# SERAMİK FAZ İÇEREN YUMUŞAK DOKU OGMENTASYON JELLERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

# PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOFT TISSUE AUGMENTATION GELS CONTAINING CERAMIC PHASE

**ERKAN KARATAŞ**

**PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN**
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

# ÖZET

## SERAMİK FAZ İÇEREN YUMUŞAK DOKU OGMENTASYON JELLERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

**Erkan KARATAŞ**

**Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı**
**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN**

**Eylül 2024, 144 sayfa**

Travma, güneşin zararlı etkileri, beslenme yetersizliği ya da doğal yaşlanma süreciyle yumuşak dokularda zaman içinde doku kayıpları, deri veya deri altı doku atrofisi, bağ doku zayıflığı gibi çeşitli klinik durumlar ortaya çıkabilmektedir. Buna ek olarak konjenital olarak da çeşitli deri, deri altı ve bağ doku hastalıkları nedeniyle de benzer klinik durumlar görülebilmektedir. Bu klinik kusurların ortadan kaldırılabilmesi, atrofi durumunda yumuşak dokuların rejenerasyonu, deri kırışıklığı, dolgunluk veya turgor/tonus kaybının giderilmesi amacıyla sistemik olarak kullanılabilen diyet destek ürünlerinin yanı sıra deriye haricen uygulanabilen ya da deri altı dolgusu olarak kullanılabilen pek çok materyal önerilmiş ve halen yeni, etkin materyallerin üretilmesi, eski materyallerin geliştirilmesi çalışmalarına devam edilmektedir. Bu yöndeki çabalara katkı olarak bu tez çalışması ile yumuşak doku onarımı ve ogmentasyonu için özel bir formülasyonla tasarlanmış enjekte edilebilir bir deri altı implant malzemesi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Malzeme, kalsiyum hidroksiapatit (Ca-HAp) seramik fazının, karboksimetil selüloz (CMC), gliserol ve saf sudan oluşturulan bir taşıyıcı jel içinde dağıtılmasıyla

hazırlanmıştır. Sentezlenen malzeme bileşenlerinin biyouyumlu, biyobozunur ve seramik fazın biyoaktif olduğu literatürdeki birçok çalışmayı destekler nitelikte çalışmamız kapsamında da doğrulanmıştır. Geliştirilen jel formülasyonu çeşitli analitik tekniklerle kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile yumuşak doku ogmentasyon malzemesi ve bileşenlerinin kimyasal yapı analizleri gerçekleştirilirken, X-ray difraksiyonu (XRD) kullanılarak seramik partiküllerinin kristal fazları ve yapısal özellikleri belirlenmiş; termogravimetrik analiz (TGA) ile formülasyonun termal stabilitesi ve bozunma davranışları değerlendirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile Ca-HAp partiküllerinin yüzey morfolojisi ve boyut dağılımı gözlemlenmiş, partikül boyutlarının yaklaşık 20−60 μm arasında olduğu doğrulanmıştır. Elemental analiz, hidroksiapatit yapısında Ca/P oranının 1.65 olduğunu göstererek, bu stokiyometik oranın literatürle uyumlu olarak seramik fazın nihai ürünün etkinliğine, biyouyumluluğuna ve biyoaktifliğine yaptığı katkıya işaret ettiği değerlendirilmiştir. ICP-MS analizi ile malzemenin cerrahi implant kullanımı için uygun olduğu ve ağır metal içeriği bakımından risk taşımadığı gösterilmiştir. Reolojik analizlerle, sırasıyla 2 ve 5 Hz frekansta 58.6 ve 68.9 kPa depolama modülü ve 21.7 ve 24.8 kPa kayıp modülü değerleri ortaya konmuştur. Bu veri ile malzemenin uygulanacağı anatomik bölge içerisinden göç etmeden kalabileceği ve implante edileceği dokuya eş değer nitelikteki mekanik özellikler barındırdığı değerlendirilmiştir.

Geliştirilen malzeme morfolojik, kimyasal, termal ve reolojik açılardan test edildikten sonra *in vitro* çalışmalarla sitotoksisite analizi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılık yüzdeleri 5 mg/mL için % 87,34 ve 10 mg/mL için % 61,38 olarak belirlenmiştir. Örneklerimizin uygun dozlarda sitotoksisite belirtisi göstermediği ve hücrelerin büyümesi ve çoğalması için uygun bir ortam yaratabileceği, mikroçevre ile etkileşimde iskele görevi görebileceği değerlendirilmiştir. MTT analizi ile biyouyumluluğu test edilen malzememiz sıçan deri altı ogmentasyon deney modelinde ticari pozitif kontrol örnekle karşılaştırılmıştır. *In vivo* deneylerde, sterilize edilmiş 150 μL Ca-HAp/CMC jeli sıçanların sırt derisinin altına enjekte edilerek pozitif kontrolle karşılaştırmalı olarak histolojik ve histomorfometrik açılardan değerlendirilmiştir. Histolojik bulgular, sentezlediğimiz Ca-HAp/CMC jelinin dermal kalınlık, elastik lif ve kolajen yoğunluğunda anlamlı düzeyde; kolajen yoğunluğunda kontrol grubuna oranla 120. gün sonunda %12,77, elastik fiber yoğunluğunda ise %9,64 artış sağladığını göstermiştir.

Histomorfometrik analizler, bu malzemenin fibroblastik büyümeyi desteklediğini ve yeni kolajen ve elastin oluşumunu teşvik ettiğini doğrulamıştır.

Özetle bu çalışma ile, özel bir formülasyonla sentezlediğimiz Ca-HAp/CMC ogmentasyon jelinin biyostimülatör etkinlik gösterdiği, aynı zamanda immünojenik ve toksik olmadığı, önemli bir yan etki ve komplikasyon profili göstermediği ve biyouyumlu olduğu doğrulanmıştır. Geliştirilen malzemenin, *in vivo* koşullarda implante edilen anatomik bölgeye başarılı bir şekilde entegre olduğu, fibroblastik büyümeyi desteklediği, yeni kolajen oluşumunu teşvik ederek üç boyutlu hacimsel stabilite kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, formülasyonumuzun yumuşak doku onarımı ve ogmentasyonu için umut verici bir seçenek olabileceği ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Enjekte Edilebilir Biyomalzemeler, Dermal Dolgular, Yumuşak Doku Onarımı, Ogmentasyon, Kalsiyum Hidroksiapatit, Karboksimetil Selüloz, Kompozit Jel

# ABSTRACT


## PREPARATİON AND CHARACTERIZATION OF SOFT TISSUE AUGMENTATION GELS CONTAINING CERAMIC PHASE

**Erkan KARATAŞ**

**Doctor of Philosophy, Bioengineering Division**
**Supervisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN**
**September 2024, 144 pages**

Various factors such as trauma, ultraviolet radiation, nutritional deficiencies, and aging can lead to tissue loss, atrophy of the skin and subcutaneous tissue, and connective tissue weakness, resulting in soft tissue-related clinical issues. Similar conditions may also arise from congenital dermatological and connective tissue disorders. To address these issues, a range of materials have been developed for external skin application or as subcutaneous fillers, aimed at repairing soft tissue, reducing wrinkles, and restoring volume and tonus. Dietary supplements for systemic use are also under investigation. Further studies are ongoing to develop new materials and improve existing ones. In order to contribute to these efforts, the objective of this thesis study was to develop an injectable subcutaneous implant material designed with a unique formulation for soft tissue repair and augmentation.

The material was prepared by dispersing the calcium hydroxyapatite (Ca-HAp) ceramic phase in a carrier gel formed from carboxymethyl cellulose (CMC), glycerol, and water for injection. The biocompatibility, biodegradability, and bioactive nature of the synthesized material components have been confirmed both within the scope of the present study and by numerous studies in the literature. The gel formulation was subjected

to comprehensive characterization through a range of analytical techniques. The chemical structure of the augmentation material and its components was analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), while the crystal phases and structural properties of the ceramic particles were determined through X-ray diffraction (XRD). Furthermore, the thermal stability and degradation behaviors of the formulation were evaluated through thermogravimetric analysis (TGA). The surface morphology and size distribution of the Ca-HAp particles were observed by scanning electron microscopy (SEM), and it was confirmed that the particle sizes were approximately between 20 and 60 micrometers. The elemental analysis demonstrated that the Ca/P ratio within the hydroxyapatite structure was 1.65. This stoichiometric ratio was evaluated as indicative of the contribution of the ceramic phase to the efficacy, biocompatibility, and bioactivity of the final product, in accordance with the existing literature. The ICP-MS analysis indicated that the material was suitable for surgical implant use and did not raise any concerns regarding heavy metal content. Rheological analyses revealed storage modulus values of 58.6 and 68.9 kPa, and loss modulus values of 21.7 and 24.8 kPa at 2 and 5 Hz frequencies, respectively. The data indicated that the material would remain in the intended anatomical region without migrating and would possess mechanical properties comparable to those of the surrounding tissue.

Following the completion of the aforementioned tests, which encompassed morphological, chemical, thermal, and rheological aspects, the developed material was subjected to a cytotoxicity analysis within the context of *in vitro* studies. The cell viability percentages were determined to be 87.34% for 5 mg/mL and 61.38% for 10 mg/mL. The evaluation demonstrated that the samples did not exhibit any indications of cytotoxicity at the administered doses. They were observed to facilitate an optimal milieu for cellular growth and proliferation and to serve as a scaffold in conjunction with the microenvironment. The material, for which biocompatibility was established through MTT analysis, was evaluated in comparison with a commercial positive control sample within the context of a rat subcutaneous augmentation experimental model. *In vivo* experiments were conducted in which 150 µL of sterilized Ca-HAp/CMC gel was injected subcutaneously into the backs of rats. Subsequently, the gel was subjected to histological and histomorphometrical evaluation in comparison with a positive control product. The histological findings demonstrated that the Ca-HAp/CMC gel synthesized provided notable increases in dermal thickness, elastic fiber, and collagen density. At the

conclusion of the 120th day, the collagen density exhibited a 12.77% increase, while the elastic fiber density demonstrated a 9.64% increase in comparison to the control group. Histomorphometric analyses revealed that this material promotes fibroblastic growth and the synthesis of new collagen and elastin. In conclusion, the results of this study confirm that the Ca-HAp/CMC augmentation gel, synthesized with a special formulation, exhibits biocompatibility, biostimulatory activity, and is non-immunogenic and non-toxic. Furthermore, no significant side effects or complications were observed. The developed material was successfully integrated into the implanted anatomical region in vivo, supported fibroblastic growth, and demonstrated the capacity to provide three-dimensional volumetric stability by promoting new collagen formation. In light of these findings, our material has demonstrated the potential to serve as a promising option for soft tissue repair and augmentation.

**Keywords:** Injectable Biomaterials, Dermal Fillers, Soft Tissue Repair, Augmentation, Calcium Hydroxyapatite, Carboxymethyl Cellulose, Composite Gel

# TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteklerini esirgemeyen, alanındaki soru ve sorunları ele alış şekliyle yeni bakış açıları ve anlayış sunan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a,

Bu zorlu ve uzun yolculukta yoğun mesaisine aldırış etmeden maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, yorulduğum, yıldığım ve düştüğüm dönemlerde beni cesaretlendiren ve ayağa kaldıran, engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle tezimin her aşamasına değer katan değerli hocam Prof. Dr. Ramazan AKÇAN'a,

Tez çalışmalarıma önerileri ve fikirleriyle yön veren değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa TÜRK ve Prof. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK'a,

Histolojik preparatların yorumlanmasındaki kıymetli katkıları için Prof. Dr. Adem KARA'ya,

Tezime yaptıkları dokunuşları, katkıları, rehberlikleri ve her türlü yardım ve destekleri için değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet YILMAZ, Doç. Dr. Kübra KOÇ, Doç. Dr. Aslı YILMAZ ve Dr. Ferhunde AYSİN'e,

Bu meşakkatli yolculukta her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen değerli dostum Erdal ALTUN'a,

Hayatımın her aşamasında ve her çabamda yanımda olan, sorgulamaksızın fedakârlık yapmaktan kaçınmayan aileme,

Bitmez tükenmez sabırları, fedakarlıkları ve sonsuz destekleri için eşim Aysel ile canlarım Dicle ve Serhat'a,

Sonsuz teşekkürlerimi, saygı, sevgi ve minnetlerimi arz ederim.

Erkan KARATAŞ

Eylül 2024, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... i
ABSTRACT ..... iv
TEŞEKKÜR ..... vii
İÇİNDEKİLER ..... viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... x
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xi
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xiii
1. GİRİŞ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 7
2.1. Yumuşak Doku Mühendisliği ..... 7
2.2. Deri ve Yapısı ..... 8
2.3. Patolojik Deri Özellikleri ..... 10
2.4. Biyomalzemeler ..... 12
2.5. Yumuşak Doku Ogmentasyonunda Yaygın Kullanılan Biyomalzemeler ..... 14
2.5.1. Doğal Polimerler ..... 15
2.5.2. Sentetik Polimerler ..... 16
2.6. Geliştirilen Ca-HAp/CMC Jelinin Öne Çıkan Yönleri ..... 17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR ..... 20
3.1. Kullanılan Malzemeler, Cihazlar ve Yöntemler ..... 20
3.2. Ca-HAp/CMC Jel Matrisi Üretim Yöntemi ..... 22
3.3. Ca-HAp/CMC Jel Matrisi Karakterizasyonu ..... 22
3.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ..... 22
3.3.2. X Işını Kırınımı (XRD) ..... 22
3.3.3. Termal Gravimetrik Analizler (TGA) ..... 23
3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ..... 23
3.3.5. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi (ICP-MS) ..... 24
3.3.6. Enjeksiyon (Ekstrüzyon) Kuvveti Ölçümleri ..... 24
3.3.7. Reolojik Analiz ..... 24
3.4. Sitotoksisite Testi ..... 29
3.5. Sıçan Deri Altına Malzeme Uygulaması ve Histolojik İnceleme ..... 30
3.5.1. Deney Hayvanları ..... 30

3.5.2. Deri Altı Ogmentasyon Deney Modeli .....30
3.6. Histolojik Analizler .....33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....35
4.1. Ca-HAp/CMC Jeli Karakterizasyonu .....35
4.1.1. FT-IR Bulgularının Değerlendirilmesi.....35
4.1.2. XRD Bulgularının Değerlendirilmesi .....36
4.1.3. TGA Bulgularının Değerlendirilmesi .....38
4.1.4. SEM Bulgularının Değerlendirilmesi .....42
4.1.5. ICP-MS Bulgularının Değerlendirilmesi .....44
4.1.6. Enjeksiyon Kuvveti Ölçümleri.....45
4.1.7. Ca-HAp/CMC'nin Reolojik Özellikleri.....47
4.2. Ca-HAp/CMC'nin İDF Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi.....51
4.3. Ca-HAp/CMC'nin Sıçan Derisi Üzerindeki Histolojik Değişiklikleri .....55
4.3.1. Sıçan Derisinde Gomori's Trikrom boyamasının Değerlendirilmesi .....56
4.3.2. Sıçan Derisinde Hematoksilen ve Eozin Boyamasının Değerlendirilmesi ....73
4.3.3. Sıçan Derisinde Verhoeff Van Gieson Boyamasının Değerlendirilmesi.....86
4.4. Maliyet-Fayda Etkinlik Değerlendirilmesi .....98
5. YORUM .....100
6. KAYNAKLAR.....108
EKLER .....122
EK 1- Etik Kurul İzin Belgesi .....122
EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar .....124
EK 3- Tezden Türetilmiş Bildiriler.....125
EK 4- Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....126
ÖZGEÇMİŞ.....127

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında yaygın kullanılan sentetik ve doğal malzemeler ..... 15
Çizelge 4.1. ASTM F1185-03 standardı ve jel dolgu malzememiz için ağır metallerin[a] eser konsantrasyonları ..... 45
Çizelge 4.2. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda kolajen ve fibroblast yoğunlukları, epidermis ve dermis kalınlıkları ve elastik fiber yoğunluklarının değerlendirilmesi ..... 55
Çizelge 4.3. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve Kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda kolajen ve fibroblast yoğunluklarının değerlendirilmesi . 56
Çizelge 4.4. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku örneklerininn kolajen yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları ..... 67
Çizelge 4.5. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku kesitlerinin fibroblast yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları ..... 68
Çizelge 4.6. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve Kontrol gruplarında uygulama sonrası sıçan deri dokusunun epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi .... 73
Çizelge 4.7. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku örneklerinin dermis kalınlıkları açısından grup içi karşılaştırmaları ..... 84
Çizelge 4.8. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda elastik fiber yoğunluklarının değerlendirilmesi ..... 86
Çizelge 4.9. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan numunelerin elastik fiber yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları ..... 97

# ŞEKİLLER DİZİNİ


Şekil 2.1. Yumuşak dokuların elastik modül değerleri. ....8
Şekil 2.2. İnsan derisinin anatomik yapısı.....9
Şekil 2.3. Fibroblast aktivasyonu için önerilen mekanizma.....19
Şekil 3.1. Salınımlı (sinüzoidal) kayma profili uygulanmış paralel plakalar arasına yüklenmiş bir numuneyi gösteren çizim. .....25
Şekil 3.2. Tam viskoz, tam elastik ve viskoelastik bir malzemenin gerilme ve gerinme dalga ilişkileri.....26
Şekil 3.3. G* ile bileşenleri G' ve G" arasındaki geometrik ilişki.....27
Şekil 3.4. Karmaşık düzlemde G', G" ve G* arasındaki ilişkiyi gösteren Argand diyagramı.....27
Şekil 3.5. Sıçan deri altı ogmentasyon deney modeli işlem basamakları.....32
Şekil 4.1. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin FTIR spektrumları.....35
Şekil 4.2. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin XRD difraktogramları. .....37
Şekil 4.3. Gliserol'ün TGA termogramı. .....38
Şekil 4.4. CMC'nin TGA termogramı. .....39
Şekil 4.5. Ca-HAp'ın TGA termogramı. .....40
Şekil 4.6. Ca-HAp/CMC'nin TGA termogramı. .....41
Şekil 4.7. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin TGA termogramları.....42
Şekil 4.8. Ca-HAp mikroküreleri̇nin, a) SEM görüntüsü b) Boyut dağılımı c) Tek partikülün görüntüsü d) Yüzeyinin ayrıntılı görüntüsü e) Jelin SEM görüntüsü.....42
Şekil 4.9. Ca-HAp mikroküreleri̇nin partikül boyut dağılımı. .....43
Şekil 4.10. Ca-HAp'ın EDS analizi bulguları. .....44
Şekil 4.11. Şırınga içerisindeki Ca-HAp/CMC jeline uygulanan ekstrüzyon kuvvetine karşın jelin yer değiştirme mesafesi.....46
Şekil 4.12. Ca-HAp/CMC'nin elastik, viskoz, kompleks modül ve tan δ değerleri. ...48
Şekil 4.13. Ca-HAp/CMC jelinin frekans bağımlı viskozite değişimi.....50
Şekil 4.14. 48 saat boyunca Ca-HAp/CMC muamelesinin İDF hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....52

Şekil 4.15. İDF üzerine Ca-HAp/CMC uygulama sonrası optik mikroskop görüntüleri. ..... 53
Şekil 4.16. İDF üzerine Ca-HAp/CMC uygulamasının MTT boyama sonrası görüntüleri. ..... 54
Şekil 4.17. 30. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. .... 57
Şekil 4.18. 45. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. .... 59
Şekil 4.19. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. .... 61
Şekil 4.20. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. .... 63
Şekil 4.21. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. .. 65
Şekil 4.22. Günlere göre ortalama kolajen yoğunluğu dağılımı. ..... 66
Şekil 4.23. Günlere göre ortalama fibroblast sayısı dağılımı..... 68
Şekil 4.24. 30. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. ..... 74
Şekil 4.25. 45. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. ..... 76
Şekil 4.26. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. ..... 78
Şekil 4.27. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. ..... 80
Şekil 4.28. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. ..... 82
Şekil 4.29. Günlere göre değişen ortalama dermis kalınlıkları..... 83
Şekil 4.30. 30. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. ..... 87
Şekil 4.31. 45. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. ..... 89
Şekil 4.32. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. ..... 91
Şekil 4.33. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. ..... 93
Şekil 4.34. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. ..... 95
Şekil 4.35. Günlere göre ortalama elastik fiber yoğunluğu dağılımı. ..... 96

# SİMGELER VE KISALTMALAR

**Simgeler**

| | |
|---|---|
| α | Alfa |
| γ | Gama |
| μ | Mikro |
| δ | Delta |
| ω | Omega, açısal frekans |
| G* | Kompleks modül |
| G' | Depolama modülü |
| G'' | Kayıp modülü |
| tan δ | Tan delta veya kayıp faktörü |
| η* | Kompleks viskozite |
| As | Arsenik |
| Hg | Civa |
| Cd | Kadmiyum |
| Pb | Kurşun |
| N | Newton |

**Kısaltmalar**

| | |
|---|---|
| XRD | X ışını kırınımı |
| FT-IR | Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi |
| TGA | Termogravimetrik analiz |
| EDS | Enerji dağılımlı spektroskopi |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| HAc | Hyaluronik asit |
| HAp | Hidroksiapatit |
| Ca-HAp | Kalsiyum hidroksiapatit |
| CMC | Karboksimetil selüloz |
| Ca-HAp/CMC | Kalsiyum hidroksiapatit/karboksimetil selüloz |
| PCL | Polikaprolakton |
| ECM | Ekstrasellüler matriks |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| İDF | İnsan deri fibroblast hücresi |
| GAG | Glikozaminoglikan |

# 1. GİRİŞ

Travma, ultraviyole radyasyon, beslenme yetersizlikleri ve diğer çevresel stres faktörleri nedeniyle yumuşak dokularda zaman içinde doku kayıpları, deri ve deri altı dokularda atrofi, bağ dokusunda zayıflama gibi çeşitli klinik durumlar gelişebilmektedir. Buna ek olarak konjenital olarak da çeşitli deri, deri altı ve bağ doku hastalıkları nedeniyle de benzer klinik durumlar görülebilmektedir [1]. Tüm bu faktörlerle birlikte yaşlanma süreci, hem intrinsik (kronolojik yaşlanma) hem de ekstrinsik (çevresel faktörlere bağlı yaşlanma) mekanizmalar aracılığıyla ciltte ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin progresif degradasyonuna yol açarken, fibroblast popülasyonunda ve fonksiyonel kapasitesinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır [2]. Sağlıklı bir ECM aselüler, protein tabanlı bir yapı iskelesi olup, dokulara yapısal destek sağlayan ve biyolojik fonksiyonlarını kazandıran yoğun bir hücresel ağ ile zenginleştirilmiştir [3]. ECM'nin temel bileşenleri arasında, özellikle tip I, III ve IV kolajen, elastin, laminin, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar yer almaktadır [4]. Dermal ECM'de kolajen tip I ve III, yapısal bütünlüğün ve rijiditenin temel kaynakları olarak görev yaparken, bu kolajen tiplerinin oranı ile çapraz bağlanma dereceleri, cildin çekme dayanımı ve mekanik sağlamlığını büyük ölçüde belirlemektedir [5]. Elastin proteini, cildin elastikiyetinin, esnekliğinin ve mekanik hareketliliğinin düzenlenmesinde kritik rol oynarken [6], proteoglikanlar ve hyaluronik asit (HAc) ise cildin hidrasyonu, viskoelastik özellikleri ve yüzey pürüzsüzlüğü üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir [7].

Dermal ECM'nin hücresel içeriği büyük oranda fibroblastlar ve keratinositlerden oluşmaktadır. Yaşlanma süreci ile birlikte, ECM'nin matriks metalloproteinazlar (MMP) veya çevresel stresörler (ultraviyole ışık radyasyonu, sigara dumanı, kimyasal ajanlar) tarafından kademeli olarak degradasyona uğradığı, bu durumun yapısal bütünlüğün kaybolmasına ve sonuç olarak fonksiyonel bozulmalara yol açtığı belgelenmiştir [2, 5, 7]. Kolajen yıkımı, hücresel yaşlanmanın temel mekanizmalarından biri olup, kolajen yıkım hızının, kolajen sentez hızını aşması durumunda, mekanik yaşlanma süreci dramatik olarak hızlanmaktadır [2]. ECM'nin degradasyonu ile birlikte, yapısal liflerin gerilimi ve rijiditesi azalmaktadır [3]. Birçok çalışma, fibroblastların uygun fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için mekanik olarak sağlam ECM lifleriyle temas ve gerilime ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Bu mekanik etkileşim, genel olarak mekanotransdüksiyon olarak bilinmektedir [8, 9]. Fibroblastlar mekanik olarak sağlam, kalın, yönlendirilmiş

lifler ve yoğun proteoglikanlar içeren sağlıklı bir ECM ile temas ettiklerinde, mekanoreseptörlerinin aktive olduğu ve bu hücrelerin proliferatif, anabolik bir durumda bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak, temas veya gerilim kaybı durumunda hücresel senesens veya apoptoz tetiklenmektedir [10-13]. Fibroblastların mekanik kuvvetlerle etkileşerek ECM'de kolajen sentezini indükleme yeteneklerini doğrudan ölçen çalışmalarda, mekanik gerilimin azalmasının kolajen gen ekspresyonunda belirgin bir azalmaya yol açtığı ve bununla birlikte matriks metalloproteinaz (MMP) seviyelerinde ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir [14]. Bu bulgular, fibroblastların mekanotransdüksiyon mekanizmalarının ECM homeostazı üzerindeki etkilerine dair önemli bir anlayış sunmaktadır. Literatürde, yaşlanma sürecine bağlı olarak ECM lifleriyle olan mekanik gerilimin kademeli kaybının kolajen sentezinde belirgin bir düşüşe yol açtığı, sağlıklı cilt dokusunda fibroblastların geniş bir yüzey alanı kapsayan yassı bir morfoloji sergilediği, ancak hasar görmüş ciltte fibroblastların iğ şeklinde bir görünüm kazandığı, adezyon noktalarından yoksun olduğu ve sağlıklı fibroblastlara kıyasla çok daha düşük bir aktivite düzeyi gösterdiği raporlanmıştır [2, 13]. Dolayısıyla, azalan mekanik gerilim altında ECM bileşenlerinin degradasyonunun hızlandığı, bu durumun da dermal yapının bütünlüğünü bozarak cilt yaşlanması ve dejeneratif değişikliklerin patofizyolojisini desteklediği anlaşılmaktadır.

Fibroblast fonksiyonlarının korunması için hücresel temas ve mekanik gerilimin kritik öneme sahip olduğu artık bilinmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar kapsamında, fibroblast tutunmasına bağlı gen ekspresyonunu düzenleyen genetik bir ağ tanımlanmış olup, üç boyutlu bir iskeledeki mekanik gerilim kaybının, fibroblastların apoptozu ve kolajen üretimindeki azalma ile ilişkili gen ekspresyonunda hızlı bir değişiklik başlattığı gösterilmiştir [10, 11, 15, 16].

Bu bulguların estetik ve rejeneratif tıp alanına uygulanmasıyla, kolajen üretiminin artırılması, kolajen yıkımının inhibe edilmesi veya gen ekspresyonunun olumlu yönde modüle edilmesi yoluyla yaşlanma sürecini kesintiye uğratmayı amaçlayan rejeneratif tedaviler için potansiyel bir temel oluşturduğu öngörülmektedir. Fibroblastlarla temas ve mekanik gerilim (tonus) geri kazanıldığında, bu hücrelerin fonksiyonlarının düzeleceği ve MMP aracılığıyla ECM yıkımı [13] gibi yaşlanmanın karakteristik süreçlerinin durdurulabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, ideal bir rejeneratif dermal dolgu maddesinin, fibroblastlar için bir iskele (skafold) görevi görmesi, hücre-biyomateryal

etkileşimlerini teşvik ederek ECM'nin üç boyutlu yapısını yeniden inşa etmesi, ECM'nin ana bileşenlerini fonksiyonel olarak yenileyerek cildin yapı ve fonksiyonunu geri kazandırması ve estetik açıdan tatmin edici sonuçlar sağlaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, ECM'deki mekanik gerilim kaybı, MMP'lerin aşırı ekspresyonu ve hücresel mekanik uyarımın eksikliği gibi dejeneratif süreçleri hedef alarak bu süreçleri etkili bir şekilde modüle edebilecek bir enjekte edilebilir dolgu maddesinin, genç yumuşak doku yapısının ve fonksiyonunun yeniden kazanılmasını veya onarılmasını tetikleyebileceği öngörülmektedir. Bu yaklaşımla yumuşak dokuların biyomekanik ve biyokimyasal özellikleri restore edilerek estetik, kalıcı, doğal ve dinamik bir görünüm sağlanabilecektir.

Yukarıda detaylandırılan ECM'deki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, klinik olarak belirgin kırışıklıklar, dermal hacim kaybı, ciltte incelme ve elastikiyet kaybı olarak tezahür etmektedir. Bu klinik kusurların ortadan kaldırılabilmesi, atrofik yumuşak dokuların rejenerasyonu, deri kırışıklığı, dolgunluk veya turgor/tonus kaybının giderilmesi amacıyla sistemik olarak kullanılabilen diyet destek ürünlerinin [17] yanı sıra deriye haricen uygulanabilen ya da deri altı dolgusu olarak kullanılabilen pek çok materyal önerilmiş ve halen yeni, etkin materyallerin üretilmesi, eski materyallerin geliştirilmesi çalışmalarına devam edilmektedir [18, 19]. Malzeme alanında yüzyılı aşkın süredir ogmentasyon amacıyla pek çok materyal denenmiştir. Bu çalışmalardan parafinin ilk denemelerinde son derece kötü sonuçlar alındığı dikkati çekmiştir [20]. Takip eden süreçte, 1983 yılında otolog yağ transferi ile önemli bir yumuşak doku ogmentasyon başarısı elde edilmiş, ancak silikon gibi diğer materyaller, benzer komplikasyonlar nedeniyle zamanla terk edilmiştir [21]. 1970'lerde, Stanford Üniversitesi'nden araştırmacılar, biyobozunma ve biyouyumluluk sorunlarını dikkate alarak enjekte edilebilir kolajen üzerine ön çalışmalar yapmış ve bu malzeme, on yıl kadar sonra Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır [22]. Bu tarihten sonra hız kazanan çalışmalar sonucunda, yumuşak doku ogmentasyon materyalleri biyolojik ve sentetik tabanlı olmak üzere iki ana grup altında sınıflandırılmıştır [23]. Biyolojik malzemeler arasında sığır kaynaklı kolajen, hyaluronik asit (HAc) ve yağlar yer alırken, sentetik ogmentasyon malzemeleri arasında bakteriyel hyaluronik asit, polimetil metakrilat mikroküreler ve hidroksiapatit (HAp) bulunmaktadır.

Günümüzde botulinum toksini (botoks) ve diğer minimal invaziv estetik prosedürlerin artan popülaritesiyle birlikte, enjekte edilebilir yumuşak doku ogmentasyon maddelerinin rejeneratif estetik alanındaki önemi dramatik olarak artmaktadır. Rejeneratif estetik kapsamında kullanılan tedaviler, daha çok biyolojik orijinli ajanlar olup, doğal olarak organizmada bulunan veya biyoteknolojik süreçler aracılığıyla elde edilen biyoaktif maddeleri içermektedir. Bu kapsamda, kök hücreler, stromal vasküler fraksiyon, eksozomlar, hücre dışı veziküller, büyüme faktörleri, trombositten zengin plazma (PRP) ve fibrin gibi biyolojik ajanlar, rejeneratif estetik prosedürlerde giderek artan bir kullanım alanı bulmuştur [24, 25]. Bu biyoaktif moleküller, doku rejenerasyonunu destekleyen ve hasarlı bölgelerde rejeneratif süreçleri hızlandıran spesifik biyolojik sinyalleri taşımaktadır. Bunların yanı sıra biyomalzeme araştırmalarının ilerlemesiyle birlikte, biyostimülatör dolgu maddeleri estetik tıbbın vazgeçilmez unsurları haline gelmiştir. Bu tür dolgu maddeleri genellikle bir taşıyıcı araç ve ECM'nin başlıca yapısal bileşenlerinin *de novo* sentezini indükleyen bir biyostimülatör materyal içermektedir. Bu amaçla geliştirilen eksojen biyomateryal içeren belirli enjeksiyon prosedürlerinin minimal invaziv yaklaşımlar aracılığıyla yumuşak doku hacmini artırma, endojen ECM rejenerasyonunu teşvik ederek cilt yapısını gençleştirme potansiyeli taşıdığı ve hızlı iyileşme süreleri ve düşük komplikasyon oranları sayesinde popülaritesini giderek artırdığı literatürde sıkça vurgulanmaktadır [26].

Yeni nesil biyostimülatör içerikli enjekte edilebilir dolgu maddelerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, implantın hedef doku gereksinimlerini karşılayacak şekilde en uygun seçimi yapmak üzere bileşimlerini ve özelliklerini değerlendirmek son derece önemlidir. Enjekte edilebilir bir implantın temel özellikleri arasında yüksek biyouyumluluk, minimal inflamatuar yanıt, enjeksiyon kolaylığı ve uzun süreli hacim tutma (lifting) kapasitesi yer almalıdır. Bu bağlamda, yumuşak doku ogmentasyon materyallerinin uzun süreli yapısal bütünlük, implant bölgesinde stabilite, biyouyumluluk, proliferasyon ve rejenerasyonu uyararak yeni doku oluşumunu destekleme, düşük yan etki ve komplikasyon profili sunması ve implant bölgesinden göç etmemesi beklenmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında steril, lateks içermeyen yarı-katı enjekte edilebilir bir deri altı implant malzemesi, kalsiyum hidroksiapatit (Ca-HAp) seramik fazın karboksimetil selüloz (CMC), gliserol ve yüksek saflıkta suyun ikamesi ile elde edilen bir jel içerisinde dağıtılması ile hazırlanmıştır. Formülasyonumuzda kullandığımız sentetik Ca-HAp,

kemik ve dişlerde bulunan endojen Ca-HAp'ın kimyasal ve kristalografik yapısına çok benzer nitelikte bir biyoseramik olup, biyomedikal uygulamalarda yaygın kullanım alanıyla [27] doku rejenerasyonunda kritik rol oynayan, malzememizin biyoaktif bileşeni olarak öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız Ca-HAp mikroküreleri, çöktürme ve sinterleme süreçleriyle 20-60 μm boyutunda homojen partiküller halinde üretilmiş olup, bu yapısal özellikleriyle optimal biyomimetik performans sağlamaktadır [28]. Biyoseramikler, tamamen polimerik içerikli dolgu maddelerine kıyasla birçok üstün fizikokimyasal özellik sergilemektedir. Hidroksiapatitler, polimerlere göre daha yüksek termal stabiliteye sahip olup, yaklaşık 1000°C'lik sinterleme sıcaklıklarına ulaşabilirler ki bu sıcaklık değeri, polimer dolgu maddelerinin camsı geçiş sıcaklıklarının ve fizyolojik sıcaklıkların çok üzerindedir [29]. Bu bağlamda, geliştirilen malzeme, radyo frekans, lazer ve ultrason gibi enerji bazlı cihazların kullanımı sırasında polimer dolgu maddelerinde karşılaşılan lokalize ısınma nedeniyle oluşabilecek deformasyon ve buna bağlı inflamatuar yanıtların tetiklenmesi gibi sorunlardan uzak kalmaktadır [30-32]. Polimerik mikrokürelerin hidrofobik yapısının aksine, Ca-HAp mikroküreleri hidrofilik yüzeyleriyle bir biyomalzemede olması gereken yüksek hücre ve protein adsorpsiyon kapasitesine sahiptir [33, 34]. Ayrıca, Ca-HAp kırıkların ardından kemik debrisinin maruz kaldığı benzer metabolik yolaklarla aynı mekanizma ile bozunabilen bir malzemedir. Yumuşak doku ogmentasyon uygulamalarında bir taşıyıcı jel içerisine yüklenen küresel HAp’ların komşuluğundaki çevrede var ise travmatize, atrofik veya inaktif doku onarımını sağladığı, dokuyu destekleyecek kolajen, elastan gibi yeni iskelet elemanlarının oluşumunu tetiklediği, metilselülozun da 2-3 ay içerisinde vücut tarafından absorbe edilebildiği ve kolajen ile replase olabildiği ve partiküllerin kademeli bir şekilde parçalanmasının son aşamasında fagositoz yoluyla tamamen yok edilebildiği çok sayıda araştırmacı tarafından ortaya konmuştur [35-39]. Buna ek olarak, Ca-HAp seramiğinin antijenisite göstermeyen, yabancı cisim reaksiyonlarına sebebiyet vermeyen ve biyouyumluluğu kanıtlanmış bir seramik olduğu da pek çok çalışmada rapor edilmiştir [40-42].

Diğer yandan formülasyonumuzun polimerik taşıyıcı fazını oluşturan CMC, selülozun amorf bölgelerinin alkilasyon reaktifleri ile kimyasal modifikasyonu yoluyla sentezlenen, suda çözünür bir selüloz türevidir. CMC'nin bitkisel kaynaklı organik yapısı, yüksek biyouyumluluğu, minimal inflamatuar yanıt oluşturma potansiyeli ve hücre proliferasyonunu destekleme kapasitesi nedeniyle, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp

uygulamalarında geniş bir kullanım alanı bulduğu raporlanmıştır [43-45]. CMC, dolgu maddesi olarak temel gereklilikleri karşılamakla birlikte, dermal dolgu jeli olarak yüksek porozite ve kayma incelmesi (shear-thinning) özellikli akışkan dinamikleriyle de öne çıkmaktadır [46, 47]. Porozite, Ca-HAp ve fibroblast etkileşimlerinin etkin ve optimal bir şekilde gerçekleşmesi için kritik bir parametre iken [48], kayma incelmesi ise dolgu maddesinin uygulandığı bölgede homojen bir dağılım göstermesi ve böylece nodül oluşumu riskinin asgari düzeye indirilmesi açısından önem taşımaktadır. CMC jelinin kayma incelmesi özellikleri, viskozitesinin uygulanan mekanik stres altında azalmasına olanak sağlayarak, enjekte edilebilir prosedürlerde belirgin bir operasyonel avantaj sunmaktadır. Bu reolojik özellik, jel uygulaması sırasında daha az direnç gösterilmesini sağlayarak, mikroküre lerin doğal morfolojik yapılarının korunmasına ve deformasyon riskinin minimize edilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda, CMC, polilaktik asit (PLLA) ve bazı çapraz bağlı hyaluronik asit (HA) jellerinde görülen yüksek nodül oluşum oranlarına karşı belirgin bir üstünlük sergilemektedir [49-51].

Pazardaki ürünler ve literatür dikkate alınarak, özel bir formülasyonla seramik fazın polimerik fazla başarılı bir birleşimi şeklinde bifazik karakterde, (Ca-Hap/CMC) yumuşak doku ogmentasyonu ve rejenereasyonu matriksi olarak geliştirdiğimiz enjekte edilebilir biyomalzememiz morfolojik, kimyasal, termal ve reolojik açılardan test edildikten sonra *in vitro* çalışmalarla sitotoksisite analizi ile değerlendirilmiştir. Biyouyumluluğu test edilen malzememiz sıçan deri altı deney modelinde ticari pozitif kontrol örnekle karşılaştırılmıştır. Histolojik ve histomorfometrik açılardan geliştirdiğimiz suni destek malzemesinin *in vivo* koşullardaki tepkisi, implantın başarılı bir şekilde entegre olup olmaması, yumuşak bağ dokusu ile replase olma miktarı ve degradasyonu ile üç boyutlu hacimsel stabiliteye zaman içerisindeki katkısı gibi kriterler ile değerlendirilmiştir. *In vivo* uygulama, malzememizin yumuşak doku alanında fibroblastik büyümeyi teşvik ettiğini ve kalsifikasyona neden olmaksınız yeni kolajen ve elastin oluşumunu desteklediğini göstermiştir.

Sonuç olarak, geliştirdiğimiz formülasyonunun rejeneratif tıp ve yumuşak doku mühendisliği uygulamaları açısından, minimal invaziv yöntemlerle uzun vadeli estetik iyileşme hedefleyen tedavi protokollerine potansiyel bir alternatif olarak hizmet edeceği değerlendirilmektedir.

# 2. GENEL BİLGİLER

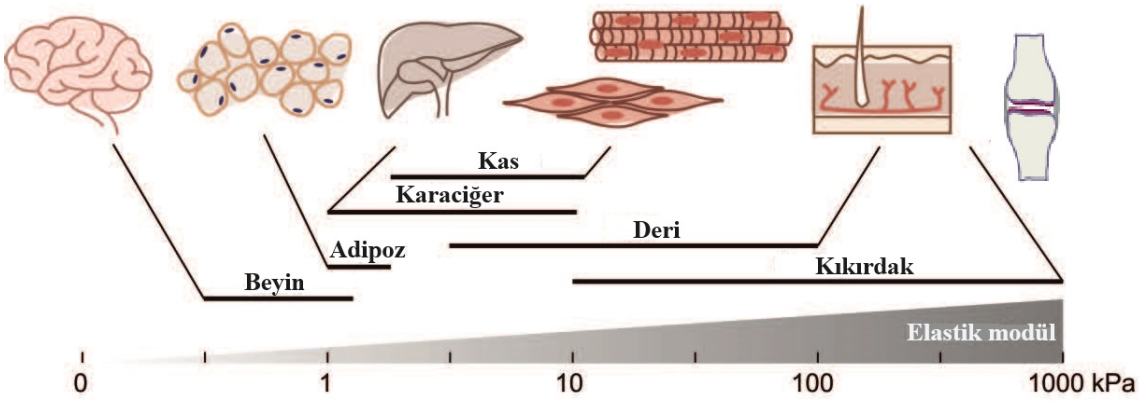
## 2.1. Yumuşak Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, biyolojik malzeme ve/veya ürünlerin geliştirilmesinde yaşam bilimleri ve mühendislik ilkelerini birlikte uygulayan interdisipliner bir alandır [52]. Bu alan, bir organın tümüne veya dokusuna işlevselliğini geri kazandırmayı, korumayı ve geliştirmeyi amaçlamaktadır. Doku mühendisliği stratejilerinde doku boşluklarını doldurmak, yapısal destek sağlamak ve transplantasyon sırasında vücutta yeni doku oluşturabilen büyüme faktörleri ve/veya hücreleri sunmak için iskele matrisleri kullanılmaktadır. Hücresel etkileşim ve entegrasyon için uygun fiziksel ve hücresel sinyalizasyonlar bu sürece dahil edilmektedir [53-55].

Yumuşak doku, genellikle kemik dışındaki tüm dokuları kapsayan geniş bir terim olarak kullanılmaktadır. Bu tanım deri, kas-iskelet sistemi (kıkırdak, bağlar/tendonlar, kas, bağ dokusu), yağ dokusu, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi (beyin, sinirler), sindirim sistemi, damar sistemi (kan ve lenf damarları), karaciğer, akciğer, böbrek, üreme organları ve göz dokularını içermektedir. Yumuşak dokular, genel olarak oldukça esnek yapılar olup sertlik değerleri 0.1 kPa ile 1 MPa arasında değişmektedir (Şekil 2.1). Bu geniş ve çeşitli sertlik aralığı, yumuşak dokuların farklı fonksiyon ve yapısal gereksinimlerine göre adapte olabilmelerine olanak tanımaktadır [56-59].

Yumuşak doku mühendisliği, doğuştan gelen genetik bozukluklar, yaşlanma süreciyle birlikte gelişen dejeneratif değişiklikler, kazalar sonucu meydana gelen travmatik yaralanmalar, kronik hastalıklar, enfeksiyonlar veya atrofik süreçler gibi nedenlerle hasar görmüş, işlevini kaybetmiş ya da yapısal bütünlüğünü yitirmiş yumuşak dokuların onarımı, yenilenmesi veya yeniden oluşturulması amacıyla hücre, biyomalzeme ve biyomoleküllerin entegre edildiği multidisipliner bir alandır. Bu alanda kullanılan biyomalzemeler ve hücrelerle, doğal doku yapısı taklit edilerek veya optimize edilerek dokunun biyolojik ve mekanik özelliklerinin geri kazandırılması hedeflenmektedir. Dokuların mekanik özellikleri, hücre dışı matriksin (ECM) bileşimi ve organizasyonu tarafından belirlenmekte olup, genellikle dokunun işlevi ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, kıkırdak ve tendon gibi mekanik yük taşıyan dokular, hücre dışı matriksin yoğunluğu ve organizasyonu nedeniyle, beyin gibi yumuşak ve esnek dokulardan çok daha sert

yapıdadır. Yumuşak doku ECM'nin ana bileşenlerini, fibroz proteinler (kolajen, elastin), glikozaminoglikanlar (hyaluronik asit (HAc), kondroitin sülfat) ve proteoglikanlar (agregan, versikan) oluşturmaktadır. Ancak her bileşenin göreceli konsantrasyonu ve yapısal düzenlemesi, dokunun türüne ve yaşına bağlı olarak değişmektedir [4, 60-62].



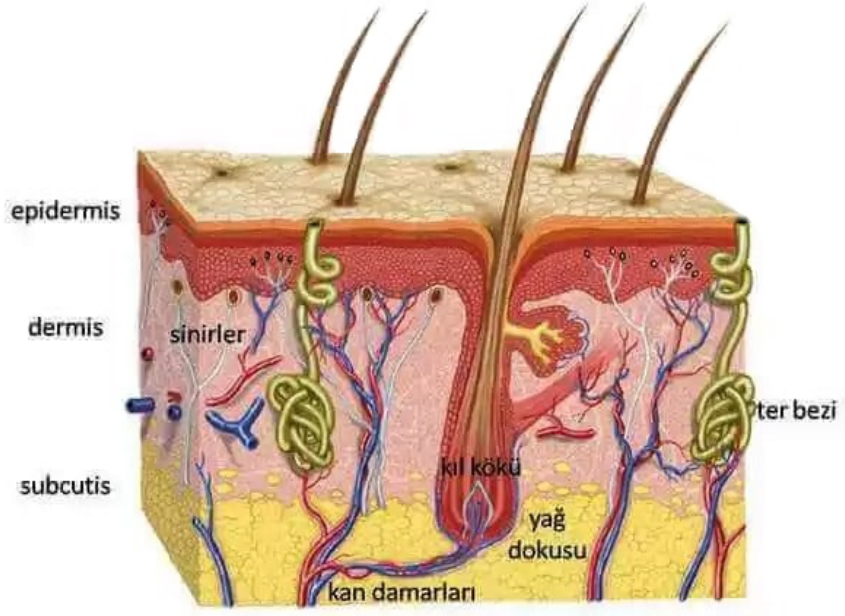

Şekil 2.1. Yumuşak dokuların elastik modül değerleri.

## 2.2. Deri ve Yapısı

Deri, vücudun en büyük organı olup, karmaşık ve çok katmanlı bir yapıya sahiptir. Bu yapı, organizmanın dış çevre ile etkileşimini sağlayan bir bariyer işlevi görmesinin yanı sıra, çeşitli biyolojik işlevlerin yerine getirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Deri, koruma, duyusal algı, termoregülasyon, su kaybının önlenmesi ve metabolik süreçlerin düzenlenmesi gibi bir dizi temel fonksiyonu yerine getirmektedir. Bu işlevlerin optimal düzeyde gerçekleştirilebilmesi, derinin biyolojik mimarisinin çok katmanlı yapısıyla doğrudan ilişkilidir [63, 64]. Anatomik olarak deri, dıştan içe doğru epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç ana katmandan oluşmaktadır (Şekil 2.2).

Epidermis, derinin en dış katmanını oluşturan ince ama oldukça dirençli bir tabakadır. Bu tabaka, keratinosit adı verilen hücrelerin katmanlı bir düzenlemesinden oluşur. Keratinositler, cildin dış etkenlere karşı korunmasında kritik rol oynayan keratin proteininin üretiminden sorumludur. Epidermis, aynı zamanda, pigmentasyon sürecini yöneten melanositler, bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde görev alan Langerhans hücreleri ve duyusal algının sağlanmasında rol oynayan Merkel hücreleri gibi çeşitli spesifik hücre tiplerini de barındırmaktadır. Epidermisin sahip olduğu bu hücresel

çeşitlilik, onun fiziksel bir bariyer olmanın ötesinde çevresel ve biyolojik uyaranlara yanıt verebilme kapasitesini artırmaktadır [65].




Şekil 2.2. İnsan derisinin anatomik yapısı.

Dermis, epidermisin hemen altında yer alan ve cildin mekanik dayanıklılığını ve esnekliğini sağlayan kalın bir tabakadır. Bu tabaka, büyük ölçüde kolajen lifleri, glikozaminoglikanlar (GAG) ve elastin gibi zengin ECM bileşenlerinden oluşmaktadır. Dermisin bu yapısı, cildin gerilme kuvvetlerine karşı direnç göstermesini ve elastikiyetini korumasını sağlamaktadır. Dermisin ana hücre tipi olan fibroblastlar, ECM bileşenlerinin sentezi ve yeniden şekillendirilmesi süreçlerinde merkezi bir rol oynamaktadır. Fibroblastlar, dermisteki kolajen ve elastin üretimini düzenleyerek dokunun yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonel sürekliliğini sağlamaktadır. Dermis, aynı zamanda bağışıklık hücreleri, sinir lifleri ve kan damarları gibi kritik bileşenleri barındırmakta olup, bu yapılar dermisin duyusal algı, bağışıklık yanıtı ve besin ile oksijenin dağıtımı gibi hayati işlevlerini etkin bir şekilde yerine getirmesine olanak tanımaktadır [66-70].

Hipodermis veya subkutan tabaka, dermisin altında yer alarak cildin en derin katmanını oluşturan, yağ dokusu açısından zengin bir yapıdır. Bu tabaka, vücut ısısının korunması, mekanik travmalara karşı yastıklama sağlanması ve enerji depolanması gibi temel işlevleri yerine getirmektedir. Hipodermis, ayrıca, metabolik süreçler ve enflamatuvar yanıtlar üzerinde etkili olan çeşitli hormonlar ve biyomoleküllerin üretildiği bir merkez

olarak, parakrin sinyalizasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bağışıklık hücrelerinin bulunması ve bu hücrelerin organizmanın savunma mekanizmalarına katkıda bulunması, hipodermisin savunma fonksiyonları açısından önemli bir bileşen olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hipodermis cildin derin dokularla olan bağlantısını sağlayarak, vücudun homeostazında kritik bir rol üstlenmektedir [71-73].

### 2.3. Patolojik Deri Özellikleri

Yaşlanma doğumla başlayan, cildin tüm katmanlarında meydana gelen yapısal ve moleküler bozulmanın yarattığı multifaktöryel, karmaşık ve devamlı bir süreçtir [74]. Patogenezi tam olarak anlaşılamamakla birlikte bu sürece katkıda bulunan birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bunların içerisinde en önemlisi intrinsik ve ekstrinsik yaşlanma mekanizmasıdır. İntrinsik yaşlanma sadece ciltte değil tüm organlarda meydana gelmekte olup, kaçınılmaz bir olgudur. Klinik olarak intrinsik yaşlanma sonucu ince kırışıklıkların eşlik ettiği atrofik kuru bir cilt görülürken, ekstrinsik yaşlanmada temel etken fotoyaşlanma olduğundan hiperpigmente maküller, telenjiektaziler, ciltte kabalaşma ve derin kırışıklıklar görülmektedir [75].

Epidermis; keratinositler, antijen sunucu langerhans hücreleri ve melanin üreterek cildin ultraviyole (UV) hasara karşı korunmasını sağlayan melanositlerden meydana gelmektedir. Epidermis gençlerde 48 günde bir yenilenirken, bu süre yaşlanmayla birlikte %30-50 oranında uzama göstermektedir [76, 77].

Yaşlanma sürecinde, başta dermis olmak üzere cildin tüm katmanlarında dejeneratif değişiklikler meydana gelir. Epidermisten farklı olarak dermisin büyük çoğunluğu fibroblastlar tarafından üretilen aselüler ECM'den oluşmaktadır. ECM'nin temel komponentleri kolajen lifler, elastik lifler, glikozaminoglikan, proteoglikan, fibroblastlar, histiositler, mast hücreleri ve dermal dendrositlerdir. Bu bileşenlerden kolajen, cildin dayanıklılığını, esnekliğini ve dermal hacmini sağlayan başlıca protein olup, derinin kuru ağırlığının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. İnsan derisinde %80-90 oranında tip 1, %8-12 oranında tip 3 kolajen bulunmaktadır. Yaşlanmayla birlikte kolajen sentezi ile yıkımı arasındaki dengesizliğin yaşlanmanın temel nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir [78]. Kronolojik yaşlanma sürecinde dermal kalınlığın azalması durumu, kolajen ve elastik liflerde meydana gelen biyokimyasal ve yapısal değişiklikler ile ECM

bileşenlerinin kaybıyla ilişkilidir. Kolajen sentezinin azalması ve yıkımının artması, özellikle metalloproteinazların (kolajenazlar) seviyesindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar, yaşlanma sürecinde toplam kolajen miktarının, yetişkin yaşamının her yılında %1 oranında azaldığını, geri kalan kolajen liflerinin ise daha düzensiz, sıkı ve taneli hale gelerek artan çapraz bağlanma gösterdiğini ortaya koymuştur [75]. Bu nedenle, cilt gençleştirme tedavilerinin büyük bir kısmı, yaşla birlikte ortaya çıkan bu kolajen dengesizliğini geri çevirmeye yöneliktir. Yaşlanmayla birlikte elastisite sağlayan elastik liflerin de sayısında ve kalınlığında azalmalar görülmektedir. Bunun yanı sıra, mukopolisakkaritler ve özellikle hyaluronik asit (HAc) miktarları da azalmaktadır. Bu biyokimyasal değişiklikler, derinin turgor ve tonus kaybına yol açarak kolajen liflerinin düzenlenmesi, yönlenmesi ve boyutunu olumsuz yönde etkilemektedir. ECM'de bulunan glikozaminoglikan ve proteoglikanlar 1000 kat kadar su tutabilme yetenekleri sayesinde cildin sıkıştırılabilmesini sağlarken [78], yaşlı cilt dokusunda, GAG miktarı artsa bile su tutma kapasiteleri azaldığı için kuru bir görünüm oluşmaktadır [79].

Subkutan doku (hipodermis), yağ lobüllerinden oluşur. Her bir yağ lobülü, bağ dokusu septaları ile ayrılmış olup, kendi damar yapısını içeren yağ hücrelerinden meydana gelmektedir [80]. Yaşlanma sürecinde, yağ hücrelerinin küçülmesi ve fonksiyonlarını yitirmesi sonucunda lipoatrofi gelişir. Bu durum, gençlikte sahip olunan konveks yüz yapısının kaybolmasına neden olur [79, 81].

İntrinsik yaşlanmayla birlikte histopatolojik olarak, retelerde ve dermoepidermal bileşkede düzleşme, dermal kolajen miktarında ve subepidermal elastik dokuda azalma görülür. Ekstrinsik yaşlanmada ise fotohasara bağlı olarak dermal fibroblastlardan anormal elastin sentezi gerçekleşir ve dermiste kalınlaşmış granüler elastik lifler izlenir [82]. Yaşlanmayla epidermisin özellikle stratum korneum tabakasında incelme meydana geldiği gösterilmiştir [83]. Bununla birlikte, fotoyaşlanmaya bağlı aktinik hasarın epidermiste hiperplaziye yol açabileceğini öne süren çalışmalar da mevcuttur [84].

Yaşlanan deri tedavisinde, neokolajen sentezini uyarmayı amaçlayan prosedürlerle, dermal yeniden şekillendirme, sarkmış deri ve kırışıklıkların iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Kolajen oluşumunun kontrolü ve uyarılması, gençleştirme tedavilerinde kritik bir öneme sahiptir. Dermal yapının uygun şekilde korunması için

kolajen sentezinin düzenlenmesi gereklidir; aksi takdirde kontrolsüz kolajen üretimi, hipertrofik skar ve keloid gibi istenmeyen durumlara yol açabilir.

Sonuç olarak, yumuşak dokuda travma, doğuştan gelen bozukluklar, hastalıklar ve/veya yaşlanma sürecinde cilt atrofisi ve UV maruziyeti sonucu cilt dokusunda ECM yapısındaki değişikliklerden kaynaklanan doku kayıpları meydana gelebilmektedir [85, 86]. Bu doku kayıplarını yerine koymak ve düzeltmek için diyet destek tedavileriyle beraber botulinum toksin uygulamaları, lazer, dermabrazyon, mikroiğneleme, kimyasal peeling, radyofrekans, trombositten zengin plazma ve dolgu uygulamaları gibi çeşitli invaziv-noninvaziv ve topikal tedaviler önerilmiştir [75]. Bunlar içerisinde dolgu uygulamaları genellikle estetik amaçlarla cilt yumuşak doku eksikliklerini düzeltmek için kullanılsa da skleroderma, ses telleri felci, yarık dudaklar, göz çukurluğu, gastroözofageal reflü ve idrar/feçes inkontinansı dahil diğer tıbbi endikasyonlar için de uygulanmaktadır [86]. Dermal uygulamalarda dolgu malzemesi, eksikliğin türüne bağlı olarak cilt altına veya içine çeşitli derinliklere enjekte edilmektedir. Ancak, mevcut dermal dolgular, hızlı bozunma süreleri veya komplikasyon riskinin artması gibi sınırlamalar içerdiğinden uzun süreli hasta konforu için uygun doku yenilenmesini kısıtlayan bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır [87].

Aşağıdaki bölümlerde enjekte edilebilir biyomalzemelerin kullanıldığı yumuşak doku ogmentasyonuna etkili çözümler getiren yaklaşımlara ve geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC ogmentasyon jelinin öne çıkan yönlerine yer verilmiştir.

## 2.4. Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, biyolojik sistemlerle etkileşimde bulunan ve medikal cihazlar içinde veya bağımsız olarak kullanılan malzemelerdir [88]. Kimya, kimya mühendisliği, malzeme bilimi, mekanik, yüzey bilimi, biyomühendislik, biyoloji ve tıp gibi disiplinlerarası alanların ortak çalışmalarıyla geliştirilmektedir [89]. Biyomalzeme alanı geniş bir büyüme hacmine sahip olup her gün yeni üretim dallarıyla çeşitlenmektedir [90]. Medikal alanda biyomalzemeler, kontrollü salım sistemleri, teşhis kitleri ve doku mühendisliği gibi yenilikçi uygulamalarda kullanılmaktadır.

Tarihsel olarak, biyomalzemeler üç sınıf içerisinde değerlendirilmiştir. Bunlar, bağışıklık reaksiyonlarını asgari düzeye indiren biyoinert malzemelerden oluşan birinci nesil; dokularla etkileşime giren ve rejenerasyonu tetikleyen ikinci nesil; biyoaktif ve bozunabilir malzemeler ve malzemelerdeki atomik değişiklikler yoluyla istenen hücre ve gen aktivitelerini hedefleyen ve geliştirdiğimiz malzemenin de dahil olduğu üçüncü nesil biyomalzemelerdir [91]. Bir biyomalzemenin taşıması gereken en temel özellikler aşağıda detaylandırılmıştır.

**Biyouyumluluk**

Biyouyumluluk, bir malzemenin belirli bir uygulamada, konakçının doğal biyolojik ortamında doku veya organ ile etkileşime girerek istenen biyolojik yanıtları teşvik etme ve aynı zamanda immün yanıt veya toksik etkiler oluşturmadan performans gösterme yeteneğidir [92]. Williams (2008) tarafından, doku mühendisliği ürünleri için biyouyumluluk, bir iskele veya matrisin, nihai konakta istenmeyen lokal veya sistemik yanıtlar oluşturmadan doku rejenerasyonunu optimize eden moleküler ve mekanik sinyal sistemlerini destekleme yeteneği olarak tarif edilmiştir [93]. Bu tanıma dayanıldığında ideal bir biyomalzeme, kimyasal, biyolojik, fiziksel ve mekanik açıdan vücutla uyumlu olmalı ve immünojenik ve sitotoksik etkiler yaratmadan hücrelerin yapışmasını, göç etmesini ve çoğalmasını sağlamalıdır [94-96].

**Biyoaktivite**

Biyoaktivite, bir malzemenin dokular ve malzeme arasında bağ oluşturan belirli biyolojik tepkileri tetikleme yeteneğini ifade etmektedir. Hench ve ark. (1974) biyoaktif malzemeleri "malzemenin ara yüzeyinde dokular ve malzeme arasında bir bağ oluşumu ile sonuçlanan biyolojik tepkiler ortaya çıkaran malzeme" olarak tanımlamıştır [97]. Biyoaktif malzemeler, genellikle aşağıda verildiği şekilde sınıflandırılmaktadır [98]:

- ✓ sadece morfolojik bir bağlanma sağlayan neredeyse inert malzemeler,
- ✓ biyolojik bir bağlanma olan gözeneklerden doku büyümesini sağlayan gözenekli malzemeler,
- ✓ doku-madde arayüzünde biyoaktif bağlanma içeren biyoaktif malzemeler,
- ✓ zamanla bozunabilen ve rejenere konak doku ile değiştirilebilen biyolojik olarak emilebilir malzemeler

Yumuşak doku onarımı veya rejenerasyonunda kullanılan biyomalzemeler için 'biyoaktivite' terimi, biyomalzeme yüzeyinde mineralize hidroksil karbonatlı apatit tabakasının *in vitro* olarak simüle edilmiş vücut sıvısında veya *in vivo* vücut sıvısı dokusunda fibröz bir doku tarafından izole edilmeden birikmesi olarak da tanımlanmıştır [99, 100]. Hidroksiapatit kristallerinin kimyasal ve morfolojik modifikasyonları, biyoaktiviteyi ve biyobozunurluğu artırabilmektedir. Örneğin, karbonat ikame edilen hidroksiapatit, osteointegrasyon, biyobozunurluk ve biyouyumluluğun artırılmasında önemli etkiler göstermiştir [101].

**Biyobozunurluk**

Biyobozunurluk, bir malzemenin biyolojik ortamda zaman içinde fiziksel, kimyasal ve mekanik bozulma süreçlerine maruz kalarak doğal yollarla parçalanma ve yok olma yeteneğidir. Biyobozunurluk, malzemenin vücut tarafından parçalanması ve metabolize edilmesi sürecini ifade eder ve bu süreçte toksik veya zararlı ürünlerin oluşmaması esastır. Geçici destek sağlayan, dokuları rejenere eden ve vücutta zamanla hücreler tarafından üretilen doğal ECM ile yer değiştirmesi gereken biyomalzemeler için biyobozunurluk doku mühendisliğindeki önemli parametrelerden biridir [102]. Ayrıca, bozunma ürünlerinin immünolojik veya enflamatuar etkilerinin olmaması, diğer organlar üzerinde zararlı bir etki yaratmadan ve kalıcı hasar bırakmadan vücudu terk etmesi de biyomalzeme tasarımında önem arz eden bir husustur [103]. Biyolojik bozunma hızı, biyomateryalin işlevine bağlı olup uzun süreli amaçlar için kademeli bozunma istenirken, dokuların yenilenmesi gerektiğinde ise hızlı bozunma tercih edilmektedir [94].

## 2.5. Yumuşak Doku Ogmentasyonunda Yaygın Kullanılan Biyomalzemeler

Yumuşak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, genellikle iki boyutlu (2D) veya üç boyutlu (3D) yapılar olarak tasarlanmaktadır. Bu yapılar filmler, süngerler, örgüler, gözenekli matlar, tüpler, hidrojeller gibi çeşitli formlarda üretilebilmektedir. 3D yapılar, mekanik özellikler üzerinde daha hassas kontrol sağlamakta ve yerel dokunun karmaşık, heterojen yapılarını daha iyi taklit edebilmektedirler [104]. Bunların yanı sıra günümüzde alternatif tedavi yöntemleri arasında enjekte edilebilir materyaller de yaygın olarak araştırılmakta ve geliştirilmektedir [104].

Enjekte edilebilir biyomalzemeler, karmaşık boşlukları doldurabilme yetenekleri ve minimal invaziv tekniklerle hasarlı dokuya implante edilerek cerrahi komplikasyon riskini azaltma gibi avantajlarla öne çıkmaktadır. Yumuşak dokular için kullanılan bu biyomalzemeler genellikle sentetik veya doğal polimerlerden üretilmektedir. Sentetik polimerler genellikle kontrollü ve tekrarlanabilir kompozisyonlara sahip olsa da intrinsik biyoaktiviteye sahip değildir ve bazı kimyasal olarak sentezlenen veya çapraz bağlanan sentetik polimerler toksik reaktifler içerebilmektedirler [104]. Öte yandan, doğal biyomalzemeler genellikle biyouyumlu olup, kimyasal ve fiziksel özellikleri açısından doğal dokulara benzerlik göstermektedir. Ancak, bu malzemeler genellikle mekanik özellikler açısından daha zayıf, sentetik malzemelere göre daha hızlı bozunabilir ve kaynaklarına bağlı olarak kompozisyonları daha değişken olabilmektedir [104].

Çizelge 2.1. Yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında yaygın kullanılan sentetik ve doğal malzemeler

| Malzeme | Örnekler |
|---|---|
| Sentetik | Polietilen glikol (PEG), poliglikolik asit (PGA), Polilaktik asit (PLA), polietilen glikol diyakrilat (PEGDA), politetrafloroetilen (PTFE), polietilen tereftalat (PET), polipropilen (PP), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polimetil metakrilat (PMMA), poliakrilamid (PAM), poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm), poli(ε-kaprolakton) (PCL), polivinil alkol (PVA), poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), poloksamerler, poli(propilen fumarat) (PPF), poliüretan (PU), poli(gliserol sebakat) (PGS), silikon |
| Doğal | Kolajen, hyaluronik asit (HAc), deselülerize ekstrasellüler matriks (ECM), ipek, fibrin, jelatin, aljinat, agaroz, dekstran, kitosan, kondroitin sülfat, laminin, selüloz, amiloz/amilopektin, polihidroksialkanoat, keratin |

### 2.5.1. Doğal Polimerler

Kolajen ve hyaluronik asit (HAc), doku mühendisliğinde en yaygın kullanılan doğal polimerlerden ikisidir. Her iki polimer de ECM'de bulunur, biyobozunabilir ve biyouyumlu karakterdedir [105]. Kolajen, süngerler, mikropartiküller, lifler ve enjekte edilebilir hidrojeller halinde formüle edilebilmektedir. Bu çeşitlilik oftalmolojik, ürogenital, deri, kardiyovasküler ve sinir doku mühendisliği dahil bir dizi biyomedikal

uygulamada kolajenin kullanılmasını sağlamaktadır [105]. Ancak, kolajen temelli iskeleler, canlı organizmada hızlı büzülme ve biyogerişim eğilimi gösterdiğinden, zamanla kararlılığı artırmak amacıyla proteinin çapraz bağlanmasını gerektiren bazı kısıtlamalara sahiptir [105, 106].

HAc, ekstraselüler matriks, sinovial eklem sıvısı, vitröz humor ve beyin dokusunda bulunan bir non-sülfatlı anyonik glukozaminoglikan olup, doku içine hidrasyon ve yapısal destek sağlamaktadır [107, 108]. HAc ayrıca birçok biyolojik fonksiyonda önemli rol oynamakta ve anti-enflamatuar özellikler sergilemektedir [107, 109]. Biyolojik ve yapısal önemi HAc'ı yumuşak doku uygulamaları için cazip bir polimer haline getirmektedir [110]. HAc, canlı organizmada endojen enzimler aracılığıyla hızla parçalanabilmekte ancak kolayca değiştirilebilir ve çapraz bağlanabilir olması nedeniyle biyobozunma profili, mekanik özellikler ve hücresel etkileşimleri değiştirilebilmektedir [111, 112]. Çapraz bağlama ile bozunma profilleri uzatılsa ve mekanik dayanımı artırılsa da, HAc tabanlı hidrojeller, birçok diğer doğal temelli hidrojeller gibi hızlı bozunma eğiliminde olup sınırlı mekanik özelliklere sahiptir, bu nedenle doku mühendisliğinde kullanımları sınırlıdır [108, 113, 114].

### 2.5.2. Sentetik Polimerler

Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bir polimer olup genellikle doku mühendisliği ve ilaç taşıma alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bozunabilen ve ayarlanabilir bir bozunma hızına sahip olan az sayıdaki sentetik polimerlerden biridir. PLGA, süngerler, köpükler, lifler, hidrojeller, mikropartiküller ve nanopartiküller olarak çeşitli biçimlerde üretilebilmektedir [115]. Enjekte edilebilen PLGA mikrosferleri, yağ ve kıkırdak dokularının yeniden oluşturulmasını teşvik etmek için büyüme faktörlerini taşımak amacıyla kullanılmıştır [116] fakat PLGA bozunma ürünleri asit karakterlidir ve yüksek konsantrasyonlarda çevresel pH'yi olumsuz yönde etkileyebilir. Bu yerel etki, hücreleri, taşınan içerikleri (büyüme faktörleri, terapötik istikrar) ve çevresel dokuları etkileyebilir [117].

Polietilen glikol (PEG) ise yaygın olarak kullanılan bir başka FDA onaylı sentetik biyomalzemedir. Toksik olmayan, biyouyumlu bir madde olan PEG, çapraz bağ

oluşturmak veya biyoaktif bileşenler eklemek için işlevsel hale getirilebilmektedir [118]. PEG'in mekanik özellikleri, yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için uygun olup, hedeflenen dokuyla uyumlu hale getirilebilmektedir [119]. Ayrıca, PEG tabanlı hidrojel polimer öncülleri hücre dostu özelliklere sahip olup, *in situ* jel oluşumuna uygun karakterdedir [120]. Bu avantajlar sayesinde PEG, kıkırdak [121], yağ [122], sinir [123] ve kalp dokusu [124] gibi pek çok yumuşak doku mühendisliği uygulamasında kullanılmıştır.

Yumuşak doku uygulamalarında kullanılan bir diğer FDA onaylı sentetik polimer ise poli(ε-kaprolakton) (PCL) polimeridir. Bu biyouyumlu ve termoduyarlı polimer, yavaş bir biyobozunma karakterine sahip olup, filmler, hidrojeller ve elektro-çekilmiş lifler şeklinde şekillendirilebilmektedir. Elastikiyeti, kararlılığı ve işlenme kolaylığı, PCL'yi doku mühendisliği uygulamaları için cazip bir malzeme yapmaktadır [125, 126]. PCL genellikle kolajen, kitosan ve PEG gibi diğer polimerlerle birleştirilerek kullanılıp, sinir, kardiyovasküler, iskelet kası, bağ, mesane, göz, deri ve kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak tercih edilmektedir [125, 127].

## 2.6. Geliştirilen Ca-HAp/CMC Jelinin Öne Çıkan Yönleri

Geliştirilen Ca-HAp partiküllerinin sentetik formülasyonu ve uyumlu jel bileşenleri sayesinde uygulama öncesi herhangi bir doku uyumu testi yapılmasına gerek yoktur. Ca-HAp vücutta bulunan doğal bir mineral olduğu için antijenik veya enflamatuar reaksiyon oluşturma potansiyeline sahip değildir. Parçacıklar seramik ve osteoindüktif olmasına rağmen, implantlar kalsifiye olmaz, yumuşak ve esnek kalır. Partikül çözünürlüğü çok düşük olduğundan, hacim retansiyonu (hacim hafızası-dolgu kapasitesi) teorik olarak yıllarca devam edebilir. Malzememiz doku volüm artışı sağlayan, subdermal enjeksiyon ile uygulanabilen Ca-HAp tabanlı bir ogmentasyon ürünüdür. Temel hedefimiz, kaybedilen hacmi geri kazandırmanın yanı sıra cilt kalitesini de iyileştirmektir. Cilt kalitesini artırmada kritik rol oynayan fibroblastlar, kalsiyumun ana besin maddesi olduğu hücrelerdir. Kalsiyum, tırnaklar, dişler ve kemiklerde bulunan (orta büyüklükte bir yetişkinde yaklaşık 1 kg) bir mineral olarak, aynı zamanda cilt ve yumuşak dokularda da bulunur (yaklaşık 10 g). Bu nedenle, kalsiyum biyouyumlu bir madde olup, hücre farklılaşması, gen transkripsiyon düzenlemesi, kas kasılması ve hücre adezyonu gibi birçok metabolik ve fizyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Vücuttaki kalsiyum, kimyasal

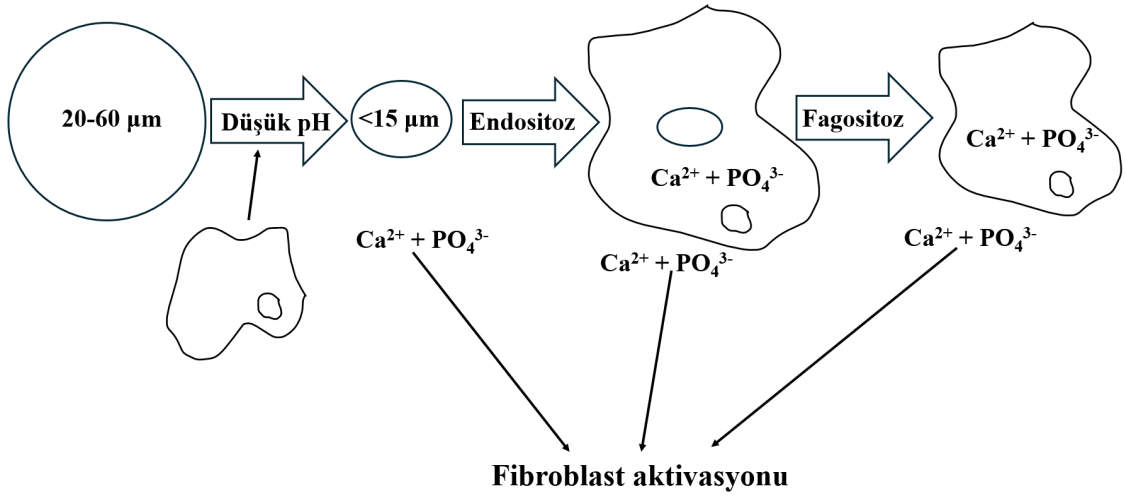
olarak kalsiyum ($Ca^{2+}$) ve fosfat ($PO_4^{3-}$) iyonlarını içeren Ca-HAp formunda bulunur. İnsan vücudu, diğer omurgalılar gibi, kalsiyum depolama veya mobilizasyon gereksinimlerine yanıt olarak Ca-HAp yapım ve yıkım mekanizmalarını tetikleyebilir [128].

Geliştirilen formülasyonun biyoaktif fazı olan Ca-HAp mikrosferleri, hacim doldurma, kolajen ve elastin üretimini teşvik etme ve fibroblastların proliferasyonunu ve göçünü tetikleyerek cilt sıkılaştırma kapasitesine sahiptir. Bu özellikler, malzememizin çok yönlülüğünü ve etkinliğini ortaya koymaktadır.

Ca-HAp mikroküreleri, enjeksiyon sırasında cilt travmasını en aza indirmek ve granülomları önlemek gibi ciddi yan etkileri bertaraf etmek için yuvarlak ve pürüzsüz yüzeyler şeklinde ve 20-60 μm aralığındaki boyutlarıyla makrofajların fagositozundan kaçınacak şekilde tasarlanmıştır. 15 μm'den büyük oldukları için makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla parçalanamayan bu partiküllerin bozunma mekanizmaları henüz net bir şekilde açıklanamamıştır [129, 130]. Ca-HAp/CMC enjekte edildiğinde, geçici travmatik ödem dışında enjekte edilen başlangıç hacmine eşdeğer oranda bir düzeltme sağlar. Düzeltme, CMC jelinin yüksek elastikiyetinin bir sonucu olarak anında gerçekleşir [131]. Enjeksiyon sonrası, Ca-HAp mikrosferleri kalsiyum iyonlarının etkisiyle çevredeki fibroblastlar tarafından kolajen ve elastin neosentezini uyararak enjeksiyon bölgesinde bir ağ oluştururlar [132]. Böylelikle dokuda sentezlenen yoğun bir kolajen ve elastin lif ağı ile dolgu etkisiyle beraber cilde genç ve dinamik görünüm kazandırır. Birkaç ay sonra Ca-HAp tamamen emilir ve sürdürülebilir yapısal destek sağlayan yeni oluşturulan kolajen ağı ile değiştirilir. Biyouyumlu ve tamamen biyolojik olarak parçalanabilen Ca-HAp mikrosferleri, makrofajlar tarafından parçalanma ve fagositoz yoluyla kalsiyum ve fosfat iyonlarına dönüştürülerek metabolize edilir [42]. Parçalanma ve emilme mekanizması tamamlandığında, salınan iyonlar vücutta doğal olarak bulunanlarla aynıdır ve vücuttan doğal olarak uzaklaştırılma metabolik döngülere katılır [42]. Bu nedenle Ca-HAp tamamen emilebilen geçici bir üründür.

Kalsiyum iyonlarının fibroblast aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ca-HAp mikroküreleri (20-60 μm) makrofajlar tarafından endositoz için çok büyük olduklarından, ekstraselüler ortamda pH düşürülerek parçalanırlar. Bu parçalanma, kalsiyum iyonlarının fibroblastlar üzerinde doğrudan etkili olduğu ve daha yüksek $Ca^{2+}$

konsantrasyonuna doğru bir kemotaksiye neden olduğu anlamına gelir. Yüksek $Ca^{2+}$ konsantrasyonu, fibroblastlarda kolajen ve elastin üretimini teşvik eden genlerin aktifleşmesine, hücrelerin proliferasyonuna, miyofibroblastlara dönüşümüne ve miyofibroblastların aktive edilmesine yol açar (Şekil 2.3).




Şekil 2.3. Fibroblast aktivasyonu için önerilen mekanizma.

Gözeneksiz seramik Ca-HAp ve büyük gözenekli Ca-HAp (10-500 µm arasında değişen gözenekleri olan düzenli bir gözenek yapısına sahip) osteointegrasyona izin verir. Büyük gözeneklere sahip makroporöz Ca-HAp, fibrovasküler büyümeyi kolaylaştırır. Diğer taraftan, seramik olmayan Ca-HAp çimento, kemik eksikliklerini onarmak için yeniden yapılandırma cerrahisinde yaygın olarak kullanılmakta olup zamanla yeni kemik ile değiştirilmektedir [133, 134]. Ca-HAp mikrosferleri mikroporözdür ve parçacıkların gözenekleri sadece 2-5 µm büyüklüğündedir. Bu küçük gözenek boyutu, fibrovasküler büyümeyi ve kemik oluşumunu teşvik etmek için yeterince büyük değildir. Şu ana kadar, subdermal olarak enjekte edilen Ca-HAp türevi malzemelerin deri altı dokularda kemik oluşturduğuna dair belgelenmiş bir vaka bulunmamaktadır. Periost üzerine enjeksiyon yapılmasının, periostu nasıl etkilediği ve uzun süreli dolgunluk ile kemik oluşumunu teşvik edip etmediği ise spekülatif bir konudur [130].

Özetle, özel bir formülasyonla geliştirdiğimiz yumuşak doku ogmentasyon malzemesinin avantajları arasında, uygulama öncesi doku uyumu testine ihtiyaç duyulmaması, düşük antijenik ve enflamatuar reaksiyon riski, uzun süreli hacim retansiyonu ve cilt kalitesini artırma kapasitesi dikkat çekmektedir.

# 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamındaki deneysel çalışmalar, temelde yumuşak doku ogmentasyonu amacıyla tasarlanan biyomalzemenin;

- ✓ Üretim prosesi ve optimizasyon çalışmalarını kapsayacak şekilde kimyasal yapı, termal, morfolojik ve reolojik karakterizasyonlarının belirlenmesi,
- ✓ Hücre ile etkileşiminde *in vitro* olarak sitotoksik etkilerinin tespiti,
- ✓ Tıbbi Cihazların Hazırlanması ve Regülasyonu konseptine uygun olarak optimum forma kavuşturulmuş ve sterilizasyon çalışmaları tamamlanmış bir şekilde sıçan derialtı ogmentasyon deney modeline uygulanarak *in vivo* ortamdaki davranışının incelenmesi

olmak üzere üç ana aşamada gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmaları içeren işlem basamakları bu bölüm içerisinde detaylandırılmıştır.

## 3.1. Kullanılan Malzemeler, Cihazlar ve Yöntemler

Sentezlenen biyomalzemenin bileşenlerini ihtiva eden kalsiyum hidroksiapatit (Ca-HAp) BMT Group (Türkiye) firmasından, sodyum karboksimetilselüloz (NaCMC) ve gliserol Sigma Aldrich (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Malzememizin *in vivo* performansının karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla, güncel olarak klinikte yumuşak doku ogmentasyonu için kullanılan Crystalys (Lod, İsrail) ticari ürünü temin edilmiştir.

Sitotoksisite testi için kullanılan analitik saflıktaki tüm kimyasallar, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, ABD)'den satın alınmıştır. *In vitro* deneyler için insan deri fibroblastı (İDF) hücre hatları (Kat. No. M2267, Cell Biologics, Chicago, IL, ABD) Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM) (Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

*In vivo* deneylerden elde edilen doku kesitlerinin boyanması amacıyla Hematoksilen ve Eozin (Merck, Rahway, NJ, ABD), Verrhoeff-Von Gieson (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya), Gomori's Trikrom (Scytek, Logan, UT, ABD) boyaları ile entellan ve ksilen

(Merck, Rahway, NJ, ABD) ve sıçanların sakrifiye edilmesinde kullanılan Sevofloran (Thal, İsviçre) sarf malzemeleri çeşitli firmalardan satın alınmıştır.

Malzeme ve bileşenlerinin kimyasal yapı analizleri için Bruker VERTEX 70v FTIR (Ettlingen, Almanya), kristal ve amorf yapı analizleri için PANalytical Empyrean XRD (Almelo, Hollanda) cihazından yararlanılmıştır.

Malzemenin nihai formu ve bileşenlerinin termal kararlılığı, Shimadzu TGA 50 (DTG60/60, Tokyo, Japonya) cihazı ile karakterize edilmiştir.

Malzememizin cerrahi implant malzemesi olarak kullanımı için gereken ağır metal içerik analizi, Perkin Elmer DRC II model ICP-MS (Shelton, CT, ABD) cihazı ile belirlenmiştir.

SEM ve EDX analizi için Quanta FEG 250 (Austin, TX, ABD) cihazı kullanılmıştır.

Nihai ürünün (Ca-HAp/CMC) depolama, kayıp ve kompleks modülü gibi akışkan özellikleri, TA Instruments ARES Rheometer (New Castle, DE, ABD) cihazı ile karakterize edilmiştir.

Enjekte edilebilir cerrahi implant malzememizin enjeksiyon kuvveti, UniVert (CellScale, Waterloo, Ontario, Kanada) mekanik test cihazı ile ölçülmüştür.

Ca-HAp mikroküre lerinin partikül boyut dağılımları ve histomorfometrik değerlendirmelerin kantitatif analizleri (kolajen ve elastik fiber yoğunluğu, dermis ve epidermis kalınlıkları ve fibroblast hücre sayıları), doku kesitleri ile oluşturulan preparatlar üzerinden Image J (v 1.52e, Solvusoft, Chicago, IL, ABD) yazılımı ile incelenmiştir. Doku kesitleri Trinoküler Mikroskop (Zeiss, Axio5, Oberkochen, Almanya) ile fotoğraflanarak değerlendirilmiştir.

Malzememizin *in vivo* performansının ticari pozitif kontrol örnekle karşılaştırılmasında, sitotoksisite çalışması verilerinin değerlendirmesinde çalışılan kontrol ve deney grupları arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesi için istatistiksel analiz çalışmaları Graphpad Prism 9.5.1 (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) yazılımıyla gerçekleştirilmiştir.

## 3.2. Ca-HAp/CMC Jel Matrisi Üretim Yöntemi

Ca-HAp/CMC jeli sentezi, iki aşamalı bir prosedürle gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, %30 gliserol, %70 deiyonize su ve %2,0 sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC) içerikli bir karışım, ogmentasyon malzemesinin taşıyıcı fazı olarak hazırlanmıştır. Elde edilen karışım, manyetik karıştırıcıda, orta hızda 30 dakika boyunca tutulmuştur. İkinci aşamada, ilk aşamada hazırlanan gliserol/NaCMC jeli ağırlıkça %60 oranında ve küresel, pürüzsüz Ca-HAp parçacıkları ise %40 oranında bir araya getirilerek homojen bir süspansiyon oluşturmak amacıyla düşük hızda karıştırılmıştır. Son olarak, preparatlar şırıngalara doldurularak 121 °C'de 21 dakika boyunca buhar ile sterilize edilmiştir.

## 3.3. Ca-HAp/CMC Jel Matrisi Karakterizasyonu

Malzemenin termal, kimyasal yapı, morfolojik ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla FTIR, XRD, TGA, SEM, ICP-MS, enjeksiyon kuvveti ölçümleri ve reometrik analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR yöntemi, inorganik veya organik yapıdaki sıvı, katı ya da gaz malzemelerin IR aktif molekül özelliklerinden yararlanarak kimyasal bağlarını belirlemeye yönelik kalitatif ve kantitatif analizler sunarak malzemelerin yapısal özellikleri hakkında kapsamlı bilgiler vermektedir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan yumuşak doku ogmentasyon malzemesi ile bileşenlerinin kimyasal yapı analizleri ATR-FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler, ZnSe ATR kristaline konularak 400-4000 $cm^{-1}$ dalga boyuna sahip kızılötesi ışınlarla tarandıktan sonra her dalga boyuna karşılık gelen geçirgenlik (%) pikleri otomatik olarak cihaz tarafından kaydedilmiştir.

### 3.3.2. X Işını Kırınımı (XRD)

XRD çalışma prensibi, hızlandırılmış elektron demetinin bakır levhaya çarparak karakteristik X-ışınlarını oluşturması, bu ışınların katı numuneler üzerine yönlendirilmesi, ardından yansıyan veya kırınıma uğrayan ışınların dedektörle kaydedilmesi ve kristal yapıya özgü kırınım deseninin incelenmesi üzerine kuruludur. Bu

sistemle toz, ince film, nanomalzeme ya da katı numuneler, yapısal ve kimyasal olarak karakterize edilmektedir.

Çalışma kapsamında hazırlanan nihai ürünümüz ile bileşenlerinin kristal ve amorf yapı içeriğini gösteren XRD desenleri (PANalytical Empyrean XRD) cihazıyla belirlenmiştir. Sentezlenen nihai ürün ve bileşenlerinin faz analizleri, X-ışını kırınımı ile, 2θ=10-90° arasında, 2°/dk tarama hızında ve Cu-Kα radyasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.3. Termal Gravimetrik Analizler (TGA)

Termogravimetri, analiz edilecek maddenin kütlesinde programlı olarak artan sıcaklıkla birlikte meydana gelen azalmaların, sıcaklık veya zamanın fonksiyonu olarak incelendiği bir analitik yöntemdir. Sıcaklık artışıyla birlikte maddenin yapısından ayrılan uçucu bileşiklerin veya maddenin bozunması sonucunda meydana gelen kütle kayıplarıyla sıcaklık-kütle eğrileri (termogram ya da termal bozunma eğrileri) elde edilmektedir. Termogravimetri cihazı, analiz sırasında kütle değişimlerini yüksek hassasiyetle ölçebilen hassas bir terazi; analizin gerçekleştirildiği sıcaklık artışının kontrol edildiği ve istenilen sıcaklık profillerinin uygulandığı iyi bir fırın; kütle ve sıcaklık değişimlerinin kaydedildiği otomatik kayıt sistemi; örneklerdeki oksidasyon ve reaksiyonların önlenmesi ve analiz ortamının kontrol altında tutulmasını sağlayan inert gazlı temizleyici ve analiz ortamının belirli gazlara maruz bırakılması veya ortamın değiştirilmesini sağlayan gaz kesebilen ya da değiştirebilen parçalardan oluşur.

Çalışmada sentezlenen nihai ürün ve bileşenlerinin termal kararlılığını değerlendirmek için termogravimetrik analiz (TGA) gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, örnekler azot atmosferinde 1 ml/dak akış hızında ve 10 °C/dak ısınma oranında 30-800 °C aralığında ısıtılmıştır. Artan sıcaklık etkisiyle meydana gelen % kütle kayıpları, tüm termal analizlerde otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış ve kaydedilmiştir.

### 3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Örneklerin yüzey morfolojisinin incelenmesi, partikül boyut ve elemental analizleri için 20 kV voltajda, dalga boyu dağılımlı X-Işınları spektroskopisi, enerji dağılımlı spektrometre ve elektron geri yansıması kırınımını içeren analitik sistemlerle donatılmış Quanta FEG 250 SEM cihazı kullanılmıştır. Daha önce karakterizasyonu yapılan Ca-

HAp'ın iletkenliğini artırmak amacıyla örnekler öncelikle Emitech K550X otomatik püskürtmeli cihazda altın ile ince bir tabaka şeklinde kaplanmıştır. Sonra kaplanan materyalin yüzey morfolojisi ve partikül boyutuna ilişkin veri elde edilmiştir.

### 3.3.5. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi (ICP-MS)

ICP-MS tekniği, elementlerin ve izotopların yüksek duyarlılıkta, geniş bir dinamik aralıkta, doğru ve hızlı analizini sağlamak için kullanılan gelişmiş bir yöntemdir. Bu teknik, elektromanyetik indüksiyonla oluşturulan yüksek sıcaklıktaki argon plazması kullanılarak numunelerin iyonize edilmesi, iyonize elementlerin kütle spektrometresi aracılığıyla ayrıştırılması ve element konsantrasyonlarının bir elektron çoklayıcı dedektörle ölçülüp elde edilen bilgilerin veri analiz yazılımı tarafından işlenmesi aşamalarından oluşur. Bu tez çalışmasında, ICP-MS yöntemi kullanılarak materyalin 5-270 amu aralığındaki olası ağır metal içeriği ng/L cinsinden analiz edilmiştir.

### 3.3.6. Enjeksiyon (Ekstrüzyon) Kuvveti Ölçümleri

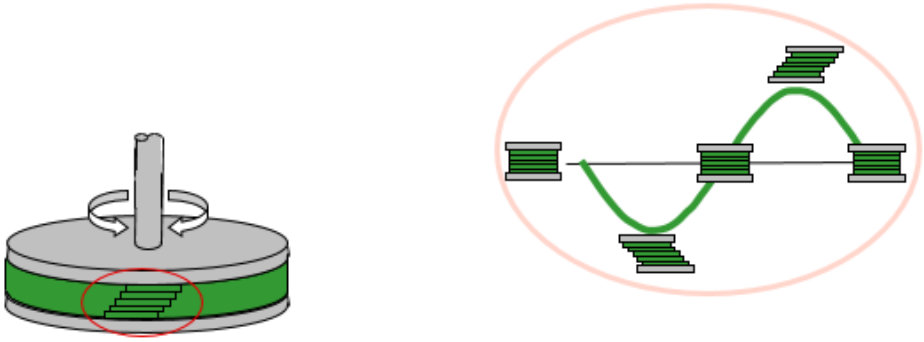
Geliştirdiğimiz ogmentasyon malzemesinin yumuşak doku içine enjekte edilirken uygulanması gereken güç/kuvvet hakkında bilgi edinilmesi amacıyla UniVert mekanik test cihazında tepe kuvveti ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analiz, malzemenin 1,5 ml şırıngadan (iğne çapı; 27 G/0,5 mm) ekstrüzyon kuvveti, şırınga pistonunun hareketine karşı 10 mm/dk kuvvet hızına sahip evrensel bir test makinesi kullanılarak tek eksenli çekme testiyle yapılmıştır. İlk dolgu damlacığının gözlemlenmesinden hemen sonra test sonlandırılmıştır.

### 3.3.7. Reolojik Analiz

Geliştirdiğimiz yumuşak doku ogmentasyon malzemesinin reolojik özellikleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında "*TA Instruments ARES Rheometer"* cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir. 40 mm çaplarındaki paralel plakalar arasına yerleştirilen örnekler 37$^{o}$C sıcaklıkta ve 0,1-100 rad/s frekans aralığında sinuzoidal salınım testine tabi tutulmuştur. Uygulanan gerilime karşı oluşan gerinim genliği ölçümleri kullanılarak gerilimle gerinim arasındaki faz açısı, depolama (elastik) modülü, kayıp (viskoz) modülü, kompleks modül, kompleks ve dinamik viskozite hesaplamaları yapılmıştır.

Viskoelastik davranış, ideal sıvı (viskoz) ile ideal katı (elastik) arasında bir yerde davranış gösteren malzemelerin reolojik özelliğini tanımlamaktadır. Malzemelerin viskoelastik davranışını incelemek için sürünme testi, gerilme gevşemesi ve salınım testi dahil olmak üzere bir dizi reolojik teknik bulunmaktadır. Salınımlı kesme reometrisi, bir rotasyonel reometrede viskoelastisiteyi ölçmek için kullanılan birincil teknik olduğundan dolayı dolgu malzememizin akışkan özellikleri bu teknik kullanılarak karakterize edilmiştir.

Küçük genlikli salınımlı kesme testi; bir rotasyonel reometre kullanılarak numunenin sürekli bir döngü içinde denge konumu (dinlenme durumu) etrafında salınmasına dayanan yöntemdir. Salınım hareketi dairesel hareketle yakından ilişkili olduğundan, tam bir salınım döngüsü 360° veya 2π radyan devrine eşdeğer kabul edilmektedir. Salınım genliği, uygulanan maksimum gerilme veya gerinime eşittir ve frekans (veya açısal frekans) saniyedeki salınım sayısını temsil etmektedir.



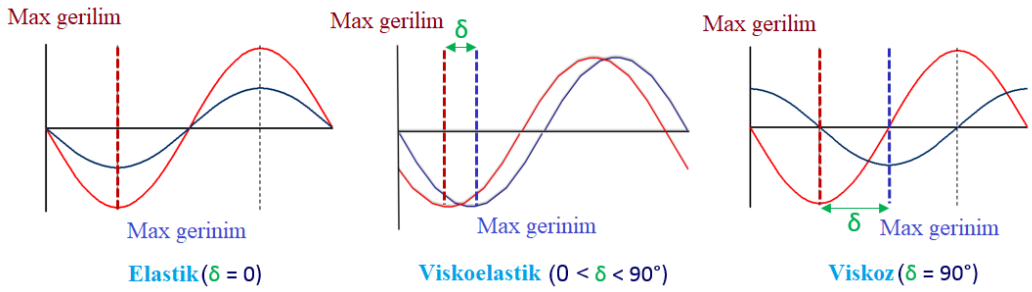
Şekil 3.1. Salınımlı (sinüzoidal) kayma profili uygulanmış paralel plakalar arasına yüklenmiş bir numuneyi gösteren çizim.

Paralel plaka ölçüm sistemiyle salınım testi gerçekleştirmek için numune plakalar arasına bilinen bir aralıkta (h) yüklenir ve üst plaka belirli bir gerilim veya gerinim genliği ve frekansında rotasyonel olarak salınır (Şekil 3.1). Bu hareket, y ekseninde stres veya gerinim genliği ve x ekseninde zaman ile çizilen sinüzoidal bir dalga olarak temsil edilir. Kontrollü bir gerilme ölçümünde üst plakaya salınımlı bir tork uygulanır ve sonuçta ortaya çıkan açısal yer değiştirme ölçülür ve bu veri ile gerinim hesaplanır. Kontrollü bir gerinim deneyinde açısal yer değiştirme kontrol edilir ve bu yer değiştirmeyi sağlamak için gereken tork ölçülür ve bu veri ile de kayma gerilmesi hesaplanabilmektedir.

Uygulanan gerilimin (veya gerinimin) ölçülen gerinime (veya gerilmeye) oranı, malzeme sertliğinin veya deformasyona karşı direncinin nicel bir ölçüsü olan kompleks modül değerini (G*) vermektedir. Kompleks modüle ait hesaplama formülü Eşitlik 3.1'de sunulmuştur. $\sigma_{max}$; maksimum gerilimi, $\gamma_{max}$; maksimum gerinimi temsil etmektedir.

$$\boldsymbol{G^* = \frac{\sigma_{max}}{\gamma_{max}}} \tag{3.1}$$

Tamamen elastik bir malzeme için gerilme ve gerinme birbirleriyle orantılıdır. Maksimum gerilme, maksimum gerinmede yani deformasyon en yoğun olduğunda meydana gelmekte olup bu durumda hem gerilme hem de gerinme aynı fazda seyretmektedir. Tamamen viskoz bir malzeme için ise gerilme/gerinme oranıyla orantılıdır. Maksimum gerilme, gerinme oranı maksimum olduğunda yani akış hızı en büyük olduğunda meydana gelmekte olup gerilme ve gerinme 90° veya π/2 radyan (bir döngünün çeyreği) kadar faz dışı seyir göstermektedir. Viskoelastik bir malzeme söz konusu olduğunda ise gerilme ve gerinim arasındaki faz farkı iki uç arasında bir yere düşecektir. Şekil 3.2'de bu durum sunulmuştur.

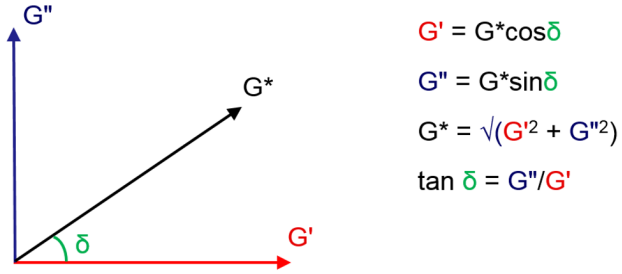



Şekil 3.2. Tam viskoz, tam elastik ve viskoelastik bir malzemenin gerilme ve gerinme dalga ilişkileri.

Faz açısı (δ), bir malzemenin toplam sertliğine (G*) katkıda bulunan viskoz ve elastik bileşenlerin ayrımını sağlar ve malzemenin viskoz ve elastik özelliklerinin göreceli bir ölçüsüdür. Bu açının değeri, malzemenin mekanik davranışını anlamak için önemlidir. Tam elastik bir malzeme için δ, 0°'dir; bu durumda, malzeme tamamen elastik özellikler gösterir ve deformasyon anında sadece geri dönüşümlü gerilme sağlar. Tam viskoz bir malzeme için δ, 90°'dir; bu durumda, malzeme tamamen viskoz özellikler gösterir ve deformasyon, viskoz direnç nedeniyle gerçekleşir. Viskoelastik malzemelerin δ değeri ise

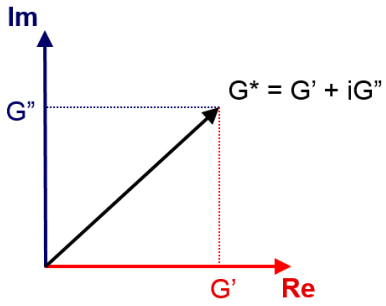
0 ile 90° arasında değişir. Bu durum, malzemenin elastik ve viskoz bileşenlerinin bir kombinasyonunu yansıtır. 45° ise, malzemenin katı ve sıvı benzeri davranışları arasındaki sınırın belirlendiği, ağ oluşumu veya deformasyonu başlangıcını temsil eden bir jel (ya da sol jel) noktasının göstergesi olarak değerlendirilebilir. Polimer sistemlerde, faz açısı kayıp tanjantı (tan δ) veya kayıp faktörü olarak da ifade edilmektedir.

Trigonometri kullanarak, Şekil 3.3'teki vektör diyagramında gösterildiği gibi G*'ye viskoz ve elastik katkıları belirlemek mümkündür.




Şekil 3.3. G* ile bileşenleri G' ve G" arasındaki geometrik ilişki.

G*'ye elastik katkı, enerjinin depolanmasını temsil ettiği için depolama modülü (G') olarak adlandırılmaktadır. Viskoz katkı ise enerji kaybını temsil ettiği için kayıp modülü (G") olarak ifade edilmektedir. Alternatif bir matematiksel gösterimde, G* karmaşık bir sayı (dolayısıyla karmaşık-kompleks modül) ve "i" de √1'e eşit hayali sayı olduğundan karmaşık sayı gösterimi kullanılır. Bu değişkenler, Şekil 3.4'te gösterildiği gibi x ekseni gerçek eksen ve y ekseni hayali eksen olmak üzere karmaşık düzlemi temsil eden bir Argand diyagramı üzerinde ortogonal seyir göstermektedir.




Şekil 3.4. Karmaşık düzlemde G', G" ve G* arasındaki ilişkiyi gösteren Argand diyagramı.

G', G" ve G* arasındaki eşitlik ilişkisi Eşitlik 3.2'deki biçimde ifade edilmektedir.

$$G^* = G' + iG'' \tag{3.2}$$

Açısal frekansın (ω) bir fonksiyonu olarak akışa karşı toplam direncin bir ölçüsü olan ve maksimum gerilme genliği ile maksimum gerilme hızı genliğinin frekansa oranı ile verilen karmaşık bir viskozite η* tanımlamak da mümkündür. G*'de olduğu gibi bu da bileşen parçalarına ayrılabilir; bunlar sırasıyla η*'nin gerçek ve hayali kısımlarını temsil eden dinamik viskozite (η') ve depolama viskozitesini (η") içerir. Kompleks viskozite ile kompleks modül arasındaki bağıntı Eşitlik 3.3'te verilmiştir.

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \tag{3.3}$$

G*'de olduğu gibi bu da dinamik viskozite ($\eta'$) ve depolama viskozitesini ($\eta''$) içeren bileşenlerine ayrılabilir; bunlar sırasıyla $\eta^*$'nin gerçek ve hayali kısımlarını temsil eder. Kompleks viskozite, dinamik viskozite ve depolama viskozite ilişkisi Eşitlik 3.4'te paylaşılmıştır.

$$\eta^* = \eta' + i\eta'' \tag{3.4}$$

Viskoelastik maddelerin reolojik karakterizasyonunda kullanılan G*, G', G" ve tan δ parametreleri geliştirdiğimiz formülasyon doğrultusunda aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

***G* (Kompleks modül);*** Ca-HAp/CMC'nin genel viskoz ve elastik özelliklerinin toplam ölçüsüdür. Hem elastik hem de viskoz özellikleri kapsar ve deformasyon gelişmesi için gereken toplam enerjiyi temsil eder. Pratikte, G* malzememizin bifazik ve kompozit karakterinin şeklini değiştirmeye karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır ve malzemenin sertliği ve direnci hakkında fikir verir.

***G' (Elastik modül);*** Ca-HAp/CMC'nin elastik özelliklerini ölçen parametredir. Kuvvet uygulandığında jelin deformasyonu ve eski şekline dönmesi aşamasında malzeme içinde biriken enerjiyi belirler. Tam elastik maddelerde, G* değeri G' değerine yakın olur. G', malzemenin sertliğini ifade eder ve klinik uygulamalarda yumuşak dokunun orta ve derin

kırışıklıklarında ne kadar etkili olduğunu gösterir. Ayrıca, dokuda çevresel kuvvetler karşısında ne kadar stabil kalabildiğine işaret eder.

***G" (Viskoz modül);*** Ca-HAp/CMC'nin viskoz özelliklerini ölçer. G" değeri yüksek bir ogmentasyon malzemesinin enjektörden geçerken zorlanacağı, dokuya uygulandığında dokuda zor yayılacağı ve dokuya daha kalın tabakalar halinde uygulanması gerektiği dikkate alınmalıdır.

***tan δ;*** Ca-HAp/CMC'nin viskoz ve elastik özellik ölçülerinin oranını gösterir. Tan δ değeri 1'den küçükse, ogmentasyon malzemesi elastik; 1'den büyükse viskoz olarak değerlendirilir.

### 3.4. Sitotoksisite Testi

Deri altına uygulanacak ogmentasyon malzememizin insan hücreleri ile etkileşimini ve potansiyel toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla *in vitro* sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla insan deri fibroblast (İDF) hücre hatları kullanılarak, mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesinde yaygın şekilde kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testiyle hücre canlılığı, etkilenimi belirlenmiştir.

Öncelikle, yüksek glukoz içeren DMEM ve DMEM/F12 besiyerlerine 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin ve %10 fetal sığır serumunun (FBS) eklenmesiyle hücreler için uygun kültür ortamı hazırlanmıştır.

İDF hücre hatları, %5 $CO_2$ ve %95 nem içeren 37 °C inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler, 96 kuyulu plakalara $1x10^4$ hücre yoğunluğunda ve 150 µl hacminde ekilerek, uygulama öncesinde 24 saat süreyle $CO_2$ inkübatöründe proliferasyona bırakılmıştır.

Ca-HAp/CMC, fosfat tamponlu salin (PBS) içinde çözündürülüp 5 dk süreyle sonikatörde karıştırılarak stok çözeltisi hazırlandıktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Ca-HAp/CMC jeli, 0 (Kontrol), 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 ve 20 mg/ml konsantrasyonlarında İDF hücre hattına uygulanmış, herhangi bir ajanla muamele

edilmemiş hücreler kontrol olarak değerlendirilmiş ve 300 µM $H_2O_2$ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

İnkübasyonun 48. saatinde, her bir kuyucuğa PBS içinde 20 µl, 5 mg/ml MTT çözeltisi eklenmiş, plakalar tekrar 37 °C $CO_2$ inkübatörüne yerleştirilmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresinin ardından, süpernatant uzaklaştırılmış ve oluşan mavi-mor renkli formazan kristalleri, 150 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek çözündürülmüştür. Canlı hücrelerin ürettiği çözünür formazan kristallerinin absorbansı, Epoch mikroplaka okuyucusunda (BioTek, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Hücre canlılığı, kontrol grubunun absorbansı %100 kabul edilerek Eşitlik 3.5'teki formülle hesaplanmıştır.

$$Canlı\ hücre\ (\%) = \left[\frac{Malzeme\ ile\ muamele\ edilen\ hücrenin\ absorbansı - Boş\ kuyucuğun\ absorbansı}{Kontrol\ hücre\ absorbansı - Boş\ kuyucuğun\ absorbansı}\right] x100 \quad (3.5)$$

## 3.5. Sıçan Deri Altına Malzeme Uygulaması ve Histolojik İnceleme

### 3.5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmadaki tüm *in vivo* deneysel prosedürler Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (No. 182, 30.07.2021). Çalışmanın deneysel uygulamaları, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma Laboratuvarında (ATADEM) yapılmıştır. ATADEM'den temin edilen 90 adet erkek Spraque Dawley türü sıçanlar (200-230 g), her bir grupta 30 hayvan olmak üzere 3 farklı uygulama grubuna ayrılmıştır. Deneysel prosedüre başlamadan önce sıçanlar standart koşullarda (12 saat ışık/karanlık döngüsü, 20-22°C sıcaklık ve %40-50 nem) barındırılmıştır. Sıçanların olası acılarını asgari düzeye indirmek için tüm çabalar sarfedilmiş ve çalışma ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na (NIH yayın No. 85-23, revize 1996) göre yürütülmüştür.

### 3.5.2. Deri Altı Ogmentasyon Deney Modeli

Çalışmada sıçanlar Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Uygulama öncesi implantasyonun yapılacağı sırt bölgesi tıraş edilmiştir.

Kontrol grubunda deri altına sadece 0.5 ml serum fizyolojik uygulanmıştır. Crystalys grubundaki sıçanların sırt bölgeleri deri altı dokusuna 150 µL Crystalys dolgu malzemesi enjeksiyon yoluyla verilirken, Ca-HAp/CMC grubuna ise geliştirilen jel doku ogmentasyon malzemesinden 150 µL enjekte edilmiştir.

Uygulama yapılan her 3 gruptaki sıçanlar, tüm deney süresince 12 saat ışık ve 12 saat karanlık periyodunda su ve yiyecek erişimi olacak şekilde kafeslerde tutulmuştur.

Çalışmanın 30, 45, 60, 90 ve 120. günlerinde her bir gruptan 6 sıçan rastgele alınıp Sevufloran inhalasyon anestezisi altında sakrifiye edilerek enjekte edilen deri ve deri altı bölgeleri örneklenmiştir. Alınan doku örnekleri %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda fikse edilmiştir. İzlenen deneysel prosedür Şekil 3.5'te sunulmuştur.



Şekil 3.5. Sıçan deri altı ogmentasyon deney modeli işlem basamakları.

### 3.6. Histolojik Analizler

Yumuşak doku ogmentasyonunun etkinliği histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bunun için öncelikle dokulardaki hücre sitoplazma bütünlüğü ve nükleusların incelenmesi amacıyla histolojik boyama işlemleri yapılmıştır. Bu amaçla elde edilen deri dokuları %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildikten sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek ksilen ile temizlenmiş ve parafin bloklara gömülmüştür. Bloklar 5 µm kalınlığında kesilmiş ve histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-eozin (H&E), Gomori's trikrom (Trikrom) ve Verhoeff Van Gieson (VG) elastin boyama işlemlerine tabi tutulmuştur. Görüntülenmeye hazır hale getirilmiş preparatlar, fotoğraflanarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen histolojik kesitlerin değerlendirmesi için Image J programı kullanılmıştır. Deri dokusu kesit yüzlerine düşen alanlarda (20x objektifte beş farklı alan) kolajen yoğunluğu, fibroblast yoğunluğu (ortalama hücre sayısı), epidermis ve dermis kalınlıkları ölçülerek grup içi ve gruplar arası değerlendirmeler, daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak yapılmıştır [135, 136]. Aynı şekilde Image J yazılımı kullanılarak, tüm deneklerden alınan doku örneklerinden hazırlanan preparatların her birinin beş farklı bölgesindeki ölçümlerinin ortalamaları hesaplanarak mikrometre alan başına düşen fiber yoğunluğu yüzdeleri hesaplanıp çalışılan tüm gruplardaki elastik fiber dağılımları da kantitatif olarak değerlendirilmiştir [137].

***H&E boyama işleminde***, hücre nükleusları mor-mavi, sitoplazma ise pembe renkte boyanmaktadır. Bu süreçte, doku kesitlerinin boyama işlemine hazırlanabilmesi için ilk olarak parafinin doku bloklarından uzaklaştırılması amacıyla etüvde 60°C sıcaklıkta bekletme işlemi gerçekleştirilmiştir. Parafin uzaklaştırıldıktan sonra, doku kesitleri ksilen ile yeniden muamele edilerek alkol serilerine tabi tutulmuştur. Ardından, hücre nükleuslarının mor-mavi renkte boyanmasını sağlamak için kesitler 2 dakika süreyle hematoksilen solüsyonunda bekletilmiştir. Gereğinden fazla boyanan doku kesitleri, asit-alkol solüsyonu ile etkileştirilmiştir. Boyama işlemi devamında, ekstraselüler matriksin pembe renkte boyanması için kesitler 30 dakika süreyle eozin ile muamele edilmiştir. Son olarak, preparatlar çeşme suyunda yıkanmış, alkol serisi ile dehidre edilmiştir ve lameller kullanılarak entellan kapama işlemi gerçekleştirilmiştir.

***Gomori's (one step) Trikrom Boyama metodu,*** dokulardaki kolajen bileşenlerini ayırt etmek için kullanılan bir histolojik boyama tekniğidir. Bu yöntemle, sitoplazma, keratin ve kas lifleri kırmızı, kolajen yeşil ve hücre nükleusları mor-mavi/siyah renkte boyanarak üç farklı renk elde edilmektedir. Bu boyama prosedüründe ilk olarak, parafin bloklardan alınan kesitler 60°C'de deparafinize edilmiştir. Ardından, kesitler alkol serilerinden geçirilerek rehidrasyonu sağlanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Hazırlanan preparatlar, 56-64°C'de ısıtılarak Bouin's solüsyonu içinde 60 dakika bekletilerek fikse edilmiştir ve sonrasında 10 dakika soğumaya bırakılmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, doku kesitleri alkol serisi ile dehidre edilmiş ve entellan ile kapatılarak kurutulmuştur.

Dokulardaki elastik fiberlerin tespit edilmesi amacıyla başvurulan ***Verhoeff-Van Gieson elastin boyaması*** ile dokudaki kolajen kırmızı/turuncu, hücre çekirdekleri ve elastik lifler siyah ve diğer doku elementleri sarı renge boyanmaktadır. Bu boyama yöntemiyle elastik lifler ve hücre nükleusları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Boyama protokolü kapsamında ilk olarak, doku preparatları 60 ºC'de bekletilerek parafin uzaklaştırılmıştır. Ardından, preparatların alkol serileri ile rehidrasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, doku kesitleri Weigert's Iron Hematoxylin solüsyonunda, renkleri siyahlaşana kadar bekletilmiştir. Renk değişimi tamamlandıktan sonra preparatlar çeşme suyu ile 10 dakika boyunca yıkanmış ve Van Gieson solüsyonu ile 5 dakika muamele edilmiştir. Son olarak, boyanan doku preparatları tekrar alkol serileri ile dehidre edilmiş ve entellan ile kapatılarak kurutulmuştur.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

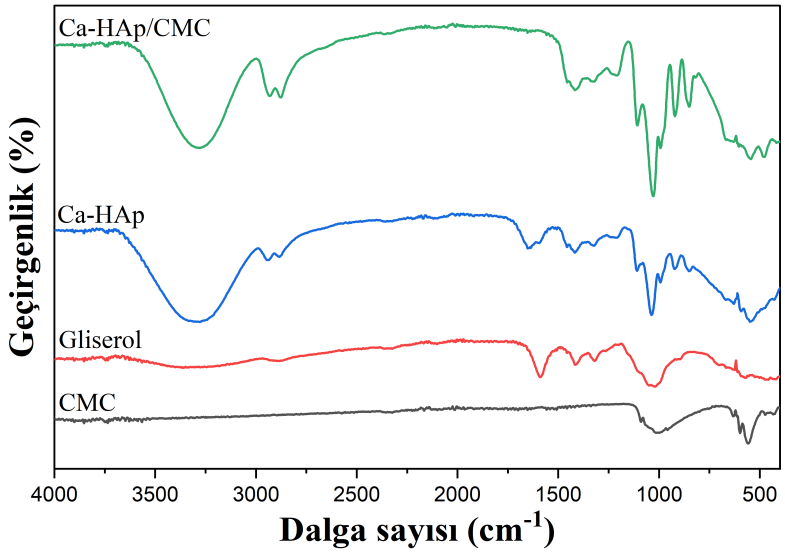
Malzememizin *in vivo* performansının ticari pozitif kontrolle karşılaştırılması, sitotoksisite ve histomorfometrik ölçümlerin istatistiksel analizleri, ortalama ±S.E.M olarak sunulmuştur. Varyanstaki farklılıklar, Graphpad prism 9.5.1 (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) yazılımında iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırmaları kullanılarak ortaya konmuştur. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirtmek için $p<0,05$ kabul edilmiştir.

# 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

## 4.1. Ca-HAp/CMC Jeli Karakterizasyonu

### 4.1.1. FT-IR Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan taşıyıcı polimerik jel sistemi (gliserol, CMC ve yüksek saflıkta su), hidroksiapatit seramik faz (Ca-HAp) ve nihai formülasyonun (Ca-HAp/CMC) FTIR spektral verileri Şekil 4.1'de verilmiştir.




Şekil 4.1. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin FTIR spektrumları.

Çalışmada kullanılan gliserolün tipik absorpsiyon bantlarının 800 $cm^{-1}$'den 1650 $cm^{-1}$'e kadar olan bölgede yer aldığı ve C-C ve C-O bağları titreşimlerine karşılık gelen pikler olduğu değerlendirilmektedir. 800, 1000, 1200, 1325, 1430 ve 1600 $cm^{-1}$'deki pikler C-C iskeletinin titreşimine aittir [138, 139]. 1117 $cm^{-1}$'deki pik, $C_2$'deki C-O'nun gerilmesine ait olup [140], bu pik 1000 $cm^{-1}$'deki piki veren C-C titreşimine ait 800-1200 $cm^{-1}$ aralığındaki band tarafından örtülmektedir.

NaCMC'nin FTIR spektrumu, 1058 $cm^{-1}$'de eter gruplarının (CH–O–$CH_2$) asimetrik gerilme titreşim bandını ve 550 $cm^{-1}$'de karboksilik grupların (COO-) gerilme titreşiminin simetrik ve asimetrik modlarını gösterdiği değerlendirilmektedir [141, 142].
Saf ortamda üretilen hidroksiapatit kristallerinin 543, 850, 927, 997, 1112, 1337, 1647, 2885, 2946 ve 3309 $cm^{-1}$ dalga boyunda karakteristik absorpsiyon pikleri verdiği

görülmektedir. 3309, 2946 ve 2885 $cm^{-1}$ dalga boyuna ait pikler -OH gerilme titreşimini gösterirken, 1647 ve 1337 $cm^{-1}$'de piklerin $CO_3^{-2}$ grubuna [143] ve 1112, 997, 927, 850 ve 543 $cm^{-1}$'de görülen piklerin ise fosfat ($PO_4^{-3}$) grubuna ait gerilme titreşimlerini gösterdiği bildirilmektedir [144]. Elde edilen bu veriler literatürdeki çalışmalarla da uyumludur [17].

FTIR analizlerinden, sentezlediğimiz maddenin (Ca-HAp/CMC) hidroksiapatit yapısındaki $(PO_4)^{3-}$ ve $OH^-$ gruplarına karşılık gelen karakteristik bantlarını içerdiği tespit edilmiştir. Genel olarak FTIR spektrumu incelendiğinde 3309 $cm^{-1}$ dalga boyunda görülen yaygın bant hidroksiapatit yapısındaki -OH gerilme titreşimini göstermektedir. 1425, 1326 ve 1209 $cm^{-1}$'deki güçlü absorpsiyon bantlarının varlığı, NaCMC yapısındaki karboksilat grubunun (-COO) varlığını doğrulamaktadır. 1105 ve 1029 $cm^{-1}$'deki bantlar ise $CH\text{-}O\text{-}CH_2$ den kaynaklanmaktadır. $(PO_4)^{-3}$ grubunun ana ve en belirgin genişleme titreşimi olan karakteristik *v3* modu, 800-1000 $cm^{-1}$ dalga boyları arasında görülmektedir. Bunun dışında bazı spektrumlarda bu grubun 960 $cm^{-1}$ dalga boyu civarındaki *v1* genişleme titreşimi de görülebilmektedir. Ayrıca 630, 596, 547, 474 ve 432 $cm^{-1}$'deki bantlar, $(PO_4)^{-3}$ grubunun karakteristik bantlarını işaret etmektedir. Bu bantların yanında gözlenen diğer bant ya da piklerin ortam koşulları ve sentez şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

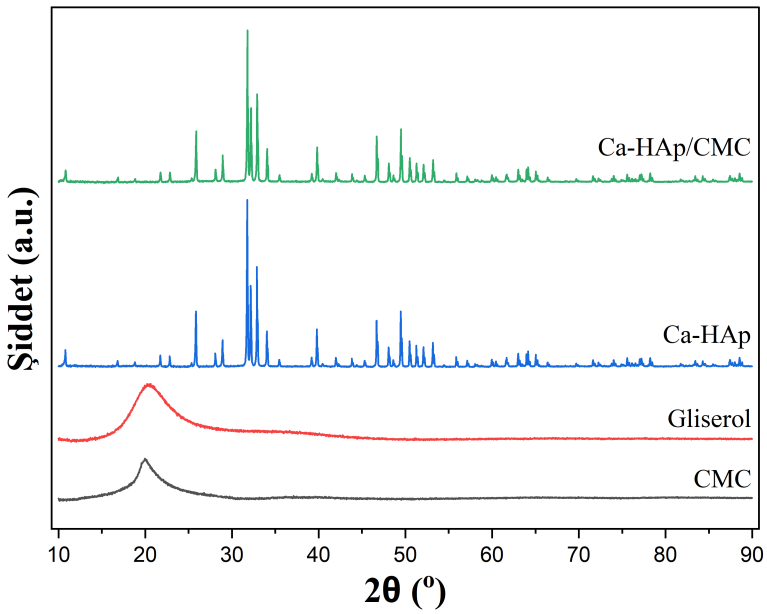
Ca-HAp/CMC'ye ait ATR-FTIR spektrumları, NaCMC/Gliserol polimer matriksi ile Ca-HAp seramik fazı arasındaki etkileşimleri, yeni piklerin oluşumu veya mevcut piklerin kaybolması gibi olguların yanı sıra, taşıyıcı jel fazını oluşturan polimer matriksine ait piklerin daha düşük veya daha yüksek dalga sayılarına kayması hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Gliserole ait 1600 $cm^{-1}$'deki ve Ca-HAp'e ait 1647 $cm^{-1}$'deki piklerin nihai Ca-HAp/CMC formunda daha düşük şiddetli pikler olarak gözlemlenmesi, polimer matriksi ile hidroksiapatit arasında bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca 600-1100 $cm^{-1}$ dalga sayısı aralığında nihai ürünün pik şiddetinde görülen artış, bileşenlerin nihai formülasyonda yarattığı sinerjitik etkiye atfedilmektedir.

### 4.1.2. XRD Bulgularının Değerlendirilmesi

XRD grafiği, X-ışınları tarafından örnekteki kristallerin atomik düzeninin incelenmesini sağlayan 2θ açısı ve kırınım yoğunluğu olmak üzere iki temel özellik taşımaktadır. 2θ

açısı, X-ışınlarının örnek üzerinde düşme açısını ifade ederken, kırınım yoğunluğu, her bir 2θ açısına karşılık gelen X-ışını kırınımının yoğunluğunu göstermektedir.

Sentezlediğimiz Ca-HAp/CMC ürünü ile bunun bileşenlerini oluşturan Ca-HAp, CMC ve gliserol moleküllerine ait olan 2θ'nın bir fonksiyonu olarak, X-ışınlarının kırınım şiddeti Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



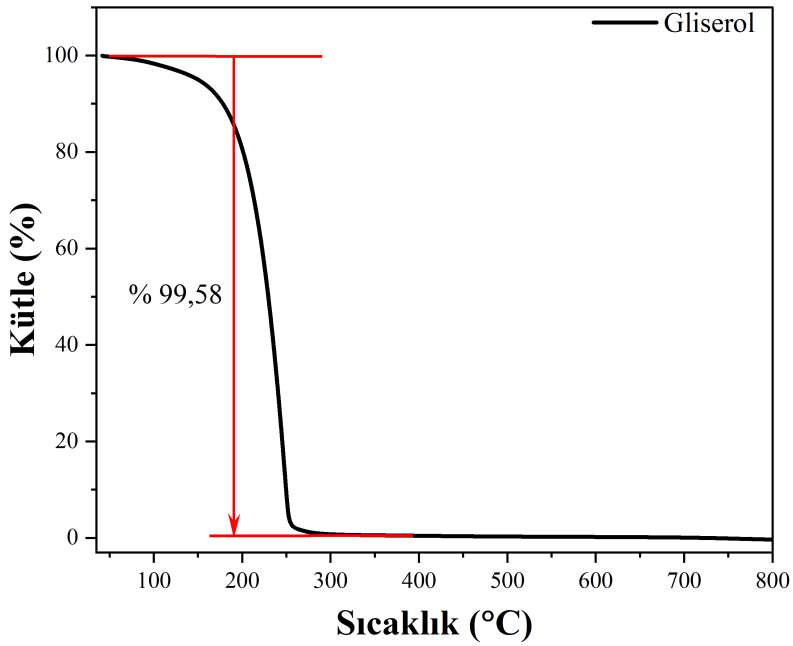

Şekil 4.2. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin XRD difraktogramları.

Şekil 4.2.'deki difraktogramlarda, 2θ karşılığı olarak 26, 29, 32, 34, 40, 47, 50-55°'lerde ortaya çıkan keskin pikler, HAp'ın zengin kristal yapısını karakterize etmektedir. Elde edilen bütün difraktogramlar, JCPDS:09-432 nolu kartta ortaya konulmuş HAp molekülünün karakteristik bölgelerini içermektedir. Yüksek şiddetteki piklerin, yüksek kristalin bölgeleri işaret ettiği anlaşılmaktadır. HAp yüklenmiş Ca-HAp/CMC jelinin XRD deseni sentezlediğimiz maddenin saf apatit fazından oluştuğunu doğrulamakta olup saf HAp'ın pik özelliklerini gösterdiği açıkça görülmektedir. Ca-HAp/CMC fazındaki pik şiddetinin Ca-HAp ile aynı oluşu, ürünümüzün nihai formundaki bileşenlerin Ca-HAp kristal yapısı ile etkileşime girmediğine işaret etmektedir. Etkileşimin gözlemlenmemesi, hidroksiapatitin morfolojik özellikleri, fonksiyonel grupları ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal karakteristiklerinin değişmediğini göstermektedir. Bu durum ürettiğimiz jel formundaki malzemenin biyoaktif fazı olan hidroksiapatit moleküllerinin doku içerisinde fonksiyonel açıdan etkin olacağına işaret etmektedir.

Diğer bileşenlerden olan gliserol ve CMC'nin kristal yapıda olmadıkları ya da kristal yapı içeriklerinin görece çok az oluşu 2θ=20º'de gözlenen keskin olmayan geniş piklerden anlaşılmaktadır. Literatürdeki verilerle de uyumlu olan bu bulgu, taşıyıcı polimer fazın bileşenlerinin amorf yapılara sahip olduklarını ve reolojik açıdan taşıyıcı rolünü uygun şekilde yerine getirme potansiyeli taşıdığını göstermektedir [145].

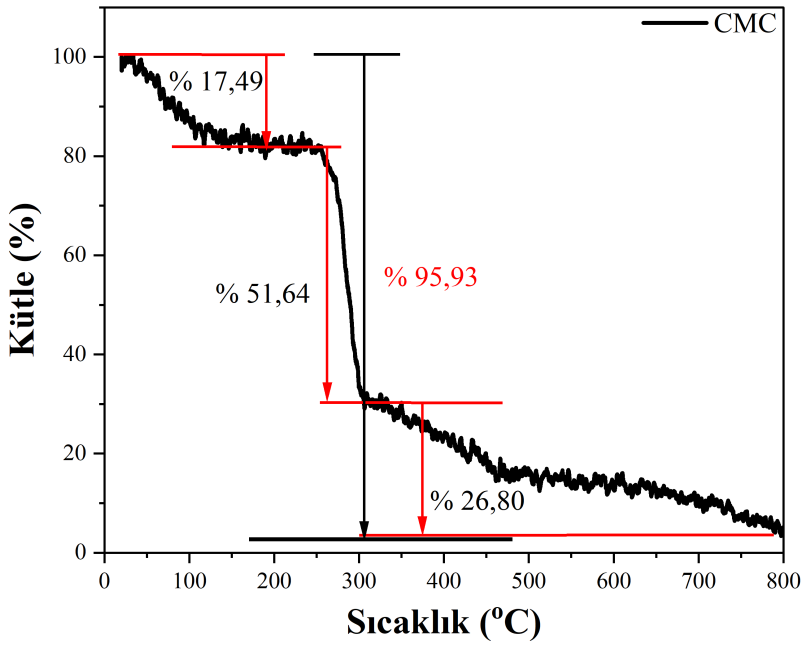
### 4.1.3. TGA Bulgularının Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin termal davranışının belirlenmesi için yapılan diferansiyel termal analiz ve termal gravimetrik analizleri sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.3-4.6'daki grafiklerde sunulmuştur.



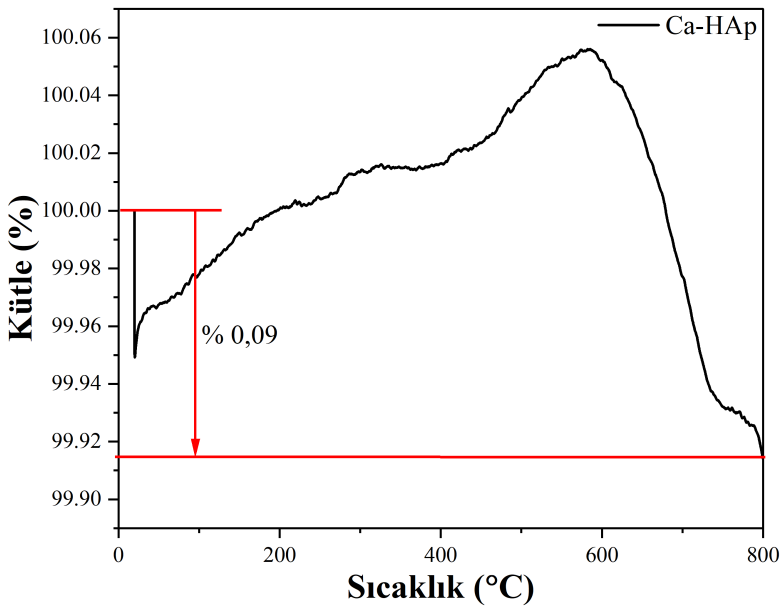

Şekil 4.3. Gliserol'ün TGA termogramı.

Ürünümüzün sentez aşamasında kullanılan gliserolün tek basamakta bozunmaya uğradığı Şekil 4.3'te görülmektedir. Kütle kaybının tamamına yakın kısmının 280˚C'de gerçekleştiği ve geriye kalan minimal kütleden 800˚C sıcaklığa kadar bir miktar daha kayıp meydana geldiği gözlenmiştir. Geliştirilen ürünün sentez, muhafaza, uygulama süreci ve uygulanan dokuya ait fizyolojik nitelikleri dikkate alındığında gliserolün taşıyıcı faz olarak uygun olduğu anlaşılmaktadır.



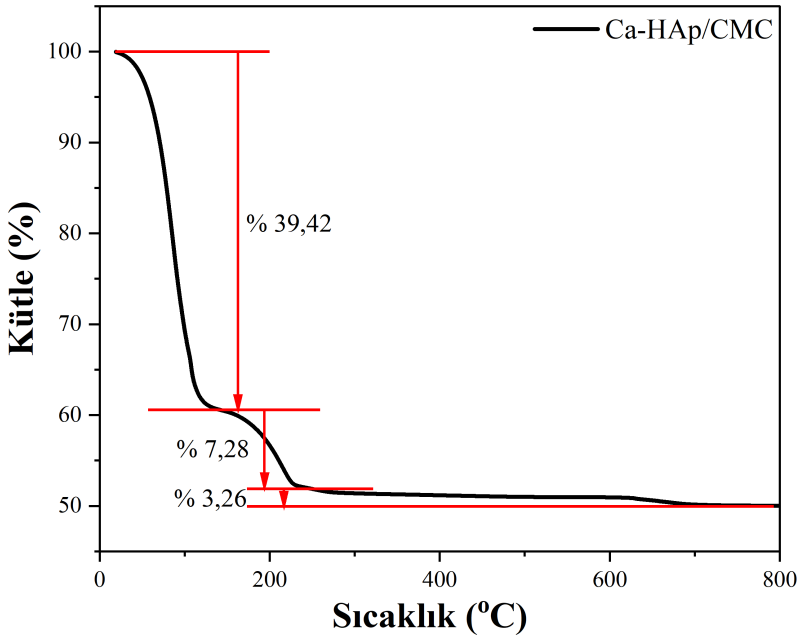

Şekil 4.4. CMC'nin TGA termogramı.

Çalışmada kullanılan taşıyıcı faz bileşenlerinden olan NaCMC'nin bozunma basamaklarının sıcaklık aralıkları Şekil 4.4'teki termogramda gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre NaCMC'nin üç basamakta kütle kaybına uğradığı görülmektedir. Birinci basamakta NaCMC'nin 50°C-120°C sıcaklık aralığında gerçekleşen % 17,49'luk kütle kaybı, CMC yapısında tutulan neme atfedilmektedir [146]. İkinci ve büyük çaptaki bozunmanın 250°C-300°C aralıkta ve % 51,64 kütle kaybıyla gerçekleştiği ve maksimum bozunma sıcaklığının ise 279°C olduğu tespit edilmiştir [147]. Bu basamaktaki asıl kütle kaybının CMC'nin dekarboksilasyonu ile karboksil gruplarından kaynaklanan $CO_2$'in yapıdan ayrılması sonucu gerçekleştiği görülmüştür [148]. Son basamakta meydana gelen % 26,8 oranındaki kütle kaybı, temel yapının bozunmasını müteakiben yapısal suyun buharlaşarak ayrılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [149, 150]. Geliştirilen ürünün sentez, muhafaza, uygulama süreci ve uygulanan dokuya ait fizyolojik nitelikleri dikkate alındığında CMC'nin taşıyıcı faz olarak uygun olduğu anlaşılmaktadır.




Şekil 4.5. Ca-HAp'ın TGA termogramı.

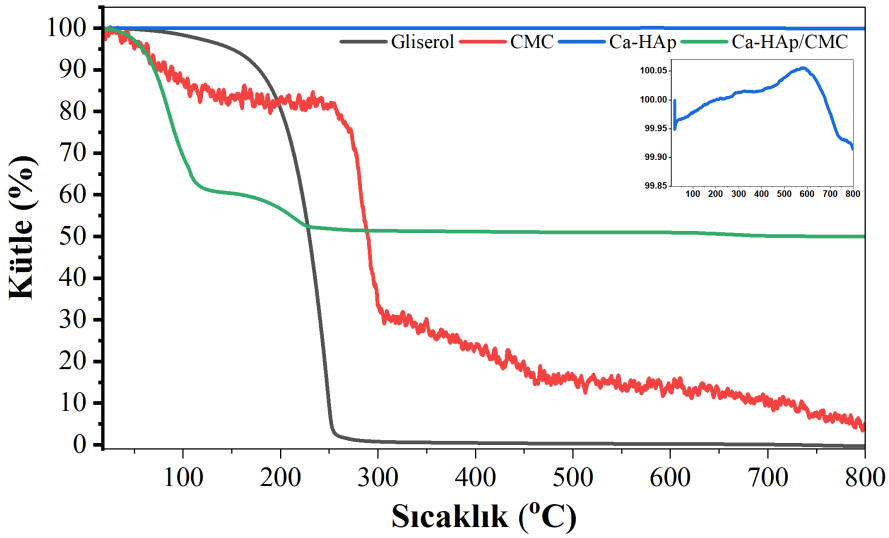
Çalışmada kullanılan Ca-HAp'ın termal stabilitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen analizlerde, Ca-HAp'ın 800°C sıcaklığa kadar bozunmaya uğramadığı, bu sıcaklık altında kimyasal yapısının korunduğu Şekil 4.5'te sunulan termogramda açıkça görülmektedir. Termogramda %0,09 düzeyinde bir kütle kaybı gözlenmişse de, bu kaybın analitik süreçten kaynaklandığı ve ihmal edilebilir nitelikte olduğu değerlendirilmiştir. Literatür incelemelerinde de Ca-HAp'nın 800°C'nin üstündeki sıcaklıklarda bozunmaya başladığı tespit edilmiştir [151]. Bu bağlamda, geliştirilen ürünün sentez, muhafaza, uygulama süreci ve uygulanan dokunun fizyolojik nitelikleri dikkate alındığında, Ca-HAp'in biyoaktif faz olarak fizyolojik açıdan uygun ve fonksiyonel olduğu sonucuna varılmıştır. Ca-HAp'ın termal stabilitesi, biyoaktif özelliklerini koruması açısından önemlidir ve bu durum, malzemenin hem üretim hem de klinik uygulama süreçlerinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.




Şekil 4.6. Ca-HAp/CMC'nin TGA termogramı.

Geliştirilen nihai jel dolgu malzememizin termal bozunma basamakları, sıcaklık aralıkları dikkate alınarak Şekil 4.6'da ayrıntılı olarak sunulmuştur. TGA analizine göre, ürünümüzün üç basamakta kütle kaybına uğradığı gözlemlenmiştir. İlk basamakta (50°C - 150°C) %39,42'lik kütle kaybı meydana gelmiştir; bu kaybın, malzeme örneğindeki nemin buharlaşması ve -Şekil 4.3'teki gliserolün bozunma eğrisi dikkate alındığında- bir miktar gliserolün de bozunmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. İkinci basamakta (150°C-230°C) yapıdaki gliserolün neredeyse tamamının bozunduğu ve bu süreçte NaCMC'nin bozunmasının yaklaşık 200°C'de başladığı gözlenmiş, bu durumun polisakkaritlerden $CO_2$'nin uzaklaşması sonucu %7,28'lik kütle kaybına yol açtığı tespit edilmiştir. Üçüncü basamakta %3,26'lık kütle kaybı gerçekleştiği görülmektedir. Bu basamakta (230°C-700°C) yapıdan $CO_2$ uzaklaşmasının pik yapmasıyla kütle kaybının devam ettiği ve 279°C'de maksimum bozunma sıcaklığına ulaşıldığı gözlenmiştir. CMC'nin karboksil grupları içermesi nedeniyle üçüncü basamaktaki sıcaklık aralığında dekarboksile olduğu görülmüştür. Bu son basamakta bir miktar kütle kaybının da temel yapıdaki suyun buharlaşmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. 800°C'nin üstündeki sıcaklıklarda hidroksiapatitin dehidroksilasyonunun başladığı ve bu durumun literatürde de rapor edildiği [151] bilinmektedir. Bu termal analiz sonuçları, geliştirilen nihai ürünün sentez, muhafaza, uygulama süreci ve uygulanan dokunun fizyolojik nitelikleri dikkate alındığında, jel ogmentasyon malzemesi olarak fizyolojik açıdan uygun ve etkin

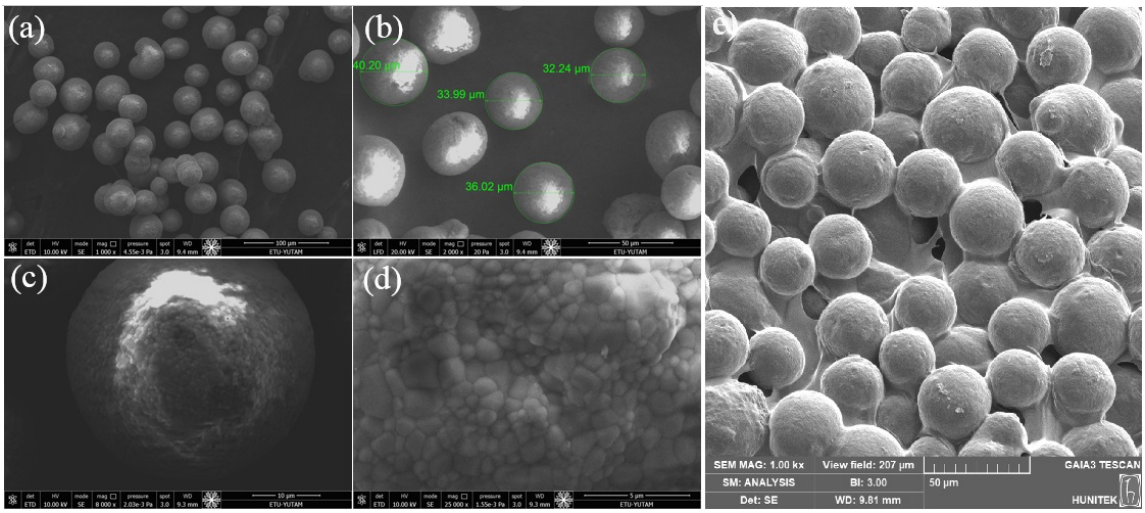
olduğunu göstermektedir. Nihai ürün ve bileşenlerinin TGA termogramları ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7'de sunulmuştur.




Şekil 4.7. Ca-HAp/CMC ve bileşenlerinin TGA termogramları.

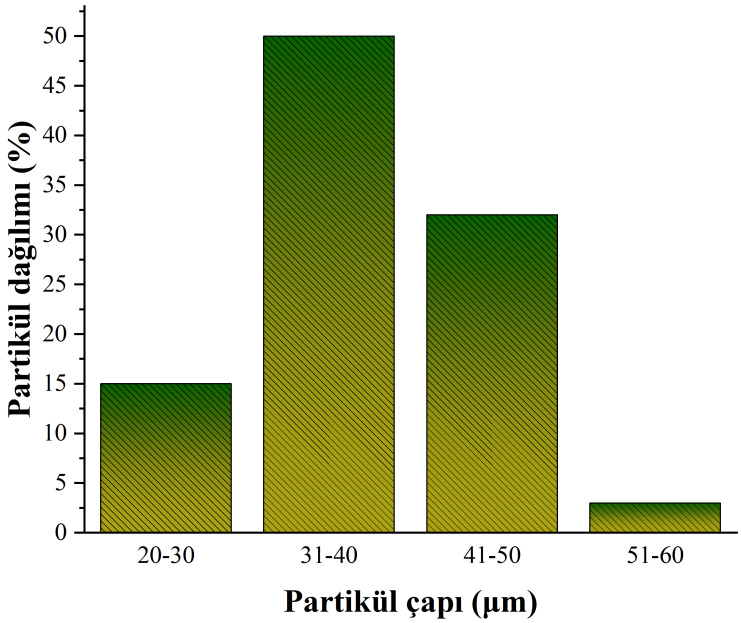
### 4.1.4. SEM Bulgularının Değerlendirilmesi

HAp mikroküreleri nin partikül boyutu ve morfolojisinin dağılımını karakterize etmek ve elemental analizi amacıyla yapılan SEM görüntülemesinde partiküllerin küresel formda oldukları ve homojen dağılım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.8).




Şekil 4.8. Ca-HAp mikroküreleri nin, a) SEM görüntüsü b) Boyut dağılımı c) Tek partikülün görüntüsü d) Yüzeyinin ayrıntılı görüntüsü e) Jelin SEM görüntüsü.

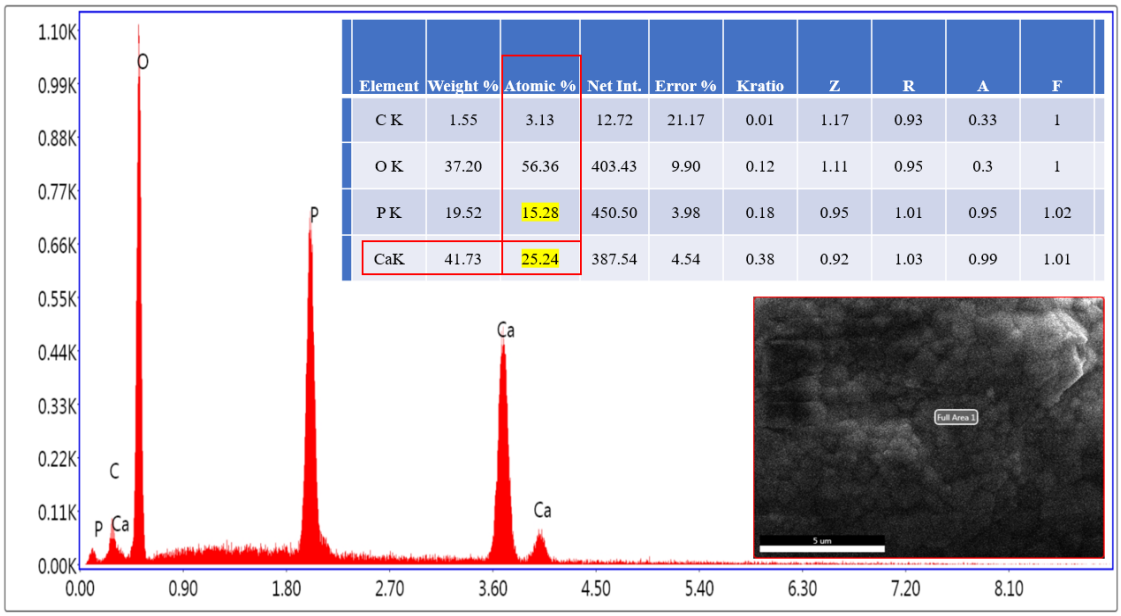
Image J yazılımı kullanılarak belli bir alanda yüzde olarak büyüklüklerine göre sayılan partiküllerin boyut analizi bulguları Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre partikül boyutlarının yaklaşık 20-60 µm oldukları ve önemli bir kısmının (%80'in üzerinde) 30-50 µm boyut aralığında oldukları tespit edilmiştir.




Şekil 4.9. Ca-HAp mikroküre lerinin partikül boyut dağılımı.

HAp partiküllerin yüzeylerinin 2-5 µm boyutlarında por ve girintilere sahip olup implant doku integrasyonu için literatürde belirtilen optimal özellikleri taşıdığı anlaşılmıştır. Polikaprolakton (PCL) mikroküre lerinin dermal dolgu malzemesi olarak kullanıldığı çalışmalarda mikroküre yapıdaki malzemelerin boyut, yüzey özellikleri ve fagosite edilememeleri bağlamında dermal dolgu açısından uygunluğuna vurgu yapılmıştır [152, 153]. Buna ek olarak literatürde, çalışmamızda geliştirilen jel malzemede kullanılan HAp'a dair por ve girintilerle sağlanan geniş yüzey alanının mikroçevre ile etkileşimini arttırdığı da ifade edilmektedir [154].

SEM cihazına entegre elemental analiz için kullanılan aparat yardımıyla rastgele seçilen HAp mikroküre lerinden birinin yüzeyi üzerinden yapılan analizde HAp yapısındaki Ca/P stokiyometrik oranının 1,65 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).




Şekil 4.10. Ca-HAp'ın EDS analizi bulguları.

Literatürde 1,67 olarak tespit edilen Ca/P oranına sahip hidroksiapatitlerin (HAp), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ kimyasal formülünde ve hegzagonal kristal yapıda bulunduğu, biyouyumlu ve biyoaktif özellikler sergilediği, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanıldığı birçok çalışmada rapor edilmiştir [155-157]. Bu çalışmada kullanılan HAp'ın da aynı stokiyometrik oranlara sahip olduğu tespit edilmiş olup, bu durum, geliştirilen ürün bileşenlerinin biyoaktif seramik fazının nihai ürünün etkinliği, biyouyumluluğu ve biyoaktifliği üzerindeki olumlu etkilerine işaret etmektedir. Bu bulgu, ürünün biyomedikal uygulamalarda güvenilir ve etkin bir şekilde kullanılabileceğini desteklemektedir.

### 4.1.5. ICP-MS Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda geliştirilen nihai ürünün ağır metal (Arsenik, Civa, Kadmiyum, Kurşun) düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizlerin sonuçları, ASTM F1185-03 standardı ile kıyaslanarak ürünün güvenlik ve biyouyumluluk açısından uluslararası standartlara uygunluğu değerlendirilmiştir. ICP-MS bulguları Çizelge 4.1'de paylaşılmıştır.

Çizelge 4.1. ASTM F1185-03 standardı ve jel dolgu malzememiz için ağır metallerin[a] eser konsantrasyonları

| **Element (ppm)** | **As** | **Hg** | **Cd** | **Pb** |
|---|---|---|---|---|
| ASTM F1185-03 standardı | <3 | <5 | <5 | <30 |
| Ca-HAp/CMC malzememiz | <0,1 | <0,02 | <0,01 | <0,01 |

[a]As; arsenik, Hg; civa, Cd; kadmiyum, Pb; kurşun

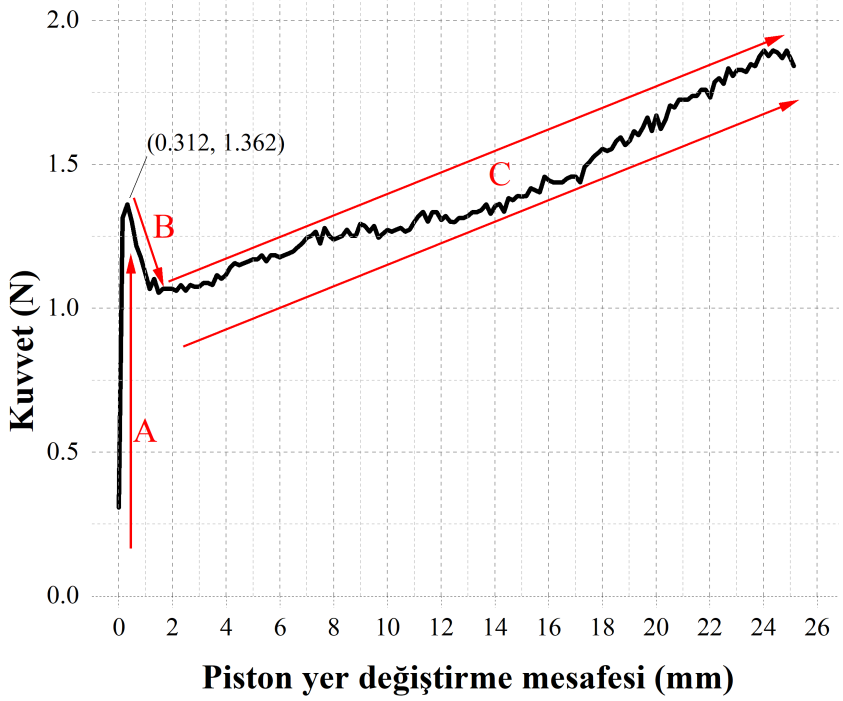
Çizelgedeki elementlerin değerlerinin sayısal olarak net biçimde verilmemiş olması, cihazın tayin sınırlarının altında kalmasından kaynaklı olup malzememiz için herhangi bir ağır metal düzeyi tespit edilememiştir. Bu sonuçla ogmentasyon malzemesinin ağır metal içeriği bakımından toksik etki oluşturacak yapıda olmadığı anlaşılmaktadır. Ortaya çıkan sonuçlar ayrı olarak değerlendirildiğinde ASTM F1185-03 standardının belirlediği elementlerin eser miktarlarının en üst değerleri için bile kabul edilebilir seviyenin Arsenik için 0,033'ü, Kadmiyum için 0,002' si, Civa için 0,004'ü ve Kurşun için 0,00033'ü kadardır. Bu sonuçlar ASTM F1185-03 standardına göre ürünümüzün cerrahi implant olarak kullanılabilmesi açısından standartların çok üzerinde bir güvenlik seviyesi sunduğunu ve süregen kullanımda organizma için herhangi bir risk taşımadığını açıkça ortaya koymaktadır.

### 4.1.6. Enjeksiyon Kuvveti Ölçümleri

Ekstrüzyon kuvveti, klinisyenin yumuşak doku dolgu maddesinin iğneden akmasını sağlamak için uygulaması gereken kuvveti tanımlayan ve klinik uygulamalar açısından büyük öneme sahip bir parametredir. Enjeksiyon sırasında dolgu maddesinin akış kuvvetini etkileyen çeşitli değişkenler arasında, hidroksiapatit partiküllerinin boyutu, bu partiküllerin homojen dağılımı ve taşıyıcı fazın reolojik özellikleri önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızda geliştirilen dolgu maddesinin enjeksiyon sürecini daha iyi anlamak amacıyla, mekanik test analizörü kullanılarak malzemenin havaya enjeksiyonu sırasında gereken kuvvet ölçülmüştür. Bu deney, malzememizin enjeksiyon esnasında karşılaşacağı akış direncini simüle etmek ve malzemenin mekanik özelliklerini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Elde edilen veriler, dolgu maddesinin reolojik davranışını ve enjeksiyon sırasındaki performansını değerlendirmek amacıyla Şekil

4.11’de sunulmuştur. Bu analizle, malzemenin enjeksiyon kolaylığı ve uygulama sürecindeki kontrol edilebilirliği hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.




Şekil 4.11. Şırınga içerisindeki Ca-HAp/CMC jeline uygulanan ekstrüzyon kuvvetine karşın jelin yer değiştirme mesafesi.

Şekil 4.11’de, dolgu maddesinin şırıngadan itilirken karşılaştığı kuvvetin, şırınganın yer değiştirmesine bağlı olarak değişimini gösteren tipik bir ekstrüzyon eğrisi sunulmuştur. Sabit bir hızla şırınganın itilmesi sırasında, kuvvet ile yer değiştirme arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiş olup bu ilişki eğimde "A" olarak etiketlenmiştir ve elastik rejim olarak bilinmektedir. Bu rejim, elastik modül (G') ile orantılıdır; dolayısıyla, daha yüksek G' değerlerine sahip jellerin şırınga üzerinde daha fazla basınç gerektirdiği anlaşılmaktadır.

Eğride "B" olarak işaretlenen tepe noktası, jel malzemenin uygulanan basınç sonucu şırınga ağzından akmaya başladığı kritik noktayı temsil etmektedir. Bu nokta, eğrinin doğrusal karakterinden saparak numunenin plastik deformasyona uğradığı noktadır. Bu aşamada, jel enjeksiyon bölgesine akmaya başlar ve şırıngaya uygulanan kuvvetin düşüş eğilimi gösterdiği görülmektedir.

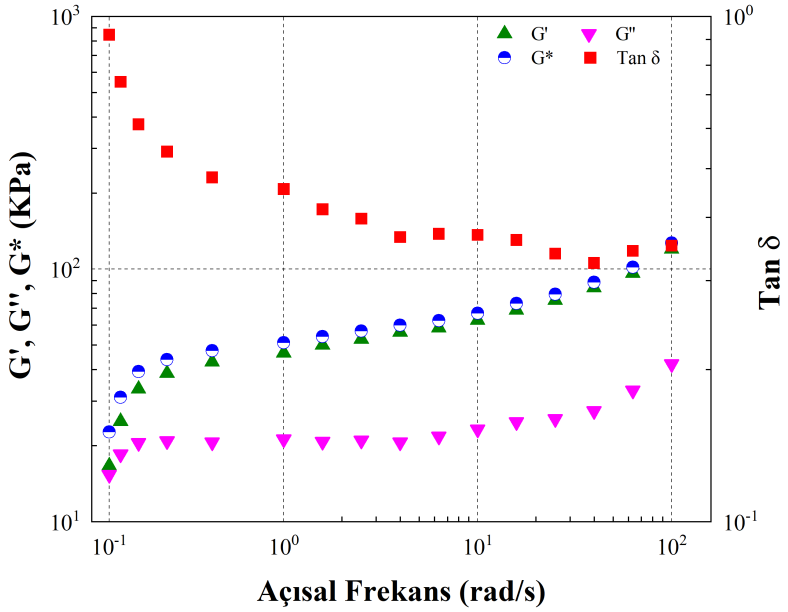
Eğride "C" olarak işaretlenen bölgede ise elastik rejimin viskoz rejimle dengelenmesi sonucu tekrar doğrusal bir ilişki ortaya çıkmıştır. Bu durum, taşıyıcı faz içerisindeki

hidroksiapatit partiküllerinin malzemeye kazandırdığı elastik davranışın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu reolojik davranışın klinik uygulamalardaki etkisi oldukça önemlidir. Klinisyenin enjeksiyon sırasında uyguladığı kuvveti herhangi bir noktada kesmesi durumunda, viskoz rejime tekrar ulaşmak için sürecin baştan tekrarlanması gerekecektir. Bu durum, enjeksiyonun düzgün bir şekilde gerçekleştirilmemesine, malzemenin dokuya eşit olmayan bir şekilde dağılmasına ve sonuç olarak istenen klinik sonucun elde edilememesine yol açabilir. Dolayısıyla, dolgu maddesinin enjeksiyonu sırasında kuvvetin kesintisiz bir şekilde uygulanması hem uygulama kolaylığı hem de klinik etkinlik açısından kritik öneme sahiptir.

CMC/Kolajen özellikli bir dolgu malzemesinin karakterize edildiği bir çalışmada, dolgudaki CMC oranındaki artışın akış kuvvetini azalttığı ve bu durumun viskozite testleriyle uyumlu olarak daha iyi enjekte edilebilirliğe işaret ettiği vurgulanmaktadır [158]. Literatürde ayrıca, bir dolgu malzemesinin kolayca enjekte edilebilmesi için maksimum dışarı atma kuvvetinin 20N'den düşük olması gerektiği belirtilmektedir [159]. Bu veriler bağlamında, çalışmamızda geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin ekstrüzyon kuvvetine ilişkin elde edilen verilerin de enjekte edilebilir bir malzeme için önerilen ekstrüzyon kuvveti aralığı içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, basit bir uygulama ile cerrahi bölgede düzgün bir enjeksiyonun gerçekleştirilmesi için nihai ürün konseptimizin enjekte edilebilir malzeme formu için uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

### 4.1.7. Ca-HAp/CMC’nin Reolojik Özellikleri

Çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jelinin osilasyonlu salınım testine ilişkin bulgular Şekil 4.12’deki görselde paylaşılmıştır. Bu analizle geliştirdiğimiz biyomalzemenin mekanik yetkinlik açısından yumuşak doku uygulamalarına yönelik uygunluğu değerlendirilmiştir.




Şekil 4.12. Ca-HAp/CMC'nin elastik, viskoz, kompleks modül ve tan δ değerleri.

Şekil 4.12'de sunulan verilere göre, açısal frekansın artmasıyla birlikte, yani daha kısa zaman aralıklarında gerçekleşen hızlı salınımlarda, jelin elastik bileşeninin kompleks modüle yaptığı katkının belirgin şekilde arttığı gözlemlenmektedir. Bu bulgu, Ca-HAp/CMC jelinin yerleştirildiği anatomik bölge içinde çeşitli dış kuvvetlere maruz kaldığında deformasyona karşı koruyucu bir özellik sergileyebileceğini işaret etmektedir. Frekansın artmasıyla depolama modülünün kompleks modülüsle paralel bir seyir izlediği görülmüş olup, bu durum malzemenin viskoelastik bir katı davranışı sergilediğini ortaya koymaktadır.

Benzer şekilde düşük frekanslarda ya da geniş zaman aralıklarındaki yavaş salınımlarda malzemenin kompleks modülüsüne viskoz bileşenin katkısının nispeten yüksek frekanslardan fazla olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum, malzemenin düşük frekansta viskoz davranışının belirgin olduğunu, ancak yüksek frekansta elastik özelliklerinin öne çıktığını göstermektedir.

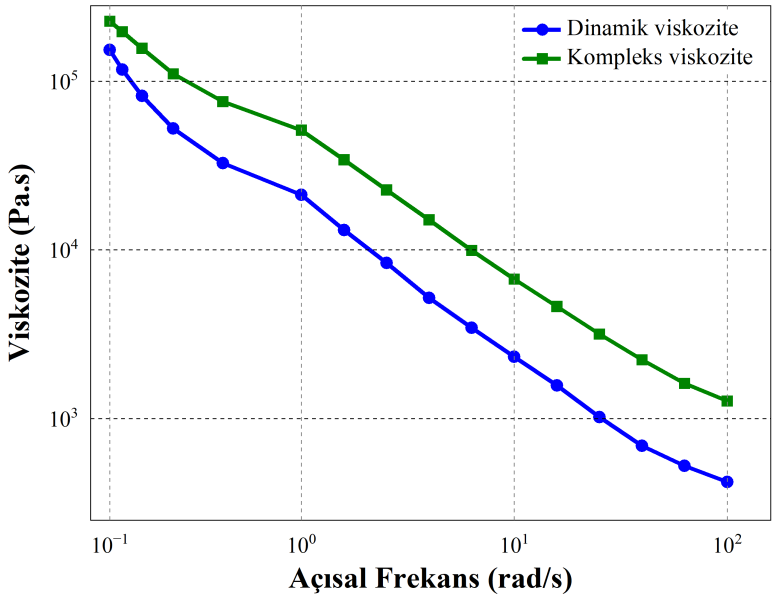
Depolama modülü eğilimleri göz önüne alındığında, Ca-HAp/CMC jelinin frekans arttıkça yapısal bütünlüğünü ve stabilitesini koruyabildiği değerlendirilmektedir. Bu durum Ca-HAp mikroküreleri ve CMC arasında oluşan potansiyel etkileşim ile

ilişkilendirilmektedir. Bu durum malzemenin değişken koşullarda güvenilir bir şekilde işlev görebileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jelinin reolojik özellikleri, malzemenin yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında nasıl performans göstereceğini belirlemek açısından kritik öneme sahiptir. Çoi ve ark. çalışmasında, CMC'nin levan bazlı hidrojellerle kombinasyonunda elastik özelliklerin arttığı ve bunun, polimerler arasındaki güçlü hidrojen bağlarının etkisiyle gerçekleştiği ifade edilmiştir [160]. Benzer şekilde, Samanipour ve ark., dolgu malzemelerinin taşıyıcı fazını oluşturan CMC polimeri katkısındaki artışın nihai ürün formülasyonu viskozitesini düşürdüğünü ortaya koyarak, bu durumun uygun bir akışkan olarak CMC ilavesiyle agregatlaşmış karışıklıkların oluşumunun önlenmesi sayesinde olabileceği değerlendirilmiştir [158]. Bu bulgular, CMC'nin dolgu maddesinin enjekte edilebilirliğini artırarak, enjeksiyon sırasında yumuşak doku kusurlarına daha düzgün yerleştirilmesini sağladığını ve klinik prosedürlerde iyileştirmeler sağladığını ortaya koymaktadır.

Şekil 4.12'de gösterilen veriler, Ca-HAp/CMC jelinin tüm frekans aralıklarında G' değerinin G" değerinden yüksek olduğunu ve bu nedenle kayıp faktörünün ölçülen tüm frekanslarda 1'den düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç, geliştirilen jelin esas olarak elastik bir davranış sergilediğini ve tan δ'nın düşük olmasının, dolgu maddesinin viskoelastik bir katı davranışı gösterdiğini belirtmektedir.

Tan δ değeri 1'e yakın olan dolgu maddeleri yüksek viskozite ve düşük elastikiyete sahipken, daha düşük tan δ değerine sahip malzemeler daha elastik özellikler sergiler. Bu bağlamda, Ca-HAp/CMC jelinin 0.1-100 rad/s frekans aralığında tan δ değerinin 1'den düşük olması, malzemenin düşük kuvvetler altında elastik, jel benzeri bir davranış sergilediğini ve yüksek kuvvetler altında viskoz bir davranış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu özellikler, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin yumuşak doku ogmentasyon uygulamalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini ve istenen klinik sonuçları sağlayabileceğini göstermektedir.
Ca-HAp/CMC jelinin farklı frekanslardaki dinamik ve kompleks viskozite değişimi Şekil 4.13'te paylaşılmıştır.




Şekil 4.13. Ca-HAp/CMC jelinin frekans bağımlı viskozite değişimi.

Çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jelinin reolojik özellikleri, özellikle viskozite değerleri, malzemenin klinik uygulamalarındaki performansını anlamak için kritik öneme sahiptir. Şekil 4.13'te gösterilen veriler, jel malzemenin farklı frekanslardaki dinamik ve kompleks viskozite değişimlerini görselleştirmektedir. Viskozite, jelin enjeksiyon sırasında ve yumuşak doku içine uygulandığında malzemeye uygulanan kesme kuvvetlerine karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. Kesme gerilimi uygulandığında, dolgu maddesinin akışa karşı direnci ve enjekte etmek için gereken kuvvet ortaya çıkmaktadır.

Elde edilen bulgular hem kompleks hem de dinamik viskozitenin frekans arttıkça azaldığını göstermektedir. Bu durum, jel malzemenin düşük frekanslarda yani daha yavaş akış koşullarında yüksek viskozite değerleri sergilediğini ve bu viskozitenin frekans arttıkça düştüğünü ortaya koymaktadır. Bu veri, Ca-HAp/CMC jelinin hafif bir kuvvetle yumuşak dokuya uygulanabileceğini ve bu özelliklerin klinik uygulamalarda hasta konforu, uygulama kolaylığı ve etkinliği açısından önemli katkılar sağlayacağını göstermektedir.

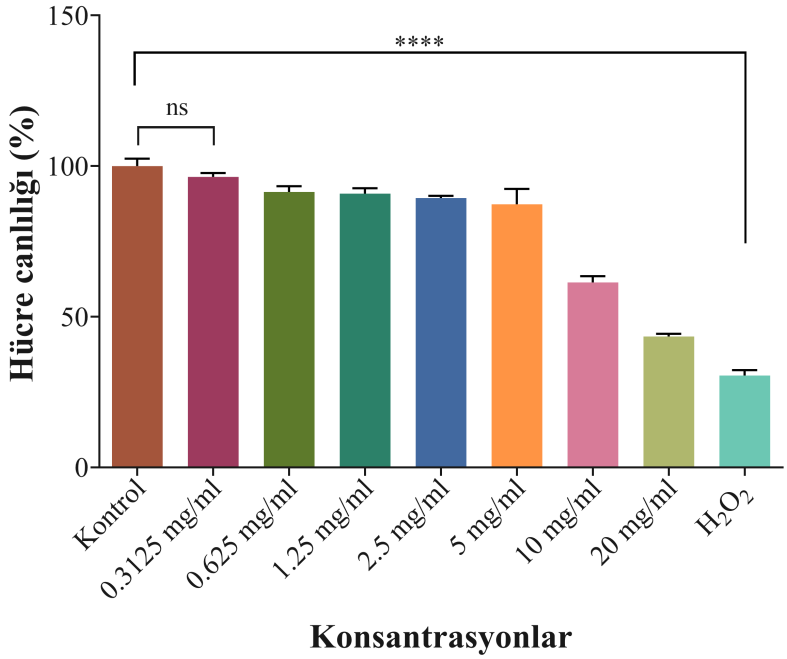
Reolojik özellikler, dolgu maddesinin çevresindeki yumuşak doku ile entegrasyonunu ve anatomik katmanın hacmini değiştirme kapasitesini etkiler. Klinik uygulamalarda istenen nihai sonuçları elde etmek için uygun özelliklere sahip dolgu maddesinin seçilmesi

önemlidir [161]. Dolgu maddesi seçimi, enjekte edilen bölgenin anatomisi, doku kıvamı, doku kalınlığı, tutucu alanların sıkılaştırılması, mimetik kas aktivitesinin yoğunluğu ve uygulamanın yapılacağı bölgeye etki eden dış kuvvetler gibi birçok değişkene bağlıdır. Her anatomik bölgedeki bu değişkenler farklılık göstermektedir ve dolgu maddesi seçiminde tüm bu faktörlerin dikkate alınarak yapılacak doğru bir değerlendirme önem arz etmektedir [162].

## 4.2. Ca-HAp/CMC'nin İDF Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi

Hazırlanan Ca-HAp/CMC jel formülasyonlarının sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, insan deri fibroblast (İDF) hücre hatları kullanılmıştır. Ca-HAp/CMC'nin 0-20 mg/mL konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyonunun, 48 saat süreyle İDF hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, 0-10 mg/ml aralığındaki Ca-HAp/CMC konsantrasyonlarıyla muamele edilen İDF hücrelerinin canlılık oranları, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermemiştir. 0.3125 mg/mL konsantrasyonunda hücre canlılığı %96.44, 0.625 mg/mL'de %91.40, 1.25 mg/mL'de %90.89, 2.5 mg/mL'de %89.38, 5 mg/mL'de %87.34 ve 10 mg/mL'de %61.38 olarak ölçülmüştür. Bu bulgular, düşük konsantrasyonlarda Ca-HAp/CMC'nin hücre sağlığı üzerinde belirgin bir toksik etki oluşturmadığını ve bu nedenle bu aralığın güvenli bir uygulama aralığı olduğunu ortaya koymaktadır.

Öte yandan, 20 mg/mL konsantrasyonundaki Ca-HAp/CMC'nin, 48 saatlik muamele süresi boyunca İDF hücrelerinin canlılığını %43,42 oranında önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyonların sitotoksik etkilerini göstermekle birlikte, düşük konsantrasyon aralıklarında gözlenen etkilerden belirgin bir farklılık arz etmektedir. Ayrıca, hesaplanan %50 inhibitör konsantrasyon (IC50) değeri 18,93 mg/mL olarak belirlenmiştir.



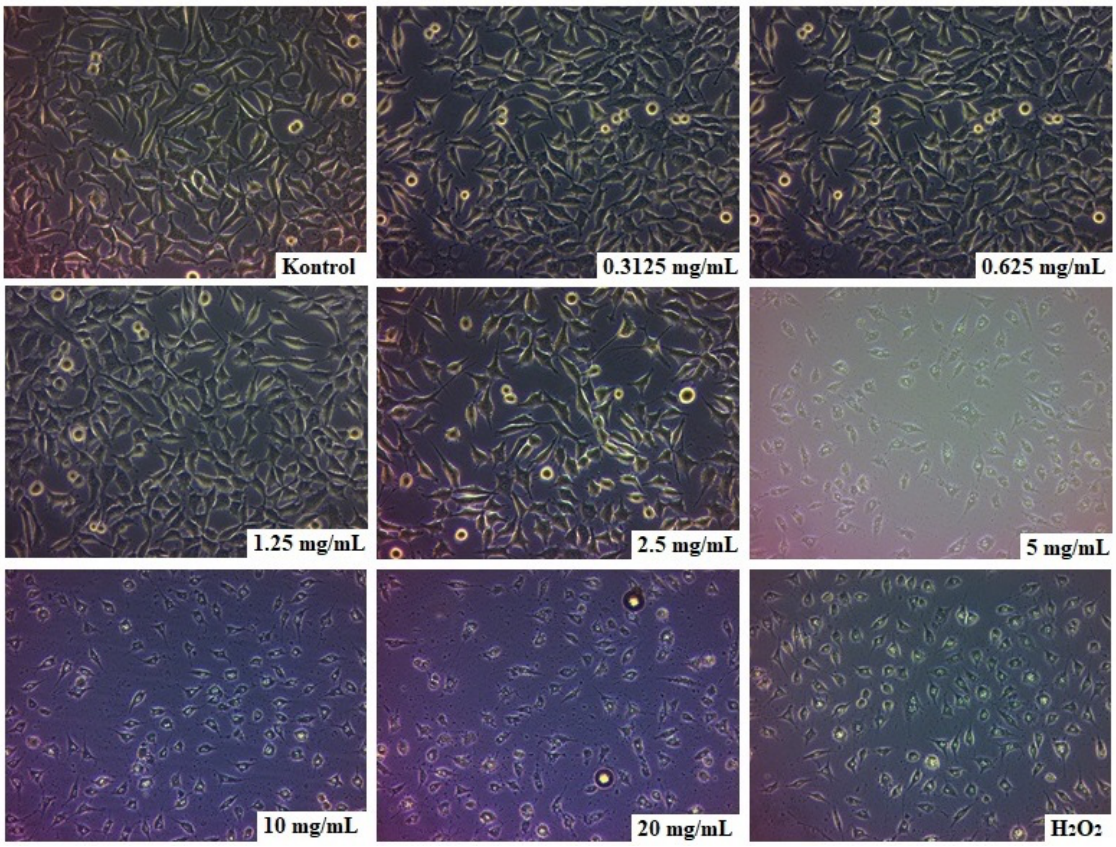

Şekil 4.14. 48 saat boyunca Ca-HAp/CMC muamelesinin İDF hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

Sonuçlar, herhangi bir madde kullanılmamış olan kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı yüzdeleri olarak sunulmuştur. Hata çubukları, tekrarlanan üç deneyin ortalamasının standart hatasına karşılık gelmektedir. ns; istatiksel olarak farksız ve ****; $p < 0,0001$ Tukey'in çoklu aralık testleri ile kontrol ve çalışılan diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Karşılaştırma amacıyla, aynı hücre hattında 48 saat boyunca 300 µM $H_2O_2$ ile yapılan muamelenin hücre canlılığını %30.47 oranında azalttığı dikkati çekmiştir. Bu veriler, düşük konsantrasyonlarda Ca-HAp/CMC'nin hücreler üzerinde toksik etkiler oluşturmadığını ve dolayısıyla bu aralıktaki formülasyonların güvenli bir şekilde kullanılabileceğini desteklemektedir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisite belirtilerinin göz önünde bulundurulması gerektiği ve bu konsantrasyonlar için daha detaylı analizlerin yapılması gerektiği sonucuna varılmaktadır.

Ca-HAp/CMC'nin 0-20 mg/mL konsantrasyon aralığında 48 saat süreyle İDF hücreleri üzerine uygulanması sonucu elde edilen optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'te sunulmuştur. Elde edilen görüntüler, Ca-HAp/CMC dozu arttıkça İDF hücrelerinin morfolojilerinin değiştiğini ve giderek yuvarlaklaştığını göstermektedir. Ayrıca doz

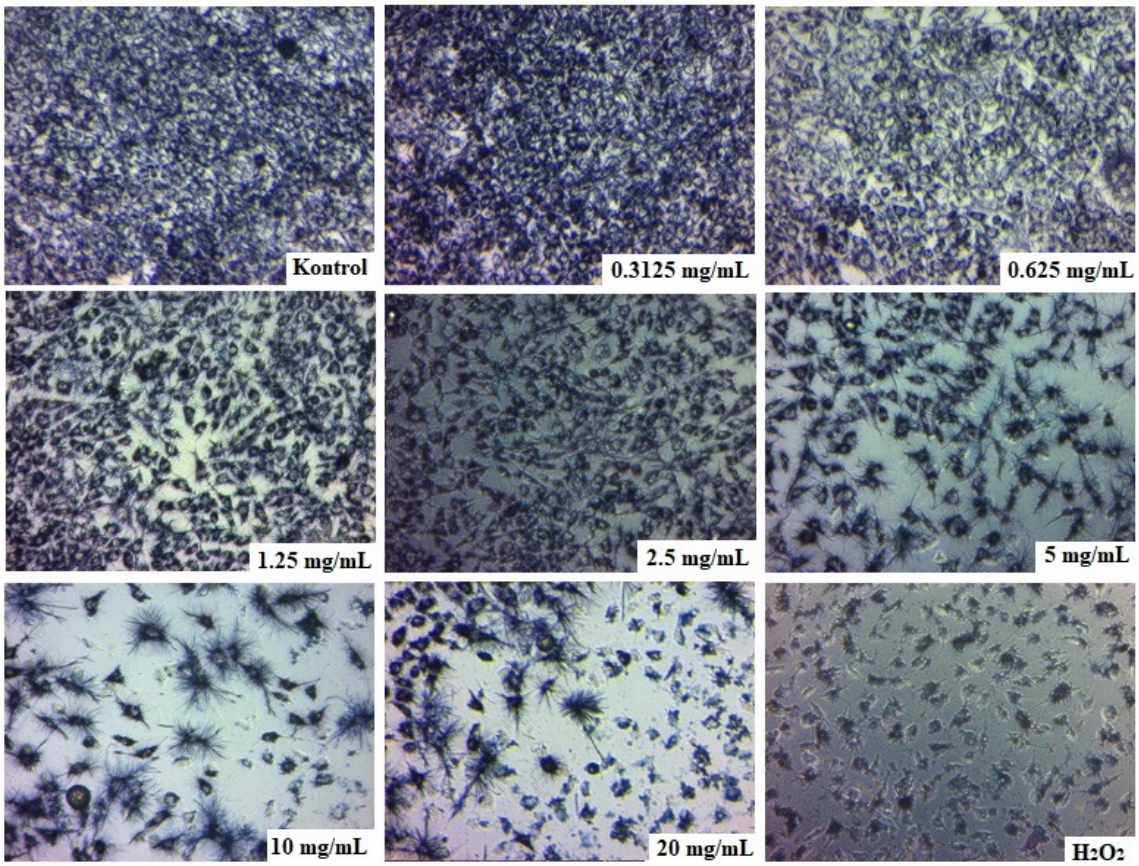
arttıkça hücrelerin yapışkanlığının azaldığı ve küme halindeki sıkı İDF popülasyonunun seyrekleştiği dikkati çekmektedir.




Şekil 4.15. İDF üzerine Ca-HAp/CMC uygulama sonrası optik mikroskop görüntüleri.

48 saat süreyle Ca-HAp/CMC'nin 0-20 mg/mL konsantrasyon aralığında İDF hücreleri üzerine uygulanmasının MTT boyamasını müteakiben alınan mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Elde edilen görüntülere göre İDF hücrelerinin canlılığındaki azalmaya bağlı olarak mitokondriyal aktivitede azalma nedeniyle oluşan formazan kristallerin sayısında da azalma olduğu tespit edilmiştir. Oluşan renk yoğunluğunun da artan Ca-HAp/CMC dozuna bağlı olarak azaldığı saptanmıştır.

Bu sonuçlar, Ca-HAp/CMC jelinin düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığına önemli bir etkide bulunmadığını ancak yüksek konsantrasyonlarda mitokondriyal aktiviteyi azaltarak hücre canlılığını düşürdüğünü ortaya koymaktadır. Bu veriler, Ca-HAp/CMC'nin belirli konsantrasyonlarda sitotoksik etkiler gösterebileceğini ve dolayısıyla uygulama konsantrasyonlarının dikkatli bir şekilde belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.




Şekil 4.16. İDF üzerine Ca-HAp/CMC uygulamasının MTT boyama sonrası görüntüleri.

Bu çalışmada, Ca-HAp/CMC geniş konsantrasyon aralığında sağlıklı İDF üzerindeki etkilerinin tespitinin güvenilir şekilde ortaya konması amacıyla MTT analizi ile test edilmiştir. MTT testiyle ulaşılan sonuçlara göre; en yüksek konstrasyondaki (20 mg/ml) Ca-HAp/CMC dozunun, sağlıklı İDF hücrelerinin canlılığını, %50 oranında azaltmaya başlattığı ortaya konmuştur. Tespit edilen veriler ışığında 48 saat boyunca 10 mg/ml'ye kadar olan tüm konsantrasyonların uygulandığı sağlıklı hücrelerin en umut verici canlılık profiline sahip oldukları gözlenmiştir. MTT analizi ile geliştirilen Ca-HAp/CMC dolgu ürününün biyouyumlu olduğu ve $IC_{50}$ değeri baz alınarak belirlenecek optimal dozlarda uygulamanın İDF hücre canlılığı üzerinde toksik etki oluşturmayacağı görülmektedir (Şekil 4.14). Örneklerimizin uygun dozlarda sitotoksisite belirtisi göstermemesi yumuşak dokulardaki potansiyel uygulamalar için uygun olabileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuçların önceki araştırmalarla uyumlu olması dikkat çekicidir [14]. Basu ve ark. poli etilen oksit ve CMC'den oluşan elektrospun biyomühendislik ürünü yumuşak doku ikamesinin biyouyumluluğunu rapor etmişlerdir [163]. Bu veri ile birlikte MTT analizi sonuçlarımız dikkate alındığında, geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC ogmentasyon

formülasyonunun hücrelerin büyümesi ve çoğalması için uygun bir ortam oluşturmada başarılı olabileceği sonucuna varılmıştır.

### 4.3. Ca-HAp/CMC'nin Sıçan Derisi Üzerindeki Histolojik Değişiklikleri

Çalışmamızda geliştirdiğimiz jel dolgu malzemesinin canlı dokudaki uygulamasını simüle etmek amacıyla *in vivo* deney modeli oluşturulmuştur. Malzememizin uygulandığı sıçanlardan, uygulama bölgesinden 30, 45, 60, 90 ve 120. günlerde doku örnekleri alınarak hazırlanan preparatlar üzerinden histolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Histolojik analizler üzerinden 30, 45, 60, 90 ve 120. gün örneklerinde kolajen-elastik fiber yoğunlukları, fibroblast sayısı ve epidermis-dermis kalınlıkları değerlendirilmiştir. Bu histolojik değerlendirmelere ilişkin 30, 45, 60, 90 ve 120. gün verileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.17-4.35'te sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda kolajen ve fibroblast yoğunlukları, epidermis ve dermis kalınlıkları ve elastik fiber yoğunluklarının değerlendirilmesi

| | | 30. gün | 45. gün | 60. gün | 90. gün | 120. gün |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kolajen yoğunluğu | Kontrol | 44,15±0,6 | 45,50±0,5 | 46,06±0,4 | 46,84±0,2 | 47,42±1,2 |
| | Crystalys | 48,82±0,8 | 51,02±1,0 | 53,67±0,6 | 55,33±1,6 | 59,68±0,7 |
| | Ca-HAp/CMC | 46,44±0,9 | 52,03±0,9 | 54,33±1,0 | 59,17±1,1 | 60,19±1,9 |
| Fibroblast yoğunluğu | Kontrol | 28,67±1,1 | 32,20±3,0 | 34,67±1,3 | 37,67±1,5 | 38,67±1,5 |
| | Crystalys | 37,00±1,0 | 36,67±1,6 | 46,67±2,5 | 56,04±1,0 | 60,13±1,2 |
| | Ca-HAp/CMC | 32,67±0,5 | 41,33±2,0 | 48,67±1,5 | 55,17±1,3 | 61,67±1,6 |
| Epidermis kalınlığı | Kontrol | 14,37±1,8 | 15,46±1,9 | 15,30±3,3 | 17,00±2,7 | 17,26±2,0 |
| | Crystalys | 15,40±2,4 | 16,39±2,1 | 16,74±1,5 | 18,73±2,3 | 17,18±1,7 |
| | Ca-HAp/CMC | 18,13±2,9 | 17,94±1,2 | 16,20±3,7 | 18,57±1,1 | 19,13±2,4 |
| Dermis kalınlığı | Kontrol | 235,02±1,9 | 238,57±1,3 | 238,93±1,1 | 237,31±5,2 | 240,95±7,6 |
| | Crystalys | 238,57±1,3 | 248,03±1,7 | 247,96±2,4 | 256,35±2,0 | 260,78±4,0 |
| | Ca-HAp/CMC | 237,33±2,2 | 248,51±1,4 | 246,83±3,2 | 257,53±2,9 | 258,44±3,5 |
| Elastik Fiber yoğunluğu | Kontrol | 7,43±0,6 | 8,0±0,1 | 8,63±0,5 | 9,67±0,4 | 10,23±0,3 |
| | Crystalys | 9,73±0,8 | 10,37±0,9 | 14,07±0,6 | 16,10±1,1 | 18,73±0,8 |
| | Ca-HAp/CMC | 7,63±1,1 | 10,93±0,6 | 14,43±0,5 | 15,63±0,3 | 19,87±1,2 |

Tabloda verilen değerler her gruptaki sıçanların tüm preparatlarının beş ayrı mikroskobik görüntüleme alanından yapılan ölçümlerle elde edilmiştir.

### 4.3.1. Sıçan Derisinde Gomori's Trikrom boyamasının Değerlendirilmesi

Sıçanlardan belirlenen periyotlarda alınan doku kesitlerinin Trikrom boyaması ile hazırlanmış preparatların incelenmesiyle kolajen ve fibroblast yoğunluklarındaki değişim belirlenmiştir. Örnekleme periyotları olan 30, 45, 60, 90 ve 120 günlük gruplara ait kolajen ve fibroblast yoğunluklarına ilişkin değerlendirme aşağıda sunulmuştur. Veriler Çizelge 4.3'te karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve Kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda kolajen ve fibroblast yoğunluklarının değerlendirilmesi

| | | 30. gün | 45. gün | 60. gün | 90. gün | 120. gün |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kolajen yoğunluğu | Kontrol | 44,15±0,6 | 45,50±0,5 | 46,06±0,4 | 46,84±0,2 | 47,42±1,2 |
| | Crystalys | 48,82±0,8 | 51,02±1,0 | 53,67±0,6 | 55,33±1,6 | 59,68±0,7 |
| | Ca-HAp/CMC | 46,44±0,9 | 52,03±0,9 | 54,33±1,0 | 59,17±1,1 | 60,19±1,9 |
| Fibroblast yoğunluğu | Kontrol | 28,67±1,1 | 32,20±3,0 | 34,67±1,3 | 37,67±1,5 | 38,67±1,5 |
| | Crystalys | 37,00±1,0 | 36,67±1,6 | 46,67±2,5 | 56,04±1,0 | 60,13±1,2 |
| | Ca-HAp/CMC | 32,67±0,5 | 41,33±2,0 | 48,67±1,5 | 55,17±1,3 | 61,67±1,6 |

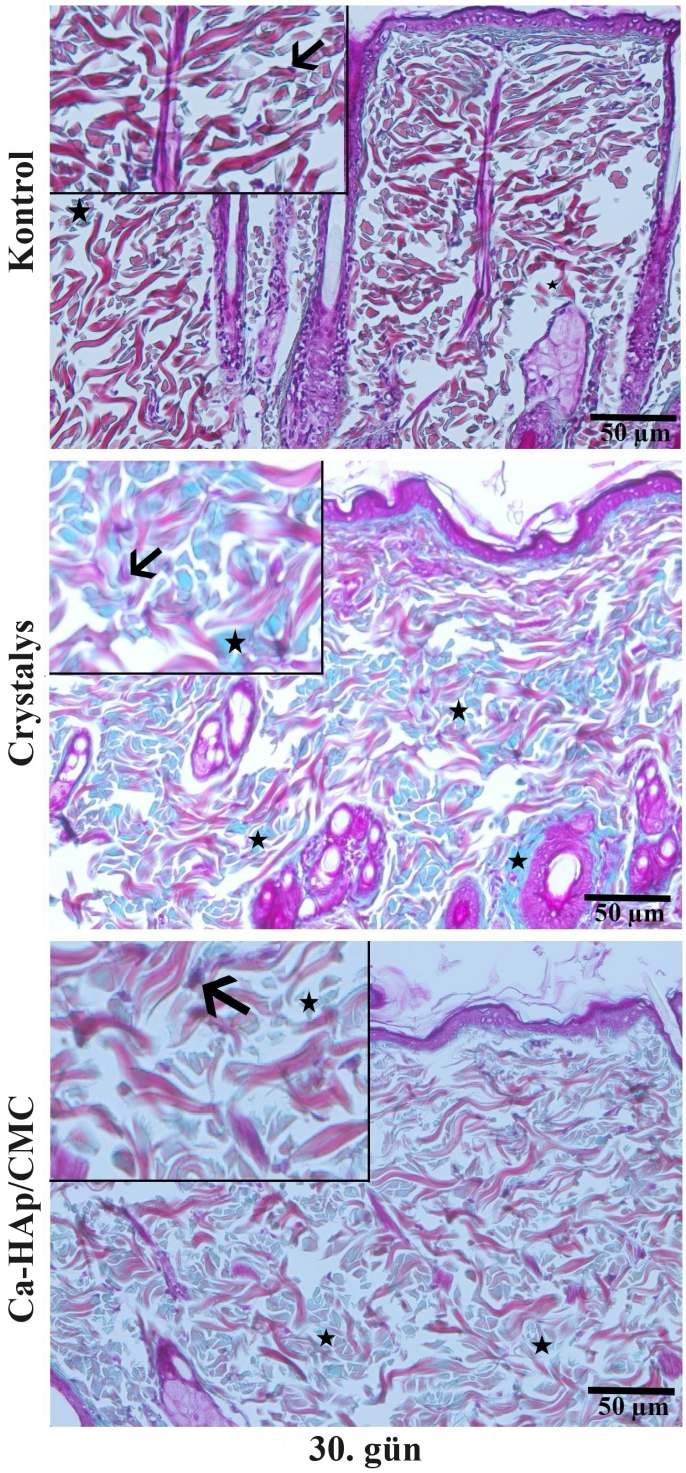
Tabloda verilen değerler her gruptaki sıçanların tüm preparatlarının beş ayrı mikroskobik görüntüleme alanından yapılan ölçümlerle elde edilmiştir.

**30. gün gruplarında kolajen ve fibroblast yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

Trikrom boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen deri dokusu örneklerindeki kolajen yoğunluğunun Crystalys grubunda Kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgu, Crystalys'in dermal dokuda kolajen sentezini hızlı bir şekilde tetiklediğini ve bu süreçte doku yenilenmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ca-HAp/CMC grubunda da buna benzer olarak kolajen yoğunluğunun Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu, ancak bunun Crystalys grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$), bu da Ca-HAp/CMC jel dolgu malzemesinin kolajen üretimini artırmada başlangıçta Crystalys kadar etkili olmadığını, ancak yine de önemli bir biyolojik aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Fibroblast yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığı, diğer yandan Ca-HAp/CMC grubunda Crystalys grubundan daha az oranda artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu fark, Ca-HAp/CMC malzemesinin erken dönemde fibroblast aktivitesini artırmada Crystalys'e kıyasla daha sınırlı bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

30. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan Trikrom boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.17'de paylaşılmıştır.




Şekil 4.17. 30. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x.

Kolajen lif (yıldız), fibroblast/fibrosit nükleusu (ok), kolajen yoğunluğu karışılaştırması (Crystalys>Ca-HAp/CMC>Kontrol), fibroblast yoğunluğu karşılaştırması (Crystalys>Ca-HAp/CMC>Kontrol)

**45. Gün gruplarında kolajen ve fibroblast yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

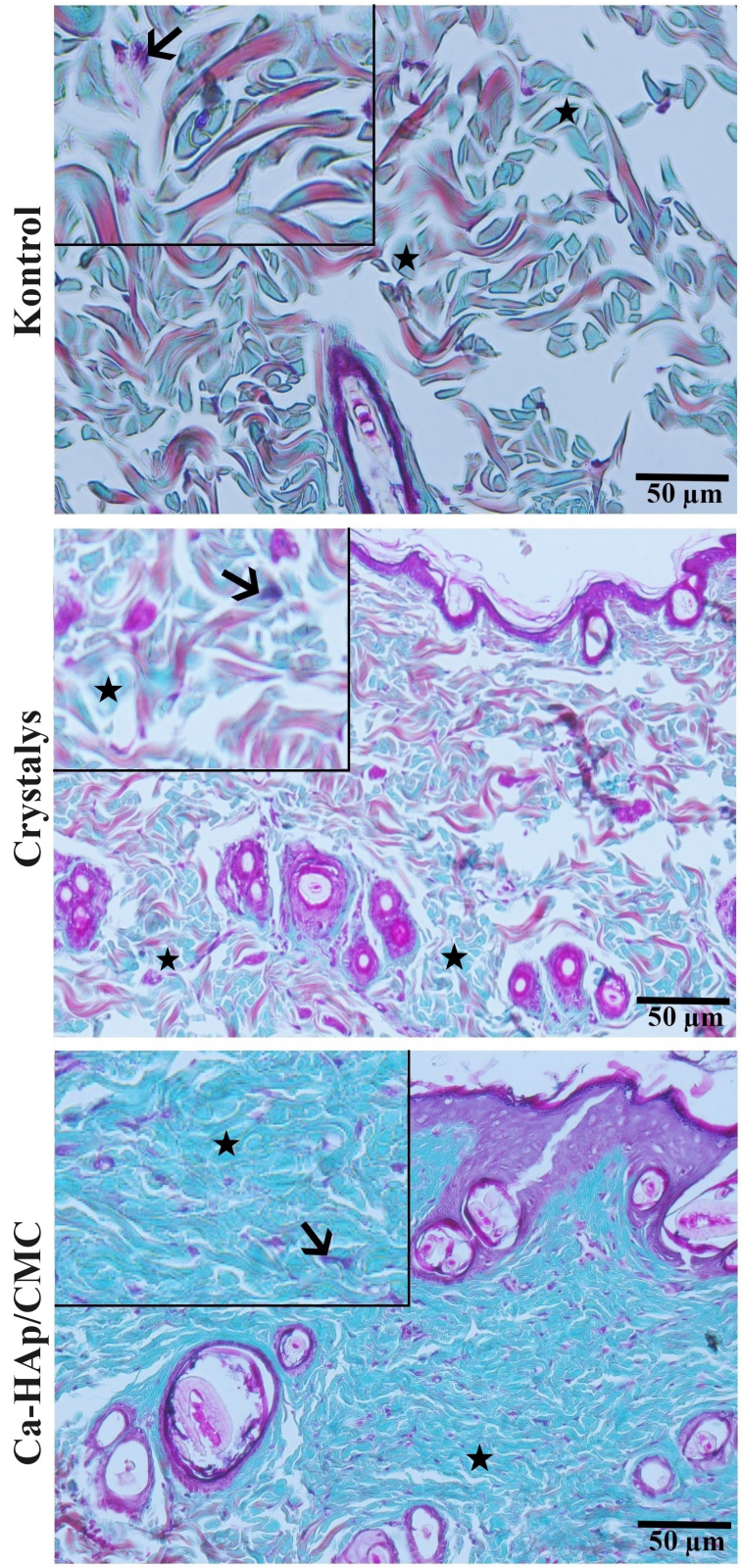
Trikrom boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen dokulardaki kolajen yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Kolajen yoğunluğu açısından Ca-HAp/CMC grubu ile Crystalys grubu karşılaştırıldığında çalışmamızda geliştirilen malzemenin kullanıldığı Ca-HAp/CMC grubunda kolajen yoğunluğunun Crystalys grubundan daha yüksek olduğu ancak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Diğer yandan fibroblast yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı oranda yüksek olduğu ancak Crystalys grubundaki artışın görece düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçla uyumlu olarak Ca-HAp/CMC grubundaki fibroblast yoğunluk artışının Crystalys grubuna göre anlamlı oranda fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu veri, kolajen yoğunluğu verisi ile uyumlu olduğu değerlendirilmekle birlikte Crystalys'in kolajen üretimini tetikleme potansiyelinin görece daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu durum Crystalys içerisindeki HAp miktarının geliştirdiğimiz malzemenin HAp içeriğinden daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC malzemesinin daha düşük HAp içeriğine rağmen fibroblast proliferasyonunu daha yüksek düzeyde teşvik etmesi, malzememizin doku rejenerasyonu üzerindeki potansiyelini ve etkinliğini göstermektedir.

Bu veriler, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin, fibroblast aktivasyonunu ve buna bağlı olarak kolajen sentezini destekleme noktasında etkili bir seçenek olduğunu ve klinik uygulamalarda Crystalys'e kıyasla rekabetçi bir alternatif olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, fibroblast aktivasyonunun daha yoğun olması, Ca-HAp/CMC'nin uzun vadede doku yenilenmesi ve cilt elastikiyeti üzerinde olumlu etkiler yaratabileceğini göstermektedir.

45. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan Trikrom boyamasına ait örnek preparatlar, yukarıda sunulan bulguların mikroskobik doğrulaması olarak Şekil 4.18'de sunulmuştur.




Şekil 4.18. 45. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. Fibroblast/fibrosit nükleusu (ok), kolajen (yıldız), kolajen yoğunluğu karşılaştırması (Ca-HAp/CMC≥Crystalys>Kontrol), fibroblast yoğunluğu karşılaştırması (Ca-HAp/CMC>Crystalys>Kontrol)

**60. Gün gruplarında kolajen ve fibroblast yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

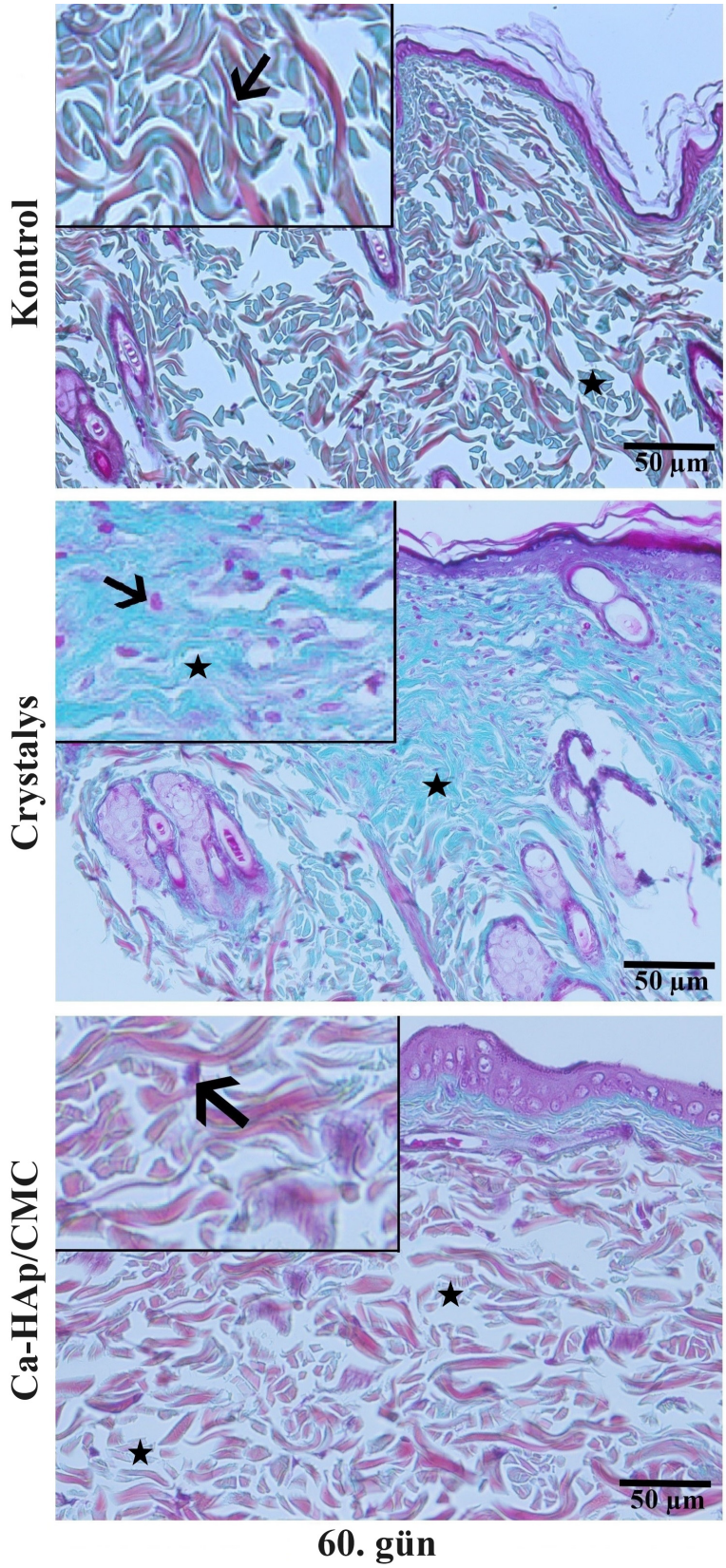
Trikrom boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen doku örneklerindeki kolajen yoğunluğu açısından Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında 60. günde anlamlı düzeyde bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), her iki grupta da kontrole göre anlamlı artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu sonuç, her iki dolgu malzemesinin de dermal dokularda kolajen sentezini teşvik ettiğini ve dokunun yapısal bütünlüğünü güçlendirdiğini göstermektedir.

Fibroblast yoğunluğunun, Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığı gözlenmekle ($p<0.05$) birlikte kendi aralarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). Bu durum, her iki dolgu malzemesinin de fibroblast proliferasyonunu ve aktivasyonunu desteklediğini ve bu hücrelerin dermal doku yenilenmesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Fibroblast ve kolajen yoğunluğu verilerinin 60. gün karşılaştırmasında, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmaması, özellikle 45. gün verileriyle karşılaştırıldığında, çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jel malzemenin Crystalys'e göre daha uzun süreçte etkinliğini gösterdiği kanaatini güçlendirmektedir. 45. günde gözlemlenen fibroblast yoğunluğundaki artışın, 60. güne gelindiğinde stabil hale gelmesi, Ca-HAp/CMC malzemesinin dermal dokularda daha uzun vadede etkin bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Bu bulgular, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin fibroblast aktivasyonunu ve buna bağlı olarak kolajen sentezini sürdürülebilir bir şekilde desteklediğini ve uzun vadede Crystalys ile benzer etkinlikte olduğunu göstermektedir. Özellikle yaşlanma karşıtı tedaviler ve dermal doku rejenerasyonu uygulamalarında, Ca-HAp/CMC malzemesinin uzun vadede stabil bir etki sunabileceği ve klinik uygulamalarda etkili bir alternatif olabileceği değerlendirilmektedir.

60. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan Trikrom boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.19'da sunulmuştur. Hazırlanan preparatlar, kolajen ve fibroblast yoğunluğundaki artışın görsel olarak da desteklendiğini ve elde edilen verilerin dermal dolgu malzemelerinin klinik etkinliği açısından anlamlı çıkarımlar sağladığını göstermektedir.




Şekil 4.19. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. Fibroblast/fibrosit nükleusu (ok), kolajen (yıldız), kolajen yoğunluğu karışılaştırması (Crystalys≥Ca-HAp/CMC>Kontrol), fibroblast yoğunluğu karşılaştırması (Ca-HAp/CMC≥Crystalys>Kontrol)

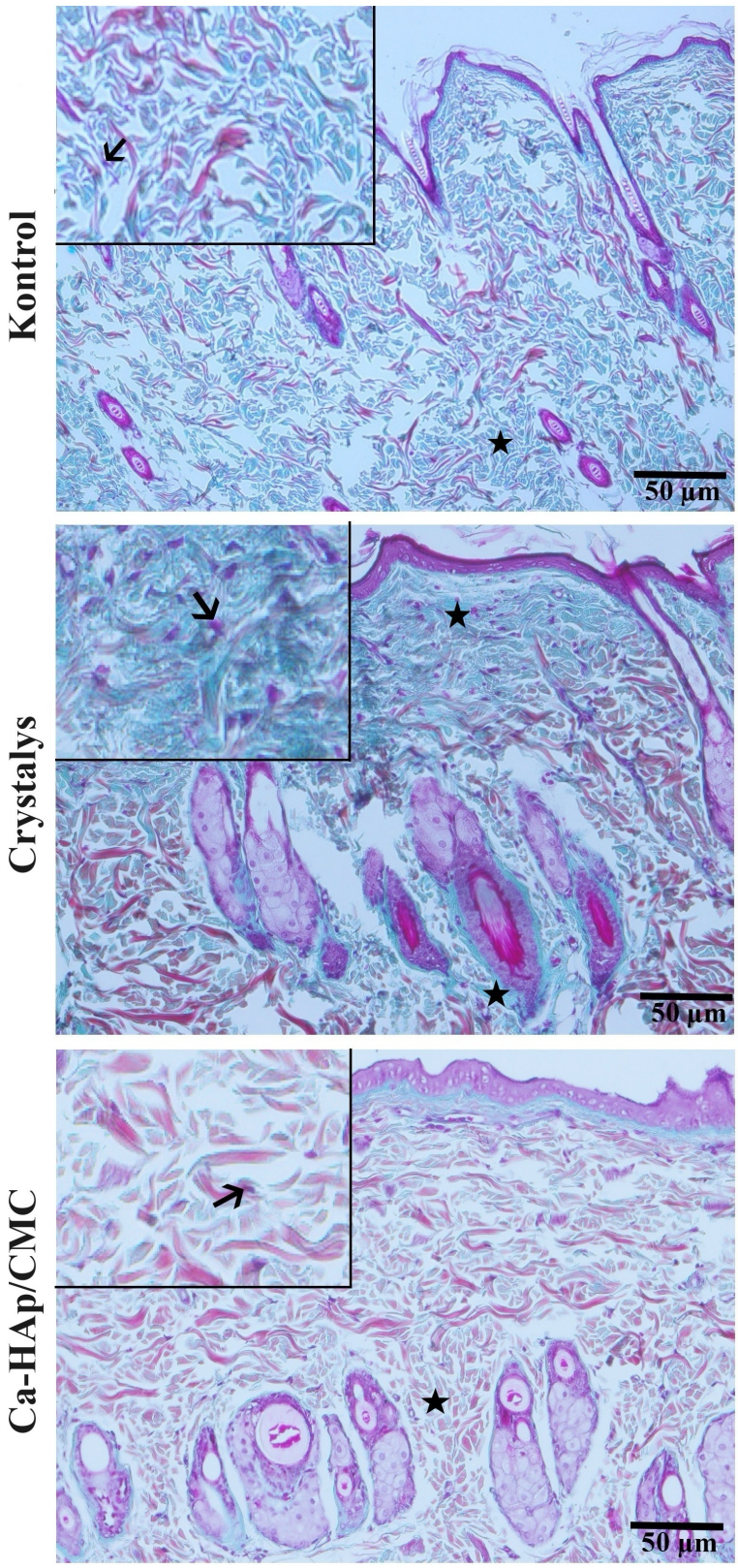
**90. gün gruplarında kolajen ve fibroblast yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

Trikrom boyaması sonuçlarına göre 90. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin kolajen yoğunluğu açısından yapılan değerlendirmesinde, Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek kolajen birikimi saptanmıştır ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin de dermal dokularda kolajen sentezini güçlü bir şekilde teşvik ettiğini ve bu süreçte dokunun yapısal bütünlüğünü ve elastikiyetini artırdığını göstermektedir. İlginç bir şekilde, Ca-HAp/CMC grubunda ölçülen kolajen yoğunluğunun, kantitatif açıdan Crystalys grubuna yakın olmasına rağmen, hem Kontrol hem de Crystalys grubundan anlamlı derecede daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum, çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jel dolgu malzemesinin kolajen üretimi üzerindeki etkisinin, uzun vadede Crystalys'e kıyasla daha güçlü olabileceğini düşündürmektedir.

Fibroblast yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, ancak bu yoğunluk Crystalys grubunda Ca-HAp/CMC grubuna göre hafif yüksek düzeyde olmakla birlikte aralarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlar, Crystalys ve Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin fibroblast proliferasyonu ve aktivasyonu açısından benzer etkiler gösterdiğini ve dolayısıyla dermal dokuların rejenerasyonunda her iki malzemenin de etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Yukarıda sunulan veriler 60. gün bulguları ile karşılaştırıldığında benzer özellik gösterdiği anlaşılmakla birlikte Crystalys ve Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin uygulamadan sonraki kronik süreçte fibroblast ve kolajen yoğunluğu açısından benzer etkiler gösterdiğini ancak kolajen yoğunluğu açısından Ca-HAp/CMC'nin Crystalys'e göre daha üstün bir etki yaratabileceğini ortaya koymaktadır. Fibroblast yoğunluğunda Crystalys'in hafif bir üstünlük göstermesi, bu malzemenin fibroblast aktivasyonu üzerinde az da olsa daha güçlü bir etkiye sahip olabileceğini düşündürse de bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, her iki malzemenin de klinik etkinlik açısından birbirine yakın performanslar sergileyeceğini göstermektedir.

90. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan Trikrom boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.20'de sunulmuş olup bu preparatlar, kolajen ve fibroblast yoğunluğundaki artışın mikroskobik düzeyde de belirgin olduğunu göstermektedir.




Şekil 4.20. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. Fibroblast/fibrosit nükleusu (ok), kolajen (yıldız), kolajen yoğunluğu karışılaştırması (Ca-HAp/CMC>Crystalys>Kontrol), fibroblast yoğunluğu karşılaştırması (Crystalys≥ Ca-HAp/CMC>Kontrol)

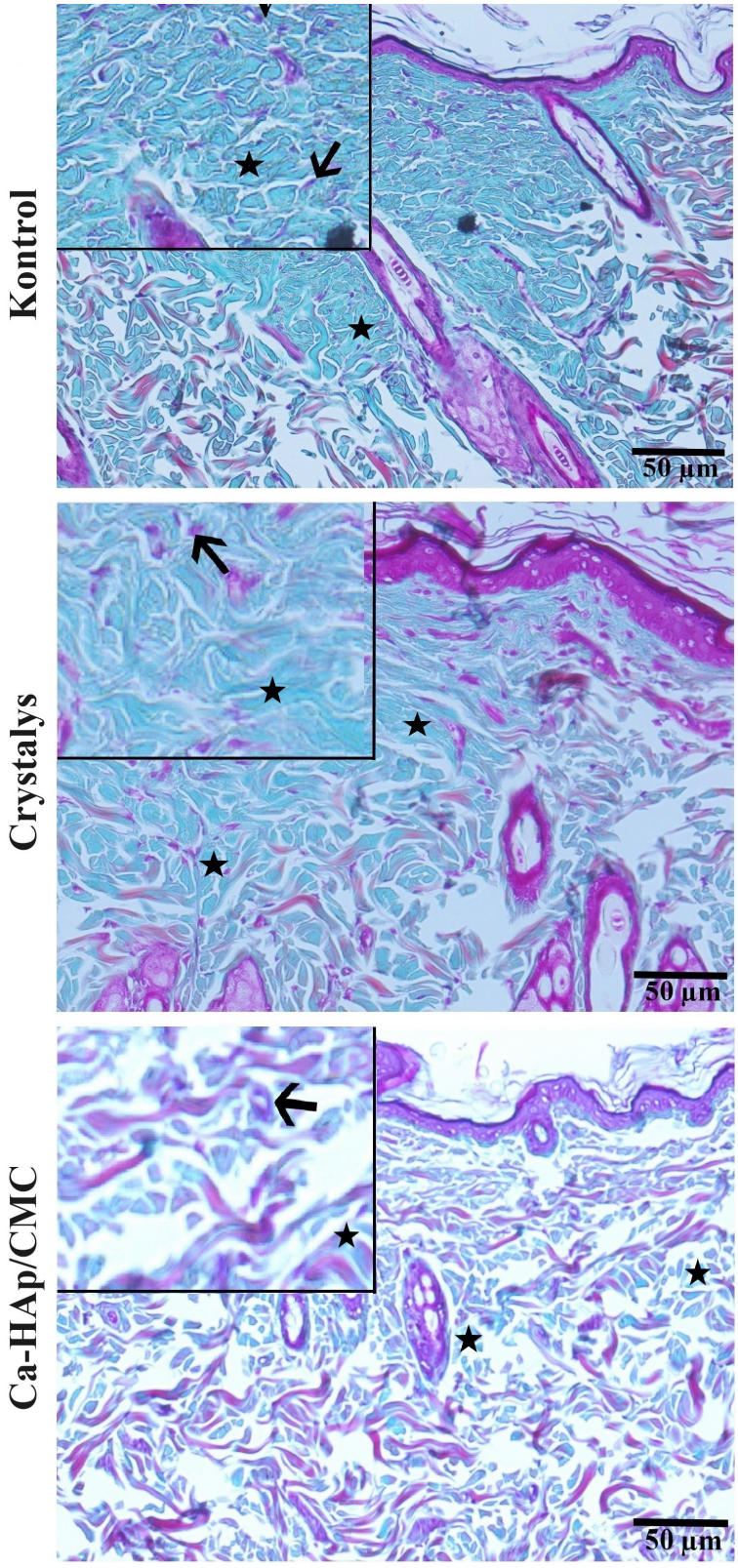
**120. gün gruplarında kolajen ve fibroblast yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

120. gün alınan doku kesitlerinin Trikrom boyaması ile yapılan değerlendirmesi sonucunda kolajen yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Diğer yandan Ca-HAp/CMC grubunda ölçülen kolajen yoğunluğu, kantitatif açıdan Crystalys grubundan minimal düzeyde yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu durum, her iki dolgu malzemesinin de dermal dokular üzerinde benzer bir biyolojik etki yarattığını, ancak Ca-HAp/CMC malzemesinin uzun vadede kolajen yoğunluğunu artırma potansiyelinin Crystalys'e kıyasla daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

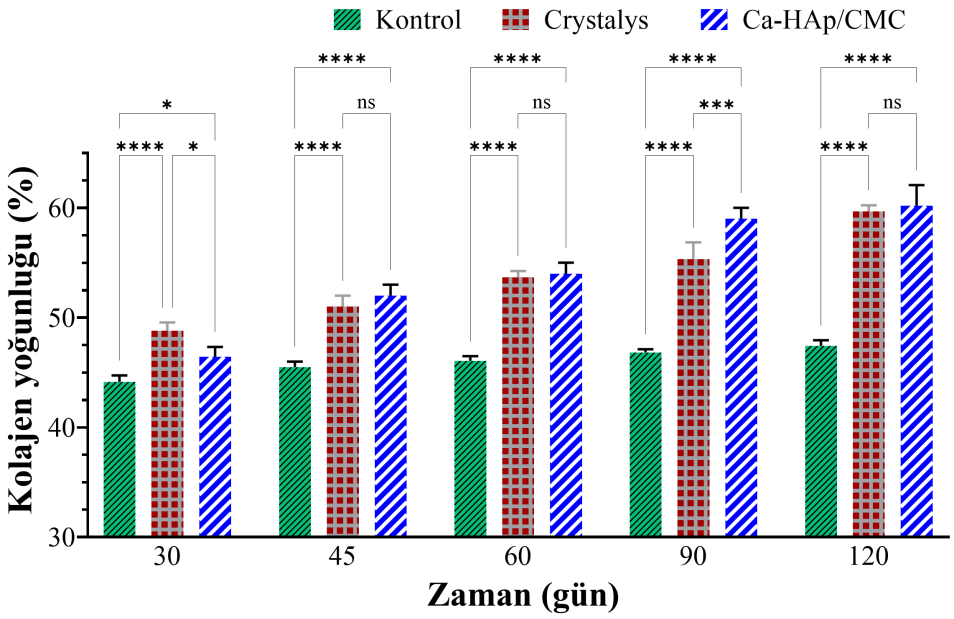
Fibroblast yoğunluğuna ilişkin değerlendirmeler de benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında fibroblast yoğunluğunun Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ancak, kantitatif olarak Ca-HAp/CMC grubunda fibroblast yoğunluğunun Crystalys grubuna göre hafif yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu bulgular, her iki dolgu malzemesinin de fibroblast proliferasyonu ve aktivasyonu açısından benzer etkiler gösterdiğini ve dermal dokuların yenilenmesi sürecinde etkili olduklarını göstermektedir.

120. gün analizlerinde saptanan verilerin, önceki 60. ve 90. gün bulgularıyla tutarlı olduğu ve dolgu malzemelerinin zamanla stabil bir biyolojik etki sergilediği anlaşılmaktadır. Bu veriler, Crystalys ve Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin kronik süreçte fibroblast ve kolajen yoğunluğu açısından benzer etkiler gösterdiğini ve bu etkilerin zamanla sürdürülebilir olduğunu ortaya koymaktadır. Ca-HAp/CMC grubunun kolajen ve fibroblast yoğunluğundaki hafif artış eğilimi, bu malzemenin uzun vadede daha üstün bir performans gösterebileceğine işaret etmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması, her iki malzemenin de klinik etkinlik açısından birbirine yakın olduğunu göstermektedir.

120. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan Trikrom boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.21'de sunulmuştur.




Şekil 4.21. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. Trikrom, 20x. Fibroblast/fibrosit nükleusu (ok), kolajen (yıldız), kolajen yoğunluğu karışılaştırması (Ca-HAp/CMC≥Crystalys>Kontrol), fibroblast yoğunluğu karşılaştırması (Ca-HAp/CMC≥ Crystalys>Kontrol)




Şekil 4.22. Günlere göre ortalama kolajen yoğunluğu dağılımı.

Hata çubukları, preparat başına beş ayrı alanda tespit edilen kolajen yoğunluğu ortalamalarının standart hatasına karşılık gelmektedir. ns; istatiksel olarak farksız, **; $p<0.01$, ****; $p < 0.0001$ Tukey'nin çoklu aralık testleri ile kontrol ve çalışılan diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Yukarıda her periyotta alınan doku örneklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlar paylaşılmış olup her preparatta Image J yazılımı kullanılarak beş ayrı alanın incelenmesiyle tespit edilen kolajen yoğunluğu ortalamalarına dair "iki yönlü varyans (ANOVA) analizi ile Tukey çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak gruplar arasında göze çarpan önemli farklılıklar" Şekil 4.22'de paylaşılmıştır.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC grubuna ait doku örneklerinin farklı periyotlar arasında karşılaştırmasında kolajen yoğunluğu açısından benzeşme ve farklılaşmaların olduğu gözlenmekle beraber deney başından sonuna kadarki süreçte kolajen yoğunluğunun tedrici artış gösterdiği, geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme noktasında etkin olabileceği değerlendirilmiştir.

Ca-HAp/CMC jel malzememizin uygulandığı doku örnekleri kolajen yoğunluğunda uygulamadan itibaren, kontrol grubuna göre 30. gün sonunda %2,29; 45. gün sonunda %5,53; 60. gün sonunda %8,27; 90. gün sonunda %12,33; 120. gün sonunda %12,77 oranında artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir.

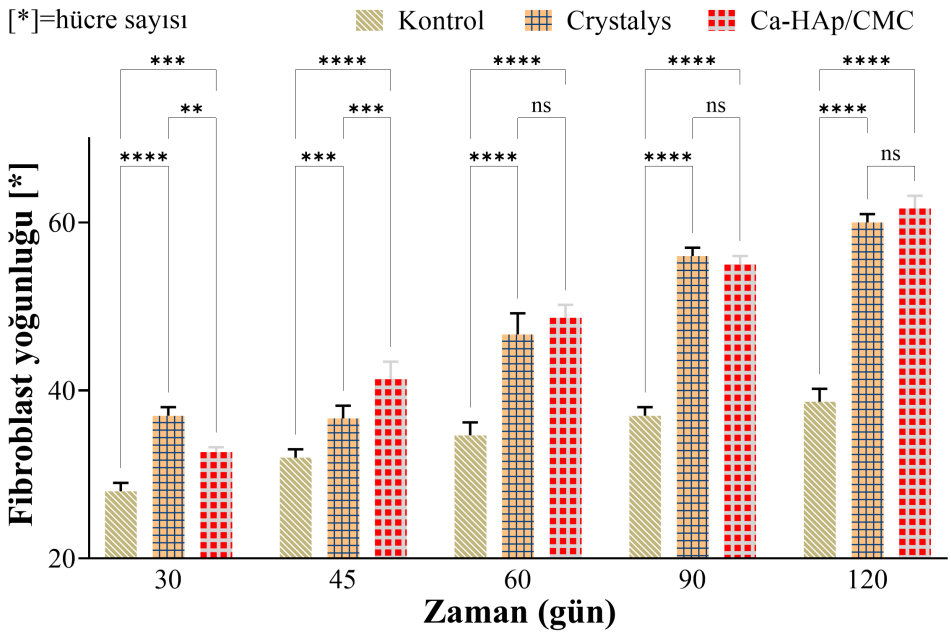
Geliştirdiğimiz malzemenin uygulandığı deri dokusu örneklerinde periyotlar arası kolajen yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırması Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku örnekleriniinn kolajen yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları

| Tukey çoklu karşılaştırmalar testi | Anlamlılık düzeyi | Uyarlanmış P Değeri |
|---|---|---|
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 45. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.3908 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 90. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.9549 |

Tabloda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) post hoc Tukey çoklu karşılaştırmalar testi sonuçları verilmiştir. ns; istatiksel olarak farksız, ****; $p < 0.0001$

Her periyotta alınan doku örneklerinin incelenmesinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te paylaşılmış olup her preparatta beş ayrı alanın incelenmesiyle sayılan fibroblast hücresi/hücre çekirdeği ortalamalarına dair "iki yönlü varyans (ANOVA) analizi ile Tukey testi kullanılarak gruplar arası çoklu istatistiksel karşılaştırma sonuçları" Şekil 4.23'te sunulmuştur.




Şekil 4.23. Günlere göre ortalama fibroblast sayısı dağılımı.

Hata çubukları, preparat başına beş ayrı alanda tespit edilen fibroblast sayısı ortalamalarının standart hatasına karşılık gelmektedir. ns; istatiksel olarak farksız, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$ ve ****; $p<0.0001$ Tukey'in çoklu aralık testleri ile kontrol ve çalışılan diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC grubuna ait farklı periyotlarda alınan doku örneklerinin karşılaştırılması sonucu fibroblast yoğunluğu açısından çeşitli benzeşme ve farklılaşmalar olduğu dikkati çekmektedir. Periyotlar arasında gözlemlenen bu farklılıklar, fibroblast yoğunluğunun tedrici bir artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin zamanla fibroblast aktivitesini artırıcı bir etki sağladığını ve dolayısıyla klinik uygulamada istenilen sonuçları elde etme noktasında etkin bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

Fibroblast yoğunluğunun periyotlar arasındaki değişimi, özellikle dolgu malzemesinin uzun vadeli etkinliğini ve biyolojik etkisini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda, Ca-HAp/CMC grubunun fibroblast yoğunluğunu artırma yeteneğinin, malzemenin etkinliğini ve güvenilirliğini destekleyen önemli bir gösterge olduğu değerlendirilmektedir. Periyotlar arası fibroblast yoğunluğunun istatistiksel karşılaştırması ve detaylı sonuçlar Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku kesitlerinin fibroblast yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları

| Tukey çoklu karşılaştırmalar testi | Anlamlılık düzeyi | Uyarlanmış P Değeri |
|---|---|---|
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 45. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0004 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 90. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0002 |

Tabloda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) post hoc Tukey çoklu karşılaştırmalar testi sonuçları verilmiştir. ns; istatiksel olarak farksız, ***; $p<0.001$ ve ****; $p < 0.0001$

**Kolajen ve fibroblast yoğunluğu tüm periyotlar açısından değerlendirildiğinde;**

Kolajen lif ve demetlere dair yoruma geçmeden önce bu yapının sıçanların normal cilt dokusunun Trikrom boyalı kesitlerinde papiller dermiste, epidermisin hemen altında ince, birbirine geçmiş kolajen lif demetleri şeklinde karşımıza çıktığı bilinmelidir. Buna ek olarak retiküler dermiste daha derin, yoğun ve kalın dalgalı kolajen demetleri olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu katmanlar aşılıp subkutan dokuya gelindiğinde ise ince kolajen lifler ile iskelet kası lifleri bulunduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız Kontrol grubu sıçanlarının tüm periyotlarda alınan deri kesitlerinde Crystalys ve Ca-HAp/CMC dolgu gruplarına kıyasla kolajen lif ağının daha gevşek ve lifler arasındaki şeffaf alanların daha geniş aralıklarda olduğu görülmektedir (Şekil 4.17-4.21).

Çeşitli dolgu malzemelerinin geliştirilmesinde kullanılan Ca-HAp pürüzlü, pürüzsüz veya poröz mikrokürelerden oluşmakta olup bu mikroküreler yeni kolajen oluşumunun tetiklenmesi sürecinde skafold görevi görmektedir. Yapılan çalışmalarda Ca-HAp mikroküreleri çevresinde veya yüzeyi ile etkileşim halinde kolajen liflerin olduğu saptanmıştır [133]. Buna ek olarak dokuya uygulanan mikroküreler bağışıklık sistemini uyararak, fibroblast aktivite ve göçünü etkileyerek kolajen sentezini sağlamaktadır [164]. Deneysel bir çalışmada HAc uygulamasını müteakiben 7. günde sakrifiye edilen sıçanlarda subkutan tabakada kolajen liflerde belirgin bir artış olduğu ifade edilmektedir [165]. Köpek deney modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada HAp'ın yeni kolajen

oluşumuna etkisi araştırılmış olup 1. ayda sentezlenen kolajen yoğunluğunun 5. aydan daha yüksek olduğu saptanmıştır [166]. Çalışmamızda bu veriyle uyumlu olarak 30. günde saptanan kolajen yoğunluğunun Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu anlaşılmakla dolgu malzemesi uygulamasını takiben ilk ayda aktif yeni kolajen sentezi olduğu değerlendirilmiştir.

Deneysel çalışmalarda 60. günde sakrifiye edilen sıçanların deri örneklerinde dermisin yanı sıra subkutan tabakada da kolajen liflerde daha belirgin bir artış olduğu ifade edilmiştir. Beş hasta içeren bir olgu serisinde Ca-HAp uygulanan olgularda uygulamanın 2. ayında kolajen yoğunluğunun anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir [167]. Yanatma ve ark.'nın çalışmasında da aynı sonuca ulaşılmıştır [168]. Bu veri ile uyumlu olarak çalışmamızda da Ca-HAp/CMC malzemenin uygulamasından sonraki 60. günde alınan doku örneklerinde Kontrol grubuna göre kolajen yoğunluğunda belirgin artış olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol olan Crystalys grubunda da benzer sonuç elde edilmiştir.

Çalışmamızda uygulama sonrası 90. gün verilerinin Ca-HAp/CMC ve Crystalys gruplarında kolajen yoğunluğunda Kontrol grubuna göre belirgin fark olduğu anlaşılmakla birlikte, HAc uygulanan bir deney modelinde subkutan dokuda sürekli bir tabaka halinde sıkıca paketlenmiş kalın kolajen liflerinin gösterilmiş olduğu dikkati çekmektedir. Bu değerlendirme ışığında HAc uygulamasının çalışmamızdan farklı olarak tabaka halinde kolajen katmanı oluşturma etkisi olduğu anlaşılmaktadır.

Yanatma ve ark. çalışmalarında 4. ayın sonunda, 2. aya benzer şekilde, dolgu gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir kolajen artışı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da hem Ca-HAp/CMC hem de pozitif kontrol malzeme uygulamasında literatürle uyumlu olarak 120 günlük doku örneklerinde Kontrol grubuna göre kolajen ve fibroblast yoğunluklarında anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalarda dolgu malzeme üretiminde kullanılan HAp-HAc kompozit malzemelerde HAp partikül boyutlarının kolajen yoğunluğu üzerinde etkisinin olduğu belirtilmiş olup, boyut küçüldükçe prokolajen aktivitenin ve buna bağlı kolajen üretimi ile cilt kolajen yoğunluğunun artış gösterdiği tespit edilmiştir [169, 170]. Nano boyutta HAp ve mikro boyutta HAp karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada her iki HAp grubunun da kolajen yoğunluğunu arttırma açısından normal boyuttaki HAc'tan

daha etkin olduğu, bu gruplarda kolajenin daha yoğun katman halinde oluştuğu gösterilmiştir. Çalışmamızda 20-60 μm boyutta HAp kullanılmış olup bunun literatürle uyumlu olarak saf dolgu malzemelerinden daha etkin olma potansiyeli olduğu anlaşılmaktaysa da Nano boyutta HAp kullanılmadığı için bu boyut ile karşılaştırma yapılamamıştır.

Fibroblast aktivite ve yoğunluğu ile ilgili literatür değerlendirildiğinde, aktif ve inaktif fibroblast nitelikleri karşılaştırılarak HAc dolgu malzemesi uygulamasının fibroblast aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir [165]. Bu bilginin aksine bir diğer çalışmada HAc-HAp kompozit dolgu malzemesi kullanılan deney modelinde fibroblast proliferasyonu niteliğinin HAp partiküllerine atfedildiği dikkati çekmektedir [170]. Bununla uyumlu olarak çalışmamızda da hem geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC malzeme hem de Crystalys gruplarında fibroblast yoğunluğunun arttığı, bu durumun kolajen artışına neden olduğu ve dolgu malzemelerinin kendilerinden beklediği etkiyi gösterdiği anlaşılmıştır.

Yanatma ve ark.'ın araştırmalarında fibroblast yoğunluğu nükleus sayısı üzerinden değerlendirilmiş olup uygulamadan 2 ay sonra Kontrol, PCL ve Ca-HAp grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmezken 4. ayda anlamlı düzeyde farklılık olduğu ifade edilmiştir. İki ve dört ay sonraki örnekler karşılaştırıldığında ise, Ca-HAp ve Kontrol grupları benzer özellik gösterirken PCL'nin fibroblast yoğunluğu üzerinde anlamlı etki gösterdiği saptanmıştır [168]. Çalışmamızda ise 30, 45, 60, 90 ve 120 günlük örnekleme periyotlarının tümünde fibroblast yoğunluğunun hem geliştirdiğimiz dolgu malzemesinde hem de pozitif kontrol malzemesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler arasındaki farkın her iki çalışmada kullanılan dolgu malzemesinin HAp miktar ve mikroküre niteliklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çeşitli deney modellerinde, HAp bazlı dolgu malzemelerinin, subkutan enjeksiyonu müteakiben ilk birkaç hafta içinde intertisyel sıvıyı emmesi nedeniyle uygulama alanına komşu alanlarda değişen ECM mikroçevre özelliklerinden dolayı dermal fibroblastları gerebileceği belirtilmektedir. Bu durumda gerilmiş fibroblastların yoğun miktarda granüllü endoplazmik retikulum içerdiği ve bunun da artan protein sentezine işaret ettiği dikkate alındığında uygulanan hidrojel dolgu malzemelerinin komşu alandan su çekme etkisiyle de dolaylı olarak fibroblast aktivasyonunu ve buna bağlı kolajen üretimini

tetiklediği anlaşılmaktadır [171]. Bu etkiye ek olarak hidrojel malzeme uygulama alanında da oluşan birikimin mekanik stres etkisiyle de fibroblastların tetiklendiği ve kolajen üretiminin artış gösterdiği bildirilmektedir [165]. Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin de hidrojel niteliği taşıması nedeniyle literatürle uyumlu şekilde fibroblast aktivasyonu yaparak kolajen yoğunluğunu artırma potansiyeli olduğu, bu durumun subkutan dolgu malzemesi uygulaması açısından önemli olduğu değerlendirilmiştir. Literatürde subkutan hidrojel dolgu malzemesi uygulamasının fibroblast aktivasyonunu tetikleme mekanizmaları değerlendirildiğinde; jel malzeme fibroblastları doğrudan etkileyebildiği gibi komşu alanda hücreler arası sıvıyı emerek komşu fibroblastlarda gerilme oluşturma, uygulama alanındaki fibroblastlar üzerinde mekanik stres oluşturma ve uygulama alanına fibroblast göçünü tetikleme yöntemleriyle fibroblastları aktive ettiği ve kolajen üretimini arttırdığı ifade edilmektedir [172-174].

Literatürde subkutan dolgu malzemelerinin fibroblast yoğunluğunu ve aktivasyonunu arttırdığı, fibroblast göçünü tetiklediği belirtilmektedir. Yanatma ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PCL ve Ca-HAp dolgu enjeksiyonu müteakiben 2 ve 4. aylarda alınan doku örneklerinde fibroblast sayıları karşılaştırılmış, 2. ayda PCL ve Ca-HAp uygulamasının fibroblast yoğunluğunu benzer şekilde artırdığı ancak 4. ay değerlendirmesinde fibroblast yoğunluğunun PCL grubunda Ca-HAp grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır [168]. Bu bulgulara karşın, çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC ve benzer içerikli pozitif kontrol grubumuz olan Crystalys dolgu malzemeleri uygulamalarını takiben fibroblast sayı ve yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttığının tespit edilmiş olması, Ca-HAp'nın fibroblast proliferasyon ve aktivasyonu noktasında önemli ölçüde etkin olduğunu ve Ca-HAp/CMC içeriğinin, fibroblast migrasyonu ve proliferasyonunu etkileyen spesifik sinyal yolaklarını modüle ederek hücre büyümesini teşvik ettiğini göstermektedir. Bu bağlamda, elde edilen bulgular Ca-HAp'ın uzun vadede fibroblast aktivitesi üzerinde kalıcı bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

### 4.3.2. Sıçan Derisinde Hematoksilen ve Eozin Boyamasının Değerlendirilmesi

Geliştirilen deney modelinde belirlenen periyotlarda alınan doku kesitlerinin H&E boyaması ile hazırlanmış preparatlarında, kolajen yoğunlukları açısından, trikrom boyaması uygulanmış doku kesitleriyle uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca her iki boyama uygulanmış doku preparatlarının epidermis-dermis kalınlıklarının da uyumlu olduğu değerlendirilmekle birlikte epidermis ve dermis kalınlıklarındaki değişim H&E ile boyanmış preparatlar üzerinden incelenmiştir. Örnekleme periyotları olan 30, 45, 60, 90 ve 120 günlük gruplara ait epidermis ve dermis kalınlıklarına ilişkin değerlendirme aşağıda sunulmuştur. Veriler Çizelge 4.6'da karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Çizelge 4.6. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve Kontrol gruplarında uygulama sonrası sıçan deri dokusunun epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi

| | | **30. gün** | **45. gün** | **60. gün** | **90. gün** | **120. gün** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Epidermis kalınlığı | Kontrol | 14,37±1,8 | 15,46±1,9 | 15,30±3,3 | 17,00±2,7 | 17,26±2,0 |
| | Crystalys | 15,40±2,4 | 16,39±2,1 | 16,74±1,5 | 18,73±2,3 | 17,18±1,7 |
| | Ca-HAp/CMC | 18,13±2,9 | 17,94±1,2 | 16,20±3,7 | 18,57±1,1 | 19,13±2,4 |
| Dermis kalınlığı | Kontrol | 235,02±1,9 | 238,57±1,3 | 238,93±1,1 | 237,31±5,2 | 240,95±7,6 |
| | Crystalys | 238,57±1,3 | 248,03±1,7 | 247,96±2,4 | 256,35±2,0 | 260,78±4,0 |
| | Ca-HAp/CMC | 237,33±2,2 | 248,51±1,4 | 246,83±3,2 | 257,53±2,9 | 258,44±3,5 |

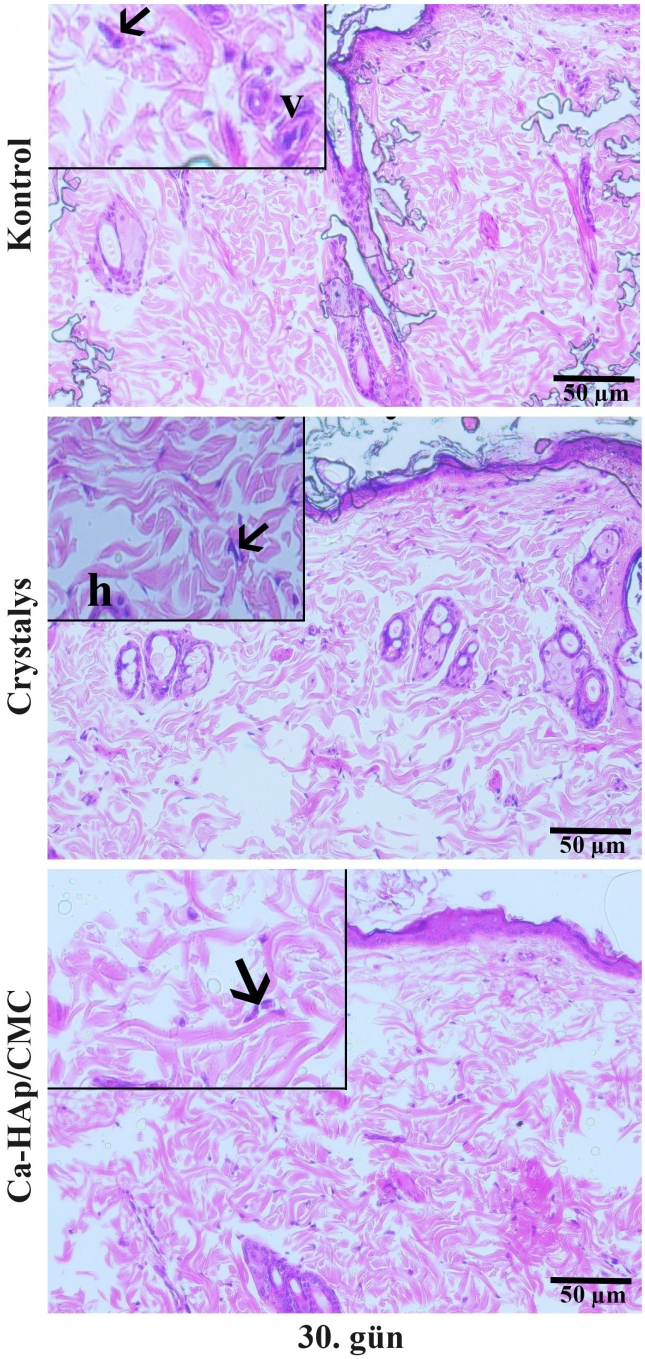
Tabloda verilen değerler her gruptaki sıçanların tüm preparatlarının beş ayrı mikroskobik görüntüleme alanından yapılan ölçümlerle elde edilmiştir.

**30. gün gruplarında epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi;**

H&E boyaması sonuçlarına göre 30. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis ve dermis kalınlıkları bakımından Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p>0.05$). Bu bulgu, uygulanan dolgu maddelerinin dermal kalınlık üzerinde erken dönemde anlamlı bir etki yaratmadığını göstermektedir. Özellikle epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesinde, bu katmanlardaki değişimlerin minimal düzeyde kalması, çalışmamızda hedeflenen alanın esasen deri altı dokusu olması nedeniyle beklenen bir durum olduğu, rutin uygulamayı müteakiben erken evrede, tüm deri katmanlarında minimal enflamasyona bağlı hafif ödem ve kalınlaşma beklense de bu patofizyolojik sürecin birkaç gün içerisinde sonlandığı ve epidermis-dermisin olağan haline döndüğü bilinmektedir. Bu bağlamda, 30. gün itibarıyla

gözlemlenen epidermis ve dermis kalınlıklarında istatistiksel anlamlılık taşımayan farklılıkların, inflamatuar yanıtın sona ermesiyle ilişkili olduğu ve dokuların normal morfolojilerine döndüğü anlaşılmaktadır.

30. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.24'te sunulmuştur.




Şekil 4.24. 30. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x.
Fibroblast (ok), kıl folikülü (h), kan damarı (v)

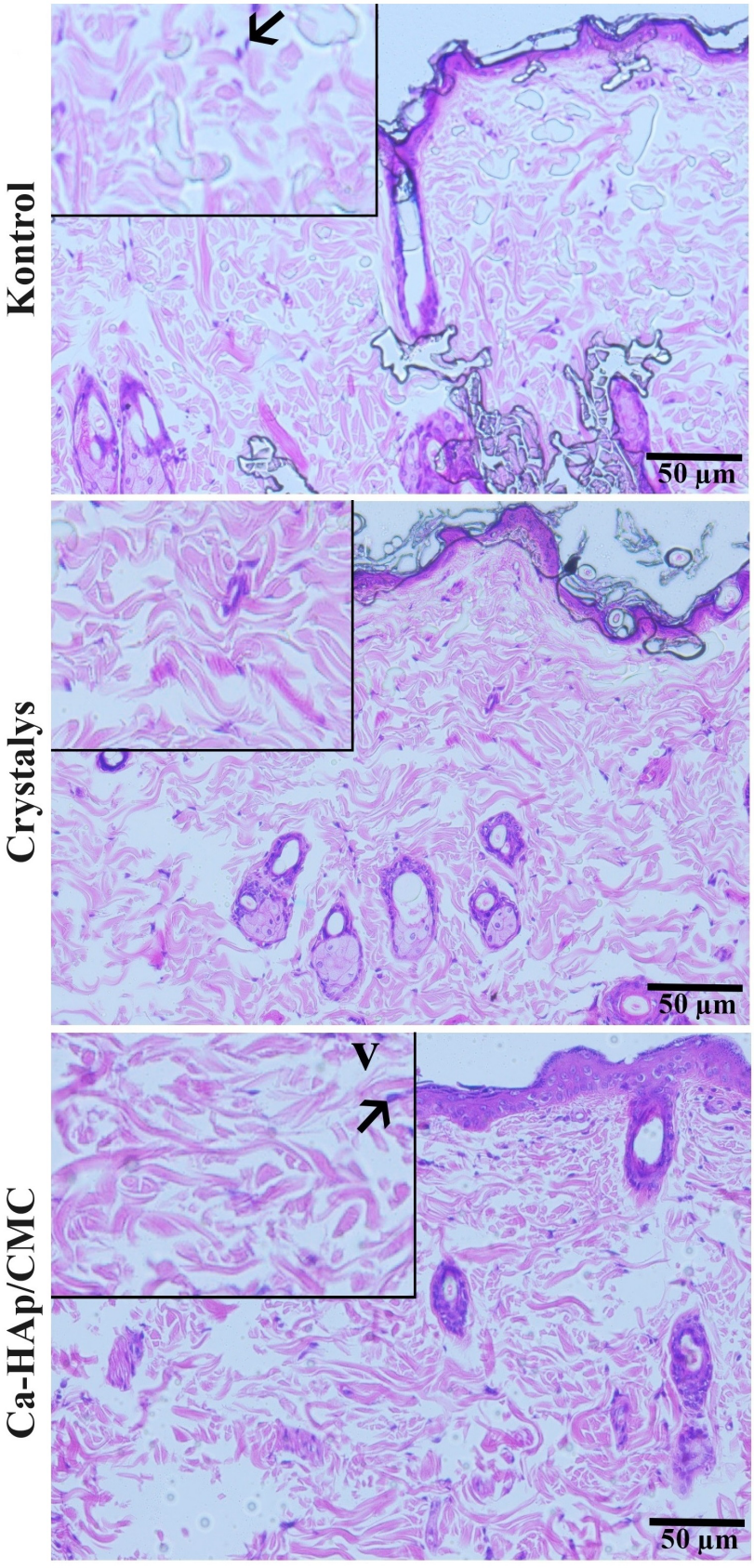
**45. gün gruplarında epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi;**

H&E boyaması sonuçlarına göre 45. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis kalınlıkları açısından minimal ölçüm farklılıkları gözlemlenmesine rağmen, bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu bulgu, uygulanan dolgu maddelerinin epidermis kalınlığı üzerinde erken dönemde anlamlı bir etki yaratmadığını göstermektedir.

Diğer yandan dermis kalınlıkları açısından yapılan analizde, Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek kalınlıklar saptanmıştır ($p<0.05$). Ancak, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında yapılan karşılaştırmada, dermis kalınlıkları bakımından minimal ölçüm farklılıkları bulunmakla birlikte, bu farkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu durum, her iki dolgu malzemesinin dermis üzerinde benzer düzeyde etkili olduğunu ve dermal kalınlık artışını teşvik ettiğini göstermektedir.

45. gün verileri, 30. gün doku kesitleri ile karşılaştırıldığında, dermis kalınlıklarının süreç içerisinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgu, dolgu malzemelerinin dermal kalınlığı artırıcı etkisinin zamanla daha belirgin hale geldiğini ve bu etkinin uygulamanın ilerleyen dönemlerinde devam ettiğini düşündürmektedir. Dermis kalınlığındaki bu artış, muhtemelen fibroblast aktivasyonu ve buna bağlı olarak kolajen sentezinin artışı ile ilişkilidir, bu da dermal yapıların güçlenmesine ve kalınlaşmasına katkıda bulunmaktadır.

45. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.25'te sunulmuştur. Bu preparatlar, dermal ve epidermal kalınlıkların histolojik olarak ve bulguların da mikroskobik düzeyde doğrulandığını göstermektedir. Dermis kalınlığındaki bu artış, dermal dolgu maddelerinin etkinliğini ve uzun vadeli biyolojik etkilerini anlamak açısından önem taşımaktadır.




Şekil 4.25. 45. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x.

Fibroblast (ok), kan damarı (v)

**60. gün gruplarında epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi;**

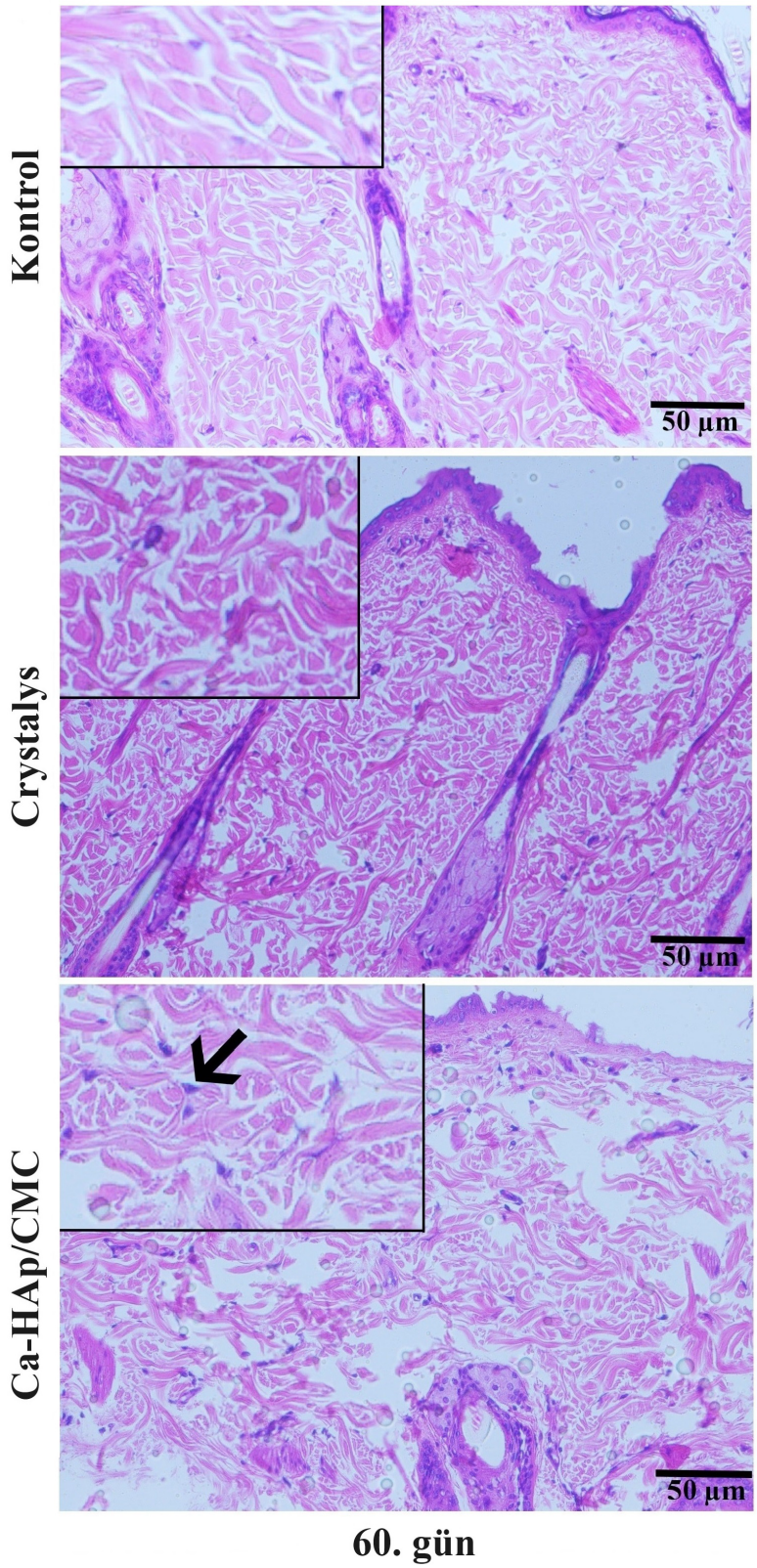
H&E boyaması sonuçlarına göre 60. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis kalınlıkları bakımından Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç, 60. gün itibariyle her iki dolgu malzemesinin epidermal kalınlık üzerinde belirgin bir etkiye yol açmadığını ve dolgu maddelerinin epidermal yapıyı değiştirme kapasitesinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Dermis kalınlıkları açısından yapılan analizde ise, Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek kalınlıkların mevcut olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin dermal matriksin yeniden yapılandırılması ve hücre proliferasyonu üzerinde belirgin bir biyostimülatif etkisi olduğunu ve bu etkinin dermis kalınlığında artış olarak ortaya çıktığını göstermektedir. Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında dermis kalınlıkları açısından yapılan karşılaştırmada ise, minimal ölçüm farklılıkları olmasına rağmen bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu durum, her iki dolgu malzemesinin dermis üzerinde benzer düzeyde etkili olduğunu ve dermal kalınlık artışını teşvik ettiğini göstermektedir.

Ayrıca, 60. gün doku kesitleri ile 30. gün doku kesitleri karşılaştırıldığında, dermis kalınlıklarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgu, dolgu maddelerinin etkisinin zamanla birikerek dermal kalınlıkta belirgin bir artışa yol açtığını, bu sürecin özellikle ilk 30 gün içinde daha belirgin olduğunu ve dokunun dolgu maddelerine yanıt olarak artan bir dermal kalınlık oluşturduğunu göstermektedir. Ancak, 45. gün doku kesitleri ile 60. gün verileri karşılaştırıldığında, dermis kalınlıklarında anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuç, dermal kalınlıktaki artışın 45. güne kadar devam ettiğini, fakat bu süre zarfından sonra dolgu maddelerinin etkisinin sabit hale gelerek dermal kalınlığın stabil bir düzeye ulaştığını göstermektedir.

Sonuç olarak, 60. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyaması bulguları, dolgu maddelerinin dermis üzerinde belirgin bir kalınlık artışı sağladığını, bu artışın zamanla stabil hale geldiğini ve epidermis üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını

ortaya koymaktadır. 60. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.26'da sunulmuştur.




Şekil 4.26. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. Fibroblast (ok)

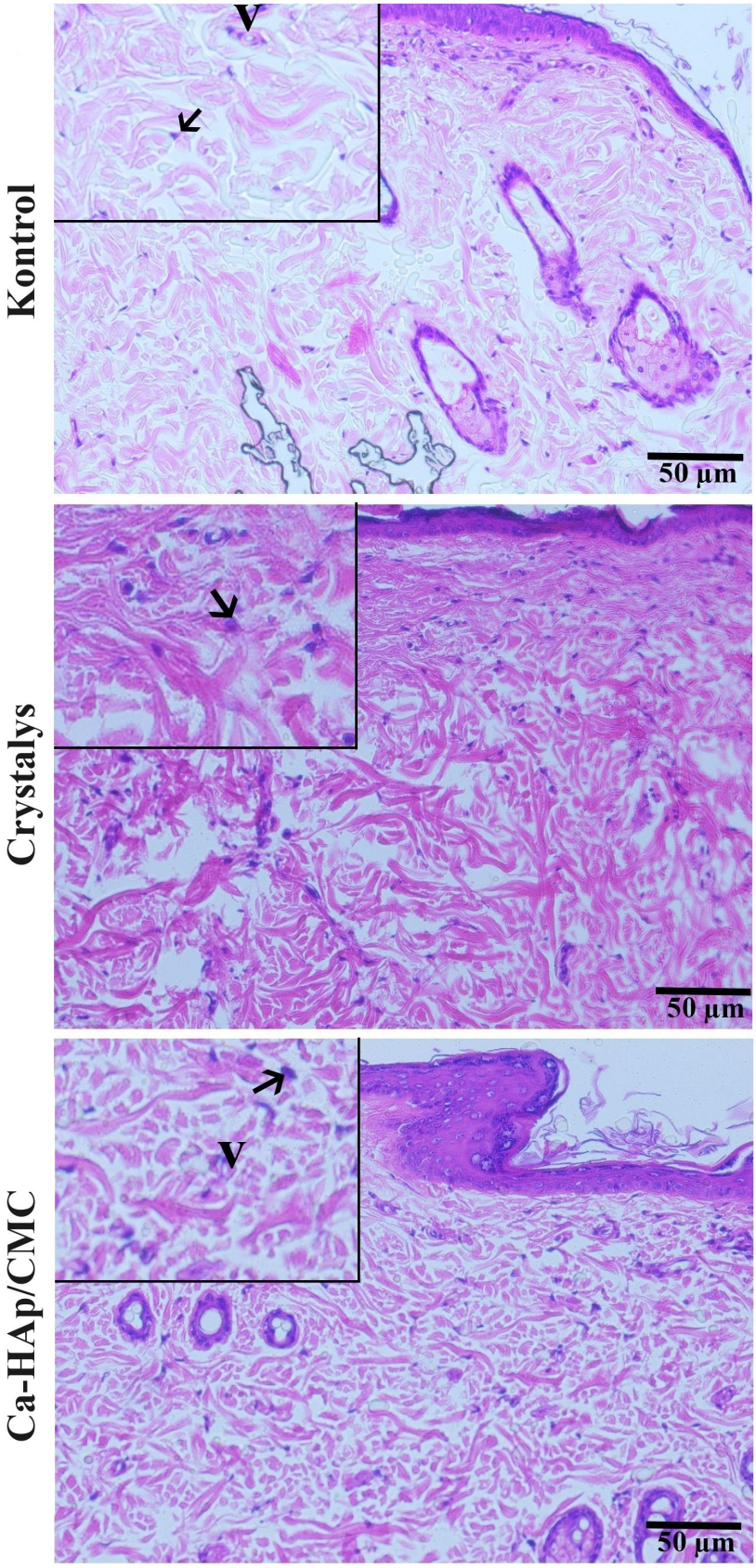
**90. gün gruplarında epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi;**

H&E boyaması sonuçlarına göre 90. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis kalınlıkları bakımından Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuç, dolgu maddelerinin 90 günlük süre zarfında epidermis kalınlığı üzerinde belirgin bir etki yaratmadığını ortaya koymaktadır.

Dermis kalınlıkları açısından yapılan analizde hem Crystalys hem de Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre dermis kalınlıklarının istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin dermal kalınlığı artırmada etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında dermis kalınlığı açısından yapılan karşılaştırmada minimal ölçüm farklılıkları bulunmakla birlikte, bu farkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu durum, dolgu maddelerinin dermal kalınlık üzerindeki etkilerinin benzer düzeyde olduğunu ve her iki malzemenin de dermis kalınlığını artırmada eşdeğer etkinliğe sahip olduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca, 60. gün doku kesitleriyle yapılan karşılaştırmada, 90. gün itibarıyla dermis kalınlıklarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın oluştuğu gözlenmiştir. Bu bulgu, dermis kalınlığındaki artışın devam ettiğini ve dolgu maddelerinin uzun vadeli etkisinin 90. güne kadar sürdüğünü göstermektedir. Dermis kalınlığındaki bu artış, muhtemelen fibroblast aktivasyonunun devam etmesi ve buna bağlı olarak kolajen sentezinin artması ile ilişkilidir. Bu süreç, dermal dokuların daha kalın ve güçlü hale gelmesine katkıda bulunarak, dolgu maddelerinin uzun vadeli etkinliğini desteklemektedir.

90. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.27'de sunulmuş olup, bu preparatlarla epidermal ve dermal kalınlıklar histolojik olarak doğrulanmaktadır. Dermal kalınlıktaki artış, dolgu maddelerinin kalıcı etkilerini ve doku yapısındaki değişimleri anlamak açısından önem arz etmektedir.




Şekil 4.27. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x. Fibroblast (ok), kan damarı (v)

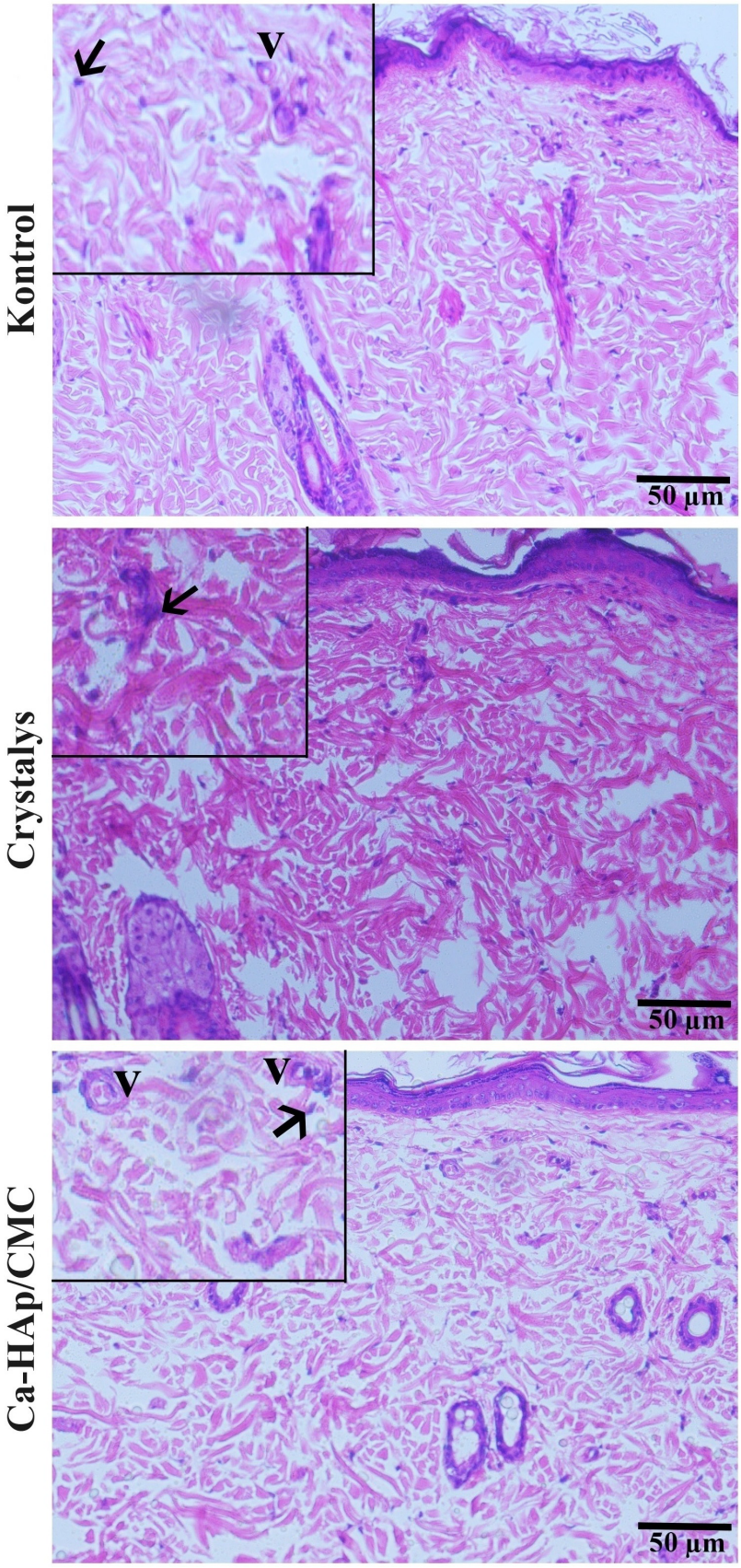
**120. gün gruplarında epidermis ve dermis kalınlıklarının değerlendirilmesi;**

H&E boyaması sonuçlarına göre 120. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis kalınlıkları bakımından Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç, dolgu maddelerinin 120 günlük süre zarfında epidermis kalınlığı üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığını ve bu parametrede stabil bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Dermis kalınlıkları açısından yapılan analizde ise, hem Crystalys hem de Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre dermis kalınlıklarının istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin de dermal kalınlığı artırmada etkili olduğunu ve bu etkinin 120. güne kadar sürdüğünü göstermektedir. Bununla birlikte, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında dermis kalınlığı açısından yapılan karşılaştırmada minimal ölçüm farklılıkları bulunmakla birlikte, bu farkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu durum, dolgu maddelerinin dermal kalınlık üzerindeki etkilerinin benzer düzeyde olduğunu ve her iki malzemenin de dermis kalınlığını artırmada eşdeğer bir performans sergilediğini ortaya koymaktadır.

120. gün doku kesitlerinin 90. gün kesitleriyle karşılaştırılması sonucunda, dermis kalınlıkları arasında minimal farklılıklar gözlenmiş olmasına rağmen, bu farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı dikkati çekmiştir. Bu bulgu, dermis kalınlığındaki artışın 90. gün ile 120. gün arasında stabilize olduğunu ve dolgu maddelerinin etkisinin bu süre zarfında sabit kaldığını göstermektedir. Dermal dokulardaki bu stabilizasyon, fibroblast aktivasyonu ve kolajen sentezinin dengelenmesi ile ilişkilendirilebilir, bu da dermis kalınlığında daha fazla artış olmadan dolgunun kalıcı etkilerini destekleyebilir.

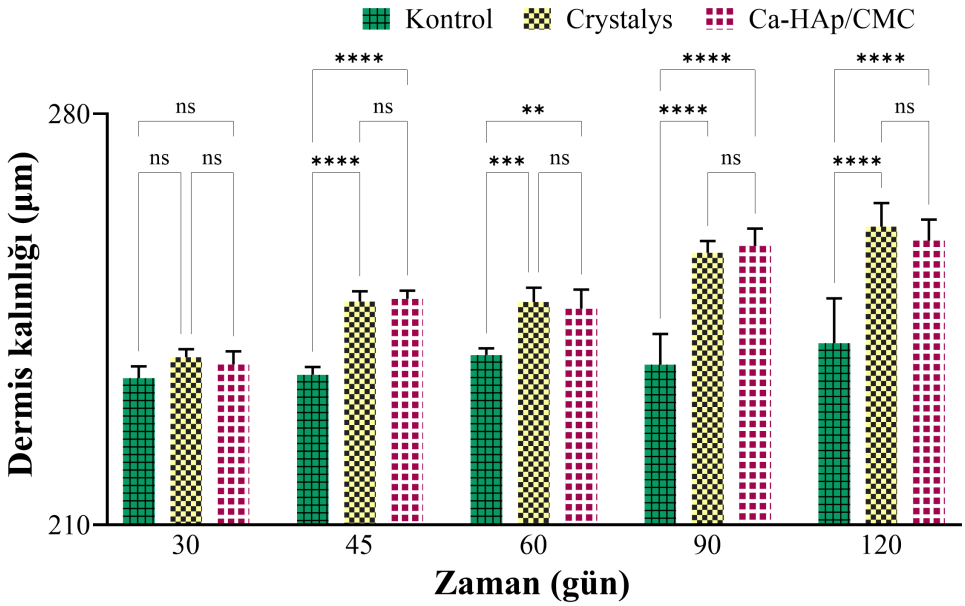
120. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan H&E boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.28'de sunulmuştur. Bu preparatlar, epidermis ve dermis kalınlıklarının histolojik değerlendirilmesine ve dolgu maddelerinin uzun vadeli etkilerinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Dermal kalınlıktaki bu süregelen artış ve stabilizasyon, dolgu maddelerinin kronik etkilerini ve dermal doku üzerinde uzun vadeli kalıcı değişiklikleri anlamak açısından önemli veriler sağlamaktadır.




Şekil 4.28. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. H&E, 20x.

Fibroblast (ok), kan damarı (v)

Yukarıda her periyotta alınan numunelerin incelenmesinden elde edilen sonuçlar paylaşılmış olup her deney grubundaki tüm deneklerden elde edilen preparatlar Image J yazılımı kullanılarak beş ayrı alanda ölçülen dermis kalınlığı ortalamalarına ilişkin "iki yönlü varyans (ANOVA) analizi ile Tukey testi kullanılarak yapılan gruplar arası çoklu istatistiksel karşılaştırmalar" Şekil 4.29'da paylaşılmıştır.




Şekil 4.29. Günlere göre değişen ortalama dermis kalınlıkları.

Hata çubukları, preparat başına beş ayrı alanda tespit edilen dermis kalınlıkları ortalamalarının standart hatasına karşılık gelmektedir. ns; istatiksel olarak farksız, **; p<0.01, ***; p<0.001 ve ****; p < 0,0001 Tukey'in çoklu aralık testleri ile kontrol ve çalışılan diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC grubuna ait farklı periyot örneklerinin dermis kalınlıkları açısından karşılaştırmasında farklı periyotlar arasında benzeşme ve farklılaşmaların olduğu gözlenmekle beraber 30. günden başlayarak 120. güne kadar devam eden süreçte dermis kalınlığındaki artışın tedricen sürdüğü, buna bağlı olarak da geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme yönünde etkin ve başarılı şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Dermis kalınlığının periyotlar arasındaki istatistiksel karşılaştırması Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan doku örneklerinin dermis kalınlıkları açısından grup içi karşılaştırmaları

| Tukey çoklu karşılaştırmalar testi | Anlamlılık düzeyi | Uyarlanmış P Değeri |
|---|---|---|
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 45. gün: Ca-HAp/CMC | ** | 0.0014 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | * | 0.0128 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | ns | >0.9999 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | * | 0.0227 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | ** | 0.0074 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | ** | 0.0027 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0008 |
| 90. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | ns | >0.9999 |

Tabloda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) post hoc Tukey çoklu karşılaştırmalar testi sonuçları verilmiştir. ns; istatiksel olarak farksız, *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$, ****; $p<0.0001$

**Epidermis ve dermis kalınlıkları tüm periyotlar açısından değerlendirildiğinde;**

Tüm gruplarda 30, 45, 60, 90 ve 120. günlerde H&E ile boyanan deri kesitlerinde epidermis ve dermoepidermal bileşkenin normal histolojik yapı ve özelliklerde olduğu görülmüş, anormal oluşum, düzensizlik, enfektif reaksiyon, granülasyon dokusu benzeri malign veya benign lezyon izlenmemiştir. Epidermis kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmede 30, 45, 60, 90 ve 120. günlerde kontrol, pozitif kontrol ve çalışma grubumuz olan Ca-HAp/CMC grupları arasındaki ölçümlerde farklılıklar olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmamızda kullanılan gruplar arasında epidermis kalınlıkları bakımından anlamlı farklılık saptanmadıysa da polidiaksanon, PCL ve PLA dolgu malzemelerinin karşılaştırıldığı fare deney modeli çalışmasında epidermis kalınlığında artışın izlendiği bildirilmiştir [175]. Yine bizim çalışmamızdan farklı olarak HAc dolgusunun insan derisine uygulandığı bir çalışmada bir aylık süre sonunda epidermis kalınlığında %19'luk artışın meydana geldiği raporlanmıştır [176]. Ancak derinin en üst katmanı olan epidermisin histomorfolojisi değerlendirildiğinde subkutan dolgu malzemelerinin epidermiste kalınlaşmayı sağlayabilecek belirgin etki göstermelerinin çok olası olmadığı ve epidermis kalınlığını değerlendiren çalışmalarda da bu hususun açıklanmadığı dikkati çekmiştir. Bu durumun görece az olmakla birlikte farklı tipte kolajen sentezi uyarımı veya epidermisin en üst katmanında yer alan keratinosit sayısında artışla açıklanabileceği düşünülmüştür.

Dermis kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmede ise dermis kalınlığının süreç içerisinde artış gösterdiği ve bu artışın farklı periyotlarda alınan doku örneklerinde farklılaştığı ancak tüm periyotlarda pozitif kontrol ile Ca-HAp/CMC verilerinin benzer özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde artmış dermis kalınlığının, dermal yapıyı dolgunlaştırıp yoğunlaştıran artmış hücre proliferasyonu ve artan kolajen yoğunluğu ile ilişkilendirilmiş olduğu dikkati çekmektedir [176]. Çeşitli çalışmalarda bu biyolojik reaksiyon farklı dolgu malzemelerindeki HAp partiküllerinin fibroblast proliferasyon ve aktivasyonunu tetiklemesine atfedilmiştir [177, 178]. Buna ek olarak literatürde dermiste yeni kolajen sentezi uyarımını doğrudan dermis kalınlığıyla ilişkilendiren çalışmalar önemli yer tutmaktadır [176, 179, 180]. Mevcut çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak artan dermis kalınlığının aynı periyotlarda artmış fibroblast ve kolajen yoğunluğu ile kolere şekilde değişkenlik gösterdiği ve bu durumun dermis kalınlaşmasına yönelik literatürde yapılan patofizyolojik açıklamayı desteklediği değerlendirilmiştir. Literatürde yapılmış diğer sıçan çalışmalarında da benzer veriler elde edildiği görülmektedir [168].

Yapılan çalışmalarda dermis kalınlığı ile ilişkilendirilen kolajen ve fibroblast yoğunluğu artışının kullanılan dolgu malzemesinin türü ve yapısına göre değişkenlik gösterdiği ifade edilmektedir. Örneğin HAc-HAp kompozitinin sadece HAc içeren malzemeye göre daha etkin olduğu, yapısal olarak nano boyuttaki partikül veya kürelerin mikro boyuttaki kürelere göre yoğun etki gösterdiği vurgulanmaktadır. Buna ek olarak kolajen ve fibroblast yoğunluğunun kullanılan dolgu malzemesine göre nasıl değiştiğini araştıran çalışmalarda HAp ve PCL kullanımının farklılaştığı, Yanatma ve ark. çalışmasında PCL'nin kolajen ve fibroblast yoğunluğu açısından daha etkin olduğu değerlendirilmekle birlikte dermis kalınlığı açısından PCL ve HAp'ın benzer özellik gösterdiği ifade edilmektedir. Buna ek olarak hem kolajen ve fibroblast yoğunluğu hem de buna bağlı dermis kalınlık artışı noktasında HAp'ın etkinliğine vurgu yapan çalışmaların olduğu dikkati çekmektedir [165, 168-170, 175]. Bizim çalışmamızda da beş farklı periyotta dört aylık süreçte yapılan kronik gözlemde HAp mikroküre lerini içeren Ca-HAp/CMC dolgu malzememizin kolajen ve fibroblast yoğunluğu artışına bağlı olarak dermal kalınlıkta kontrol grubuna göre anlamlı artış sağladığı ve bu verinin HAp'ın etkinliğini ortaya koyduğu değerlendirilmiştir.

### 4.3.3. Sıçan Derisinde Verhoeff Van Gieson Boyamasının Değerlendirilmesi

Deney modelinde belirlenen periyotlarda alınan doku kesitlerinin VG boyaması ile hazırlanmış preparatların incelenmesiyle elastik fiber yoğunluğundaki değişim belirlenmiştir. Örnekleme periyotları olan 30, 45, 60, 90 ve 120 günlük gruplara ait elastik fiber yoğunluğuna ilişkin değerlendirme aşağıda sunulmuştur. Veriler Çizelge 4.8'de karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. Crystalys, Ca-HAp/CMC ve kontrol gruplarının uygulama sonrası sıçan deri dokusunda elastik fiber yoğunluklarının değerlendirilmesi

| | | **30. gün** | **45. gün** | **60. gün** | **90. gün** | **120. gün** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Elastik Fiber Yoğunluğu** | Kontrol | 7,43±0,6 | 8,0±0,1 | 8,63±0,5 | 9,67±0,4 | 10,23±0,3 |
| | Crystalys | 9,73±0,8 | 10,37±0,9 | 14,07±0,6 | 16,10±1,1 | 18,73±0,8 |
| | Ca-HAp/CMC | 7,63±1,1 | 10,93±0,6 | 14,43±0,5 | 15,63±0,3 | 19,87±1,2 |

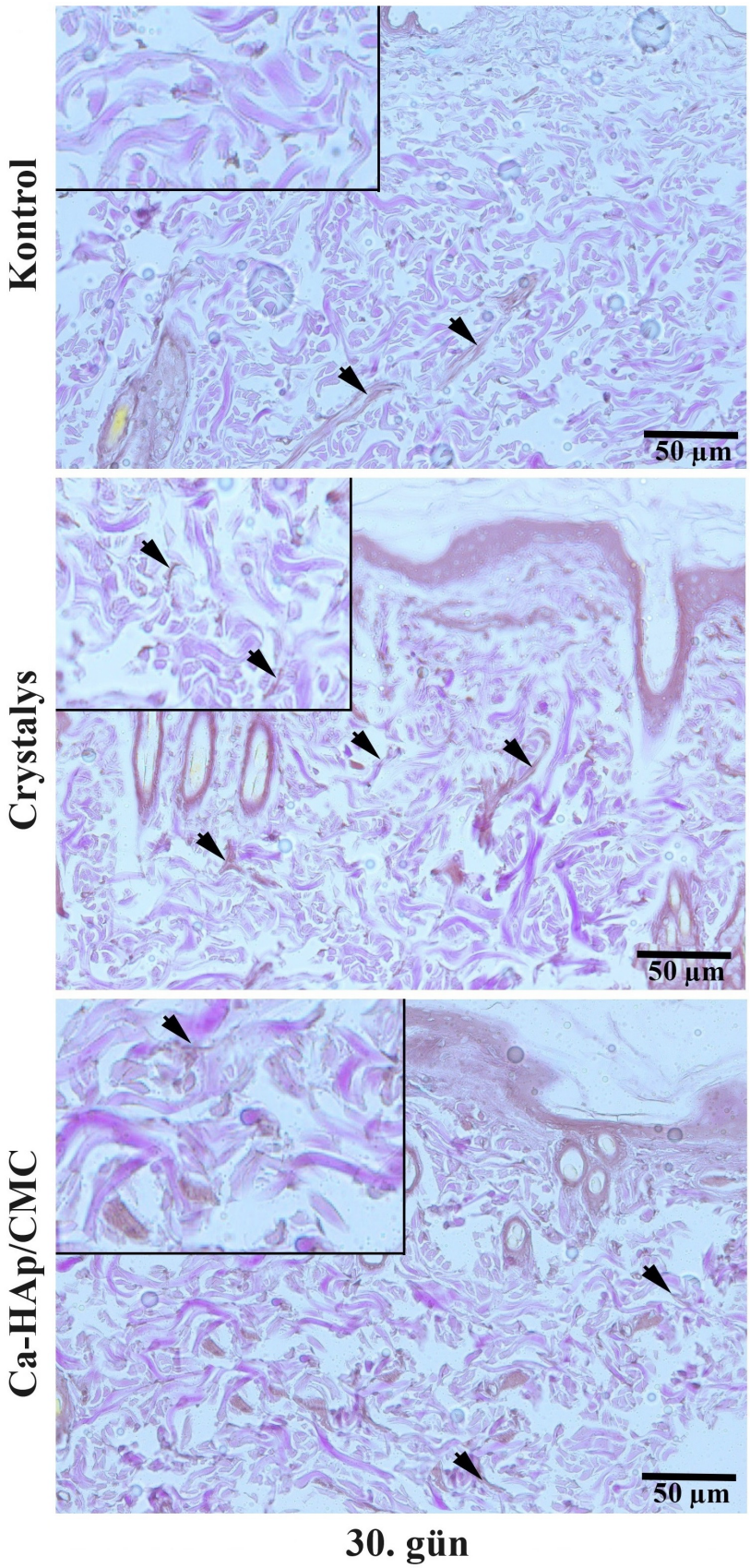
Tabloda verilen değerler her gruptaki sıçanların tüm preparatlarının beş ayrı mikroskobik görüntüleme alanından yapılan ölçümlerle elde edilmiştir.

**30. gün gruplarında elastik fiber yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

VG boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen deri dokusu örneklerindeki elastik fiber yoğunluğunun Crystalys grubunda Kontrol ve çalışma grubumuz olan Ca-HAp/CMC gruplarına göre arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak Ca-HAp/CMC ve Kontrol gruplarının karşılaştırmasında sonuçların benzerlik gösterdiği, istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmediği değerlendirilmiştir ($p>0.05$).

Bu değerlendirme ile benzer malzeme içeriğine sahip olmasına rağmen pozitif kontrolümüz olan Crystalys dolgu malzemesinin çalışma kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC dolgu malzemesine göre daha erken süreçte elastik fiber sayısında artış sağlamaya başladığına işaret etmektedir. Bu veri çalışmamızda elde edilen 30. gün kolajen ve fibroblast yoğunluğu verisi ışığında değerlendirildiğinde pozitif kontrol Crystalys dolgu malzemesinin fibroblast aktivasyonu ve elastin oluşumunu tetiklemesi noktasında daha etkili olduğuna işaret etmektedir.

30. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan VG boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.30'da sunulmuştur.




Şekil 4.30. 30. gün Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. Elastik fiber (ok)

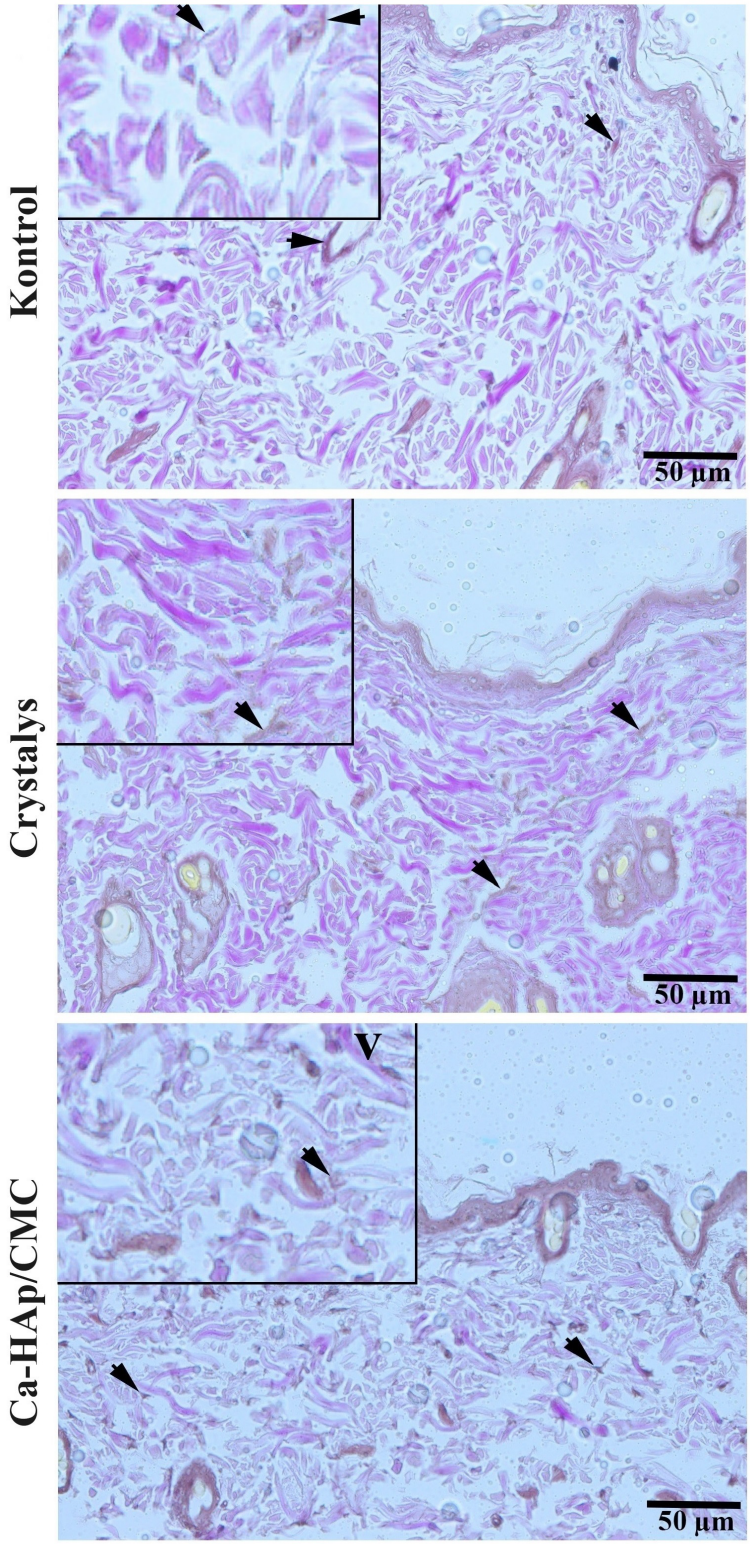
**45. gün gruplarında elastik fiber yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

VG boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen dokulardaki elastik fiber yoğunluğunun Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında Kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin de elastik liflerin üretimini teşvik etme kapasitesine sahip olduğunu ve uygulama sonrası erken dönemde doku elastikiyetini artırdığını göstermektedir. Elastik fiber yoğunluğu açısından Ca-HAp/CMC grubu ile Crystalys grubu karşılaştırıldığında çalışmamızda geliştirilen malzemenin kullanıldığı Ca-HAp/CMC grubunda elastik iplik yoğunluğunun Crystalys grubundan daha yüksek olduğu, ancak iki grubun da yoğunluk açısından anlamlı bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Bu durum, her iki malzemenin de elastik lif üretimini teşvik etme kapasitesinin benzer seviyelerde olduğunu, ancak Ca-HAp/CMC grubunun erken dönemde biraz daha fazla elastik lif üretimi sağladığını göstermektedir. Bu bulgu, Ca-HAp/CMC malzemesinin, Crystalys'e kıyasla elastik lif yoğunluğunu artırmada daha etkili bir performans sergilediğini düşündürmektedir, ancak bu etkinlik her iki malzeme için de benzer düzeyde kalmaktadır.

Yukarıda sunulan verinin, fibroblast ve kolajen yoğunluğu verisi ile uyumlu olduğu dikkate alındığında Crystalys'in erken dönemde elastik fiber üretimini daha belirgin bir şekilde tetikleyebilme potansiyelinin, içeriğindeki yüksek HAp miktarından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. HAp'ın, fibroblast aktivasyonu ve elastin üretimini artırmada önemli bir rol oynayabileceği, dolayısıyla yüksek HAp konsantrasyonunun, elastik liflerin üretimini erken dönemde daha belirgin bir şekilde teşvik edebileceği düşünülmektedir. Buna karşın, 45. gün itibarıyla her iki malzemenin elastik fiber üretiminde benzer etkilere sahip olduğu, uzun vadede etkilerinin benzeşmeye başladığı gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar, HAp içeriğinin, elastik fiber yoğunluğunu artırmada erken dönemde belirgin bir etki sağladığını, ancak uzun vadede her iki malzemenin de elastik lif üretimini desteklemede benzer etkinliği sürdürdüğünü göstermektedir. Bu bulgular, Ca-HAp/CMC malzemesinin, HAp içeriği daha düşük olmasına rağmen elastik fiber üretiminde potansiyel olarak etkili bir alternatif sunduğunu ortaya koymaktadır.

45. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan VG boyamasına ait örnek preparatlar Şekil 4.31'de sunulmuştur.




Şekil 4.31. 45. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x.
(Oklar; elastik lif)

**60. gün gruplarında elastik fiber yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

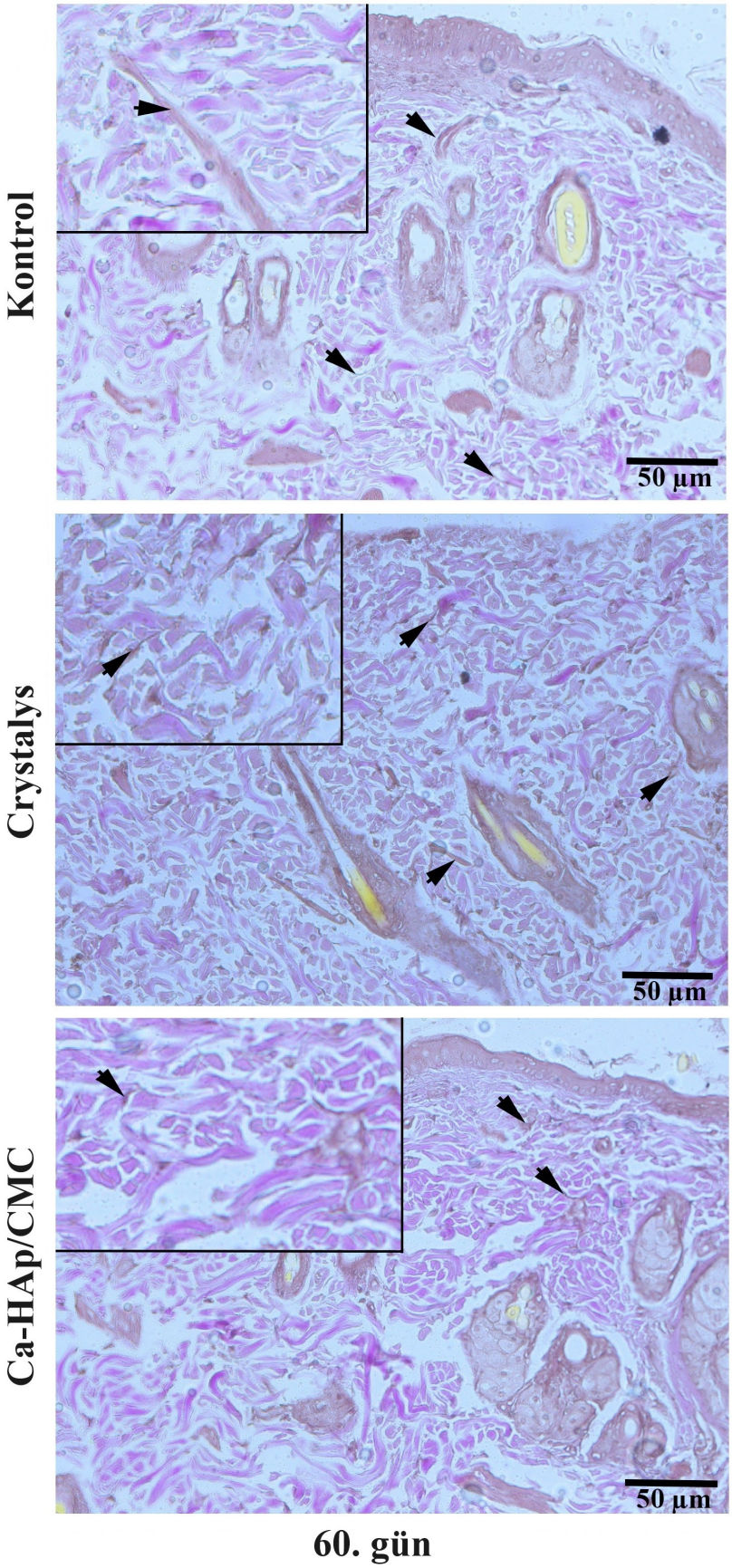
VG boyaması sonuçlarına göre değerlendirilen doku örneklerindeki elastik fiber yoğunluğu açısından 60. gün itibarıyla Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu bulgu, her iki malzemenin de elastik fiber oluşumunu benzer derecede desteklediğini göstermektedir. Bununla birlikte hem Crystalys hem de Ca-HAp/CMC gruplarında, Kontrol grubuna kıyasla elastik fiber yoğunluğunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$), bu da her iki dolgu malzemesinin de doku elastikiyeti üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın sonuçları, elastik fiber yoğunluğu verilerinin 60. gün karşılaştırmasında Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları arasında anlamlı bir fark olmamasının, özellikle 45. gün verisiyle karşılaştırıldığında, geliştirilen Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin Crystalys'e kıyasla daha uzun süreli bir etkinlik sağladığını düşündürmektedir. Bu durum, HAp içeren dermal dolgu malzemelerinin uygulamadan ortalama 1,5-2 ay sonra elastin oluşumunu tetikleme noktasında stabil bir etkinliğe ulaştığını ve zamanla bu etkinin daha da belirgin hale geldiğini işaret etmektedir. Özellikle HAp içeriğinin elastik fiber yoğunluğuna etkisi, uygulama sonrası uzun dönem etkinlik açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Bu bulgu, geliştirilen dolgu malzemesinin uzun vadeli cilt elastikiyeti sağlama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir ve klinik kullanımda uzun süreli etkinlik arayışında olan uygulayıcılar için önemli bir avantaj sunmaktadır.

Ayrıca, VG boyamasıyla yapılan analizlerde 60. gün gruplarına ait doku örneklerinde, her iki dolgu malzemesinin de elastik fiber oluşumunu desteklediği ve bu etkilerin kontrol grubuna kıyasla belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin, elastik fiber oluşumunu teşvik etme yeteneğini ve dolayısıyla dermal dolgular arasında potansiyel olarak rekabetçi bir seçenek olarak konumlandığını göstermektedir.

60. gün gruplarına ait doku örneklerinin VG boyaması ile elde edilen örnek preparatları Şekil 4.32'de sunulmuş olup, bu bulguların görsel olarak da desteklendiği gözlemlenmektedir.




Şekil 4.32. 60. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. (Oklar; elastik lif)

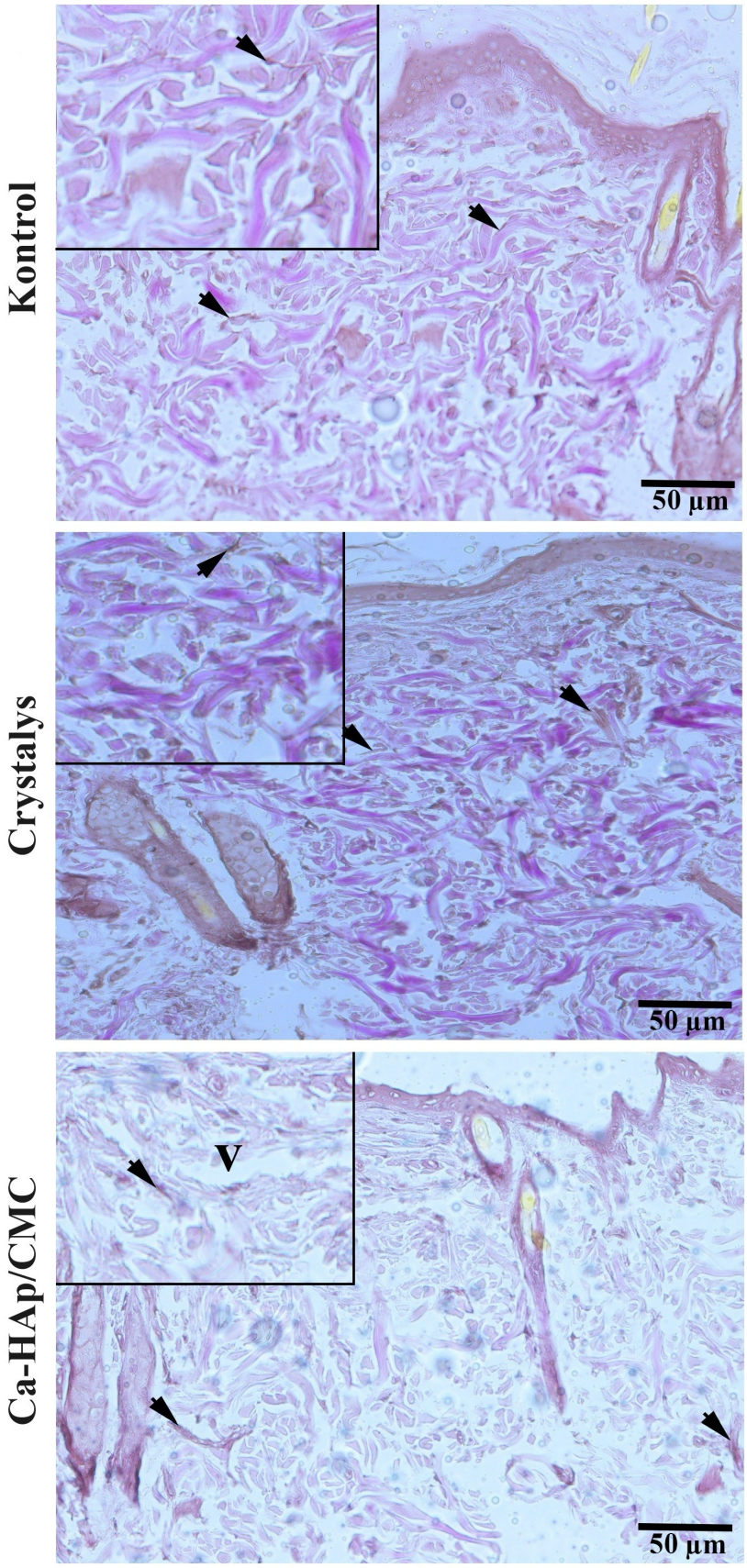
**90. gün gruplarında elastik fiber yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

VG boyaması sonuçlarına göre 90. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesi elastik fiber yoğunluğunun hem Crystalys hem de Ca-HAp/CMC gruplarında, Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur ($p<0.05$). Bu artış, her iki malzemenin de dermal dokularda elastik fiber oluşumunu etkin bir şekilde teşvik ettiğini ve doku esnekliğini artırmada önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Diğer yandan Ca-HAp/CMC grubunda ölçülen elastik fiber yoğunluğu, kantitatif olarak Crystalys grubuna yakın olmasına rağmen, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu durum, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin Crystalys ile benzer düzeyde bir etki gösterdiğini ve elastik fiber oluşumu açısından en az Crystalys kadar etkili olduğunu göstermektedir.

Yukarıda sunulan veriler 30, 45 ve 60. gün bulguları ile karşılaştırıldığında, elastik fiber yoğunluğu açısından zamanla oluşan etkilerin benzer bir eğilim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle 30. ve 45. günlerde gözlemlenen erken dönem etkilerinin, 60. ve 90. günlerde daha stabil ve uzun vadeli sonuçlara dönüştüğü anlaşılmaktadır. Bu durum hem Crystalys hem de Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin, uygulamadan sonraki kronik süreçte elastik fiber yoğunluğunu artırmada sürdürülebilir bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, HAp içeren dermal dolgu malzemelerinin, uzun vadede doku esnekliğini artırma ve elastin oluşumunu teşvik etme yeteneği, bu malzemelerin klinik uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılabileceğini işaret etmektedir.

Ek olarak, bu bulgular, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin Crystalys'e kıyasla maliyet-fayda açısından daha avantajlı olabileceğini de düşündürmektedir. Crystalys'in bilinen biyouyumluluğu ve etkinliği göz önüne alındığında, benzer etkiler sunan Ca-HAp/CMC malzemesinin daha düşük maliyetle üretilebilmesi, özellikle uzun süreli klinik kullanımlarda tercih edilebilirliğini artırabiliceği değerlendirilmiştir. Ayrıca, HAp içeren dolgu malzemelerinin elastik fiber oluşumunu teşvik etme yeteneği, yaşlanma karşıtı tedaviler ve dermal rejenerasyon uygulamaları açısından da büyük bir potansiyele işaret etmektedir.

90. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan VG boyamasına ait örnek preparatlar, Şekil 4.33'te sunulmuş olup, bu bulguların görsel olarak da desteklendiği görülmektedir.




Şekil 4.33. 90. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. (Oklar; elastik lif)

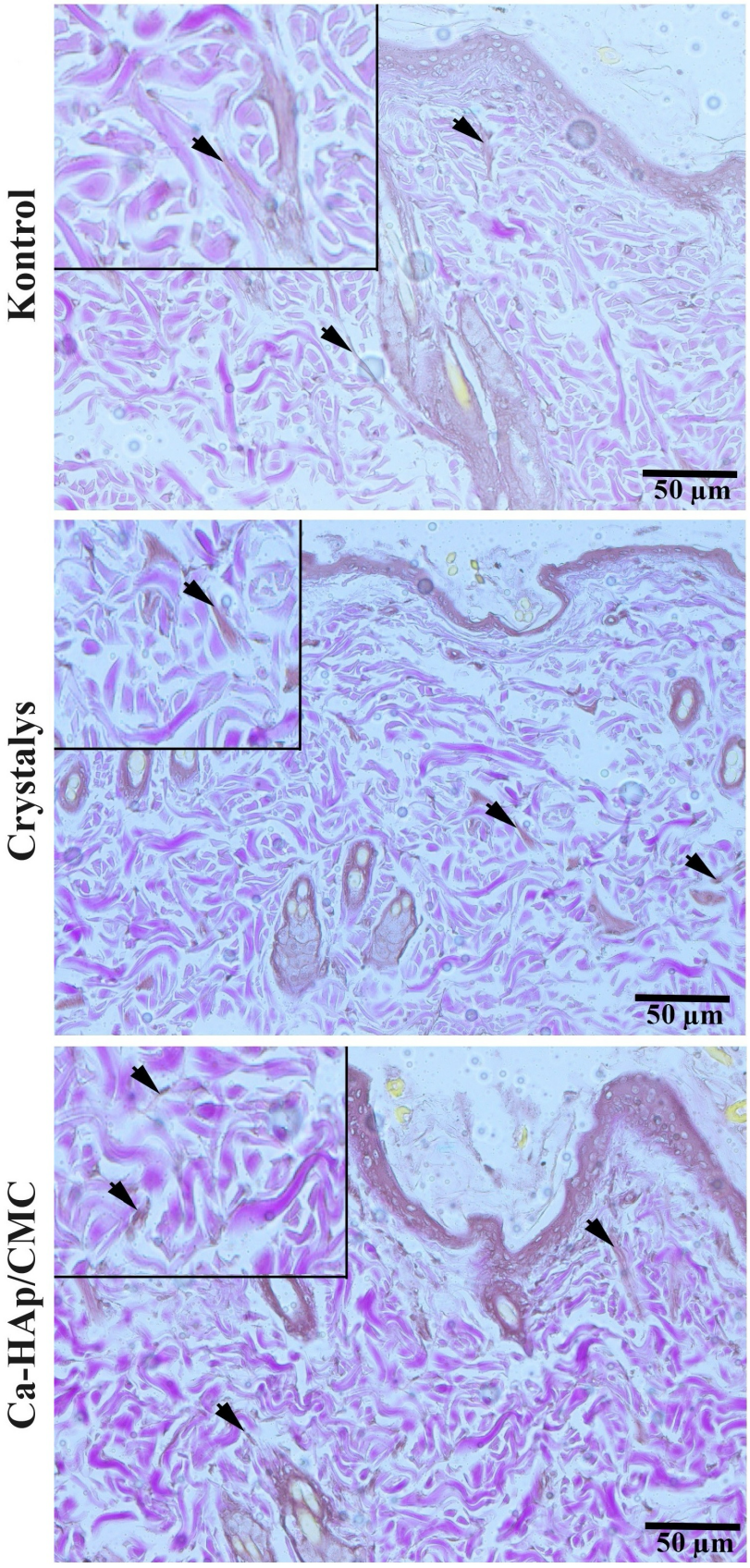
**120. gün gruplarında elastik fiber yoğunluğunun değerlendirilmesi;**

120. gün sonunda alınan doku kesitlerinin VG boyaması ile yapılan değerlendirmesi, Crystalys ve Ca-HAp/CMC gruplarında elastik fiber yoğunluğunun Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymuştur ($p<0.05$). Bu bulgu, her iki dolgu malzemesinin de uzun vadede elastik fiber oluşumunu desteklediğini ve dermal dokunun esnekliğini artırmada etkili olduğunu göstermektedir. Ca-HAp/CMC grubunda ölçülen elastik fiber yoğunluğu, kantitatif açıdan Crystalys grubundan minimal düzeyde daha yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç, Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin elastik fiber oluşumu üzerinde Crystalys ile benzer bir etkinlik düzeyine sahip olduğunu işaret etmektedir.

120. gün analizlerinden elde edilen veriler, daha önce sunulan 60. ve 90. gün bulgularıyla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar, her iki malzemenin de uygulamadan sonraki kronik süreçte elastik fiber yoğunluğu üzerinde kalıcı ve sürdürülebilir bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle 60, 90 ve 120 günlük verilerin bir arada değerlendirilmesi, Crystalys ve Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin elastik fiber yoğunluğunda anlamlı derecede artış meydana getirdiğini ve bu etkinin zamanla korunduğunu göstermektedir.

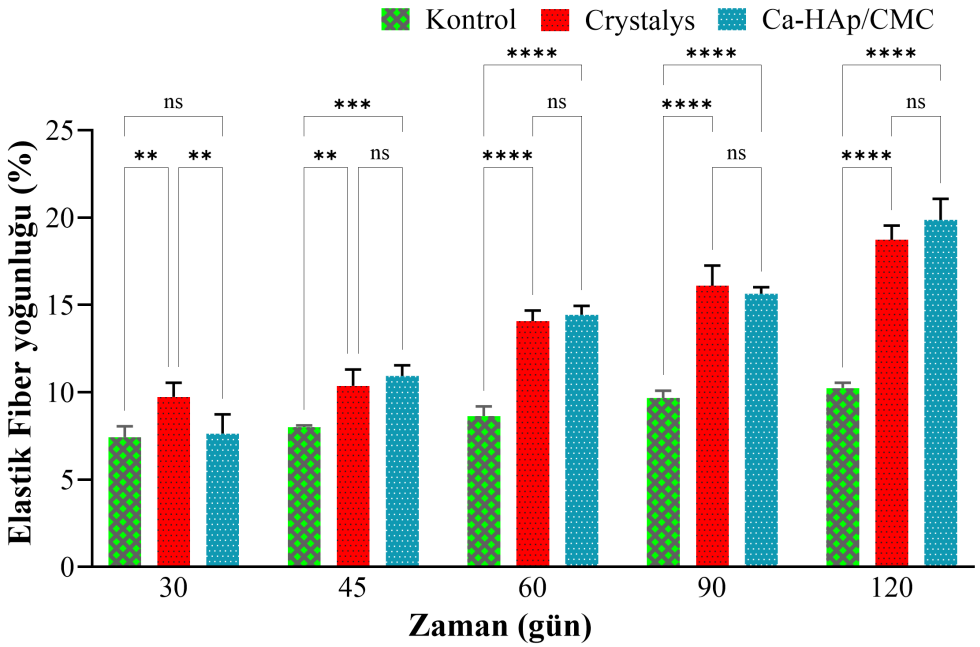
Bu bulgular, çalışmamız kapsamında geliştirilen Ca-HAp/CMC jel dolgu malzemesinin fibroblast aktivasyonunu başarılı bir şekilde tetiklediğini ve buna bağlı olarak elastik fiber üretimini desteklediğini güçlü bir şekilde göstermektedir. Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin, Crystalys'e kıyasla benzer biyouyumluluk ve etkinlik sunması, bu malzemenin dermal dolgu uygulamalarında kullanılabilirliğini ve klinik değerini artırmaktadır. Ayrıca, elastik fiber oluşumunu uzun vadede destekleme yeteneği, Ca-HAp/CMC jel dolgu malzemesinin özellikle yaşlanma karşıtı tedavilerde etkili bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

120. gün gruplarına ait doku örneklerinde yapılan VG boyamasına ait örnek preparatlar ise Şekil 4.34'te sunulmuş olup, yukarıda verilen bulguların görsel doğrulaması olarak önem taşımaktadır. Bu preparatlar, elastik fiber yoğunluğundaki artışın mikroskobik düzeyde de belirgin olduğunu ve elde edilen verilerin klinik uygulamalar açısından anlamlı çıkarımlar sağladığını göstermektedir.




Şekil 4.34. 120. gün, Kontrol, Crystalys ve Ca-HAp/CMC grupları. VG, 20x. (Oklar; elastik lif)

Yukarıda her periyotta alınan numunelerin incelenmesinden elde edilen sonuçlar paylaşılmış olup her preparatta Image J yazılımı kullanılarak beş ayrı alanın incelenmesiyle tespit edilen elastik fiber ortalamalarına ilişkin "iki yönlü varyans (ANOVA) analizi ile Tukey testi kullanılarak yapılan gruplar arası çoklu istatistiksel karşılaştırmalar" Şekil 4.35'te gösterilmektedir.




Şekil 4.35. Günlere göre ortalama elastik fiber yoğunluğu dağılımı.

Hata çubukları, preparat başına beş ayrı alanda tespit edilen elastik fiber yoğunluğu ortalamalarının standart hatasına karşılık gelmektedir. ns; istatiksel olarak farksız, **; p<0.01, ***; p<0.001 ve ****; p < 0,0001 Tukey'nin çoklu aralık testleri ile kontrol ve çalışılan diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC grubuna ait farklı periyot örneklerinin elastik fiber yoğunluğu açısından karşılaştırmasında farklı periyotlar arasında benzeşme ve farklılaşmaların olduğu gözlenmekle beraber deneysel çalışmanın başından sonuna kadar devam eden süreçte dokudaki elastik fiber artışının tedricen sürdüğü, buna bağlı olarak da geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme açısından etkin ve başarılı şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Elastik fiber yoğunluğunun periyotlar arasındaki istatistiksel karşılaştırması Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Ca-HAp/CMC grubunda tüm periyotlarda alınan numunelerin elastik fiber yoğunluğu açısından grup içi karşılaştırmaları

| Tukey çoklu karşılaştırmalar testi | Anlamlılık düzeyi | Uyarlanmış P Değeri |
|---|---|---|
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 45. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.8165 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0004 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 30. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 60. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.0881 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0006 |
| 45. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | **** | <0.0001 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 90. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.8653 |
| 60. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | *** | 0.0009 |
| 90. gün: Ca-HAp/CMC vs. 120. gün: Ca-HAp/CMC | ns | 0.1294 |

Tabloda iki yönlü varyans analizi (ANOVA) post hoc Tukey çoklu karşılaştırmalar testi sonuçları verilmiştir. ns; istatiksel olarak farksız, ***; $p<0.001$, ****; $p<0.0001$

**Elastik fiber yoğunluğu tüm periyotlar açısından değerlendirildiğinde;**

Herhangi bir muameleye tabi tutulmamış veya bir uygulamaya maruz bırakılmamış sıçan cilt altı dokusunun VG boyaması ile elde edilen doku kesitleri incelendiğinde, epidermis, dermis ve subkutan bölgede dallanmış, kısa ve ince elastik liflerin bulunduğu, bu liflerin yoğunluğunun sıçan yaşına göre değişkenlik gösterebileceği bilinmektedir.

Marian ve ark. tarafından yapılan, dermiste sınırlı sayıda ve zayıf nitelikte elastik liflerin görüldüğü, subkutan dokuda ise neredeyse hiç tespit edilemediği ve lifler arasında boş alanların görüldüğü yaşlı ratların kullanıldığı bir çalışmada HAc enjekte edilen subkutan uygulama bölgesinde dallanmış elastik liflerin göze çarptığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, hem 7. hem de 60. gün sakrifiye edilen ratlarda yapılan HAc subkutan uygulamada subkutan bölgede uzun dallı paralel elastik liflerin varlığı tespit edilirken, 90. gün sakrifiye edilen grupta kısa dallı elastik lifler görüldüğü rapor edilmiştir [165]. Çalışmamızda ise hem pozitif kontrol (Crystalys) hem de kendi geliştirdiğimiz malzememiz olan Ca-HAp/CMC elastik iplik yoğunluğunda artışı tetiklese de bu ipliklerin kalınlık ve boyutlarına dair bir analiz bulunmadığından bu hususta bir değerlendirme yapılamamaktadır. Diğer yandan çalışmamızda üretilen malzemenin uygulandığı bölgelerde pozitif kontrol grubumuz ile uyumlu olarak zaman içerisinde elastik fiber sayısında artış meydana geldiği istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

Benzer çalışmalarda uygulama yapılan enjeksiyon bölgelerinde yeni sentezlenmiş elastin liflerinin varlığına dair bulgular paylaşılmıştır. Yeni kolajen ve elastik liflerin doku-dolgu arayüzünde hizalandığı gözlenmiş, dermal elastin proteini ekspresyonunun HAc enjekte edilen hayvanlarda 4, 8 ve 12. haftalarda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ve enjeksiyondan sonraki 4. ve 8. haftalarda maksimum düzeyde eksprese edildiğine vurgu yapılmıştır [181]. Bu bilgiyle uyumlu olarak çalışmamızda gen ekspresyonu analizi yapılmamış olmakla birlikte tüm periyotlarda alınan doku örneklerinde elastik fiber yoğunluğunda Kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda uygulanan Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin, literatürde vurgulanan HAc etkisiyle benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır.

Dermal dolgu malzemesi olarak HAc-mikroHAp ve HAc-nanoHAp kullanılan bir çalışmada elastik fiber yoğunluğunun kontrol olarak uygulanan Radiesse ve Restylane grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [169]. Radiesse dolgu malzemesinin çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC ile aynı içerik ve özelliklerde olduğu dikkate alındığında malzememizin HAc-mikroHAp içeren malzemelere göre elastik fiber yoğunluğu açısından daha az etkin olabileceği düşünülse de bu kapsamda pozitif kontrol grubu olarak HAc içeren malzeme kullanmadığımız için bu husus değerlendirilememiştir. Ancak literatürde yapılan kıyaslamada HAc ve HAp'ın fibroblast aktivasyonu ve elastik fiber üretimi noktasında benzer etki gösterdikleri görülmektedir. Fan ve ark.'nın çalışmalarında, HAc ve mikroHAp veya nanoHAp'ın birlikte kullanılmasının iki etken malzemenin sinerjik etkisiyle uygulanan dolgu malzemesinin elastik fiber üretimi noktasındaki başarısını saf HAc ve HAp malzemelerine göre artırmış olabileceği düşünülmüştür.

## 4.4. Maliyet-Fayda Etkinlik Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında geliştirilen Ca-HAp/CMC jel ogmentasyon malzemesinin;

- Yukarıda belirtilen üretim süreçleri, kullanılan ekipman ve kimyasal materyal dikkate alındığında ticari muadillerine göre daha ucuz olma potansiyeli bulunduğu, bu da son ürünün piyasaya daha rekabetçi bir fiyatla sunulmasını sağlayacağı,

- Malzemenin oda koşullarında uzun süre bozunmadan muhafaza edilebileceği, bu açıdan ek muhafaza ekipmanı ve koşullarına ihtiyaç duyulmadığı, dolayısıyla depolama ve lojistik süreçlerinde önemli maliyet tasarrufları sağlayacağı,

- Klinik uygulama aşamasında minimal düzeyde medikal ekipman ihtiyacı olduğu, uygulama için operasyon odası veya özel bir alana ihtiyaç bulunmadığı gibi spesifik anestezi ekipman ve malzemesi gerektirmediği, uygun poliklinik koşullarında tek kişi tarafından uygulanabileceği, uygulamanın hızlı ve pratik olacağı ve sağlık hizmetleri sağlayıcılarının iş yükünü hafifleteceği,

- Malzemenin biyouyumluluğu dikkate alındığında uygulama sonrasında klinik sorun oluşmadığı, şahsın özel bakım veya ek tedavi ihtiyacı olmadığı dikkate alındığında,

maliyet-fayda açısından son derece etkin, klinik olarak kolay uygulanabilir ve hasta konforunu en üst düzeye çıkaran bir seçenek olduğu anlaşılmaktadır.

# 5. YORUM

Yapılan tez çalışması kapsamında, etkinliği ve biyouyumluluğu önceden kanıtlanmış dermal dolgu malzemelerinde sıkça kullanılmakta olan selüloz tabanlı bir jel olan karboksimetil selüloz (CMC) içerisinde dağıtılan ve kimyasal, termal, morfolojik ve reolojik açılardan etraflıca değerlendirilen hidroksiapatit mikroküreleri (HA) birleşimi ile geliştirilen Ca-HAp/CMC ürünümüzün suni destek yapı formülasyonunun tüm karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Dahası sitotoksisite testleri yapılarak klinik kullanım açısından uygun olduğu değerlendirilmiş ve *in vivo* sıçan deri altı deney modelinde yumuşak doku onarımı/ogmentasyonundaki etkinliği ve başarısı detaylıca yansıtılmıştır.

Geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC dolgu malzememizin fizikokimyasal açıdan tüm özelliklerinin belirlenmesi amacıyla aşağıda listelenen karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Tez çalışması kapsamında hazırlanan yumuşak doku dolgu maddesinin ve bileşenlerinin ayrı ayrı kimyasal yapı analizleri ATR-FTIR ile ortaya konmuştur.
- ✓ Sentezlenen nihai ürün ve bileşenlerinin faz analizleri, X-ışını kırınımı ile, $2\theta=10^{o}$-90° arasında, 2°/dk tarama hızında ve Cu-Kα radyasyonu ile gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Hazırlanan Ca-HAp/CMC jel formülasyonun termal kararlılığını incelemek amacı ile TGA analizleri yapılmıştır.
- ✓ HAp mikroküre lerinin yüzey morfolojileri, partikül boyutları ve elemental analizleri SEM yöntemi ile karakterize edilmiştir.
- ✓ Ca-HAp/CMC jel formülasyonun olası ağır metal içeriği ICP-MS sistemi ile analiz edilmiştir.
- ✓ Klinisyenlerin malzememizi yumuşak doku içine enjekte ederken uygulayacakları güç/kuvvet hakkında fikir edinilmesi amacıyla enjeksiyon (ekstrüzyon) kuvveti ölçümleri gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Geliştirdiğimiz malzemenin reolojik özellikleri kapsamında faz açısı, depolama (elastik) modülü, kayıp (viskoz) modülü, kompleks modül, kompleks ve dinamik viskozite değerleri saptanmıştır.

Yapılan kimyasal ve morfolojik karakterizasyon çalışmalar neticesinde malzememizin saf HAp özelliklerini gösterdiği, nihai ürün formundaki bileşenlerin Ca-HAp kristal yapısı ile etkileşime girmediği, HAp morfolojisi, fonksiyonel grupları, yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerinin etkilenmediği, HAp mikrokürelerinin doku integrasyonu için literatürde belirtilen optimal özellikleri taşıdığı ve malzememizin biyoaktif fazı olan HAp'ın insan doku içerisinde de fonksiyonel açıdan etkin olabileceği ön görülmüştür. Geliştirilen ürünümüzün sentez, muhafaza, uygulama süreci ve uygulanan dokuya ait fizyolojik nitelikler dikkate alındığında ise gliserol ve CMC'nin taşıyıcı faz olarak uygun olduğu ve jel dolgu malzemesi olarak uygulanmasının fizyolojik açıdan etkin olduğu anlaşılmıştır.

SEM elemental analiz yöntemiyle HAp mikrokürelerinin literatürdeki stokiyometrik oranlarda olduğu tespit edilmiş olup ürünümüzün bileşenlerinin biyoaktif formu olan seramik fazın nihai ürünün etkinliğine, biyouyumluluğuna ve biyoaktifliğine yaptığı katkıya işaret ettiği belirlenmiştir. Malzememizin ağır metal içeriği bakımından toksik etki oluşturacak yapıda olmadığı, ASTM F1185-03 standardı eser element düzeylerine göre ürünümüzün cerrahi implant malzemesi olarak kullanıma uygun olduğu, süregen kullanımda da organizma açısından herhangi bir risk taşımadığı ortaya konmuştur. Çalışmamızda geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin ekstrüzyon kuvvetine ilişkin analiz, basit bir uygulama ile cerrahi bölgede düzgün bir enjeksiyonun gerçekleştirilmesi için uygun formda olduğu, düşük kuvvetler altında jel benzeri elastik davranış, yüksek kuvvetler altında ise viskoz davranışlar göstereceği, bu bağlamda, malzememizin düzgün ve kontrollü bir enjeksiyon sağlamak için gerekli mekanik özellikleri taşıdığını ve dolayısıyla yumuşak doku ogmentasyon malzemesi olarak cerrahi bölgelerde güvenli bir şekilde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Malzememizin yumuşak dokuda insan hücresi ile etkileşimini ve hücrelere olası sitotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla yapılan MTT testi ile uygulanan Ca-HAp/CMC dozlarından yalnızca en yüksek konsantrasyonun (20 mg/mL), sağlıklı İDF hücrelerinin canlılığını %50 oranında ($IC_{50}$) azaltmaya başlattığı ortaya konmuştur. Tespit edilen bulgular ışığında 10 mg/mL'ye kadar olan tüm konsantrasyonların uygulandığı sağlıklı hücrelerin umut verici canlılık profiline sahip oldukları gözlenmiştir. Bu analiz sonucuna göre Ca-HAp/CMC dolgu malzememizin biyouyumlu olduğu, optimal dozda uygulamanın İDF hücre canlılığı üzerinde toksik etki oluşturmayacağı,

geliştirilen formülasyonun uygulanan anatomik bölgede doku hücrelerinin büyümesi ve proliferasyonu için uygun ortam oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

*In vivo* deney modelinde alınan doku kesitlerinde test edilen malzememizin H&E, Trikrom ve VG boyamaları sonucunda kolajen-elastik fiber-fibroblast yoğunlukları ve epidermis-dermis kalınlıkları açısından enjeksiyon bölgesindeki başarısı ortaya konmuştur. Geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC dolgu malzemesine dair incelenen tüm çalışma periyotlarında uygulama yapılan organizma, anatomik bölge ve konak doku yanıtlarının çok iyi olduğu gözlenmiştir. Deney süreci boyunca dolgu malzemelerine karşı akut ya da kronik enflamatuar reaksiyon, uygulama alanında yabancı cisim reaksiyonu, anormal oluşum, düzensizlik, granülasyon dokusu, konak doku nekrozu, başkaca malign veya benign lezyona rastlanılmamıştır. Bu bulgularla malzememizin yüksek biyouyumluluk niteliğinde olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamız süresince tüm periyotlarda yapılan kolajen yoğunluk değerlendirmesinde;

- ✓ Ca-HAp/CMC jel malzememizin uygulandığı doku örneklerinde kolajen yoğunluğunda uygulamadan itibaren, kontrol grubuna göre 30.gün sonunda %2,29; 45.gün sonunda %5,53; 60.gün sonunda %8,27; 90.gün sonunda %12,33; 120.gün sonunda %12,77 oranında artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir.
- ✓ Ca-HAp/CMC malzememizin kolajen yoğunluğuna etkisinin araştırıldığı çalışmamızda grup içi periyotların karşılaştırmasında 45 ile 60 ve 90 ile 120 günlük doku örnekleri arasında kolajen yoğunluğunda ilerleyen süreçle artış eğilimi devam etmekle birlikte anlamlı farklılıkların gözlenmediği, diğer tüm periyotlarda önceki periyotlara göre kolajen yoğunluğunun çok anlamlı derecede ($p<0.0001$) yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Ca-HAp/CMC yumuşak doku ogmentasyon malzememizin enjekte edildiği sıçan deri dokusunda kolajen yoğunluğunun 30. gün sonunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ve pozitif kontrolden anlamlı düzeyde düşük olduğu; 90. gün grubunda ise hem kontrol hem de pozitif kontrol grubundan anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer çalışma periyotlarında (45, 60, 120) ise pozitif kontrol grubuyla aralarında minimal farklılıklar olmakla birlikte anlamlı bir fark gözlenmediği, tüm periyotlar (30, 45, 60, 90, 120) süresince kontrol grubuna göre anlamlı derede yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

Kolajen yoğunluğu değerlendirmesine dair bulgular ışığında geliştirilen dolgu malzemesinin deri/deri altı dokuların önemli bir yapısal bileşeni olan kolajenin yoğunluğunu metinde tarif edilen biyolojik mekanizmalarla arttırma noktasında etkin ve başarılı olduğu, bunun malzemeden beklenen klinik etkiye ulaşmayı sağlayacağı değerlendirilmiştir.

Çalışmanın tüm periyotlarında yapılan fibroblast yoğunluk değerlendirmesinde;

- ✓ Ca-HAp/CMC yumuşak doku ogmentasyon malzememizin enjekte edildiği sıçan deri dokusunda fibroblast yoğunluğunun 30. gün sonunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ve pozitif kontrolden anlamlı düzeyde düşük olduğu; 45. gün grubunda ise hem kontrol hem de pozitif kontrol grubundan anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer çalışma periyotlarında (60, 90, 120) ise pozitif kontrol grubuyla aralarında minimal farklılıklar olmakla birlikte anlamlı bir fark gözlenmediği, tüm periyotlar (30, 45, 60, 90, 120) süresince kontrol grubuna göre anlamlı derede yüksek olduğu değerlendirilmiştir.
- ✓ Ca-HAp/CMC malzememizin fibroblast yoğunluğuna etkisinin araştırıldığı çalışmamızda grup içi periyotların karşılaştırmasında uygulamanın yapıldığı tüm periyotlar arasında anlamlı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Fibroblast yoğunluğuna ilişkin veri kolajen yoğunluğu bağlamında değerlendirildiğinde, çalışmamızda geliştirilen Ca-HAp/CMC jel malzemenin ara periyotta (45.gün) fibroblast yoğunluğunda belirgin artış oluşturmakla birlikte fibroblast aktivasyonu ve bunun kolajen yoğunluğuna yansıması noktasında pozitif kontrole göre daha uzun süreçte etkinliğini gösterdiği kanaati oluşmuştur. Bu farkın her iki malzeme içeriğinde bulunan HAp miktar ve mikroküre niteliklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Hem pozitif kontrol hem de Ca-HAp/CMC dolgu malzemelerinin uygulamadan sonraki kronik süreçte (60 gün ve sonrası) fibroblast ve kolajen yoğunluğu açısından benzer etkiler gösterdiği anlaşılmıştır.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin de hidrojel niteliği taşıması nedeniyle literatürle uyumlu şekilde fibroblast aktivasyonu yaparak kolajen yoğunluğunu arttırma potansiyeli olduğu, bu durumun subkutan dolgu malzemesi

uygulaması açısından önemli olduğu, geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme noktasında etkin olabileceği değerlendirilmiştir.

Epidermis ve dermis kalınlıkları tüm periyotlar açısından değerlendirildiğinde;

- ✓ Deri altı dolgu uygulamalarını müteakiben erken evrede uygulamanın fiziksel lokal uyarımına bir yanıt olarak tüm deri katmanlarında fizyolojik enflamatuar reaksiyona bağlı hafif ödem ve kalınlaşma beklense de bu patofizyolojik sürecin birkaç gün içerisinde sonlandığı ve epidermis-dermisin olağan haline döndüğü ve yapılan ölçümlerin bu husus dikkate alınarak yapılması gerektiği bilinmektedir. Tüm periyotların sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde epidermis kalınlıkları bakımından tüm deney grupları arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.
- ✓ 30. gün sonunda alınan deri dokusu örneklerinin değerlendirmesinde dermis kalınlıkları bakımından kontrol, pozitif kontrol ve malzememiz arasında minimal ölçüm farklılıkları olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir fark izlenmemiştir. Ancak ilerleyen periyotlarda pozitif kontrol ve malzemizin uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre dermis kalınlığında anlamlı artış olduğu dikkati çekmiştir.
- ✓ Ca-HAp/CMC malzememizin dermis kalınlığına etkisinin araştırıldığı çalışmamızda grup içi periyotların karşılaştırılmasında 45 ile 60 ve 90 ile 120 günlük doku örnekleri arasında dermis kalınlığında, kolajen yoğunluğu verisi ile uyumlu olarak anlamlı farklılıkların gözlenmediği, diğer tüm ileriki periyotlarda önceki periyotlara göre dermis kalınlığındaki artışın anlamlı derecelerde yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak artan dermis kalınlığının aynı periyotlarda artmış fibroblast ve kolajen yoğunluğu ile kolere şekilde değişkenlik gösterdiği ve bu durumun dermis kalınlaşmasına yönelik literatürde yapılan "artmış dermis kalınlığının, dermal yapıyı dolgunlaştırıp yoğunlaştıran hücre proliferasyonu ve artan kolajen yoğunluğu ile ilişkilendiren" patofizyolojik açıklamayı desteklediği değerlendirilmiştir.
- ✓ Çalışmamızda beş farklı periyotta dört aylık süreçte yapılan kronik gözlemde HAp mikroküreleri içeren Ca-HAp/CMC dolgu malzememizin kolajen ve

fibroblast yoğunluğu artışına bağlı olarak dermal kalınlıkta kontrol grubuna göre anlamlı artış sağladığı ve bu verinin HAp'ın etkinliğini ortaya koyduğu değerlendirilmiştir.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC grubuna ait doku örneklerinin dermis kalınlıkları açısından karşılaştırmasında farklı periyotlar arasında benzeşme ve farklılaşmaların olduğu gözlenmekle beraber 30. günden başlayarak 120. güne kadar devam eden süreçte dermis kalınlığındaki artışın tedricen sürdüğü, buna bağlı olarak da geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme yönünde etkin ve başarılı şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Elastik fiber yoğunluğu tüm periyotlar açısından değerlendirildiğinde;

- ✓ Ca-HAp/CMC jel malzememizin uygulandığı doku örneklerinde elastik fiber yoğunluğunda, kontrol grubuna göre 30. gün sonunda %0.2; 45.gün sonunda %2,93; 60.gün sonunda %5,8; 90.gün sonunda %5,96; 120.gün sonunda %9,64 oranında artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir.
- ✓ 30 günlük deri dokusu örneklerindeki elastik fiber yoğunluğunda Ca-HAp/CMC ve kontrol gruplarının karşılaştırmasında sonuçların benzerlik gösterdiği, istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmediği anlaşılmakla bu veri malzememizin elastik fiber yoğunluğu açısından 1. ayda yeterli etkinlik göstermediği şeklinde değerlendirilmiş, aksine pozitif kontrolün hafif düzeyde de olsa elastik fiber yoğunluğunda artış sağladığı gözlenmiştir.
- ✓ 45, 60, 90 ve 120 günde alınan doku örneklerinde elastik fiber yoğunluğunun pozitif kontrol ve Ca-HAp/CMC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği, bu periyotlarda elastik fiber yoğunluğu açısından malzememizin pozitif kontrole göre kantitatif açıdan yüksek olmakla birlikte her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı, etkilerinin uygulamadan 1,5 ay sonra deney sonuna kadar benzer nitelikte olduğu saptanmıştır.
- ✓ Pozitif kontrolün elastik fiber üretimini tetikleme potansiyelinin erken dönemde malzememize göre daha yüksek olduğu, ancak takip eden süreçte etkilerinin benzeştiği, bu durumun pozitif kontroldeki HAp miktarının geliştirdiğimiz malzemenin HAp içeriğinden daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği, dolayısıyla HAp miktarının erken dönemde fibroblast etkinliği ve elastin üretme

potansiyeli açısından önemli olduğu değerlendirilmiştir. Erken dönemde malzeme içeriğindeki HAp miktarının malzeme etkinliğini artırdığı ancak HAp içeren dermal dolgu malzemelerinin uygulamadan ortalama 1,5-2 ay sonra elastin oluşumunu tetikleme noktasında stabil etkinliğe kavuştuğuna işaret etmektedir.

- ✓ Ca-HAp/CMC malzememizin elastik fiber yoğunluğuna etkisinin araştırıldığı çalışmamızda grup içi periyotların karşılaştırılmasında 30 ile 45, 45 ile 60, 60 ile 90 ve 90 ile 120 günlük doku örnekleri arasında elastik fiber yoğunluğunda, kolajen yoğunluğu verisi ile kısmen benzer olarak anlamlı farklılıkların gözlenmediği, diğer tüm periyotlarda önceki periyotlara göre elastik lif yoğunluğundaki artışın anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında üretilen Ca-HAp/CMC grubuna ait farklı periyot örneklerinin elastik fiber yoğunluğu açısından karşılaştırmasında farklı periyotlar arasında benzeşme ve farklılaşmaların olduğu gözlenmekle beraber deneysel çalışmanın başından sonuna kadar devam eden süreçte dokudaki elastik fiber artışının tedricen sürdüğü, buna bağlı olarak da geliştirdiğimiz dolgu malzemesinin klinik uygulamada istenilen sonucu elde etme açısından etkin ve başarılı şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın nihai değerlendirmesinde geliştirdiğimiz Ca-HAp/CMC dolgu malzemesinin uygulandığı deri dokusunda fibroblast, elastik fiber ve kolajen yoğunluklarında meydana getirdiği anlamlı artışın dolaylı olarak dermiste kalınlaşmaya ve sıkılaşmaya yol açtığı gösterilmiş olup, malzememizin yumuşak doku ogmentasyonunda etkili olacağı, herhangi bir komplikasyona neden olmadığı dikkate alındığında da güvenli bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Deney modelinde elde edilen bulgular geliştirdiğimiz malzemenin biyobozunur, biyouyumlu, nonimmünojenik, nontoksik, güvenilir bir malzeme olduğu, uygulama sonrasında komplikasyon oluşturmadığı, klinik olarak ve fiyat fayda dengesi açısından etkin olduğu, ticari muadilleriyle eşdeğer nitelikleri taşıdığı değerlendirilmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında geliştirilen ve yukarıda etraflıca izah edildiği üzere klinik açıdan uygulanabilir niteliği, etkinliği ve başarısı ortaya konan Ca-HAp/CMC jel dolgu malzememizin sanayi desteği ile birlikte ticari ürüne dönüşme ve ulusal ekonomik getiri sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Klinik uygulamalar açısından, rejeneratif biyoaktif moleküllerle sinerjik kullanımlar giderek yaygınlaşmaktadır. Bu bağlamda geliştirdiğimiz biyomateryalin esnek formülasyon yapısı, diğer regeneratif süspansiyonlar ve tedavi yaklaşımlarıyla kombinasyonunu mümkün kılarak birden fazla rejeneratif yolun simultane başlatılması yoluyla tedavi etkinliğini artırma potansiyeli taşıdığı değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, malzememiz bu tür kombine tedavilerin etkinliğinin nicel olarak değerlendirilmesi ve doğrulanması için ileri düzey araştırmalarla geliştirilmeye açıktır.

# 6. KAYNAKLAR


[1] Y. Liang, W. Su, F. Wang, Skin ageing: a progressive, multi-factorial condition demanding an integrated, multilayer-targeted remedy, Clinical, cosmetic and investigational dermatology, (**2023**) 1215-1229.

[2] J. Varani, M.K. Dame, L. Rittie, S.E. Fligiel, S. Kang, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation, The American journal of pathology, 168 (**2006**) 1861-1868.

[3] M.A. Cole, T. Quan, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging, Journal of cell communication and signaling, 12 (**2018**) 35-43.

[4] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, Journal of cell science, 123 (**2010**) 4195-4200.

[5] U. Klinge, H. Zheng, Z. Si, V. Schumpelick, R. Bhardwaj, L. Muys, B. Klosterhalfen, Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and-13 in the skin of patients with inguinal hernia, European surgical research, 31 (**1999**) 480-490.

[6] H. Oxlund, J. Manschot, A. Viidik, The role of elastin in the mechanical properties of skin, Journal of biomechanics, 21 (**1988**) 213-218.

[7] D.A. Carrino, J.M. Sorrell, A.I. Caplan, Age-related changes in the proteoglycans of human skin, Archives of biochemistry and biophysics, 373 (**2000**) 91-101.

[8] J.D. Humphrey, E.R. Dufresne, M.A. Schwartz, Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis, Nature reviews Molecular cell biology, 15 (**2014**) 802-812.

[9] B. Kuehlmann, C.A. Bonham, I. Zucal, L. Prantl, G.C. Gurtner, Mechanotransduction in wound healing and fibrosis, Journal of clinical medicine, 9 (**2020**) 1423.

[10] M.A. Carlson, L.M. Smith, C.M. Cordes, J. Chao, J.D. Eudy, Attachment-regulated signaling networks in the fibroblast-populated 3D collagen matrix, Scientific reports, 3 (**2013**) 1880.

[11] M.A. Carlson, J.S. Thompson, Wound matrix attachment regulates actin content and organization in cells of the granulation tissue, Wound repair and regeneration, 13 (**2005**) 84-92.

[12] S.E. Fligiel, J. Varani, S.C. Datta, S. Kang, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro, Journal of Investigative Dermatology, 120 (**2003**) 842-848.

[13] J. Varani, L. Schuger, M.K. Dame, C. Leonard, S.E. Fligiel, S. Kang, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin, Journal of Investigative Dermatology, 122 (**2004**) 1471-1479.

[14] P. Delvoye, P. Wiliquet, J.-L. Levêque, B.V. Nusgens, C.M. Lapière, Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel, Journal of Investigative Dermatology, 97 (**1991**) 898-902.

[15] M. Carlson, J. Eudy, L. Smith, Gene networks involved with mechanoregulation of cell population in the fibroblast-populated 3D collagen matrix, Journal of Surgical Research, 172 (**2012**) 266.

[16] M.A. Carlson, M.T. Longaker, J.S. Thompson, Modulation of FAK, Akt, and p53 by stress release of the Fibroblast-Populated collagen matrix1, 2, Journal of Surgical Research, 120 (**2004**) 171-177.

[17] A.K. Mohiuddin, Skin aging & modern age anti-aging strategies, Int. J. Clin. Dermatol. Res, 7 (**2019**) 209-240.

[18] R.G. Glogau, Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin, Seminars in cutaneous medicine and surgery, **1996**, pp. 134-138.

[19] P.F. Jacovella, Calcium Hydroxylapatite Facial Filler (Radiesse™): Indications, Technique, and Results, Clinics in Plastic Surgery, 33 (**2006**) 511-523.

[20] C.A. Murray, D. Zloty, L. Warshawski, The evolution of soft tissue fillers in clinical practice, Dermatologic clinics, 23 (**2005**) 343-363.

[21] R. Shafir, Liquid injectable silicone: Is there a role as a cosmetic soft-tissue filler?, Plastic and reconstructive surgery, 115 (**2005**) 667.

[22] R.J. Rohrich, J.L. Rios, S. Fagien, Role of New Fillers in Facial Rejuvenation:: A Cautious Outlook, Plastic and reconstructive surgery, 112 (**2003**) 1899-1902.

[23] T.L. Tzikas, Evaluation of the Radiance FN soft tissue filler for facial soft tissue augmentation, Archives of facial plastic surgery, (**2004**).

[24] H. Mehta, A. Bishnoi, S. Dogra, Regenerative medicine in aesthetics, CosmoDerma, 2 (**2022**).

[25] M. Zarbafian, S.G. Fabi, S. Dayan, K. Goldie, The emerging field of regenerative aesthetics—where we are now, Dermatologic Surgery, 48 (**2022**) 101-108.

[26] S. Haddad, H. Galadari, A. Patil, M. Goldust, S. Al Salam, S. Guida, Evaluation of the biostimulatory effects and the level of neocollagenesis of dermal fillers: a review, International Journal of Dermatology, 61 (**2022**) 1284-1288.

[27] N. Zakharov, I. Polunina, K. Polunin, N. Rakitina, E. Kochetkova, N. Sokolova, V. Kalinnikov, Calcium hydroxyapatite for medical applications, Inorganic Materials, 40 (**2004**) 641-648.

[28] S.L. Silvers, J.A. Eviatar, M.I. Echavez, A.L. Pappas, Prospective, open-label, 18-month trial of calcium hydroxylapatite (Radiesse) for facial soft-tissue augmentation in patients with human immunodeficiency virus-associated lipoatrophy: one-year durability, Plastic and reconstructive surgery, 118 (**2006**) 34S-45S.

[29] A. Cuneyt Tas, F. Korkusuz, M. Timucin, N. Akkas, An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 8 (**1997**) 91-96.

[30] M.S. Caicedo, L. Samelko, K. McAllister, J.J. Jacobs, N.J. Hallab, Increasing both CoCrMo-alloy particle size and surface irregularity induces increased macrophage inflammasome activation in vitro potentially through lysosomal destabilization mechanisms, Journal of orthopaedic research, 31 (**2013**) 1633-1642.

[31] L.W. McKeen, The effect of long term thermal exposure on plastics and elastomers, William Andrew**2021**.

[32] C. Nakafuku, S.y. Takehisa, Glass transition and mechanical properties of PLLA and PDLLA-PGA copolymer blends, Journal of applied polymer science, 93 (**2004**) 2164-2173.

[33] Z. Ma, C. Gao, J. Yuan, J. Ji, Y. Gong, J. Shen, Surface modification of poly-L-lactide by photografting of hydrophilic polymers towards improving its hydrophilicity, Journal of applied polymer science, 85 (**2002**) 2163-2171.

[34] T.G. Tihan, M.D. Ionita, R.G. Popescu, D. Iordachescu, Effect of hydrophilic–hydrophobic balance on biocompatibility of poly (methyl methacrylate)(PMMA)–hydroxyapatite (HA) composites, Materials Chemistry and Physics, 118 (**2009**) 265-269.

[35] M.S. Ahn, Calcium hydroxylapatite: radiesse, Facial Plastic Surgery Clinics, 15 (**2007**) 85-90.

[36] H.P. Drobeck, S.S. Rothstein, K.I. Gumaer, A.D. Sherer, R.G. Slighter, Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxylapatite, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 42 (**1984**) 143-149.

[37] D.J. Misiek, J.N. Kent, R.F. Carr, Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 42 (**1984**) 150-160.

[38] G.Y. Pettis, L.B. Kaban, J. Glowacki, Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants, Journal of oral and maxillofacial surgery, 48 (**1990**) 1068-1074.

[39] J.A. Sklar, S.M. White, Radiance FN: a new soft tissue filler, Dermatologic surgery, 30 (**2004**) 764-768.

[40] R. Havlik, PSEF Data Committee, Hydroxyapatite Plast Reconstr Surg, 110 (**2002**) 1176-1179.

[41] P.F. Jacovella, C.B. Peiretti, D. Cunille, M. Salzamendi, S.A. Schechtel, Long-lasting results with hydroxylapatite (Radiesse) facial filler, Plastic and reconstructive surgery, 118 (**2006**) 15S-21S.

[42] E.S. Marmur, R. Phelps, D.J. Goldberg, Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler, Journal of Cosmetic and Laser Therapy, 6 (**2004**) 223-226.

[43] G. Priya, B. Madhan, U. Narendrakumar, R.V. Suresh Kumar, I. Manjubala, In vitro and in vivo evaluation of carboxymethyl cellulose scaffolds for bone tissue engineering applications, ACS omega, 6 (**2021**) 1246-1253.

[44] C. Sarkar, P. Kumari, K. Anuvrat, S.K. Sahu, J. Chakraborty, S. Garai, Synthesis and characterization of mechanically strong carboxymethyl cellulose–gelatin–hydroxyapatite nanocomposite for load-bearing orthopedic application, Journal of Materials Science, 53 (**2018**) 230-246.

[45] A. Zennifer, P. Senthilvelan, S. Sethuraman, D. Sundaramurthi, Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications, Carbohydrate polymers, 256 (**2021**) 117561.

[46] P. Zainith, N.K. Mishra, Experimental investigations on stability and viscosity of carboxymethyl cellulose (CMC)-based non-Newtonian nanofluids with different nanoparticles with the combination of distilled water, International Journal of Thermophysics, 42 (**2021**) 137.

[47] Y. Zhu, Q. Luo, H. Zhang, Q. Cai, X. Li, Z. Shen, W. Zhu, A shear-thinning electrostatic hydrogel with antibacterial activity by nanoengineering of polyelectrolytes, Biomaterials science, 8 (**2020**) 1394-1404.

[48] M.J. Gupte, W.B. Swanson, J. Hu, X. Jin, H. Ma, Z. Zhang, Z. Liu, K. Feng, G. Feng, G. Xiao, Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization, Acta biomaterialia, 82 (**2018**) 1-11.

[49] G. Lemperle, P. Neugebauer, R. Kernke, K.-H. Lerche, S. Lemperle, Microspheres for cosmetic and medical injections must be free of phagocytosable microparticles under 20 microns, Biomed J Sci Tech Res, 1 (**2017**) 1982-1686.

[50] J.Y. Lin, N.J. Hsu, C.Y. Lin, Retaining even distribution of biostimulators microscopically and grossly: Key to prevent non-inflammatory nodules formation, Journal of Cosmetic Dermatology, 21 (**2022**).

[51] I.P. Palmieri, M. Raichi, Clinical commentary about foreign body complications over 20 years after polymethyl-methacrylate face implants and control of late sequelae with Polynucleotides Highly Purified Technology (PN-HPT®), Journal of Cosmetic Dermatology, 21 (**2022**) 5537-5542.

[52] C. van Blitterswijk, J. De Boer, Tissue engineering, Academic Press**2022**.

[53] Y. Esmaeili, E. Bidram, A. Bigham, M. Atari, R.N. Azadani, M. Tavakoli, S. Salehi, M. Mirhaj, A. Basiri, Z. Mirzavandi, Exploring the evolution of tissue engineering strategies over the past decade: From cell-based strategies to gene-activated matrix, Alexandria Engineering Journal, 81 (**2023**) 137-169.

[54] R. Hama, J.W. Reinhardt, A. Ulziibayar, T. Watanabe, J. Kelly, T. Shinoka, Recent tissue engineering approaches to mimicking the extracellular matrix structure for skin regeneration, Biomimetics, 8 (**2023**) 130.

[55] S.-H. Lee, H. Shin, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, Advanced drug delivery reviews, 59 (**2007**) 339-359.

[56] K. Comley, N. Fleck, The high strain rate response of adipose tissue, IUTAM Symposium on Mechanical Properties of Cellular Materials: Proceedings of the IUTAM Symposium on Mechanical Properties of Cellular Materials, held September 17–20, 2007, LMT-Cachan, Cachan, France, Springer, **2009**, pp. 27-33.

[57] A. Kalra, A. Lowe, A.M. Al-Jumaily, Mechanical behaviour of skin: a review, J. Mater. Sci. Eng, 5 (**2016**) 1000254.

[58] C.T. McKee, J.A. Last, P. Russell, C.J. Murphy, Indentation versus tensile measurements of Young's modulus for soft biological tissues, Tissue Engineering Part B: Reviews, 17 (**2011**) 155-164.

[59] G. Skeldon, B. Lucendo-Villarin, W. Shu, Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 373 (**2018**) 20170224.

[60] T.R. Cox, J.T. Erler, Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer, Disease models & mechanisms, 4 (**2011**) 165-178.

[61] P.J. Delves, I.M. Roitt, Encyclopedia of immunology, Encyclopedia of immunology**1998**, pp. 145-145.

[62] A. Kurtz, S.-J. Oh, Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance, Preventive medicine, 54 (**2012**) S50-S56.

[63] E. Hofmann, A. Schwarz, J. Fink, L.-P. Kamolz, P. Kotzbeck, Modelling the complexity of human skin in vitro, Biomedicines, 11 (**2023**) 794.

[64] Y. Liu, X. Li, H. Yang, P. Zhang, P. Wang, Y. Sun, F. Yang, W. Liu, Y. Li, Y. Tian, Skin-interfaced superhydrophobic insensible sweat sensors for evaluating body thermoregulation and skin barrier functions, ACS nano, 17 (**2023**) 5588-5599.

[65] E. Hofmann, J. Fink, A.-L. Pignet, A. Schwarz, M. Schellnegger, S.P. Nischwitz, J.C. Holzer-Geissler, L.-P. Kamolz, P. Kotzbeck, Human in vitro skin models for wound healing and wound healing disorders, Biomedicines, 11 (**2023**) 1056.

[66] F. Girard, C. Lajoye, M. Camman, N. Tissot, F. Berthelot Pedurand, B. Tandon, D. Moedder, I. Liashenko, S. Salameh, P.D. Dalton, First Advanced Bilayer Scaffolds for

Tailored Skin Tissue Engineering Produced via Electrospinning and Melt Electrowriting, Advanced Functional Materials, (**2024**) 2314757.

[67] A.D. Metcalfe, M.W. Ferguson, Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, Journal of the Royal Society Interface, 4 (**2007**) 413-437.

[68] G. Voskerician, Soft Tissue Structure and Functionality, Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues, (**2012**) 35-80.

[69] B.S. Kim, Innate lymphoid cells in the skin, Journal of Investigative Dermatology, 135 (**2015**) 673-678.

[70] M. Steinhoff, S. Ständer, S. Seeliger, J.C. Ansel, M. Schmelz, T. Luger, Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation, Archives of dermatology, 139 (**2003**) 1479-1488.

[71] M. Coelho, T. Oliveira, R. Fernandes, State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ, Archives of medical science, 9 (**2013**) 191-200.

[72] S.H. Mathes, H. Ruffner, U. Graf-Hausner, The use of skin models in drug development, Advanced drug delivery reviews, 69 (**2014**) 81-102.

[73] P. Permana, M. Owecki, G. Chaldakov, M. Böhm, G. Hausman, C. Lapière, P. Atanassova, J. Sowiński, M. Fasshauer, D. Hausman, What are subcutaneous adipocytes really good for...?, Experimental Dermatology, 16 (**2007**).

[74] X. He, F. Wan, W. Su, W. Xie, Research progress on skin aging and active ingredients, Molecules, 28 (**2023**) 5556.

[75] C.C. Zouboulis, R. Ganceviciene, A.I. Liakou, A. Theodoridis, R. Elewa, E. Makrantonaki, Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment, Clinics in dermatology, 37 (**2019**) 365-372.

[76] I. Bulur, Yaşlanma ve Deri/Aging and Skin, Osmangazi Tıp Dergisi, 38 (**2016**).

[77] A.C. Ko, B.S. Korn, D.O. Kikkawa, The aging face, Survey of Ophthalmology, 62 (**2017**) 190-202.

[78] J.-W. Shin, S.-H. Kwon, J.-Y. Choi, J.-I. Na, C.-H. Huh, H.-R. Choi, K.-C. Park, Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches, International journal of molecular sciences, 20 (**2019**) 2126.

[79] G. SARAÇ, Y. KAPICIOĞLU, Yaşlanan Yüz: Kutanöz, Yumuşak Doku, Kas ve İskelet Değişiklikleri, Türkiye Klinikleri Kozmetik Dermatoloji Özel Dergisi, 10 (**2017**).

[80] N.H. Attenello, C.S. Maas, Injectable fillers: review of material and properties, Facial Plastic Surgery, 31 (**2015**) 029-034.

[81] I. Sjerobabski-Masnec, M. Šitum, Starenje kože lica, Acta clinica Croatica, 49 (**2010**) 515-518.

[82] M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, Experimental dermatology, 11 (**2002**) 398-405.

[83] M. Branchet, S. Boisnic, C. Frances, A. Robert, Skin thickness changes in normal aging skin, Gerontology, 36 (**1990**) 28-35.

[84] B.A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, Journal of the American Academy of Dermatology, 21 (**1989**) 610-613.

[85] S.F. Dastoor, C.E. Misch, H.-L. Wang, Dermal fillers for facial soft tissue augmentation, Journal of Oral Implantology, 33 (**2007**) 191-204.

[86] G. Lemperle, V. Morhenn, U. Charrier, Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation, Aesthetic plastic surgery, 27 (**2003**) 354-366.

[87] A. Fallacara, S. Manfredini, E. Durini, S. Vertuani, Hyaluronic acid fillers in soft tissue regeneration, Facial Plastic Surgery, 33 (**2017**) 087-096.

[88] D. Cao, J. Ding, Recent advances in regenerative biomaterials, Regenerative Biomaterials, 9 (**2022**) rbac098.

[89] L. Chen, Y. Zhang, Z. Chen, Y. Dong, Y. Jiang, J. Hua, Y. Liu, A.I. Osman, M. Farghali, L. Huang, Biomaterials technology and policies in the building sector: a review, Environmental Chemistry Letters, 22 (**2024**) 715-750.

[90] E. Marin, F. Boschetto, G. Pezzotti, Biomaterials and biocompatibility: An historical overview, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 108 (**2020**) 1617-1633.

[91] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, Science, 295 (**2002**) 1014-1017.

[92] W.R. Zhang, C.R. Parikh, Biomarkers of acute and chronic kidney disease, Annual review of physiology, 81 (**2019**) 309-333.

[93] J. De Boer, C. Van Blitterswijk, P. Thomsen, J. Hubbell, R. Cancedda, J. De Bruijn, A. Lindahl, J. Sohier, D.F. Williams, Tissue engineering, Elsevier**2008**.

[94] L. Edgar, K. McNamara, T. Wong, R. Tamburrini, R. Katari, G. Orlando, Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering, Materials, 9 (**2016**) 332.

[95] C.J. Kowalczewski, J.M. Saul, Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration, Frontiers in pharmacology, 9 (**2018**) 513.

[96] R. Scholz, M. Knyazeva, D. Porchetta, N. Wegner, F. Senatov, A. Salimon, S. Kaloshkin, F. Walther, Development of biomimetic in vitro fatigue assessment for UHMWPE implant materials, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 85 (**2018**) 94-101.

[97] L. Hench, H. Paschall, Histochemical responses at a biomaterial's interface, Journal of biomedical materials research, 8 (**1974**) 49-64.

[98] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, Ceramics international, 22 (**1996**) 493-507.

[99] T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: properties and applications, Biomaterials, 12 (**1991**) 155-163.

[100] R.Z. LeGeros, B. Ben-Nissan, Introduction to synthetic and biologic apatites, Advances in calcium phosphate biomaterials, (**2014**) 1-17.

[101] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri, Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, Journal of the European Ceramic Society, 23 (**2003**) 2931-2937.

[102] J.E. Babensee, J.M. Anderson, L.V. McIntire, A.G. Mikos, Host response to tissue engineered devices, Advanced drug delivery reviews, 33 (**1998**) 111-139.

[103] F.J. O'brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials today, 14 (**2011**) 88-95.

[104] H. Xia, X. Li, W. Gao, X. Fu, R.H. Fang, L. Zhang, K. Zhang, Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells, Nature Reviews Materials, 3 (**2018**) 174-193.

[105] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications, Materials, 3 (**2010**) 1863-1887.

[106] N. Davidenko, C. Schuster, D. Bax, N. Raynal, R. Farndale, S. Best, R. Cameron, Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics, Acta biomaterialia, 25 (**2015**) 131-142.

[107] A. Borzacchiello, L. Russo, B.M. Malle, K. Schwach-Abdellaoui, L. Ambrosio, Hyaluronic acid based hydrogels for regenerative medicine applications, BioMed research international, 2015 (**2015**) 871218.

[108] H.G. Garg, C.A. Hales, Chemistry and biology of hyaluronan, Elsevier**2004**.

[109] K. Masuko, M. Murata, K. Yudoh, T. Kato, H. Nakamura, Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity, International journal of general medicine, (**2009**) 77-81.

[110] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, Biotechnology letters, 29 (**2007**) 17-25.

[111] J.A. Burdick, G.D. Prestwich, Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, Advanced materials, 23 (**2011**) H41-H56.

[112] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review, Carbohydrate polymers, 92 (**2013**) 1262-1279.

[113] C.-W. Chung, J.Y. Kang, I.-S. Yoon, H.-D. Hwang, P. Balakrishnan, H.-J. Cho, K.-D. Chung, D.-H. Kang, D.-D. Kim, Interpenetrating polymer network (IPN) scaffolds of

sodium hyaluronate and sodium alginate for chondrocyte culture, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88 (**2011**) 711-716.

[114] X. Xu, A.K. Jha, D.A. Harrington, M.C. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks, Soft matter, 8 (**2012**) 3280-3294.

[115] X. Sun, C. Xu, G. Wu, Q. Ye, C. Wang, Poly (lactic-co-glycolic acid): Applications and future prospects for periodontal tissue regeneration, Polymers, 9 (**2017**) 189.

[116] C.W. Chung, K.G. Marra, H. Li, A.S. Leung, D.H. Ward, H. Tan, A. Kelmendi-Doko, J.P. Rubin, VEGF microsphere technology to enhance vascularization in fat grafting, Annals of plastic surgery, 69 (**2012**) 213-219.

[117] K. Fu, D.W. Pack, A.M. Klibanov, R. Langer, Visual evidence of acidic environment within degrading poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres, Pharmaceutical research, 17 (**2000**) 100-106.

[118] J. Zhu, Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, Biomaterials, 31 (**2010**) 4639-4656.

[119] M. Parlato, S. Reichert, N. Barney, W.L. Murphy, Poly (ethylene glycol) hydrogels with adaptable mechanical and degradation properties for use in biomedical applications, Macromolecular bioscience, 14 (**2014**) 687-698.

[120] E. Bakaic, N.M. Smeets, T. Hoare, Injectable hydrogels based on poly (ethylene glycol) and derivatives as functional biomaterials, RSC advances, 5 (**2015**) 35469-35486.

[121] H. Zhang, Z. Zhou, F. Zhang, C. Wan, Hydrogel-Based 3D Bioprinting Technology for Articular Cartilage Regenerative Engineering, Gels, 10 (**2024**) 430.

[122] D.A. Young, K.L. Christman, Injectable biomaterials for adipose tissue engineering, Biomedical materials, 7 (**2012**) 024104.

[123] M.J. Mahoney, K.S. Anseth, Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels, Biomaterials, 27 (**2006**) 2265-2274.

[124] G.N. Grover, N. Rao, K.L. Christman, Myocardial matrix–polyethylene glycol hybrid hydrogels for tissue engineering, Nanotechnology, 25 (**2013**) 014011.

[125] D. Mondal, M. Griffith, S.S. Venkatraman, Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 65 (**2016**) 255-265.

[126] S. Stratton, N.B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, S.G. Kumbar, Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, Bioactive materials, 1 (**2016**) 93-108.

[127] E. Malikmammadov, T.E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, PCL and PCL-based materials in biomedical applications, Journal of Biomaterials science, Polymer edition, 29 (**2018**) 863-893.

[128] R.W. Evans, H.S. Cheung, D.J. McCarty, Cultured human monocytes and fibroblasts solubilize calcium phosphate crystals, Calcified tissue international, 36 (**1984**) 645-650.

[129] J.M. Lee, Y.J. Kim, Foreign body granulomas after the use of dermal fillers: pathophysiology, clinical appearance, histologic features, and treatment, Archives of Plastic Surgery, 42 (**2015**) 232-239.

[130] G. Lemperle, V. Morhenn, U. Charrier, Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation, Aesthetic Plastic Surgery, 44 (**2020**) 1348-1360.

[131] H. Sundaram, B. Voigts, K. Beer, M. Meland, Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid, Dermatologic Surgery, 36 (**2010**) 1859-1865.

[132] Y. Yutskovskaya, E. Kogan, E. Leshunov, A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler, Journal of Drugs in Dermatology: JDD, 13 (**2014**) 1047-1052.

[133] A.L. Berlin, M. Hussain, D.J. Goldberg, Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis, Dermatologic surgery, 34 (**2008**) S64-S67.

[134] P.D. Costantino, C.D. Friedman, A. Lane, Synthetic biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery, Facial Plastic Surgery, 9 (**1993**) 1-15.

[135] Y. Chen, Q. Yu, C.-B. Xu, A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software, Int J Clin Exp Med, 10 (**2017**) 14904-14910.

[136] S.H. Jeong, Y. Fan, K.H. Cheon, J. Baek, S. Kim, H.E. Kim, Hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite hydrogels for enhanced biophysical and biological performance in a dermal matrix, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 105 (**2017**) 3315-3325.

[137] C. Pirri, C. Fede, L. Petrelli, D. Guidolin, C. Fan, R. De Caro, C. Stecco, Elastic Fibres in the subcutaneous tissue: Is there a difference between superficial and muscular fascia? A cadaver study, Skin Research and Technology, 28 (**2022**) 21-27.

[138] A.S. Franca, L.S. Oliveira, Potential uses of fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in food processing and engineering, Food engineering, (**2011**) 211-257.

[139] H.H. Nieuwoudt, B.A. Prior, I.S. Pretorius, M. Manley, F.F. Bauer, Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples, Journal of agricultural and food chemistry, 52 (**2004**) 3726-3735.

[140] R.A. Syahputra, Z. Rani, R. Ridwanto, D. Miswanda, A. Pulungan, Isolation and characterization of glycerol by transesterification of used cooking oil, RASĀYAN J. Chem, 16 (**2023**) 648-652.

[141] H. Qiu, J. Yu, Polyacrylate/(carboxymethylcellulose modified montmorillonite) superabsorbent nanocomposite: preparation and water absorbency, Journal of Applied Polymer Science, 107 (**2008**) 118-123.

[142] J. Ma, Y. Xu, B. Fan, B. Liang, Preparation and characterization of sodium carboxymethylcellulose/poly (N-isopropylacrylamide)/clay semi-IPN nanocomposite hydrogels, European polymer journal, 43 (**2007**) 2221-2228.

[143] T. Theophile, Infrared spectroscopy: Materials science, engineering and technology, BoD–Books on Demand**2012**.

[144] G. Balasundaram, T.J. Webster, A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications, Journal of Materials Chemistry, 16 (**2006**) 3737-3745.

[145] J. Shang, Z. Shao, X. Chen, Electrical behavior of a natural polyelectrolyte hydrogel: chitosan/carboxymethylcellulose hydrogel, Biomacromolecules, 9 (**2008**) 1208-1213.

[146] L. Mansouri, M. Elkolli, B. Zohra, Effect of acidification on biological proprieties of sodium carboxymethylcellulose, Materials and Biomaterials Science, 3 (**2020**) 065–070-065–070.

[147] F. Yang, G. Li, Y.-G. He, F.-X. Ren, G.-x. Wang, Synthesis, characterization, and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer, Carbohydrate Polymers, 78 (**2009**) 95-99.

[148] J.-F. Su, Z. Huang, X.-Y. Yuan, X.-Y. Wang, M. Li, Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, Carbohydrate polymers, 79 (**2010**) 145-153.

[149] M. El-Sakhawy, H.-A.S. Tohamy, A. Salama, S. Kamel, Thermal properties of carboxymethyl cellulose acetate butyrate, Cellul. Chem. Technol, 53 (**2019**) 667-675.

[150] K. Suppiah, T.P. Leng, S. Husseinsyah, R. Rahman, Y.C. Keat, C. Heng, Thermal properties of carboxymethyl cellulose (CMC) filled halloysite nanotube (HNT) bio-nanocomposite films, Materials Today: Proceedings, 16 (**2019**) 1611-1616.

[151] C.-J. Liao, F.-H. Lin, K.-S. Chen, J.-S. Sun, Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere, Biomaterials, 20 (**1999**) 1807-1813.

[152] K. Laeschke, Biocompatibility of microparticles into soft tissue fillers, Seminars in cutaneous medicine and surgery, WB Saunders, **2004**, pp. 214-217.

[153] V.B. Morhenn, G. Lemperle, R.L. Gallo, Phagocytosis of different particulate dermal filler substances by human macrophages and skin cells, Dermatologic Surgery, 28 (**2002**) 484-490.

[154] M.-P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review, Journal of controlled release, 113 (**2006**) 102-110.

[155] A.T. de Almeida, V. Figueredo, A.L.G. da Cunha, G. Casabona, J.R.C. de Faria, E.V. Alves, M. Sato, A. Branco, C. Guarnieri, E. Palermo, Consensus recommendations for the use of hyperdiluted calcium hydroxyapatite (Radiesse) as a face and body biostimulatory agent, Plastic and Reconstructive Surgery Global Open, 7 (**2019**).

[156] J. Eviatar, C. Lo, J. Kirszrot, Radiesse: advanced techniques and applications for a unique and versatile implant, Plastic and Reconstructive Surgery, 136 (**2015**) 164-170.

[157] P.F. Jacovella, Use of calcium hydroxylapatite (Radiesse®) for facial augmentation, Clinical interventions in aging, 3 (**2008**) 161-174.

[158] R. Samanipour, A. Pourmostafa, A. Marzban, S. Tabatabaee, H. Bahraminasab, A.A. Hamidieh, A. Tavakoli, Injectable Collagen/CMC soft tissue filler with developed flow properties, Molecular & Cellular Biomechanics, 19 (**2022**) 97.

[159] U. Posadowska, M. Brzychczy-Wloch, E. Pamula, Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 27 (**2016**) 1-9.

[160] W.I. Choi, Y. Hwang, A. Sahu, K. Min, D. Sung, G. Tae, J.H. Chang, An injectable and physical levan-based hydrogel as a dermal filler for soft tissue augmentation, Biomaterials science, 6 (**2018**) 2627-2638.

[161] H. Galadari, Soft Tissue Augmentation: Principles and Practice, Springer**2017**.

[162] D.H. Jones, Injectable fillers: principles and practice, John Wiley & Sons**2011**.

[163] P. Basu, A. Repanas, A. Chatterjee, B. Glasmacher, U. NarendraKumar, I. Manjubala, PEO–CMC blend nanofibers fabrication by electrospinning for soft tissue engineering applications, Materials Letters, 195 (**2017**) 10-13.

[164] P. Nicolau, J. Marijnissen-Hofsté, Neocollagenesis after injection of a polycaprolactone based dermal filler in a rabbit, Eur J Aesth Med Dermatol, 3 (**2013**) 19-26.

[165] M. Aziz, E. Gamal El Din, S.K. Ahmed, M. Ahmed Mekway, Histological study on the effect of hyaluronic acid injection (dermal filler) on the skin of the adult and aged albino rat, Egyptian Journal of Histology, 42 (**2019**) 245-261.

[166] K.M. Coleman, R. Voigts, D.P. DeVore, P. Termin, W.P. COLEMAN III, Neocollagenesis after injection of calcium hydroxylapatite composition in a canine model, Dermatologic surgery, 34 (**2008**) S53-S55.

[167] N. Zerbinati, E. D'Este, P.C. Parodi, A. Calligaro, Microscopic and ultrastructural evidences in human skin following calcium hydroxylapatite filler treatment, Archives of dermatological research, 309 (**2017**) 389-396.

[168] I. Yanatma, G. Sarac, M. Gul, S. Gul, Y. Kapicioglu, Comparison of polycaprolactone and calcium hydroxylapatite dermal fillers in a rat model, Dermatologic Therapy, 34 (**2021**) e14716.

[169] Y. Fan, T.-H. Choi, J.-H. Chung, Y.-K. Jeon, S. Kim, Hyaluronic acid-cross-linked filler stimulates collagen type 1 and elastic fiber synthesis in skin through the TGF-β/Smad signaling pathway in a nude mouse model, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 72 (**2019**) 1355-1362.

[170] S.-H. Jeong, Y.-F. Fan, J.-U. Baek, J. Song, T.-H. Choi, S.-W. Kim, H.-E. Kim, Long-lasting and bioactive hyaluronic acid-hydroxyapatite composite hydrogels for injectable dermal fillers: Physical properties and in vivo durability, Journal of Biomaterials Applications, 31 (**2016**) 464-474.

[171] F. Wang, L.A. Garza, S. Kang, J. Varani, J.S. Orringer, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin, Archives of dermatology, 143 (**2007**) 155-163.

[172] M. Mochizuki, N. Aoi, K. Gonda, S. Hirabayashi, Y. Komuro, Evaluation of the in vivo kinetics and biostimulatory effects of subcutaneously injected hyaluronic acid filler, Plastic and Reconstructive Surgery, 142 (**2018**) 112-121.

[173] M.A. Solis, Y.-H. Chen, T.Y. Wong, V.Z. Bittencourt, Y.-C. Lin, L.L. Huang, Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells, Biochemistry research international, 2012 (**2012**).

[174] J. Varani, P. Perone, S.E. Fligiel, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis, Journal of investigative dermatology, 119 (**2002**) 122-129.

[175] T.R. Kwon, S.W. Han, I.K. Yeo, J.H. Kim, J.M. Kim, J.Y. Hong, B.C. Lee, S.E. Lee, H.S. Moon, H.J. Kwon, Biostimulatory effects of polydioxanone, poly-d, l lactic acid, and polycaprolactone fillers in mouse model, Journal of Cosmetic Dermatology, 18 (**2019**) 1002-1008.

[176] T. Quan, F. Wang, Y. Shao, L. Rittié, W. Xia, J.S. Orringer, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo, Journal of Investigative Dermatology, 133 (**2013**) 658-667.

[177] M. Bongio, J. Van den Beucken, M. Nejadnik, S. Leeuwenburgh, L. Kinard, F. Kasper, A. Mikos, J. Jansen, Biomimetic modification of synthetic hydrogels by incorporation of adhesive peptides and calcium phosphate nanoparticles: in vitro evaluation of cell behavior, (**2011**).

[178] C. Hwang, B. Ay, D. Kaplan, J. Rubin, K. Marra, A. Atala, J. Yoo, S. Lee, Assessments of injectable alginate particle-embedded fibrin hydrogels for soft tissue reconstruction, Biomedical materials, 8 (**2013**) 014105.

[179] T. Quan, T. He, S. Kang, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-β type II receptor/Smad signaling, The American journal of pathology, 165 (**2004**) 741-751.

[180] E.D. Son, J.Y. Lee, S. Lee, M.S. Kim, B.G. Lee, I.S. Chang, J.H. Chung, Topical application of 17β-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF-β signaling in aged human skin in vivo, Journal of Investigative Dermatology, 124 (**2005**) 1149-1161.

[181] S. Paliwal, S. Fagien, X. Sun, T. Holt, T. Kim, C.K. Hee, D. Van Epps, D.J. Messina, Skin extracellular matrix stimulation following injection of a hyaluronic acid–based dermal filler in a rat model, Plastic and reconstructive surgery, 134 (**2014**) 1224-1233.