2.5			
	UXLNaCMC20-5			
SEM Resimleri		Yatay kesit (250X)	Dikey kesit (100X)	Dikey kesit (250 X)
	UXLNaCMC20-1			
	UXLNaCMC20-2.5			
UXLNaCMC20-5				

Şekil 4.7. -20°C'de dondurulmuş, çapraz bağlanmamış NaCMC iskeleleri

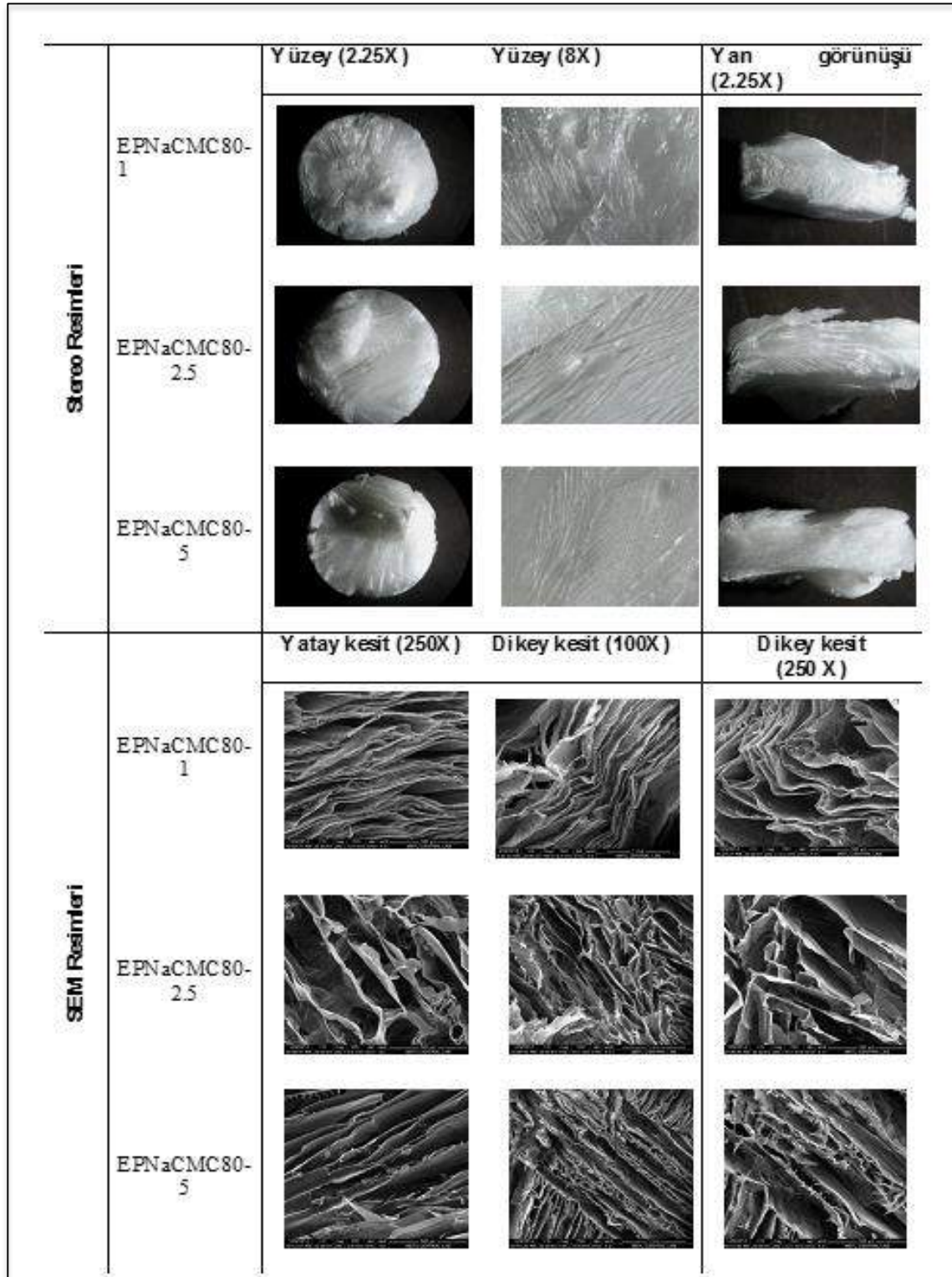
Stereo Resimleri		Yüzey (2.25X)	Yüzey (8X)	Yan görünüşü (2.25X)
	EPNaCMC20-1			
	EPNaCMC20-2.5			
	EPNaCMC20-5			
SEM Resimleri		Yatay kesit (250X)	Dikey kesit (100X)	Dikey Kesit (250 X)
	EPNaCMC20-1			
	EPNaCMC20-2.5			
	EPNaCMC20-5			

Şekil 4.8. %1 Epiklorohidrin ile çapraz bağlanan ve -20°C'de dondurulan NaCMC iskeleleri

Değişik derişimlerde %1, %2,5 ve %5 NaCMC kullanılarak ve -80°C'de dondurularak hazırlanan iskelelerinin stereo- ve SEM mikrografları Şekil 4.9. ve Şekil 4.10. da gösterilmiştir. Bu örneklerde derişimin artması sağlamlığı artırmakla birlikte hızlı soğutma ve dondurma işlemi bir tür faz ayırımına, katman oluşumuna ve gözenek yapısının bozulmasına neden olmuştur. Şekil 4.7. çapraz bağlanmamış ve Şekil 4.8 ise epiklorohidrin ile çapraz bağlanmış örnekleri göstermektedir. Çapraz bağlama işlemi, gözenek yapısında değişime neden olmamıştır ve örneklerin sağlamlılığı arttırmıştır.

		Yüzey (2.25X)	Yüzey (8X)	Yan görünüşü (2.25X)
Stereo Resimleri	UXLNaCMC80 -1			
	UXLNaCMC80 -2.5			
	UXLNaCMC80 -5			
		Yatay kesit (250X)	Dikey kesit (100X)	Dikey kesit (250 X)
SEM Resimleri	UXLNaCMC80 -1			
	UXLNaCMC80 -2.5			
	UXLNaCMC80 -5			

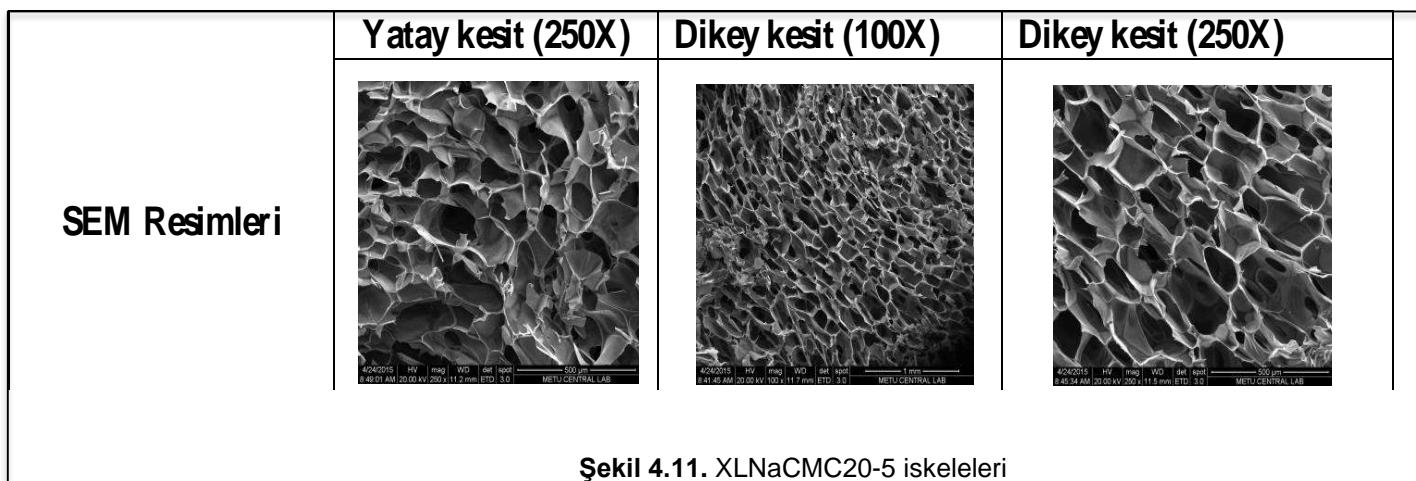
Şekil 4.9. -80°C'de dondurulan, çapraz bağlanmamış NaCMC iskeleleri



Şekil 4.10. -80°C'de dondurulan ve %1 epiklorohidrin ile çapraz bağlanan NaCMC iskeleleri

Stereo ve SEM mikrograflarda da görüldüğü gibi -80°C'de dondurulan NaCMC iskelelerde çok düşük sıcaklıkta dondurulmalarından kaynaklı olduğu düşünülen tabaka gibi yapılar gözlemlenmiştir.

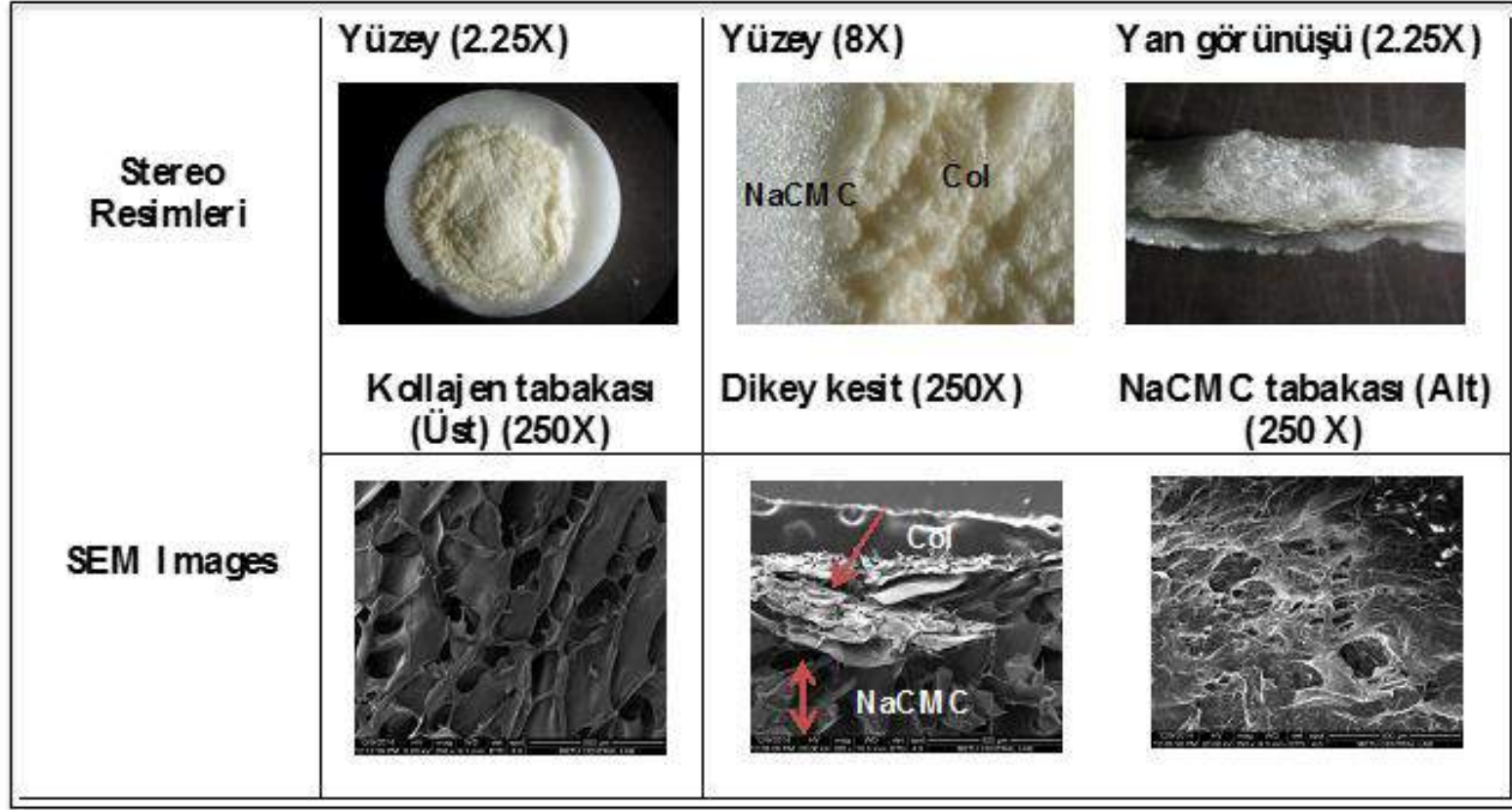
-20°C'de dondurulan NaCMC iskelelerde her derişimde gözenek oluşumu gözlenmiş ve XLNaCMC20-5 süngerlerinin gözeneklerinin birbiriyle bağlantılı ve diğer örneklere oldukça benzer boyutta olduğu görülmüştür. Deri dokusunun dermis tabakası epidermis tabakasına göre oldukça büyük gözenekli olduğu için, çalışmada -20°C'de dondurularak hazırlanan NaCMC süngerler ile dermis tabakası olarak kullanılmak için daha uygun bulunmuştur. Çapraz bağlanmamış veya epiklorohidrin (EP) ile çapraz bağlanmış iskeleler su içinde bekletildiğinde bir gün içinde çözündüğü için EPNaCMC20-5 örnekleri ayrıca dehidrotermal işleme tabii tutulmuştur. Dermis tabakası yerine kullanılmak üzere XLNaCMC20-5 süngerleri seçilmiştir (Şekil 4.11).



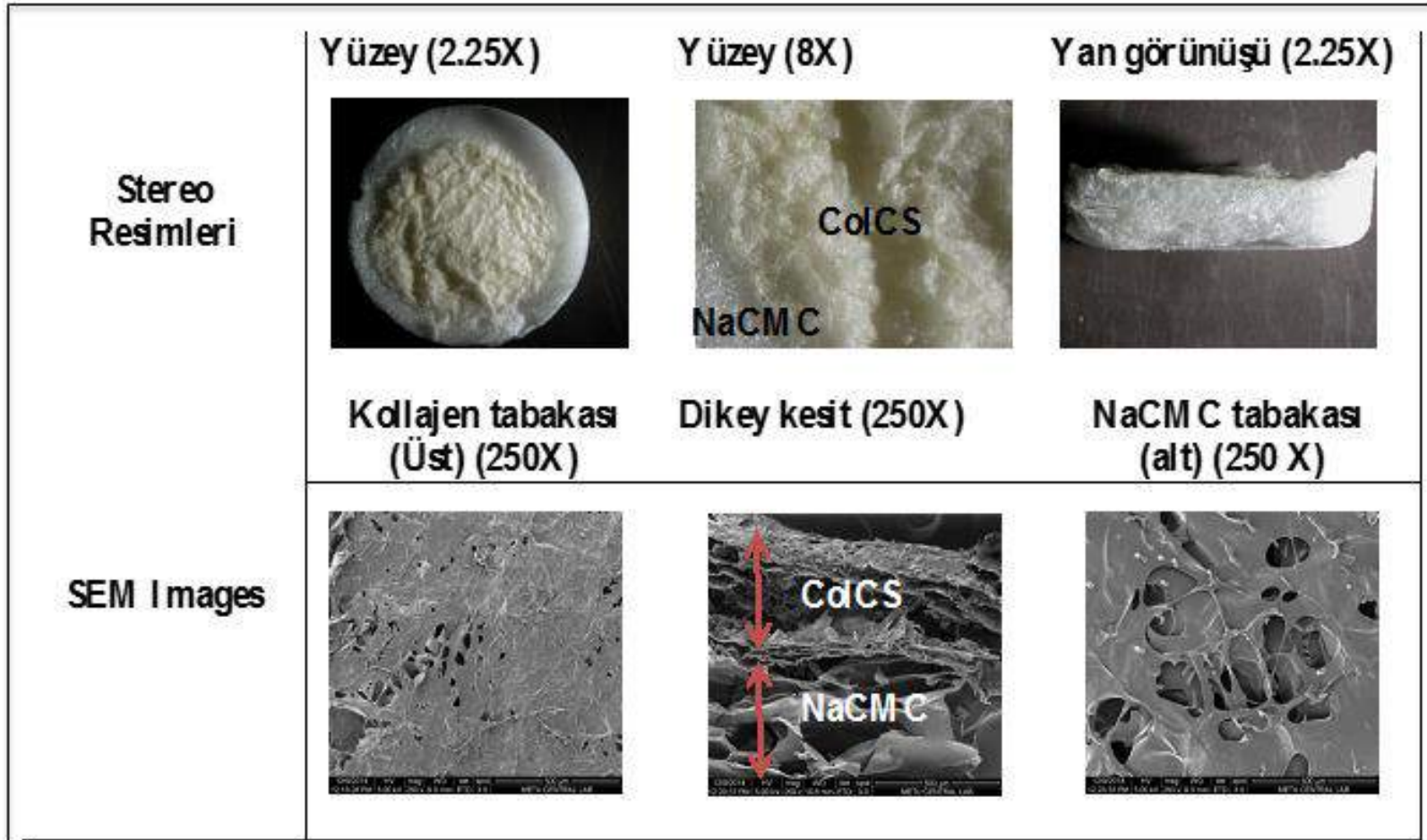
Şekil 4.11. XLNaCMC20-5 iskeleleri

Çift katmanlı yapıların oluşturulmasında DHTGluCol ve DHTGluColCS süngerleri ile EPNaCMC20-5 iskeleleri kullanılmıştır. Liyofilizasyon sonrasında birbirine bağlanan bu iki katman daha sonra DHT çapraz bağlama yöntemi ile 140°C'de 3 saat bekletilmiştir. Bu işlem iki tabakanın birbirine bağlanmasını sağlamıştır. *In situ* ve *in vitro* çalışmalar sırasında BLCol and BLColCS

çift katmanlı yapılarını oluşturan katmanların birbirinden ayrılmadığı gözlenmiştir. XLNaCMC20-5 ile DHTGluCol veya DHTGluColCS kullanılarak hazırlanan iki tabakalı (BL) yapıların stereo-ve SEM mikrografları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 de verilmiştir. Şekillerden de görüleceği gibi katmanlar birbiri içine geçmiştir ve sağlam bir biçimde bağlanmıştır.



Şekil 4.12 BLCOL iskeleleri



Şekil 4.13. BLCOLCS iskeleleri

4.1.5. İskelelerin Yoğunlukları

İskelelerin yoğunlukları (özkütle) gravimetrik yöntemle hesaplanmış ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Yapılar çok gözenekli olduğu için yoğunluklarının düşük olması doğaldır.

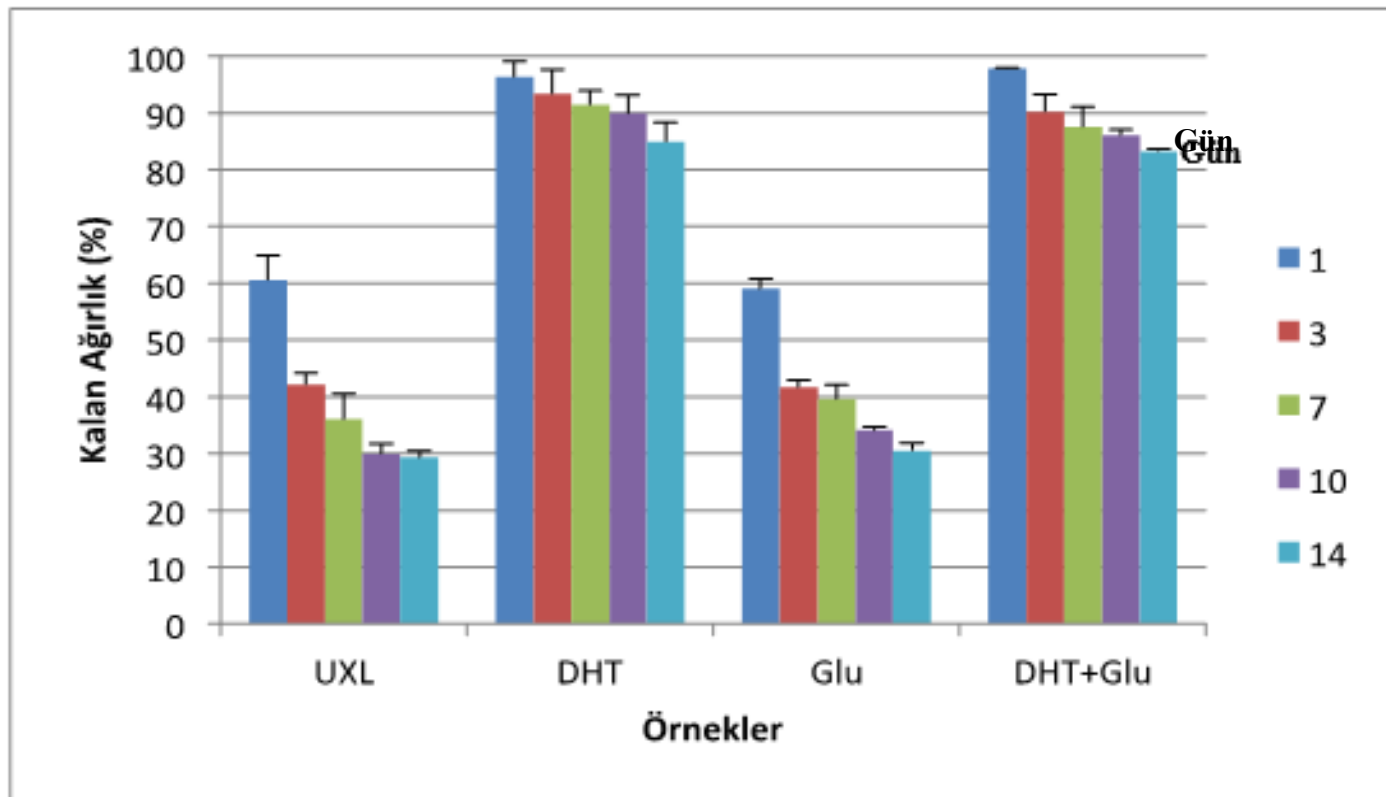
Tablo 4.1. NaCMC, Col ve ColCS iskelelerin yoğunlukları

Örnekler	Yoğunluk (g/cm ³)
UXLNaCMC20-1	0.0194± 0.0006
UXLNaCMC20-2.5	0.0332± 0.0008
UXLNaCMC20-5	0.0611± 0.0007
EPNaCMC20-1	0.0162± 0.0011
EPNaCMC20-2.5	0.0352± 0.0013
EPNaCMC20-5	0.0625± 0.0017
UXLNaCMC80-1	0.0183± 0.0009
UXLNaCMC80- 2.5	0.0348± 0.0015
UXLNaCMC80- 5	0.0607± 0.0017
EPNaCMC80-1	0.0169± 0.0016
EPNaCMC80-2.5	0.0363± 0.0010
EPNaCMC80-5	0.0649± 0.0017
UXLCol	0.0106± 0.0012
UXLColCS	0.0101± 0.0006

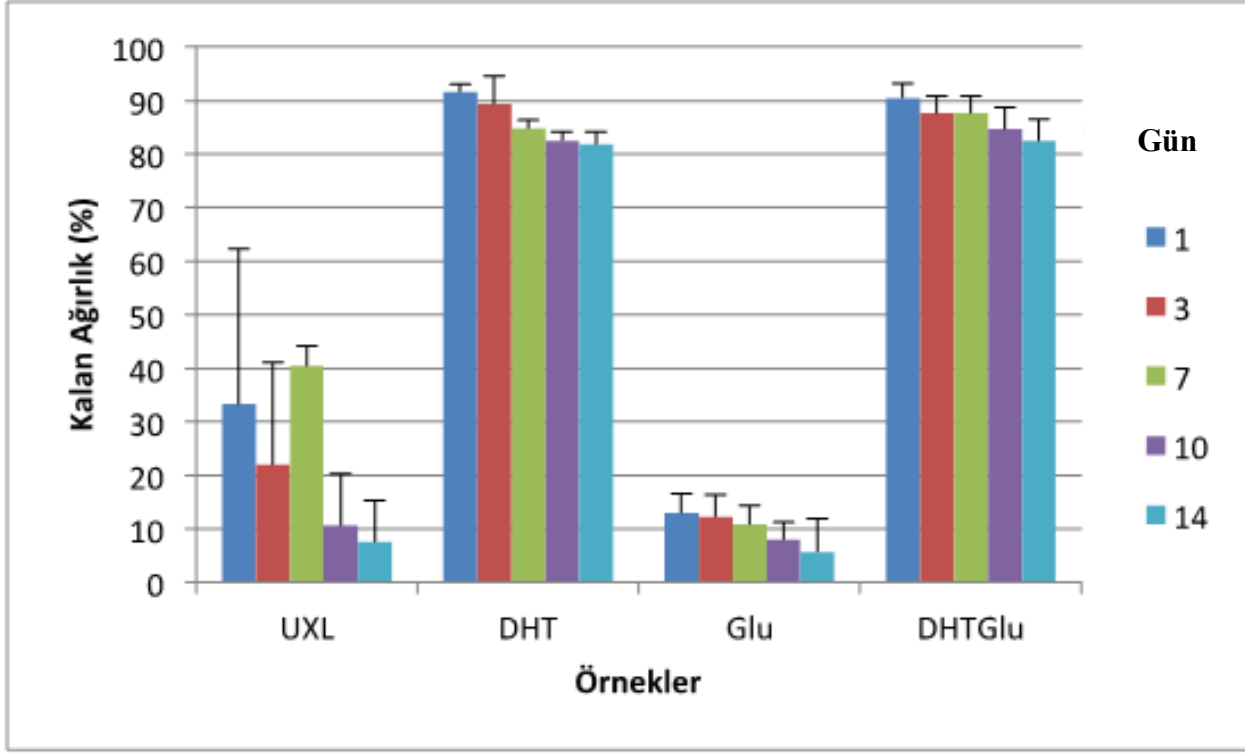
NaCMC iskelelerin yoğunluklarının konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı ve dondurma sıcaklığının yoğunluğu etkilemediği görülmüştür. Çapraz bağlanan iskelelerin yoğunlukları çapraz bağlanmayanlara oranla daha yüksek görünse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p \geq 0,05$). Aynı şekilde çapraz bağlanmamış olan UXLCol ve UXLColCS iskelelerin de yoğunlukları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p \geq 0,05$).

4.1.3. *In situ* Bozunma Testi

Malzemelerin biyolojik sistemde bozunma özelliklerini incelemek için *in situ* bozunma testi yapılmış ve örnekler 14 gün boyunca 37°C'de 10 mM PBS (pH 7.4) içinde tutularak bozunmaları gözlemlenmiştir. Dehidrotermal olarak çapraz bağlanan DHTCol, DHTGluCol, DHTColCS ve DHTGluColCS iskelelerin çapraz bağlanmayan ve Glu ile çapraz bağlanan örnekler göre daha iyi sonuç verdiği, daha dayanıklı olduğu ve 14 günün sonunda ağırlıklarının %80'ini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15). UXLCol, GluCol, UXLColCS ve GluColCS iskelelerin ise hızla bozundukları ve 14 günün sonunda kalan ağırlıklarının başlama ağırlıklarına göre önemli ölçüde (kabaca %50) azaldığı görülmüştür. Bu nedenle örneklerin kararlılığını sağlamak için ek çapraz bağlama yapılması gerekmiştir.

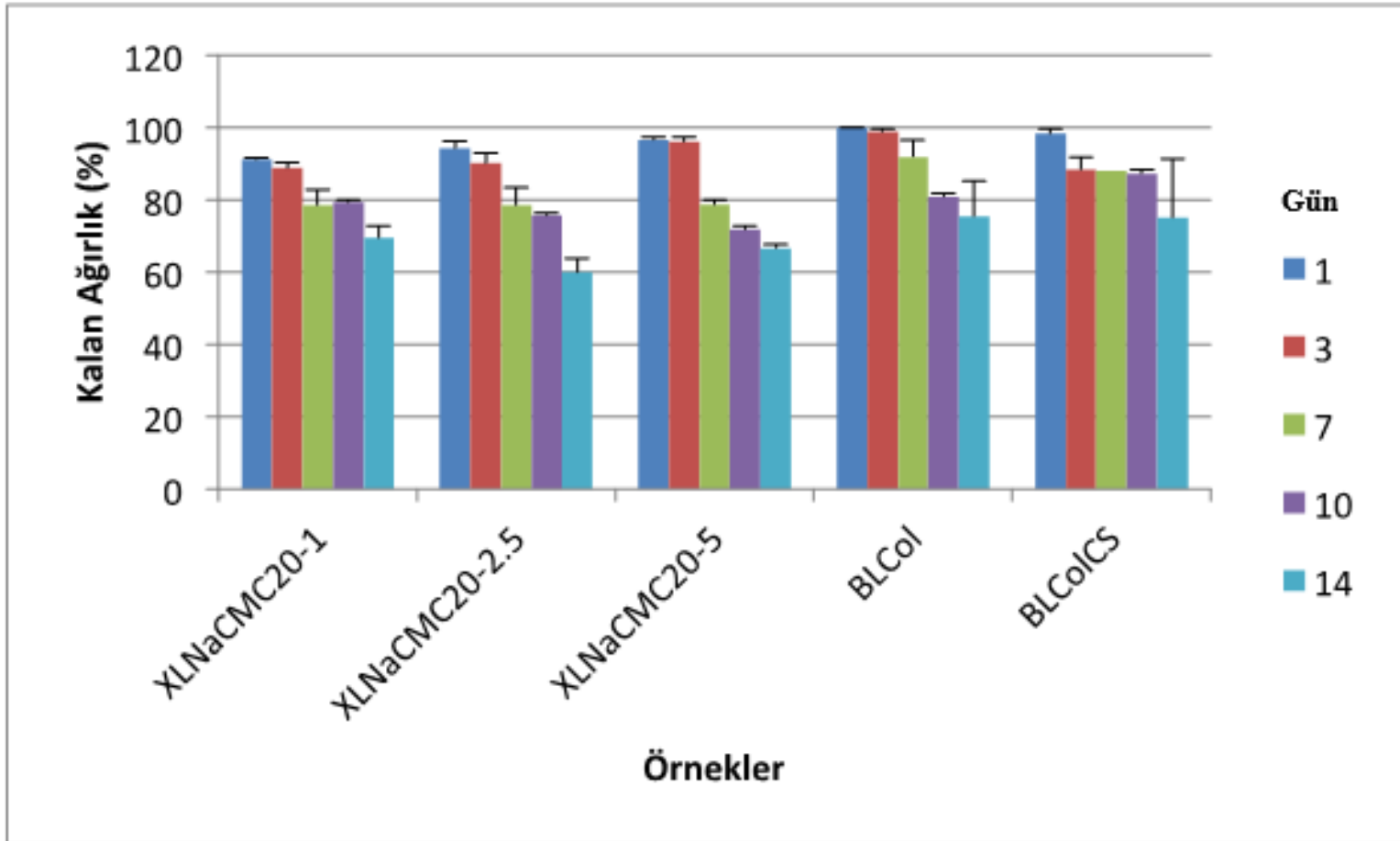


Şekil 4.14. Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış Kollajen iskelelerin *in situ* bozunma profilleri.



Şekil 4.15. Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış ColCS iskelerin *in situ* bozunma profilleri

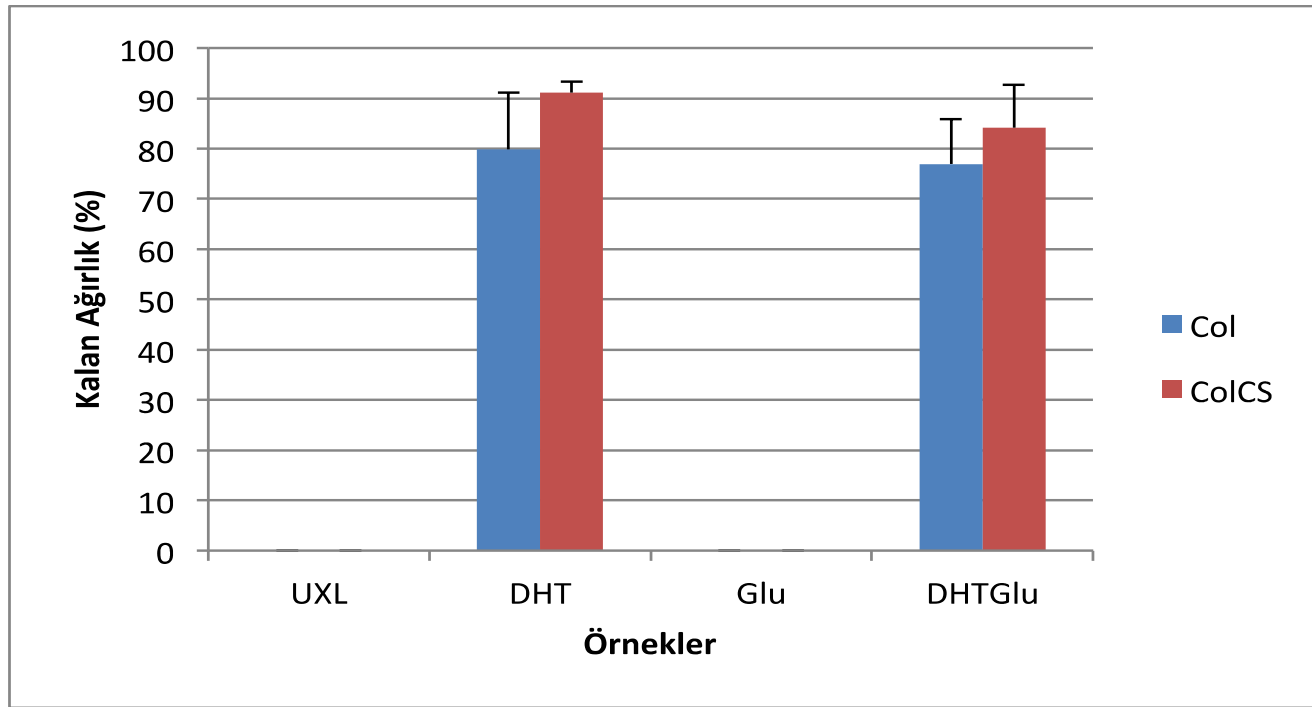
NaCMC iskelelerin 37°C'de *in situ* bozunma testinde UXLNaCMC süngerlerinin 1 saat içerisinde tamamen çözündüğü gözlenmiştir. EPNaCMC süngerlerinin UXLNaCMC süngerlerinden daha dayanıklı olduğu ancak bu süngerlerin de 1 gün içerisinde tamamen çözündüğü görülmüştür. Bu nedenle ek bir çapraz bağlama yöntemi olarak DHT kullanılmış ve bütün örnekler 140°C'de 3 saat boyunca çapraz bağlanmıştır. Sadece DHT ile çapraz bağlanan iskeleler de EPNaCMC iskeleler gibi 1 gün içinde çözülmüş ancak DHT ve %1 epiklorohidrin kullanılarak çapraz bağlanan örnekler 14 günlük test boyunca şekillerini korumuşlardır. Bu XLNaCMC iskeleleri PBS içinde 14 günlük inkübasyon sonunda başlangıç ağırlıklarının %65'ini korumuşlardır. XLNaCMC20-1, XLNaCMC20-2.5 ve XLNaCMC20-5 iskelelerin bozunmaları istatistiksel bir farklılık göstermemiştir ($p \geq 0,05$) (Şekil 4.18). Ancak çift katmanlı BLCol ve BLColCS iskelelerin tek katmanlı XLNaCMC iskelelerden daha dayanıklı olduğu ve 14 günün sonunda diğerlerine oranla önemli derecede ağırlıklarını korudukları gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Sonuç olarak; tek katmanlı yapıya DHTGluCol ve DHTGluColCS iskelelerin eklenmesi, çift katmanlı yapının daha dayanıklı olmasını sağlamıştır.



Şekil 4.16. NaCMC ve çift katmanlı iskelerin *in situ* bozunma profilleri

4.1.4. Kollajenaz Enzimi ile *In situ* Bozunma Testi

Kollajen (Col) ve kollajen sülfat (ColCS) iskelelerin kollajenaz enzimi tarafından bozunmaları incelenmiştir (Şekil 4.17). Çapraz bağlanmayan ve Glu ile çapraz bağlanan örneklerin inkübasyon sırasında tamamen bozunduğu görülmüştür. Ancak, DHTCol, DHTGluCol, DHTColCS ve DHTGluColCS iskelelerin 3 saat kollajenaz enzimi ile inkübasyonlarından sonra ağırlıklarının %80'ini koruduğu belirlenmiştir. DHT ve DHT+Glu çapraz bağlama yöntemleri ile Col ve ColCS süngerlerinin bozunmaları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p \geq 0,05$). Bu sonuçlara göre yapıya CS eklenmesinin örneklerin *in situ* ve enzimatik bozunma özelliklerinde bir değişiklik yapmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Col ve ColCS iskelelerin kollejenaz enzimi tarafından bozunma profilleri

4.1.5. NaCMC İskelelerin Su Tutma Kapasitesi

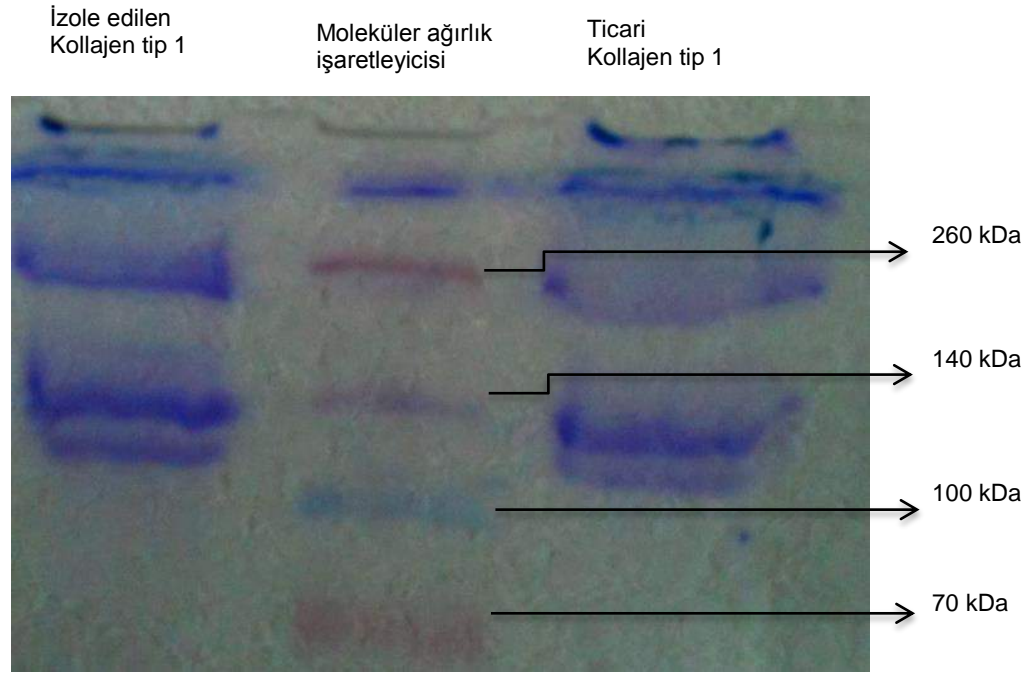
NaCMC iskelelerin su tutma kapasitelerini belirlemek için XLNaCMC iskeleleri 37°C'de PBS (pH 7.4) içinde 24 saat bekletilmiştir. Bütün XLNaCMC iskelelerin yapıları içerisinde yüksek miktarda su tuttuğu görülmüştür (%95'ten fazla). Ayrıca, başlangıçta kullanılan derişim oranının artması ile su tutma kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. NaCMC iskelelerin su tutma kapasiteleri

Örnek	XLNaCMC20-1	XLNaCMC20-2.5	XLNaCMC20-5
Su içeriği (%)	96.58 ± 0.23	97.53 ± 0.02	95.64 ± 0.01

4.1.6. Kollajen İskelelerin Saflığının Belirlenmesi (SDS-PAGE)

Kollajen tip 1, Sprague-Dawley sıçanlarının kuyruklarından izole edilmiştir. Proteinin saflığını ölçmek için SDS-PAGE analizi yapılmış ve sonuçlar ticari olarak satılan ve bu deney için izole edilen kollajen tip 1'in sonuçları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.18). Ortadaki sıra ticari moleküler ağırlık merdiveni (ladder) olup yukarıdan aşağıya 260 kDa, 140 kDa, 100 kDa, ve 70 kDa ağırlıktaki protein bantlarını içermektedir. İlk sıradaki bantlar bu çalışmada izole edilen kollajenin bantlarını, son sıradaki bantlar ise ticari Tip 1 kollajenin bantlarını göstermektedir. İzole edilen kollajen ve ticari olarak satılan kollajenin aynı bantlara sahip olması ve her ikisinde de başka hiç bir yerde bant bulunmaması nedeniyle izole edilen kollajenin saf Tip 1 kollajen olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.18. Sprague-Dawley sıçan kuyruğundan izole edilen kollajenin, moleküler ağırlık merdiveni ve ticari Tip 1 kollajenle SDS-PAGE sonuçlarının karşılaştırması

4.1.7. Mekanik testler

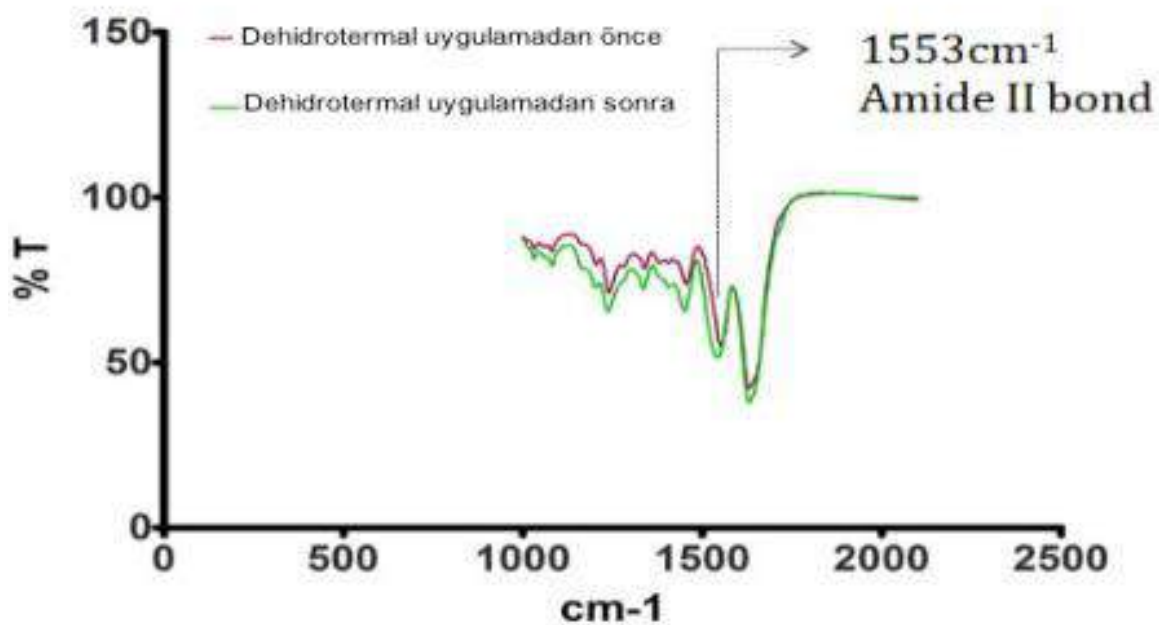
Kuru tek katmanlı yapı XLNaCMC20-5 ile, çift katmanlı BLCol ve BLColCS örneklerinin sıkıştırma yönünde güç uygulanması karşısında dayanımları 100 N güç uygulanarak ölçülmüştür (Tablo 4.4). Tabloda görüldüğü üzere çift katmanlı örneklerde tek katmanlıya oranla elastiklik modülünde bir artış gözlenmişse de bunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı hesaplanmıştır. Bu sebeple, tek katmanlı yapıya DHTGluCol ve DHTGluColCS süngerlerinin eklenmesi güçte herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı söylenebilir. Elastiklik modülü değerinin düşük olması örneklerin çok gözenekli ve çok yumuşak olmasının sonucudur.

Tablo 4.4. İskelelerin elastiklik modülü

Örnek	XLNaCMC20-5	BLCol	BLColCS
Elastiklik modülü (kPa)	377.05 ± 95.64	426.97 ± 157.78	523.92 ± 156.26

4.1.8. FT Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi

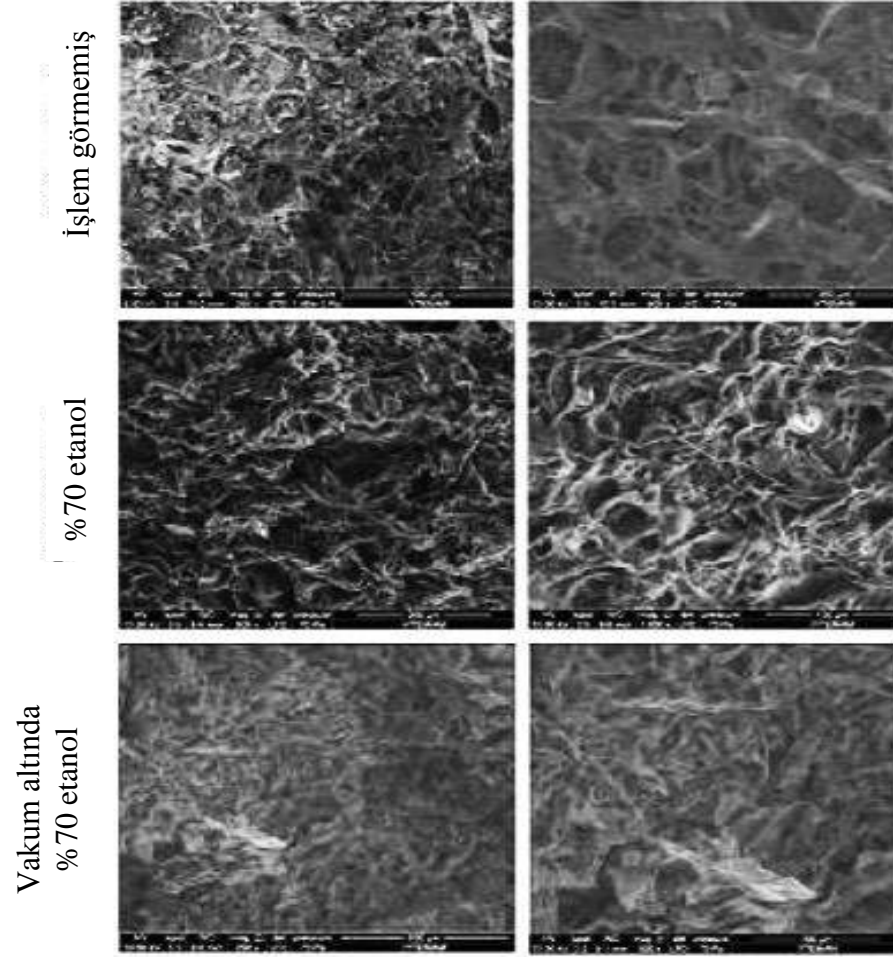
Dehidrotermal işlem sonrası çapraz bağların oluşumu FTIR spektroskopisinde 1553 cm^{-1} dalga boyunda görünen bant ile değerlendirilmiştir. Bu bantın genliği, kollajen içinde bulunan NH_2 'nin miktarıyla doğru orantılıdır. Dolayısıyla 1553 cm^{-1} bandının genliğindeki azalma çapraz bağlanma sırasındaki yoğunlaşma tepkimeleri sırasında NH_2 'nin NH haline dönüştüğünü gösterir (Haugh ve ark., 2007). Şekil 4.19'de dehidrotermal çapraz bağlanma sonrası örneklerin 1553 cm^{-1} bantında görülen düşüş, çapraz bağlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.



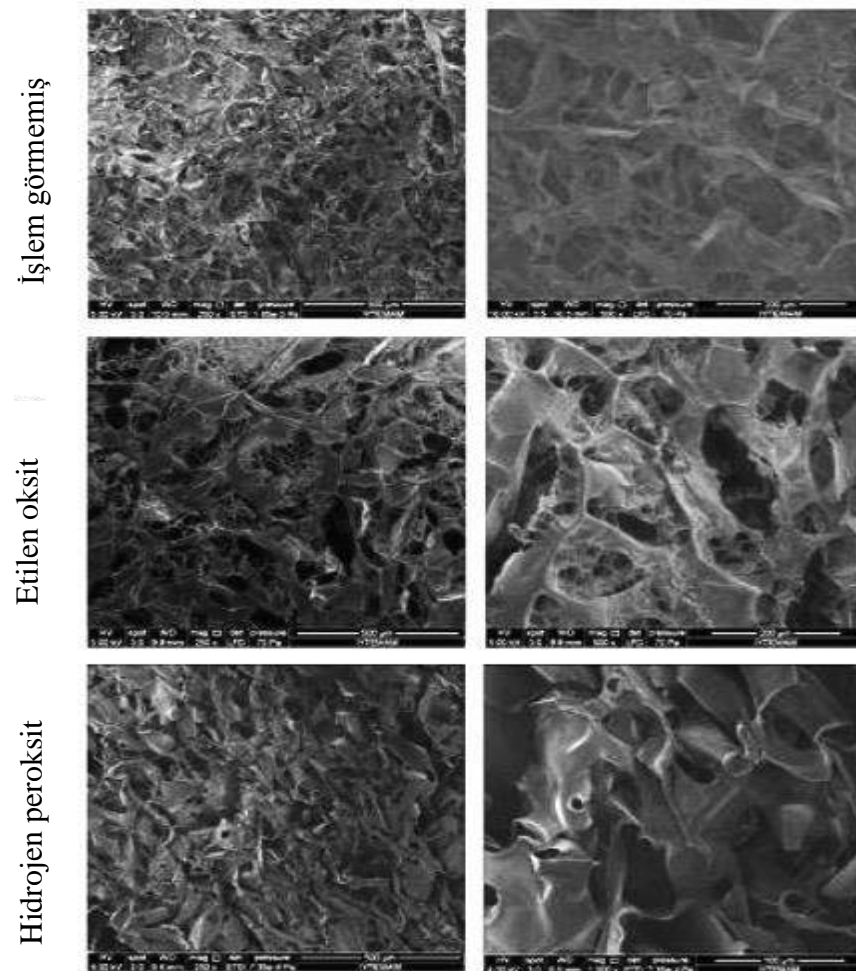
Şekil 4.19. Dehidrotermal çapraz bağlamadan önce ve sonra kollajen iskelelerin FTIR spektroskopisi analizi

4.2. İskelelerin Sterilizasyonu

İskele morfolojisi üzerinde sterilizasyon yöntemlerinin etkisi SEM ile incelenmiştir (Şekil 4.20 ve 4.21). İskelelerde yüksek gözeneklilik gözlenmiş ve etanol, hidrojen peroksit ve etilen oksit temelli farklı sterilizasyon yöntemleri sonucunda iskelelerin morfolojisinde önemli bir farklılık saptanmamıştır. Kollajenin protein yapısına en az hasar verecek sterilizasyon yöntemi olan etanolle işlem görmesi daha sonra yapılacak olan *in vitro* çalışmalar için uygun bulunmuştur.



Şekil 4.20. İskelelerin vakum ve atmosferik basınç altında etanol ile sterilizasyonu sonrası SEM görüntüleri

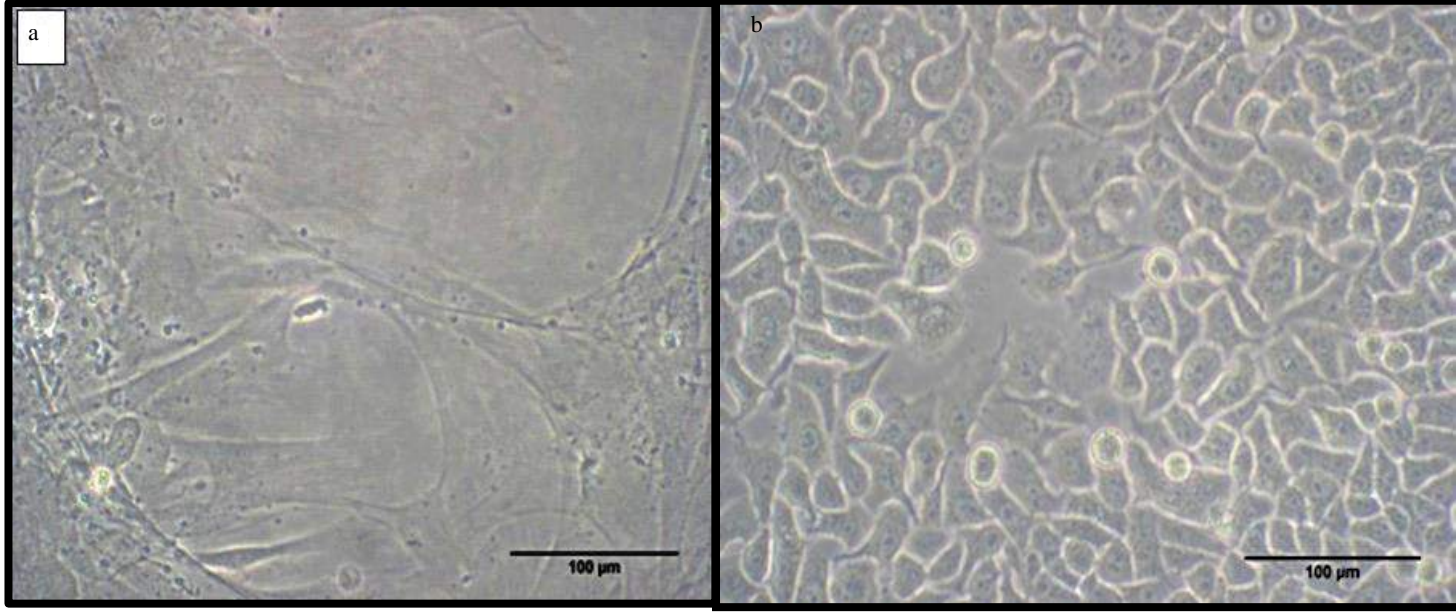


Şekil 4.21. İskelelerin etilen oksit ve hidrojen peroksit ile sterilizasyonu sonrası SEM görüntüleri

4.3. Hücre Kültürü

4.3.1. Hücre Morfolojileri

Fibroblastlar polistren yüzeye ekildikten 7 gün sonra yüzeyi tamamen kaplarken keratinositler bunu 3 günde gerçekleştirmişlerdir. Şekil 4.22'de her iki hücre tipinin de kültür kabı yüzeyinde morfolojileri gösterilmiştir. Detroit hücrelerinin tipik iğsi, fibroblastik morfolojileri, HS2 hücrelerinin de tipik tek katmanlı, poligonal morfolojileri gözlenmiştir.

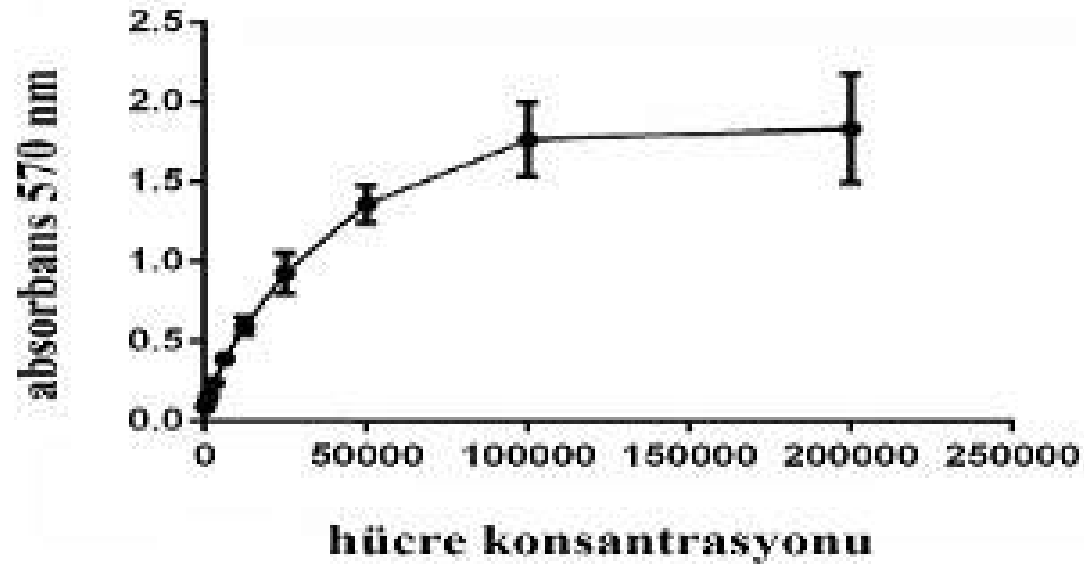


Şekil 4.22. Hücrelerin Faz-kontrast ışık mikroskopunda morfolojilerinin görüntüsü.

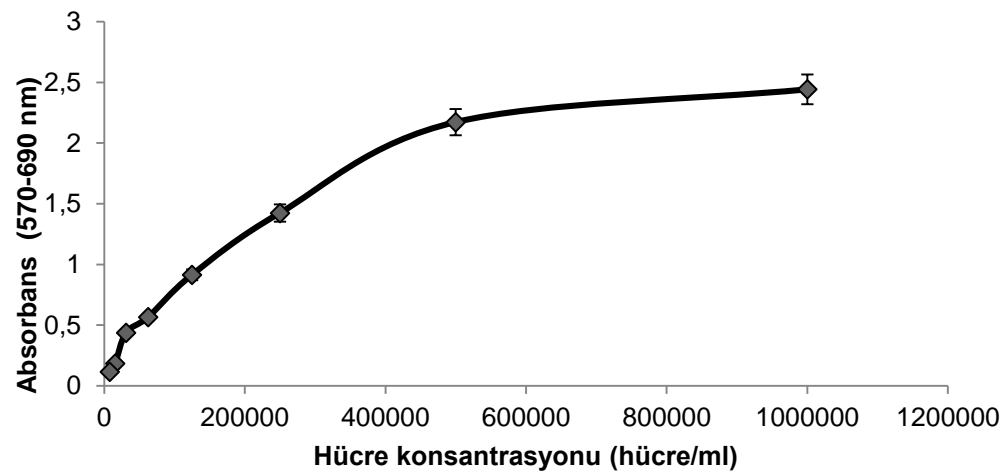
a) Detroit hücreleri, b) HS2 hücreleri. (Olympus CK, Japonya). Büyütme 20x

4.3.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi İçin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Hücre sayısı ile absorbans arasındaki bağlantıyı belirlemek için MTT testi gerçekleştirilerek bilinen hücre sayılarında keratinosit (Şekil 4.23) ve fibroblast (Şekil 4.24) hücrelerinin 570 nm dalga boyunda verdikleri absorbans ölçülerek kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Bu eğrilerin başlangıç, doğrusal bölümlerinden yararlanılarak daha sonra yapılan absorbans ölçümlerinde elde edilen hücre sayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır.



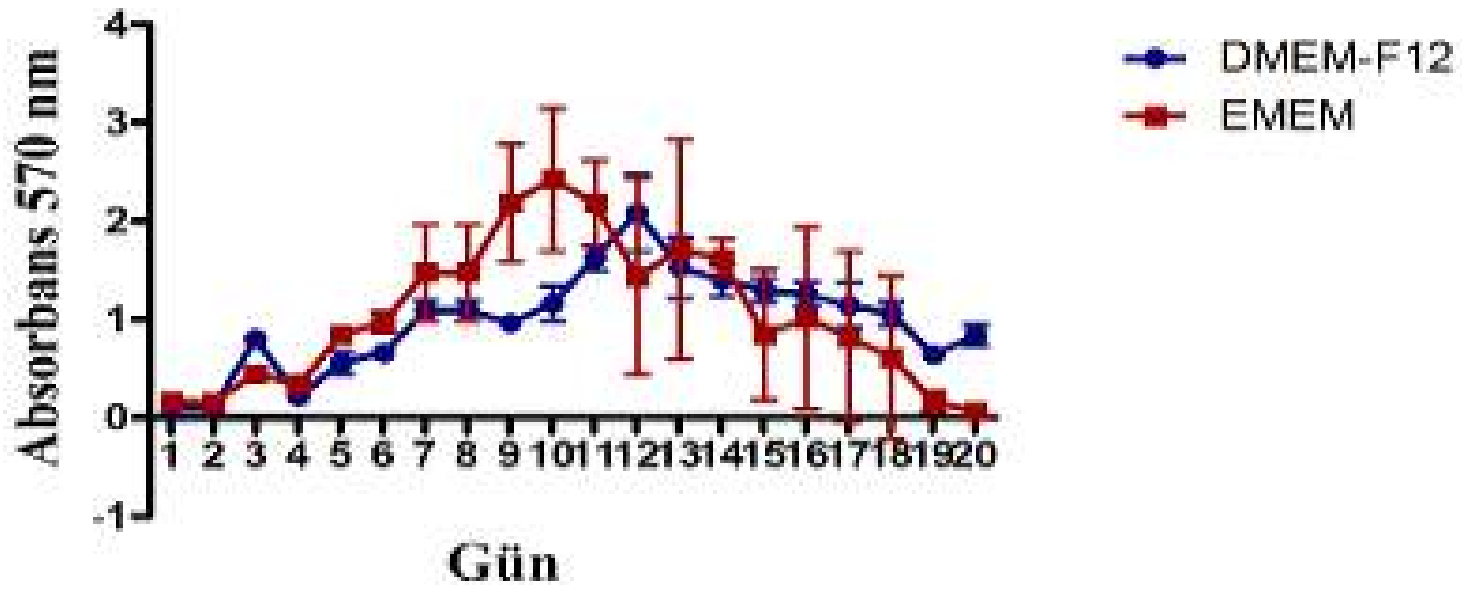
Şekil 4.23. Keratinosit hücrelerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.24. Fibroblast hücrelerinin kalibrasyon eğrisi

4.3.3. Keratinosit Hücrelerinin EMEM Ortamına Adaptasyonu

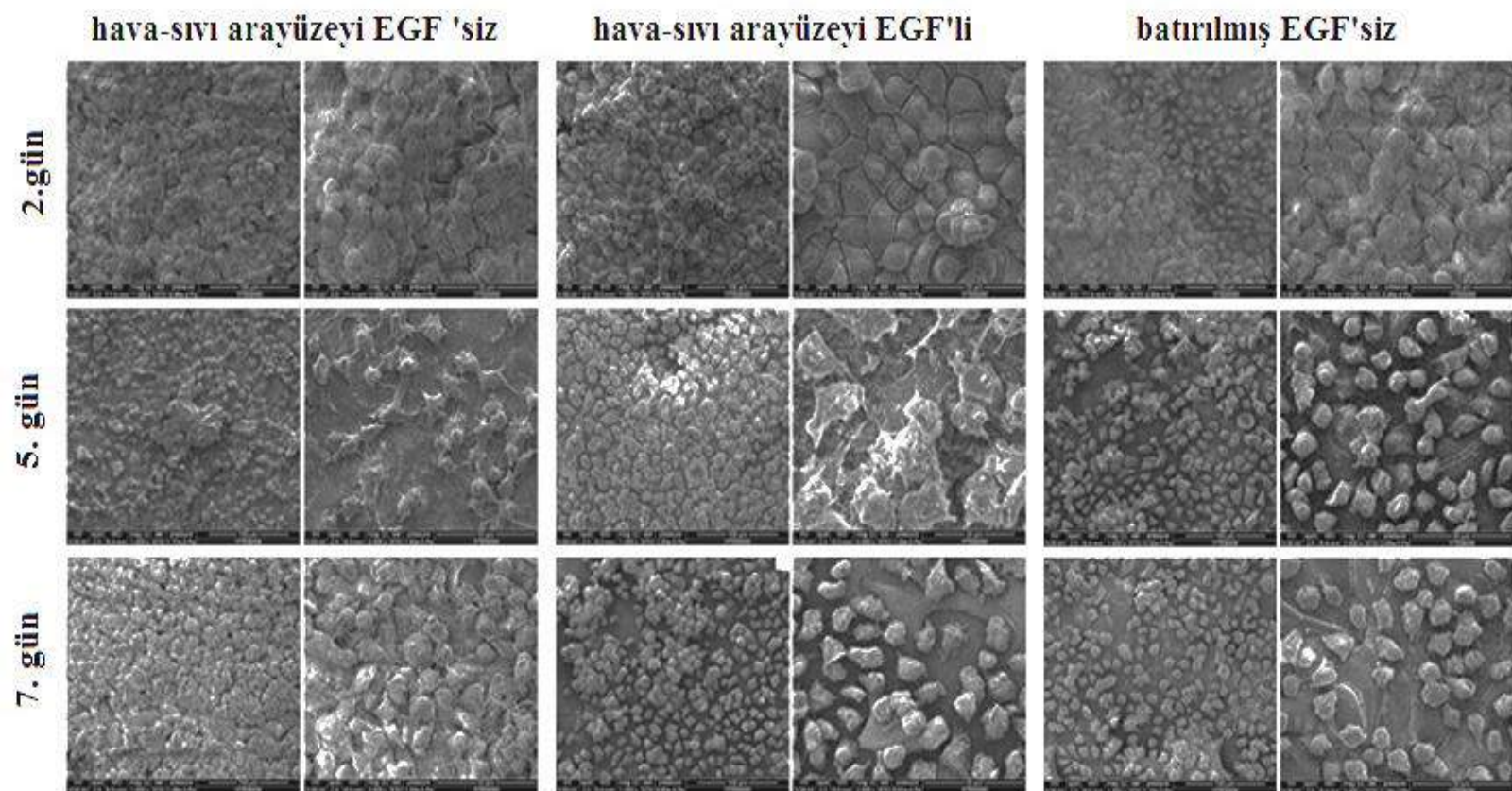
Normal koşullarda HS2 hücreleri DMEM-F12 ortamında, Detroit hücreleri de EMEM ortamında üretilmektedir. Ancak bu çalışmada iki hücrenin ko-kültüründe EMEM ortamı kullanıldığından ko-kültüre başlanmadan önce HS2 hücreleri EMEM ortamına geçirildikten sonra hücre davranışında değişme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Şekil 4.25'de ortam farklılığının hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı ($p \leq 0.05$, student t-testi) gösterilmiştir. Bunun sonucunda da keratinosit hücreleri için EMEM ortamının kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.25. Keratinosit hücrelerinin %10 serum içeren EMEM ve DMEM-F12 ortamlarında üremeleri.

4.3.4. Keratinosit Hücrelerinin ThinCert™ İnsertleri Üzerine Kültüre Edilmesi

En sağlıklı hücre morfolojisi ve çoğalma, hava-sıvı ara yüzeyli ve EGF'li ortamda gözlenmiştir (Şekil 4.26). Hava-sıvı arayüz kültürü keratinositlerin karşılaştıkları fizyolojik koşulları daha yakın taklit etmesi sebebiyle daha önce yapılmış yapay deri modellerinde de özellikle tavsiye edilmektedir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda keratinositler için EGF desteğinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.26. Keratinositlerinin ThinCert™ insertleri üzerinde farklı inkübasyon koşullarındaki SEM görüntüleri

4.3.5. CellCrown™ İnsertler Üzerine Fibroblast ve Keratinosit Hücrelerinin Farklı Özellikteki Kollajen

İskelelerde Ko-kültürü

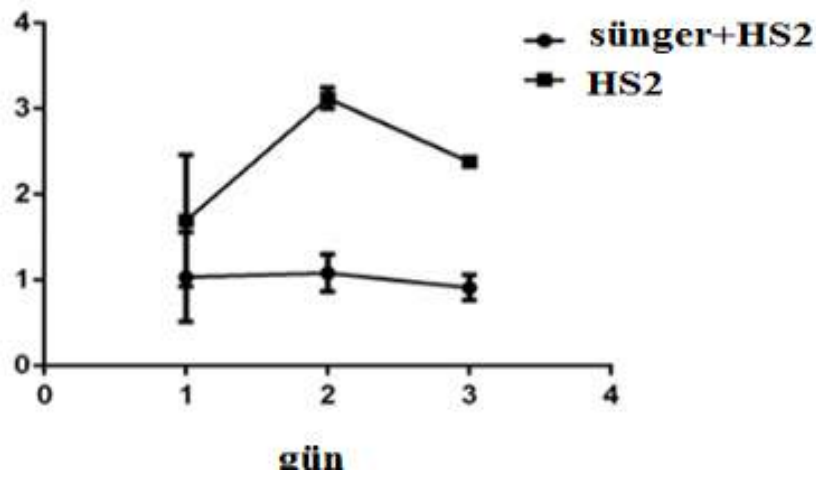
İki farklı yöntem ile gerçekleştirilen çalışmalarda hücre ekim sürelerinde fark denenmiş, böylece ko-kültür yapılırken iki farklı hücre tipinin birlikte ne kadar süre kültüre edileceği saptanmıştır. Histolojik ve immunohistokimyasal analizler sonucunda 7. gün sonunda eklenen keratinositler daha uzun süre fibroblastlar ile ko-kültüre olduklarından morfolojik olarak ve keratinositlere özgü belirteç proteinlerin ekspresyonunda daha olumlu sonuçlar vermiştir.

4.4. Üç Boyutlu Kültürlerde Yapılan Analizler ve Hücre Karakterizasyonu

4.4.1. Üç Boyutlu Kültürlerde Hücre Üreme Kinetiği

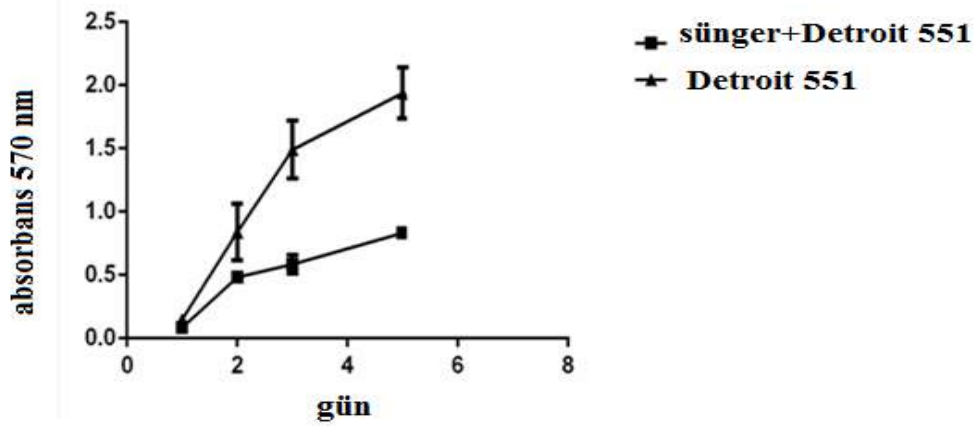
Her iki tip hücre de kollajen iskeleler üzerinde tutunma ve üreme göstermişlerdir (Şekil 4.27-4.29). Klasik polistren yüzeyler üzerinde yapılan kültürlerde hücre üremesinin iskele içinde üremeye kıyasla daha hızlı olması beklenen bir sonuçtur. Doğal ortamları dışında kültüre edilen hücreler kanserleşme eğilimi göstererek hızlı üreme döngüsüne girerler. Polistren kültür kapları da yapılan çeşitli yüzey işlemleri sayesinde bu üreme hızını destekleyecek şekilde üretilirler. İskele üzerinde üç boyutlu kültür hücrelerin doğal ekstraselüler ortamlarına daha yakın olduğu için hücreler fizyolojik şartlarda olduğu hıza daha yakın bir üreme davranışı sergilemişlerdir.

Kollajen sünger- HS2 hücreleri

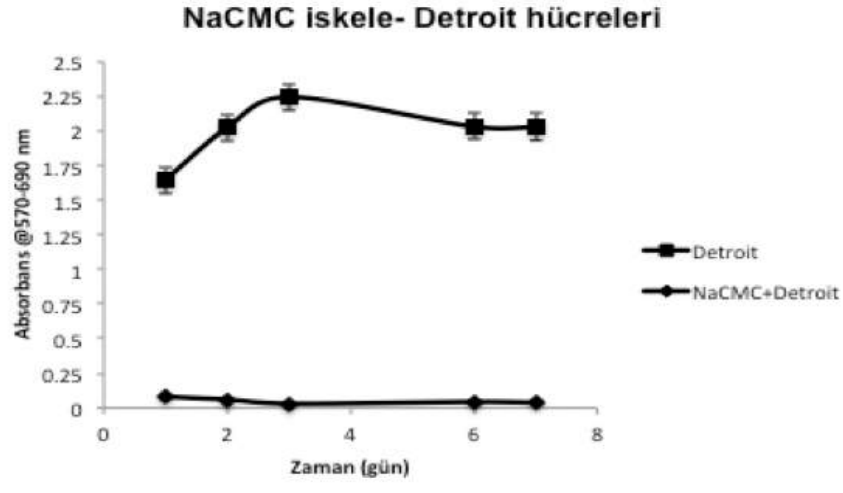


Şekil 4.27. Küçük gözenekli kollajen iskele üzerinde keratinositlerin üremesi

Kollajen sünger- Detroit 551 hücreleri



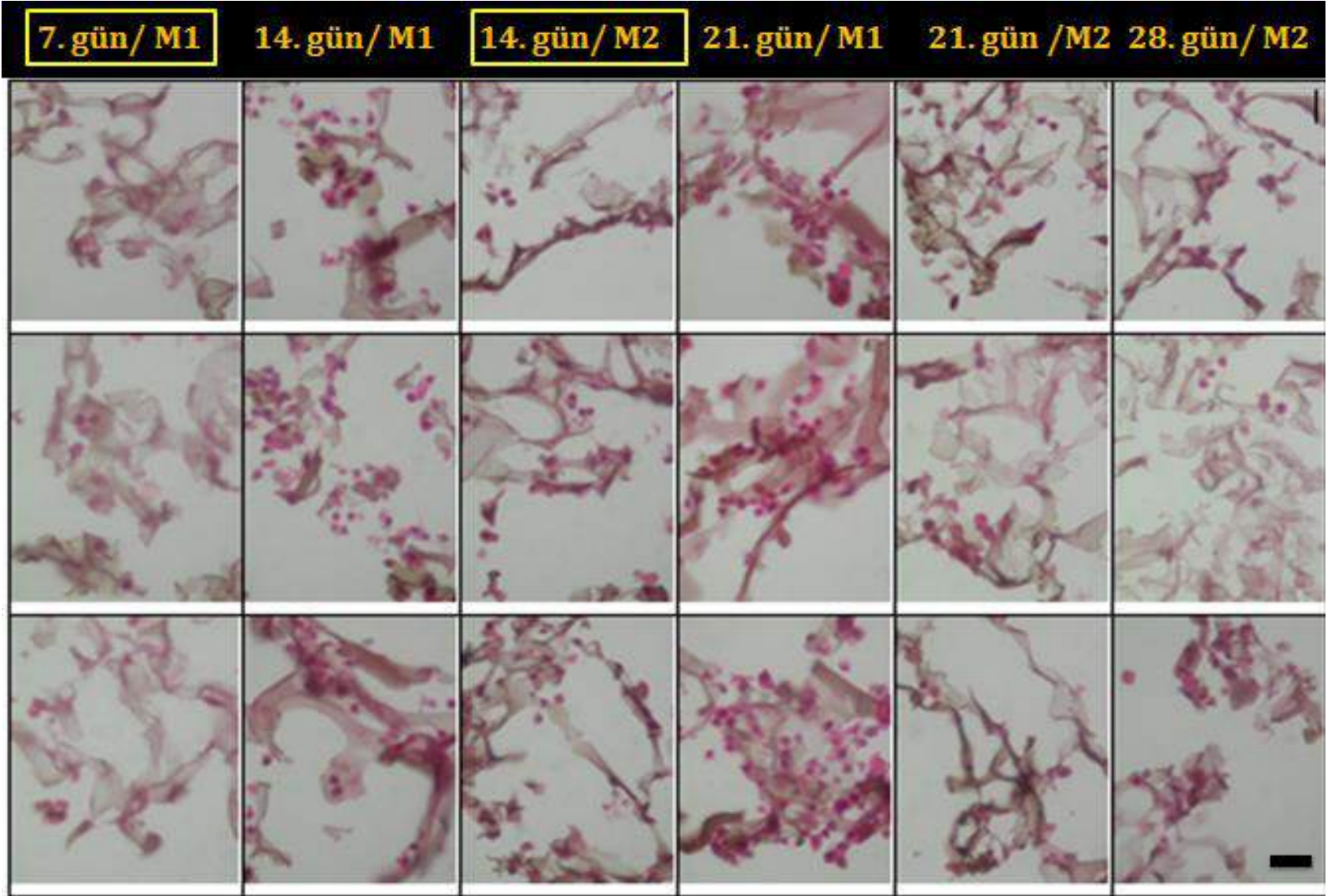
Şekil 4.28. Büyük gözenekli kollajen iskele üzerinde fibroblast hücrelerinin üremesi



Şekil 4.29. NaCMC iskele üzerinde fibroblast hücrelerinin proliferasyonu

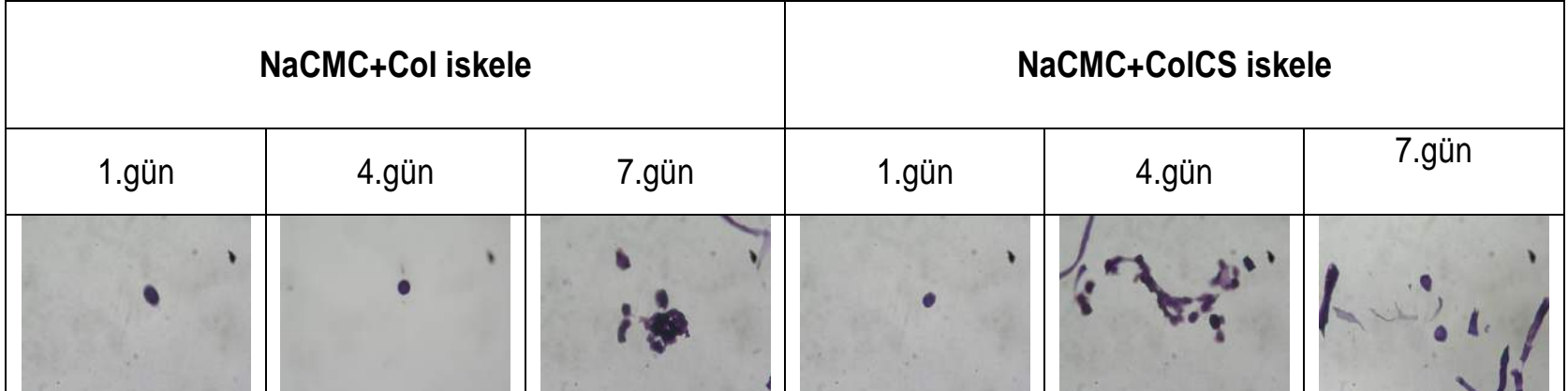
4.4.2. Hücre Morfolojisinin Gözlenmesi İçin Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Hematoksilen boyası ile hücre çekirdeği mavi ve eozin boyası ile de sitoplazma pembemsi olarak görünmektedir. Şekil 4.30'da genel olarak iki farklı gözenek büyüklüğüne sahip kollajen iskelelerde hücre ekimi sonrası yapılan çalışmalardaki M1 de daha fazla hücre olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi ko-kültür süresinin uzunluğu olabilir. Hücreler arası etkileşimin daha uzun süre devam etmiş olması, hücrelerin daha sağlıklı üremelerine de destek olmaktadır. 7. gün M1 ve 14. gün M2'ler sadece fibroblast hücrelerini göstermektedir. 7. günden 14. güne fibroblast hücrelerinde iskele içinde üreme görülmektedir. 14. günde M1'de iki tip hücre vardır. Birlikte ko-kültür süresi uzadıkça 21. günde M1 de daha fazla hücre görülmüştür. Bu sonuçlar keratinosit çoğalmasına fibroblast hücreleriyle ko-kültür edilmiş olmalarının olumlu etkisini göstermektedir.



Şekil 4.30. CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası hematoksilen ve eozin boyanmış görüntüleri.

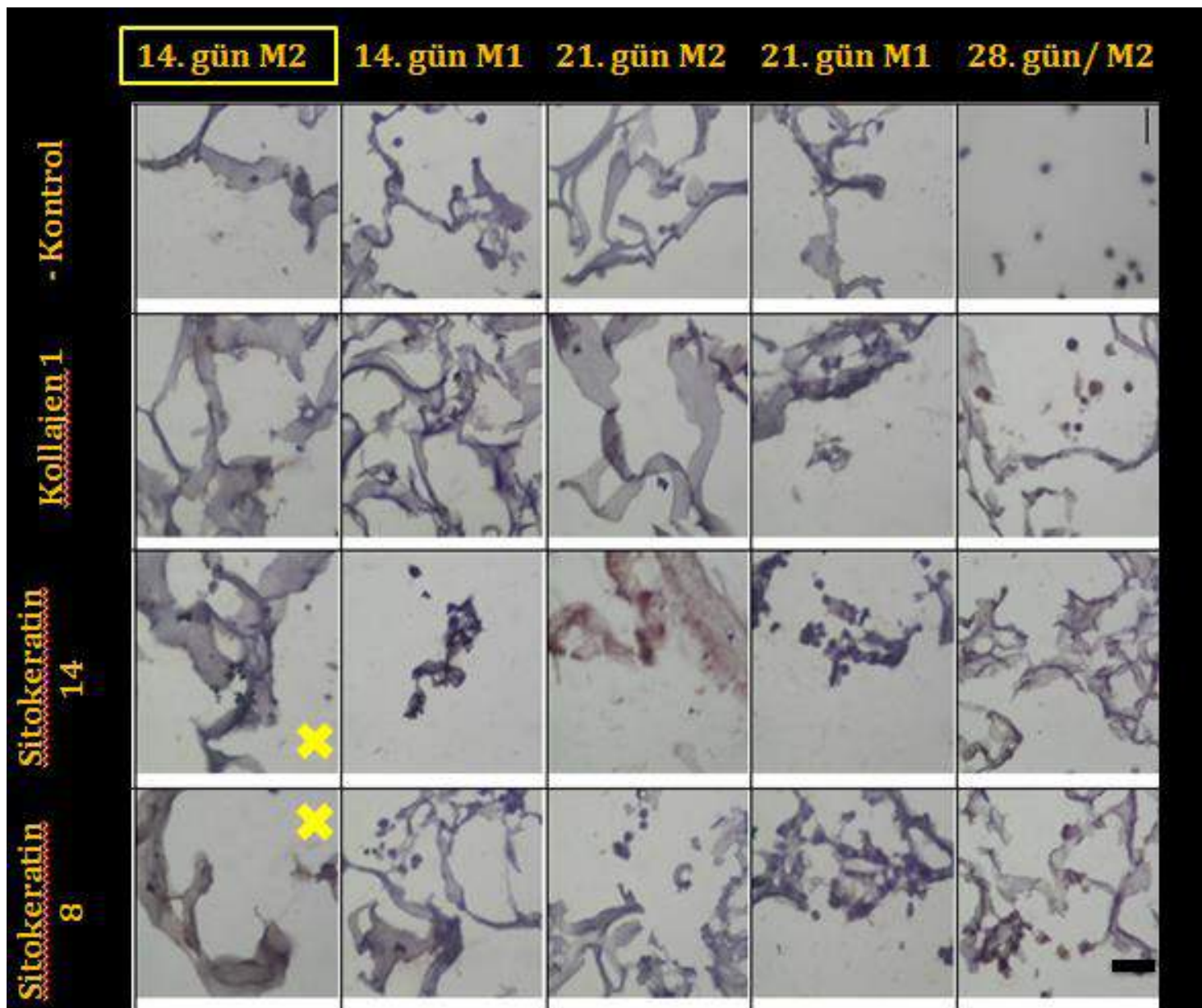
Hazırlanan her iki çift katmanlı grup iskelelerde hücreler gözlenmiştir. (Şekil 4.31). Her grupta ilk günlerde hücre yoğunluğunun çok az olduğu, kültüre devam edildiğinde hücrelerin arttığı ve hücrelerin iskeleler içinde ve gözenekler arasında yerleştiği saptanmıştır.



Şekil 4.31. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı iskelelerde ko-kültürü sonrası hematoksilin ve eozin boyaması

4.4.3. İmmünohistokimyasal Boyama



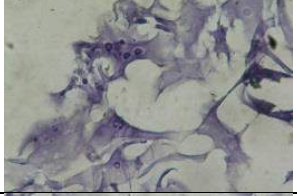
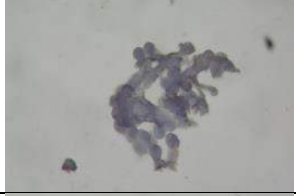
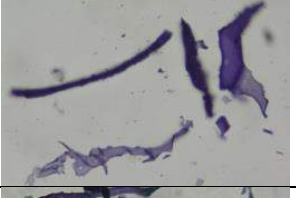
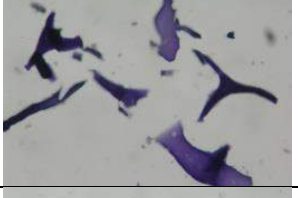
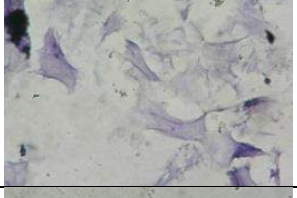
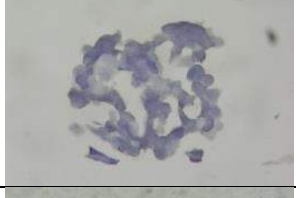
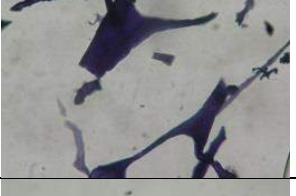

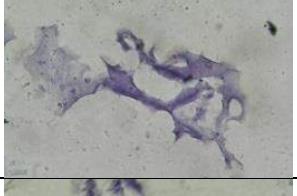
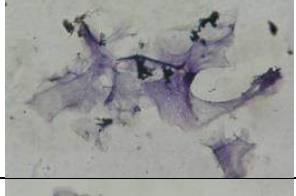


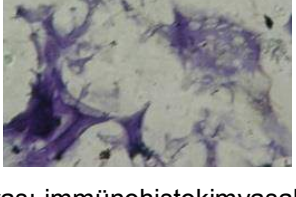

Şekil 4.32'de kontrol mavi, antikor boyanan pozitif reaksiyonlar ise kahverengi olduğu görülmektedir. Sitokeratin 8 erken dönem keratinosit belirteçidir. 14. günde M2'de keratinosit hücresi olmadığı için boyanma da yoktur. Ancak M1'de vardır. Sitokeratin 8 boyanması daha fazladır. Sitokeratin 14 ise geç dönem basal keratinosit belirteçidir. 21. günde boyanma oldukça belirgindir. Kollajen 1'de hücreler intraselüler olarak kahverengi boyanmışlardır. 14. gün M2'de fibroblastlar henüz intraselüler kollajen üretmeye başlamamışlardır ancak 21. günden itibaren bu gözlenmektedir. 21. gün M1 de fibroblastlar keratinositler ile daha uzun süre etkileşimde olduklarından daha fazla miktarda kollajen üretmişlerdir. Fibroblast hücrelerin kollajen tip 1 sentezlediği görülmektedir.



Şekil 4.32. CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyama

CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü 28 güne kadar sürdürülebilmiş olmasına rağmen NaCMC iskelelerin kültür şartlarında 8 – 9 gün içinde bozunarak parçalanmaları sebebiyle ko-kültürlere sadece 7 gün devam edilebilmiştir. *In situ* yapılmış bozunma testlerinde bu iskeleler dayanıklılıklarını korumuş olmalarına rağmen hücre kültürü ortamında salgılanan hücre metabolitlerin ve ortamda bulunan enzimlerin iskele yapılarının bozunmasını hızlandırdığı görülmüştür. İlk denemelerden sonra tekrar ve daha uzun süreli uygulanan çapraz bağlama yöntemleri sonuç vermemiştir. Ayrıca hücre kültürü ortamında asitliğin yükselmesini önlemek amaçlı ikinci grup denemede besiyerinin her gün değiştirilmiş olmasına rağmen iskelelerin bütünlüğü korunamamıştır. Bu sebeple NaCMC katmanlı olan fibroblast ve ko-kültür denemeleri için sadece 7 günlük sonuçlar verilebilmektedir.


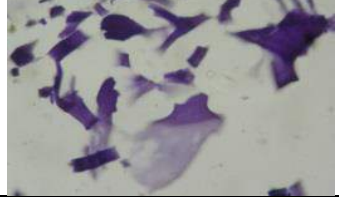
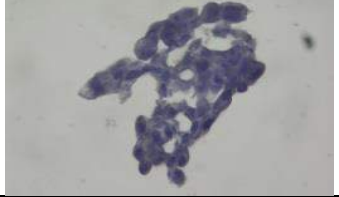

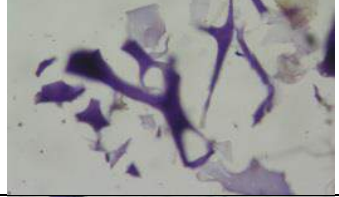
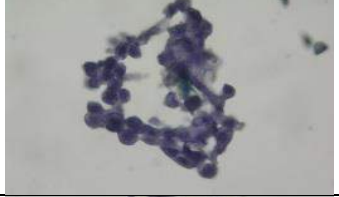
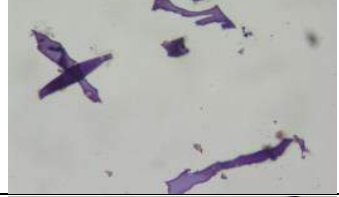

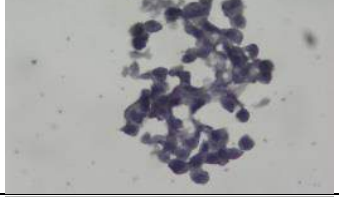
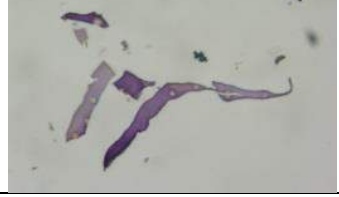
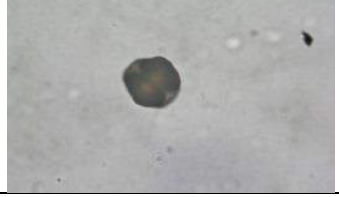
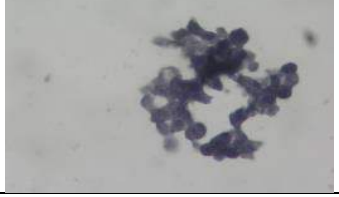
Şekil 4.33'te de sadece fibroblast hücrelerinin NaCMC iskelelerde immunohistokimyasal sonuçları görülmektedir. 2. ve 3. günlerdeki boyamalarda sadece kollajen tip-3 boyamasının zayıf şiddette olduğu gözlenirken, 6. ve 7. günlerde laminin pozitifliği zayıf şiddette izlenmiştir. Diğer boyamaların ise negatif olduğu belirlenmiştir. Fibroblast hücrelerinin kollajen tip-3 sentezlediği söylenebilir. NaCMC tek katmanlı iskele olduğundan dermis-epidermis arasındaki bağlantının belirlenmesinde kullanılan laminin belirtecinin zayıf görülmesi beklenen bir sonuçtur. Bu belirteç ko-kültür şartlarında iki tip hücrenin birbirleriyle etkileşimi sonrasında daha şiddetli olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.34 ve 4.35).

NaCMC iskele	2.gün	3.gün	6.gün	7.gün
Laminin				
Kollajen1				
Kollajen3				
Transglutaminaz				

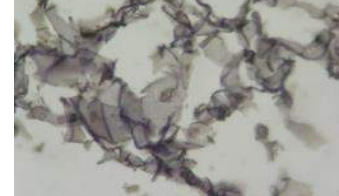








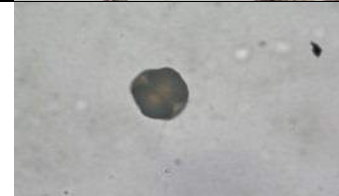


Şekil 4.33. Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskelelerde kültürü sonrası immunohistokimyasal boyama

Şekil 4.34'de fibroblast ve keratinositlerin NaCMC ve kollajen çift katmanlı iskeleler üzerinde ko-kültürü sonrası immunohistokimya boyamaları görülmektedir. 1. günde laminin ve kollajen tip-1 boyaması zayıf şiddette pozitif iken, 4. günde kollajen tip-1 ve tip-3 ve transglutaminaz boyamaların olduğu görülmüş ve transglutaminaz boyamasının orta şiddette olduğu saptanmıştır. Bu enzimin ekspresyonu kültürdeki keratinositlerin sağlıklı olarak kültür ortamında devam ettiğinin göstergesidir. 7. günde ise kollajen tip-1 ve tip-3 orta şiddette pozitif iken, transglutaminaz ve laminin boyamaları da halen zayıf şiddette gözlenmektedir. NaCMC ve kollajenden oluşan çift katmanlı iskelede kültür süresinin artmasıyla beraber hücrelerin iskelelerin yüzeyinden iskele içine doğru göç ederek yerleştiği ve çoğaldığı belirlenmiştir.

Şekil 4.35 de ko-kültür sonrası immunohistokimyasal sonuçlardır; ancak bu şekilde kullanılan ince tabaka kollajen değil kollajen – kondroitin sülfattır. 1. günde laminin, kollajen tip-1 ve tip-3 boyamaları gene zayıf şiddette gözlenirken, transglutaminaz boyamasının orta şiddette olduğu saptanmıştır. 4. gündeki boyamalarda laminin, kollajen tip-3 ve transglutaminaz boyamaları zayıf şiddette iken, kollajen tip-1 boyamasının orta şiddette olduğu saptanmıştır. 7. günde laminin ve kollajen tip-1 boyamaları orta şiddette iken, kollajen tip-3 ve transglutaminaz boyamaları zayıf şiddette saptanmıştır. Bu sonuçlar keratinosit belirteci proteinlerin kondroitin sülfat içeren iskelelerde daha yüksek ekspresyon edildiğini, dolayısıyla epidermis tabakasının ekstrasellüler matrisini taklit etmede kollajen iskelelere kondroitin sülfat eklenmesinin önemli bir katkı sağladığını göstermektedir. İnce katmanda gözenek büyüklükleri yüksek olmadığı için 1. Günde iskele içine yerleşmiş hücre görülemedi. Ancak hücre göçü 4. ve 7. günlerde gözlenmektedir.

NaCMC + Col iskele	1.gün	4.gün	7.gün
Laminin			
Kollajen1			
Kollajen3			
Transgutaminaz			

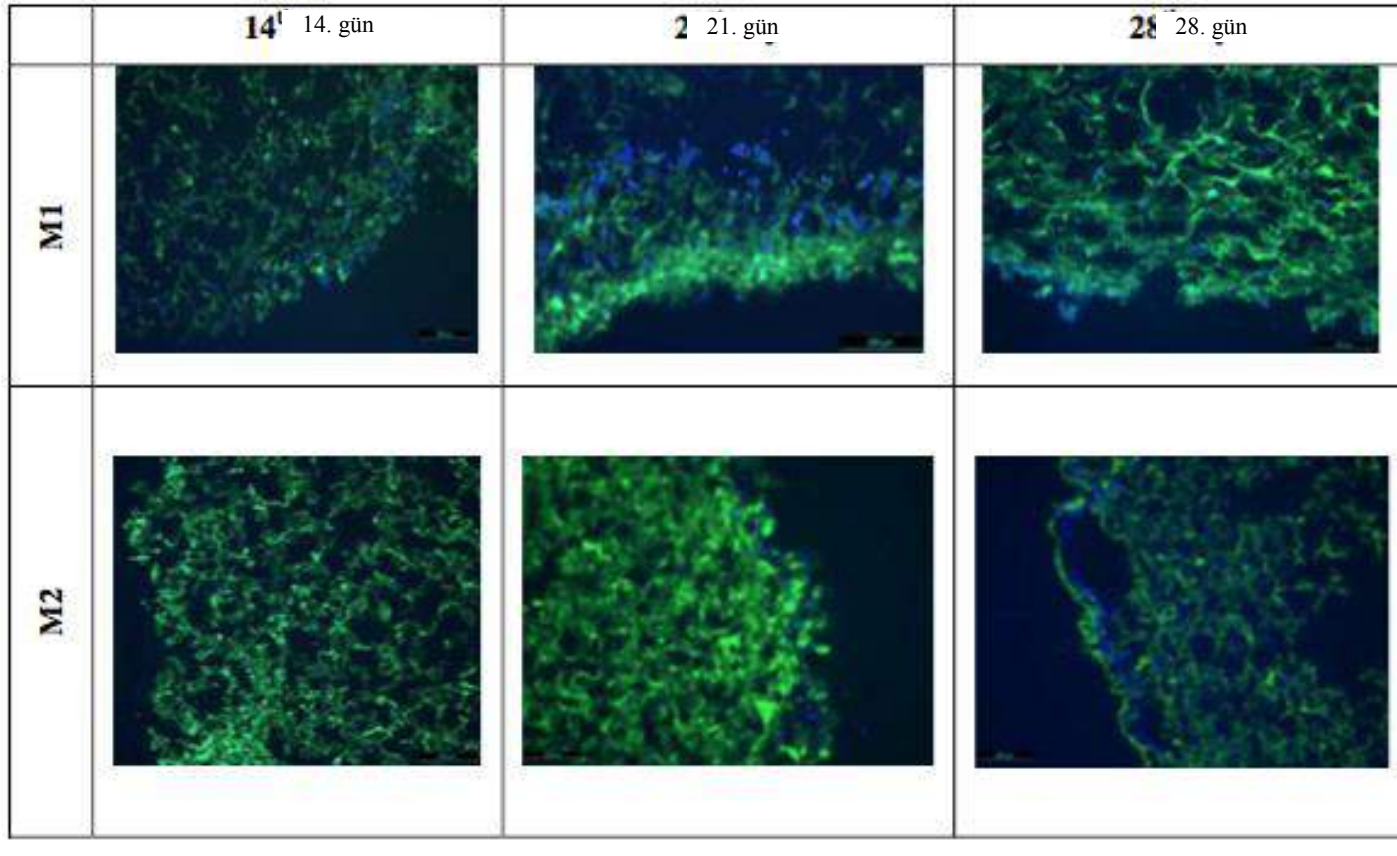
Şekil 4.34. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı NaCMC ve kollajen iskelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyama

NaCMC + ColCS iskele	1.gün	4.gün	7.gün
Laminin			
Kollajen1			
Kollajen3			
Transgutaminaz			

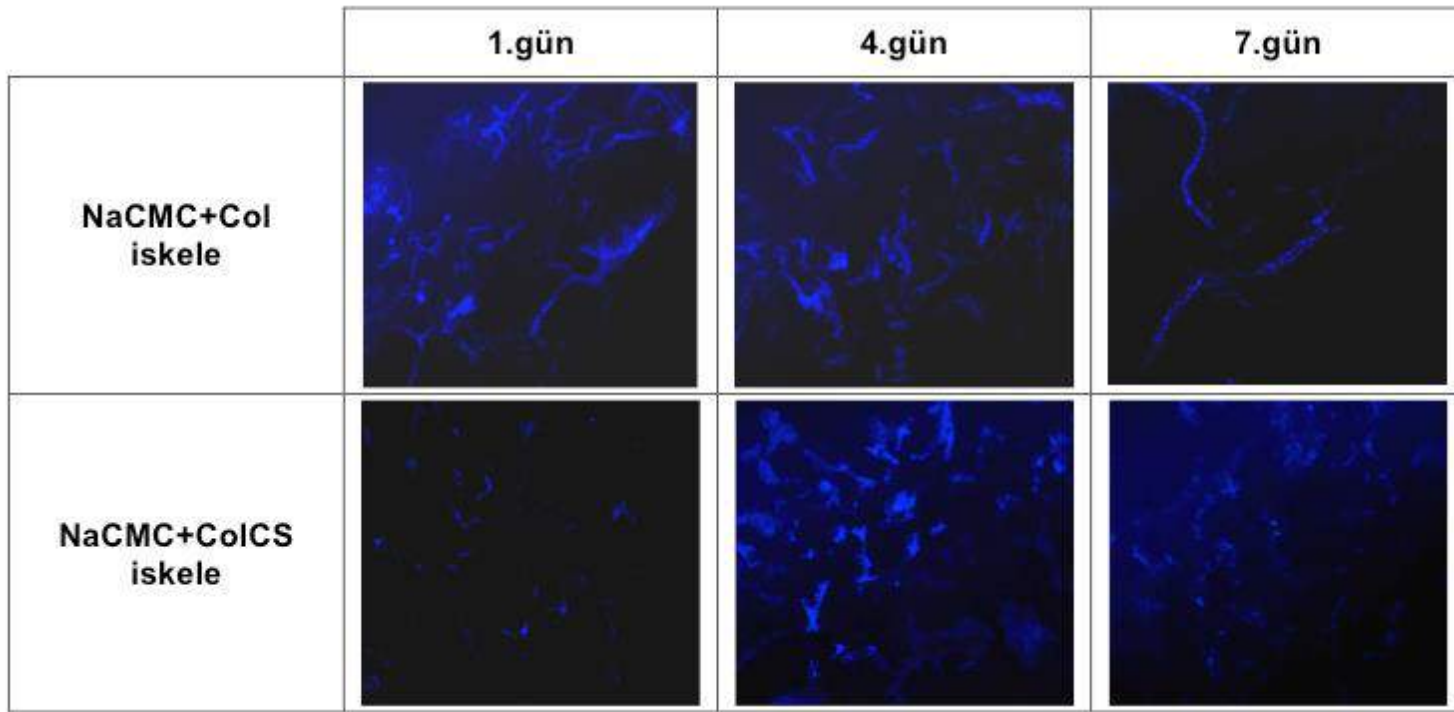
Şekil 4.35. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı NaCMC ve ColCS iskelerde ko-kültürü sonrası immünohistokimyasal boyama

4.4.4. DAPI Boyaması

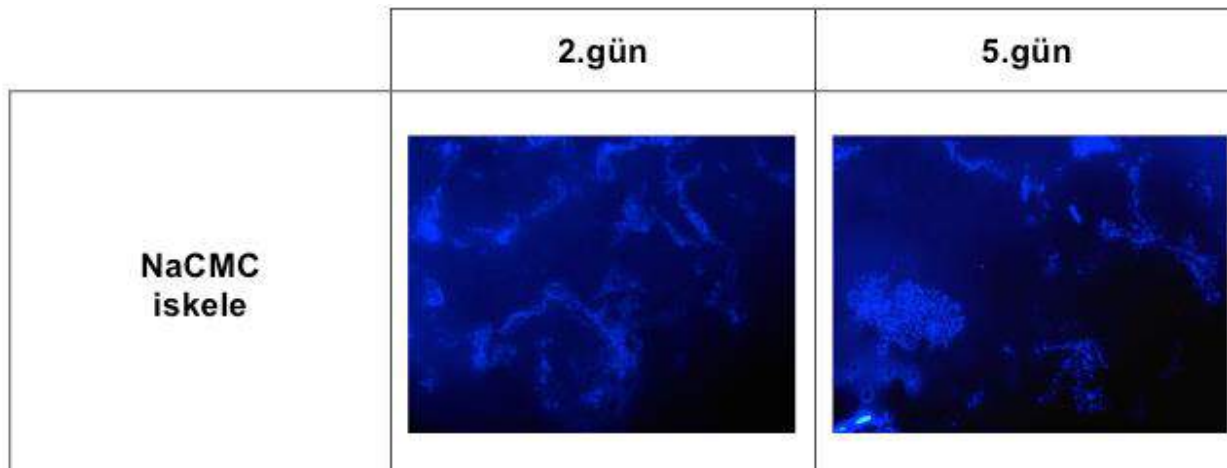
CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelelerde ko-kültürü 28 güne kadar sürdürülebilmiş olmasına rağmen NaCMC iskelelerin kültür şartlarında 8 – 9 gün içinde bozunarak parçalanmaları sebebiyle ko-kültürlere sadece 7 gün devam edilebilmiştir. İmmünohistokimya boyamaları gibi DAPI boyamaları da bu süre içinde iskeleler içine hücre göçünün olduğunu, 7 günlük kültür süresinde hücre üremesi gözlenmektedir (Şekil 4.36, 4.37 ve 4.38).



Şekil 4.36. CellCrown™ insertler üzerine fibroblast ve keratinosit hücrelerinin kollajen iskelede ko-kültürü sonrası DAPI boyama (M1: 7 gün, M2: 14 gün keratinosit ekimi)



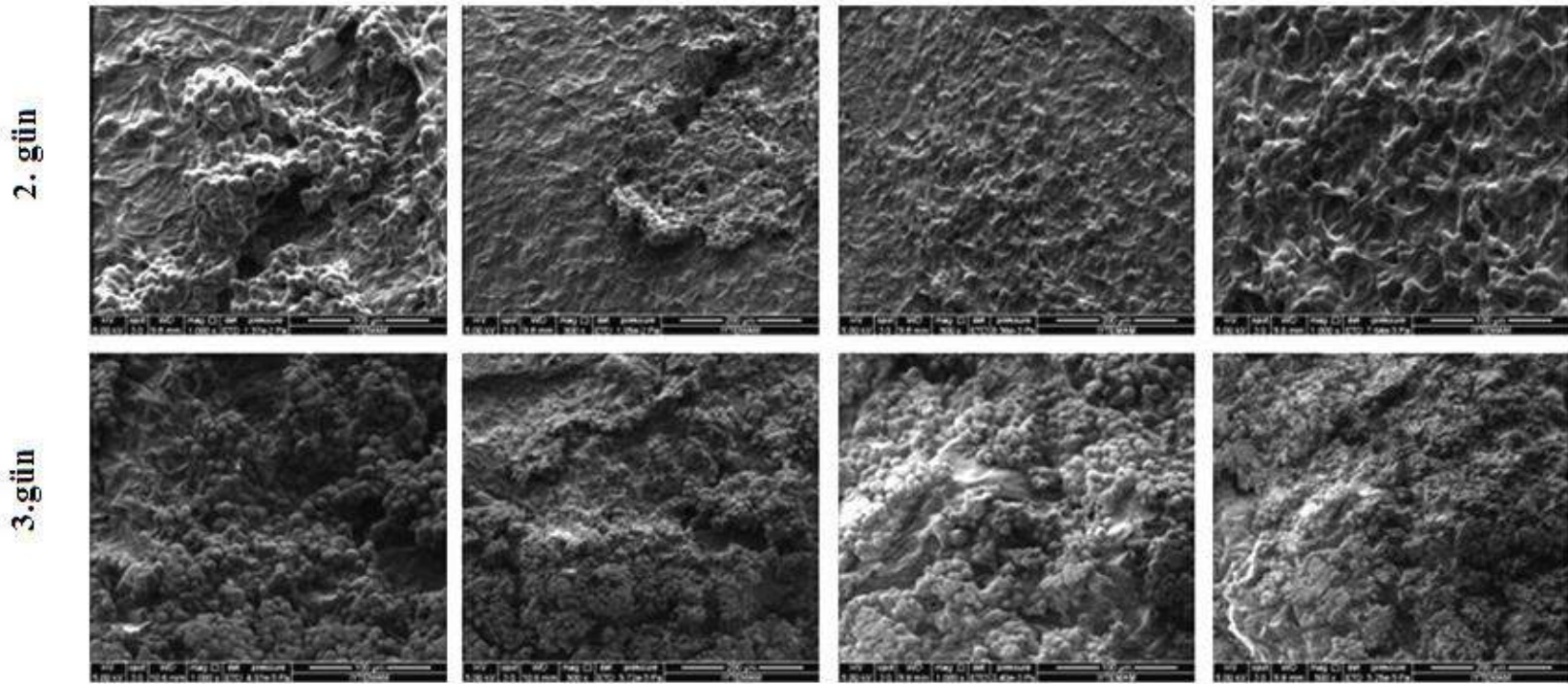
Şekil 4.37. Fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çift katmanlı iskelede ko-kültürü sonrası DAPI boyama



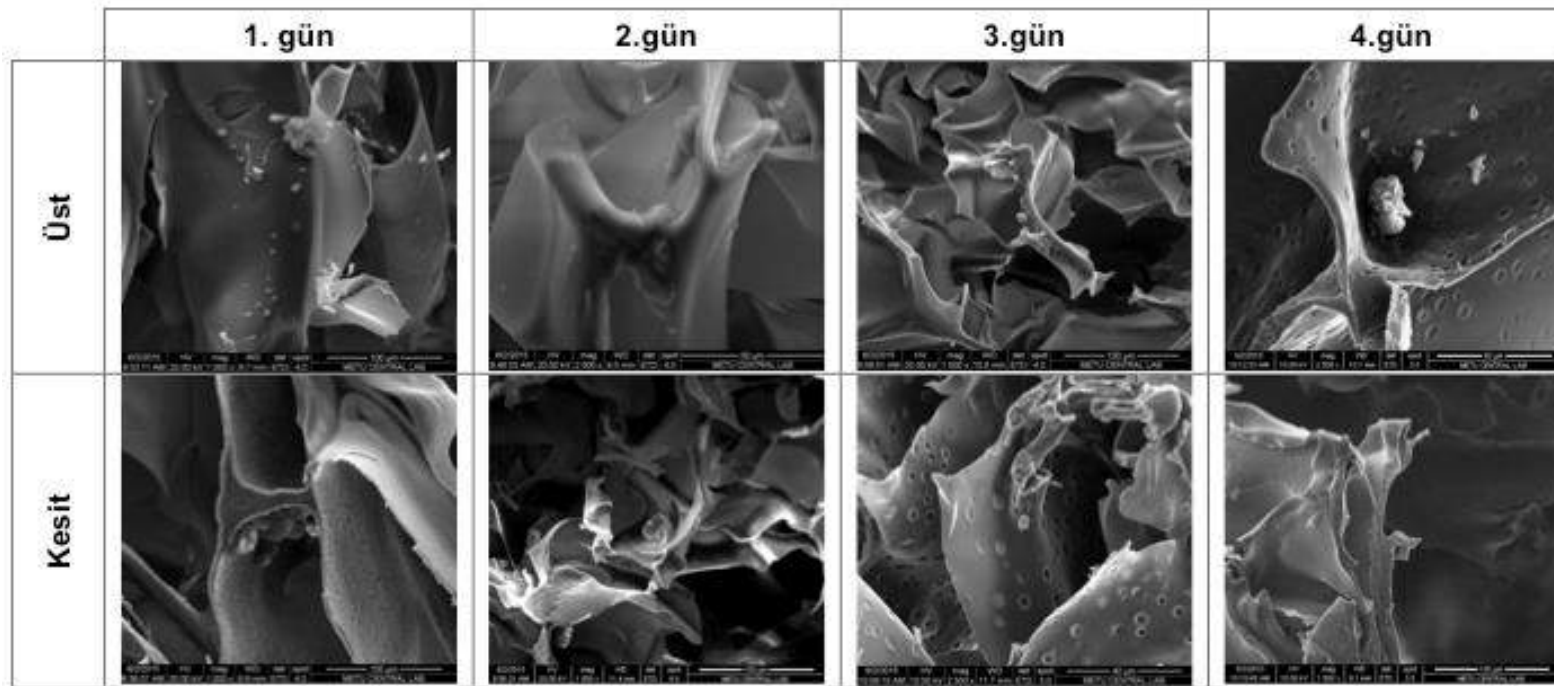
Şekil 4.38. Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskelede kültürü sonrası DAPI boyama

4.4.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Keratinosit hücrelerinin küçük gözenekli kollajen sünger üzerinde 2. ve 3. günlerdeki dağılımları Şekil 4.39 ve 4.40'da görülmektedir. Küçük gözenekli yapı sebebiyle yüzeyde yoğun bir katman oluşturan keratinosit hücreleri, beklenen tek katmanlı, poligonol morfolojilerini göstermektedir. Yoğun hücre dağılımı ve hücreler arası sıkı bağlantıların bulunması epidermis tabakasının koruyucu işlevini yerine getirebilmesi için önemlidir. Kollajen iskelelerin keratinosit tutunma ve üremesini desteklemesi sayesinde istenen keratinosit gelişimi ve yoğunluğu elde edilebilmiştir.



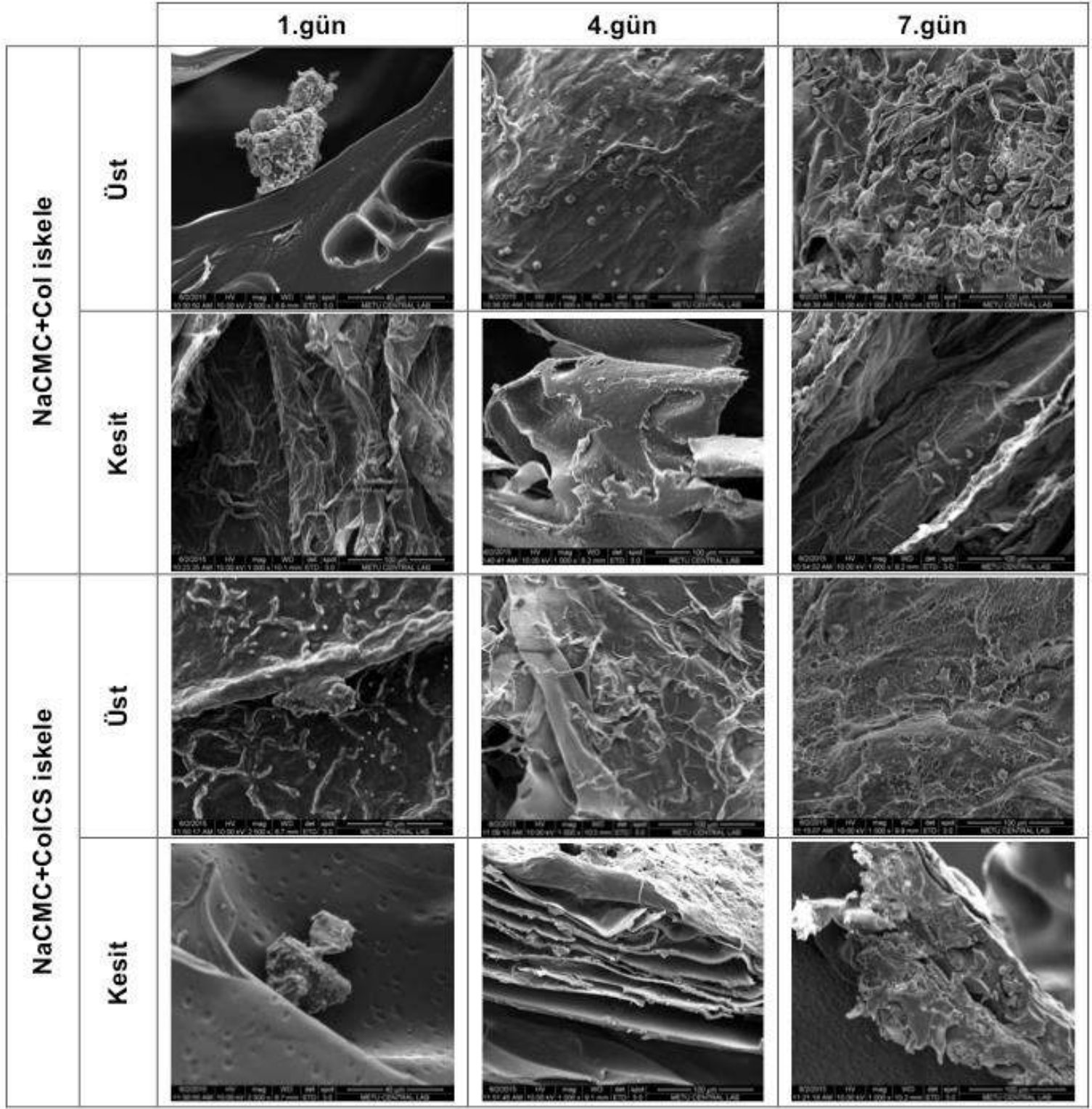
Şekil 4.39. Keratinosit hücrelerinin küçük porlu kollajen iskele üzerinde kültürü sonrası SEM görüntüleri



Şekil 4.40. Fibroblast hücrelerinin NaCMC iskele üzerinde kültürü sonrası SEM görüntüleri

NaCMC iskeleler büyük gözenekli olduğu için fibroblastların iskele gözenekleri içine yerleşerek içeri göçleri kolayca sağlanmıştır. Şekil 4.40'da görülen SEM fotoğraflarında hem üst yüzeyde hem de iskele ortasından alınan kesitte fibroblast hücreleri gözlenmektedir. Kültür süresinin 28 güne kadar devam etmesi hedeflendiği için ilk hücre ekim konsantrasyonları düşük tutulduğu için görülen hücre sayısı çok fazla değildir.

Şekil 4.41'de çift katmanlı iskelelerin SEM fotoğraflarında üst yüzeylerde küçük gözenekli katmanın yüzeyini yoğun olarak kaplayan keratinosit hücreleri ve kesit fotoğraflarında alt katman aralarına yerleşmiş fibroblast hücreleri görülmektedir. İnce ve yoğun epidermis tabakası ile kalın ve daha seyrek dermis tabakası morfolojik olarak elde edilmiş olmakla beraber, dermis içindeki hücre yoğunluğu kültür sürelerinin 7 günle sınırlı kalması sebebiyle istenenden daha düşük düzeydedir.



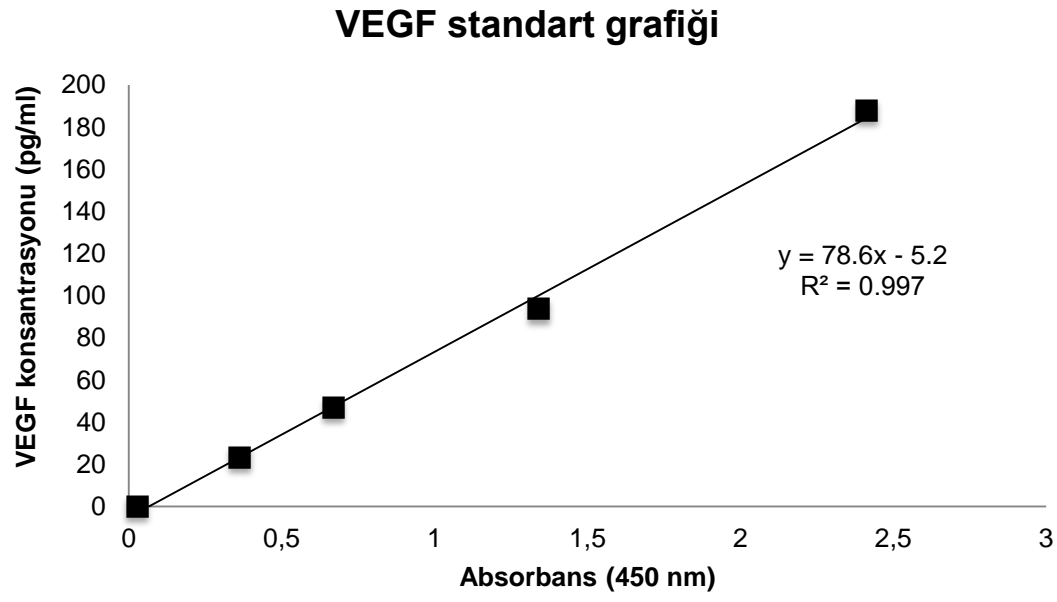
Şekil 4.41. Hücrelerinin çift katmanlı iskelede kültürü sonrası SEM görüntüleri

4.4.6. ELISA sonuçları

4.4.6.1. VEGF ekspresyonunun belirlenmesi

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenez ve vaskülogenezde görev alan önemli bir düzenleyicidir. Anjiyogenez, doku yenilenmesi sürecinde görülmesi istenen, yeni doku oluşumu ve iyileşme için vazgeçilmez bir süreçtir. Doku mühendisliği çalışmalarında da laboratuvar şartlarında üretilen dokunun vücuda implantasyonu sonrası konak dokularla bütünleşmesinde önemli yer tutar. Bu sebeple pek çok doku mühendisliği çalışmasında anjiyogenezi hızlandırıcı yaklaşımlar denenmektedir. Anjiyogenez ayrıca tümör büyümesi ve metastası, diyabetik retinopati, doku iskemisinden sonra veya eklem iltihabı gibi patolojik süreçlerde de görülmektedir. Vaskülogenez ise endotel hücrelerinin mezodermal öncülerinden farklılaşma ile kan damarlarının oluşmasıdır. Vaskülogenez embriyonik gelişim ile sınırlı iken yeni damarlanma gerektiğinde anjiyogenez ömür boyu gerçekleşir.

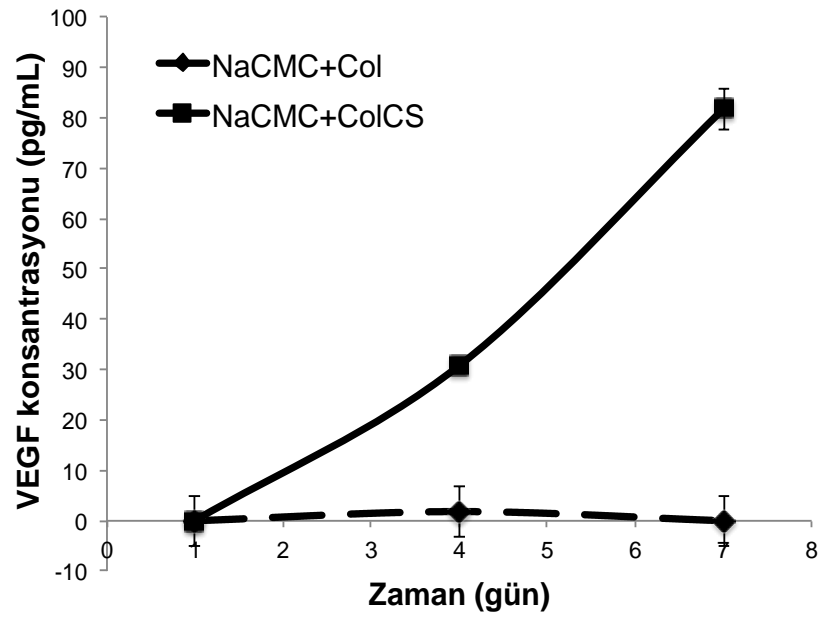
Invitrogen VEGF ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirilen deneme sonucunda bilinen standartların konsantrasyonlarına göre çıkarılan standart grafiği Şekil 4.42'te gösterilmiştir. Bu standart grafiğinden elde edilen denklem, çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin VEGF ekspresyonlarının absorbans değerlerine uygulanarak VEGF konsantrasyonları pg/mL cinsinden belirlenmiş ve Tablo 4.5 ve Şekil 4.43'de gösterilmiştir.



Şekil 4.42 VEGF ELISA testine göre standart grafiği

Tablo 4.5. Çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin VEGF ekspresyonları

Zaman (gün)	İskele	Absorbans @450 nm	Konsantrasyon (pg/mL)
1	NaCMC+Col	0,027	0
4	NaCMC+Col	0,078	1,8
7	NaCMC+Col	-0,003	0
1	NaCMC+ColCS	0,038	0
4	NaCMC+ColCS	0,262	30,8
7	NaCMC+ColCS	0,587	81,8



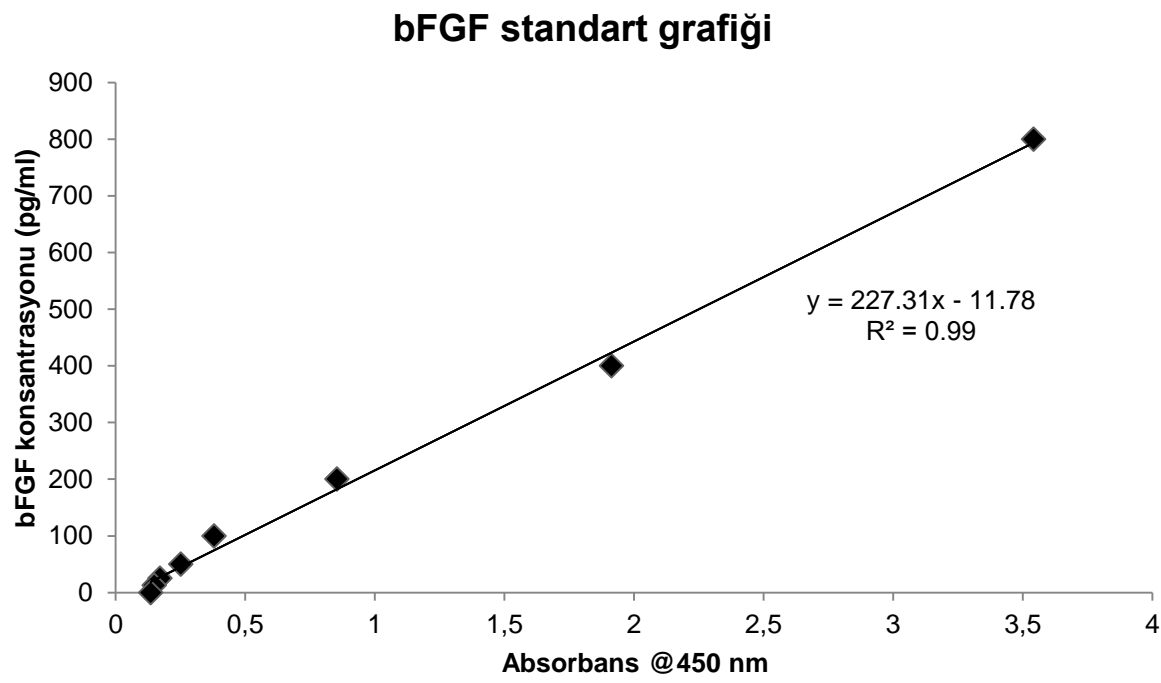
Şekil 4.43. VEGF ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin salgıladıkları VEGF konsantrasyonları

Olgun ve sağlıklı keratinositlerin VEGF salgıladıkları bilinmektedir. Grafik ve tablodan görüldüğü gibi NaCMC+kollajen-kondroitin sülfat iskeleler üzerinde 4. günden itibaren VEGF ekspresyonu görülmektedir. Bu sonuç immunohistokimya boyamalarında görülen kondroitin sülfat içeren iskelelerde keratinosit belirteçlerinin daha yüksek görülmesi ile paraleldir. Sadece NaCMC+kollajen iskeleler üzerinde VEGF ekspresyonu görülmezken kondroitin sülfat içerenlerde 4. günden itibaren artarak görülmesi, bu iskele kimyasının keratinosit kültürü için çok daha uygun olduğunu işaret ediyor olabilir. Ancak ELISA protokolü kullanılarak saptanan VEGF'in keratinositler tarafından mı yoksa fibroblastlar tarafından mı salgılandığını saptanamamaktadır. Literatürde bulunan kaynaklarda fibroblastların da VEGF salgıladığı da gösterilmiştir. Her iki durumda da çift katmanlı iskele modelinde ince tabakanın kondroitin sülfat içermesinin keratinosit – fibroblast etkileşimini etkileyerek VEGF salgılanmasını tetiklediği ve sonuç olarak anjiyogeneze hazırlığı başlattığı şeklinde yorumlanabilecektir.

4.4.6.2. bFGF Ekspresyonunun Belirlenmesi

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) bir heparin bağlayıcı büyüme faktörüdür ve fibroblast büyüme faktörleri (FGFs) ailesindedir. bFGF embriyoenez sırasında gelişme ve damar bütünlüğünü korumak için gerekli olan ve aynı zamanda yara iyileşmesi, kalp-damar hastalığı ve tümör damarlanmasına katılan önemli bir anjiyogenik faktördür. Hemen hemen bütün memeli hücrelerinde kullanılan doza bağlı olarak üremeyi tetikleyici etki ettiği gösterilmiştir.

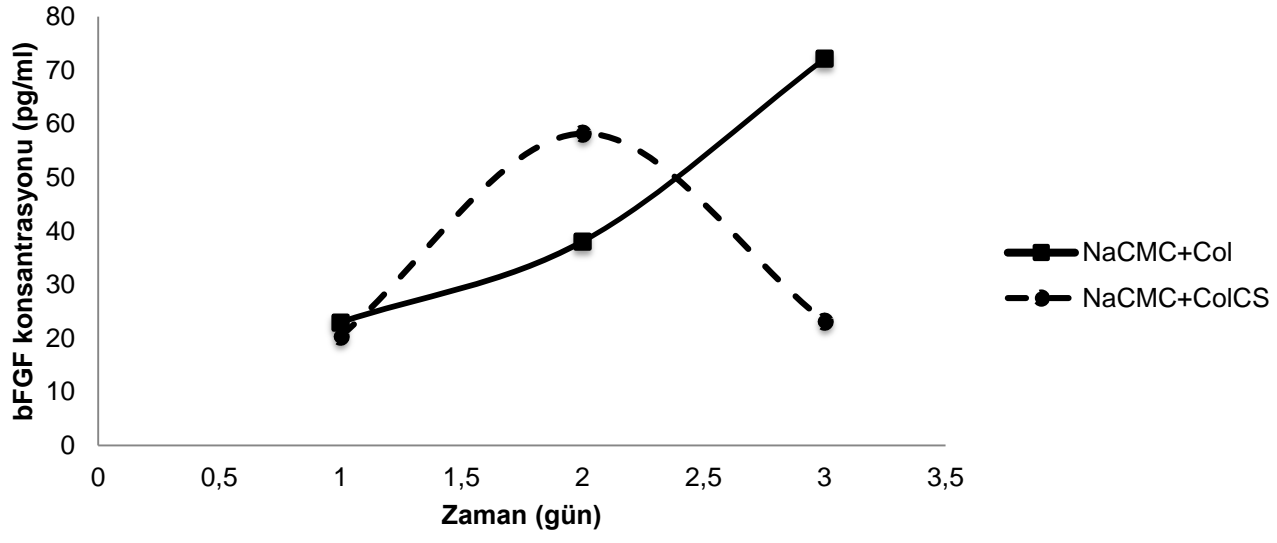
BioLegend bFGF ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirilen deneme sonucunda bilinen standartların konsantrasyonlarına göre çıkarılan standart grafiği Şekil 4.42'te gösterilmiştir. Bu standart grafiğinden elde edilen denklem, çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin bFGF ekspresyonlarının absorbanslarıyla birleştirilerek bFGF konsantrasyonları pg/mL cinsinden belirlenmiş ve Tablo 4.4 ve Şekil 4.43'de gösterilmiştir. Buna göre NaCMC ve kollajen çift katmanlı iskelelerdeki bFGF konsantrasyonunun günden güne arttığı ve 7. günde 72,1 pg/mL konsantrasyona ulaştığı belirlenmiştir. NaCMC, kollajen ve kondrotin sülfattan oluşan çift katmanlı iskelede ise 4. günden sonra bFGF konsantrasyonunda bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.42. bFGF ELISA testine göre standart grafiği

Tablo 4.4. Çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin bFGF ekspresyonları

Zaman (gün)	İskele	Absorbans (450 nm)	Konsantrasyon (pg/mL)
1	NaCMC+Col	0,153	22,991
4	NaCMC+Col	0,219	38,054
7	NaCMC+Col	0,369	72,128
1	NaCMC+ColICS	0,141	20,331
4	NaCMC+ColICS	0,308	58,201
7	NaCMC+ColICS	0,154	23,180

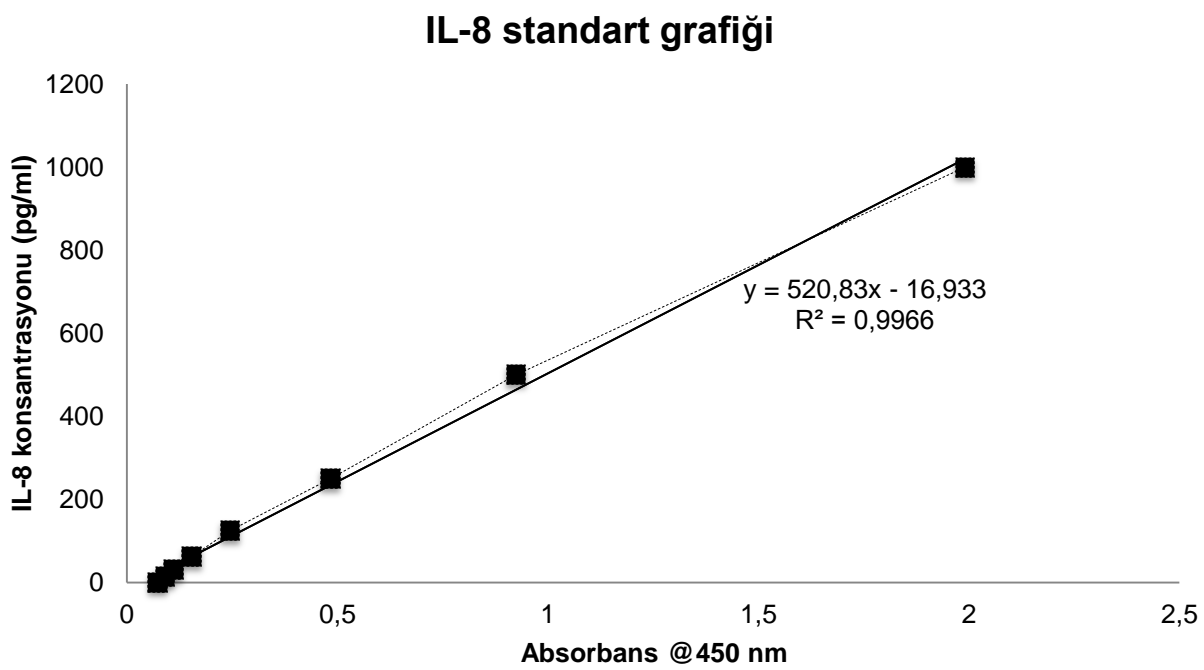


Şekil 4.43. bFGF ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin salgıladığı bFGF konsantrasyonları

4.4.6.1. IL-8 ekspresyonunun belirlenmesi

İnsan interlökin-8 (IL-8) kemokinlerin alfa (C-X-C) alt ailesinin bir üyesidir. Enflamasyonun ilk aşamalarında monositler, makrofajlar, T hücreleri, nötrofiller ve fibroblastlar tarafından üretilir. IL-8 nötrofillerin kemotaksisini teşvik eder ve hasarlı ve enfekte dokularda enflamasyona neden olur. Keratinositlerin yara iyileşmesi sürecinde IL-8 salgılamayı arttırdıkları gösterilmiştir. Pek çok kaynak IL-8'in deride yara iyileşme, epitel yenilenmesi ve anjiyogenez sürecinde en önemli düzenleyicilerden olduğuna işaret etmektedir (Blumenfeld, 2000). Ayrıca IL-8 keratinositler üzerinde hem kemotaktik hem de üremeyi artırıcı etki yapmaktadır.

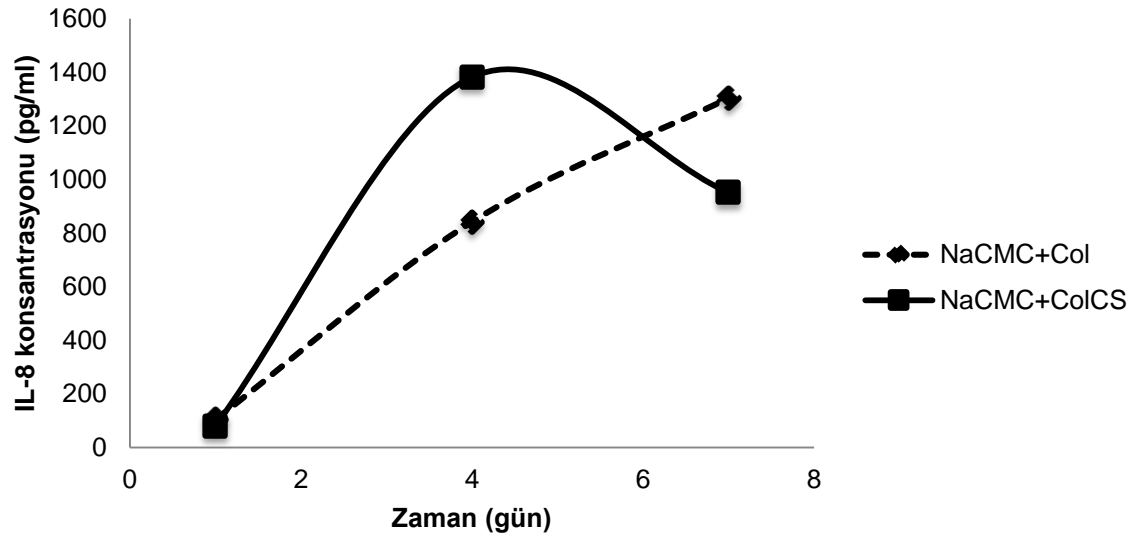
BioLegend IL-8 ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirilen deneme sonucunda bilinen standartların konsantrasyonlarına göre çıkarılan standart grafiği Şekil 4.46'de gösterilmiştir. Bu standart grafiğinden elde edilen denklem, çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin IL-8 ekspresyonlarının absorbanslarıyla birleştirilerek IL-8 konsantrasyonları pg/mL cinsinden belirlenmiş ve Tablo 4.6 ve Şekil 4.47'da gösterilmiştir. Buna göre NaCMC ve kollajen çift katmanlı iskelelerdeki IL-8 konsantrasyonunun günden güne arttığı ve 7. günde 1300 pg/mL konsantrasyona ulaştığı belirlenmiştir. NaCMC, kollajen ve kondrotin sülfattan oluşan çift katmanlı iskelede ise 4. günden sonra konsantrasyonda bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.46. IL-8 ELISA testine göre IL-8 standart grafiği

Tablo 4.6. Çift katmanlı iskelelere ekilen hücrelerin IL-8 ekspresyonları

Zaman (gün)	İskele	Absorbans (450 nm)	Konsantrasyon (pg/ml)
1	NaCMC+Col	0,170	105,214
4	NaCMC+Col	1,585	842,527
7	NaCMC+Col	2,470	1303,409
1	NaCMC+ColCS	0,123	80,735
4	NaCMC+ColCS	2,622	1382,419
7	NaCMC+ColCS	1,794	951,172



Şekil 4.47. IL-8 ELISA testine göre çift katmanlı iskelelerdeki hücrelerin IL-8 konsantrasyonları

5. SONUÇ

Deri vücudun en büyük organıdır ve hayati önem taşır. Bu organın fiziksel bariyer işlevi görerek vücudu dış etmenlerden koruma, vücut sıcaklığını dengede tutma ve vücudun normal nem seviyelerini koruma gibi önemli görevleri vardır. Yanıklardan, hastalıklardan ya da diğer deri problemlerinden kaynaklı olan deri kayıplarını tedavi etmek için bir takım yöntemler olsa da, rutin tıbbi uygulamalar kullanılarak ciddi doku kayıpları tamamen tamir edilip işlevsel bir doku üretilmemektedir. Bu nedenle, bu tip doku kayıpları için doğal ya da sentetik maddeler kullanarak derinin mikro yapısını bire bir taklit eden yapı iskelelerini doku mühendisliği yöntemleri ile yapmak hedeflenmektedir.

Bu projede de, derinin doğal organizasyonunu taklit etmek için derinin üst tabakası yerine geçebilecek, uygun bozunma hızına sahip ve mikroorganizmalara bariyer oluşturması için küçük gözenekli üretilen kollajen iskeleler kullanılmıştır. Derinin dermis tabakası için ise daha büyük gözenekli ve nem seviyesini koruyabilmesi için yüksek su tutma kapasitesine sahip olan NaCMC iskeleleri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaCMC iskeleleri (%1, %2.5 ve %5) , %1 epiklorohidrin ve DHT (140°C, 3 saat) kullanılarak çapraz bağlanmıştır. SEM ve stereo resimleri NaCMC80 süngerlerinin tabaka benzeri yapıları olduğunu fakat NaCMC20 süngerlerinin bu çalışma için ideal olan gözenekleri olduğunu göstermiştir. XLNaCMC20-5 iskelelerin gözeneklerinin birbiriyle bağlantılı ve aynı boyutta oldukları ve su tutma kapasitelerinin de %95'ten fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bütün XLNaCMC20 süngerlerinin *in situ* bozunmalarının aynı olduğu ve aralarında önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, en iyi gözenek yapısını sunan XLNaCMC20-5 süngerleri ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Tek katmanlı yapılar BLCOL ve BLCOLCS iskelelerin eklenmesi oluşturulan çift katmanlı yapıların *in situ* dayanıklılıklarını arttırdığı belirlenmiştir. DHTCOL, DHTGLUCOL, DHTCOLCS ve DHTGLUCOLCS iskeleleri 3 saat boyunca Kollajenaz tip 2 enzimi ile inkübasyonları sonrasında başlangıç ağırlıklarının %80'ini koruduğu belirlenmiştir. Bütün örneklerin basma testi sonucunda hesaplanan elastisite modülleri birbirleriyle benzer çıkmış ve yapıya DHTGLUCOL ve DHTGLUCOLCS süngerlerinin eklenmesinin sonucu değiştirmedığı görülmüştür.

Ancak *in situ* denenen bozunma testleri ile hücre kültürü ortamında iskelelerin bozunma hızı farklılık göstermiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonrası kullanılan üretim yöntemi ve/veya çapraz bağlama yönteminde değişikliklere gerek duyulduğu belirlenmiş, ancak çalışma süresinin kısa olması sebebiyle iskele üzerinde çalışmalar devam ederken keratinosit ve dermal fibroblast hücreleri ile ko-kültür çalışmalarının ancak 7 günlük sonuçları değerlendirilebilmiştir. Bu sebeple ko-kültür sonuçları proje önerisinde

belirtildiği gibi ticari insertler içinde ve sadece kollajen iskele üzerinde 28 güne kadar değerlendirilmiş, ancak çift katmanlı iskelelerin ticari deri eşlenikleriyle 28 günlük karşılaştırmaları yapılamamıştır.

Tek katmanlı kollajen iskeleler üzerinde küçük gözenekli ince tabakada epidermis tabakasının gerektirdiği gibi tek tabaka, yoğun ve poligonal morfoloji gösteren keratinosit kültürü 28 güne kadar gözlenmiştir. Tek katmanlı, büyük gözenekli kollajen iskeleler üzerinde de fibroblastların 28 güne kadar yaşatılabildiği, gözenek büyüklüğünün fibroblastların iskele içine göçüne olanak sağladığı görülmüştür. İskeleler üzerinde hem erken dönem keratinosit belirteci olan sitokeratin 8 ve geç dönem keratinosit belirteci olan sitokeratin 14 ekspresyonu görülmüştür. İki farklı yapıdaki kollajen iskeleler bir araya getirildiğinde hedeflenen çift katmanlı deri yapısına ulaşılabilmektedir. Bu iskeleler üzerinde keratinosit ve fibroblastların ekim süreleri ve ko-kültür koşulları optimize edilerek çift katmanlı deri modeli için başarıyla uygulanabilecek bir ko-kültür protokolü üretilmiştir. Yazım aşamasında olan makale aracılığıyla bu protokolün kendi ekibimiz ve farklı ekipler tarafından, değişik iskele tipleri ile de kullanılması için literatüre kazandırılması sağlanacaktır. Gelecek çalışmalarda ko-kültür protokolünün geliştirilerek deri dokusunu oluşturan diğer hücre tiplerinin de kültür kapsamına kazandırılması hedeflenmektedir.

İmmunohistokimyasal boyamalar NaCMC + kollajen ve NaCMC + kollajen-kondroitin sülfat çift katmanlı iskeleler üzerinde 7 günlük ko-kültür sonrası keratinositler için belirteç protein olan transglutaminaz ve fibroblastlar için belirteç proteinler olan kollajen 1 ve kollajen 3'ün bütün iskele tiplerinde salgılandığını göstermektedir. Ancak keratinosit belirteci olan transglutaminaz ve iki hücre tipi etkileşimin başladığının göstergesi olarak kabul edilen laminin, kondroitin sülfat içeren iskeleler üzerinde daha kuvvetlidir.

ELISA testleri aracılığıyla çift katmanlı iskeleler üzerinde keratinosit – fibroblast ko-kültüründe toplam VEGF, bFGF ve IL-8 salgılanma miktarlarının 7 günlük dağılımları elde edilmiştir. Ancak salgılanmanın hangi hücre tipi tarafından yapıldığını ayırt etme şansımız yoktur. Üç büyüme faktörünün görevleri değerlendirilip immunohistokimyasal boyama ve SEM sonuçlarıyla karşılaştırıldığında NaCMC + kollajen–kondroitin sülfat iskeleler üzerinde keratinosit hücrelerinin daha hızlı üreyerek yüzeyde sürekli bir katman oluşturduğu görülmektedir. Bu katman derinin üst tabakası olan epidermis morfolojisine benzemektedir. NaCMC + kollajen – kondroitin sülfat iskeleler üzerinde 4. günden itibaren görülen VEGF salgılanmasındaki artış iki hücre tipinin etkileşimlerinin anjiyogeneze hazırlığı tetiklediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak bFGF ve IL-8 salgılanması NaCMC + kollajen iskeleler üzerinde 7 güne kadar artarken NaCMC + kollajen – kondroitin sülfat iskeleler üzerinde 4. günden itibaren düşmüştür. Bu sonuç da gene kondroitin sülfat etkisiyle keratinositlerin hızlı üremesi ve 4. günde iskele yüzeyini tamamen doldurarak epidermis benzeri bir morfolojiye ulaşması ile ilişkilendirilebilir. Her iki büyüme faktörünün de keratinositler üzerinde üremeyi tetikleyici etkisi vardır. Keratinosit katmanı tamamlandığında bu büyüme faktörlerinin salgılanmasının da azalması beklenmektedir.

Kondroitin sülfat eklenmesinin kollajen iskelelerin keratinosit kültürü için oldukça olumlu etkileri belirlenmiş, kollajen-kondroitin sülfat, küçük gözenekli yapının epidermis katmanı olarak ideal bir doku iskelesi olduğu gösterilmiştir. NaCMC iskelelerin kullanılan üretim yöntemiyle kültür şartlarında hedeflenen süreden önce bozunması keratinosit – fibroblast etkileşimlerinin daha uzun süreli incelenmesine olanak vermemiştir. Ancak NaCMC kullanılarak gerek iskele kimyası gerekse gözenek büyüklüğü ve gözeneklilik yapısı olarak dermal fibroblast kültürüne uygun iskeleler elde edilmiştir. İlerleyen çalışmalarda farklı üretim ve/veya çapraz bağlama yöntemleri denenerek NaCMC iskelelerin bozunması yavaşlatılarak ko-kültür süresi uzatılıp iki hücre tipi arasındaki etkileşimin uzun süreli olarak incelenmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Agren, M.S., Steenfos H.H., Dabelsteen, S., Hansen, J.B. and Dabelsteen, E. 1999. "Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent", *The Journal of Investigative Dermatology*, 112(4): 463-469.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 2002. "Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix". *Molecular Biology of the Cell*. Editors: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. New York: Garland Science.
- Atiyeh, B.S., Hayek, S.N. and Gunn, S.W. 2005. "New technologies for burn wound closure and healing review of the literature", *Burns*, 31(8): 944-956 .
- Auger, F., Lacroix, D. and Germain, L. 2009. "Skin substitutes and wound healing", *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(2):94-102.
- Barker, C.L., McHale, M.T., Gillies, A.K., Waller, J., Pearce, D.M., Osborne, J., Hutchinson, P.E., Smith, G.M. and Pringle, J.H. 2004. "The development and characterization of an in vitro model of psoriasis", *J. Invest. Dermatol.* 123(5): 892–901.
- Bartkova, J., Gron, B., Dabelsteen, E. and Bartsch, J. 2003. "Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing", *Archives of Oral Biology*, 48(2): 125-132.
- Bellas, E., Seiberg, M., Garlick, J. and Kaplan, D.L. 2012. "In vitro 3D full-thickness skin equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials", *Macromolecular Bioscience*, 12(12): 1627-1636.
- Bello, Y.M. and Falabella, A.F. 2003. "The role of Graftskin (Apligraf®) in difficult-to-heal venous leg ulcers". *J. Wound Care* 11(5): 182–183.
- Bessou, S., Surleve-Bazeille, J.E., Pain, C., Donatien, P. and Taieb, A. 1996. "Ex vivo study of skin phototypes", *J. Invest. Dermatol.* 107(5): 684–688.
- Boyce, S.T. 2001. "Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes", *Burns*, 27(5): 523-533.
- Boyce, S.T., Kagan R.J., Greenhalg, D.G., Warner, P., Palmieri, T. and Warden G.D. 2006. "Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns", *J. Trauma* 60(4): 821–829.
- Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann T. and Reichmann E. 2010. "Tissue engineering of skin", *Burns* 36(4): 450-460.
- Brohem, C.A., Cardeal, L.B, Tiago, M., Soengas, M.S., Barros, S.B., Maria-Engler, S.S. 2011, "Artificial skin in perspective: concepts and applications", *Pigment Cell Melanoma Res* 24(1): 35-50.
- Bucala, R., Spiegel, L., Chesney, J., Hogan, M. and Cerami, A. 1994. "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair", *Molecular Medicine*, 1(1): 71-81.
- Burke, J.F., Yannas, I.V., Quinby, W.C., Bondoc, C.C. and Jung, W.K. 1981. "Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury". *Ann. Surg.* 194(4): 413–428.
- Clark, R.A. 1993. "Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair", *American Journal of Medicine*, 306(1): 42-48.
- Clark, R.A.F., Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M. and Austin, K.F. 2007. "Mechanisms of cutaneous wound repair", *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill.
- Chakrabarty, K.H., Heaton, M., Dalley, A.J., Dawson, R.A., Freedlander, E., Khaw P.T. and MacNeil S. 2001. "Keratinocyte-driven contraction of reconstructed human skin", *Wound Repair Regen.* 9(2): 95–106.
- Cotsarelis, G., 2006. "Epithelial stem cells: A folliculocentric view", *Journal of Investigative Dermatology*, 126(7): 1459-1468.
- Cuono, C., Langdon, R. and McGuire, J. 1986. "Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury", *Lancet*, 1(8490): 1123–1124.
- Dai, N.T., Williamson, M.R., Khammo, N., Adams, E.F., Coombes, A.G.A. 2004. "Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin", *Biomaterials*, 25(18): 4263-4271.
- Dalkiranoglu, S. 2011. "EGF ile desteklenmiş PCL/kollajen bazlı nanofibröz doku iskeleleri ile deri doku mühendisliği", MSc Thesis, Hacettepe University, 145 s.
- Dvir, T., <http://www.lifesciences.tau.ac.il/departments/biotech/members/dvir/dvir.html>
- Son Erişim Tarihi: 18 Mayıs 2015.
- Elias, P.M. 1983. "Epidermal lipid, barrier function and desquamation", *Journal of Investigate Dermatology*, 80: 44-49.
- Elias, P.M. 1996. "Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers", *Experimental Dermatology*, 5(4) :191-201.

- Epstein, F., Singer, A., Clark R. 1999. "Cutaneous wound healing", *New England Journal of Medicine*, 341(10): 738-746.
- Gallico, G.G., O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O. and Green, H. 1984. "Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium", *New Engl J. Med.* 311(7): 448–451.
- Gendaszewska-Darmach, E. and Kucharska, M. 2011. "Nucleotide receptors as targets in the pharmacological enhancement of dermal wound healing". *Purinergic Signal*, 7(2): 193-206.
- Green, H., Kehinde, O. and Thomas, J. 1979 "Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76, 5665–5668.
- Green, H., Rheinwald, J.G., Sun, T.T. 1977. "Properties of an epithelial cell type in culture: The epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast", *Cell Shape and Surface Architecture*, 17: 493 -500.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. and Layland, K. 2011. "Skin tissue engineering in vivo and in vitro applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4-5): 352-366.
- Harley, B.A., Leung, J.H., Silva, E.C.C.M. and Gibson, L.J. 2007. "Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds". *Acta Biomaterialia*, 3(4), 463-474.
- Harrison, C.A., Gossiel, F., Layton, C.M., Bullock, A.J., Johnson, T., Blumsohn, A. and MacNeil S. 2006. "Use of an in vitro model of tissue-engineered human skin to investigate the mechanism of skin graft contraction", *Tissue Eng.*, 12(11): 3119-33.
- Haugh, M.G., Jaasma, M.J. and O'Brien, F.J. 2009. "The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen GAG scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research A*, 89(2):363-369.
- Herndon, D.N. and Parks, D.H. 1986. "Comparison of serial debridement and autografting and early massive excision with cadaver skin overlay in the treatment of large burns in children", *J. Trauma* 26(2): 149–152.
- Herrick, S.E., Sloan, P., McGurk, M., Freak, L., McCollum, C.N. and Ferguson, M.W. 1992. "Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers" *The American Journal of Pathology*, 141(5):1085-1095.
- Horch, R., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J. and Bach, A. 2005. "Tissue engineering of cultured skin substitutes", *Journal of Cellular Molecular Medicine*, 9(3): 592-608.
- Hutmacher, W., Ng, K. and Khor, L. 2005. "Skin Tissue Engineering". *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Editors: Reis, R.L., Roman, J. New York: CRC Press.
- Hübner, G., Hu, Q., Smola, H. and Werner, S. 1996. "Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair", *Developmental Biology*, 173(2): 490-498.
- Jones, I., Currie, L. and Martin, R. 2002. "A guide to biological skin substitutes", *British Journal of Plastic Surgery*, 55(3): 185-193.
- Kinikoglu, B., Rodríguez-Cabello, J., Damour, O., and Hasirci, V. 2011. "A smart bilayer scaffold of elastin-like recombinamer and collagen for soft tissue engineering". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(6), 1541–1554.
- Krawczyk, W.S. 1971. "A pattern of epidermal cell migration during wound healing", *The Journal of Cell Biology*, 49(2): 247-263.
- Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P.J. and Stenman, S. 1980. "Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue", *Laboratory Investigation*, 43(1): 47-51.
- Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J.T. 2007. "Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering", *Chemical Engineering Research and Design* 85(7): 1051-1064.
- MacNeil, S. 2007. "Progress and opportunities for tissue-engineered skin", *Nature* 445(7130): 874-880.
- MacNeil, S. 2008. "Biomaterials for tissue engineering of skin", *Materials Today*, 11(5): 26-35.
- Mansbridge, J., 2007. "Tissue-engineered skin products", *Principles of Tissue Engineering*, 3th edition. Authors: Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. Academic Press, California.
- Marston, W.A., Hanft, J., Norwood, P. and Pollak, R. 2003. "The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial". *Diabetes Care* 26(6): 1701–1705.
- Mathes, S.H., Ruffner, H. and Hausner, U. 2014. "The use of skin models in drug development", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 70:81-102.
- Meier, F., Nesbit, M., Hsu, M.Y., Martin, B., Belle, P.V., Elder, D.E., Schaumburg-Lever, G., Garbe, C., Walz, T.M., Donatien, P., Crombleholme, T.M. and Herlyn, M. 2000. "Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF", *The American J. Pathol.* 156(1):193–200.
- Metcalfe, A.D. and Ferguson M.W. 2007. "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration", *J R Soc Interface* 4(14): 413-437.

- Mulvaney, M., Harrington, A., James, W.D., Davis, L.B., Quick, C.M. and Siegel, S.E. 1994. "Cutaneous Trauma and Its Treatment". Military Dermatology. Author: James, W.D. Washington D.C.: Office of The Surgeon General at TMM Publications.
- Murugan, R. and Ramakrishna, S. 2007. "Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation", *Tissue Engineering*, 13(8): 1845-1866.
- O'Connor, N.E., Mulliken, J.B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. and Green, H. 1981. "Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells", *Lancet*, 1(8211): 75–78.
- Pachance, J.M. and Kohn, J. 2000. "Biodegradable Polymers". Principles of Tissue Engineering. Editors: Lanza, R.P., Langer, R. and Vacanti, J. California: Academic Press.
- Papini, R. 2004. "Management burn injuries of various depths", *British Medical Journal*, 329(7458): 158-160.
- Patel, M. and Fisher, J.P. 2008 "Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering", *Pediatric Research*, 63(5): 497-501.
- Ralston, D.R., Layton, C., Dalley, A.J., Boyce, S.G., Freedlander, E. and MacNail S. 1997. "Keratinocytes contract normal human dermal extracellular matrix and reduce soluble fibronectin production by fibroblasts in a skin composite model", *Br. J. Plast. Surg.* 50(6): 408–415.
- Ralston, D.R., Layton, C., Dalley, A.J., Boyce, S.G., Freedlander, E. and MacNeil S. 1999. "The requirement for basement membrane antigens in the production of human epidermal/dermal composites in vitro". *Br. J. Dermatol.* 140(4): 605–615.
- Ramli, N.A. and Wong T.W. 2011. "Sodium carboxymethylcellulose scaffolds and their physicochemical effects on partial thickness wound healing", *International Journal of Pharmaceutics* 403(1–2): 73-82.
- Rheinwald, J.G. and Green, H. 1975. "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells". *Cell* 6(3): 331–343.
- Rheinwald, J.G. and Green, H. 1977. "Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes". *Nature* 265, 421–424.
- Roh, DH; Kang, SY; Kim, JY; et al. 2006, Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat, *J. Materials Science-Materials in Medicine* 17(6), 547-552
- Saarialho-Kere, U.K., Vaalamo, M., Airola K., Niemi, K.M., Oikarinen, A.I. and Parks, W.C. 1995. "Interstitial collagenase is expressed by keratinocytes that are actively involved in reepithelialization in blistering skin disease" *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(6): 982-988.
- Sachlos, E., Czernuszka, J.T. 2003 "Making tissue engineering scaffolds work: Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds" , *European Cells and Materials*, 5, 29-40.
- Sannino, A., Demitri, C. and Madaghiele, M. 2009. "Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications", *Materials*, 2(2): 353-373.
- Sannino, A., Pappadà, S., Madaghiele, M., Maffezzoli, A., Ambrosio, L., Nicolais, L. 2005. "Crosslinking of cellulose derivatives and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide", *Polymer*, 46(25), 11206-11212.
- Sauer, U.G., Spielmann, H. and Rusche, B. 2002. "Fourth EU report on the statistics on the number of animals used for scientific purposes in 2002 — trends, problems, conclusions", *ALTEX* 22(2): 59–67.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V and Schlegel J. 2002. "De-differentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture", *Osteoarthritis and Cartilage* 10(1):62-70.
- Shaw, T. and Martin, P. 2009 "Wound repair at a glance", *Journal of Cell Science*, 122: 3209-3213.
- Shevchenko, R., James, S. and James, E. 2010. "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction", *Journal of the Royal Society Interface*, 7(43): 229-258.
- Stadelmann W.K., Digenis, A.G. and Tobin, G.R. 1998. "Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds", *American Journal of Surgery*, 176:26S-38S.
- Stern, R., McPherson, M. and Longaker, M.T. 1990. "Histologic study of artificial skin used in the treatment of full thickness thermal injury", *J. Burn Care Rehabil.* 11(1): 7–13.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall V.S. and Jones J.M. 1998. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", *Science*, 282(5391): 1145-1147.
- Tomic-Canic, M., Agren, M.S., Alvarez, O.M., Rovee, D.T. and Maibach, H.I. 2004. "Epidermal Repair and the Chronic Wound". *The Epidermis in Wound Healing*. Editors: Rovee, D.T. and Maibach, H.I. Chicago: CRC Press.

Tomic-Canic, M., Komine, M., Freedberg, I.M. and Blumenberg, M. 1998. "Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes", *Journal of Dermatological Science*, 17(3): 167-181.

Uitto, J., Olsen, D. and Fazio, M. 1989. "Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress", *Journal of Investigative Dermatolog*, 92(4): 61-67.

http://training.seer.cancer.gov/ss_module14_melanoma/images/illu_skin01.jpg

Venugopal, J.R., Zhang, Y., Ramakrishna, S. 2006. "In-vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone/collagen nanofibrous membrane", *Artificial Organs*, 30(6): 440-446.

Yannas, I. and Burke J.F. 1980. "Design of an artificial skin. I. Basic design principles." *Journal of Biomedical Materials Research* 14(1): 65-81.

Zhong, S.P., Zhang Y.Z., Lim, C.T. 2010. "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2(5): 510-525.

TÜBİTAK
MAG - MÜHENDİSLİK ARAŞTIRMA DESTEK GRUBU SEKRETERLİĞİNE

Yürütücüsü olduğum, aşağıda bilgileri verilen 213M651 numaralı ve 'Doku Mühendisliği Yöntemi Ile Kollajen Ve Nacmc Kullanılarak Çift Katmanlı Deri Modeli Oluşturulması' başlıklı projenin Sonuç Raporu ve ekleri TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ'ne 03/07/2015 itibariyle yüklenmiştir. Sisteme yüklenen proje çıktıları, bu proje kapsamında yapılan çalışmalardan oluşan çıktıları içermektedir ve proje çıktılarında TÜBİTAK'a teşekkür edilmiştir.

İMZA

TARİH

Prof. Dr. NESRİN HASIRCI

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. NESRİN HASIRCI
Proje No:	213M651
Rapor:	Sonuç Raporu
Proje Başlığı:	Doku Mühendisliği Yöntemi Ile Kollajen Ve Nacmc Kullanılarak Çift Katmanlı Deri Modeli Oluşturulması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	AYLİN ŞENDEMİR ÜRKMEZ
Danışmanlar:	
Bursiyerler:	ILGIN KIMIZ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. BIYOTEKNOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2014 - 01/05/2015
Proje Kapsamında Katılan Bilimsel Etkinlikler:	
Proje Çıktıları:	
Sisteme Yüklenen Dosyalar:	1- FinalRapor-213M651-29-06-2015-reduced.pdf (Proje Sonuç Raporu Dosyası(PSRD)), 2- Proje_ozet_bilgi_formu.pdf (Proje Özet Bilgi Formu(PÖBF)), 3- 1.rapor_kapak_dosyasi.pdf (Gelişme Raporu Özeti (GRO))