



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN VİVO YARA MODELLEMESİNE ALTERNATİF İN VİTRO YARA
MODELLEMESİ**

**ESİLA ECE AKKAYA
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Oğuz KUL

KIRIKKALE-2022



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİVO YARA MODELLEMESİNE ALTERNATİF İN VİTRO YARA
MODELLEMESİ**

ESİLA ECE AKKAYA

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

KIRIKKALE-2022

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- o Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- o Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- o Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- o Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- o Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

ESİLA ECE AKKAYA

ÖZET

İN VİVO YARA MODELLEMESİNE ALTERNATİF İN VİTRO YARA MODELLEMESİ

Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Patolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Oğuz KUL
Ocak 2022, 71 sayfa

Bu tez çalışmasında canlı hayatı sona ermediği sürece her zaman gündemde ve güncel olacak yara ve yara iyileşmesinin in vivo modellemeye gerek kalmadan hücreler kullanılarak modellenmesi amaçlanmıştır. İn vivo modellemelerde yara iyileşme fizyolojisinin farklı olmasının ortaya çıkardığı dezavantajları kaldırmak ve canlıdaki organoid yapıyı hücre kültüründe oluşturmak için 3B kültür çalışması yapıldı. Fibroblast ve HaCaT hücre hattı kullanıldı. PRP – fibroblast, matrigel fibroblast ve fibroblast- PRP -HaCaT şeklinde iç grup yapıldı. Sferoid oluşturularak matrigel ve PRP jel hücre iskelesi tabanına oluşturulan sferoidlerden ekim yapılarak klinikte yara iyileşmesinde kullanılan aktivatör ve inhibitör maddeler etkisinde gelişimleri ve çoğalmaları incelendi. 0,24,48 ve 72. Saatlerdeki gelişimleri fotoğraflanarak ‘Image J ‘ programı ile alan ve çevre bakımından değerlendirildi.

Sonuç olarak: Kontrol grupları ve aktivatör gruplarında sferoid oluşumunun arttığı ve oluşan sferoid yapıların büyüdüğü görüldü. İnhibitör madde etkisinde olan gruplarda sferoid oluşumunun belirgin bir şekilde azaldığı oluşan sferoid yapıların ise bozulduğu belirlendi. Oluşan sferoid yapıların büyüklüğü ve çokluğu hücre hücre etkileşimlerin ve hücre matriks etkileşimlerinin artması ve iyi bir göstergesi olarak kabul edildi aktivatör maddenin eklendiği gruplardaki gelişme yara iyileşmesinde fibroblast etkinliği ile doğru orantılı olarak değerlendirildi. Yara hattına uygulanacak aktivatör maddenin o bölgede hücre etkinliğini artırarak bölgedeki hücre hücre etkileşimlerine destek olacağı inhibitör maddenin ise bu etkileşimleri azaltarak ya da bozarak yara iyileşmesini geciktireceği sonucu elde edildi. Böylelikle in vivo yara çalışmasına alternatif ve farklı hücre hatları ile ya da farklı hücre iskeleleri kullanılarak yapılacak olan 3B kültürlerin insan organoid yapısını daha iyi yansıtacağı ve hücre hücre etkileşimlerinin daha iyi gösterilebileceği in vitro modellemelerin yapılabileceği ve modellemelerin geliştirilebileceği kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: İn vivo, in vitro, 3B, hücre kültürü, yara, yara iyileşmesi

ABSTRACT

ALTERNATIVE TO EXPERIMENTAL ANIMAL STUDIES

IN VITRO WOUND MODELLING

Kırıkkale University
Graduate School of Health Sciences
Department of Veterinary Pathology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Oğuz KUL
January 2022, 71 pages

In this thesis study, it is aimed to model wound and wound healing, which will always be on the agenda and up-to-date, using cells without the need for in vivo modeling, as long as the living life does not end. In vivo modeling, a 3D cultural study was carried out to remove the disadvantages of different wound healing physiology and to create the organoid structure in the living in cell culture. Fibroblast and HaCaT cell line were used. PrP – fibroblast, matrix fibroblast and fibroblast-PRP -HaCaT were made in the form of internal group. Spheroids were created and sedimented from spheroids created at the base of matrigel and PRP gel cell scaffolding and their development and proliferation were examined under the influence of activators and inhibitors used in wound healing in the clinic. Their development in the hours 0,24,48 and 72 hours was photographed and evaluated in terms of area and environment with the 'Image J' program.

As a result: It was seen that spheroid formation increased and spheroid structures grew in control groups and activator groups. It was determined that the formation of spheroids decreased significantly in the groups under the influence of inhibitors and the spheroid structures were disturbed. The size and multiplicity of spheroid structures formed were considered to be a good indicator of the increase in cell cell interactions and cell matrix interactions, and the development in the groups in which the activator substance was added was evaluated in direct proportion to fibroblast efficacy in wound healing. It was concluded that the activator substance to be applied to the wound line will increase cell activity in that region and support cell interactions in the region, while the inhibitory substance will delay wound healing by reducing or disrupting these interactions. Thus, it was concluded that 3D cultures, which will be done with alternative and different cell lines or using different cell scaffolds, will better reflect human organoid structure and in vitro modeling can be done and modeling can be improved, where cell cell interactions can be shown better.

Keywords: In vivo, in vitro, 3D, cell culture, wound, wound healing

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yapmamda bana fikir veren ve desteklerini esirgemeyen, bir bilim insanı olarak bilgisine ve çalışmalarına her zaman saygı, hayranlık duyduğum, akademik hayata adım attığım bu ilk çalışmada yol gösterici olan çok saygı değer danışmanım Prof. Dr. Oğuz Kul'a çok teşekkür ediyorum.

Tezimin her aşamasında, en zorlandığım anlarda yanımda olan ve bana bildiği herşeyi usanmadan sıkılmadan öğreten tezimin bu günlere gelmesinde emeğini asla azımsayamayacağım hem hocam hem ablam olan Arş. Gör. Merve Bişkin TÜRKMEN'e,

Hocam olmayacak galiba, yetişmeyecek galiba diye kapısını her çaldığımda bana bir abla hatta bir anne şevkatiyle kucak açan ve her zaman beni destekleyip 'gerekirse hepimiz oturur yaparız' diyen beni her daim yüreklendiren Dr. Öğretim Üyesi Tuğçe SÜMER'e,

Patoloji Anabilim Dalına adım atmamda öncü olan ve patolojiyi sevmemi sağlayan her zaman her türlü sorunumda arayabildiğim tecrübelerini ve bilgisini benimle paylaşmaktan asla sakınmayan çok değerli hocam Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a,

Kürsümüzde ne zaman istersem kapısını çalabildiğim her zaman tecrübe ve bilgisinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Eray ALÇIĞIR'a

Benim bu günlere gelmemde maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen her anımda yanımda olan desteklerini hep hissettiren her başarımda benden daha çok mutlu olduklarını bildiğim ve hissettiğim canım annem Behiye ÜNAL ve 'kızım sen oku okumaya devam et gerekirse ceketimi satarım yine okuturum' diyen babam Mustafa ÜNAL'a

Benimle tez yapım ve yazım aşamasındaki olumsuzlukları paylaşan, zorluklarda destek olan ve benim hırslanmamı sağlayan sevgisini ve desteğini hep hissettiren çok sevgili eşim Serkan AKKAYA'ya

Teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1. DENEY HAYVANI VE DENEYSEL HAYVAN MODELİ.....	1
1.1.1. İn Vitro Modelleme	2
1.1.2.Matrigel – PRP (Platelet Rich Plasma)	3
1.1.3.Yara	4
1.1.4.Yara İyileşmesi.....	5
1.1.5.Yara İyileşme Evreleri.....	6
I. Hemostaz ve Koagülasyon Fazı	6
II. İnflamatuvar Fazı	7
III. Çoğalma (proliferasyon) Fazı	8
IV. Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı.....	10
1.2.DENEYSEL YARA MODELLERİ	12
1.2.1.İn Vivo Yara Modellemeleri	12
1.2.2.Granuloma Modelleri	13
1.2.3.İnsizyonel Yara ve Eksizyonel Yara Modelleri	13
1.2.4.Yanık Yarası ve Donuk Yarası Modelleri.....	13
1.2.5.Yara İyileşme Sürecinde Gecikmelere Neden Olan Durum Modellemeleri	14
1.3.İN VİTRO MODELLEME VE TARİHÇESİ.....	15

1.3.1.Hücre Kültürü.....	16
1.3.2.Hücre Kültürü Laboratuvar Ekipmanları.....	18
1.3.3.İn Vitro Yara İyileşmesi Modellemeleri.....	18
1.3.4.Çizik Yara Modeli.....	18
1.3.5.Damgalama Yara Modeli.....	19
1.3.6.Termal Yara Modeli.....	19
1.3.7.Elektriksel Yara Modeli.....	19
1.3.8.Optik Yara Modeli.....	20
1.4.2B ve 3B HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	20
1.4.1.2B Hücre Kültürü.....	20
1.4.2.3B Hücre Kültürü.....	21
2.MATERYAL VE METOT.....	25
2.1.L929 FARE FİBROBLAST HÜCRE HATTI ve HACAT KERATİNOSİT HÜCRE HATTI.....	25
2.2.ÇALIŞMA PLANI.....	26
2.2.1.PRP – FİBROBLAST GRUBU.....	26
2.2.2.MATRİGEL - FİBROBLAST GRUBU.....	27
2.2.3.PRP – FİBROBLAST – HaCaT GRUBU.....	29
3.BULGULAR.....	31
3.1.MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ.....	33
I. PRP ve Fibroblast Grubu.....	33
II. Matrigel – Fibroblast Grubu.....	36
III. Fibroblast – PRP- HaCaT Grubu.....	39
3.2.OLUŞAN SFEROİD YAPILARIN KARŞILAŞTIRILMASI, ALAN ve ÇEVRE ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	42
3.3.ÇİZELGELER.....	46
4.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53
KAYNAKÇA.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Yara iyileşmesinde rol alan sitokinler	6
Çizelge 1.2. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri	11
Çizelge 1.3. En çok kullanılan bazı hücre hatları	17
Çizelge 1.4. Hayvan modellemesi 2B hücre kültürü ve 3B hücre kültürü karşılaştırması	24
Çizelge 3.1. PRP- Fibroblast grubu alan karşılaştırması	45
Çizelge 3.2. PRP- Fibroblast grubu çevre karşılaştırması	45
Çizelge 3.3. Fibroblast - Matrigel grubu çevre karşılaştırması	46
Çizelge 3.4. Fibroblast - Matrigel grubu alan karşılaştırması	46
Çizelge 3.5. Fibroblast PRP - HaCaT grubu alan karşılaştırması	47
Çizelge 3.6. Fibroblast PRP - HaCaT grubu çevre karşılaştırması	47
Çizelge 3.7. Kontrol gruplarının sferoid alanlarının oluşumunun karşılaştırılması	48
Çizelge 3.8. Kontrol gruplarının sferoid çevrelerinin oluşumunun karşılaştırılması	48
Çizelge 3.9. Aktivatör gruplarının sferoid alanlarının oluşumunun karşılaştırılması	49
Çizelge 3.10. Aktivatör gruplarının sferoid çevrelerinin oluşumunun karşılaştırılması	49
Çizelge 3.11. Fibroblast(PRP)-Matrigel grubu sferoid alanlarının oluşumunun karşılaştırması	50
Çizelge 3.12. Fibroblast(PRP)-Matrigel grubu sferoid çevrelerinin oluşumunun karşılaştırması	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Yara iyileşme sürecindeki hücrelerin günlere göre dağılım grafiği.....	5
1.2. İnflamasyon evresinde yaralanmadan 3 gün sonra cilt yarası.....	7
1.3. İn vivo modellemeler yapılan canlı türleri.....	12
1.4. İn vitro modellemede kullanılan hücre kültürleri modelleri.....	16
2.1 Laboratuvar çalışması görselleri.....	27
2.2. Asılı damla yöntemiyle gömülecek olan sferoidlerin oluşturulması...	28
3.1. PRP–Fibroblast (L929) Kontrol Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	33
3.2. PRP–Fibroblast (L929) Aktivatör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	34
3.3. PRP–Fibroblast (L929) İnhibitör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	35
3.4. Matrigel–Fibroblast (L929) Kontrol Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	36
3.5 Matrigel–Fibroblast (L929) Aktivaör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	37
3.6 Matrigel–Fibroblast (L929) İnhibitör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	38
3.7 Fibroblast (L929)-PRP- HaCaT Kontrol Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	39
3.8 Fibroblast (L929) – PRP - HaCaT Aktivatör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	40
3.9 Fibroblast (L929)-PRP - HaCaT İnhibitör Grubu Sferoid oluşumu İverted Mikroskop Görüntüsü.....	41
3.10. PRP- Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72’nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri ‘Image J’ programı kullanılarak	42
3.11. PRP- Fibroblast (L929) aktivatör grubu 24,48,72’nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri ‘Image J’ programı kullanılarak	42

3.12. PRP- Fibroblast (L929) inhibitör grubu 24,48,'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	43
3.13. Matrigel -Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	43
3.14. Matrigel-Fibroblast (L929) aktivatör grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	44
3.15. HaCaT-PRP- Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	44
3.16. HaCaT-PRP- Fibroblast (L929) aktivatör grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	45
3.17. HaCaT-PRP- Fibroblast (L929) inhibitör grubu 24,48'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri.....	45

KISALTMALAR

TGF- α	Transforming growth factor alfa
TGF- β	Transforming growth factor beta
C3a	Kompleman reseptör
C5a	Kompleman reseptör
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ECM	Ekstra selüler makriks
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
°C	Santigrat derece
HEPA	High Efficiency Particulate Arresting
LEAP	Lazer etkin analiz ve işleme aleti
CO ₂	Karbondioksit
T75 Flask	75 ml Hücre kültür kabı
PRP	Plateletten zengin plazma
μ L	Mikrolitre
ml	Mililitre
μ M	Mikromolar
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
μ m	Mikrometre

1.

GİRİŞ

1.1. DENEY HAYVANI ve DENEYSEL HAYVAN MODELİ

Deney hayvanı, prosedürlerde kullanılan, serbest yaşayan veya çoğalan larva biçimleri, canlı kafadanbacaklılar ve normal fetal gelişimlerinin son üçte birlik döneminden itibaren memeliler dahil, insan olmayan herhangi bir omurgalı canlıyı ifade eder (T.C. Resmi Gazete, 15 Şubat 2014, sayı: 28914). Deneylerde kullanılan hayvan türleri genel olarak fare, rat, kobay, tavşan, kedi, köpek, tavuk, koyun, domuzdur. Bunların içerisinde en çok tercih edilenleri ise fare, rat ve kobaylardır (Altun ve Keskin, 2020).

Deney hayvanı (in vivo) modeli, hayvanlarla insanlar arasındaki biyolojik benzerlikten yararlanarak bazı fizyolojik veya patolojik olguların işleyiş ya da gelişim sürecini incelemek için tasarlanan deney düzeneğinin deney hayvanı adı altındaki hayvanlar üzerinde kurgulanması olarak tanımlanabilir (Kaya ve Çevik, 2011). Deney hayvanlarının tür düzeyinde anatomik ve fizyolojik özellikleri, farelerde immunité; köpeklerde meme tümörü ve kardiyovasküler sistem, maymunlarda ise immunité ve enfeksiyöz hastalıklar yönünden, insana benzerlikleri iyi tanımlanmıştır (Kaya ve Çevik, 2011). Deney hayvanı yara modelleri, yara oluşum ve iyileşme sürecinde gelişen kompleks olguların en iyi ve en yakın şekilde yansıttığının düşünülmesi nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır (Baktır, 2019). Yara modellerine olan ilginin bir diğer nedeni ise, yeni bir ekstrakt ya da molekül keşfedildiğinde, doku iyileşme ve reparasyonu üzerine etkinliğinin gösterilebilmesi için kolay uygulanabilir olmasıdır. Bununla birlikte, hayvan modellemesinden önce ilk hedef in vitro çalışmalar ile etkinliğin gösterilmesi olmalıdır. Deney hayvanı çalışmaları potansiyel etkinlik gösterildikten sonra planlanarak kullanılan hayvan sayısının azaltılması ve zorunlu olunmadıkça hayvan modellerine alternatif modeller kullanılması tavsiye edilmektedir (ILAR Journal, 1989).

Hayvan modellerinde birden fazla türde hayvan kullanılsa bile türler arasında histolojik farklılıklar görülmektedir. Kullanılan türler ile insanlarda bulunan yara

oluşum, gelişim ve iyileşme süreci arasında da büyük farklılıklar bulunmaktadır (Baktır, 2019). Fare, rat, hamster, kobay gibi kemirgenlerde yara iyileşmesi kontraksiyonla gelişirken, domuz ve insanlarda yara iyileşme süreci granülasyon ve epitelizasyon tabanlıdır (Reid, 2004). Yara iyileşme mekanizmasında bulunan bu değişiklik çok belirgin olsa da, bakımı ve üretimi kolay olması, aynı zamanda dirençli hayvanlar olmaları nedeniyle en sık tercih edilen deney hayvanları kemirgenlerdir (Kaya ve Çevik, 2011). Epidermis, dermis, hipodermis kalınlığı ve papillalar, subdermis, kıl siklusu insana yakın olduğundan yara iyileşmesinin incelenmesi bakımından insana en yakın deney hayvanı ise domuzdur (Harunari ve ark., 2006; Dorsett-Martin, 2004). Her ne kadar domuz insana benzer özellik gösterecek bu iki tür arasında da belirgin farklılıklar vardır; örneğin insanda ekrin ter bezleri bulunurken domuzda bulunmaz ayrıca apokrin ter bezleri insanda ve domuzda ortak olmakla birlikte bulundukları bölgeler farklıdır. Apokrin ter bezleri insanda, perineal ve aksillar bölgede, domuzlarda ise tüm vücut bölgelerinde yer alır (Zhu ve ark., 2007; Wong ve ark., 2011).

1.1.1. İn Vitro Modelleme

İn vitro, laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda anlamı taşıyan bir terimdir. İn vitro modelleme ise kontrollü bir ortamda, genellikle petri kapları, flasklar ya da test tüpleri kullanarak canlı organizmanın dışında oluşturulan modellemelerdir. İn vitro yara modellemeleri, hücre ve doku kültürleri ile 3D matrisleri kapsar ve genellikle hücreler arası iletişimi ve hücre içi sinyal iletimini değerlendirmek için kullanılır (Jing ve ark., 2014). Yara iyileşmesinde en etkin hücreler; fibroblast ve keratinositlerdir. İn vitro olarak yapılan yara modellemelerinde en çok kullanılan hücre tipleri endotel, fibroblast ve keratinosit hücreleridir; bu modellemelerde hücreler tek tek ya da kombine olarak kullanılırlar. İki boyutlu bir hücre kültüründe hücrenin aktivitenin izlenmesi çevresel faktörlerden etkilenmeden olgunun direk incelenmesine ve daha doğru sonuçlar elde edilmesine olanak sağlar (İnan ve Duman, 2020). Yara iyileşmesi sürecinde gelişen büyüme faktörlerine karşı fibroblastlarca ortama salgılanan kollajenin tipi ve miktarı, endotel proliferasyonu, yara bölgesinde iyileşme sürecinin başlamasıyla gelişen fibroblast kontraksiyonu gibi süreçler in vitro modellemelerde izlenebilir (Bettinger ve ark., 1995; Aydın ve ark., 2015). Hücrelerin bazı uyaranlara tek başına verdikleri cevap, diğer hücrelerle birlikte iken verdikleri cevaptan farklı olduğundan yara iyileşmesi araştırmalarında in vivo şartlara daha

yakın olan organ ve doku kültürü modelleri kullanılmaktadır (Bettinger ve ark., 1995; Aydın ve ark., 2015). 3D matrisler kullanılarak yapılan bu doku kültürü çalışmalarında hücre göçünün in vitro olarak üç boyutlu yara bölgesinde değerlendirilmesini sağlar (Nandi ve Brown, 2017).

1.1.2. Matrigel – PRP (Platelet Rich Plasma)

Matrigel, 1983'te Gelişimsel Biyoloji ve Anomaliler Laboratuvarı (LDBA)'na katılan Hynda Kleinman tarafından yapılan bir çalışmada Engelbreth-Holm-Swarm(EHS) tümör dokusu incelenmiş ve içeriğine bakılmıştır. EHS tümör dokusu, %20 NaCl ile hücre ve serumdan türetilen proteinlerden arındırılmış ve 2 M üre ile ekstrakte edilerek protein-protein etkileşimleri kırılmıştır (Kleinman ve ark., 1986). Ortaya çıkan materyal santrifüj edildikten sonra 37°C'ye soğutulmuş ve berrak bir materyal elde edilmiştir. Üzerine yapılan farklı çalışmalar sonrası John Hassell tarafından Matrigel olarak adlandırılmıştır. Günümüzde hala Matrigel matrisi olarak adlandırılan bu materyal, hücre kültürlerinde hücre farklılaşmasını desteklemek ve tümör hücrelerinin aktivitesini ölçmek için kullanılır. In vivo çalışmalarda ise anjiyojenik inhibitörleri ve aktivatörleri ölçmek, greft uygulamalarını iyileştirmek, hasarlı dokuları onarmak ve tümör büyümesini artırmak için kullanılmaktadır (Kleinman ve ark., 1986; Kubota ve ark., 1988).

PRP (platelet rich plasma,) alınan tam kanın ya da PRP hazırlama kitledi adı altında satılan ticari kitlerle alınan kanın santrifüje edildikten sonra kanın kırmızı elemanlarının(eritrosit) dibe çökmesi sonrasında yukarıda kalan plateletten zengin plazma kısmıdır (Paoloni ve ark., 2011). Plateletten bulunan biyoaktif mediatörler ve PRP kısmında bulunan bazı büyüme faktörleri nedeniyle birçok yara tedavisinde(tendon, kıkırdak, kas) ve cilt yenileme gençleştirme uygulamalarında kullanılmaktadır. PRP içerisinde normal kanın 3-5 katı oranında platelet bu plateletlerden kaynaklı dopamin, histamin, kalsiyum gibi biyoaktif mediatörler ve IGF-1, TGF- β , PDGF, VEGF, b-FGF gibi büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu nedenle PRP hücre hücre bağlarının kurulmasında, hücreler arası gen ekspresyonlarında, matriks sentezinde rol almaktadır (Rees ve ark., 2006; Foster ve ark., 2009).

1.1.3.Yara

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır (Robson ve ark., 2001). Yara oluşumu dokuya uygulanan kuvvet ile orantılı şekilde yüzeysel olarak ya da derin dokulara kadar ilerlemiş olarak gerçekleşebilir (Ekizoğlu ve Arıcan, 2009). Uygulanan kuvvetin derecesi ve şekline göre yara epitel doku bütünlüğünün bozulması gibi yüzeysel ya da gibi cilt altı dokuları (damar, kemik, bağ doku, kaslar) içine alacak şekilde derin olabilir (Alonso ve ark., 1996).

Yaraların Sınıflandırılması:

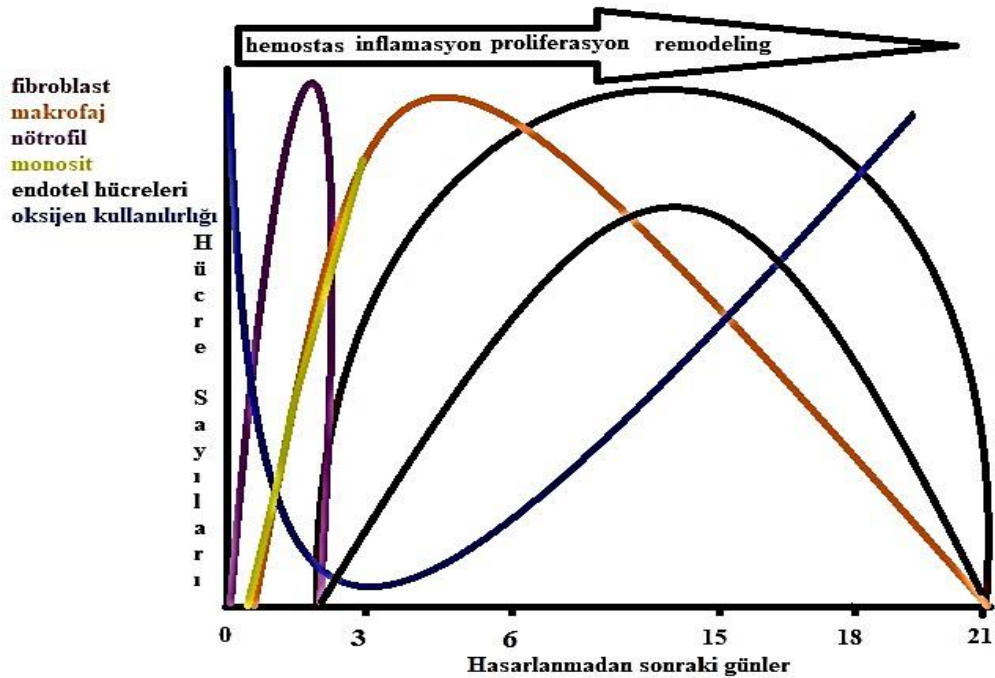
Yaralar oluşum şekli, zamanı mekanizması, uygulanan kuvvet, kuvvetin derecesi ve uygulanma şekli, yaranın iyileşme süreci bu süreçte gerçekleşen mekanizmalara göre birçok farklı kriterde sınıflandırılabilir (Dimaio ve ark., 2001;Pollack ve ark., 2000). Bu sınıflandırmalar arasında klinik olarak en çok kullanılan ise yara iyileşme sürecine göre akut yaralar ve kronik yaralar olarak sınıflandırılmasıdır (Bischoff ve ark., 1999).

Akut Yaralar: Doku üzerinde anlık gelişen bir travma sonucu ya da yapılan bir cerrahi uygulama sonucu oluşan yara hattında herhangi bir kontaminasyon etkeni bulunmayan yara hattının genellikle temiz olduğu ve iyileşme sürecinin hemen başladığı yaralardır. Akut yaralarda iyileşme yara oluşumunu takiben erken dönemde başlar iyileşme süreci fizyolojik olarak bir aksaklığa uğramadan sırasıyla gerçekleşir. Yara hattının büyüklük ve derinliğine göre 5 ile 30 gün arasında yara onarımı tamamlanmış olur (Robson ve ark., 2001;Bischoff ve ark., 1999) .

Kronik Yaralar: Yara oluşumundan sonra iyileşmenin fizyolojik sürecinin başlamasında ya da devam etmesinde gecikmelerin olduğu yara onarımının zamanında tamamlanamadığı yaralardır (Robson ve ark., 2001). Yara iyileşme sürecindeki aşamalardan biri ya da bir kaç çevresel ya da dokusal olarak karşılaştığı aksaklıklardan dolayı gerçekleşmez ya da geç gerçekleşir (Robson ve ark., 2001). Yara bölgesinde gerçekleşen çevresel veya bakteriyel kontaminasyon, yarayı oluşturan etken ya da kuvvetin sürekli olarak aynı bölgeye etkimesi, yara bölgesindeki dokuda gelişen hipoksi gibi nedenler yaranın kronik hal almasına sebep olur (Vanwijck, 2001). Kronik yaraların oluşumundaki etkenler ise sürekli bölgeye bası olması, bölgenin yeteri kadar beslenememesi, derin yanıklar ve vaskülit gibi komplikasyonlar örnek verilebilir (Komarcevic, 2000).

1.1.4. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, anatomik ya da fizyolojik olarak bütünlüğü bozulan dokunun karmaşık biyokimyasal ve hücrel olguların art arda sıralı şekilde gelişmesi ile onarımıdır (Ahmet ve ark., 2014). Yara onarımı hasardan hemen sonra başlar ve sırasıyla inflamasyon, granülasyon, reepitelizasyon, matriks oluşumu ve remodeling aşamalarının birbirini izlemesi ile gerçekleşir (Barrientos ve ark., 2008). Yara onarım sürecinin başlamasında etkili olan lokal yara faktörleri, sistemik mediatörler, sitokinler, bazı büyüme faktörleri ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin salınması rol oynar. Bu faktörler; inflamasyon, angiogenezis, fibroplazi, yara epitelizasyonu ve matriksin yeniden şekillenmesi gibi süreçlerin birbiri ardı sıra gelişmesine yardımcı olur (Monaco ve Lawrence, 2003). Yara onarımında temel olgu yara bölgesinin yeterli oksijenizasyonu ve doku perfüzyonunun sağlanması böylelikle bölgenin yeteri kadar beslenerek onarım için uygun nem oratamının sağlanmasıdır (Prisăcaru ve ark., 2013). Yara onarım sürecinin normal olarak süregelmesinde başta fibroblast ve keratinositler olmak üzere endotelial hücre, makrofaj ve trombositler gibi birçok hücre tipinin koordineli olarak çalışması gerekmektedir (Barrientos ve ark., 2008).



Şekil 1.1. Yara iyileşme sürecindeki hücrelerin günlere göre dağılım grafiği (Bu şekil <http://fizyoaktif.com.tr/?p=965> (2022) web sitesinden uyarlanmıştır.)

Çizelge 1.1.Yara iyileşmesinde rol alan sitokinler (Robson 2001)

Yara İyileşmesinde Rol Alan Sitokinler
Fibroblast büyüme faktörü
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
Transforme edici büyüme faktörü
Epidermal büyüme faktörü
İnsülin benzeri büyüme faktörü
Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
İnterlökinler

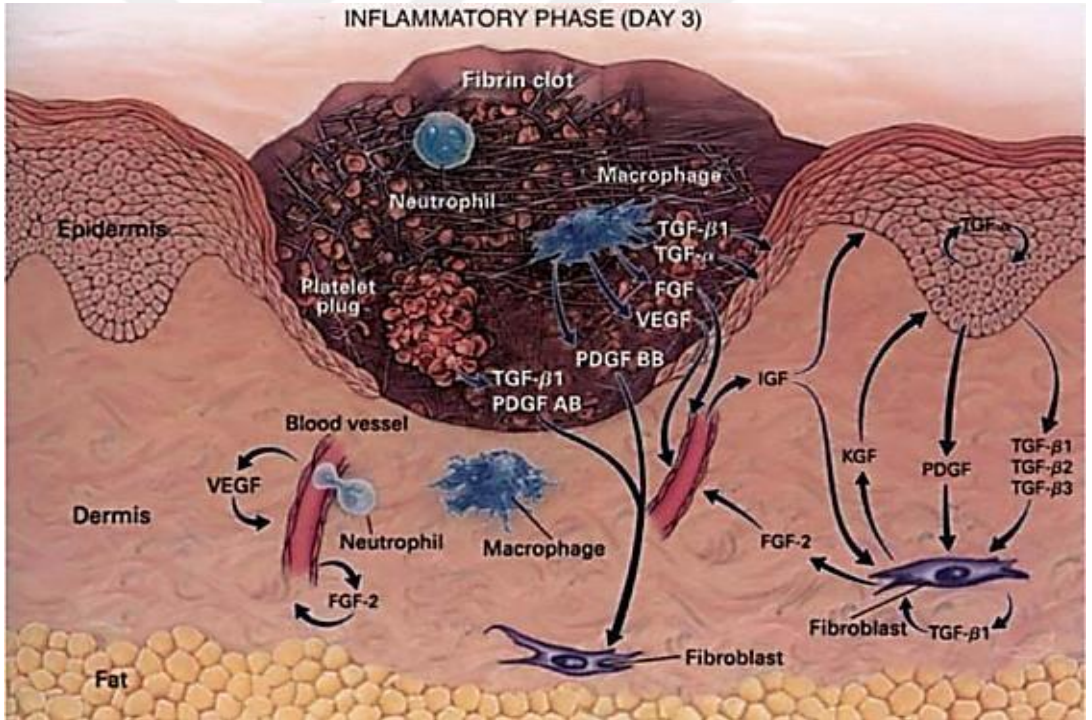
1.1.5. Yara İyileşme Evreleri

Yara iyileşme süreci, yaranın bulunduğu bölgeye, yaranın derinliğine, etkilenen doku ve organlara göre farklılık gösterir ve aşağıdaki dört ana fazda gerçekleşir (Werner ve Grose 2003).

I. Hemostaz ve Koagülasyon Fazı: Yaralanmanın hemen ardından başlayan ve hem yara hattında fazla kan kaybını önlemek, hem de hayati organları korumak için bölgedeki endotelin etkisiyle damar düz kas hücrelerinin ani ve geçici bir vazokonstriksiyon oluşturmasıyla başlayan fazdır (Clark, 1985). Oluşan vazokonstriksiyon ile kanama minimum seviyeye indirgenir ya da durur (Sherris ve Kern, 1999). Oluşan yaradan sonra damar endotelinde meydana gelen hasardan subendotelyal ekstraselüler matriks açığa çıkarak trombositlerin aktive olarak birbirine yapışması ve agregasyonuna neden olur (Coşkun ve ark., 2016;Kenneth, 2012). Subendotelyal matriks içeriğindeki von-Willebrand faktörü (vWF) ve doku tromboplastini trombositlerin subendotelyal kollajenlere yapışmasını sağlar aynı zamanda ADP ve tromboksan A₂'yi aktive ederek trombositlerin agregasyonunu da sağlamış olur. Böylelikle damar endotelinde oluşan hasar bölgesi doldurularak birincil hemostatik tıkaç meydana getirilmiş olur (Kenneth, 2012). Fibrin tıkaç oluşumu için hemostatik olaylarla beraber koagülasyon aşamaları da aktive edilir (Baum ve Arpey, 2005). Hasarlı damar endotelinden açığa çıkan trombositler ve diğer ekstraselüler matriks bileşenleri kollajenle temasa geçerek fibronektin, fibrin, vitronektin ve trombospondinlerin pıhtı oluşumunu, böylelikle ikincil hemostatik tıkaç oluşumu sağlamış olur (Robson ve ark., 2001). Pıhtı oluşumu ve trombositler hemostatik ve inflamatuvar fazların sonraki aşamalarında hücre migrasyonu için

geçici bir matriks sağlamış olurlar (Monaco ve ark., 2003;Dubay ve ark.,2003). Trombositlerin alfa granülleri; platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü ve insülin-benzeri büyüme faktörü gibi sitokin ve büyüme faktörlerini ihtiva eder (Broughton ve ark. 2006). Bu moleküller yara onarım sürecine ilk olarak nötrofilleri daha sonra da makrofaj, endotel hücreleri ve fibroblastları aktive ederek yara bölgesine çeker. Trombositler vasküler geçirgenliği yüksek vazoaktif aminler ile inflamasyon sırasında sıvının damar dışına çıkmasını sağlar (Richardson, 2004). Bu faz 1 ile 4 gün içerisinde tamamlanır (Coşkun ve ark., 2016)

II. İnflamatuvar Fazı: Hunter tarafından 1794’de yangı bulguları (kızarıklık, ödem, ısı ve ağrı) ile karakterize ettiği iyileşme evresidir (Monaco ve ark., 2003). Bu fazda bölgeye inflamtuvar hücrelerin gelmesi sağlanarak dışardan gelen etkenlere karşı immun bariyer oluşturulur (Hart, 2002).



Şekil 1.2. İnflamasyon evresinde yarananmadan 3 gün sonra cilt yarası. Yaraya göçü sağlayabilmek için gerekli hücreler ve büyüme faktörleri (Bu şekil <http://fizyoaktif.com.tr/?p=965> (2022) web sitesinden alınmıştır)

İnflamatuvar faz iki bölümde incelenebilir:

a) Erken İnflamatuvar Faz: Hemostaz ve koagülasyon fazının hemen ardından başlayarak yara hattına nötrofil infiltrasyonunu sağlayan fazdır. Nötrofiller, yara bölgesine ilk olarak gelen ve akut inflamasyonu başlatan lökositlerdir. Nötrofiller yara bölgesinde enfeksiyon etkeni varsa ilk birkaç dakikada, enfeksiyon etkeni yoksa birkaç saat ile 6 saat içinde; TGF- β , C3a ve C5a, bakteriyel ürünler, sitokinler ve trombositlerin etkisi gibi kemotaktik ajanlarla 24-36 saat içerisinde yara bölgesine göç ederler. Yara oluşumundan 24-48 saat sonrasında pik seviyeye ulaşırlar ve doku hasarının 3 ncü gününden sonra yara hattından çekilmeye başlarlar (Barrientos ve ark., 2008;Robson ve ark., 2001). Böylelikle kompleman sistem aktive edilmiş olur (Broughton ve ark., 2006). Nötrofiller yara hattındaki hasarlı dokuyu, yabancı partikülleri, bakterileri fagosit ederek ortamdaki yabancı mikroorganizma yükünü azaltır ve yara iyileşmesinin normal süreçte gelişmesi sağlanmış olur (Robson ve ark., 2001;Hart 2002). Endotel hücrelerinden salınan kemokinler ve integrinler yüzey adezyonunu başlatırlar. Nötrofiller kan akışı boyunca yuvarlanarak yara bölgesinde bulunan post kapiller venüllerdeki endotel hücrelerine bağlanmaya başlarlar ve sabit hale gelirler. Sabit hale gelen nötrofiller diapedez ile endotel hücrelerinin arasından geçerler (Hart, 2002;Flangan, 2000). Görevlerini tamamlayan nötrofiller yara iyileşmesinin sonraki fazına kadar ortamdan çekilirler. Yara bölgesinde kalan apoptotik kalıntılar ve hücre kalıntıları makrofajlar ile fagosit edilerek ortamdan uzaklaştırılırlar (Robson ve ark., 2001;Diegelmann ve ark., 2004).

b) Geç İnflamatuvar Faz: Trombosit ve nötrofillerden salınan TGF- β kemotaktik etkisiyle monositleri yara bölgesine çeker. Yara bölgesine gelen monositler matrofajlara dönüşerek, bakterilerin yok edilmesini ve yara yerindeki kalıntıların atılmasını sağlarlar. Geç inflamatuvar fazda (yara oluşumundan72 saat sonra) interlökin-1'in (IL-1) etkisi ile yara bölgesine en son olarak lenfositler gelir (Alves ve ark., 2010).

III. Çoğalma (proliferasyon) Fazı: İnflamasyon fazından hemen sonra başlayan ve nekrotik doku ve oluşan pıhtının kaybolup granülasyon dokusunun oluşumu ile karakterize olan fazdır. Yara onarımı için oluşan granülasyon dokusu makroskobik olarak görünür hal almıştır. Çoğalma fazı yara oluşumunu takip eden 3 ncü gün başlar ve 2 hafta kadar sürer. Proliferatif fazda etkin

rol alan hücresel olaylardır; fibrin ve fibronektinden oluşan ekstraselüler matriks bir ağ görevi görmek için birikmesi ve fibroblastların göçü ile karakterizedir (Li ve ark., 2007; Karasu ve ark., 2008). Proliferatif faz 4 başlık altında ele alınabilir (Diegelmann ve ark., 2004):

a) Fibroblast Göçü: Yaralanma sonrası inflamatuvar hücreler ve trombositler tarafından salınan TGF- β ve PDGF gibi faktörler tarafından çevre dokuların uyarılması ile yara bölgesine fibroblast ve myofibroblast göçü başlar (Goldman, 2004; Witte ve ark., 1997). Yara bölgesinde sayıları artan fibroblastlar, matriks proteinleri, hyaluran, fibronektin, proteoglikan, tip1 ve tip3 prokollajen üretimini aktive ederler (Robson ve ark., 2001; Ramasastry, 2005). Bir haftalık sürenin sonuna kadar hücre göçünü aktive eden ve yara onarımının başlaması için gerekli olan ekstraselüler matriks yara hattında birikir ve fibroblastlar myofibroblastlara dönüşür (Coşkun ve ark., 2016). Myofibroblastlar pseudopod uzantılarıyla fibronektin ve kollajene bağlanarak aktin destekleri oluşturur (Ramasastry, 2005). Bu desteklerle meydana gelen yara kontraksiyonu yara kenarlarını birbirine yaklaştırır. Bölgede fazlaca bulunan fibroblastlar ise apoptoza uğrayarak ortamdan kaybolur (Greenhalgh, 1998).

b) Kollajen Sentezi: Kollajen sentezi fibroblastlar tarafından gerçekleştirilir ve yara iyileşme sürecinin her aşamasının temelini oluşturmaktadır. Hücre içi matriks oluşumu, yara onarımının proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarında dokuların bütünlük ve güç kazanmasını sağlar (Baum ve ark., 2005; Eming ve ark., 2014). Yaralanmamış dermiste %80 tip1 ve %25 tip3 kollajen bulunurken, yara granülasyon dokusunda %40 oranında tip3 kollajen bulunmaktadır (Robson ve ark., 2001).

c) Anjiogenez ve Granülasyon Dokusu Oluşumu: Anjiyogenez, yaraya bitişik önceden var olan damarların filizlenmesiyle yeni damar oluşması anlamına gelir; yeni kan damarlarının oluşumu yara onarımında kritik bir öneme sahiptir (Li ve ark., 2007; Takeshita ve ark., 1994). Endotel hücreleri FGF, VEGF, PDGF, anjiogenin, TGF- α ve TGF- β gibi anjiogenik faktörlerle aktive olsa da bu olay anjiostatin ve steroid gibi inhibitörlerin etkisi ile dengede tutulur (Oike ve ark., 2004). İnhibitör ve aktivatör ajanlar direkt olarak endotel hücrelerinin çoğalmasında etkili iken indirekt olarak da EGF'yi serbest bırakmak için konak hücreleri uyararak mitozu aktive ederler (Li ve ark., 2005). Hipoksik olgularda yara iyileşmesinde ise proliferasyon

fazını ve endotelial hücrelerin büyümesini aktive eden moleküller yara hattının çevresindeki dokudan salgılanırlar. Hipoksik olgularda çevre dokulardan salgılanan moleküllere yanıt dört adımlı bir mekanizmayla gerçekleşir. Birinci olarak ana damarda bazal laminayı parçalamak için endotelial hücreler tarafından proteaz üretilir, böylelikle ekstraselüler matriks boyunca moleküller ilerleyebilir. Bu aşamadan sonra FGF ve VEGF'nin aktif rol aldığı kemotaksis, çoğalma, yeniden yapılanma ve farklılaşma aşamaları gelir (Takeshita ve ark., 1994). Yara merkezinde damar kaynağı olmadığından bölgenin beslenmesi yara etrafındaki dokularda bulunan damarlardan sağlanır. Yara etrafında birkaç günde mikrovasküler bir ağ oluşur. Hücre iskeleti organizasyonu, sinyal iletimi ve hücre adezyonu bu mikrovasküler ağda bulunan fiziksel ve kimyasal maddelerce düzenlenir. Kemotaksis, mekanotaksis ve haptotaksis düzenlemede etkili olan mekanizmalardır (Li ve ark., 2005;Krizbai ve ark., 2000). Bu mekanizmaların devreye girmesiyle migrasyon oluşur. Hücre hareketlilik; hücre önünde uzantı (protrüzyon), subtratum aktin hücre iskeletini eklemek için adezyon ve final traksiyon(çekiş) şeklinde gerçekleşir. EGF, TGF-alfa, VEGF, anjiopietin-1, fibrin ve lipid büyüme faktörleri hücre büyümesinde, yara bölgesinde yeniden damar gelişiminde ve hasarlı damarın onarımında mediatör olarak rol alırlar (Holly ve ark., 2000;Wolgemuth, 2005).

IV. Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı: Yara oluşumunu izleyen birkaç saat içerisinde yara etrafında epitelial hücrelerde yoğun mitotik aktivite başlar. Yara bölgesine yoğun bir epitelial hücre göçü olur. Bu hücrelerin birleşmesiyle bazal membran oluşur ve hücre göçü durur (Diegelmann ve ark., 2004;Baum ve ark., 2005). Remodeling fazının en önemli göstergesi makroskopik olarak görülebilen epitel ve skar dokusu oluşumudur. Bu faz yaranın oluşumuna ya da iyileşme sürecine göre bir ay ya da birkaç yıl sürebilir (Ramasastry, 2005). Remodeling fazında sırasıyla hücre içi matriks olgunlaşır, kollajen demetlerinin çapı artar, hyaluronik asit ve fibronektin parçalanır. Yaranın gerilme kuvveti artar (Baum ve ark., 2005). Yaralanan doku orjinal gücünü tam olarak kazanamaz ve iyileşen yara alanı maksimum %80 oranında gücünü geri kazanır (Robson ve ark., 2001). Kollajenin sentezi, yıkımı, ekstraselüler matriksin yeniden yapılanması, yaralanmayı takiben sürekli yinelenir fakat 3 hafta sonra kararlı duruma gelme eğilimindedirler. İlk kollajen matriks oluşumu düzensiz, sonrasında gelişenler ise iyi bir organizasyona

sahiptirler ve zamanla çarpaz bağlantılar gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ile fibroblastlar arası oluşan bağ doku sonucu yara boşlukları yaklaşır (Greenhalgh 1998). Bu süreç PDGF, TGF- β ve FGF gibi faktörlerle düzenlenir. Fibroblast ve makrofajların sayısı yara bölgesinden apoptoz ile azaltılır. Kılcal damarların büyümesi durur, kan damarları ve hücrelerin sayısı azalırken dayanıklılığı artar böylelikle skar doku oluşumu gerçekleşir (Baum ve ark., 2005;Hart, 2002).

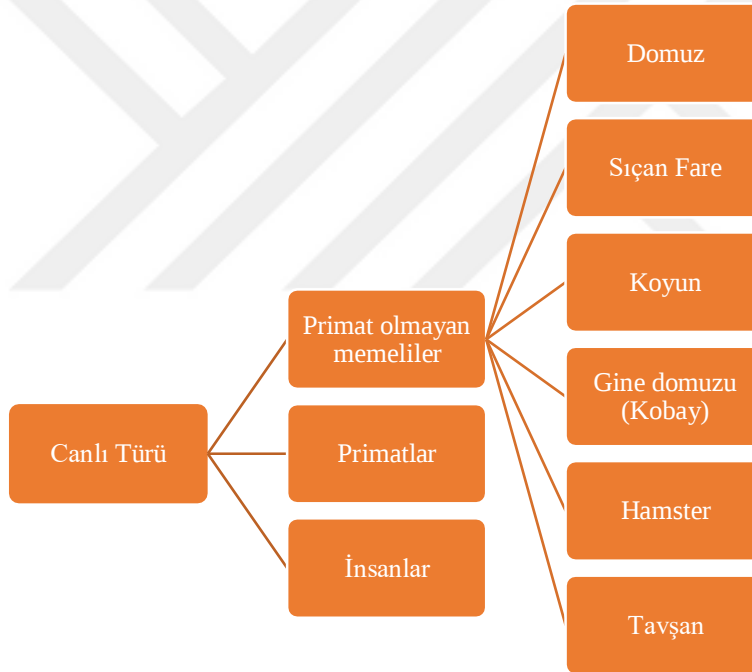
Çizelge 1.2. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri (Werner S, Grose R. ‘Regulation of wound healing by growth factors and cytokines’ den Türkçe’ye uyarlanmıştır.)

Büyüme Faktörü Kökeni Fonksiyonu	Kökeni	Fonksiyonu
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Makrofajlar, Endotelyal Hücreler	Anjiogenez ve fibroblast çoğalması
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Trombositler	Fibroblast, endotelyal ve epitelyal hücreler için mitotik uyarıcı
Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)	Fibroblastlar	Epitelyal hücreler için mitotik uyarıcı
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Trombositler Makrofajlar Makrofajlar Endotel hücreleri Fibroblastlar	Makrofaj aktivasyonu Damar düz kası ve fibroblastlar için mitojenik etkili
Transforme Edici Büyüme faktörü-Beta (TGF-β)	Epidermal hücreler	Makrofajlar Anjiogenik faktördür, epitelyal hücreler ve fibroblastlar için mitojeniktir
Tümör Nekrozis Faktör (TNF)	Nötrofil Makrofaj	Büyüme faktörlerinin ekspresyonunun uyarılması, nötrofil ve makrofaj aktivasyonu
Transforme Edici Büyüme faktörü-Beta (TGF-α)	Trombositler, Makrofajlar	Fibrozis ve yara geriliminde artış
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	Epidermal hücreler, Makrofajlar	Endotel hücrelerinin mitojenitesini ve damar geçirgenliğini artırır.

1.2. DENEYSEL YARA MODELLERİ

Model kavramı, Türk Dil Kurumu tarafından “gerçeğin aslına benzeyen bir örnek” olarak tanımlanmaktadır. Yara modellemesi bu açıdan düşünülürse in vivo ya da in vitro olarak geliştirilen yara benzeri özellik gösteren olgulardır. Yara ve yara iyileşme süreci ile ilgili değerlendirme yapılırken genellikle in vitro yara modellemeleri ya da in vivo (hayvan) yara modellemeleri kullanılır. Bu modellemeler insanlardaki yara oluşumuyla birebir benzerlik göstermediği gibi kendi içerisinde de önemli farklılıkları, avantaj ve dezavantajları vardır (Aydın ve ark., 2014). Yara modeli yapılacak olan çalışmaya, incelemeye, mekanizmaya, kullanılacak olan materyale göre tercih edilmelidir (İnan ve ark., 2020).

1.2.1. İn Vivo Yara Modellemeleri



Şekil 1.3. İn-vivo modellemeler yapılan canlı türleri

In vivo (deney hayvanı) yara modelleri, yara oluşumunu ve doku onarımını fizyolojik yönden en iyi taklit edebilen kompleks koşulları düşünüldüğü için günümüzde yara oluşumu ve yara iyileşmesini incelemede en fazla tercih edilen modellerdir (Baktır 2019).

1.2.2. Granuloma Modelleri

Genellikle uygulanan polivinil alkol sünger implant, selüloz sünger implant gibi implantların oluşturduğu inflamatuvar yanıtı ve salgılanan kollajen miktarını incelemek için yapılan modellemelerdir. İmplantlar deney hayvanlarında deri altına yerleştirilir ve bu bölgede biriken kollajen miktarı ve oluşan inflamtuvar yanıtı bölgeden belirli zaman aralıklarında örnekler alarak bakılır (Diegelmann ve ark., 1986;Kurkinen ve ark., 1980).

1.2.3. İnsizyonel Yara ve Eksizyonel Yara Modelleri

Bu tür modeller yara hattında oluşan gerilim kuvvetini ölçmek için kullanılır. Yara gerilim kuvveti yara kenarında santimetre kare alana kilogram olarak uygulanan kuvvetle ölçülür (Aydın ve ark., 2015). Kullanılan deney hayvanı üzerinde insizyonel yara oluşturulur bu yara ya açık bırakılır ya da primer sütur atılır. Yara hattında belirli zaman aralıklarıyla ölçümler yapılır. Genellikle bölgesel topikal ilaç uygulamalarının etkisi, sistemik ilaç uygulamalarının etkisi gibi durumlar değerlendirilir (Wong ve ark., 2013;Kilpadi ve ark., 2014).

Klasik yara oluşum ve iyileşme evrelerini gözlemlemek için yapılan modellemelerdir. Kullanılacak olan deney hayvanı üzerinde oluşturulan açık yara hattının sürece bağlı iyileşme evreleri, yara üzerindeki etkileri değerlendirilmek istenen materyallerin etkileri, farklı derinlikteki yaraların iyileşme süreçleri aynı hayvan üzerinde oluşturulan birden fazla yarada birden fazla ajanın değerlendirilebilmesi gibi faktörlerin analizi için tercih edilir (Greenhalgh, 2005; Galiano ve ark., 2004).

1.2.4. Yanık Yarası ve Donuk Yarası Modelleri

Yanık olgularında yara iyileşme süreci, oluşan termal yaraya verilen tepki, yanık yara hatlarında sistemik yanıtlar veya yanık oluşturma sonrası gelişen sepsis gibi olguların incelenmesi için yapılan modellemelerdir. Yanık yaraları modellemelerinde deney hayvanlarında farklı derinlikte, farklı yüzey alanlarına sahip ya da farklı kalınlıkta yaralar oluşturulur. Yanık oluşturmak için genellikle istenilen yanık derecesine ve kalınlığına göre farklı derecelerde sıcaklıklar uygulanır. Yara oluşturulmasında kaynar su, elektrik, sıcak cisim ve alev uygulamaları en çok tercih edilenlerdir (Greenhalgh, 2005;Galiano ve ark., 2004).

Donma olgularında gelişen doku harabiyetinin değerlendirilmesi için kullanılır. Kullanılacak olan hayvanın derisine soğutulmuş bir cisim dokundurularak yara oluşturulur ve oluşan yara üzerinde inceleme yapılır (Auerbach ve ark., 2013).

1.2.5. Yara İyileşme Sürecinde Gecikmelere Neden Olan Durum Modellemeleri

Yara iyileşme sürecinde gecikmelere neden olan diyabet, beslenme eksikliği, malnütrüsyon, iskemi, yara hattında gelişen enfeksiyon, kullanılan kemoterapötikler, radyasyon gibi faktörlerin incelenmesi için yapılan modellemelerdir. İskemi modellemelerinde, yara bölgesinin yeterince kanlanması önleyerek oksijenizasyon azaltılır, bunun için damar ligasyonu ya da flep modeli kullanılır (Corral ve ark., 1999;Serin ve Bayramiçli, 2018). Diyabet yaraları için hayvanlarda diyabet oluşturulur bunu için genellikle ilaçlara ve genetik faktörlerin değiştirilmesine başvurulur. Diyabet gelişen hayvanda hangi yara modeli incelenmek istenirse modellemesi yapılır (Brown ve ark., 1994;Tsuboi ve ark., 1990). Malnütrasyon modellemelerinde hayvanların diyetle protein, K vitamini, Avitamini, çinko, esansiyel yağ asitleri gibi yara iyileşmesini etkileyen maddelerin alınması kısıtlanır (Levenson ve ark., 1984;Alvarez ve ark., 1982). Enfeksiyon modellemelerinde ise modelleme ya bölgesel olarak sadece istenen alanda ya da sistemik olarak canlıyı tamamen etkileyecek şekilde yapılır. Lokal enfeksiyon modellemesinde enfeksiyon oluşturmak istediğimiz etken lokal olarak yara hattına uygulanır; sistemik enfeksiyon modellemesinde ise en çok tercih edilenler ise CASP modeli, intraperitoneal veya intravenöz *E. coli* uygulaması ve peritonit oluşturmak için CLP yöntemidir (Levenson ve ark., 1983;Traeger ve ark., 2010).

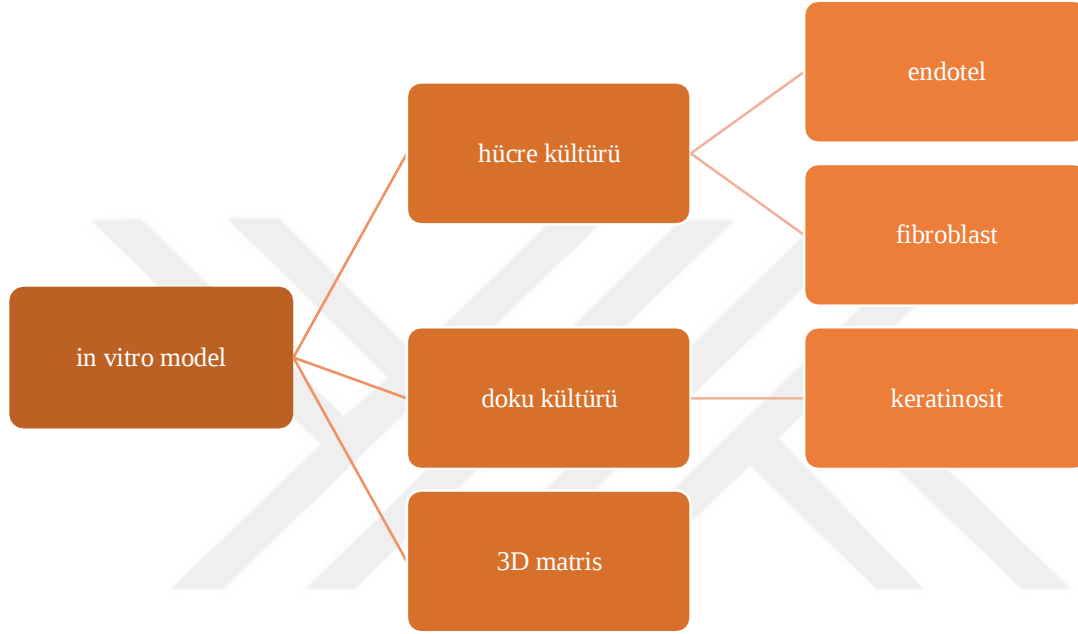
1.3. İN VİTRO MODELLEME VE TARİHÇESİ

Bilimsel çalışmalarda canlı varlıkların denek olarak kullanılması etik sorunları ortaya çıkarmış bunun sonucu olarak canlı ortamın laboratuvar ortamına (in vitro) aktarılabilmesi çalışmalarına gerek duyulmuştur. Hayvanlardan elde edilen dokular kullanılarak yapılan ilk hücre kültürü Harisson tarafından 1907 yılında keşfedilmiştir. Harrison hayvan modeli olarak, kurbağayı seçmiş, kurbağa embriyoları ile yaptığı deneyde normal fonksiyonun in vitro ortamda da sürdüğünü göstermiştir. Harison'dan sonra bu çalışmalar farklı araştırmacılar tarafından da devam ettirilmiş olsa da yaptığı çalışma tekrarlanabilir olduğu için doku kültürünün başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Harrison, 1907;Fresney, 2005). Earle ve arkadaşları 1943 yılında farelerde tümör hücrelerini izole etmiştir. Leonard Hayflick ise 1961 yılında hücrelerin in vitro ortamda yaşam sürelerinin sınırlı olduğunu gösteren bir rapor hazırlamıştır (Harrison, 1907). Çalışmaların geliştirilmesiyle, hücre içi olaylar hücre hücre bağlantıları, hücre ortam ilişkileri ve hücrelerin değişen faktörlere verdiği tepkileri boyutta incelenebilir hal almıştır. Johns Hopkins Üniversitesinde 1951'de DC, George Gey serviks adenokarsinomu bulunan hastadan aldığı biyopsiden ilk defa insan kaynaklı ölümsüz (immortal) hücre hattını oluşturarak ölen hastanın ismine ithafen (Henrietta Lacks) "Helâ" ismini vermiştir (Lucey, 2009).

Hücre kültüründe gelişmeler Çin hamster yumurtalık hücrelerinin izole edilmesiyle sürmüştü ve 1970'lerde güvenlik kabinlerinin geliştirilmesi ile profesyonel hale gelmiştir (Fresney, 2005).

Günümüzde sıklıkla başvurulmuş hücre kültürü ortamında, monoklonal antikor, enzim ve hormonların ve çeşitli fonksiyonel aktivitesi olan proteinlerin üretimi, DNA ve RNA replikasyonları ve ekspresyon araştırmaları, hücreler arası sinyal iletiminin araştırılması veya hastalıkların tedavisinde stratejilerin belirlenmesi gibi birçok çalışma yapılmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları aşı ve ilaç geliştirilmesi; geliştirilen aşı, ilaç ya da diğer kimyasalların toksisitesinin ölçülmesi gibi araştırmalar için de sıklıkla başvurulmuş yöntemlerdir (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Son yıllarda bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyon, kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesi (kontrollü hücre ölümü), kök hücre çalışmaları ve tedavileri içinde hücre kültürü tek seferde birden çok çalışma yapılabilmesi, ekonomik ve tekrarlanabilirliğinin kolay olması açısından önem kazanmıştır (Nims ve ark., 2017; Koçancı ve ark., 2018).



Şekil 1.4. İn vitro modellemede kullanılan hücre kültürleri modelleri

1.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; canlılardan elde edilen hücrelerin birbirinden farklı metotlar kullanılarak ayrıştırılıp; amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glukoz ve serum gibi temel besin maddelerinin bulunduğu kapların belirli sıcaklık, nem ve karbondioksitli ortamda tutularak in vivo şartlarda (canlı ortamda) olduğunun kabullendirilmesi olarak tanımlanabilir (Antoni ve ark., 2015). Hücre kültüründe kullanılan hücreler, ya kültür kaplarında süspanse halde asılı kalarak (kan hücreleri) ya da kültür kaplarının tabanına yapışıp (monolayer hücreler) çoğalırlar (Candan, 2006). Süspanse hücre kültürlerinde hücrelerin üremesi günlük olarak kontrol edilmeli ve sayım günlük yapılmalıdır, bu hücrelerin üremesi için kültür kaplarının sallanmasına ihtiyaç vardır. Hücre görüntülenmesi zordur fakat pasajlaması kolaydır. Genellikle protein yığını elde etmek için kullanılır. Yapışan kültürlerde hücre sayımı ve kontrolü için günlük bakıma ihtiyaç yoktur ve pasaj süresi 3 güne bir olacak şekilde uzatılabilir. Üremeyi sınırlayan durumlar genellikle kültür kabı yüzeyidir.

Hücre görüntülenmesi kolaydır fakat pasajlamak için hücrelerin kültür kabı (flask) yüzeyinden enzimatik yolla ya da mekanik yolla ayrılması gerekmektedir. Bu kültürler sitolojik incelemeler için tercih edilir (Elçin AE, 2022) .

Primer hücre hattı: Doku ya da organdan izole edildikten sonra çoğaltılan ve izole edildiği doku ve organın özelliğini taşıyan temel hücre kültürleridir. Dokudan alınan küçük parçalar direk kültür kabında besiyeri eşliğinde kültüre edilir ya da proteolitik enzimle müdahale edildikten sonra ortaya çıkan süspansiyon uygun besiyeri eklenerek kültür kabında kültüre edilir. Primer hücre hatlarının yaşam süreleri oluşturulan dokuyla doğru orantılıdır bu nedenle yaşlanmadan yeniden pasajlanmalıdır. Primer kültürdeki hücrelerin kültür kabındaki tüm besiyerini kullandıktan sonra yeni kültür kaplarında çoğaltılmasına alt kültür denir (Elçin AE, 2022).

Sonlu ve sürekli hücre hattı: Alt kültürlerin hiçbir etkiye bırakılmadan normal hücre çoğalma yeteneklerini sürdürdüğü hücre hatlarına sonlu hücre hattı denir. Hücre çoğalması sınırlı sayıdadır.

Viral, bakteriyel, kimyasal ya da spontan gelişen nedenlerle transforme olan hücrelerin ölümsüz hale gelmesiyle oluşan hücre hatlarına sürekli hücre hattı denir (Coecke ve ark., 2005).

Çizelge 1.3. En çok kullanılan bazı hücre hatları

Hücre Hattı	Hücre Kökeni	Büyüme Formu
Fibroblast hücresi (3T3)	Fare embrio	Yapışkan
Fibroblast hücresi (BHK21)	Suriye hamster böbrek	Süspansiyon
Epitel hücresi (MDCK)	Köpek böbrek	Yapışkan
Epitel hücresi (HeLa)	İnsan adenokarsinoma	Yapışkan ve/veya Süspansiyon
Epitel hücresi (PtK1)	Sıçan, kangru böbrek	Yapışkan
Myoblast hücresi (L6)	Sıçan iskelet kası	Yapışkan
Chromaffin hücresi (PC12)	Sıçan adrenal feokromasitoma	Süspansiyon
Plazma hücresi (Sf9)	Fare myeloma	Süspansiyon

Hücre kültüründe kullanılan hücre hatlarının morfolojisini ışık mikroskopu altında incelediğimizde:

- Fibroblastik (fibroblast benzeri) hücreler; bipolar ya da multipolar olarak uzamış şekillerde görünürler.
- Epitel benzeri hücreler; çokgen şekilli (poligonaldır) kümeler halinde çoğalan yapıdadırlar.
- Lenfoblast benzeri hücreler; küresel şekillidirler (Tufan, 2011).

1.3.2. Hücre Kültürü Laboratuvar Ekipmanları

Hücre kültürü çalışmalarında çevre şartlarından etkilenmeyi ve kontaminasyonunu önlemek için özel giriş çıkışın, hava akımının kontrol altında tutulabildiği odalar kullanılmalıdır.

1.3.3. İn Vitro Yara İyileşmesi Modellemeleri

Yara oluşum ve iyileşme süreci, yara iyileşmesinde kullanılan ilaçlar, ilaçların toksisitesi gibi olgular geçmişten bu yana merak edilen, araştırılan ve modellenen bir olgudur. Yara dokusunun hızlı iyileşmesi, restorasyonu ve doku defektlerinin önlenmesi canlı için ciddi öneme sahiptir. Yara iyileştirme çalışmaları için ve iyileşme sürecini düzenleyen mekanizmaları anlamak için birçok in vivo modelleme yapılmıştır. İnsanda gelişen yara iyileşme mekanizması deney hayvanlarında olandan farklı olduğundan deney hayvanlarında iyileşmenin kontraksiyonla olmasından dolayı bazı çalışmaları aydınlatsada tam anlamıyla insan fizyolojisine uygun değildir (Wilhelm ve ark., 2017).

İn vitro yara modellemeleri:

1.3.4. Çizik Yara Modeli

Basit ve çok sık kullanılan bir yöntemdir. Petri kabının tabanını kaplayan birleşik hücre tabakasının bir bölgesine sivri uçlu bir materyalle çizik atılır, yani bölgedeki hücreler kazınır (Liang ve ark., 2007;Jonkman ve ark., 2014) ve bu hatta olan hücre göçü incelenir. Kolay tekrarlanabildiğinden ve uygulandığından iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinde en çok tercih edilen çalışmalardır. İlaç toksikasyonu ve hücre aktivasyonlarını incelemek için kullanılır (Liu ve ark., 2014;Yue ve ark., 2010). Bu testin dezavantajı çizikler oluşturulurken düz bir hat oluşmaması ve hücre kültürü

kabı üzerindeki hücre dışı matris oluşumlarının tahribatı ve kazınan hücrelerin çizik hattı kenarlarında birikmesidir. Bu sonuçlar deneysel çalışmanın doğruluğunu etkileyebilir (Ashby ve Zijlstra, 2012;Goetsch ve Niesler, 2011)

1.3.5. Damgalama Yara Modeli

Polimerden yapılmış damga görünümlü materyalin hücrelerle kaplanmış petri tabanına uygulanarak etki ettiği bölgedeki hücrelerin alınmasına dayalı bir testtir. Genellikle düzlemsel materyaller kullanılır, fakat el manipülasyonunun olmaması uygulanan ve kuvvetin az gelmesi gibi durumlarda istenen sonuç elde edilemeyebilir. Damgalama işlemi mekanik bir yara oluşturur. Temeli hücre göçünün olmasına dayanır (Lan ve ark., 2010).

1.3.6. Termal Yara Modeli

Damgalama işleminde ya da çizik yara modelinde kullanılan materyallerin belirli bir ısıya maruz kaldıktan sonra hücrelere uygulanmasıyla oluşturulur. Böylelikle termal yaralanmalarda hücrelerin tepkileri görülmüş olur. Bu modelin dezavantajı ise ne kadar dikkat edilirse edilsin çevredeki hücrelerinde bu ısı değişiminden etkilenmesidir (Hettler ve ark., 2013).

1.3.7. Elektriksel Yara Modeli

Hücreler elektrot yardımıyla akıma maruz bırakılır. Akım hücre kültür kabının altından uygulanır. Akıma maruz kalan bölgedeki hücrelerde gelişen elektroporasyon ve hücre ölümüne hücrelerin verdiği yanıt incelenebilir (Giaever ve Keese, 1991). Kullanılan akıma hücre zarının uyguladığı direnç (empedans) incelenebilmektedir. Uygulanan elektrot üzerinde ilk hücre üremesi, hücre tabakasının yaralanması ve bunun sonucu bölgedeki hücre tabakasının incelenmesine izin verdiğiinden, kullanılan mekanizmanın insan gücüne ve etkisine gerek duymamasından dolayı diğer çalışmalara göre daha doğru sonuçlar vermektedir. Uygulanan akım güçlü bağ oluşturmuş hücrelerin ayrılmasına yetmeyebilir bu da çalışma sonuçlarını olumsuz etkilemektedir. Hücre tabakasında oluşan yoğunluğun fazla olması ependans ölçümünü olumsuz yönde etkileyebilir. Elektrot çevresinde oluşan ısıdan kaynaklı istenmeyen hücre ölümleri ya da hücre form bozuklukları gelişebilir. Tüm bunların yanı sıra insan etkisinin olmaması nedeniyle diğer modellemelere göre daha nicel sonuçlar verir (Keese ve ark., 2004;Szulcek ve ark., 2014).

1.3.8. Optik Yara Modeli

Daha önceden tanımlanmış olan lazer ışınlarının hücre tabakasına uygulanarak belirli alandaki hücrelerin yok edilmesine dayanır. Bu çalışma için özel bir cihaz kullanılır (LEAP). Bu cihaz hem çalışmanın tekrarlanabilirliğinin hem de analizinin aynı zaman diliminde olmasını sağlar böylelikle sonuçlar daha niceldir (Zordan ve ark., 2011).

1.4.2B ve 3B HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bilimsel araştırmalardan endüstriye kadar birçok alanda başvurulmuş hücre kültürlerinde değerlendirmeler genellikle görüntüleme, veri toplama ve analiz yöntemleri ile değerlendirilmektedir (Duval ve ark., 2017). Hücre kültürünün ilk keşfinden beri tek tabakalı (2B) hücre kültürleri, biyofiziksel ve biyokimyasal ipuçlarından gelen uyarımlar hücresel tepkileri incelemek için in vitro modeller olarak kullanılmıştır. Teknolojideki gelişmelere paralel olarak 2B olan hücre kültürleri, üç boyutlu (3B) forma çevrilerek dokuya daha yakın ve benzer özellikler kazandırılmaya başlanmıştır (Ravi ve ark., 2015; Duval ve ark., 2017). Üç boyutlu hücre kültürleri belirli bir organa yönelik fonksiyonları temsil ettiğinden, organoid olarak ta anılır.

1.4.1.2 B Hücre Kültürü

2B hücre kültürleri, hücrelere mekanik desteği kültür kabı yüzeyleri sağlamaktadır, hücreler cam veya polistiren kültür kabı yüzeyine tek tabakalı olarak yapışarak ürerler (Freshney, 2005). İki boyutlu hücre kültürlerinde hücre üremesi homojendir, ortamdaki besiyeri ve kültür kabı yüzeyi ile doğru orantılıdır (Edmondson ve ark., 2014). 2B hücre kültürleri düşük maliyetli olması ve kolay tekrarlanabilir olması bakımından günümüze kadar birçok çalışma için tercih edilir hal almış olsalarda hücrelerin in vivo ortamda gerçekleşen hücresel olayları tam anlamıyla gösteremez. Hücrelerde polarizasyon kaybı ve ekstraselüler matriks salgısının sınırlı olduğu görülmektedir (Duval ve ark., 2017). Hücre içi ve hücre dışı etkileşimleri yeterince olmaz, bu hücre proliferasyonu, canlılık, gen ve proteinlerin ekspresyonu, uyarılara yanıt verme gibi olguların canlı organizmadakinden farklı gelişmesine neden olur. Bir başka dezavantajı da hücrelerin tek tabakalı çoğalmasından kaynaklanan; oksijen, besin maddeleri, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi ortamın bileşenlerine sınırsız

erişime sahip olmasıdır (Choi ve ark., 2010; Duval ve ark., 2017). 2B hücre kültürü modelleri çalışmalarda kritik öneme sahip gerçek dokudaki hücrelerin davranışını temsil etmesi konusunda yaşanan aksaklıklar, hücre görüntüleme, analitik sistem teknolojileri ve yeni iskeleler/matrislerin uygulamalarındaki ilerlemeler, üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Koçancı ve Aslım, 2018).

1.4.2.3B Hücre Kültürü

3B hücre kültürü, hücre kümelerinin doku sferoidleri veya gömülü hücreler olarak canlı dokularında bulunan yapısal proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin ekstraselüler matriksi taklit ettiği bir doku iskelesinde veya sıvı tabanlı iskelede oluşmasını sağlayan hücre kültürü modelleridir. 3B hücre kültürü modellemeleri, in vivo'dakine benzer polarizasyon gösterirler, morfolojileri de in vivo modellemelere yaklaşık özellik gösterir (Vinci ve ark., 2012) .

Hücre dışı bir matriks içine hücrelerin yerleştirilmesi ile apikal-bazal polarizasyon, lümen oluşumu, proliferasyon değişimleri, RNA ve protein ekspresyonları gibi fizyolojik davranışlarla ilişkili durumlar 3 boyutlu hücre kültürleri ile kolay izlenebilir hal almıştır. Hücre biyolojisi ile mikro mühendisliğin kombinasyonu organ işlevselliğini daha ileri bir seviyeye taşıyan üç boyutlu hücre kültürü modelleri ve daha gelişmiş mikro-çip cihazlardan, mikro akışkan hücre kültürü sistemlerine kadar gelişen modellemeler hastalık teşhisi, ilaç toksisitesi, gen ekspresyonu, kök hücre üretimi, kanser modellemeleri, yara modellemeleri gibi bir çok alanda yararlanılmaktadır (Li ve ark., 2012; King ve ark., 2007; Tourouskaia ve ark., 2005) . İlaç sanayinde ilaç geliştirme sürecini hızlandırmak düşük maliyetle güvenli ve etkili ilaçlar geliştirmek için (Swinney ve Anthony, 2011), klinikte uygulanacak ilaçların dokularda etkisine bakılması için model geliştirilmesinde (Haycock, 2011) 3B hücre kültürü modellemelerine başvurulmaktadır. İn vivo hayvan modellemelerinin etik ve bilimsel olarak baskı altında olması, maliyetli olması, insanlardaki etkisinin tam olarak modellenememesi, istenmeyen ölümler ve reaksiyonlar gelişmesi gibi olgular hayvan deneylerinden 3D hücre kültürü modellemelerine olan yönelimi artırmıştır (Swinney ve Anthony, 2011).

2B hücre kültürlerinde olduğu gibi 3B hücre kültürlerinde de farklı yöntemler vardır ve yapılacak olan çalışmaya göre seçim yapılmalıdır (Knight ve ark., 2015):

Sferoidler; hücrelerin kendi hücre dışı matriks bileşenlerini oluşturduğu, çok hücreli kümelerden (agregatlardan) oluşur (Lin ve Chang, 2008) ve herhangi bir kültür substratına yapışmayan toplanmış hücreleri belirtir (Fennema ve ark., 2013). Hücreler arasındaki reaksiyonlar ve hücreler ile matriks arasındaki reaksiyonları gösteren bir tür üç boyutlu hücre modellemesidir (Fennema ve ark., 2013).

Sferoid yapıları farklı yollarla üretilir:

- Asılı damla yöntemi
- Statik sıvı kaplama tekniği
- Mikrowell dizileri tekniği
- Mikroakışkan kanallar yöntemi

Uygulanabilirliği kolay ve ekonomik olan asılı damla yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler, bir petri kabının kapağı üzerinde asılı bırakılmış damla şeklinde kültüre edilir ve hücrelerin damlacıkların petriye bakan bölümlerinde sferoid oluşturması beklenir (Harrison ve ark., 1907; Duinen ve ark., 2015). Besiyeri değişimine imkan veren bir yöntemdir. Başka bir teknik, askıya alınmış hücrelerin yapışkan olmayan bir alt tabaka üzerinde kültürlendiği statik sıvı kaplama tekniğidir (liquid overlay technique, LOT). Bu teknik hücrelerin bir yüzeye yapışmak yerine kümelenmeleriyle oluşur (Yuhas ve ark., 1977). Bir başka yöntem ise mikrowell dizileri tekniğidir. Yöntem, yapışmaz 96 kuyucuklu kültür kaplarında yuvarlak dipli topakların oluşturulmasına dayanır (Napolitano ve ark., 2007). Mikroakışkan kanallar yöntemi, sürekli kontrol edilen agregatların üretimi için olanak sağlayan tekniktir. Bu yöntem için biraz daha teknolojik bir alt yapıya ihtiyaç vardır (Torisawa ve ark., 2007).

3B katı iskeleler (matriksler), hücreleri desteklemek için 3 boyutlu bir alan sağlar ve bunların doğal 3B doku benzeri yapılar oluşturmasına izin verir. Skafold (katı iskele) bir dizi doğal ve sentetik malzemeden üretilir. Doğal biyomateryaller genellikle kollojen, fibrin ve hyaluronik asit gibi hücre dışı matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerine dayanır, ancak doğal olarak diğerlerini (ipek, jelatin, kitosan, ve aljinat dahil olmak üzere türetilmiş materyaller) de içerebilir. Biyolojik olarak uyumludur ve hücre yapışma bölgeleri içerir (Moroni ve ark., 2008). Sentetik materyallerden imal edilen iskeleler, hücre farklılaşmasını ve hücre yapışmasını etkilediği belirlenen belirli bir kimyasal bileşim ve ayarlanabilir mekanik özellikler gibi avantajlara

sahiptir. Sentetik polimerler (plastikler, kauçuklar, fiberler vb.) kullanılarak üretilir. Sentetik bir iskele tekrarlanabilirliği sağlar. Sentetik ürünler gözeneklilik, liflilik, geçirgenlik ve mekanik stabilite ile doğal ekstraselüler matriksi taklit eder (Chaicharoenaudomrung ve ark., 2019). Bu materyallerin seçimi tamamen araştırmacıya ve yapılacak olan çalışmaya göre değişmektedir.

Hidrojeller, yüksek su içeriğine sahip agaroz, fibrin, kollojen veya hiyaluronik asit gibi çapraz bağlı doğal bir malzemenin gevşek bir iskele sisteminde hücrelerin kümeleşmesine olanak sağlayan materyallerdir. Doku benzeri su içeriği ve kolay ayarlanabilen biyokimyasal ve mekanik özellik sağlarlar. Matriks üretimini ve diğer hücre biyoaktivitelerini sağlamak için yavaş çözünen ve iç alan üreten bileşenlere sahiptir (Ruedinger ve ark., 2015).

Sıvı tabanlı yöntemler, mikroakışkanlar, mikro-taşıyıcı sistemler, mikroakışkan çipler gibi birçok farklı sistemden oluşurlar (Whitesides, 2006). Mikroakışkan teknikler, 3 boyutlu kültür modellerinin fizyolojik uygunluğunu arttırabilmek için oluşturulan mikrometre boyutundaki kanallardaki akışkanlar üzerinde uzamsal kontrole izin veren sistemlerdir. Mikroakışkan cihazlar; kanserlerin tespiti, embriyonik gelişim mekanizmalarının anlaşılması ayrıca gelişmekte olan ülkelerde bir teşhis aracı olarak ve daha birçok uygulama için kullanılmaktadır (Gogoi ve ark., 2016).

3B biyobaskı tekniği (3D bioprinting); genel olarak, malzemelerin basıldığı, katılaştırıldığı ve birbirine bağlandığı hesaplama kontrolü altında özelleştirilmiş 3B yapıların inşası olarak adlandırılan, son zamanlarda geliştirilen bir teknolojidir (Andersen ve ark., 2015). Hücrelerden ve biyomateryallerden oluşan biyolojik yapıların, birkaç milimetreden santimetreye kadar değişen küçük bir boyutta basıldığı 3B doku baskısıdır. Bu teknik, biyoyumlu malzemeler, hücreler ve destekleyici bileşenlerin 3B formatlarını oluşturmak için kullanılır. Hücre fonksiyonu ve canlılığı basılı yapılar içinde sürdürülebilir olduğundan damar benzeri tüpler, böbrek, kıkırdak, suni deri ve doku yapıları gibi kök hücreler üretilebilir (Murphy ve Atala, 2014; Tasoglu ve Demirci, 2013). 3B bioprinting tekniği, canlı hücreler içeren geometrik yapılar üretme kabiliyetinin yanı sıra, hassas tekrarlanabilirlik ile yüksek verim uygulamalarını da kolaylaştırmaktadır (Knowlton ve ark., 2015).

Yara ve yara modellemesi canlı hayat olduğu sürece önemini yitirmeyecek ve hep güncel kalacak konulardandır. Bu çalışmada; yara ve yara iyileşmesi için yapılan in vivo modellemelerin yerini alabilecek veya yerine tercih edilebilecek, hayvan modellemelerinde oluşan yara iyileşmesi sürecinde farklılık gösteren fizyolojinin yerine araştırılmak istenen canlının hücreleri kullanılarak direk canlıda oluşan hücre hücre ya da hücre ECM etkileşimlerini daha iyi anlayabileceğimiz bir 3D kültür ortamı oluşturmak amaçlanmıştır. Ayrıca bu oluşturulan kültür modellemesinde klinik olarak kullanılan, yara iyileşmesini aktive inhibe eden maddeler kullanılarak yapılan kültürün işlevselliği kontrol edilmek istenmiştir.

Çizelge 1.4. Hayvan modellemesi 2B hücre kültürü ve 3B hücre kültürü karşılaştırması

İn Vivo modelleme	2D hücre kültürü	3D hücre kültürü
İnsan ve hayvan yara iyileşme biyolojisi farklıdır	Yara hattında olan hücre hücre ve hücre ECM etkileşimlerini göstermezler Tek tip hücre ile çalışılır	İn vivo hücre hücre ve hücre ECM etkileşimini taklit edebilirler, farklı hücreler kullanılarak modelleme yapılabilmektedir
Yara iyileşme sürecinin görüntülenmesinde sınırlamalar vardır	İn vivo koşullarda olan sinyal yollarını ve hücrel iletişim taklit edemezler	İn vivo koşullardaki sinyal yollarını taklit edebilirler.
Hayvan bakım besleme maliyeti yüksektir	Çoğalmaları ekilen alan yüzeyiyle sınırlıdır sürekli yenilenmesi gerekir	Primer hücre hatları kullanılarak organoid kültürler elde edilebilir ve bu da kişiye özel tedavileri mümkün kılar
Etik sorunları beraberinde getirir	Hücreler zamanla fenotiplerini kaybeder	Yaşam süreleri 2D hücre kültüründekilerine göre çok daha uzundur
Müdahaleler sırasında istenmeyen durumlar gelişebilir(ölüm, sepsis vb.)	Genellikle toksikasyon çalışmalarında kullanılırlar	Hem hastalık modellemelerini hem toksikasyon modellemelerini mümkün kılar ve in vivo modellemelere yakın sonuç verir
Çalışma süresi uzundur sonuç almak için uzun zaman gerekir.	Çalışma süresi kısadır tek seferde birden çok hücre hattıyla çalışılabilir	Zaman açısından tek seferde birden çok çalışmaya olanak sağladığından avantaj sağlar
Tekrarlanması zor ve ekstra maliyet gerektirir	Tekrarlanması hayvan modellemelerine göre kolaydır ve Hayvan modellemelerine göre daha ekonomiktir	Tekrarlanması hayvan modellemelerine göre kolaydır ve Hayvan modellemelerine göre ekonomiktir
Çevre şartları kontrol altında tutulamaz	Çevre şartları tamamen çalışmacıya bağlıdır ve kontrol altındadır	Çevre şartları tamamen çalışmacıya bağlıdır ve kontrol altındadır

2.MATERYAL VE METOT

2.1.L929 FARE FİBROBLAST HÜCRE HATTI ve HACAT KERATİNOİT HÜCRE HATTI ÜRETİMİ

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM) arşivinde bulunan hücre hatları L929 (cat no: NCTC klonu 929) ve Hacat (cat no: CLS; 300493) kullanılarak çalışmaya başlandı. Tüm çalışma, çevresel faktörlerden etkilenilmemesi ve kontaminasyonun gerçekleşmemesi adına biyogüvenlik şartlarına uyularak biyogüvenlik kabiniinde yapıldı. Hücrelerin ekiminde kullanılacak olan kültür vasatı; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4.5 g/L Glucose, w/ Sodium Pyruvate, w/out L- Glutamine), %10 fetal buzağı serumu , %1 penisilin-streptomisin ve , %1 L –Glutamine ve dondurulmasında kullanılacak olan dondurma vasatı (9 ml FBS ve 1ml DMSO) kullanılarak hazırlandı. Sıvı azot tankında bulunan dondurulmuş stok hücreler 37 °C su banyosunda çözündürüldü ve hazırlanan kültür vasatından 2ml eklenmiş 10ml' lik falkonun içine alındı. 200 x g de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüjleme işlemi sonrası hücre peleti dibe çökmüş olan fakon biyogüvenlik kabinine alındı ve işlemlere burada devam edildi. Falkonun üzerinde kalan süpernatant döküldü ve üzerine 1 ml kültür vasatı eklenerek pipetaj yapıldı. T -75 hücre kültür flasklarına 5ml kültür vasatı eklendi bir süre 37°C de bekletildi. Gerekli ısınma gerçekleştikten sonra bu hücre kültür vasatı süspansiyonundan 500' er µL bu flasklara ekim yapıldı. Ekim yapılan hücre flaskları 37 °C' de %4 CO₂'li etüvde kültüre edildi. Hücreler flask hacminin %80'lik bölümünü kapsayacak kadarlık hacme sahip olana kadar besi yeri değiştirilip kontrol edildi. Hücre çoğalması %80lik birleşmeye ulaştığında hücreler flask başına 3'er ml olacak şekilde tripsin EDTA eklenilerek tripsinize edildi. Tripsinizasyon işlemi sonrası flask yüzeyinden ayrılan hücreler 3'er ml kültür vasatı eklenmiş falkonlara alınarak santrifüj edildi. Santrifüjleme sonrası dibe çöken hücrelerin üzerindeki marazi maddeler döküldü ve 3.16 ml dondurma vasatı eklenilip pipetaj yapıldı ve dondurma tüplerine 1.8ml eklenilerek dondurulup çalışma başladığında kullanılmak üzere -80°C' ye kaldırıldı. Bu işlem her iki hücre hattından da 8'er adet dondurulana kadar devam edildi.

Hücre iskeleti oluşturmak, hücre hücre etkileşimlerini sağlamak ve matriksi taklit etmesi için matrigel ve PRP (platelet rich plasma) kullanıldı. Kullanılacak olan matrigel ve PRP(platelet rich plasma)’ın hazırlanması ve kullanımı çalışma planı gruplandırmalarının altında ayrıntılı olarak anlatıldı.

2.2.ÇALIŞMA PLANI

Çalışma üç farklı grupta yapıldı:

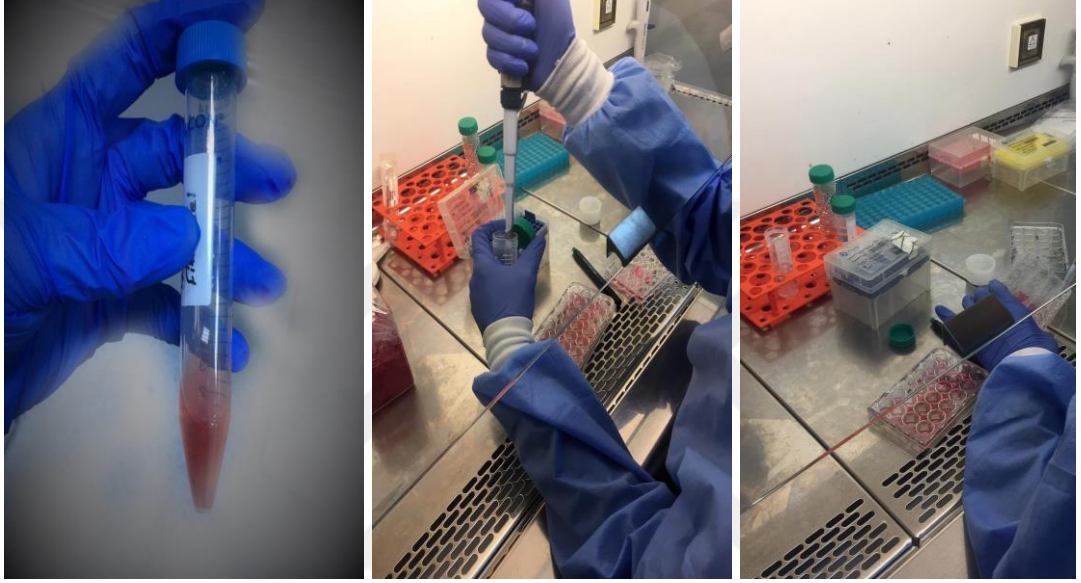
- I. PRP – Fibroblast
- II. Matrigel – Fibroblast
- III. PRP – Fibroblast – HaCaT

2.2.1. PRP – Fibroblast Grubu

Daha önceden pasajlaması yapılan L929 fibroblast hücrelerini çözündürüp ekim yapılarak işleme başlandı. Daha önce izlenilen hücre ekim prosedürü izlenerek hücreler çoğaltıldı. %80’lik üremeye ulaşıldıktan sonra hücreler süspanse hale getirildi ve hücre sayımı ve canlılığı ölçüldü. Canlılık ölçümü ve hücre sayımı için tripan blue kullanıldı. Hücre süspansiyonundan 10µl ve tripan blue boyasından 10µl bir endorf tüpüne alındı ve pipetaj yapıldı, oluşan yeni süspansiyondan 10µl alınarak hücre sayım slaydının ‘A’ bölmesine eklendi ve hemositometre ile sayım yapıldı. Sonuç 4.5×10^6 olarak saptandı. 24’lük plate için kuyucuk başına 40.000 hücre/ml düşecek şekilde kültür vasatı ile sulandırıldı. 24 kuyucuklu plate’ in ilk 6 kuyucuğunun tabanına 100µL hücre süspansiyonundan ekim yapıldı ve hücrelerin tutunması için 37 °C’ de %4 CO₂’li etüve kaldırılarak 2 saat beklendi.

Beklenen süreçte PRP kiti ile alınan kan 570 x g de 7dk santrifüj edildi. Üstte kalan plateletten zengin plazma bir enjektör yardımı ile ayrı bir falkona alındı. 21 G ‘lik iğne ucundan geçirildi. Üzerine 2ml 0.06 Mm CaCl₂·2H₂O çözeltisi ve %2 oranında penisilin x streptomisin kombinasyonu eklendi. Oda ısısında 2 saat bekletildi. Oluşan jel DMEM ile sulandırılarak 3 falkona bölündü. Kontrol grubu – İnhibitör (%6’lık H₂O₂) grubu – Aktivatör (Trentilin Ampul ’etken madde: Pentoksifilin 100mg/5ml) grubu olmak üzere gruplandı. İnhibitör grubuna %6’lık H₂O₂ den 0,4µM/L oranında süspanse edilerek eklendi böylelikle hidrojen peroksitin oksitleyici özelliği kullanılarak hücrelerin migrasyon yeteneğinin nasıl etkilendiğine bakıldı. Aktivatör

grubuna ise Trentilin Ampul' den 10µg/ml oranında süspanse edilerek eklendi. Hazırlanan bu solüsyonlar etüvden çıkarılan plate üzerinde gruplama yapılarak 100'er µL eklendi. Üzerine hazırladığımız fibroblast hücre süspansiyonundan 100µL daha eklendi. İşlem sonrası fibroblastların 0.saat, 24. saat, 48.saat ve 72.saat olmak üzere mikroskop altında incelemesi yapılarak fotoğrafları çekildi ve kayıt altına alındı. Oluşan sferoid çapları 'Image J' programı ile ölçülerek Microsoft Excelde kayıt altına alındı ve grafikleştirildi.

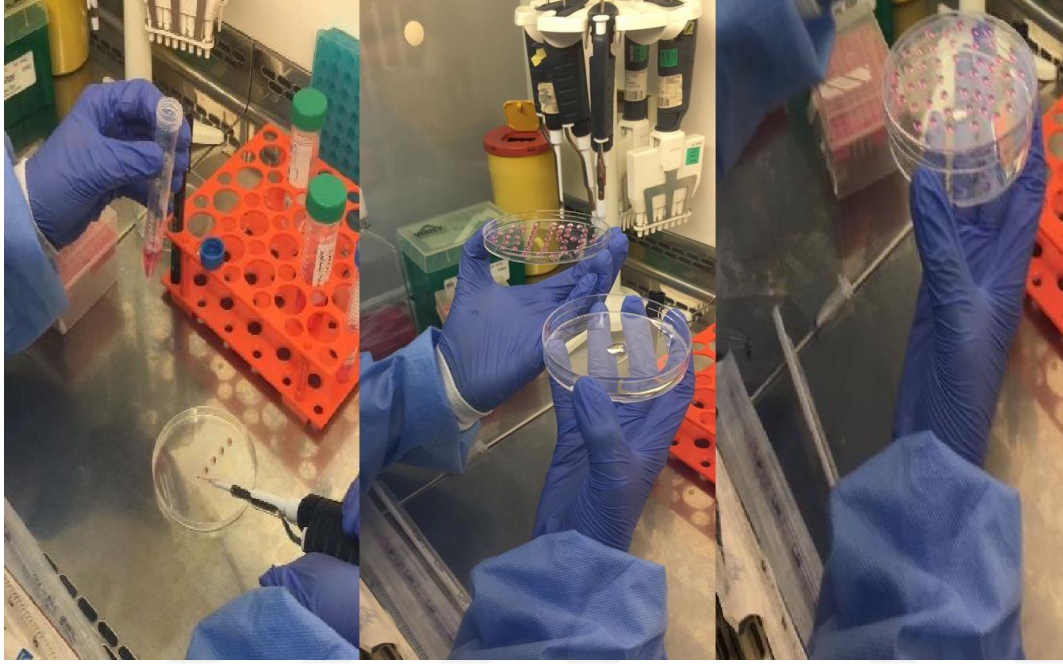


Şekil 2.1. Laboratuvar çalışması görselleri

2.2.2. Matrigel - Fibroblast Grubu

Tüm çalışma çevre kontaminasyonu ve biyo güvenlik açısından biyo güvenlik kabininde yapıldı. Daha önceden pasajlaması yapılan ve -80 °C'de bulunan stok L929 fibroblast hücrelerini çözündürüp ekim yapılarak işleme başlandı. Bu işlemem daha önce anlatılan prosedürle yapıldı. Ekim yapılan hücreler %80'lik kültür kabı alanını kaplayana kadar gün aşırı kontrolleri yapıp besi yeri değiştirildi. İstenilen çoğalmaya gelen hücreler tripsinize edilerek süspanse kültür vasatı ile süspanse hale getirildi ve süspansiyondan 10µl ve tripan blue boyasından 10 µl bir ependorf tüpüne alınıp karıştırıldıktan sonra 10µl'si bir hücre sayım slaydının B bölmesine alınarak hemositometreyle hücre sayımı yapıldı; 3.9×10^6 oranında sonuca ulaşıldı. Çıkan oran sonrası bu hücre süspansiyonu 1.25×10^5 oranında olacak şekilde kültür vasatı eklenerek yenide süspanse edildi. Oluşan hücre süspansiyonu kullanılarak asılı damlacık yöntemi ile sferoid oluşturmak için 10 cm çapındaki steril petrinin kapak

kısmına 20' şer μL damlacıklar eklendi. Sferoid oluşması sırasında ortamdaki nemi korumak için petrinin alt tabanına 5ml PBS konuldu. Kapak damla yapısı bozulmadan hızlı bir şekilde ters çevrilerek kapatıldı ve 37 °C' de %4 CO_2 'li etüvde 72 saat boyunca üremeye bırakıldı.



Şekil 2.2. Asılı damla yöntemiyle gömülecek olan sferoidlerin oluşturulması

72 saat sonunda oluşan bu sferoidler matrigel matrix'e (Corning® Matrigel® Matrix REF:356234, 5ml) gömüldü. Bu işlem için -20 °C'de bulunan matrigel matrix bir gece önceden +4 °C' ye çıkartıldı. İşlem öncesi kullanılacak olan pipet uçları steril bir şekilde -20 °C'de 10 dakika soğutuldu ve matrigel matrix ile yapılan tüm işlemler buz aküsü üzerinde sürdürüldü. 24 kuyucuklu plate'in üzerinde kullanılacak olan kuyucuklar işaretlenerek tabanına 100 μL matriks pipet ile konuldu ve plate 37 °C' lik etüve kaldırılarak 30dk beklenildi. Böylelikle soğuk ortamda sıvı halde bulunan matrixin jelleşmesi sağlandı. 30dk'nın sonunda daha önceden hazırladığımız petride bulunan sferoidler 21G iğne ucu ile alınarak jelleşen matrigellerin tam ortasına kabarcık oluşturulmadan bırakıldı üzerine 100 μL matrigel eklenip önceki sferoidin tam üzerine gelecek şekilde ikinci sferoid bir önceki aşamaların aynısı uygulanarak eklendi. Kontrol kuyucuklarına 500 μL standart kültür vasatı; migrasyon aktivasyon grubuna Trentilin Ampul (Trentilin Ampul 'etken madde: Pentoksifilin 100mg/5ml) den 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde standart kültür vasatı ile süspanse edilerek 500 μL ve

migrasyon inhibisyon grubuna ise %6'lık H_2O_2 den 0,4 μ M/L oranında süspanse edilerek eklendi. Oluşan sferoid yapıların alanları 0, 24, 48 ve 72 nci saatlerde kontrol edilerek fotoğraflandı. Çekilen fotoğraflar 'Image J' programı ile ölçülerek değerlendirilip grafiklendirildi.

2.2.3. PRP – Fibroblast – HaCaT Grubu

Daha önceden pasajlaması yapılan L929 fibroblast hücreleri ve HaCaT hücrelerini çözündürüp ekim yapılarak işleme başlandı. -80 °C'de bulunan stok hücreler çıkartılarak 37 °C su banyosunda çözündürüldü. Daha önce yapılan hücre ekim prosedürü izlenerek ekim yapıldı ve %80'lik çoğalmaya ulaştığında süspanse hale getirilip; hücrelerin canlılık oranları ölçüldü. Canlılık ölçümü ve hücre sayımı için tripan blue kullanıldı. HaCaT hücre süspansiyonundan 10 μ l ve tripan blue boyasından 10 μ l bir endorf tüpüne alındı ve pipetaj yapıldı. Oluşan yeni süspansiyondan 10 μ l alınarak hücre sayım slaydının 'A' bölmesine eklendi ve hemositometre ile sayım yapıldı (3.6×10^6). Aynı işlem L929 fibroblast hücre hattı içinde yapıldı (4.9×10^6). 24 kuyucuklu plate için kuyucuk başına 40.000 hücre/ml olacak şekilde kültür vasatı ile yeni hücre süspansiyonları hazırlandı ve plate üzerinde istenilen kuyucuklara fibroblast süspansiyonundan 100 μ L ekim yapıldı 2 saat 37 °C'de etüve kaldırıldı. Daha önce kullandığımız PRP' den oluşturduğumuz PRP Aktivatör – inhibitör ve kontrol grubundan 100'er μ L eklenerek hücre yüzeyleri kapatıldı. Üzerine HaCaT hücre süspansiyonundan 100 μ L eklendi. 0, 24, 48 ve 72 saatleri fotoğraflanarak sferoidlerin çapları değerlendirildi. 'Image J' programı ile ölçümleri yapıldı ve sonuçlar grafikleştirildi.



3.

BULGULAR

Yapılan mikroskopik incelemede üç yöntemde de hücre hücre kompleks yapıların sferoid oluşturduğu görülmüştür. Oluşan sferoid yapıların aktivatör ve inhibitörler kullanılarak artıp artmadığı da ortaya konmuştur. Aktivatör ve inhibitör maddeleri yara iyileşme sürecinde iyileşmeyi destekleyen ve inhibe eden maddelerden seçilmiştir. Hücrelerin çoğalıp birbirleriyle etkileşimi şeklinde oluşan sferoid yapılar(kürecikler) klinik olarak yara iyileşmesini aktive eden preparatın kullanıldığı aktivatör gruplarında belirgin bir şekilde çoğalmış ve büyümüştür (Şekil 6.1,6.4,6.7). İnhibitör gruplarında ise bazı gruplarda sferoid oluşumu görülmüş fakat az sayıda ve küçük şekillerde belirlenmiştir (Şekil 6.2, 6.8), bazı gruplarda ise kullanılan hücrelere iskelet oluşturacak yapıyı bozduğu ve hücrelerde ölüme neden olduğu için çok küçük yapılarda görülmüş ya da görülmemiştir (Şekil 6.5). Amacımız ilaç etkisini ölçmek olmadığından bu konuya yönelik başka bir değerlendirme yapılmamıştır.

Mikroskopik incelemede de görüldüğü gibi yara iyileşmesini destekleyen aktivatör ve inhibitör maddelerin 3B hücre kültüründe hücre hücre kompleks yapıların oluşmasını artırıp azaltarak yara bölgesine migrasyonun artıp azaldığının ortaya konulabileceği görülmüştür. Çalışmamızda oluşan sferoid yapıların '*Image J*' ile alan ve çevre ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar grafikleştirilerek karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada ise sonuçlar PRP' nin jel formunun hücre destek ağı olarak kullanıldığı gruplarda, sferoid oluşumunun olduğu fakat matrigelin hücre destek ağı olarak kullanıldığı gruplardaki kadar büyük sferoid yapıların oluşmadığını ortaya koymuştur. PRP kullanılan gruplarda matrigel kullanılan gruplara göre daha küçük sferoidler oluşsa da matrigel göre bir avantajı vardır bu da PRP kullanılan gruplarda inhibitör gruplarında da azda olsa sferoid yapıların oluştuğu ve belirgin olmasıdır.

Çalışmamızda yara iyileşmesinde en çok etkili olan fibroblast ve keratinosit hücreleri kullanılmış ve bunların birbiriyle oluşturduğu sferoid yapılar incelenmiştir. Oluşan sferoid yapıların büyüklüğü ve çokluğu bize migrasyon olgusunun hızı ve oluşumu konusunda bilgi verici olmaktadır. Çalışmada kullanılan PRP ve Matrigel ise hücrelerin kompleks yapı oluşturmaya iskelet oluşturmaktadır. Matrigel kolloajenin boşluğunu doldurmakta PRP ise yara bölgesine hücre migrasyonunu hızlandıran

plateletleri ihtiva etmektedir. Kullanılan aktivatör ve inhibitör maddeler ise klinik olarak kullanılan materyallerdir.

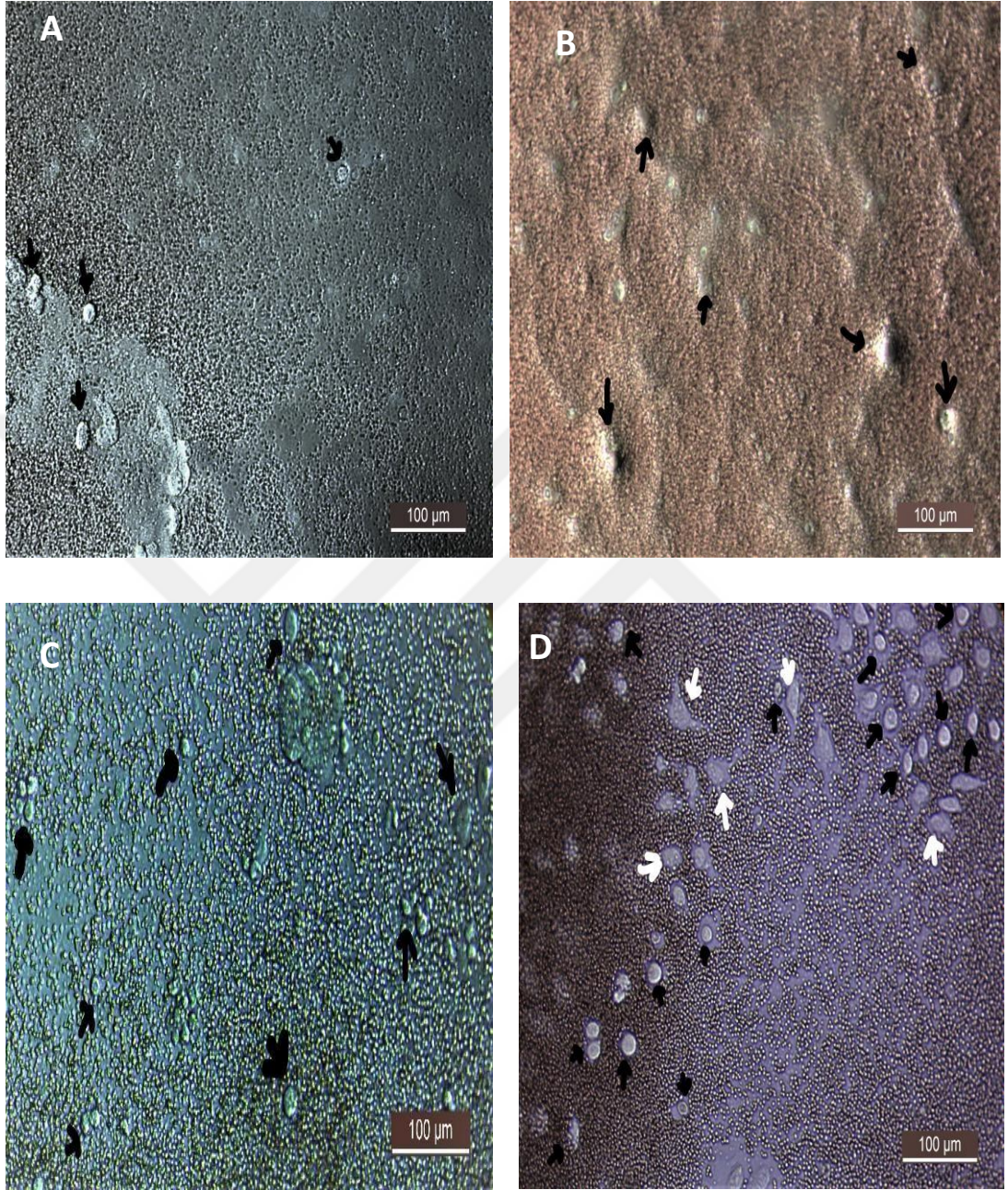
Çalışma grupları incelendiğinde:

Kontrol grupları incelendiğinde sferoid oluşumlarının olduğu fakat matrigel kontrol grubundaki kadar büyük ve belirgin olmadığı görülmüştür. Kontrol grupları arasında diğer bir farkta HaCat ile yapılan çalışmada oluşan sferoid yapıların sadece fibroblast ile yapılan çalışmadaki fibroblastlara göre daha belirgin ve büyük olmasıdır. Aktivatör gruplarında oluşan sferoidlerin 72.saatte küçük ama çok sayıda olduğu 24. ve 48. saatlerde ise oluşumların yeni başladığı ve daha büyük yapıların da olduğu görülmüştür. İnhibitör grubu çalışmalarında matrigel grubunda kullandığımız inhibitörün matrigel formunu bozmasından dolayı bir sonuca ulaşamamıştır fakat fibroblast ve keratinosit hücreleri ile yapılan çalışmalarda 24. ve 48. saattlerde sferoid oluşumları görülmüş fakat oluşan sferoid yapıların küçük yapılar olduğu görülmüştür. 72.saatlerde ise sferoid yapılara rastlanmamış oluşan yapılarında bozulduğu görülmüştür.

3.1.

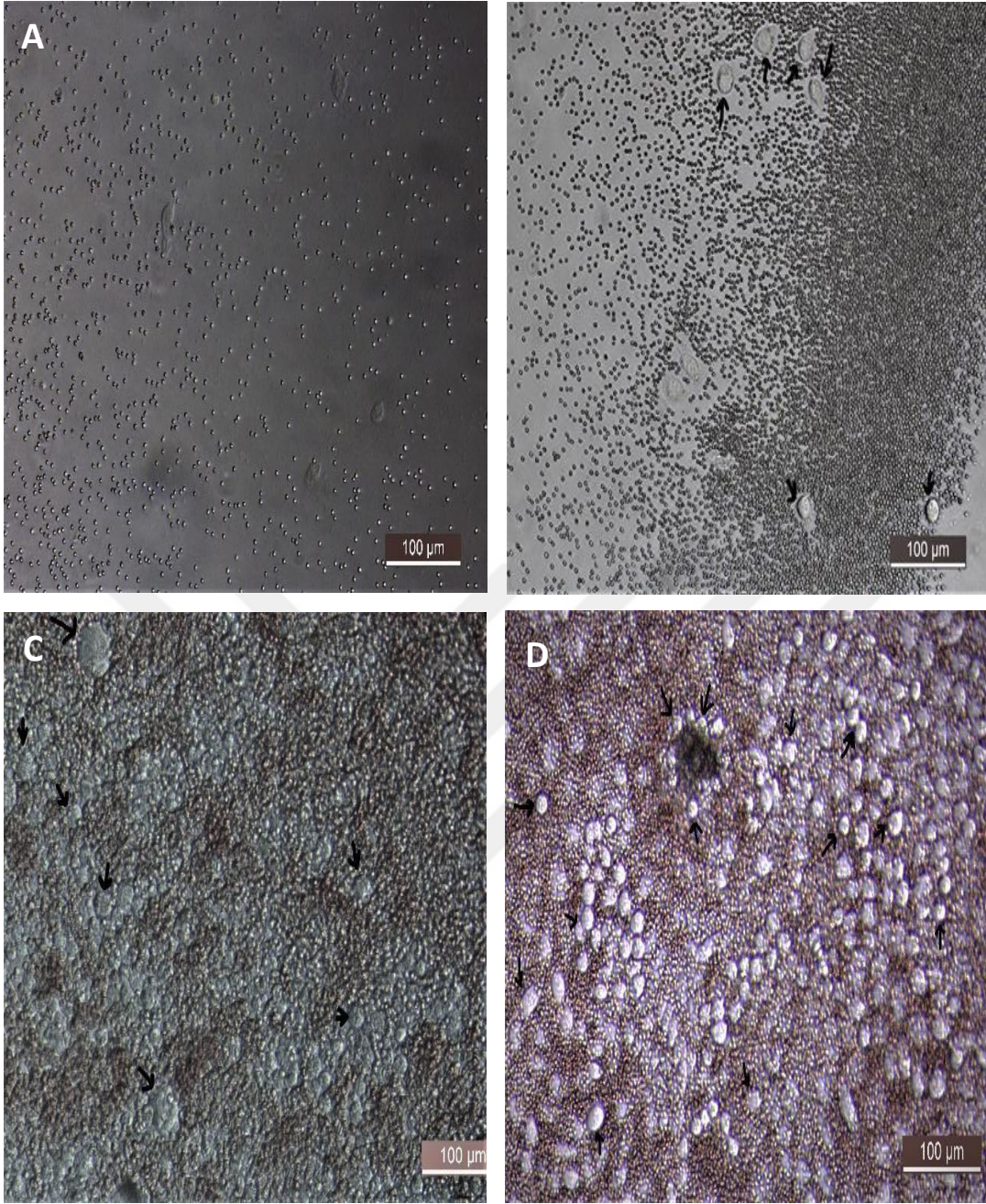
MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ

I. PRP ve Fibroblast Grubu



Şekil 3.1. PRP – Fibroblast (L929) kontrol grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) Kontrol grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Kontrol grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Kontrol grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) Kontrol grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm (Fibroblast hücreleri beyaz oklarla gösterilmiştir - Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

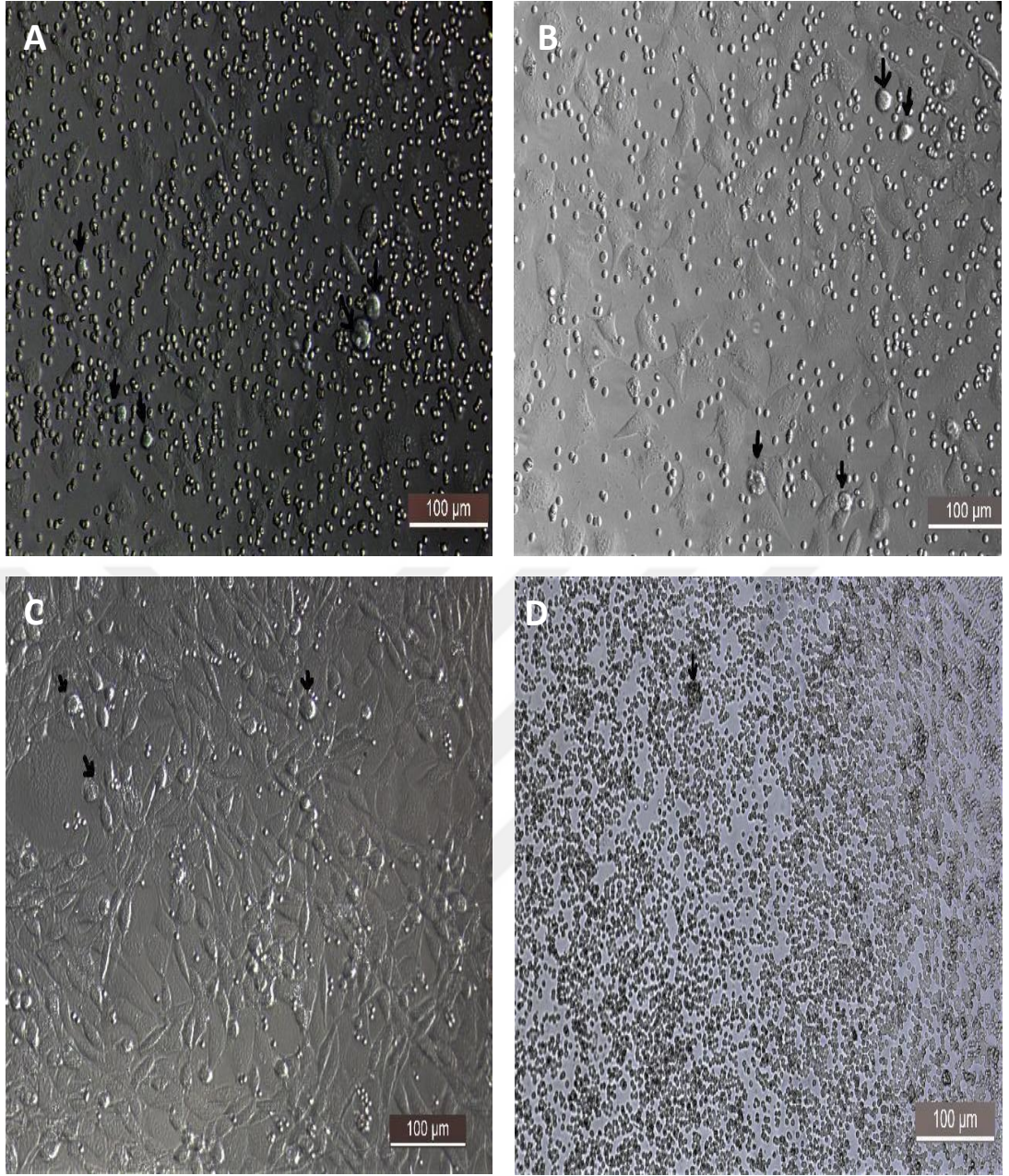


Şekil 3.2. PRP – Fibroblast (L929) aktivator grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) Aktivator grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Aktivator grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Aktivator grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) Aktivator grubunun 72.

Saat görüntüsü = 100 µm

(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

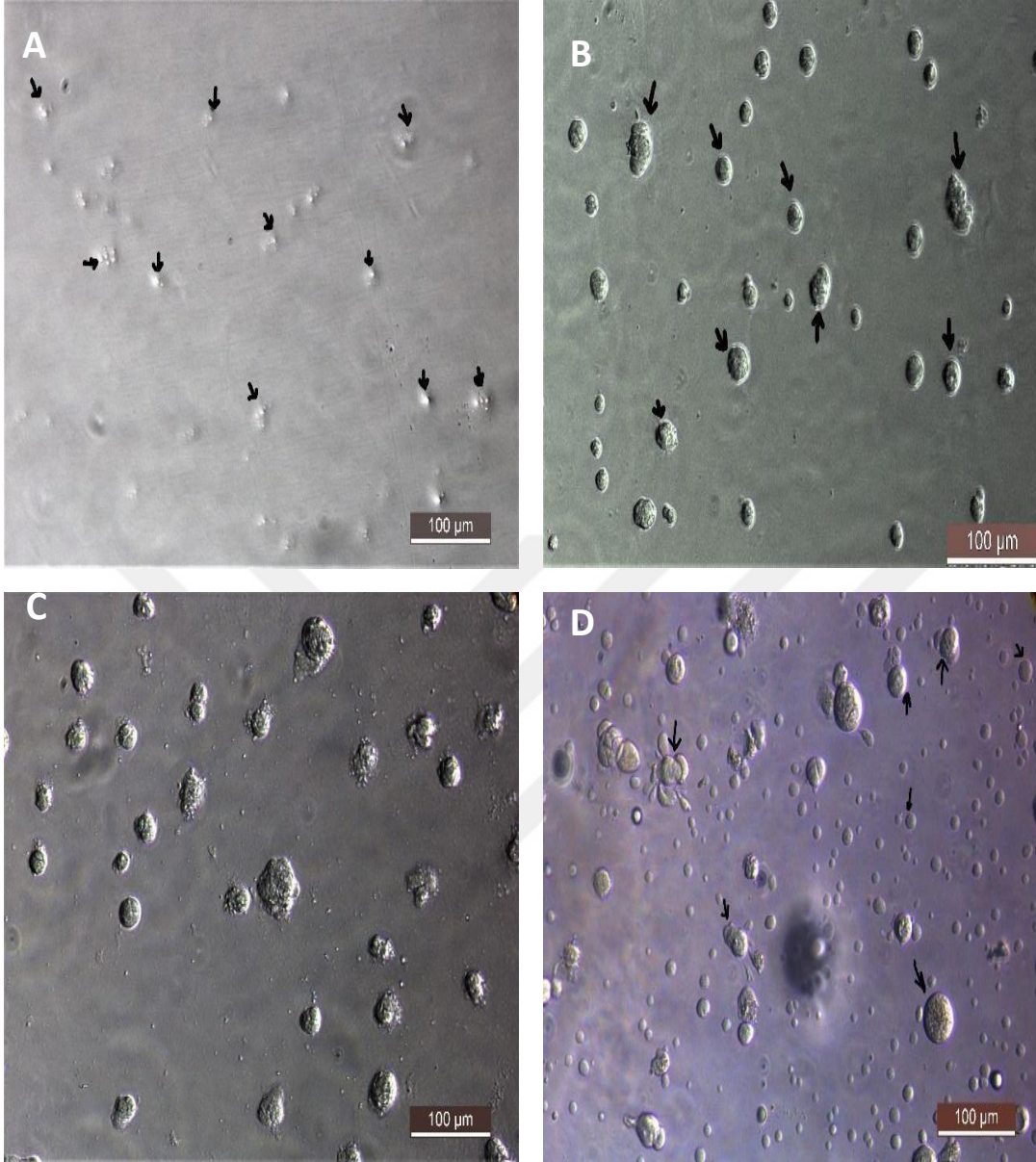


Şekil 3.3. PRP – Fibroblast (L929) inhibitör grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) İnhibitör grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) İnhibitör grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) İnhibitör grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) İnhibitör grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm

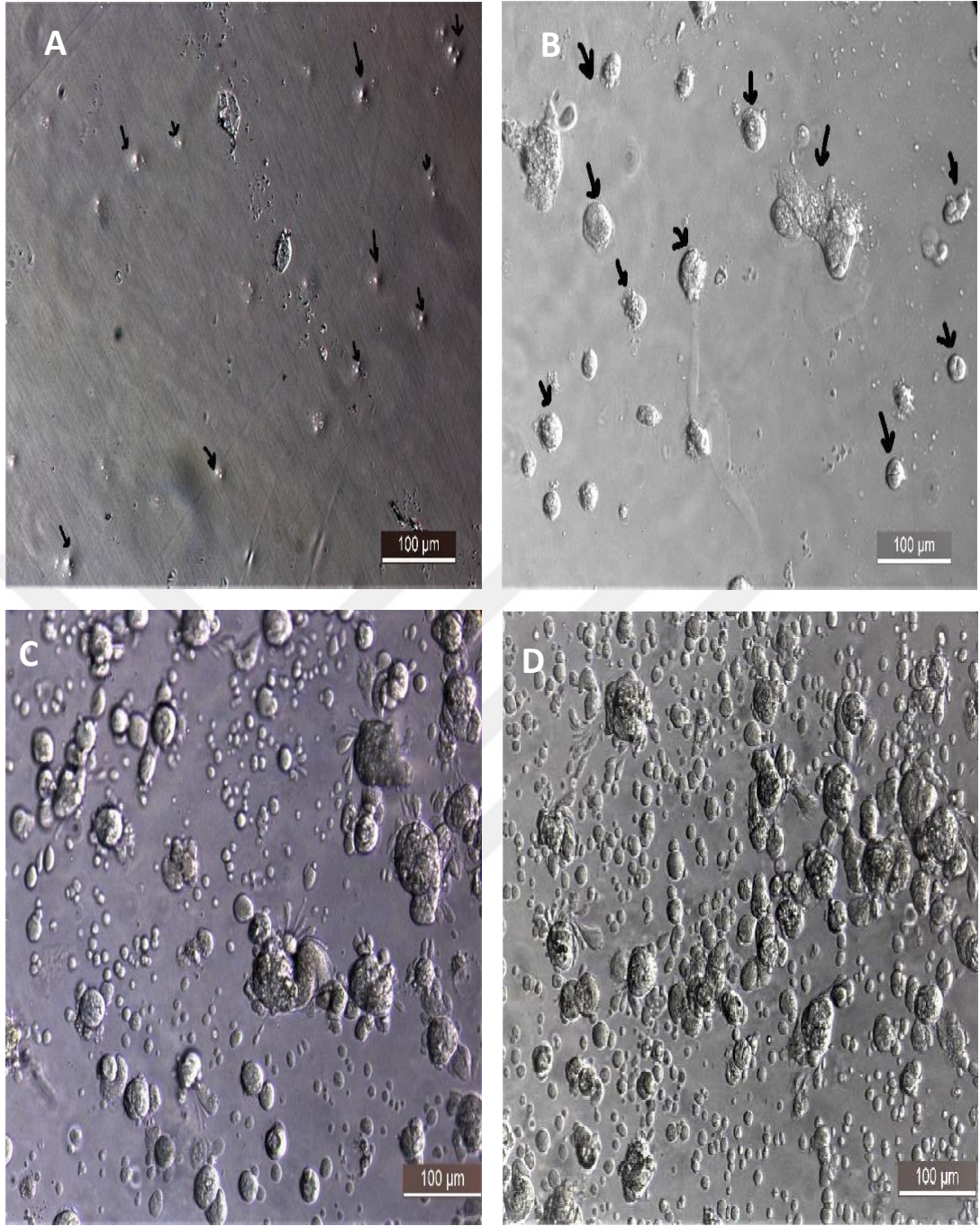
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

II. Matrigel – Fibroblast Grubu



Şekil 3.4. Matrigel – Fibroblast (L929) kontrol grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

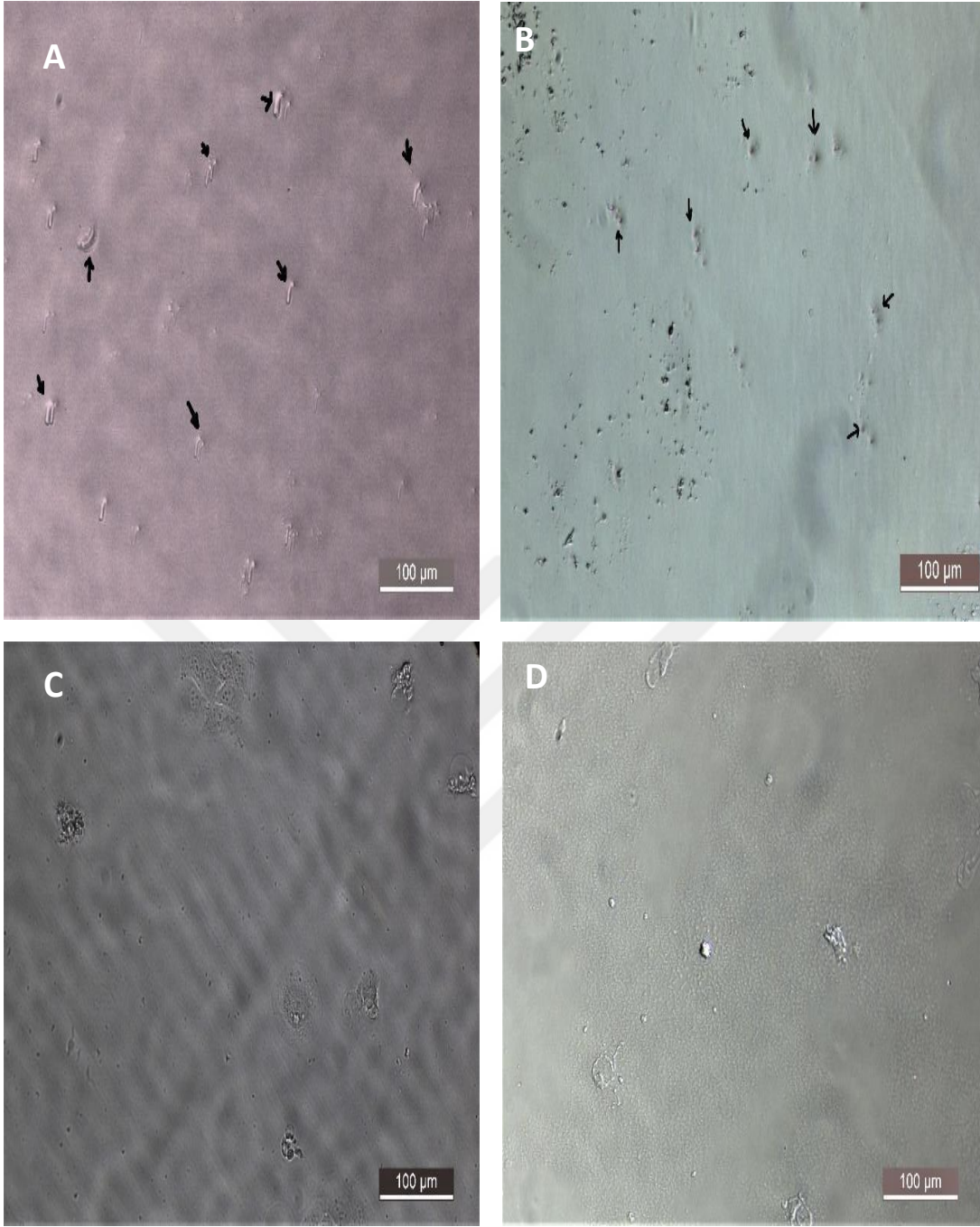
(A) Kontrol grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Kontrol grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Kontrol grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) Kontrol grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)



Şekil 3.5. Matrigel – Fibroblast (L929) aktivaör grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) Aktivaör grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Aktivaör grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Aktivaör grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) Aktivaör grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm

(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

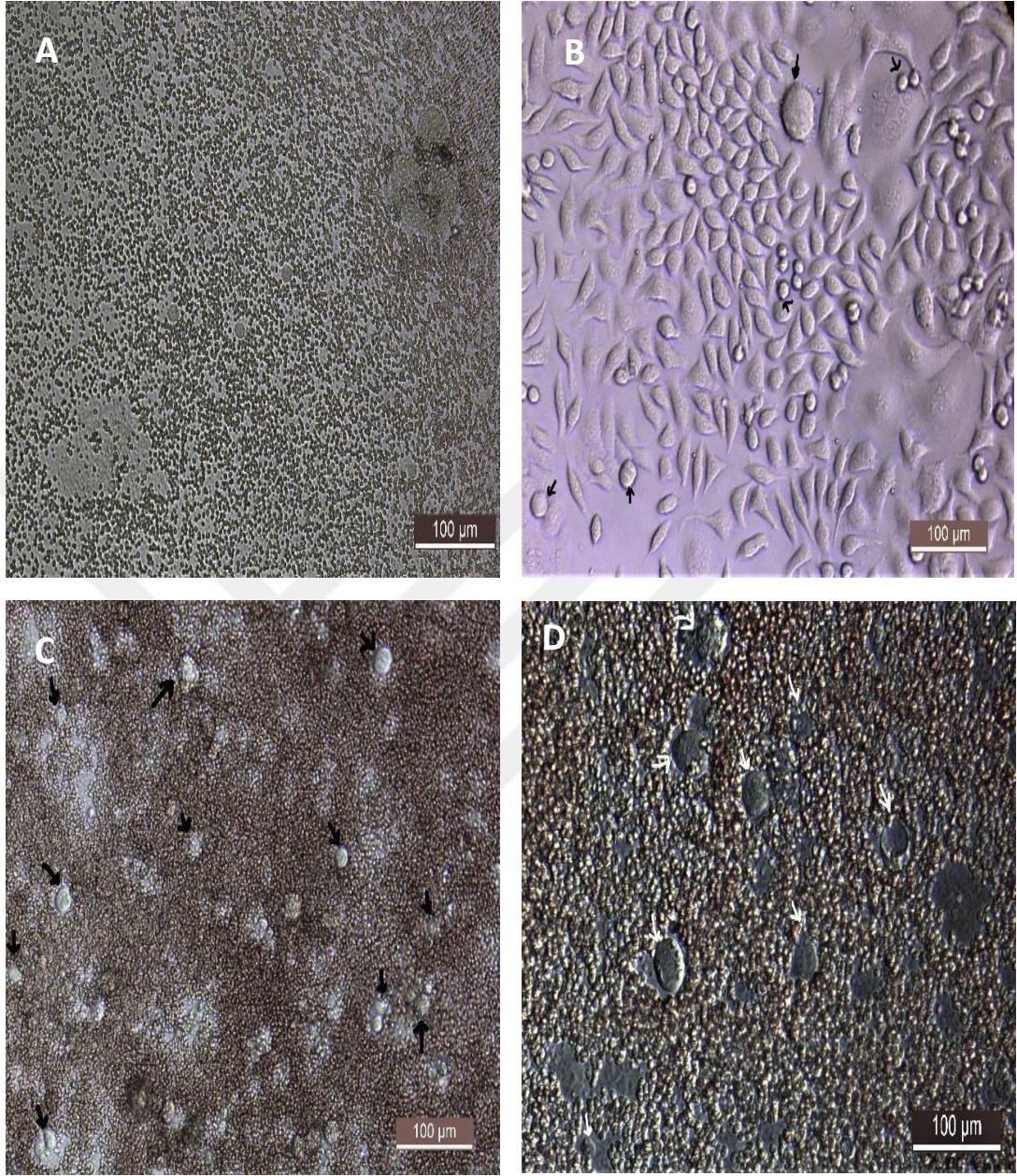


Şekil 3.6. Matrigel – Fibroblast (L929) inhibitör grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) İnhibitör grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) İnhibitör grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) İnhibitör grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) İnhibitör grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm

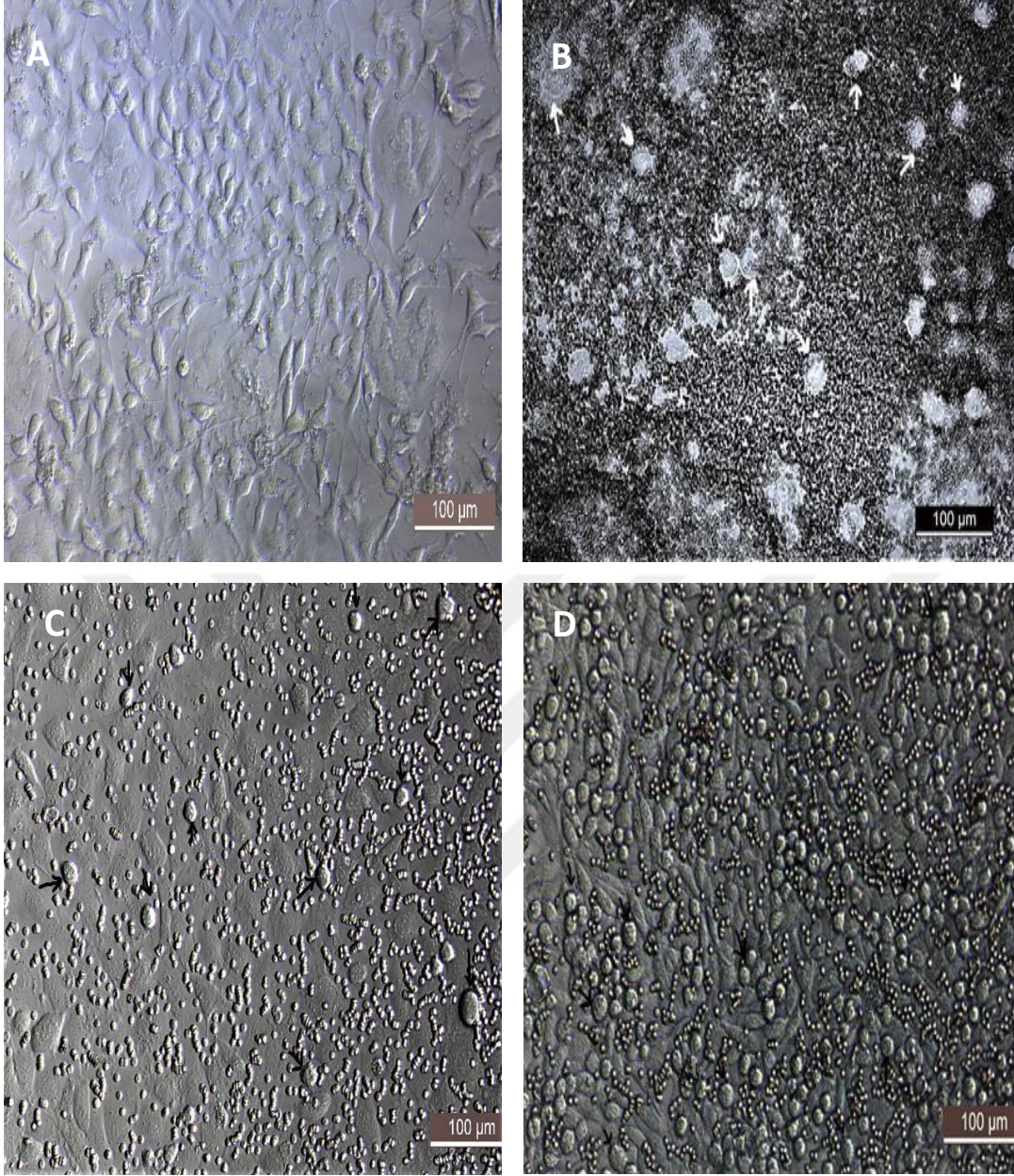
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

III. Fibroblast – PRP- HaCaT Grubu



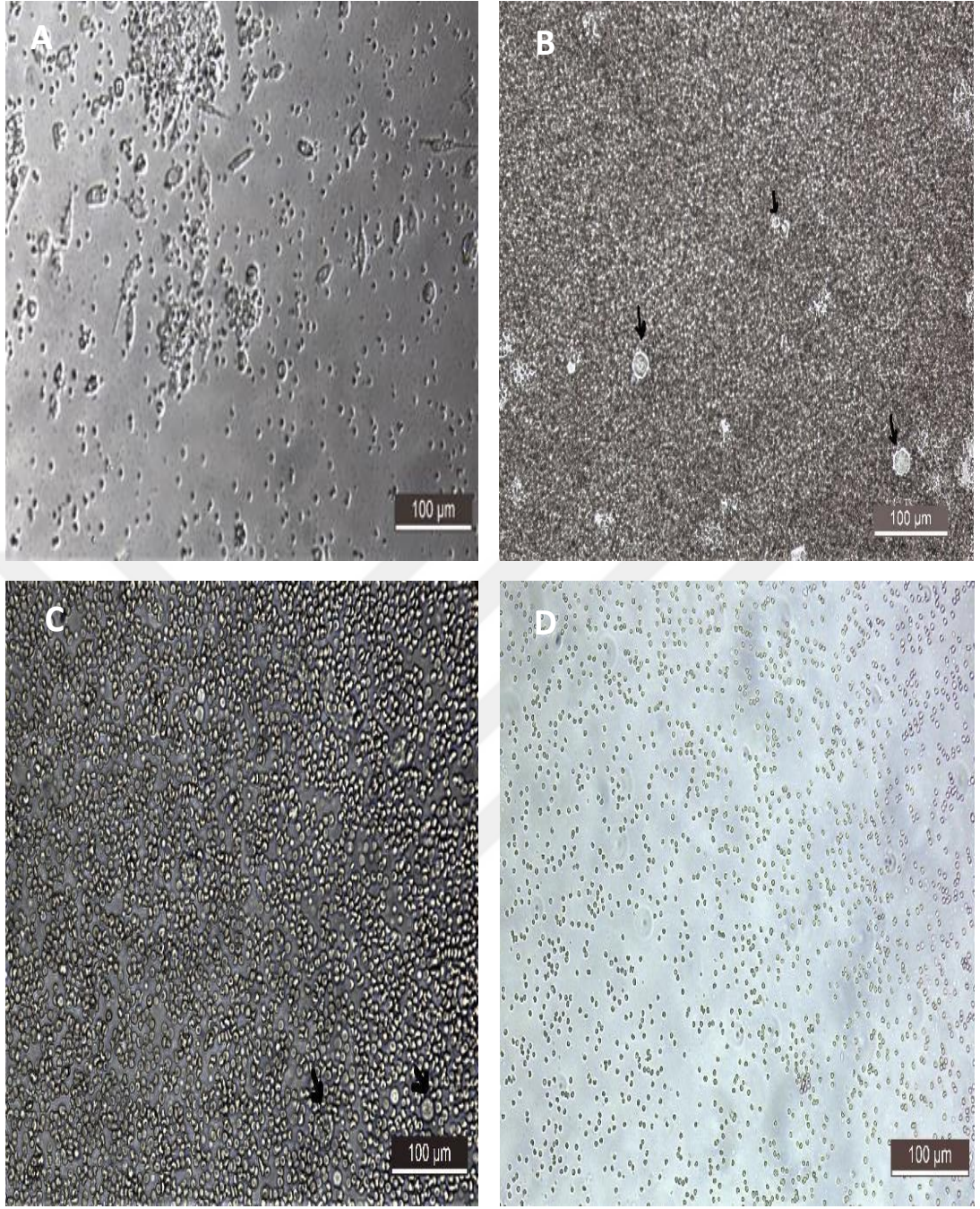
Şekil 3.7. Fibroblast (L929) – PRP - HaCaT kontrol grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) Kontrol grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Kontrol grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Kontrol grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) İnhibitör grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)



Şekil 3.8. Fibroblast (L929) – PRP - HaCaT aktivator grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) Aktivator grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) Aktivator grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) Aktivator grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) Aktivator grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir.)

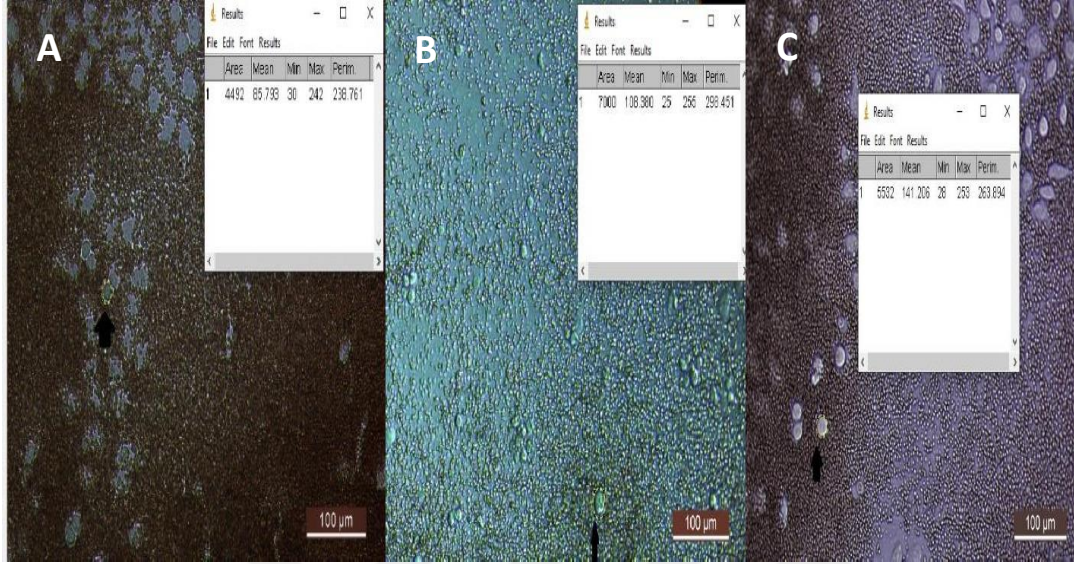


Şekil 3.9. Fibroblast (L929) – PRP - HaCaT inhibitör grubu sferoid oluşumu inverted mikroskop görüntüsü

(A) İnhibitör grubunun 0. Saat görüntüsü = 100 µm (B) İnhibitör grubunun 24. Saat görüntüsü = 100 µm (C) İnhibitör grubunun 48. Saat görüntüsü = 100 µm (D) İnhibitör grubunun 72. Saat görüntüsü = 100 µm

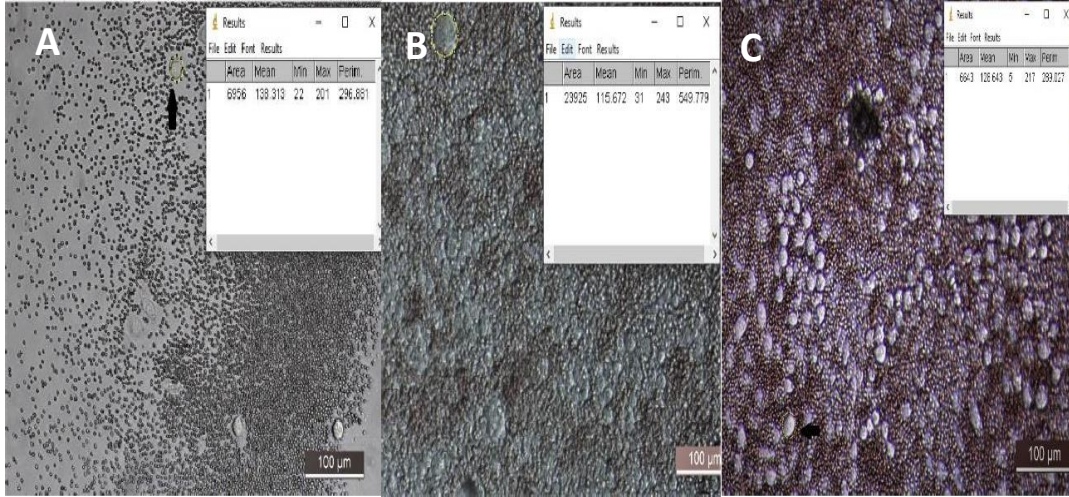
(Sferoid yapıları siyah oklarla gösterilmiştir)

3.2.OLUŞAN SFEROİD YAPILARIN KARŞILAŞTIRILMASI, ALAN ve ÇEVRE ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ



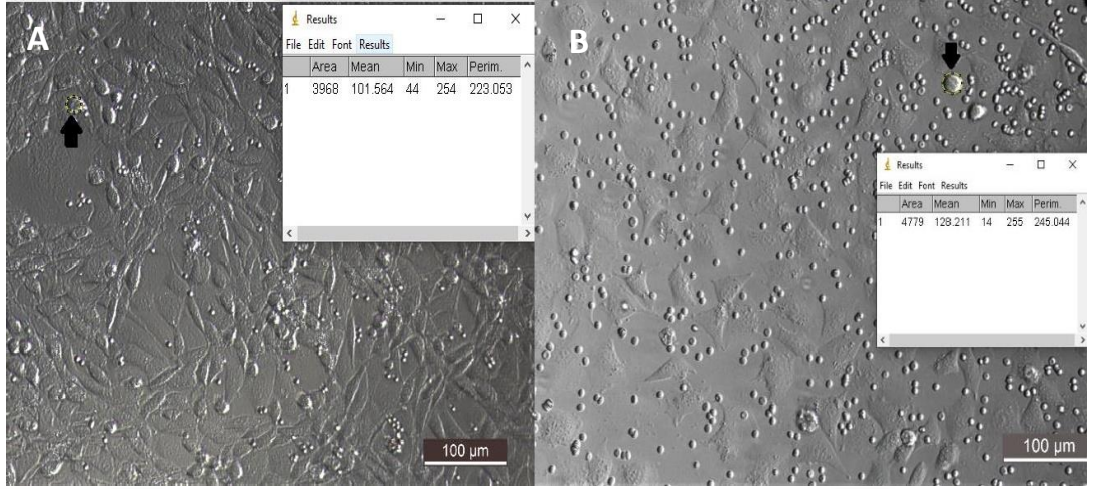
Şekil 3.10. PRP- Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



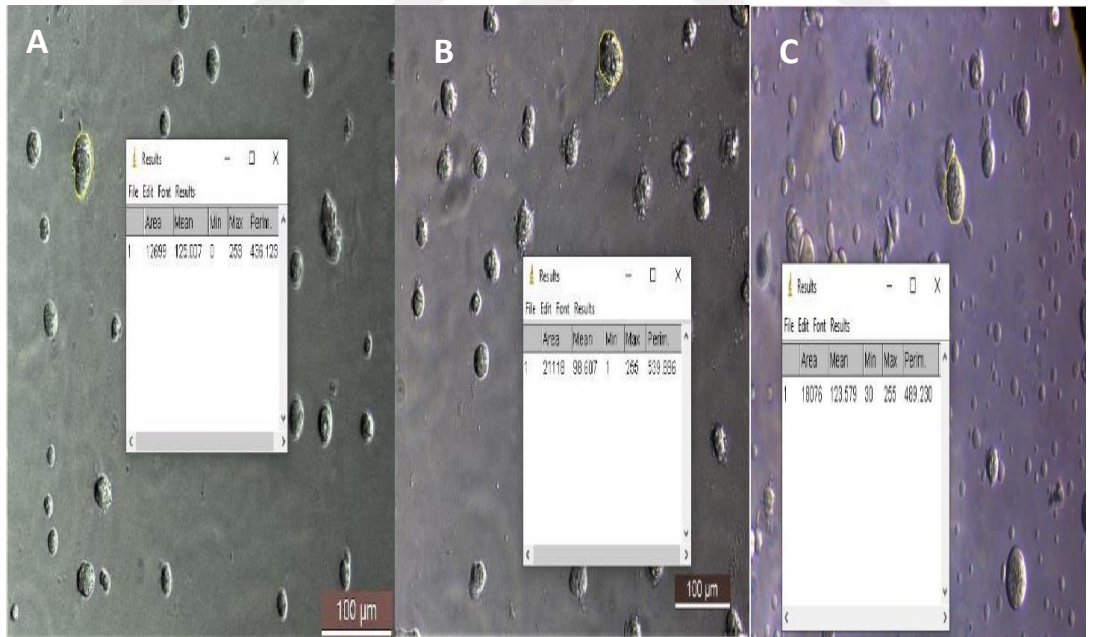
Şekil 3.11. PRP- Fibroblast (L929) aktivator grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



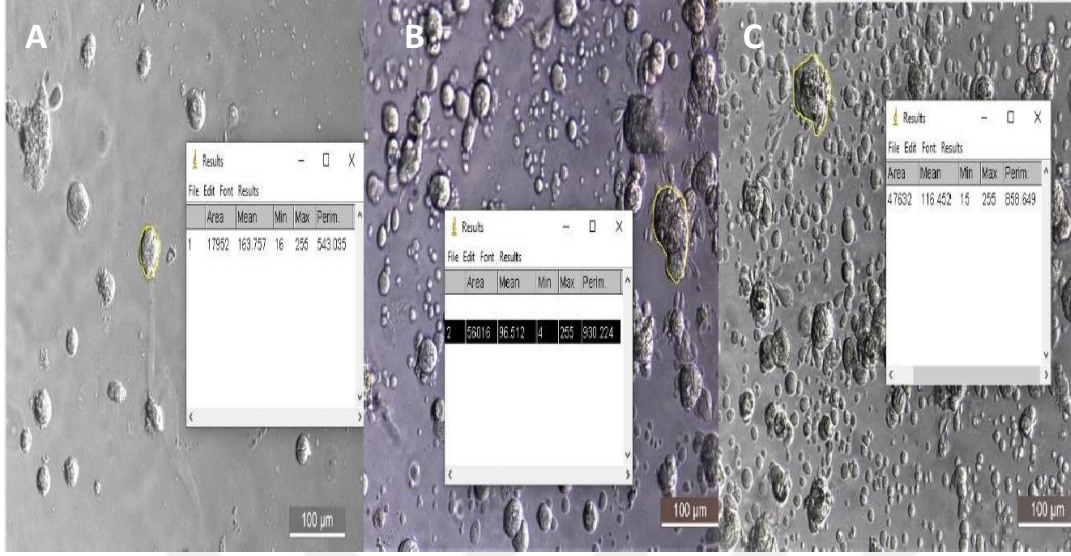
Şekil 3.12. PRP- Fibroblast (L929) inhibitör grubu 24,48,'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat /72.saatte belirgin bir sferoid yapısı görülememiştir.



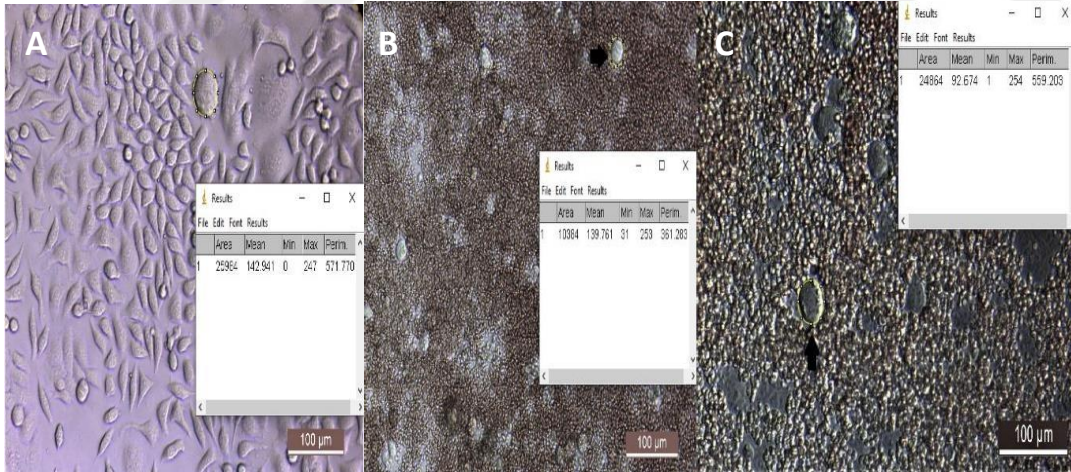
Şekil 3.13. Matrigel - Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



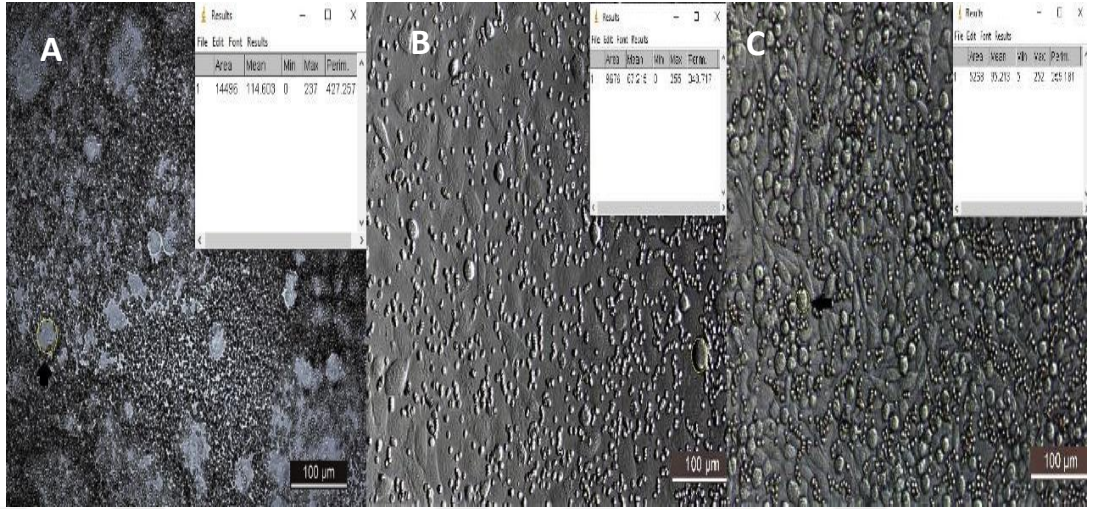
Şekil 3.14. Matrigel - Fibroblast (L929) aktivator grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



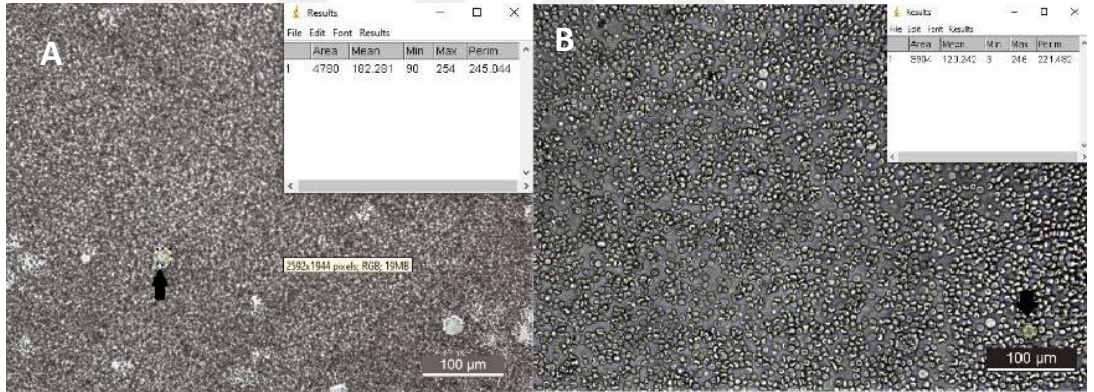
Şekil 3.15. HaCaT - PRP- Fibroblast (L929) kontrol grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



Şekil 3.16. HaCaT - PRP- Fibroblast (L929) aktivator grubu 24,48,72'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat (C) 72.saat



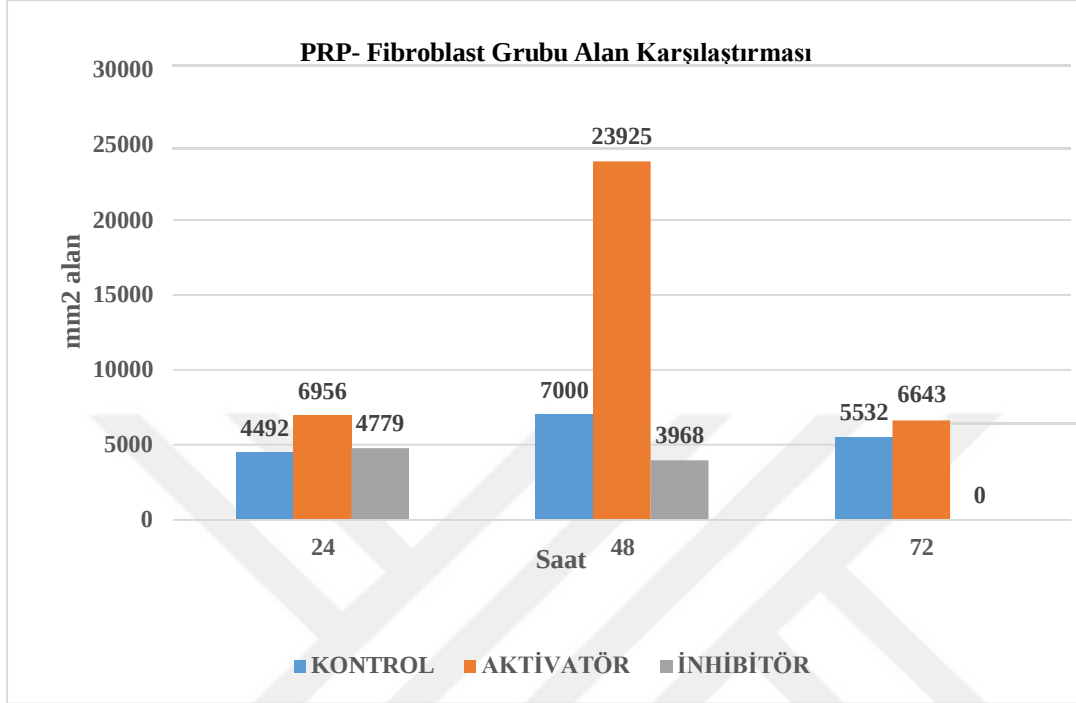
Şekil 3.17. HaCaT - PRP- Fibroblast (L929) inhibitör grubu 24,48'nci saatlerde oluşan sferoidlerin alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı kullanılarak

(A) 24.saat (B) 48.saat /72.saatte belirgin bir sferoid yapısı görülememiştir.

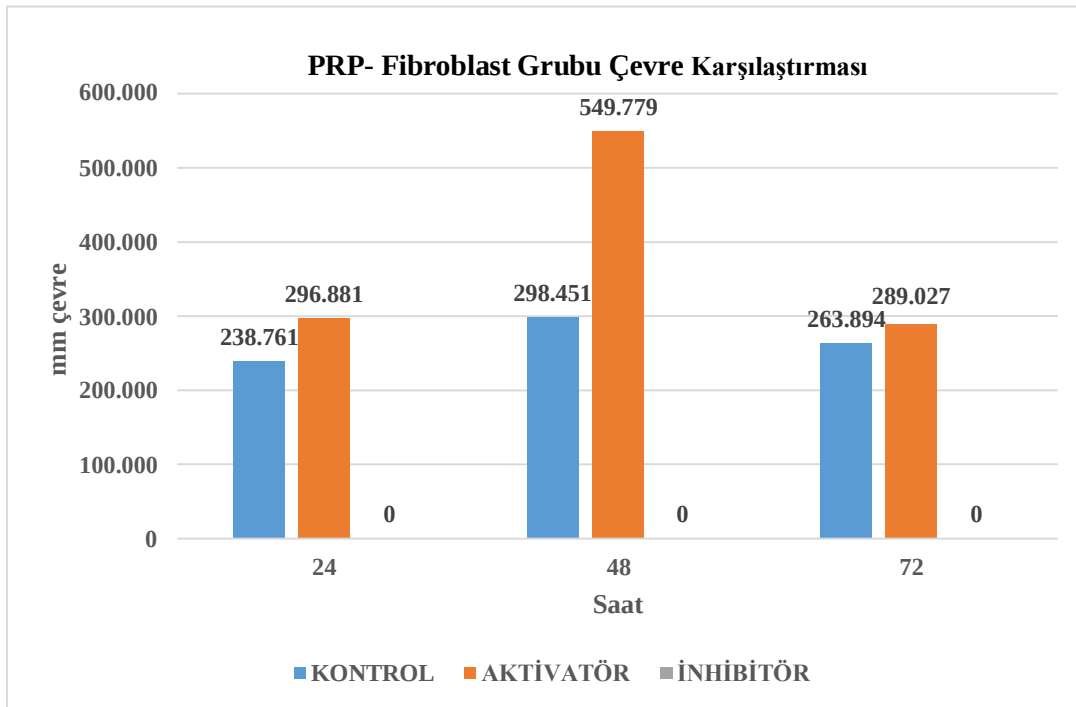
3.3.

ÇİZELGELER

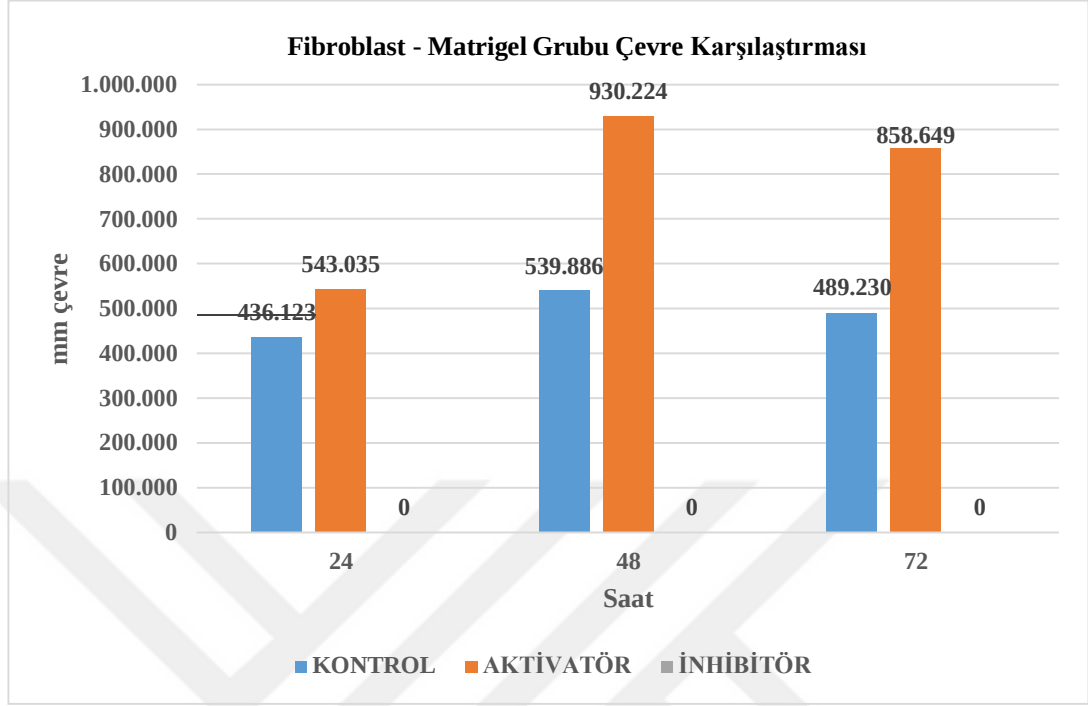
Çizelge 3.1.



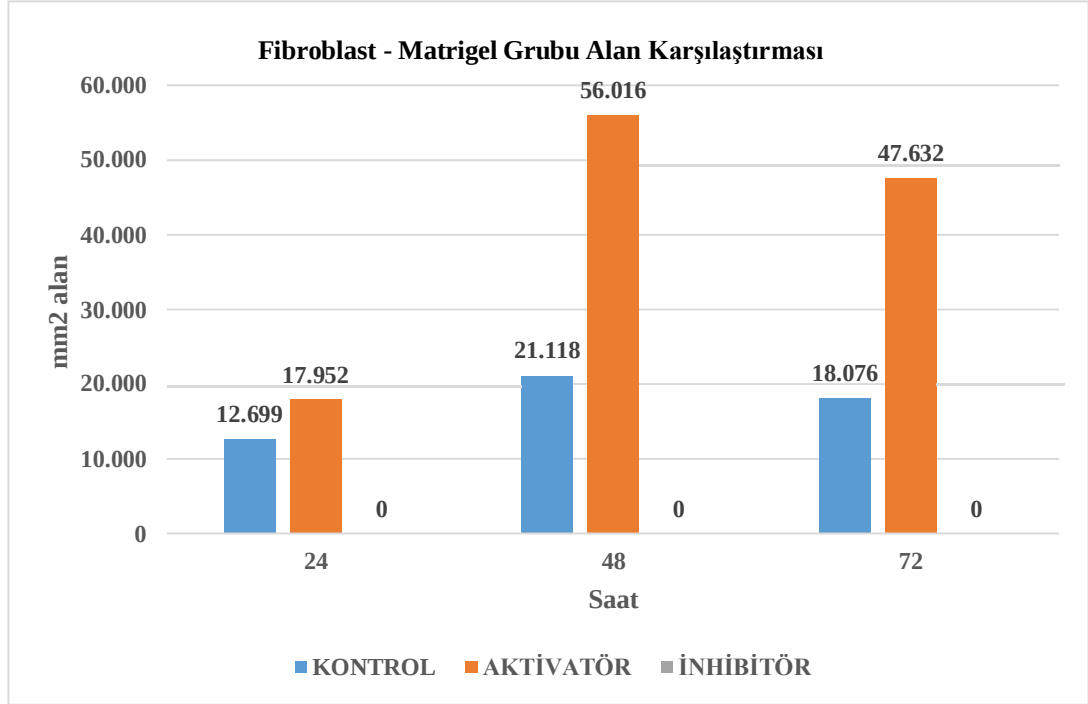
Çizelge 3.2.



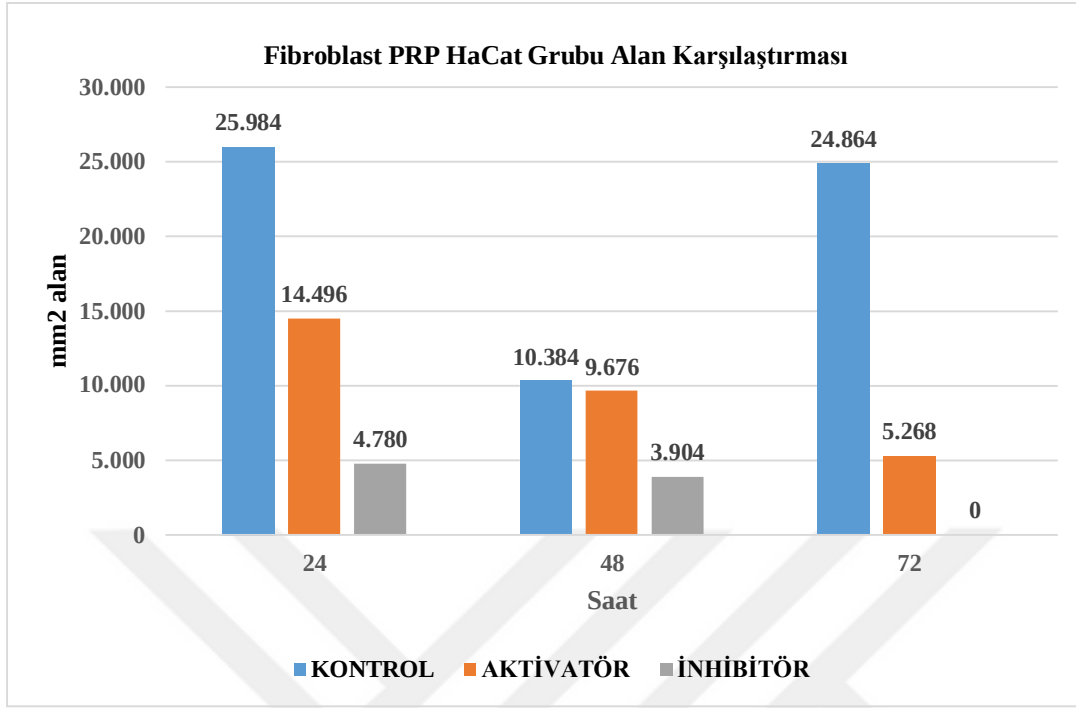
Çizelge 3.3.



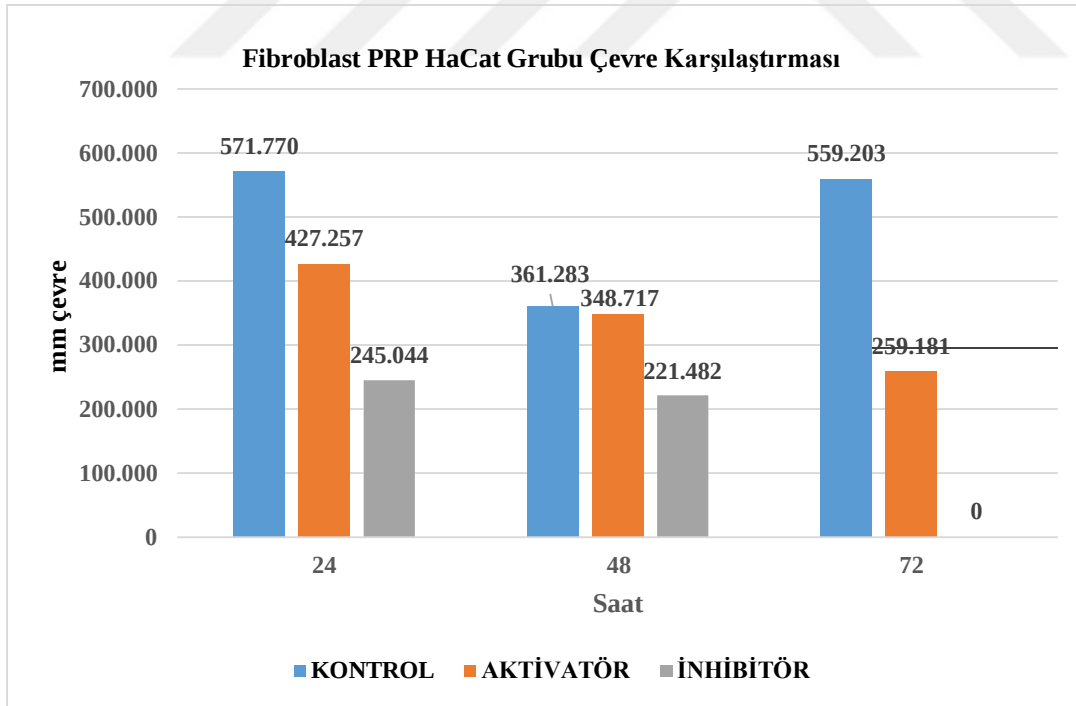
Çizelge 3.4.



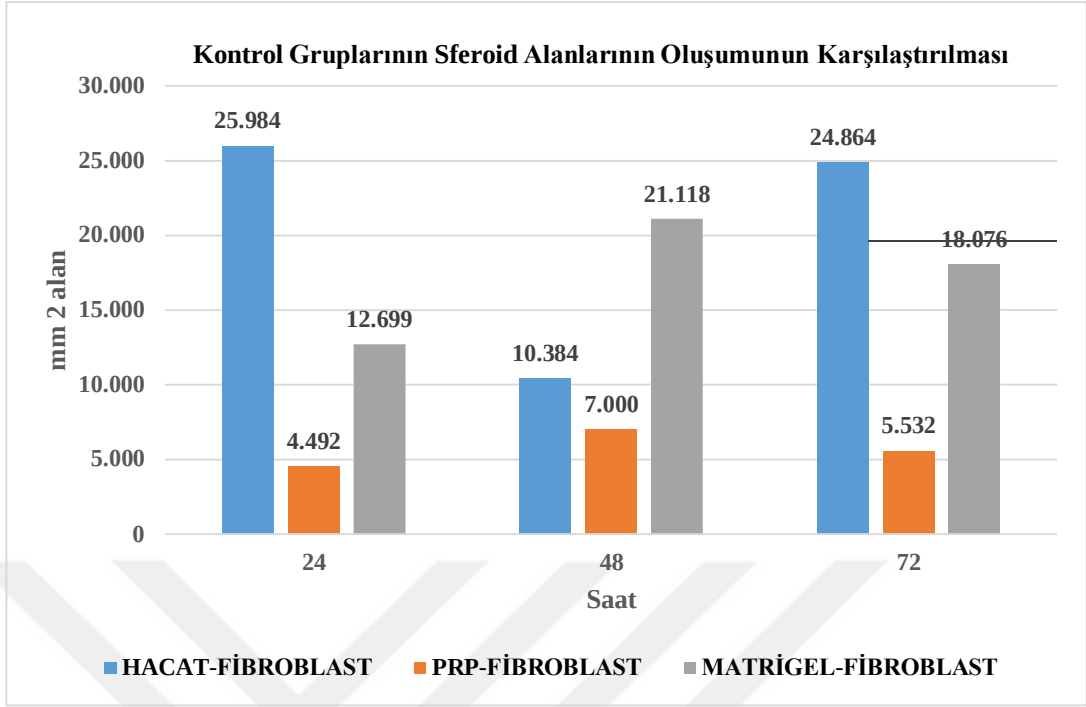
Çizelge 3.5.



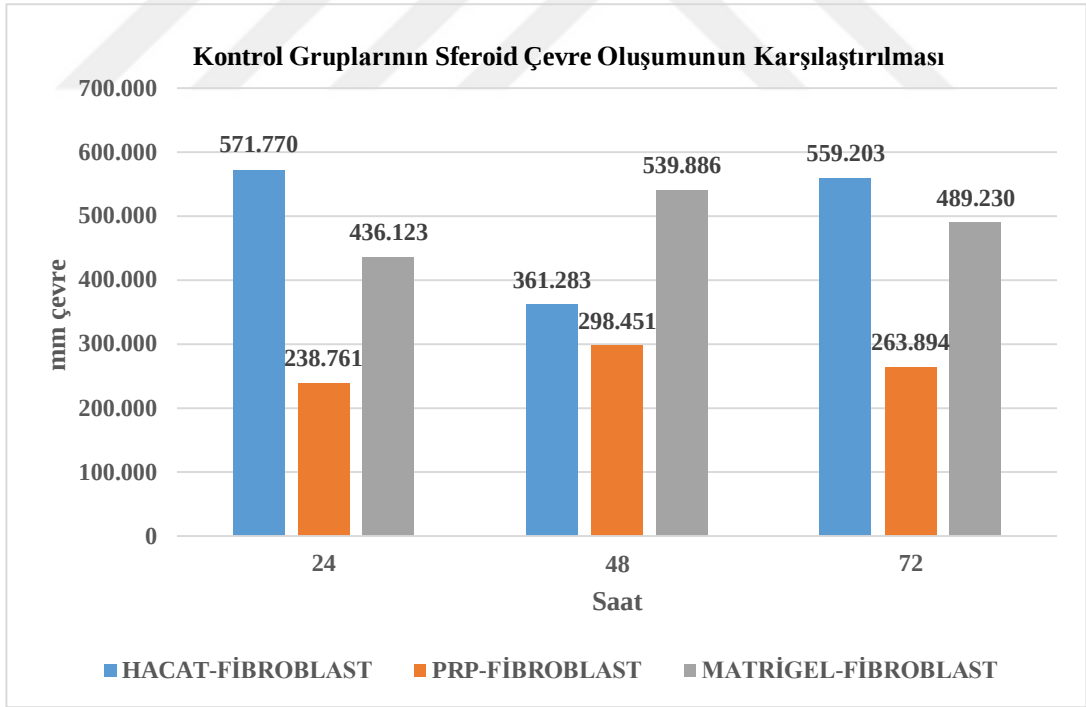
Çizelge 3.6.



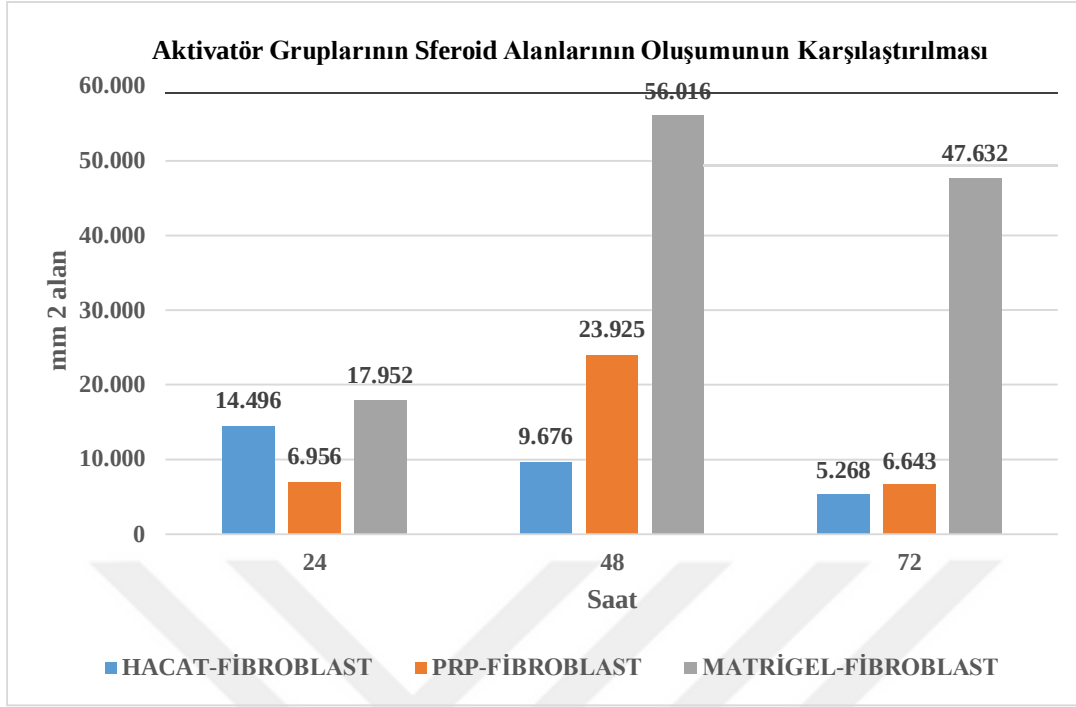
Çizelge 3.7.



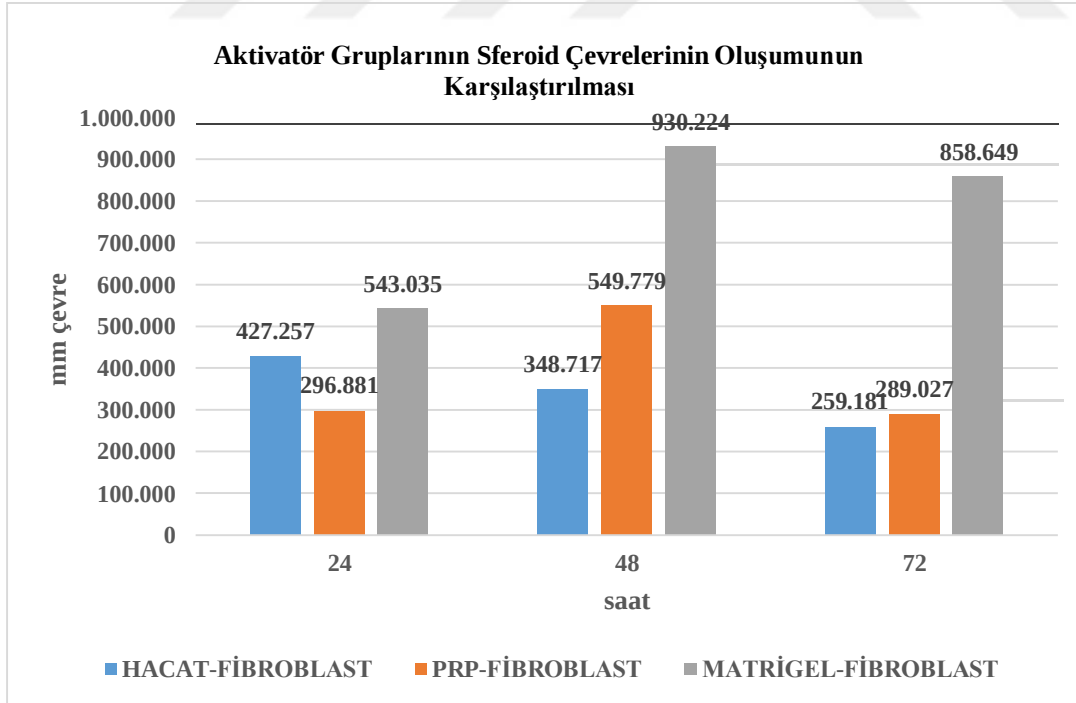
Çizelge 3.8.



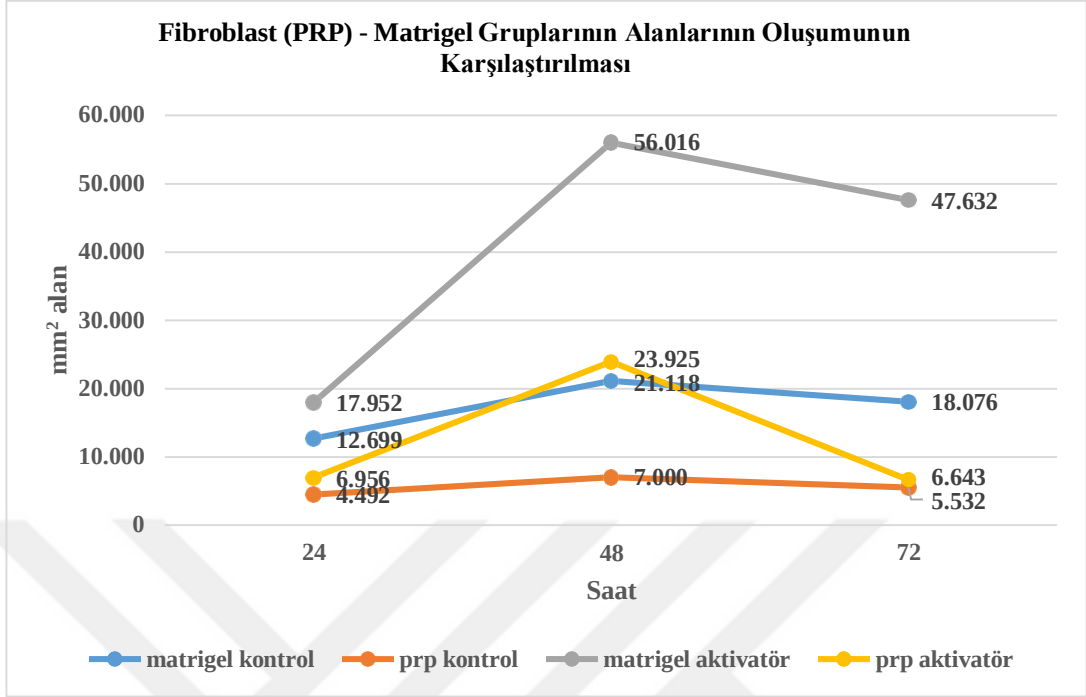
Çizelge 3.9.



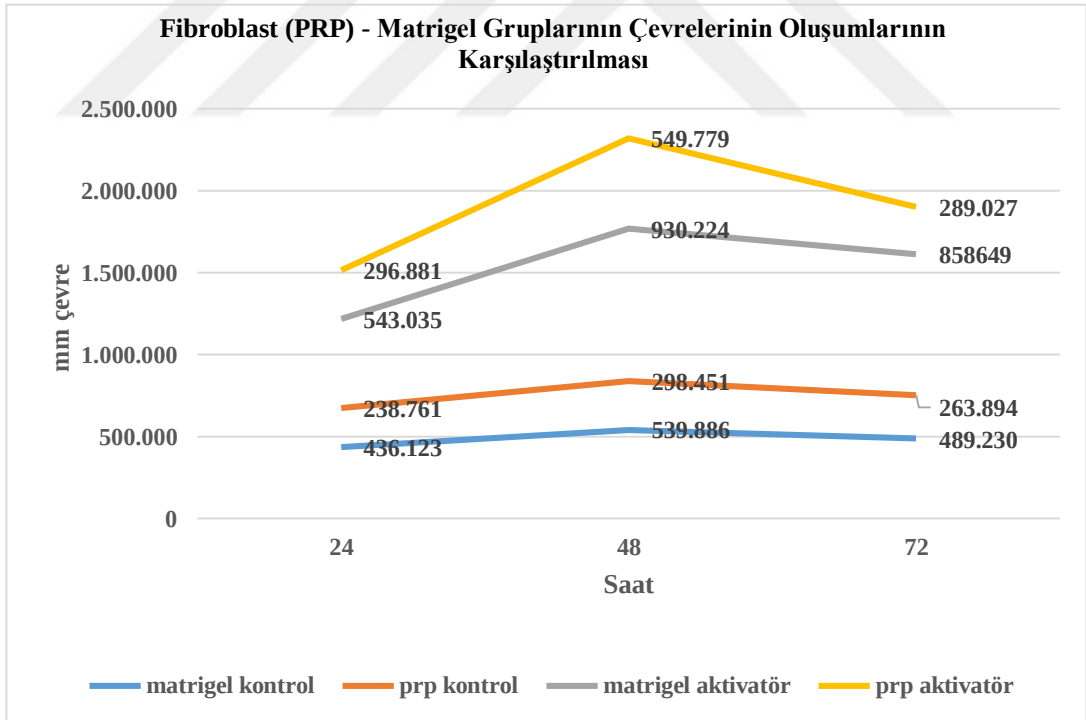
Çizelge 3.10



Çizelge 3.11.



Çizelge 3.12.





4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yara geçmişten bu güne üzerinde birçok çalışma ve araştırma yapılan bir olgudur. Dokularda yaralanma ve iyileşme sürecindeki mekanizmalarda hep merak edilmiş ve araştırılmıştır (Barbul ve Efron, 2015). Yara oluşumu, iyileşme sürecindeki mekanizma, iyileşme için tedavi yöntemleri arayışları da dünya çapında yaygın olarak en çok araştırılan ve deneyimlenen konular arasında yer almaktadır (Daunton ve ark., 2012). Yara modellerinde in vivo, in silico, ex vivo, in vitro gibi birçok modelleme yapılmaktadır (Ud-Din ve Bayat, 2017).

Bu çalışmalar içerisinde olan ve canlı ortamda çalışma anlamına gelen in vivo modeller yara iyileşme sürecindeki kompleks olayların incelenmesi için en çok tercih edilenleridir. İn vivo çalışmalar çok tercih edilsede deney hayvanlarının deri yapıları insandakine benzememesi ve iyileşme sürecinde gelişen olgular insandan farklı olması nedeniyle insanda oluşan yara oluşumu ve iyileşmesindeki fizyolojiyi göstermemektedir (Greenhalgh, 2005). Deney hayvanı yara modelleri çalışmalarında kolay üretilmesi, dayanıklı olması, kısmende olsa modellemenin kolay olmasından dolayı sıklıkla çalışılan kemirgen grubu canlılardır; kemirgenlerde yara iyileşmesinin kontraksiyon ile olması insandaki gibi granülasyon dokusunun gelişmemesi, ayrıca deri eklenti bezleri ve katmanlarının yerleşimlerinin farklı olması da çalışma sonuçlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Dorsett-Martin, 2004). Deri yapısı insana en yakın canlı domuzdur. Kemirgenlerde dermis, epidermis kalınlıkları inceyken domuz ve insanda kalındır. Yara iyileşmesi kemirgenlerde kontraksiyon ile olurken insan ve domuzda granülasyon ve epitelizeasyon ile gerçekleşmektedir. Domuz ve insanda kıl folikül yapıları benzerken, kemirgenlerde kıl folikülünün fazla olması insanlardan ayıran özelliklerdendir. Kemirgenlerde apokrin ter bezleri memeye lokalize olmuş durumdayken insanda perine ve aksillada domuzlarda ise vücutta yaygın halde bulunmaktadır (Dorsett-Martin, 2004; Sullivan ve ark., 2001; Wong ve ark., 2011).

Google scholar üzerinde son 5 yıl baz alınarak yapılan çalışmalar aratıldığında ‘wound healing mouse model’ adı altında 18.800 sonuç, ‘wound healing rat model’ aramasında 19.200 sonuç, ‘wound healing rabbit model’ aramasında 18.200 sonuç, wound healing pig model aramasında ise 17.700 sonuç olduğu görülmektedir.

Çalışmalarda hayvanların kullanılması hem etik sorunları beraberinde getirmekte hemde çalışmalar sırasında istenmeyen durumların gelişmesine neden olmaktadır. Çalışma sırasında yapılan müdahalelerde hayvanlarda sepsis gelişmesi, müdahale sırasında şok gelişmesi ya da yapılan müdahalelerin hayvan üzerinde istenilen etkileri yaratmaması, yapılan müdahaleyi hayvanın tamamen tolere etmesi gibi olgularla sonuçlanabilmektedir (Kaya ve Çevik, 2011). Hayvanların bakımı ve beslemesi, ölen hayvanların yerine konması, çalışmanın yinelenebilmesi gibi durumlar hem ekstra zaman hem de ekstra ekonomik külfet gerektirmektedir (Yeğen ve Gören, 2005) . Sauer ve ark. Yaptıkları çalışmada alternatif tüm yollar denendikten sonra hayvan deneylerine başvurulması gerektiğini savunmuşlardır. Deney hayvanı modellemelerinde hayvanın çevre koşullarından etkilenmesinin önüne geçilememesi, ilaç uygulamalarında uygulanan ilacın önce metabolize olması ve tüm etkisinin net bir şekilde ortaya konamaması, uygulamalara hayvanların gösterdiği reaksiyonlar çalışmalarda kısıtlayıcı faktörlerdir (Karajus, 2016). Tüm bunların ışığında insan doku ve hücrelerinin tüm özelliklerini yansıtan hücre kültürleri kullanımı ve geliştirilmesi son yıllarda ön plana çıkmaya başlamıştır. Hayvan çalışmalarındaki etik kaygılar ve İnsani Deney Tekniği İlkeleri (4R İlkesi) düşünüldüğünde yapılacak olan deneylerin hücre kültürüne taşınması bu kaygıları ortadan kaldırmaktadır. Tarihi çok eskilere dayanan hücre kültürü çalışmaları 2B olarak canlı dokusundaki hücrelerin aktivitelerini, yapılarını, gelişimlerini incelemek için kullanılmaktadır (Duval ve ark., 2017).

Toksikolojik, farmakolojik, mikrobiyolojik, onkolojik incelemeler gibi birçok farklı alanda kullanılan ve canlı hayatı için önemli gelişmelerin oluşmasına zemin hazırlayan hücre kültürü çalışmaları yara modellemeleri ve yara iyileşmesinde gelişen hücresel aktivitelerin incelenmesinde de kullanılmaktadır (Huh ve ark., 2011; Duval ve ark., 2017). Bu çalışmalar son yıllara kadar 2B hücre kültüründe modellenmekte önce yara oluşumunu karakterize etmek için tabanda kaplı olan hücrelere mekanik bir zarar verilmekte sonra da hücrelerin bu bölgeye göçlerine, kullanılan ya da geliştirilen ilaçların hücresel etkilerine, toksik olup olmadığına, mekanik yaralanmalara karşı hücresel yanıtlara bakılmaktadır (Liang ve ark., 2007; Jonkman ve ark., 2014). Bu çalışmalarla ölçülebilir sonuçlar elde edilse de gelişen teknoloji ve artan arayışlar sonucunda 2B hücre kültürlerinin hayvan deneylerine kolay tekrarlanabilir olması, çevre şartlarının kontrolünün

sağlanabilmesi ve ekonomik olması açısından alternatif olduğu fakat in vivo ortamda gelişen kompleks olayı yansıtmada eksik kaldığı sonucuna varılmıştır (Mazzoleni ve ark., 2009). Hücre üremesinin kültür vasatı ve kültür kabındaki taban ile sınırlı olması, hücre hücre ve hücre ECM etkileşimlerinin sınırlı olması da 2B hücre kültürlerinin canlıdaki organoid yapıyı yansıtmadaki sınırlılıklarındandır (Bonnier ve ark., 2015;Choi ve ark., 2010). Bu sınırlılıkların ortadan kalkması ve in vivo organoid yapının ve reaksiyonlarının incelenmesi çalışmalarının artması ve gelişen araştırma teknikleri sonucu 3B'li hücre kültürleri yapılmaya başlanmıştır (Duval ve ark., 2017). 3B hücre kültürlerinde oluşan sferoid yapılarda hücre hücre ve hücre ECM etkileşimleri sonucu proliferasyon, polarizasyon gen ve protein ekspresyonları gibi birçok hücresel davranışın izlenilebilirliğini in vivo şartlardaki gibi sağladığı görülmüştür (Steinwechs ve ark., 2016;Marby ve ark., 2016). 3B hücre kültürünün temelinde ekstraselüler matriks benzeri bir yapıda (sıvı, katı) oluşan sferoidlerin in vivo şartlardaki yapısal protein ve molekküllerin salgılanmasının sağlanması bulunur (Weaver ve ark., 1997;Lin ve ark., 2008). 3B hücre kültürlerinin kullanılarak yapılan birçok çalışmada 3B hücre kültürlerinin 2B hücre kültürlerine oranla in vivo olgulara daha yakın olduğu ve alınan sonuçların deney hayvanı çalışmaları sonuçlarına yakınlığı göz önüne konulmuştur (Polat, 2020). Bu çalışmalar ışığında 3B yara modellemelerinin yapılıp yapılamayacağı ve yara iyileşmesinde etkin rol alan hücrelerin yine yara iyileşmesinde kullanılan ve iyileşmeyi hızlandıran etkenler karşısında ne tepki vereceğini araştırmak için bu çalışma yapılmıştır. İki farklı iskele kullanılarak oluşturulan üç farklı hücre hücre etkileşimlerinde yara iyileşmesinde en çok rol alan hücrelerin 3B olarak kültürlenmesi ve yine yara iyileşmesini hızlandıran ve inhibe eden maddelerin bu hücrelere etkisi incelendi. Çalışma gruplarının incelemelerinin değerlendirilmesinde oluşan sferoid yapıların çokluğu ve büyüklüğü değerlendirildi. Yara iyileşmesinde fibroblastların migre ve prolife olması aktivasyonu ile alakalı olduğundan değerlendirme sferoidlerin sayısı ve büyüklüğüyle doğru orantılandı. Sferoidlerin sayısı nitel olarak değerlendirmeye alınırken oluşan sferoid yapıların alan ve çevre ölçümleri 'Image J' programı ile yapılarak nicel olarak değerlendirildi. Oluşan sferoid yapılar ne kadar çoksa ya da büyükse fibroblast etkinliği var ve migrasyon yapıyor olarak değerlendirildi. Yapılan bu çalışmada kullanılan kanın PRP kısmı da hem fibroblast hücrelerinin aktivasyonunu artırmış hem de hücre hücre bağlantıları için iskelet görevi görmüştür.

PRP'nin yara iyileşmesinde olumlu etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hudgens ve ark., 2016).

Yapılan bu 3B hücre kültürü çalışmasında sferoid oluşumu gözlenmiş ve kullanılan aktivatörle fibroblast migrasyonunun arttığı sonucuna varılmıştır. PRP- HaCaT- Fibroblast grubunda oluşan sferoid yapıların büyüklüğünün ve sayısının fibroblast – PRP grubundaki çalışmaya göre daha yoğun olduğu ve belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Bunun kaynağı olarak HaCat ve fibroblast hücrelerinin arasında skar oluşumunu sağlayan çapraz bağların oluşmasının olabileceği düşünülmüştür (Ghahary ve Ghaffari, 2007). Fibroblast migrasyonunun en iyi değerlendirildiği ve görüldüğü grup ise matrigel ile yapılan çalışma grubudur. Diğer gruplarda da sferoid oluşumu görülmüş fakat büyüklük ve sayı bakımından matrigeldeki kadar belirginlik göstermemiştir. Yara çalışması yapılmak için ve bu hatta migrasyonun görülmesi için çizik modellemesi yapılmak istendiğinde jel formunda olan yapılardan dolayı hücreler kenarlarda toplanmış ve jel formunun bozulmasından kaynaklı bu çalışma yapılamamıştır. Çalışmada oluşan sferoid yapıların çevre ve alanları hesaplanmış bunların karşılaştırılmasında ise yine matrigel grubunun öne çıktığı gözlenmiştir. Yarada migrasyon olgularında hücre hücre bağlantılarının ve hücre matriks bağlantılarının incelenmesinde ve fibroblast aktivasyonunun incelenmesinde deney hayvanı modellemesinden önce başvurulabilecek bir modelleme olarak kabul edilebilir görülmüştür.

Sonuç olarak:

Yara iyileşmesinde etkin rol alan hücre hücre bağlantılarının ve hücre ECM incelenmesinde kullanılabilir hem 2B hem de in vivo çalışmalara alternatif bir çalışma olarak tercih edilebilir olduğu; yara iyileşmesinde kullanılacak aktivatör ve inhibitör maddelerin hücre hücre etkileşimlerindeki ve bağındaki olguların incelenmesinde tercih edilebilir bir modelleme olarak kullanılabilir olduğu, yara iyileşmesinde rol alan fibroblast ve keratinosit aktivasyonunun incelenmesi için 2B hücre kültürüne alternatif in vivo şartlara daha yakın olduğu için de deney hayvanı çalışmalarına alternatif bir ön çalışma olabileceği, deney hayvanı çalışmasına başvurmadan önce hem ekonomik hem de tekrarlanması kolay olduğundan tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

Çalışma yapım ve değerlendirme aşamaları göz önüne alındığında, farklı hücre iskeleti yapıları kullanılarak ve farklı hücreler kullanılarak çalışmanın genişletilebileceği, daha kompleks 3D kültürler yapılarak hücrelerin ve hücresel etkileşimlerin gösterilebileceği kompleks olguların incelenebileceği çalışmalar yapılabileceği düşünülmektedir. Çalışmada kullanılan materyaller değerlendirildiğinde matrigel matrixin hücredeki ECM'i daha iyi taklit ettiği ve hücre iskeleti olarak tercih edildiğinde sferoid yapılarını daha uzun süre koruduğu ve oluşumun uzun süre devam ettiği görülmüştür. kronik yara iyileşme süreci incelenmek istendiğinde çalışma materyali olarak tercih edilebilir olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

1. Ahmet Ü, Aydın H, Tüzün İS, Karşıdağ T. Deri iyileşmesinin mekanik olarak incelemesi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*. 2014;2(3):141-5.
2. Alonso JE, Lee J, Burgess AR, Browner BD. The management of complex orthopedic injuries. *Surg Clin North Am*. 1996 Aug;76(4):879-903. doi: 10.1016/s0039-6109(05)70486-2. PMID: 8782479.
3. Altun, A. ve Keskin, İ. (2020). Hayvan Çalışmalarında Uygun Model Seçim Kuralları ve Etik Durum . *Sakarya Tıp Dergisi* , 10 (2) , 359-364 . DOI: 10.31832/smj.679500
4. Alvarez OM, Gilbreath RL. Thiamine influence on collagen during the granulation of skin wounds. *J Surg Res* 1982; 32: 24- 31. [CrossRef]
5. Alves, C. C., Torrinhas, R. S., Giorgi, R., Brentani, M. M., Logullo, A. F., Arias. V., Mauad, T., Silva, L. F. F. and Waitzberg, L. Short-term specialized enteral diet fails to attenuate malnutrition impairment of experimental open wound acute healing. *Nutrition* 2010; 26, 873–79.
6. Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*. 2015;4(2):133-161.
7. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Threedimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences* 2015;16(3):5517-27.
8. Ashby WJ, Zijlstra A. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integr Biol*. 2012;4:1338.
9. Auerbach LJ, Galvez MG, De Clerck BK, Glotzbach J, Wehner MR, Chang EI, et al. A novel mouse model for frostbite injury. *Wilderness Environ Med* 2013; 24: 94-104. [CrossRef]
10. Aydın OE, Tan Ö, Çinal H, Kara M, Çakmak MA. Deneysel Yara Modelleri. *Türkiye Klinikleri J Plast Surg-Special Topics* 2015; 4: 5-1
11. Aydın, Osman Enver & Tan, Önder & Cinal, Hakan & Kara, Murat & Akif, Mehmet. (2014). deneysel yara modelleri. 4. 5.
12. Baker EL, Bonnecaze RT, Zaman MH. (2009). Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys J* 97:1013–1021.
13. Baktır G. Wound Repair and Experimental Wound Models. *Experimed* 2019; 9(3): 130-7
14. Barbul A, & Efron D.T., & Kavalukas S.L. (2015). Wound healing. Brunicaardi F, & Andersen D.K., & Billiar T.R., & Dunn D.L., & Hunter J.G., & Matthews J.B., & Pollock R.E.(Eds.), *Schwartz's Principles of Surgery*, 10e. McGraw Hill. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=980§ionid=59610850>
15. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2008;16(5):585-601.
16. Baum CL, Arpey CJ: Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674 –86.
17. Bercu, M. M., Arien-Zakay, H., Stoler, D., Lecht, S., Lelkes, P. I., Samuel, S., ... & Elchalal, U. (2013). Enhanced survival and neurite network formation of human umbilical cord blood neuronal progenitors in three-dimensional collagen constructs. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(2), 249-261.

18. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* 1995; 98: 827-33. [CrossRef]
19. Bischoff M, Kinzl L, Schmelz A: The complicated wound. *Unfallchirurg* 1999; 102: 797 – 804 [in German].
20. Bokhari, M., Carnachan, R. J., Cameron, N. R., & Przyborski, S. A. (2007). Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *Journal of anatomy*, 211(4), 567-576.
21. Bonnier F, Keating M, Wrobel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A, et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in vitro*. 2015;29(1):124-131.
22. Breslin, S., and O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*, 18(5-6), 240-249
23. Broughton G, Janis JE, Attinger CE: The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 suppl): 12S – 34S.
24. Brown RL, Breeden MP, Greenhalgh DG. PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Surg Res* 1994; 56: 562-70. [CrossRef]
25. Candan Ç. (2006). Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi*, 20(3), 231-241.
26. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Threedimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World Journal of Stem Cells*. 2019;11(12):1065
27. Cheng, X., Irimia, D., Dixon, M., Sekine, K., Demirci, U., Zamir, L., ... & Toner, M. (2007). A microfluidic device for practical label-free CD4+ T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on a Chip*, 7(2), 170-178.
28. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Experimental cell research*. 2013;319(1):75-87
29. Choi SW, Yeh YC, Zhang Y, Sung HW, Xia Y. Uniform beads with controllable pore sizes for biomedical applications. *Small*. 2010;6(14):1492-1498
30. Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13(5):701-25.
31. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W; Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*. 2005 Jun;33(3):261-87. doi: 10.1177/026119290503300313. PMID: 16180980.
32. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg* 1999; 134: 200-5. [CrossRef]
33. Coşkun Ö, Uzun G, Dal D ve ark. Kronik yarada tedavi yaklaşımları. *Gülhane Tıp Derg* 2016; 58: 207-28.
34. Daunton C, Kothari S, Smith L, Steele D. A history materials and practices for wound management. *Wound Practice and Research* 2012;20(4):174-85.

35. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 1:283-9.
36. Diegelmann RF, Lindblad WJ, Cohen IK. A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J Surg Res* 1986; 40: 229-37. [CrossRef]
37. Dimaio VJ, Dimaio D. Blunt trauma wounds. In Dimaio VJ, Dimaio D ed. *Forensic Pathology*. 2nd ed. Florida, USA: CRC Press LLC; 2001:92-116.
38. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 591-9. [CrossRef]
39. Dubay DA, Franz MG. Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surgical Clinics*. 2003;83(3):463-81.
40. Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Current opinion in biotechnology*. 2015;35:118- 126
41. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-277
42. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Threedimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-218.
43. Ekizoğlu O, Arıcan N. http://klinikgelisim.org.tr/eskisayi/klinik_2009_22/05.pdf
44. Elçin AE, 2022: <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=62509>
45. Emanuelsson P, Kratz G. Characterization of a new in vitro burn wound model. *Burns* 1997; 23: 32-6. [CrossRef]
46. Eming SA, Martin P, Canic MT: Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine* 2014; Vol. 6, Issue 265, pp. 265-6.
47. Erickson, I. E., Huang, A. H., Chung, C., Li, R. T., Burdick, J. A., & Mauck, R. L. (2008). Differential maturation and structure–function relationships in mesenchymal stem cell-and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, 15(5), 1041-1052.
48. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in biotechnology*. 2013;31(2):108-115.
49. Flangan M: The physiology of wound healing. *J Wound Care* 2000; 9: 299 – 300.
50. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 2009;37:2259-72.
51. Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*: Wiley-Liss; 2005
52. Galiano RD, Michaels VJ, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 485-92. [CrossRef]
53. Ghahary, A., & Ghaffari, A. (2007). Role of keratinocyte–fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. *Wound Repair and Regeneration*, 15, S46-S53.
54. Giaever I, Keese CR. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:7896–900.

55. Goetsch KP, Niesler CU. Optimization of the scratch assay for in vitro skeletal muscle wound healing analysis. *Anal Biochem.* 2011;411:158–60.
56. Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, Gorin MA, Paolillo C, Capoluongo E, et al. Development of an automated and sensitive microfluidic device for capturing and characterizing circulating tumor cells (CTCs) from clinical blood samples. *PloS one.* 2016;11(1):e0147400
57. Goldman R: Growth factors and chronic wound healing: past, present and future. *Adv Skin Wound Care* 2004; 17: 24 – 35.
58. Greenhalgh DG. Models of wound healing. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 293-305. [CrossRef]
59. Greenhalgh DG. Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plastic Surg* 2003; 30: 37-45. [CrossRef]
60. Greenhalgh DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1019-30.
61. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in cell biology.* 2003;13(5):264-269.
62. Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M. J., & Petersen, O. W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of cell science*, 115(1), 39-50.
63. H.K. Kleinman, M.L. McGarvey, J.R. Hassell, V.L. Star, F.B. Cannon, G.W. Laurie, *et al.* Basement membrane complexes with biological activity *Biochem*, 25 (1986), pp. 312-318
64. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Engineering Part A.* 2010;17(5-6):713-724
65. Harjanto, D. ve Zaman, M. H. (2010). Matrix mechanics and receptor–ligand interactions in cell adhesion. *Organic & biomolecular chemistry*, 8(2), 299-304.
66. Harrison RG, Greenman M, Mall FP, Jackson C. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record.* 1907;1(5):116-128.
67. Hart J: Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* 2002; 11: 205 – 9.
68. Harunari, N., Zhu, KQ, Armendariz, RT, Deubner, H., Muangman, P., Carrougner, GJ, ... & Engrav, LH (2006). Histology of the thick scar in the female, red Duroc pig: recent similarities to the human hypertrophic scar. *Burns*, 32 (6), 669-677.
69. Haycock, J. W. (2011). 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. In *3D cell culture* (pp. 1-15). Humana Press
70. Holly SP, Larson MK, Parise LV: Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 2000; 261: 69 – 74.
71. <http://fizyoaktif.com.tr/?p=965> (15 Ocak 2022)
72. Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. Platelet-Rich Plasma Activates Proinflammatory Signaling Pathways and Induces Oxidative Stress in Tendon Fibroblasts. *Am J Sports Med.* 2016 Aug;44(8):1931-40. doi: 10.1177/0363546516637176. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27400714; PMCID: PMC4970921.
73. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology.* 2011;21(12):745-754

74. İnan NB, Duman N. Yeni ex vivo ve in vivo sikatris/ yara (dokusu) modelleri. Serarslan G, editör. Sikatris Tedavisine Güncel Yaklaşım. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.66-70.
75. Jedrzejczak-Silicka M (2017). History of cell culture. *New Perspectives on Cell Culture Technology*, 1-42. <https://doi.org/10.5772/66905>
76. Jerneja V., Constance C., Walter C., Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review, *Journal of Surgical Research*, Volume 210, 2017, Pages 269-280, ISSN 0022-4804, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.10.016>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480416304565>)
77. Ji C, Khademhosseini A, Dehghani F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2011;32(36):9719-9729.
78. Jing X, Shi Q, Bi W, Zeng Z, Liang Y, Wu X, et al. Rifampicin protects PC12 cells from rotenone-induced cytotoxicity by activating GRP78 via PERK-eIF2 α -ATF4 pathway. *PLoS One* 2014; 9: doi: 10.1371/journal.pone.0092110
79. Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr*. 2014;8:440–51.
80. Kane, B. J., Zinner, M. J., Yarmush, M. L., & Toner, M. (2006). Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4291-4298.
81. Karasu A, Bakır B. Yara ve yara iyileşmesi. 2008. *Veteriner Cerrahi Dergisi*. 14(1):36-43. 95
82. Kaya, M. & Çevik, A. (2011). Hayvan deneylerinde planlanma ve model seçimi . *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (2) , 36-39 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/iudtaed/issue/8971/111908>
83. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:1554–9.
84. Kenneth JC: Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosisresearch* 2012; Volume 129, Issue 3, Pages 220–4.
85. Kilpadi DV, Lessing C, Derrick K. Healed porcine incisions previously treated with a surgical incision management system: mechanical, histomorphometric, and gene expression properties. *Aesthetic Plast Surg* 2014; 38: 767-78. [CrossRef]
86. Klein, E. A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F. J., Xu, T., ... & Assoian, R. K. (2009). Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Current biology*, 19(18), 1511-1518
87. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*. 2015;227(6):746-756.
88. Knowlton S, Onal S, Yu CH, Zhao JJ, Tasoglu S. Bioprinting for cancer research. *Trends in biotechnology*. 2015;33(9):504-513.
89. Kobayashi, H., Man, S., Graham, C. H., Kapitain, S. J., Teicher, B. A., & Kerbel, R. S. (1993). Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3294-3298.
90. Koch TM, Münster S, Bonakdar N, Butler JP, Fabry B. 3D traction forces in cancer cell invasion. *PloS one*. 2012;7(3):e33476

91. Koçancı FG, Aslım B. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Modelleri ve Uygulamaları. Güvenç D, editör. İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.8-14.
92. Komarcevic A: The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000; 53: 363 – 8 [in Croatian].
93. Krizbai IA, Bauer H, Amberger A, et al: Growth factor-induced morphological, physiological and molecular characteristics in cerebral endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 594 – 600.
94. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Med* 1980; 43: 47-51. [CrossRef]
95. Lan R, Geng H, Hwang Y, Mishra P, Skloss WL, Sprague EA, et al. A novel wounding device suitable for quantitative biochemical analysis of wound healing and regeneration of cultured epithelium. *Wound Repair Regen.* 2010;18:159–67.
96. Levenson SM, Gruber CA, Rettura G, Gruber DK, Demetriou AA, Seifter E. Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing. *Ann Surg* 1984; 200: 494-512. [CrossRef]
97. Levenson SM, Kan-Gruber D, Gruber C, Molnar J, Seifter E. Wound healing accelerated by *Staphylococcus aureus*. *Arch Surg* 1983; 118: 310-20. [CrossRef]
98. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology.* 2007;25(1):9-18.
99. Li S, Huang NF, Hsu S: Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 2005; 96: 1110 – 26.
100. Li, X., Valadez, A. V., Zuo, P., & Nie, Z. (2012). Microfluidic 3D cell culture: potential application for tissue-based bioassays. *Bioanalysis*, 4(12), 1509-1525.
101. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2:329–33.
102. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology.* 2008;3(9-10):1172-1184.
103. Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T, Koga T, Sugimoto Y, et al. 12-hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J Exp Med.* 2014;211:1063–78.
104. Lucey, B.P. , Nelson-Rees, W.A. , Hutchins, G.M. , 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab*
105. Mabry KM, Payne SZ, Anseth KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials.* 2016;74:31-41.
106. Mabry KM, Payne SZ, Anseth KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials.* 2016;74:31-41.
107. Mañes S, Mira E, Gómez-Moutón C, et al: Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. *IUBMB Life* 2000; 49: 89 – 96.

108. Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., & Steimberg, N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?. *Genes & nutrition*, 4(1), 13.
109. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing: an overview. *Clinics in plastic surgery*. 2003;30(1):1-12.
110. Moroni L, De Wijn J, Van Blitterswijk C. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008;19(5):543- 572
111. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*. 2014;32(8):773.
112. Nandi S, Brown AC. Characterizing cell migration within three-dimensional in vitro wound environments. *J Vis Exp* 2017; 126: doi: 10.3791/56099. [CrossRef]
113. Napolitano AP, Chai P, Dean DM, Morgan JR. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue engineering*. 2007;13(8):2087-2094.
114. Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., ... & Muthuswamy, L. (2011). Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 472(7341), 90.
115. Nie, F. Q., Yamada, M., Kobayashi, J., Yamato, M., Kikuchi, A., & Okano, T. (2007). On-chip cell migration assay using microfluidic channels. *Biomaterials*, 28(27), 4017-4022.
116. Nims RW and Harbell JW (2017). Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture media. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 53(8), 682–690. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0184-8>
117. Nirmalanandhan, V. S., Duren, A., Hendricks, P., Vielhauer, G., & Sittampalam, G. S. (2010). Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay and drug development technologies*, 8(5), 581-590.
118. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, et al: Angiopoietinrelated growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood* 2004; 103: 3760 – 5.
119. Ong, S. M., Zhang, C., Toh, Y. C., Kim, S. H., Foo, H. L., Tan, C. H., ... & Yu, H. (2008). A gel-free 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterials*, 29(22), 3237-3244
120. Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med* 2011;21:37-45.
121. Pineda ET, Nerem RM, Ahsan T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two-versus three-dimensional culture. *Cells Tissues Organs*. 2013;197(5):399-410.
122. Polat, E. (2020). Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerine Güncel Yaklaşımlar . *Namık Kemal Tıp Dergisi* , 8 (1) , 84-92 . DOI: 10.37696/nkmj.679069
123. Pollack S, Saukko PJ. Blunt injury. In Saukko PJ et al ed. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 1 ed. Amsterdam, Nedherland: Academic Press; 2000. pp. 316-325
124. Prisăcaru AI, Andrițoiu C, Andriescu C, Hăvârneanu E, Popa M, Motoc A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(4):1053-9.
125. Ramasastry SS: Acute wounds. *Clin Plast Surg* 2005; 32: 195 – 208

126. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon FP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(1):16-26
127. Rees JD, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *Am J Sports Med* 2009;37:1855-67.
128. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:508-21.
129. Reid RR, Said HK, Mogford JE, Mustoe TA. The future of wound healing: Pursuing surgical models in transgenic and knockout mice. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 578-85.
130. Richardson M: Acute wounds: an overview of the physiological healing process. *Nurs Times* 2004; 100: 50 – 3.
131. Rivron NC, Raiss CC, Liu J, Nandakumar A, Sticht C, Gretz N, et al. Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(12):4413-4418.
132. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*. 2001 Feb;38(2):72-140. doi: 10.1067/msg.2001.111167. PMID: 11452260.
133. Rockwood, D. N., Gil, E. S., Park, S. H., Kluge, J. A., Grayson, W., Bhumiratana, S., ... & Kaplan, D. L. (2011). Ingrowth of human mesenchymal stem cells into porous silk particle reinforced silk composite scaffolds: An in vitro study. *Acta biomaterialia*, 7(1), 144-151.
134. Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(2):623-636
135. Sauer UG, Kolar R, Rusche B., The use of transgenic animals in biomedical research in Germany. Part 2: Ethical evaluation of the use of transgenic animals in biomedical research and perspectives for the changeover in research to research animal-free methods: *Altex: Alternativen zu Tierexperimenten* 2006; 23: 3-16.
136. Schmeichel, K. L., & Bissell, M. J. (2003). Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of cell science*, 116(12), 2377-2388
137. Serin ve Bayramiçli M. Experimental Rat Flap Models 2018; Available from: <https://www.intechopen.com/books/issues-in-flapsurgery/experimental-rat-flap-models> [CrossRef]
138. Sherris DA, Kern EB. The Wound. In *Basic Surgical Skills*, Mayo Foundation for medical Education and research, Rochester, 1999:8-12
139. Smith, B. H., Gazda, L. S., Conn, B. L., Jain, K., Asina, S., Levine, D. M., ... & David, E. M. (2011). Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties. *Cancer research*.
140. Steinwachs J, Metzner C, Skodzek K, Lang N, Thievessen I, Mark C, et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. *Nature methods*. 2016;13(2):171.
141. Stephens P., Caley M., Peake M. (2013) Alternatives for Animal Wound Model Systems. In: Gourdie R., Myers T. (eds) *Wound Regeneration and Repair. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1037. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-505-7_10

142. Strande LF, Foley ST, Doolin EJ, Hewitt CW. In vitro bioartificial skin culture model of tissue rejection and inflammatory/ immune mechanisms. *Transplant Proc* 1997; 29: 2118-9. [CrossRef]
143. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 2001;9(2):66-76.
144. Swinney, D.C. and Anthony, J. (2011) How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 507–519
145. Szulcek R, Bogaard HJ, van Nieuw Amerongen GP. Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility. *J Vis Exp.* 2014;85:e51300.
146. T.C. Resmi Gazete, Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Tarih: 15 Şubat 2014, Sayı:28914.
147. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al: Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662 – 70.
148. Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. *Trends in biotechnology.* 2013;31(1):10-19
149. Torisawa Y-s, Chueh B-h, Huh D, Ramamurthy P, Roth TM, Barald KF, et al. Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device. *Lab on a Chip.* 2007;7(6):770-776.
150. Tourovskaia, A., Figueroa-Masot, X., & Folch, A. (2005). Differentiation-on-a-chip: a microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip*, 5(1), 14-19.
151. Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, et al. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized Model for Polymicrobial Abdominal Sepsis. *J Vis Exp* 2010; 46: doi: 10.3791/2299. [CrossRef]
152. Tsuboi R, Rifkin DB. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med* 1990; 172: 245-51. [CrossRef]
153. Tufan, T. (2011). Deneysel Çalışmaların Vazgeçilmezleri: Hücre Hattı Nedir? Doi: 10.47023/ea.bilim.20
154. Ud-Din, S. and Bayat, A. (2017), Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Rep and Reg*, 25: 164-176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
155. Valdez, J., Cook, C. D., Ahrens, C. C., Wang, A. J., Brown, A., Kumar, M., ... & Lauffenburger, D. (2017). On-demand dissolution of modular, synthetic extracellular matrix reveals local epithelial-stromal communication networks. *Biomaterials*, 130, 90-103.
156. Vanwijck R: Surgical biology of wound healing *Bull Mem Acad R Med Belg* 2001; 115: 175 – 84.
157. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Lomas C, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology.* 2012;10(1):29
158. Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P, et al. Reciprocal interactions between β 1-integrin and epidermal growth factor receptor

- in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(25):14821-14826.
159. Wang K, Cai L-H, Lan B, Fredberg JJ. Hidden in the mist no more: physical force in cell biology. *Nature methods*. 2016;13(2):124.
 160. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell C, Briand P, Damsky C, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *The Journal of cell biology*. 1997;137(1):231-245.
 161. Werner, Sabine & Grose, Richard. (2003). Werner, S. & Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835-870. *Physiological reviews*. 83. 835-70. 10.1152/physrev.00032.2002.
 162. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368
 163. Wilhelm, K.-P., Wilhelm, D. and Bielfeldt, S. (2017), Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Res Technol*, 23:3-12. <https://doi.org/10.1111/srt.12317>
 164. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 1997;77(3):509-28.
 165. Wolgemuth CW: Lamellipodial contractions during crawling and spreading. *Biophys J* 2005; 89: 1643 – 9.
 166. Wong VW, Beasley B, Zepeda J, Dauskardt RH, Yock PG, Longaker MT, et al. A Mechanomodulatory Device to Minimize Incisional Scar Formation. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2: 185-94. [CrossRef]
 167. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011; doi: 10.1155/2011/969618.
 168. World Veterinary Association Policy Statement on Animal Welfare, Well-Being, and Ethology. *ILAR Journal* 1989; 31 (4): 29-30.
 169. Xu, T., Molnar, P., Gregory, C., Das, M., Boland, T., & Hickman, J. J. (2009). Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials*, 30(26), 4377-4383.
 170. Y. Kubota, H.K. Kleinman, G.R. Martin, T.J. Lawley Role of laminin and basement membrane in the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structure *J Cell Biol*, 107 (1988), pp. 1589-1598
 171. Yao T ve Asayama Y (2017). Hayvan hücresi kültür ortamı: Tarih, özellikler ve güncel konular. *Üreme Tıbbı ve Biyolojisi*, 16(2), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
 172. Yaylalı C. Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Ankara, Hacettepe Üniversitesi, 2007.
 173. Yazır, Y. ve Dalçık, H. (2011). Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü . *Koşuyolu Kalp Dergisi* , 15 (3) , 137-142 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/kkd/issue/10171/125075>
 174. Yeğen B., Gören Z., *Biyomedikal Araştırmalarda Deney Hayvanı: Temel Bilgiler ve Etik İlkeler*; Yüce Yayınları, 2005.

175. Yue PYK, Leung EPY, Mak NK, Wong RNS. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen.* 2010;15:427–33
176. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer research.* 1977;37(10):3639-3643.
177. Zhu, KQ, Carrougner, GJ, Gibran, NS, Light, FF, and Engrav, LH (2007). Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair and Regeneration*, 5, S32-S39.



