

**NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARLA KOAGÜLATİF  
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**COAGULATIVE SYSTEMS DEVELOPMENT BY  
NANOTECHNOLOGICAL APPROACH**

**ZEYNEP KARAHALİLOĞLU**

**PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

30/03/2015

ZEYNEP KARAHALİLOĞLU

## ÖZET

# NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARLA KOAGÜLATİF SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

**Zeynep KARAHALİLOĞLU**

**Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş**

**Mart 2015, 166 sayfa**

Günlük yaşamda karşılaşılan travmaya bağlı kanamaların yanı sıra savaşlar ve afetler sırasında oluşan kontrol edilemeyen kanama en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Özellikle savaş alanlarında yaralı sayısının fazla olması ve medikal anlamda olanakların kısıtlı olması efektif kanama kontrolünü önemli hale getirmektedir. Hali hazırda kanama kontrolü için bandaj, direkt bası, turnike ya da koterizasyon gibi teknikler uygulanmaktadır. Ancak bu geleneksel teknikler bazı yaralanmalarda yetersiz kalmakta ya da uygulanamamaktadır. Bu nedenle kişinin kendisinin veya bir ilk yardımcının kullanabileceği, kolay taşınabilir, ucuz, yan etkisi olmayan ve etkili bir hemostaz sağlayacak malzemeye olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Hemostazda rol oynayan faktörler ve ortam koşulları göz önüne alındığında, nanoteknolojik yaklaşımlarla üretilcek yapıların hemostazı kolaylaştıracağı açıktır. Hazırlanacak olan nanofibriler bazlı örtü malzemelerinin doğal ekstraselular matrikste var olan kollajen/elastin iplikçiklerine benzerliği,

yüksek yüzey alanı/hacim oranı gibi özellikleriyle trombosit göçünü hızlandıracağı düşünülmektedir.

Sunulan tez kapsamında çift katmanlı bir kanama durdurucu örtü malzemesinin hazırlanması planlanmıştır. Öncelikle alt katman, medikal sektörde sıklıkla kullanılan kitosan ve selüloz bileşiminden hazırlanmıştır. Hazırlama esnasında pıhtılaşma yolağında aktif rol oynadığı bilinen hemostatik ajanlar (kalsiyum, vitamin K, kaolin vb.) yapıya eklenmiştir. Üst katman ise kanla uyumu yüksek, sütür malzemesi olarak sıklıkla kullanılan ipek fibroin ve hücre membranı yapısında yer alan fostatidilkolin içeren nanofibriler bir örtü tabakasından oluşturulmuştur. Hazırlanan modifiye hemostatik örtü malzemelerinin etkinlikleri karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Hemostatik örtülerin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Hemostatik örtülerin etkinlikleri *in-vitro* ve *in-vivo* pıhtılaşma testleri ile çalışılmıştır. *In-vitro* olarak, parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), protrombin zamanı (PTZ) testleri ile hazırlanan hemostatik örtülerin kanı pıhtılaştırma süreleri hesaplanmıştır. Laktat dehidrogenaz (LDH) kiti ile hemostatik örtüler üzerine yapışan trombosit sayısı karşılaştırılmıştır. *In-vivo* testlerde ise hazırlanmış olan hemostatik malzemenin aktivitesi, sağlıklı ve diyabetik sıçanların femoral arter kanama modeli üzerinde test edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Hemostatik ajan, kanama kontrolü, kanama durdurucu, nanoteknoloji, nanotıp, elektroejirme, nanofiber, ipek, kitosan, kaolin.

# **ABSTRACT**

## **COAGULATIVE SYSTEMS DEVELOPMENT BY NANOTECHNOLOGICAL APPROACH**

**Zeynep KARAHALIOGLU**

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and  
Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ**

**March 2015, 166 pages**

Uncontrolled bleeding is the major cause of death in cases like war and disaster in addition of bleeding dependant trauma encountered in daily life. Effective bleeding control is essential because a lot of injured patients or limited medical equipment on battlefield. Currently for bleeding control was used such as bandage, direct pressure, tourniquet or cauterization. But these conventional techniques remain incapable or not used in much injury. Therefore hemostatic agent requirement, that is portable, low cost, no adverse effects to healing, effective control of bleeding, easy administration even by layperson or by first-aider, increases day by day. When the conditions and environmental factors play a role in hemostasis were considered, products produced by nanotechnological approaches will

facilitate obviously the hemostasis. Similarity of the nanofibrillar structure to collagen/elastin fibers in extracellular matrix and its high surface area/volume ratio will accelerate thrombocyte migration in structure.

Within the scope of the thesis; it's planned that the double layer blood stopping patches are prepared. At first step, top layer of hemostatic patches are prepared from cellulose and chitosan that is frequently used in medical industry. Thereafter, hemostatic agents (calcium ions, vitamin K, kaolin etc.) that plays active role in coagulation cascade are incorporated the structure of the hemostatic patches. A nanofibrillar layer membrane on the top is created from the silk fibroin that widely used as a suture material and phosphatdylcholine that be in the structure of cell. The performances of the prepared modified silk fibroin nanofibrillar patches are investigated comparatively. Surface properties of hemostatic dressing are characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM). The activity of the prepared hemostatic dressings is examined by *in-vitro* and *in-vivo* coagulation tests. The coagulation time of blood is determined using by partial thromboplastin time (aPTT) and protrombin time (PTZ) tests. The amount of adhered thrombocyte on the hemostatic dressings is compared using LDH assay. In vivo study, the hemostatic activity of the hemostatic dressings is tested in healthy and diabetic rat femoral artery model.

**Keywords:** Hemostatic agent, bleeding control, bleeding stopper, nanotechnology, nanomedicine, electrospinning, nanofiber, silk, chitosan, kaolin.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, akademik ve sosyal anlamda maddi, manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a ve çalışma ortamında bir aile olmamızı sağlayan değerli ailesine,

Tez süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, destekleriyle yanımda olan sayın hocalarım Prof. Dr. Mehmet Mutlu, Yrd. Doç. Dr. Berrak G. Öcal, Prof. Dr. Ahmet Çabuk, Prof. Dr. İbrahim Vargel ve Prof. Dr. Gaye Tezel'e,

Bilimsel anlamda desteklerini esirgemeyen Dr. Murat Demirbilek ve İbrahim Ulusoy'a,

Birlikte çalışırken çok şey öğrendiğim değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Cem Bayram, Dr. Tamer Çırac, Dr. Doğa Kavaz, Dr. Ebru Erdal, Tayfun Vural, Eda Yalçın, Betül Bozdoğan Pala, Uğur Aydın, Soheil Malekghasame, Öznur Akbal, Ekin Çelik ve Göknur Kara'ya,

Tez çalışmamın yürütülmesinde önemli katkısı olan "014BİYP604003" numaralı "Nanoteknolojik Yaklaşımlarla Koagülatif Sistemlerin Geliştirilmesi" projesi için Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne,

Ve hayatımın her anında beni sevgi, sabır ve güvenle karşılıksız destekleyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım...

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER .....	ix
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Hemostaz .....	3
2.1.1. Primer Hemostaz .....	4
2.1.2. Sekonder Hemostaz .....	6
2.1.3. Tersiyer Hemostaz .....	11
2.2. İdeal Hastane Öncesi Örtülerin Özellikleri .....	12
2.3. Topikal Hemostatik Ajanlar .....	13
2.3.1. Fiziksel Ajanlar .....	14
2.3.1.1. Bone waks .....	14
2.3.1.2. Ostene .....	14
2.3.2. Absorblanabilir Ajanlar .....	22
2.3.2.1. Jelatin Köpükler (Gelfilm ve Gelfoam) .....	22
2.3.2.2. Okside Selüloz (Surgicel Fibrillar ve Surgicel Nu-Knit) .....	23
2.3.2.3. Mikrofibriler Kollajen (Avitene, Avitene Flour, EndoAvitene, Avitene Ultrafoam, Avitene UltraWrap, Instat, Helitene ve Helistat) .....	24
2.3.3. Biyolojik Ajanlar .....	25
2.3.3.1. Topikal Trombin (Trombin-JMI, Recothrom, Evitrom) .....	25
2.3.3.2. Fibrin Sealants (Tisseel, Crosseal, Evicel, Floseal) .....	26
2.3.3.3. Platelet Jel (Vitagel) .....	27
2.3.4. Sentetik Ajanlar .....	28
2.3.4.1. Siyanoakrilatlar (Dermabond) .....	28
2.3.4.2. Polietilen Glikol Hidrojel (CoSeal) .....	29
2.3.4.3. Glutaraldehid Çapraz Bağlı Albümin (Bioglue) .....	31



2.4. Hemostatik Örtüler .....	32
2.4.1. Kuru Fibrin Örtüler .....	32
2.4.2. Kitin, Kitosan (RDH, HemCon).....	32
2.4.3. Mineral Zeolit (QuickClot) .....	34
2.5. Kitosan ve Hemostazda Kullanımı .....	38
2.5.1. Kitosanın Hemostatik Ajan Olarak Medikal Alanda Kullanımı.....	39
2.5.2. Kitosan ve Eritrositler .....	40
2.5.3. Kitosanın Platelet Adhezyonu, Agregasyonu ve Aktivasyonu Üzerine Etkisi .....	41
2.6. Selüloz ve Hemostazda Kullanımı .....	44
2.7. İpek ve Hemostazda Kullanımı .....	49
2.7.1. İpeğin Kan Plazması ile Etkileşimi .....	51
2.8. Vitamin K ve Hemostaz .....	53
2.9. Protamin Sülfat ve Hemostaz.....	54
2.10. Kaolin ve Hemostaz .....	55
2.11. Fosfatidilkolin (PC) ve Hemostaz .....	57
2.12. Hemostazda Kullanılan Nanoteknolojik Yaklaşımlar .....	58
2.12.1. Elektroçirme ve Hemostatik Örtü Malzemesi Üretimi .....	60
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	64
3.1. Materyal ve Yöntemler .....	64
3.2. Bakteriyel Selüloz Üretimi .....	64
3.2.1. <i>Acetobacter xylinum</i> Stok Kültürü .....	64
3.2.2. Bakteriyel Selüloz Polimer Ortamı .....	65
3.3. Bakteriyel Selüloz (BS) /Kitosan (KTS) Hemostatik Ajanların Hazırlanması... 66	
3.4. Morfolojik Karakterizasyonlar .....	67
3.4.1. ATR-FTIR Spektroskopisi .....	67
3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskopu .....	67
3.4.3. Atomik Kuvvet Mikroskopu.....	67
3.5. Elektroçirme Düzeneği .....	68
3.5.1. İpek Fibroin Eldesi .....	68
3.5.2. BS/KTS Poröz Hemostatik Ajanlar Üzerine SF ve SF /PC Elektroçirme Prosesi .....	69
3.6. Porozite .....	70
3.7. Mekanik Test (Basma Testi).....	70

3.8. BS/KTS Hemostatik Ajanların PBS Absorblama Özellikleri .....	71
3.9. Hemostatik Ajanların Koagülasyonun Plazmatik Fazı Üzerinde Etkisi (aPTT/PTZ) .....	71
3.10. Platelet Yapışma Testi .....	72
3.11. İn-vitro Sağlıklı Tam Kan ve PRP Absorblama Oranları .....	72
3.12. Hayvan Modelinde Hemostaz .....	73
3.12.1. Sağlıklı Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli.....	74
3.12.2. Diyabetik Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli.....	77
3.13. Histolojik İncelemeler .....	78
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	79
4.1. Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu.....	79
4.2. BS/KTS Hemostatik Ajanların Hazırlanması ve Karakterizasyonu .....	81
4.3. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Elektroeğirme ile Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu.....	84
4.4. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Poroziteleri .....	88
4.5. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Mekanik Özellikleri .....	90
4.6. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların PBS Alım Özellikleri .....	93
4.7. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Koagülasyonun Plazmatik Fazı Üzerindeki Etkisi (aPTT/PTZ).....	94
4.8. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Aktivite Testi .....	99
4.9. İn-vitro Sağlıklı Tam Kan ve PRP Absorblama Oranları .....	104
4.10. Hayvan Modelinde Hemostaz .....	108
4.10.1 Sağlıklı Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli.....	108
4.10.2. Diyabetik Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli.....	120
4.11. Histolojik İncelemeler .....	131
4.11.1. Sağlıklı Ratlarda Oluşturulan Femoral Arter Kanama Modelinde Histolojik İncelemeler .....	131
4.11.2. Diyabetik Ratlarda Oluşturulan Femoral Arter Kanama Modelinde Histolojik İncelemeler .....	134
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	136
KAYNAKLAR .....	145
ÖZGEÇMİŞ .....	165

## ÇİZELGELER

### Sayfa

Çizelge 2.1. Hemostatik ajanların avantajları ve dezavantajları .....	13
Çizelge 2.2. Topikal hemostatik ajanların çalışma mekanizması, avantajları/kullanım tavsiyeleri ve dezavantajları/kullanımda dikkat edilmesi gereken noktalar [36]......	16
Çizelge 2.3. Topikal hemostatik ajanların fiyat ve boyut tanımlamaları [36]......	36
Çizelge 2.4. Şu an USA'de ticari olarak satılan hemostatik ürünler. ....	37
Çizelge 2.5. Kitin ve kitosan içeren ticari ürünler [134]......	43
Çizelge 3.1. <i>Acetobacter xylinum</i> bakterisinin stok besi yeri. ....	65
Çizelge 3.2. <i>Acetobacter xylinum</i> bakterisinin polimer ortamı. ....	65
Çizelge 3.3. Saf BS/KTS ve modifiye kompozit hemostatik ajan bileşenlerinin miktarları. ....	66
Çizelge 3.4. Hayvan uygulamaları için oluşturulan deney grupları. ....	73
Çizelge 4.1. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların % porozite değerleri. ....	89
Çizelge 4.2. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların ıslak ve kuru mekanik özellikleri. ....	93
Çizelge 4.3. Sağlıklı ratların kan plazması ile yapılan PTZ ve aPTT test sonuçları. .	95
Çizelge 4.4. Diyabetik ratların kan plazması ile yapılan PTZ ve aPTT test sonuçları. ....	99
Çizelge 4.5. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan metabolit değerleri. ....	114
Çizelge 4.6. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan gazı değerleri. ....	115
Çizelge 4.7. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan kimyası değerleri. .	116
Çizelge 4.8. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan metabolit değerleri. ....	126
Çizelge 4.9. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan gazı değerleri. ....	127
Çizelge 4.10. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan kimyası değerleri. .	128

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Hemostazda gerçekleşen vazokonstrüksiyon ve primer hemostazın şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2. Primer hemostatik tıkaçın oluşumu.....	6
Şekil 2.3. Hemostazda gerçekleşen intrinsik ve ekstrinsik yolların şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4. Koagülasyon kaskadının şematik gösterimi. Koagülasyon ekstrinsik yolak tarafından başlatılır (doku faktörü-faktör VII) ve trombin tarafından intrinsik yolak boyunca güçlendirilir. Faktör XII tarafından XI'un aktivasyonu kaskadın aktivasyonunda minimum role sahiptir; faktör XII bradikinin oluşumu için önemlidir (fibrinolizisi stimüle eder). Alternatif yolak doku faktörü-faktör VII kompleksi tarafından intrinsik yolağın (özellikle faktör IX) aktivasyonudur. Kısaltmalar: High MW kininojen: yüksek molekül ağırlıklı kininojen, F: faktör, TF: doku faktörü, Ca <sup>+2</sup> : kalsiyum, PF3: platelet fosfolipidi. ....	10
Şekil 2.5. Tersiyer hemostazın şematik gösterimi. (tPA: doku plazminojen aktivatörü; PAI: plazminojen aktivatör inhibitörü; PLG: Plazminojen; AP: Antiplazmin; FDPs: Fibrin(ojen) degradasyon ürünleri.....	11
Şekil 2.6. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.....	38
Şekil 2.7. Selüloz biriminin moleküler yapısı, beta 1-4 glukosidik bağlar ve zincirler arası hidrojen bağları içerir.....	45
Şekil 2.8. Selüloz mikrofibrillerinin kristalin bölgeleri ile birlikte selüloz moleküler zincirleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.....	45
Şekil 2.9. Statik kültürde oluşan BS pelikülleri (A); durgun kültürde oluşan BS peleti (B). ....	46
Şekil 2.10. Bakteriyel selüloz bazlı materyallerin farklı biyomedikal uygulamaları... ..	47
Şekil 2.11. Yaralanmış yüz ve toraksa uygulanan bakteriyel selüloz örtüler. Farklı vücut boyutları için uygunluk, nemli bir çevre sağlama ve önemli derecede ağrı hissini azaltma [148]. ....	47
Şekil 2.12. İpek filamentinin bileşimi.....	49
Şekil 2.13. Kalsiyum varlığında polimerize fibrin içerisinde fibroin fabriklerin inkübasyonu sonrası fiber/pıhtı ara yüzeyinin kriyo-SEM görüntüsü. a) fiberler ile	

köprü oluşturan laminar yapılar (x1500); b) bir fiberle kontakt halinde olan demetler (x50000). Oklar değme noktasının morfolojisini göstermektedir [163]. .....	52
Şekil 2.14. Kalsiyum varlığında polimerize fibrin içerisinde inkübasyondan sonra formaldehit ile etkileştirilmiş fibroin fiberlerin kriyo-SEM görüntüsü, a) doğal yüzey (x1500), b) iki polimer arasındaki etkileşimlerin nadir görülen bölgeleri (x3000) [163].....	53
Şekil 2.15. Tipik bir elektroçirime kurgusunun bileşenleri. ....	62
Şekil 3.1. İpek kokonlarından ipek fibroin eldesinin şematik gösterimi.....	66
Şekil 3.2. Kullanılan elektroçirime düzeneği.....	67
Şekil 3.3. Kontrol grubu olarak hazırlanan standart gazlı bezler. ....	72
Şekil 3.4. Hayvanların monitörizasyonunda kullanılan dijital veri toplayıcı sistem. ...	73
Şekil 3.5. Hayvanların kan gazı analizlerinde kullanılan portatif kan gazı cihazı.....	73
Şekil 3.6. Ratlarda kan basıncı ölçmek için kanülün yerleştirildiği karotis arter (A), kan basıncı ve EKG verilerinin alınması için yerleştirilen kanül ve elektrotlar (B). ....	74
Şekil 3.7. Hemostatik ajanın uygulanacağı sıçan femoral arterin görüntüsü.....	77
Şekil 4.1. <i>Acetobacter xylinum</i> tarafından üretilen selülozik fiber yapısı. ....	79
Şekil 4.2. Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen bakteriyel selüloz görüntüsü.....	80
Şekil 4.3. Bakteriyel selülozun FTIR spektrumu.....	81
Şekil 4.4. A) BS'un taramalı elektron mikroskobu görüntüsü, B) atomik kuvvet mikroskobu görüntüsü. ....	81
Şekil 4.5. Liyofilize edilmiş BS/KTS doku iskeleleri; A) çapraz bağlanma öncesi B) çapraz bağlanma sonrası. ....	82
Şekil 4.6. Saf BS, KTS, çapraz bağlanma öncesi ve sonrası BS/KTS hemostatik ajanların FTIR spektrumları. ....	83
Şekil 4.7. Saf BS/KTS hemostatik ajanların SEM görüntüsü; A) Üstten alınan görüntü, B) İç duvar yapısının görüntüsü (Ölçek çubuğu: 400 ve 1 µm) .....	83
Şekil 4.8. Kaolin, Vit K, PS katkılı BS/KTS hemostatik ajanların çapraz bağlanma sonrası FTIR spektrumları. ....	84
Şekil 4.9. Saf SF (A, C) ve SF/PC (B, D) kompozit nanofibriler ajanların SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılımları (Ölçek çubuğu: 10 µm).....	85
Şekil 4.10. Saf SF ve SF/PC kompozit nanofibriler örtülerin FTIR spektrumu. ....	86
Şekil 4.11. SF kaplı BS/KTS (A, B); SF/PC kaplı BS/KTS (C, D); Kao/BS/KTS (E, F); Vit K/BS7KTS (G, H) ve PS/BS/KTS (I, J) kompozit hemostatik ajanların SEM	

görüntüleri (sol görüntü bilayer tabaka görüntüsü, ölçek çubuğu: 100 µm; sağ görüntü alt poröz katman, ölçek çubuğu: 300 µm). .....	88
Şekil 4.12. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların por çapı histogramları. ...	90
Şekil 4.13. Kuru haldeki saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların uygulanan kuvvete karşı gösterdiği deformasyon yüzdeleri.....	91
Şekil 4.14. Islak haldeki saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların uygulanan kuvvete karşı gösterdiği deformasyon yüzdeleri.....	92
Şekil 4.15. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların PBS absorplama yüzdeleri (**: p<0.005, *: p<0.05). .....	94
Şekil 4.16. Sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanların kanından elde edilen plazma ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların görüntüleri.....	96
Şekil 4.17. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar ile etkileştirilen sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi erişkin rat plazması ile yapılan aPTT testi görüntüleri. ....	97
Şekil 4.18. Diyabetik Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanların kanından elde edilen plazma ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtülerin görüntüleri.....	98
Şekil 4.19. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtüler ile etkileştirilen diyabetik Sprague Dawley cinsi dişi erişkin rat plazması ile yapılan aPTT testi görüntüleri. ....	99
Şekil 4.20. Sağlıklı ratların PRP'sı ile etkileştirilen örneklerde LDH aktivitesi ..... (**: p<0.005, *: p<0.05).....	100
Şekil 4.21. Sağlıklı ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklerde yapışan trombositler; BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), Vit K/BS/KTS (E) ve PS/BS/KTS (F) (Ölçek çubuğu: 2 µm).....	101
Şekil 4.22. Diyabetik ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklerde LDH aktivitesi.....	102
Şekil 4.23. Diyabetik ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklerde yapışan trombositler: BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), Vit K/BS/KTS (E) ve PS/BS/KTS (F) (Ölçek çubuğu: 2 µm).....	103
Şekil 4.24. Sağlıklı ratlardan alınan tam kan ve PRP'nin saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtüler tarafından absorplanma yüzdeleri (**: p<0.005, *: p<0.05).....	105
Şekil 4.25. Sağlıklı ratlardan alınan tam kan ile etkileştirilen hemostatik ajanlar; gazlı bez (A), BS/KTS (B), SF kaplı BS/KTS (C), SF/PC kaplı BS/KTS (D), SF kaplı Kao/BS/KTS (E), SF kaplı Vit K/BS/KTS (F) ve SF kaplı PS/BS/KTS (G). .....	106

Şekil 4.26. Diyabetik ratlardan alınan tam kan ve PRP'nin saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtüler tarafından absorplanma yüzdeleri (**: $p<0.005$ , *: $p<0.05$ ).....	107
Şekil 4.27. Diyabetik ratlardan alınan tam kan ile etkileştirilen hemostatik ajanlar; BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), SF kaplı Vit K/BS/KTS (E) ve SF kaplı PS/BS/KTS (F) ve gazlı bez (G).....	108
Şekil 4.28. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde kullanılmak üzere hazırlanan hemostatik ajanların kanamayı durdurma süreleri (**: $p<0.005$ ). .....	109
Şekil 4.29. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra oluşan kan kaybı (**: $p<0.005$ ).110	
Şekil 4.30. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince ortalama arteriyel basınç. ....	111
Şekil 4.31. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri.....	112
Şekil 4.32. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli sonrası ölüm oranları (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS uygulaması sırasındaki sıcaklık değişimi (B).113	
Şekil 4.33. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde gazlı bez uygulaması ve sonrasında oluşan kan kaybı.....	117
Şekil 4.34. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı BS/KTS uygulaması ve sonrası.....	117
Şekil 4.35. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF/PC kaplı BS/KTS uygulaması ve sonrası. ....	118
Şekil 4.36. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı Kao/BS/KTS uygulaması ve sonrası. ....	118
Şekil 4.37. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı Vit K/BS/KTS uygulaması ve sonrası. ....	119
Şekil 4.38. Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde BS/KTS uygulaması ve sonrası.....	119
Şekil 4.39. Sağlıklı ratlarda oluşturulan kanama modelinde SF kaplı PS/BS/KTS uygulaması ve sonrası.....	120
Şekil 4.40. Diyabet oluşturulmuş ratların görüntüsü. ....	121
Şekil 4.41. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde kullanılmak üzere hazırlanan hemostatik ajanların kanamayı durdurma süreleri (**: $p<0.05$ ). .....	121

Şekil 4.42. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra oluşan kan kaybı (**: $p < 0.005$ ).	122
Şekil 4.43. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince ortalama arteriyel basınç. ....	123
Şekil 4.44. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri.....	124
Şekil 4.45. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli sonrası ölüm oranları (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS uygulaması sırasındaki sıcaklık değişimi (B).....	125
Şekil 4.46. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde gazlı bez uygulaması ve sonrasında oluşan kan kaybı (A ve B).....	129
Şekil 4.47. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde BS/KTS (A) ve SF kaplı BS/KTS (B) uygulaması sonrası. ....	129
Şekil 4.48. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF/PC kaplı BS/KTS (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS (B) uygulaması sonrası. ....	130
Şekil 4.49. Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı Vit K/BS/KTS (A) ve SF kaplı PS/BS/KTS (B) uygulaması sonrası. ....	131
Şekil 4.50. Sağlıklı ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (A) Kontrol, (B) Gazlı bez, (C) BS/KTS, (D) SF kaplı BS/KTS. ....	132
Şekil 4.51. Sağlıklı ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (E) SF/PC kaplı BS/KTS, (F) SF kaplı Kao/BS/KTS, (G) SF kaplı Vit K/BS/KTS, (H) SF kaplı PS/BS/KTS.....	133
Şekil 4.52. Diyabetik ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (A) Kontrol, (B) Gazlı bez, (C) BS/KTS, (D) SF kaplı BS/KTS. ....	134
Şekil 4.53. Diyabetik ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (E) SF/PC kaplı BS/KTS, (F) SF kaplı Kao/BS/KTS, (G) SF kaplı Vit K/BS/KTS, (H) SF kaplı PS/BS/KTS.....	135



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

BS	Bakteriyel Selüloz
KTS	Kitosan
PS	Protamin Sülfat
SF	İpek Fibroin
Kao	Kaolin
ECM	Ekstraselüler matriks
PBS	Fosfat tamponu
PRP	Plateletçe zengin plazma
PPP	Plateletçe fakir plazma
ECH	Epiklorhidrin
vWf	von Willebrand faktör
TXA2	Tromboksan A2
PAF	Platelet Aktivasyon Faktörü
ADP	Adenozin di fosfat
MFC	Mikrofibriler Kollajen
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HS	Hestrin-Schramm
RBCs	Eritrositler

# 1. GİRİŞ

Trafik kazaları, düşme, darp, iş kazaları ve ateşli silah yaralanmaları sonucu ortaya çıkan travmalar toplumsal bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Acil servislerde travmaya bağlı olarak başvuran kişi sayısı her geçen gün artmaktadır. Dünya genelinde 2000 yılında beş milyon insan travma nedeniyle ölmüştür ve ölüm oranı 100.000'de 83.7'dir [1]. Travmalar dünya genelinde ölümlerin % 9'undan sorumludurlar ve tüm hastalıkların % 12'sini oluştururlar [2]. Ülkemiz de travmaya bağlı ölüm oranlarının en yüksek olduğu ülkeler arasındadır. Kanama, travmalı hastalarda ölüm ve sakatlığın önemli sebeplerinden birisidir. Travma sonucu kişide görülen sakatlıkların yanı sıra ülke ekonomisine getirdiği mali yük göz ardı edilemeyecek değerdedir. Bu nedenle kanama kontrolü, travmaya bağlı yaralanmalarda hastane öncesi süreçte ve cerrahi müdahaleden sonra klinik gidişat açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla hastane öncesi alanda, afetlerde, savaşlarda hastanın kendine uygulayabileceği düzeyde basit, bir ilkyardımcı tarafından da kolaylıkla uygulanabilecek, fazla hazırlık gerektirmeyen, ucuz, kolay taşınabilen, etkili bir hemostaz sağlayan hemostatik ajanların geliştirilmesi öncelikli olmalıdır.

Sivil hayatta ve askeri operasyonlar sırasında savaş alanlarında merkezi sinir sistemi hasarları sonucu oluşan ve en önemli ölüm nedeni olarak gösterilen travmaya bağlı kanamalarda kullanılan biyomateryallerin yaşamı koruması ve sağlık hizmetlerini iyileştirmesi bakımından büyük avantajları vardır. Şimdilerde hemostatik ajanların ya da prosedürlerin 3 temel kategorisi bulunmaktadır; kimyasal, termal ve mekanik [3, 4]. Kimyasal ajanlar kanın pıhtılaşma aktivitesini değiştirir, kan akışını yavaşlattığından ve pıhtılaşmayı desteklediğinden damarların kasılmasına neden olan tromboksan A2 gibi vazokonstrüktör olarak görev yapar [5, 6]. Termal cihazlar, elektrotlar, lazer ya da ısının kullanıldığı koterizasyonu kapsar [7]. Standart iki probu kateter cihazına benzer bir etki yaratan, uygulandığı zaman ekzotermik reaksiyona giren ajanlar da bulunmaktadır. Mekanik metodlar kan akışını yavaşlatmak için bası ya da bağlamanın kullanılmasıdır [8]. Bu hemostatik ajanların uygulanması ve kısıtlamaları ile ilgili olarak beş temel problem bulunmaktadır. İlki toz formunda olduğu gibi bu materyallerin bazıları katıdır ve hemostatik etkilerini göstermek için yara bölgesinin içine doğru sızacak yetenekte değildirler [9]. İkincisi siyanoakriatlar gibi bazı sıvı ajanlar etkili olmak

için kuru bir çevreye ihtiyaç duyar [10]. Üçüncüsü bazı materyaller iyileşmeyi engelleyecek ya da geciktirecek vücut üzerinde ek bir strese neden olacak şekilde komşu hücrenin ölümüne neden olan bir immun cevap yaratabilir [11]. Dördüncüsü bazı ajanlar kısa yarılanma süresine ve özel kullanım ihtiyaçlarına sahiptir [12]. Son olarak kullanılan bazı hemostatları kontrol edilemeyen çevrelerde kullanmak zordur. Ayrıca eğer hemostatik aktivitenin bir kısmı şişme ise, ek bir doku hasarına ya da hatta ölüme neden olabilecek lokal kan ihtiyacını durdurduğundan ya da azaltmadığından emin olmak için ekstra bir özene ihtiyaç vardır.

Yukarıda bahsedilen sorunlar ve ihtiyaçlar göz önüne alındığında hazırlanan tez kapsamında nanoteknolojik yöntemler kullanılarak literatürde var olan hemostatik ajanlara alternatif olacak bir hemostatik malzeme üretilmesi planlanmıştır. Hazırlanacak olan hemostatik örtüde bileşen olarak medikal alanda sıklıkla kullanılan biyouyumlu, biyobozunur ve minimum reaksiyon oluşturan kitosan ve selüloz tercih edilmiştir. Modifikasyonunda kullanılacak olan fosfolipidler, kalsiyum, protamin sülfat, Vitamin K, kaolin gibi hemostazda aktif rol oynadığı bilinen materyallerin kanın su içeriğini absorblayıp trombositlerin fonksiyonunu arttırması ve kanın şekilli elemanlarının buraya göçünü sağlamasıyla etkili bir hemostatik örtü için iyi bir birleşim sağlanacağı düşünülmüştür. Bunun yanı sıra hemostatik ajanın nano boyutun vermiş olduğu özellikleri de taşıması, hazırlanan hemostatik örtünün etkinliğini bir kat daha arttıracaktır. Nanofibriler örtülerin hemostatik ajan olarak düşünülmesinin altında, bu örtülerin doğal ekstraselular matriksin boyutlarına benzer olmasının yanı sıra ekstraselular matriks (ECM)'in önemli biyomoleküllerinden olan kollajene benzerliği yatmaktadır. Kollajenin hemostazda aktif rol oynadığı da bilinmektedir. Ayrıca nanofibriler örtülerin yüksek yüzey alanı/hacim oranı kanamanın durdurulmasını hızlandırırken, nanoboyut ise trombositlerin buraya göçünü hızlandıracaktır.

Literatürde nanoteknoloji kullanılmadan üretilen hemostatik tıkaçların katyonik bağlama özelliğinin çok zayıf olduğu ve trombositleri etkin bir şekilde aktif hale getiremediği yönünde bilgiler mevcuttur. Dolayısıyla yara bölgesinde kanamanın yeniden başlama riski yüksek olacaktır. Bu nedenle geleneksel yöntemlerin kullanılmasının mümkün olmadığı özellikle kasık, sırt, kalça ve koltuk altı bölgelerinde etkin bir hemostaz sağlayacak hemostatik malzeme geliştirilmesi tezde ulaşılmaması beklenen öncelikli amaçtır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemostaz

Organlar arasında gaz, besin, mineral, metabolik ürünler ve hormonların ulaştırılabilmesi için kardiyovasküler sistem içerisinde kan dolaşımının sağlıklı olması gereklidir. Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır ve travma, cerrahi girişim, damarın endotel dökmesini bozan hastalıklar, endotoksinlerin etkisi ve kanın endotel altı bağ dokusu ile temas etmesi gibi durumlarda başlatılır. Birbirini izleyen bir seri mekanizma ile hemostaz sağlanır. Bu mekanizmalar; damar spazmı, trombosit tıkaç oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır [13].

Normal hemostaz, plazma, koagülasyon, fibrinolitik proteinlerin, plateletlerin ve kan damarlarının ortak etkileşimine bağlıdır. Hemostaz, bu kompleks prosesi daha kolay anlaşılır hale getirecek 3 kategoriye ayrılabilir. Bu kategorinin her biri genellikle farklı bir klinik anlamı ifade eder. Örneğin primer hemostazdaki bir sorun köpekte epistaksis ile kendini gösterirken sekonder hemostazda hemoartrozis ile kendini gösterir. Ayrıca bu 3 proses simultan ve in vivo ortamda ardışık olmayacak şekilde gerçekleşmelidir.

Bu 3 kategori;

✓ Primer hemostaz: Trombosit tıkaçın oluşumu olarak tanımlanır. Hasarı izleyen saniyeler içerisinde gerçekleşir. Kapillerlerden, küçük arteriol ve venüllerden kan kaybının durdurulması bakımından önem taşır.

✓ Sekonder hemostaz: Koagülasyon kaskadı süresince fibrin formasyonunun oluşumu olarak tanımlanır. Daha büyük damarlarda önem taşır ve hasarı izleyen saatler ya da günler sonra kan kaybının önlenmesini sağlar.

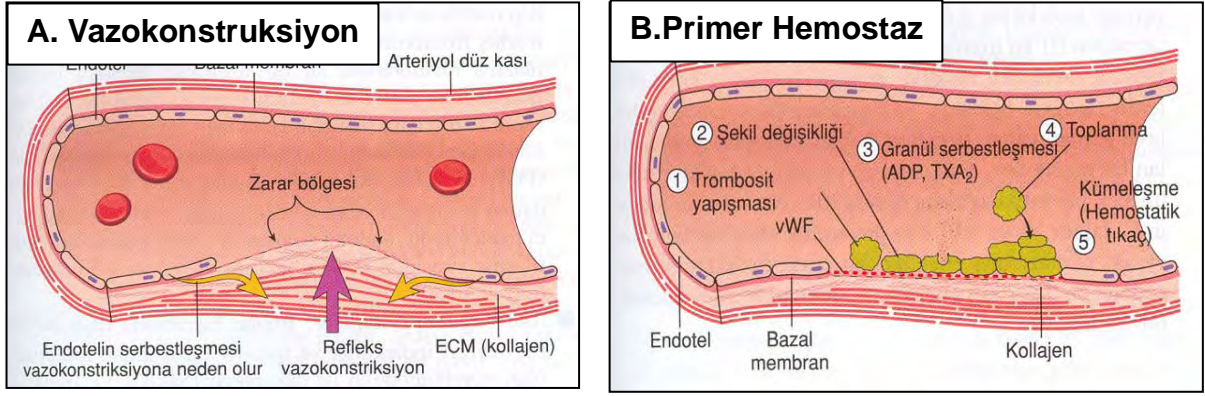
✓ Tersiyer hemostaz; pıhtının parçalanması için plazmin formasyonunun oluşumu olarak tanımlanır.

### 2.1.1. Primer Hemostaz

Primer hemostaz plateletler, kan damarı duvarı ve von Willebrand faktörünü kapsayan primer platelet tıkaçının oluşumu olarak tanımlanır. Genel bir kural olarak primer hemostazda abnormaliteler, damar kesilmesi ya da yaralanma sonrası uzayan kanama, peteşiyal ya da eşiyomotik kanamalar, mukozal yüzeyden kanamalar (epistaksis, melena, hematüri) ile sonuçlanır [14]. Ayrıca sorun birkaç yerde ise, sekonder hemostaz rahatsızlıklarının daha tipik kanaması olan intrakavital kanamaya yol açabilir. Bu nedenle, primer hemostazdaki bir sorunun tipik klinik göstergelerini sergileyen bir hayvan normal olmayan platelet sayısı ya da fonksiyonuna, kan damarı duvarındaki bozukluklara ya da normal olmayan von Willebrand faktöre sahip olabilir.

Endotel hücreleri normal hemostazın birbirine karşıt özelliklerini düzenler. Bir taraftan antiplatelet, antikoagülan ve fibrinolitik özelliklere sahip iken, diğer taraftan prokoagülan aktivite gösterme eğilimindedirler. Normal bir endotelyum trombositlerin yüksek derecede trombojenik olan subendotelial hücre dışı matriksle karşı karşıya gelmesini engeller. Aktive olmamış trombositler endotele yapışmazlar. Aktive olduklarında ise zarar görmemiş endotele yapışmalarını güçlü damar genişletici ve trombosit agregasyonunu baskılayıcı maddeler olan nitrik oksit ve prostaglandin I<sub>2</sub> (prostasiklin) engeller. Bu iki madde de trombosit içi siklik adenozin monofosfat ve siklik guanozin monofosfat düzeylerini artırarak trombositlerin ve lökositlerin agregasyonunu inhibe ederler. Ayrıca endotel hücreleri elektriksel olarak negatif yüklü olduklarından yine negatif yüklü olan trombositleri uzaklaştırırlar. Bu fiziksel etkinin yanı sıra endotel yüzeyinde bulunan trombomodulin ve heparin sülfatın trombinin inhibe edici etkileriyle, fibrin pıhtısının damar içine yayılması sınırlanır.

Damar duvarının yaralanmasını takiben, ilk aşama geçici, bölgesel indüklenen fenomen vazokonstrüksiyondur. Vazokonstrüksiyon sadece ekstravasküler kan kaybını geciktirmez lokal kan akımını da yavaşlatır. Burada amaç koagülasyon prosesinin aktivasyonu ve subendotelial yüzeye plateletlerin yapışmasını iyileştirmektir. Platelet yapışmasını kapsayan primer platelet tıkaç oluşumu, bir platelet tıkaç formunun agregasyonu sonrası plateletlerin aktivasyonunu takip eder.



**Şekil 2.1.** Hemostazda gerçekleşen vazokonstriksiyon ve primer hemostazın şematik gösterimi.

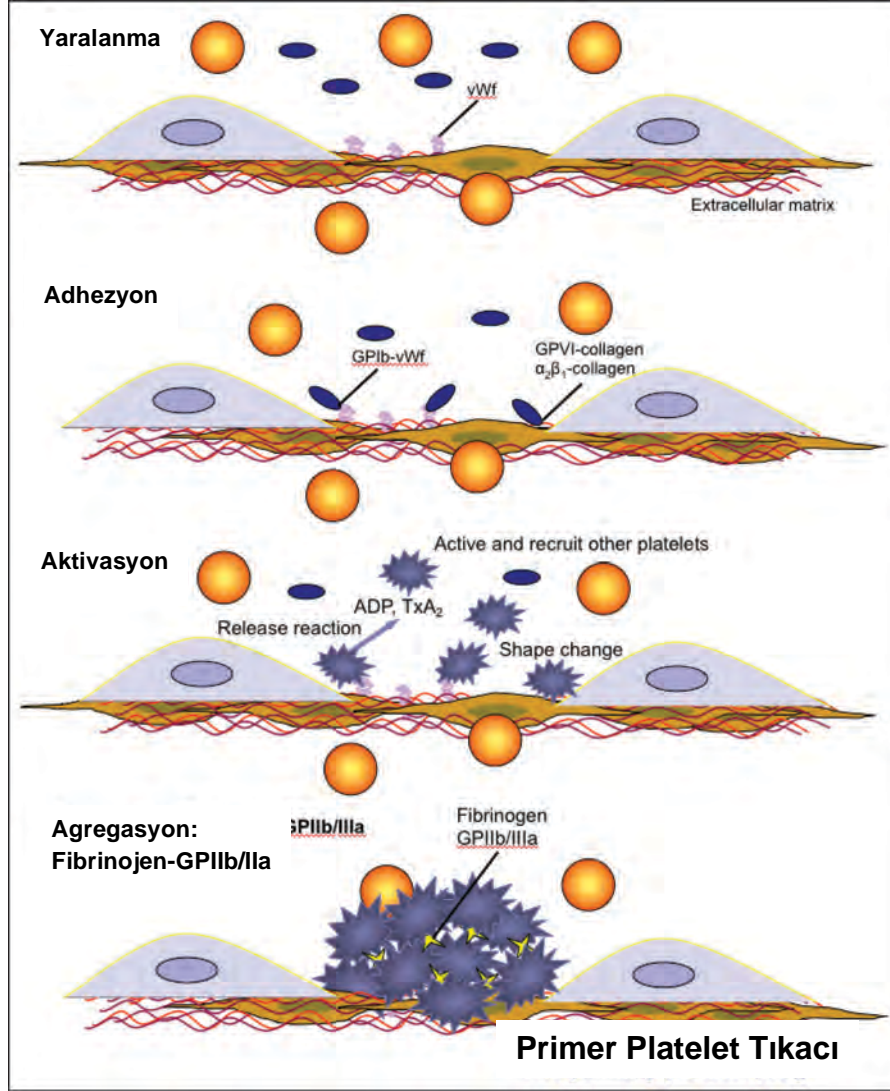
Platelet adhezyonu: Hemostazda ilk aşama subendotelyuma plateletlerin yapışmasıdır. Yüksek kayma hızı olan bölgelerde, bu yapışma platelet membranındaki glikoprotein Ib-IX'e (GPIb-IX/V) bağlanan von Willebrand faktör (vWf) tarafından gerçekleştirilir.

Aort gibi düşük kayma hızı olan bölgelerde ise plateletlerin subendotelyuma bağlanması fibrinojen aracılığıyla gerçekleşir (platelet reseptörü-integrine, glikoprotein Ia/IIa'a yapışması ile).

Platelet aktivasyonu: Plateletlerin damar duvarına yapışması onları aktive eder, plateletlerin şekil değiştirmesine neden olur ve yüzeylerindeki kollajen reseptörünü (glikoprotein IIb/IIIa denen bir integrin reseptörü) aktive etmeye ve salım reaksiyonunun gerçekleşmesine (alfa ve dens granül içeriklerinin salımına) neden olur. Ek olarak aktivasyon ile birlikte plateletler tromboksan A2 (TXA2) ve platelet aktivasyon faktörünü (PAF) sentezler ve salar.

Platelet agregasyonu: Tromboksan, PAF, adozin difosfat (ADP) ve serotonin (dens granüllerinden salınan ADP ve serotonin) platelet agonistleridir ve yapışan plateletlere ek olarak yapışacak plateletlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını sağlarlar. Bu aktivasyon koagülasyon kaskadı süresince trombin oluşumu ile iyileştirilir; trombin önemli bir platelet antagonistidir. Platelet agregasyonu birincil olarak komşu plateletdeki glikoprotein IIb/IIIa ya bağlanan fibrinojen aracılığı ile gerçekleşir (vWf ikincil role sahiptir). Bu agregasyon fibrin formasyonu tarafından stabilize edilmek

zorunda olan primer platelet tıkaçın oluşumuna yol açar. Plateletler koagülasyon faktörlerinin bağlanması için reseptörler ve fosfolipid yüzey (PF3 olarak adlandırılan) tarafından sekonder hemostaza katkıda bulunur.



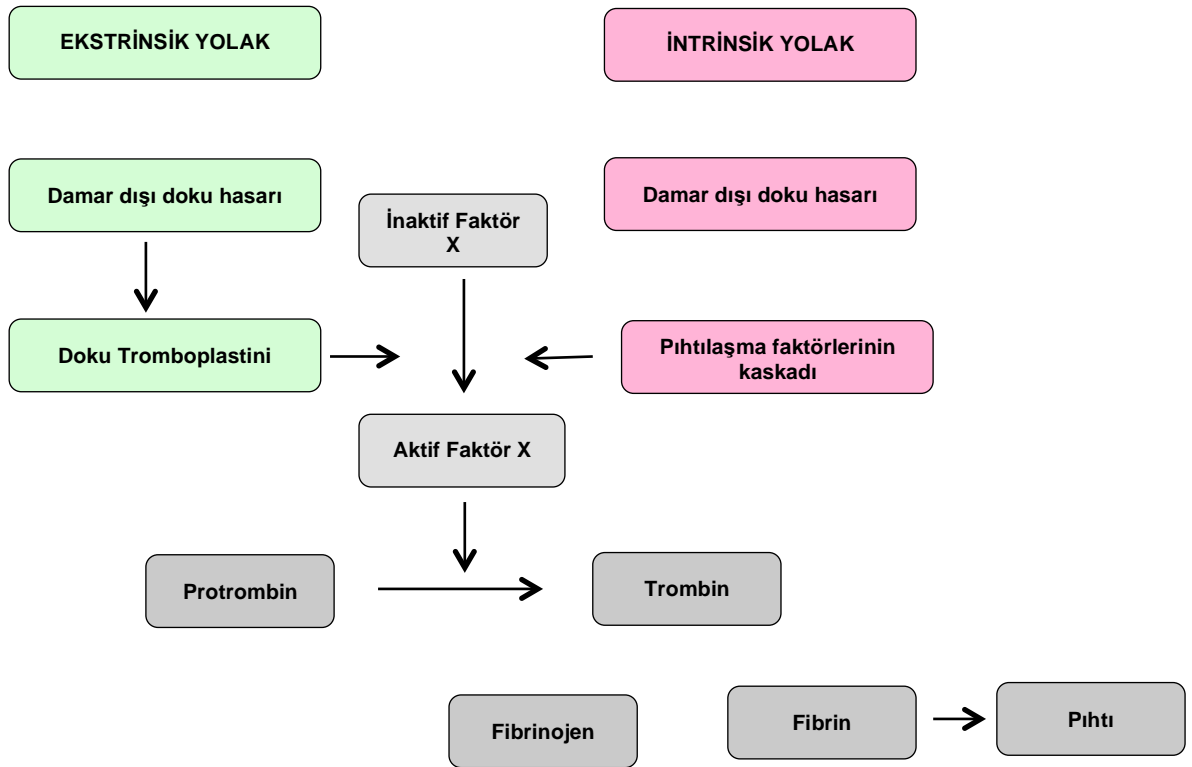
Şekil 2.2. Primer hemostatik tıkaçın oluşumu.

### 2.1.2. Sekonder Hemostaz

Koagülasyon kaskadı boyunca fibrin oluşumu olarak tanımlanır. Enzim olarak rol oynayan (aktivasyona ihtiyaç duyan) koagülasyon faktörlerini ve kofaktörleri (faktör V ve VIII), kalsiyum ve plateletleri (plateletler fosfolipidler için bir kaynak sağlar ve koagülasyon kaskadının ilerlemesini sağlayan bir bağlanma yüzeyi oluşturur) içerir.

Koagülasyon kaskadındaki sorunlar primer hemostazdan daha ciddi kanamalara neden olur. Peteşiyal kanama sekonder hemostaz bozukluklarında görülmez. Bu sorunlar epitaksis ya da yaralanma, cerrahi sonrasındaki kanamaları içeren primer hemostaz sorunlarıyla ortak kanama semptomlarına sahiptir [15].

Koagülasyon kaskadı geleneksel olarak 3 yolağa ayrılır: intrinsik, ekstrinsik ve ortak yol. Ekstrinsik yol, doku faktörü ve faktör X'u aktive eden faktör VII kompleksini içerir. İntrinsik yol yüksek moleküler kininojen, prekallikrein, faktör XII, XI, IX ve VIII'i kapsar. Faktör VIII, faktör X'un faktör IX-aracılı aktivasyonu için kofaktör (kalsiyum ve platelet fosfolipidleri ile) olarak rol oynar. Ekstrinsik ve intrinsik yollar faktör X'un aktivasyonu aşamasında birleşir. Ortak yol protrombinden trombinin faktör X-aracılı oluşumu (faktör V, kalsiyum ve platelet fosfolipidleri tarafından kolaylaştırılan) ve fibrinojenden fibrinin oluşumudur.



**Şekil 2.3.** Hemostazda gerçekleşen intrinsik ve ekstrinsik yolların şematik gösterimi.

Geçmişte büyük çoğunluk intrinsik ve ekstrinsik yolların koagülasyonu başlattığına inanılıyordu. Şimdi biliniyor ki intrinsik yolak koagülasyonun güçlenmesini sağlarken (ama başlatmaz), koagülasyonun başlaması için ana yolak ekstrinsik yoldur (faktör VII ve doku faktörü). Bu bağlamda faktör XII (intrinsik yolağın ilk komponenti)



koagülasyonun başlatılmasından ziyade bradikinin oluşumu ve fibrinolizis uyarımı için çok önemlidir. Faktör XII noksanlığının kan kaybı için bir anlam ifade etmediği insanlar ve hayvanlarda da (deniz memelileri ve bazı kediler) desteklenmektedir. Ayrıca koagülasyon kaskadının intrinsik ve ekstrinsik olarak ayrılması koagülasyon kaskadındaki hataların tanımlanması ve koagülasyon testlerinin arkasındaki mekanizmayı tanımlamak açısından oldukça kullanışlıdır.

Koagülasyonun başlatılması: Koagülasyon kaskadı doku faktörünün (faktör III) oluşumu ile ekstrinsik yolak tarafından başlatılır. Doku faktörü endotelial hücreler, subendotelial doku ve monositler tarafından eksprese edilir. Doku faktörü sonrasında faktör VII'ye bağlanır ve bu kompleks faktör X'u aktive eder. Faktör X, faktör V, kalsiyum ve fosfolipid (protrombinaz kompleks) varlığında protrombini trombine aktive eder. Bu yolak doku faktörü yolağı inhibitörü denen lipoprotein-ilişkili molekül tarafından hızla inhibe edilir. Bu yolak tarafından oluşturulan trombinin küçük bir miktarı koagülasyon kaskadını güçlendiren intrinsik yolağın faktör XI'unu aktive eder.

Koagülasyonun güçlendirilmesi: Ekstrinsik yolak tarafından oluşturulan trombinin küçük bir miktarı tarafından koagülasyon kaskadı güçlendirilir. Bu trombin faktör XI ve VIII'un aktivasyonu aracılığıyla intrinsik yolağı aktive eder. Aktive edilmiş faktör IX, aktive edilmiş faktör VIII ile birlikte, kalsiyum ve fosfolipid ("tenaz kompleks"), bol miktarda trombin üreterek faktör X'un aktivasyonunu güçlendirir. Trombin sırasıyla daha sonra kendiliğinden çözünebilir fibrin polimeri haline gelecek fibrinojeni çözünebilir fibrin monomerleri formuna böler. Trombin faktör XIII'u aktive eder, kalsiyumla birlikte çözünebilir fibrin polimerini stabilize eder ve çapraz bağlar.

Alternatif yolak: İntrinsik yolağı uyaran ikinci bir rota (alternatif yolak da denen) doku faktörü-faktör VII kompleksi tarafından faktör IX'un direkt aktivasyonudur. Ayrıca bu küçük bir yolaktır ve intrinsik yolağın ana stimulatörü faktör XI aktivasyonu sayesinde trombindir.

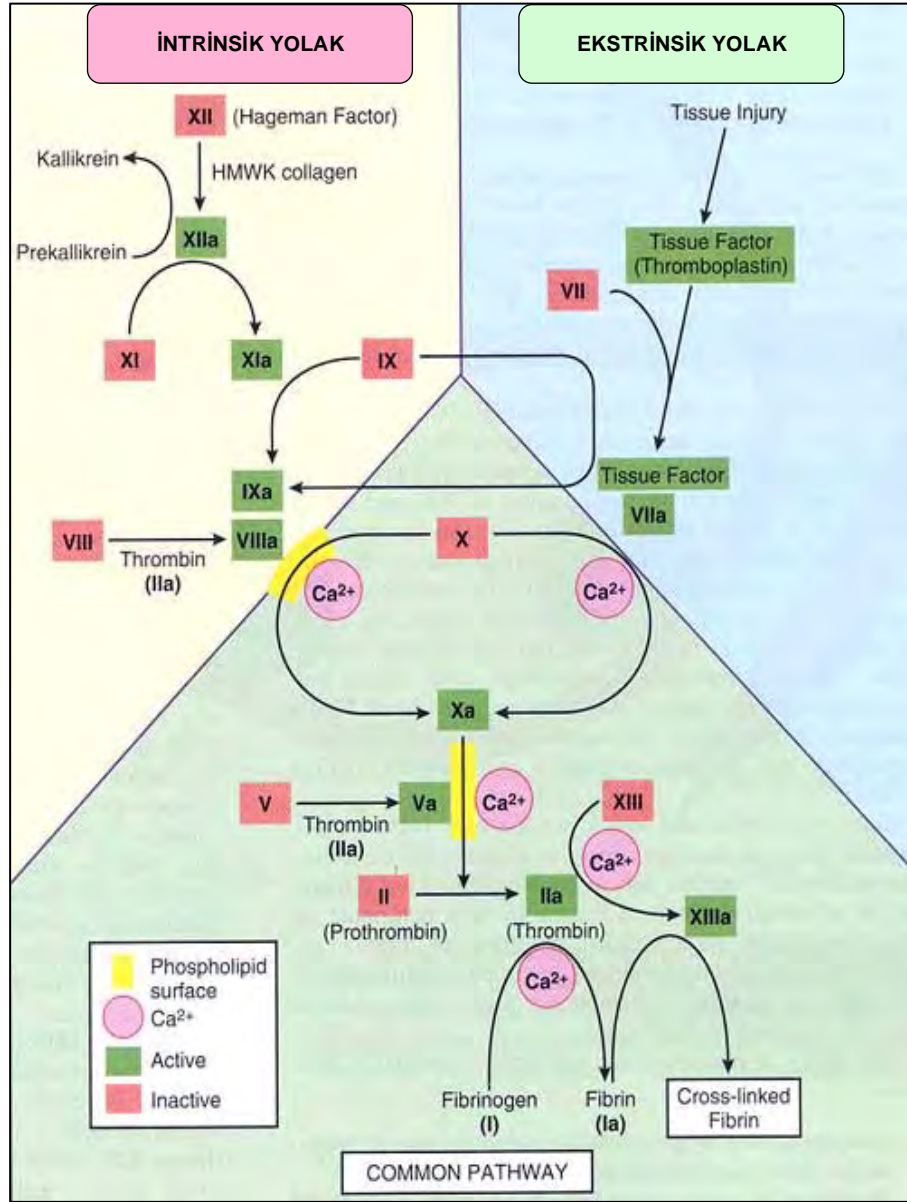
Kontakt yolak: Kontakt yolak prekallikrein (Fletcher faktör), yüksek-moleküler ağırlıklı kininojen (Williams, Fitzgerald faktör) ve faktör XII (Hageman faktör) içerir. Bu kontakt sistem önemli antikoagülanta, profibrinolitik ve proinflamator role sahiptir ve koagülasyon kaskadı üzerinde (faktör XI'un faktör XII-a aracılı aktivasyonu ile) minimal etkiye sahiptir.

Prekallikrein yüksek molekül ağırlıklı kininojen ile birlikte 1:1'lik kompleksle dolaşımı sağlar. Bu kompleks hücre membranının yüzeyindeki faktör XII ile birlikte (aktivasyonun negatif yüzeyi denen) biraraya gelir. Plateletlerin, endotel hücrelerinin ve granüositlerin yüzeyindeki bu düzenleme ile Faktör XII'in aktivasyonu, prekallikreini güçlü bir enzim, kallikreine dönüştürür. Kallikrein faktör XII'in aktivasyonunu güçlendirir ve yüksek molekül ağırlıklı kininojeni bradikinine dönüştürür ve bu nötrofil bir kemotaksindir. Bradikinin, vasküler düz kas büyümesini ve çoğalmasını sağlayan, vasküler geçirgenliği arttıran, vazodilasyona neden olan önemli bir vasküler aracıdır. Yaralanan bir damarda, bradikinin damar onarımını uyarmakla görevlidir. Ayrıca, bradikinin trombin aracılı platelet agregasyonu inhibisyonu aracılığıyla antitrombotik role sahiptir. Bu kontakt sistem fibrinolizisin güçlü bir aktivatörüdür. Kallikrein ve faktör XIIa direkt olarak plazminojeni plazmine dönüştürebilir ve bradikinin endotel hücrelerinden salınan doku plazminojen aktivatörünün en güçlü ve spesifik uyarandır. Bu kontakt yolak fibrinolizisin aktivasyonu ve hemostazisden ziyade vasküler biyolojinin kodlanması ve inflamasyonu için çok önemlidir.

Hemostazisin farklı prosesleri arasında etkilenen bu kompleks, her iki primer (platelet tıkaçın oluşumu) ve sekonder (koagülasyon için zorunlu fosfolipid yüzey ihtiyacı) hemostazda plateletlerin katılımı, fibrinolizisin uyarımında faktör XII'in rolü (koagülasyonun başlatılmasından ziyade) ve fibrinolizis inhibitörü, koagülasyon kaskadının güçlendiricisi, plateletlerin aktivatörü olarak trombinin etkisi ile resmedilir.

Trombin hemostazda önemli bir rol oynar, trombotik ve antitrombotik molekül olarak fonksiyon görmesi dolayısıyla üzerinde durulmayabilir. Trombotik bir molekül olarak, trombin farklı yollarla, en belirginini fibrinojenden fibrinin oluşumu ile, koagülasyonu desteklemektedir. Fibrin oluşumu intrinsik ve ekstrinsik yollar arasındaki kompleks etkileşime ihtiyaç duyan fazla miktarda trombine dayanmaktadır. Ek olarak, trombin bir platelet antagonistidir, platelet agregasyonunu destekler ve aynı zamanda protrombinaz ve tenaz kompleksleri için zorunlu kofaktörler olan faktör V ve VIII aktive eder. Trombin de fibrin polimerinin çapraz bağlanması stabil, üç boyutlu bir fibrin kafesinin oluşumu için zorunlu olan faktör XIII'ü aktive eder. Antitrombotik bir molekül olarak, trombin tersine kendi inhibitörümüştü gibi davranır. Endotel hücreleri üzerindeki trombomoduline bağlanan trombin antikoagülan proteinler protein C ve S'i aktive eder. Bu proteinler trombin oluşumunu sınırlayan faktör V ve VIII'in

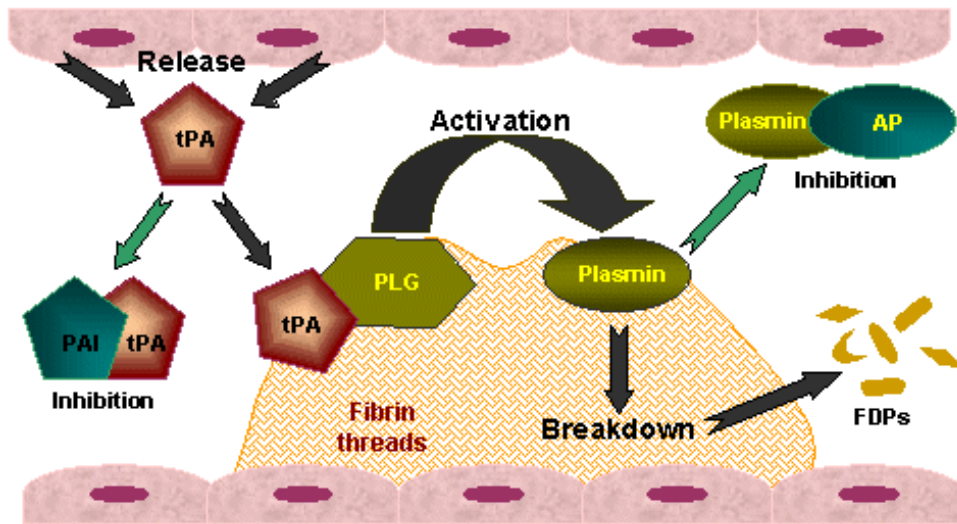
aktivasyonunu inhibe eder.



**Şekil 2.4.** Koagülasyon kaskadının şematik gösterimi. Koagülasyon ekstrinsik yolak tarafından başlatılır (doku faktörü-faktör VII) ve trombin tarafından intrinsik yolak boyunca güçlendirilir. Faktör XII tarafından XI'un aktivasyonu kaskadın aktivasyonunda minimum role sahiptir; faktör XII bradikinin oluşumu için önemlidir (fibrinolizisi stimüle eder). Alternatif yolak doku faktörü-faktör VII kompleksi tarafından intrinsik yolağın (özellikle faktör IX) aktivasyonudur. Kısaltmalar: High MW kininojen: yüksek molekül ağırlıklı kininojen, F: faktör, TF: doku faktörü, Ca<sup>2+</sup>: kalsiyum, PF3: platelet fosfolipidi.

### 2.1.3. Tersiyer Hemostaz

Tersiyer hemostaz, fibrinolizisten sorumlu ana enzim olan plazmin oluşumu olarak tanımlanır (pıhtının parçalanması). Aynı zamanda koagülasyon kaskadı aktive edilir, doku plazminojen aktivatörü (tPA) endotel hücrelerinden salınır. Salım hipoksia ve bradikinin gibi farklı faktörler tarafından uyarılır. Doku plazminojen aktivatörü pıhtı ile birlikte plazminojene bağlanır, onu plazmine dönüştürür. Plazmin pıhtı içerisindeki fibrinojen ve fibrin (çözünebilir ve çapraz bağlanmış) her ikisini de parçalar, fibrinojen degradasyon ürünlerini salar. Plazminojenin tPA tarafından aktivasyonu fibrin gerektirir, bundan dolayı trombus oluşum bölgesine plazmin üretimini kısıtlar. Plazminin yerleşim aktivitesi nonspesifik olduğundan ve sadece fibrin değil faktör V ve VII, fibrinojen gibi diğer faktörleri de parçaladığından önemlidir.



**Şekil 2.5.** Tersiyer hemostazın şematik gösterimi. (tPA: doku plazminojen aktivatörü; PAI: plazminojen aktivatör inhibitörü; PLG: Plazminojen; AP: Antiplazmin; FDPs: Fibrin(ojen) degradasyon ürünleri.

tPA'dan bağımsız plazminojen aktivatörleri vardır. Bunlar ürokinaz, faktör XII ve kallikreindir. Aktive olmuş faktör XII ve kallikrein plazminojeni plazmine aktive edebilir. Ayrıca, faktör XII ve kallikrein koagülasyonun intrinsik yolağı kontakt aşamasında yüksek moleküler ağırlıklı kininojenden bradikinin üretir; bradikinin tPA salımı için en özel ve güçlü bir uyarandır. Koagülasyondan ziyade bradikinin oluşumu ve fibrinolizide intrinsik yolak komponentlerinin (yüksek molekül ağırlıklı kininojen, prekallikrein ve faktör XII) rolünü vurgulamaktadır.

## **2.2. İdeal Hastane Öncesi Örtülerin Özellikleri**

Kan kaybı kritik zaman aralığında müdahale yapılamadığı takdirde ağır biçimde yaralanmış hastalar için ana ölüm nedenidir. 30 yıldan daha uzun bir süredir Vietnam savaşından beridir sivil hayatta uygulanmak üzere daha iyi metotlar geliştirilmektedir. Muharebe yaralanmaları diğer yara tiplerinden epidemiyoloji, yaralanma mekanizması ve patofizyoloji, vücudun cevabı bakımından farklıdır [16]

Travmatik ölümlerin % 40'ı ve sivil hayattaki ölümlerin % 90'ından fazlası hastane öncesi koşullardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda muharebe ölümlerinin % 50'si kan kaybı kaynaklı büyük çapta kan kaybından dolayı rapor edilmektedir [17, 18].

Irak barış operasyonundaki kayıplarla yapılan çalışmalar ve ikinci dünya savaşındaki çalışmalar muharebe ölümlerinin % 24'ünün kanama kontrolündeki iyileştirilmiş metotlarla engellenebileceğini desteklemektedir ve bu ölümlerin % 85'i kontrol edilmeyen kanamadan kaynaklanmaktadır. Yeni metotların bulunması ve kanama kontrolü için yeni materyallerin keşfinin gelecekteki kanamaya bağlı hastalıkları ve ölümleri azaltmak için önemi vurgulanmıştır. Bu yüzden topikal ve cerrahi hemostatik ajanları içeren kanama kontrolü için alternatif metotların geliştirilmesine odaklanılmıştır.

Marketlerde okside rejenere selüloz, absorbentler, hemostatlar, sızdırmazlar, nişasta bazlı tozlar, kollajen bazlı örtüler, topikal trombin, trombin-fibrinojen örtüler, ışıkla iyileştirilmiş jelatin hidrojel, kitin ve kitosan bazlı hemostatik ajanlar,

siyanoakrilat adhesivler, polietilen glikol polimerleri, sığır albümini ve glutaraldehid, mikroporöz polisakkarit hemoküreler, mikrokristallin kollajen, jelatin sponge, fibrin glue ve poly(L-glutamik asit) (PLGA) gibi çok sayıda hemostatik ajan bulunmaktadır. Bu ajanların her birinin kendi avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

**Çizelge 2.1.** Hemostatik ajanların avantajlar ve dezavantajları

AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
En azından birkaç saat kanamayı durdurma	Kanamayı durdurma yeteneğinde olmama ve trombin formasyonuna yol açma
Kan kaybını azaltma ve ölüm oranını azaltma	Alerjik reaksiyonlara neden olma
Yara bölgesini mühürleme	Kısa raf ömrü ve kullanmadan önce hazırlık gerektirmesi
Vazospazmı indükleme	Spesifik ambalajlama kuralları, bazı ortamlarda yararlanmak zor
Suyu absorblama, kırmızı kan hücrelerinin ve kanama bölgesindeki plateletlerin konsantrasyonunu düzenlemek,	Pahalı maliyeti
Platelet aktivasyonunu ve pıhtı formunu indüklemek	

İdeal örtü malzemesi yoktur ancak en önde beklenen özellikler ucuz olması, dayanıklılık ve kolay kullanımdır. Örtü malzemesi kendisi hemostatik olmalı ve fazla eksudayı absorbe edebilmeli ve yaradan kontaminatları uzaklaştırmalı nemli termal olarak yalıtılmış bir çevre sağlarken bakterilerin girişi için bir bariyer görevi görmelidir.

### 2.3. Topikal Hemostatik Ajanlar

Binlerce yıl önce bir yaradaki kanamayı durdurmak için çok farklı hemostatik ajanlar kullanılmaktaydı. Mısırlılar waks, yağ ve arpadan oluşan bir karışım kullanmaktaydılar [19]. Eski Yunanlılar muharebe bölgelerinde yaralara hemostatik bitkiler uygularlardı [20]. Amerikalılar ise hayvan postlarını sıcak kumla

karıştırdıktan sonra kazıyarak yaralı bölgeye uyguluyorlardı [21]. Son yüzyıldaki biyoteknoloji alanındaki gelişmeler modern cerrahide uygulanabilecek topikal hemostatik ajanlarda bir patlamaya neden olmuştur. Aşağıda sıklıkla kullanılan topikal hemostatik ajanlar, bunların mekanizmaları, avantajları ve dezavantajları ortaya konmuştur.

### **2.3.1. Fiziksel Ajanlar**

#### **2.3.1.1. Bone waks**

Bay Victor Horsley 1886'da arı ağdası, salisilik asit ve badem yağından oluşan antiseptik waks denilen bir karışımı köpeklerde hemostaz sağlamak üzere geliştirmiştir [22]. Şimdilerde cerrahlar bone waksı, arı waksından, parafinden, izopropil palmitat ve waks inceltici ajandan oluşan absorbe olmayan bir karışım olarak biliyorlar. Jonhson and Johnson, ethicon Inc, Somerville, NJ tarafından pazara sunulmuştur. Bone waks tamponlayıcı etkisi ve kemikteki kanama kanallarının kapatılması ile hemostazı sağlar. Kanamayı geri dönüşümsüz durdurmak için kolay bir yöntemdir. Bone waksın diğer bir avantajı diğer hemostatik ajanlara kıyasla düşük maliyetidir [23, 24]. Ayrıca bone waks vücut tarafından absorbe edilmediğinden osteojenezi engeller ve kemik iyileşmesini azaltır. Kemik granuloma formasyonu yabancı cisim reaksiyonu için ortopedik cerrahide [25, 26], nörocerrahide [27], dental cerrahide [28] ve sternotomide [29] bone waks kullanımının bir komplikasyonu olarak literatürde tanımlanmıştır. Ayrıca bakteriyel geçişe izin verme ve yabancı bir cisim olarak enfeksiyon için bir yuva görevi görür [30, 31]. Pulmoner sirkulasyonu içeren bölgelerde emboliye neden olabilir. Kemik waksı kontamine cerrahi bölgelerde asla kullanılmamalıdır [32].

#### **2.3.1.2. Ostene**

Wang ve arkadaşları 2001'de bone waksa alternatif olacak biyoyoumlu ve absorbe edilebilir hemostatik alternatiflerin "pluronic kopolimer karışımı" kullanımını tanımlamışlardır [33]. Yazarlar bir sıçan modelinde alkilen oksit kopolimerlerinin

bone waks benzeri hemostaz yarattığı, kemik büyümesini inhibe etmediğini gözlemlemişlerdir. Alkilen oksit kopolimerleri Ceremed Inc., Los Angeles, CA tarafından "Ostene" adıyla pazarlanmıştır. Ostene cerrahın elinde bone waks hissi verir, hidrofilik ve suda çözünebilir. İnsan vücudu tarafından biyokimyasal olarak değiştirilemez ve değişmeden elimine edilebilir. Bu karakteristik özelliklerden dolayı, Ostene'nin bone waksdan üstün olduğuna inanılmaktadır. Wellisz ve arkadaşları median sternomi ameliyatı olmuş 20 sıçanda Ostene'ni bone waksla kıyaslamışlardır. Araştırmacılar Ostene grubunun bone waksı kıyasla daha güçlü olduğunu bulmuşlardır [34]. Benzer bir çalışmada, Wellisz ve arkadaşları 24 sıçan tibiasında defekt yaratmışlardır ve *Staphylococcus aureus* inoküle etmişlerdir [35]. 4 hafta sonra bone waks ile muamele edilmiş tüm sıçanlarda osteomyelitis gelişmiştir. Polimer grubunda sadece 2 sıçan osteomyelitis belirtisi göstermiştir. Osten'in osteogenezisi zayıflatmaksızın ya da enfeksiyonu uyarmaksızın hemostaz yarattığı gözlemlenirken şimdiye kadar insanda yapılmış kontrollü bir çalışma bulunmamaktadır. Duke Üniversitesi Medikal Merkezi'nde kardiopulmoner bypass ve sternomi ameliyatı geçirmiş Yorkshire domuzlarında kullanılan Ostene yeterli bir hemostaz yaratmıştır ve sternomi kaynaklı bir kanamada bone waksın yerine kullanılması önerilmektedir.



**Çizelge 2.2.** Topikal hemostatik ajanların çalışma mekanizması, avantajları/kullanım tavsiyeleri ve dezavantajları/kullanımda dikkat edilmesi gereken noktalar [36].

Hemostatik ajan	Ürün	Etki mekanizması	Avantajları	Dezavantajları
<b>Bone waks</b>	Bone waks	Kemikteki kanama kanallarının kapatılması sayesinde tamponlama	Kemik yüzeyinden efektif olarak kanama kontrolünün yapılması	Bakteriyel geçişe izin verme ve enfeksiyon için bir yuva görevi görmesi, bu yüzden kontamine bölgelerde kullanılmaktan kaçınma  Embolize olma  Kemik füzyonunun kritik olduğu yerlerde kullanılmamalıdır (vücut tarafından absorbe edilmediği için)
<b>Ostene</b>	Ostene (alkilen oksit kopolimerleri)	Kemikteki kanama kanallarının kapatılması	Kemik yüzeyindeki kanama kontrolü için önerilmektedir (sternotomi için)  Kemik büyümesini engellememe ve zamanla absorbe olma	Aktif yada gecikmiş enfeksiyon bölgelerinde kullanılamaz.  Kemiği yapısal olarak destekleyecek bölgelerde kullanımına dikkat edilmelidir.

<b>Gelatin köpük</b>	Gelfoam, gelfilm, surgifoam	Pıhtılaşmayı başlatıcı fiziksel matriks sunması	Küçük damar kanamalarını efektif olarak kontrol etmesi Kemikteki kanamaları kontrol etmek için kullanılabilir Okside selüloz içerisinde hemostatik tıkaç olarak paketlenmesi tavsiye edilir 4-6 hafta içinde absorbe olabilme Nonantijenik Nötral pH biyolojik ajanlarla kullanımına izin verir	Önemli şişkinliklerin sınırlara baskı yapacağı kapalı boşluklarda kullanılmamalı Hareketli arteriyel kanama etrafında kullanımı sponge'u yerinden oynatabilir. Eğer intravasküler bir kompartıman içerisinde ise embolize olabilir.
<b>Okside selüloz</b>	Surgicel	Düşük pH'ın koagülatif nekroza katkıda bulunarak pıhtılaşma başlangıcı için fiziksel matriks görevi görmesi	Düşük pH antimikrobiyal etki sağlar Çok iyi kullanım karakteristikleri (koton benzeri katılık, kuru uygulandığında en iyisi) Bölgeye yapışmama 2-6 hafta içinde tipik olarak çözünme	Düşük pH'dan dolayı diğer biyolojik hemostatik ajanlarla (trombin gibi) kullanılmamalıdır. Düşük pH çevre dokularda inflamasyonu arttırabilir. Şişme gibi spinal korda yakın bölgelerde kullanımına dikkat ve surgical fiberler kompresyona neden olarak intervertebral forameni geçerler
<b>Mikrofibriler kollajen (MFC)</b>	Avitene Flour, Avitene Ultrafoam, Avitene Ultrawrap, Helistat, Helitene,	Platelet yapışması ve aktivasyonu	Önemli bir şişme yok 8 haftadan daha kısa sürede absorblama Parenkimal kanama bölgesini kontrol	Trombositopenia olan hastalarda daha az efektif Operasyon yapan kişinin

	Instat, Endoavitene		edebilme Etki mekanizmasından dolayı şiddetli heparinizasyona rağmen etkin olma	eldivenine yapışma Nöral yapılara bağlanabilme Kan dolaşımında MFC'nin filtrelere geçebileceğinden, dikkat edilmelidir.
<b>Trombin</b>	Trombin- JMI(bovine), Evithrom (human plasma derived), rh Trombin/Recothrom (recombinant human)	Fibrinojenin fibrine dönüşümü pıhtı formunda, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu	Bası ya da bağlama yetersiz kaldığında kapillerlerden ve küçük venüllerden minör kanamaların efektif kontrolü Kolay uygulama Hızlı etki	İmmünolojik cevaptan dolayı ve olası koagülapati ve trombozisten dolayı sığır trombin kullanımından kaçınmak, İnsan kan ürünleriyle reaksiyonu bilinen bireylerde kullanılmamalı
<b>Jelatinle birlikte trombin</b>	Floseal	Matriks içerisine çapraz bağlanmış jelatin granüller ve tamponlayıcı etki için şişme; trombinin hemostatik etkisi	Jelatin granüllerin tamponlayıcı etkisinden dolayı arteriyel kanamaları hafifletmek için fibrin macunlardan daha iyi kontrol Açık ve laparoskopik nefrektomi yanı sıra kardiyak cerrahide kullanımı önerilmektedir	Fibrinojen kaynağı gibi kanla etkileşime ihtiyaç vardır Uygulama sonrası %20 şişebilme
<b>Fibrin macunlar</b>	Tisseel, Eviceal, Crosseal	Uygulama bölgesinde trombin ve fibrinojen karışımı, trombin fibrinojeni fibrine, pıhtı formuna dönüştürür.	Heparinize hastalarda efektif Re-operatif kardiyak cerrahide, kolostomi kapatmalarında, splenik yaralarda, kemik onarımında, dural sealing, deri greftlemede kullanılır.	Uygulamadan önce, yaralar trombin ve fibrinojeni denatüre eden alkol, iodin ya da ağır metal içeren antiseptiklerle temizlenmelidir.

<b>Platelet sealants</b>	Vitagel	Mikrofibriler kollajen ve thrombin, hastanın plazma kökenli fibrinojen ve platelet derivatlı fibrinojen ve plateletler ile kombine olur.	Jel içerisindeki proteinler doku rejenerasyonu için özelleşirken, hastanın güçlenmiş pıhtısından plateletler içerir.  Ortopedik, hepatik, rekonstrüif ve genel cerrahi prosedürler için kullanılabilir.	Santrifüje ihtiyaç vardır ve ön hazırlık gerektirir.  Bypass ya da kan boşaltma durumlarında dikkat edilmelidir.  Etkinliğini zayıflattığından metilmetakrilat ve diğer akrilik adhesivlerle kullanılmamalıdır.  Foci böbrek taşı oluşumuna neden olabildiğinden renal pelvis ya da üreter yakınlarında kullanımına dikkat edilmelidir.
<b>Polietilen glikol hidrojel</b>	Coseal	Yara bölgesinde karışan ve çapraz bağlanan iki sentetik polietilen glikol polimeri	Prekardiyal adhezyonları engelleyebilir.  Vasküler yeniden yapılanma için iyi mekanik macun  Ekzotermik değildir, inflamasyona neden olmaz ve bakteriyel enfeksiyon olasılığını arttırmaz.	1 gün sonrasında başlangıç hacminin 4 katına kadar çıkabilme ve şişmeye devam etme  Kısmi nefrektomilerde iyi performans sergilememe
<b>Siyanoakrilatlar</b>	Dermabond	Su varlığında sıvı monomerlerin polimerlere dönüşümü	Yüzde, ekstremitelerde ve torsodaki yaralar için süturların yedeği olarak kullanılır.  2.5 dk'da tam olarak bağlanma, 7 gün sonunda iyileşmiş dokunun gücüne ulaşma, su geçirmez bariyer formu	Çentikli yırtıklarda kullanımı zordur.  Çarpışma, patlama yaralarında kullanılmamalıdır.  Mukozal yüzeylerde, aksilla

				ya da perineumda tavsiye edilmez.
<b>Glutaraldehid ile çapraz bağlı albümin</b>	Bioglue	Yara bölgesinde güçlü scaffold formasyonu için glutaraldehid sığır albuminini hücre proteinlerine çapraz bağlar.	20 saniyede % 65 bağlanma gücü, sıcaklığa ya da havaya suya bakılmaksızın 2 dakika içerisinde güçlü bir performans Süturlar ya da çiviler etrafındaki kapatma boşlukları için kullanım, arteriyel kanama için iyi bir alternatif Karotid endarterektomi ve arteriovenöz geçitler gibi periferel vasküler prosedürler yanı sıra periferel aortik anevrizmalarda kapak değişimlerinde ya da aortik kesiler gibi kompleks kardiyovasküler prosedürlerde sıklıkla kullanım	Büyümeyi engellediğinden gelişen yapılar etrafında çevresel uygulama yapılmamalıdır. Sinirlere yakın bölgelere dikkat, fonksiyon kaybına neden olabilir. Reaksiyona girmeyen glutaraldehid mutajenik etkilere neden olabilir. İntrakardiyak yapılara ve kapakçık yapraklarına uygulanamaz. Hipersensitif reaksiyonlara neden olabilir.
<b>Fibrin örtüler</b>	Kuru fibrin macun örtüler	Gazlı bez üzerinde dondurup-kurutulmuş (liyo-filize edilmiş) fibrinojen ve trombin	FDA ilaç araştırma protokolü altında Irak ve Afganistan ile birlikte Amerikan güçleriyle ön başarı Geniş yüzeyli abrazyonlarda kanamayı efektif olarak kontrol etme Fibrin sealantlardan daha uzun raf ömrü ve uygulama esnasında karıştırmaya gerek yok	FDA onayı yok Kırılganlığından dolayı güçlü paketlemeye ihtiyaç var

<b>Kitin örtüler</b>	Rapid Deployment Hemostat (RDH)	Vazokonstrüksiyon, mekaniksel tutturma, RBCs, pıhtılaşma faktörleri, plateletler	Hayvan modellerinde minör yaralar için efektif İlk kullanıcıların görüşüne göre acil tıp kullanımı için planlanmış	Hayvan modelinde splenik yırtıklar gibi bazı yaralar için farklı sonuçlar
<b>Kitosan örtüler</b>	HemCon	Kitinin deasetillenmiş formu, aynı mekanizma	İlk kullanıcıların görüşüne göre acil tıp kullanımı için planlanmış FDA ilaç araştırma protokolü altında Irak ve Afganistan ile birlikte Amerikan güçleriyle ön başarı Antimikrobiyal özelliğe sahip olma	Başarı oranı ilk kullanıcıların tecrübesine büyük oranda bağlıdır (bandajın başarısızlığı yapışarak altını kaldırmasıyla oluşan etkisizlik) Hayvan deneylerinde tutarsız sonuçlar Kabuklu deniz ürünlerinin kitosan içermesi, kabuklu deniz ürünlerine alerjisi olan hastalarda kullanılamaz.
<b>Mineral zeolit örtüler</b>	QuickClot	Pıhtılaşma faktörlerinin, plateletlerin, RBCs'lerin konsantrasyonunu arttırmak için yara bölgesindeki suyun moleküler elekle absorplanması	İlk kullanıcıların görüşüne göre acil tıp kullanımı için planlanmış Düşük basınçlı kanamalar için toz formu efektif Yüksek basınçlı kanamalar için mesh içerisine gömülmüş zeolit Ekzotermik yaralardan kaçınmak için yeni ürünlerde prehidrasyon	Yaranın dışına da tozların yayılmasından dolayı yüksek basınçlı kanamalarda dikkat edilmelidir. Vücut içi kullanım için genel olarak efektif, ancak yabancı cisim reaksiyonlarına, skar doku formasyonu ve bununla ilişkili komplikasyonlara katkıda bulunduğu rapor edilmektedir.

## **2.3.2. Absorblanabilir Ajanlar**

### **2.3.2.1. Jelatin Köpükler (Gelfilm ve Gelfoam)**

Jelatin köpüklerin Correll ve Wise tarafından hemostatik ajan olarak geliştirilmesi 1945'lere kadar dayanır. Jelatin köpük çırpılarak ve kabartılarak köpük formuna getirilerek hayvan deri jelatininden imal edilmiştir [37]. Pıhtılaşmayı başlatmak için fiziksel bir matriks görevi görür ve Pharmacia ve Upjohn şirketi tarafından (Pharmacia şirketi, Pfizer'in alt kuruluşu olarak) Gelfilm ve Gelfoam olarak temin edilebilir. Film, sponge ya da toz halde uygulanabilir. Toz form, steril tuz solüsyonu ile karıştırılır ve kanama bölgesine macun olarak uygulanır. Gelfoam macun, daha az enfeksiyona neden olur ve bone waksa kıyasla daha az kemik iyileşmesinin inhibisyonu söz konusudur. Bu yüzden sternomi insüzyonu gibi kemiksi yözeyden kanamanın durdurulmasında kullanım için iyi bir alternatiftir [38]. Gelfoam kollajen ve selüloz ürünlerinden daha çok şişer ve hacminin iki katına çıkar. Özellikle sinir yakınlarında ya da kuşatılmış bölgelerde kullanıldığında iyi bir mekaniksel hemostatik aktivite sağlarken, sıkıştırıcı komplikasyonlara neden olabilir. Cerrah etkili travma ile birlikte karakteristik avantajlar kazanır. Özellikle katı organ yaralanmalarında (hepatik barut yaraları) okside selülozla sıkıca paketlenmiş jelatin köpük içeren tübüler bir hemostatik tıkaç ile kullanılmalıdır. Bu çözünebilir suture ya da titanyum klips ile tıkaç sağlam tutulabilir. Bu tıkaç bir yol gösterici olarak bir suture halkası boyunca bir piston ya da pens yardımıyla kavite içerisine dijital olarak gömülebilir. Bazen eğer kavite yeterli büyüklükte ise bir tıkaçtan daha çoğuna ihtiyaç duyulur. Bu tıaçlara önceden operasyon odasında elle şekil verilebilir ve hatta travma merkezleri için önceden paketlenir. Aksi halde cerrah artan kanama sayısına ligasyon, ısı tedavisi ya da daha güçlü ya da pahalı topikal hemostatik ajanlar ile kontrol altına almak zorunda kalır.

Gelatin köpük 4-6 hafta arasında absorbe olur ve hayvan ürünü olmasına rağmen

nonantijeniktir. Okside selülozun aksine, jelatin köpüğün pH'ı nötraldır ve bu yüzden hemostatik aktiviteyi arttırmak için trombinle ya da diğer nötral pH biyolojikleri ile birlikte bağlayıcı olarak kullanılabilir.

### **2.3.2.2. Okside Selüloz (Surgicel Fibrillar ve Surgicel Nu-Knit)**

Okside selüloz 1942'de Frantz tarafından geliştirildikten sonra 1960'larda okside rejenere selüloz ortaya çıkmıştır [39]. En son olarak kağıt hamurunun parçalanması ile üretilmiştir ve sürekli selüloz fiberlerin imali ile selüloz rejenere edilmiştir. Rejenere selülozun gevşek örgü yapısından dolayı çevre dokuya rahatlıkla uyum sağlayacağı düşünülmektedir. Okside rejenere selüloz Surgicel Fibriller ve Ethicon, Johnson and Johnson tarafından Surgicel Nu-Knit olarak markalaşmıştır. Kuru uygulandığı zaman daha büyük bir hemostatik etki sergilediğinden kullanmadan önce nemlendirilmemelidir. Jelatin köpüklere kıyasla malzeme üstün kullanım özellikleri sunar ve örülmüş fabrikleri herhangi boyuta getirmek için işlenebilir. Ameliyat aletlerine yapışmaz ve hemostaz oluşana kadar kanama dokusuna karşı sımsıkı tutulabilir. Surgicel fibriller katılık bakımından kotona benzer ve bir yara içerisine serildiğinde yumuşaklığını sürdürür.

Okside selülozun her iki formu çevre dokuların pH'ını düşürür. Bu düşük pH, kanla etkileşim sonrası ajanın kahverengi renk almasını açıklayan kırmızı hücre lizisine neden olur. Salınan hemoglobin, asit hematin formunun asitleri ile reaksiyona girer. Bu düşük pH'ın teorikteki avantajlarından biri de farklı patojenik organizmalara karşı antimikrobiyal etkisidir. Ayrıca, düşük pH oluşan yapay pıhtı aracılığıyla hemostaza neden olan yakıcı bir ajan olarak görev yapar. Okside selüloz düşük pH gibi dezavantajları göz önüne alındığında diğer ajanlarla birlikte kullanıldığında aktivitesini yitiren trombin gibi diğer biyolojik topikal ajanları inaktive eder. Ayrıca Surgicel'in asidik doğası çevre dokuda inflamasyonu arttırabilir ve yara iyileşmesini geciktirebilir [40].



Kullanım süresine bağlı olarak okside selülozun bozunması 2-6 hafta arasında değişir [38]. Ayrıca kardiyak cerrahi sonrasında birkaç yıl okside selüloz fiberlerin varlığını tanımlayan raporlar bulunmaktadır [41-43]. Surgical intervertebral foramen boyunca yapılan toraktomi sırasında kanamayı durdurmak için kullanılır ve spinal kord baskılarına neden olur [44, 45]. Bu yüzden en küçük hacimlerde kullanılmalıdır ve hemostaz yaratılır yaratılmaz fazlası uzaklaştırılmalıdır.

### **2.3.2.3. Mikrofibriler Kollajen (Avitene, Avitene Flour, EndoAvitene, Avitene Ultrafoam, Avitene UltraWrap, Instat, Helitene ve Helistat)**

Mikrofibriler kollajen (MFC) Hait tarafından 1970'de geliştirilmiştir. Sığır alt derisinden kökenlenmektedir ve düzensiz yüzeylere iyi yerleşebilen beyaz, yumuşak görünen kuru toz halde bir malzemedir (C. r. Bard, Inc'e bağlı bir kuruluş olan Davol tarafından Avitene Flour olarak; Ethicon, Inc tarafından Instat olarak; Integra tarafından Helitene olarak). Toz formunun kompresyonu örülmemiş bir tabaka formunu resmeder (Avitene ve EndoAvitene Davol tarafından pazarlanmaktadır). Son olarak mikrofibriler kollajen sponge ve tampon formda bulunmaktadır (Daval tarafından Avitene Ultrafoam ve Aviten Ultrawrap, Integra tarafından Helistat ve Ethicon firması tarafından Instat). MFC geniş bir yüzey alanı sunar, kanla iletişimde olduğunda plateletlerin fibrillere yapışmasını ve salım reaksiyonu başlatır [46]. Bu platelet aktivasyonu, platelet agregasyonunu ve trombus formasyonunu takip eder [47]. Hemostaz genellikle 2-5 dk arası gerçekleşir. Çalışma mekanizması platelet aktivasyonuna bağlı olduğundan trombositopenialı hastalarda daha az efektiftir, şiddetli heparinizasyonda bile başarı ile hemostaz yaratılır [48]. Önemli bir şişme göstermez ve 8 haftadan daha az sürede absorbe edilir. MFC eldivenlere yapıştığından cerrahın ellerini kullanmasından ziyade kuru ameliyat malzemeleri ile kanama bölgesine uygulanmalıdır. Geniş yüzey alanlı parenkim sızıntılarını kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır. Laparoskopik prosedürlerde, Endo-Avitene

MFC'nin rulo hali, bir aplikatör yardımıyla standart laparoskopik troskarı boyunca yerleştirmeye uygundur [49]. Okside selülozda olduğu gibi, nöral yapılara bağlanabildiğinden ve acıya ve hissizliğe neden olabildiğinden hemostaz oluşturulduktan sonra cerrahi bölgeden MFC'nin uzaklaştırılması tavsiye edilir. MFC kan temizleme filtreleri boyunca geçebildiğinden, MFC'nin kullanıldığı operasyon bölgesinden kan tekrar hastaya geri döndürülmemelidir.

### **2.3.3. Biyolojik Ajanlar**

Biyolojik kökenli hemostatik malzemelerin kullanım sıklığı onların etkili mekanizmasına bağlanabilir. Doğal olarak oluşan protein ve polisakkaritler ki bunlar sıklıkla kullanılan koagülasyon faktörleri ya da diğer hemostatik materyaller gibi hemostazda direkt rol oynarlar. Albumin, kollajen, jelatin, polipeptit, keratin, kitosan gibi bileşenler efektif ve kolay düzenlenebilir hemostatik ajan olarak izole edilebilir ve düzenlenebilir. Koagülasyon proteinleri, sekonder hemostazda ve pıhtı formasyonunda direkt role sahip fibrinojen, fibrin ve trombin hemostatik kullanım için araştırılmaktadır.

#### **2.3.3.1. Topikal Trombin (Trombin-JMI, Recothrom, Evitrom)**

Trombin hücre sinyalinde, inflamasyon, hemostazdaki rolleriyle karakterize edilen doğal bir enzimdir. İntrinsik ve ekstrinsik koagülasyon yollarının aktivasyonun bir sonucu olarak protrombinden oluşur. Trombin fibrinojenin fibrine dönüşmesini teşvik eden bir fibrin pıhtısından oluşur. Trombin sayısız kaynaktan saflaştırılır ve 60 yıldan fazla klinik bir yardım olarak topikal hemostaz için kullanılmaktadır. Şimdiye kadar, sadece ticari olarak uygun bağımsız trombin, sığır plazma kökenlidir. Trombin kanamayı durdurmak için efektif olarak kullanılmasına rağmen, sığır kökenli trombinin insan uygulaması sonrası güçlü bir immun cevap yarattığı görülmüştür [49]. Sığır trombin uygulamasını takiben trombin, protrombin, faktör V ve kardiolipine karşı antibadi gelişimini içeren bir dizi klinik olaylar rapor edilmektedir [50, 51]. Topikal sığır trombinin aksine artmış antibadi dereceli hemodiyaliz hastalarında vasküler tromboza

ve sığır trombin uygulaması sonrası kanama ve koagülopatiyeye artan eğilim bulunmuştur [52, 53]. Faz 3'deki, cerrahi hemostazdaki sığır trombinin aksine topikal rekombinant insan trombininin karşılaştırmalı, randomize, çift körlü deneylerinde, rh trombinin kıyaslanabilir etkinlik, benzer güvenlik profili ve sığır trombinine kıyasla önemli derecede daha az immun cevaba sahip olduğu bulunmuştur [54]. Ayrıntılı araştırmalar, rekombinant insan trombininin gelecekte sığır trombin kullanımının yerini alabileceğini göstermektedir.

### **2.3.3.2. Fibrin Sealants (Tisseel, Crosseal, Evicel, Floseal)**

Avrupa'da fibrin tıkaçların çoğalmasını sağlayan Cohn damıtma 1960'larda konsantre fibrinojen üretimine izin veriyordu. Bu tıkaçlar hemostaz, deri greftleme, dural kapama ya da kemik onarımı için kullanılmıştır. Maalesef kullanımları 1970'de FDA tarafından Amerika'da viral geçiş riskinden dolayı yasaklanmıştır. 1989'lara kadar kullanılmamıştır, FDA Baxter firmasından ilk ticari fibrin tıkaç, Tisseel, onay vermiştir. Aynı yıl, kardiyak cerrahisi ve acil sternotomi reoperatif hastalarda geleneksel topikal hemostatik ajanlara kıyasla fibrin tıkaçın olası klinik denemeleri muhtemel azalan postoperatif kan kaybı ve kanamanın daha hızlı kontrolünü göstermiştir [55]. O zamandan beri, birkaç tane fibrin tıkaç onaylanmıştır ve kullanımdadır. Fibrin tıkaçlar trombini ve fibrinojeni (genellikle plazma kökenli) kombine eden iki bileşenli ürünlerdir. Bu tıkaçlardaki bileşen uygulama öncesi 2 bileşeni karıştırmak için çift şırıngalı salım sistemi ile ayrı bir vial içerisinde takviye şeklindedir. Bileşenler uygulama sırasında fibrin içeren stabil bir pıhtı formunda etkileşir. Fibrin tıkaçların mekanik gücü fibrinojenin konsantrasyonu ile tanımlanır. Gerçek trombin konsantrasyonu, pıhtı formasyonunun hızını ve final fibrin tıkaçın çekme gücünü tanımlar. Tisseel'de bileşen 67-106 mg/mL konsantrasyonunda insan kökenli fibrinojendir, diğer bileşen ise insan trombini (400-625 IU/mL) ve kalsiyum klorittir. Crosseal 2003'de Amerikan Red Cross. tarafından geliştirilmiştir. Crosseal Ethicon tarafından pazarlanmıştır, sadece insan ürünleri (insan fibrinojeni ve

transezaminik asit yanı sıra plazmaca fakir insan trombini) içerir. Diğer bir ajan, son zamanlarda marketlere "Evicel" adıyla girmiştir (Ethicon'dan temin edilebilir).

Evicel hiçbir fibrinolitik inhibitör içermez ve sadece uygulama öncesi minimum hazırlık süresine ihtiyaç duyar, bu onu daha kullanışlı hale getirir. Floseal Baxter'den temin edilebilen marketlerde şu anda var olan diğer bir tıkaçtır. Fibrin tıkaçtan farklılaşmıştır ve fibrinojen kaynağı olarak kana ihtiyaç duyar. Floseal mikrogranüller, glutaraldehid ile çapraz bağlanmış ve insan thrombin solüsyonu içeren sığır kollajeninden jelatin bazlı bir matriks kombinasyonudur [56, 57]. Kanla etkileşir etkileşmez jelatin partiküller şişer ve tamponlayıcı etki gösterir. Bu özellikler, diğer ajanlara kıyasla arteriyel kanamanın kontrolünde daha efektif olmasını sağlar. Floseal kardiyak cerrahide Gelfoam-trombine kıyasla daha üstündür ve açık ve laparoskopik nefrektomilerde kullanıldığında kanamayı başarıyla indirgediği gözlemlenmiştir [57, 58].

Ürolojide, bu materyallerin farklı prosedürlerde uygulamaları bulunmuştur. 1979'dan beri tıkaçlar açık kısmi nefrektomilerde kullanılmaktadır, fibrin glue hemostaz yaratmak için böbreklerin kesik yüzeylerine uygulanmaktadır. Minimum invaziv cerrahi tekniklerinin geliştirilmesi laparoskopik kısmi nefrektomi süresince bu bileşenlerin yaygın kullanımıyla sonuçlanmıştır [59]. Son yapılan bir araştırma, laparoskopik kısmi nefrektomi sırasında ürolojik cerrahların %70'inin rutin olarak fibrin tıkaçları kullandığını desteklemektedir [60].

### **2.3.3.3. Platelet Jel (Vitagel)**

Costasis (Orthovita, Malvern, PA) fibrinojen ve platelet içeren hastanın kendi plazması ile kombine edilmiş mikrofibriller kollajen ve trombin içermektedir. FDA tarafından 2000 yılında onaylanmıştır ve Vitagel olarak marketlerde yerini almıştır. Cerrahi prosedür sırasında 10 mL hastanın kendi kanı alınır, santrifüj edilir ve plazma bir şırınga içerisine toplanır. Bu plazma iki çemberli şırınga sistemine yerleştirilir,

uygulama sırasında hastanın kanı Vitagel'in içerisindeki trombin ve mikrofibriler kollajen ile kombine edilir. Plateletlerin varlığının (hastanın plazmasından) pıhtının gücünü artırdığına inanılmaktadır ve daha güçlü bir pıhtı için büyüme faktörü sunmaktadır. Platelet jeldeki proteinler doku rejenerasyonuna olanak sağlar [61]. Diğer kombinasyon ürünleri gibi bu üründe pahalıdır ve başarılı kullanımı operatör deneyimine bağlıdır. Santrifüje olan ihtiyaç ve proses ürünü daha az çekici kılar.

### **2.3.4. Sentetik Ajanlar**

#### **2.3.4.1. Siyanoakrilatlar (Dermabond)**

Siyanoakrilatlar sıvı monomerlerdir, suyun varlığında hızlıca polimer formuna gelir ve bu yüzden yapışkan komşu yüzeye hızlıca yapışır. Siyanoakrilatlar kimyacı Harry Coover tarafından 1942'de keşfedilmiştir ve Superglue ve Crazy glue olarak satışa sunulmuştur. Vietnam savaşı sırasında, yaralı askerler tıbbi merkezlere nakliye edilirken kanamayı yavaşlatmak için açık kanama yaraları spreyleneştir. Ayrıca, Superglue gibi etil siyanoakrilatlar degradasyon sırasında yara iyileşmesini geciktiren ve inflamasyon cevabına neden olan toksik yan ürünler (siyanoasetat ve formaldehid) oluşturur. Bu yüzden 1998'lere kadar kullanılmamıştır, Amerika'da yara iyileşmesi için FDA onayı olan daha yavaş degrade olan siyanoakrilat, oktil-2-siyanoakrilat geliştirilmiştir. Halbuki bütil-2-siyanoakrilat (Histoakril, Braun, Melsungen, Almanya) Asya, Avrupa ve Kanada'da da ulaşılabilir olmasına rağmen sadece oktil-2 siyanoakrilat Amerika'da elde edilebilir ve Ethicon tarafından Dermabond olarak satışa sunulmuştur.

Oktil-2-siyanoakrilat 2-5 dk uygulamayla maksimum bağlanma gücü göstermektedir ve bütil-2-siyanoakrilattan daha fleksibil olmasının yanı sıra daha güçlü form almaktadır [62]. Literatürden alınan sistematik raporlar standart süturlar, adhesiv stripler, zımbalar ile karşılaştırıldığında oktil-2-siyanoakrilatda derin yırtıklar onarılırken, kozmetik görünümde tatmin, enfeksiyon ya da açılma açısından bir farklılık görülmemiştir [63, 64]. İlk olarak Asya'da bütil-2-siyanoakrilat kanayan damar içerisine doku adhesivinin direkt enjeksiyonu ile kanayan gastrik varislerin embolizasyonu için bulunmuştur [65-68]. Halbuki kanayan gastrik varislerin içerisine

glue enjeksiyonu çoğu durumda çabuk hemostaz geliştirir gibi gözükrken mezentrik ven trombozu riskini barındırır [69].

Vaka raporları, anastomotik pösodoanevrizmalar ve portosistemik venöz şantların embolizasyonu için müdahalesel radyolojideki kullanımını tanımlamaktadır [70, 71]. Son zamanlarda, oktil-2-siyanoakrilat Almanya'da arterovenöz fistullarda ve vasküler rekonstrüksiyonda vasküler anastomik bölgelerde hemostaz yaratmak için başarıyla kullanılmıştır [72]. Benzer olarak, Dermabond, perianastomik bölgeden kanamayı durdurmak için kardiyak cerrahi altında 17 hastada kullanılmıştır [73].

Siyanoakrilatların doku onarımı için bir avantajı; daha hızlı uygulama, küçük yaralar ve kesiler için dikişleri almak için tekrar ziyarete gerek kalmaksızın standart süturlara kozmetik olarak eşdeğer onarım süresidir. Doku adhesivler su geçirmez bir bariyer görevi görmektedir. Ayrıca, glue antibiyotik merhemle ya da vazelin ile birlikte parçalanacaktır, bundan dolayı hastaların her yaraya uygulanamayacağını bilmesi gerekmektedir ve 7 gün boyunca bölgeyi temizlemekten kaçınması gerektiğini bilmelidir.

Doku adhesivler derin yaralanmalı dokularda, eklemleri kapsayan yaralanmalarda, el veya ayaklarda ya da yırtılmış mukozal yüzeylerin onarımı için kullanılamayabilir. Vasküler anastomozlar civarında kanamayı durdurmak için siyanoakrilatların kullanımını araştırma aşamasındadır.

#### **2.3.4.2. Polietilen Glikol Hidrojel (CoSeal)**

Coseal, (FDA tarafından 2001'de onaylanmıştır, Baxter Healthcare Corporation, Fremont, CA) sodyum fosfat tamponu içerisinde yüksek moleküler ağırlıklı polietilen glikolün 2 solüsyonunu içermektedir ve sentetik hidrojel matriks formunda dokuya spreylenebilmektedir. Ön şekillendirilmiş polimer matriksden ziyade, CoSeal içerisindeki polimerlerden biri diğerine ve kontakta olduğu dokuya in situ olarak çapraz bağlanır. Bu çapraz bağlanan ağ, yapışma ve hücrenin içeri doğru büyümesi yanı sıra doku sıvısına yapışır hale gelir. CoSeal ekzotermik değildir, inflamasyona neden olmaz ve bakteriyel enfeksiyon riski yoktur.

Bir hayvan çalışmasında, 12 köpeğin her iki iliak arterine PTFE interposition greft yerleştirilmiştir. Greftlerden bir tanesi Coseal ile etkileştirilirken diğerleri etkileştirilmeden yerleştirilmiştir. CoSeal ile etkileştirilen greften ortalama kan kaybı kontrol greften 15 kat daha az ve hemostaz etkileştirilmemiş greftte 15 dk iken etkileştirilmiş greft de 5 dakika da oluşmaktadır [74]. 48 hastayla yapılan randomize deneylerde, CoSeal ile etkileştirilmiş diyaliz şantlarının oluşturulması ya da infrainguinal revaskülarizasyon prosedürü için PTFE greftlere sahip 74 hasta, 74 hastada kontrol olarak gelfoam/trombin ile etkileştirilmiştir. Kontrol grubunun sadece % 20'sinde iken, CoSeal ile etkileştirilen hastaların % 47'sinde kapanma söz konusudur. Buna ek olarak CoSeal ile etkileştirilmiş olanlarda kanamayı durdurmak için 16.5 saniye gibi ortalama bir süre beklenmiştir, kontrole kıyasla 189.0 saniye daha azdır. Bu çalışma CoSeal'in anostomotik kapatma performansının gelfoam/trombin ikilisine eşdeğer olduğunu gösteriyor, ancak daha hızlı işlev görüyor. CoSeal hastalardaki perikardiyal adhezyonların yapışmasını önlemek için de kullanılabilir [75, 76].

CoSeal ile ilgili diğer bir konu, uygulamadan sonra ilk günlerde başlangıç hacminin 4 katına kadar şişebilmesidir ve bundan sonra da şişmeye devam etmesidir [77]. Bundan dolayı anatomik yapıların çevresi için kullanılamaz, bası halinde zarar görebilir. Buna ek olarak, vasküler cerrahi de olduğu gibi kısmi nefrektomilerde kullanılacağı zaman iyi iş görmez. Bir çalışmada çiftlik kobayları kısmi nefrektomi ameliyatı geçirirler ve hemostaz için CoSeal, fibrin glue ya da süturlama ile etkileştirilir. Operasyon sonrasında, 3 gün sonra ölen kobaylardan, CoSeal ile etkileştirilenlerden 3 tanesinin hepsi üriner kaçak göstermiştir. Bunun aksine, süturla etkileştirilenlerden 6 tanesinden 3 tanesi gösterirken fibrin glue ile etkileştirilenlerden hiçbiri üriner kaçak göstermemiştir. Fibrin glue ile kıyaslandığında CoSeal gevşekçe renal parenkimaya yapışır [78]. Kanlı ya da kansız insan ürin test tüpleri çalkalandığında ve inkübe edildiğinde, Coseal tüpün dibinde katı pıhtı formuna geçer ve 5 gün boyunca değişmez [79].

### 2.3.4.3. Glutaraldehid apraz Bağlı Albümin (Bioglue)

Bioglue (1999'da FDA tarafından onay almış, CryoLife Inc.) ikili kartuşlar halinde ayrı kompartımanlarda tutulan % 10 glutaraldehid solüsyonu ve % 45'lik sığır serum albümini içerir. Bu kartuş şırınga dağıtıcı içerisine yüklenir ve bileşenler uygulama sırasında karışır. Sığır serum albümini sığır spongiform ensefalopatisiz ülkelerden elde edilir ve çöktürme, kromatografi ve radyasyonla saflaştırılır [80]. Glutaraldehid albümin proteinindeki ve ekstrasellular matriks içerisindeki, yara bölgesinde hücre yüzeyindeki lizin artıklarını çapraz bağlar ve kuvvetli bir doku iskelesi formuna geçer. Buna ek olarak, Bioglue greft matriksin çatlaklarıyla mekaniksel olarak kenetlenme sayesinde sentetik greft materyaline yapışır. Adhesiv, 20 saniyede % 65 bağlanma gücüne sahiptir ve sıcaklığa, havada ya da suda olup olmadığına bakılmaksızın 2 dakikada kendi gücünü toparlayabilmektedir [81].

Bioglue hemostatik ajan olarak 79 kardiyak cerrahili hastada kullanılmıştır ve bu durumların 78'inde başarıyla hemostaz yaratılmıştır. Bioglue, laparoskopik nefrektomi sırasında kasıtsız dalak yırtıklarının yanı sıra [80] mitral kapak değişiminde atrioventriküler bozulmaların onarımı için PTFE patch ve sığır perikardiyumu ile birlikte başarıyla kullanılmıştır [82].

Yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda Bioglue kullanımından dolayı sorun rapor edilmemesine rağmen, Bioglue kullanan genç hastalarda uygulanan bölgede yapıların büyümesinin tehlikeye atılmak istenmemesinden dolayı kullanımından kaçınılır [80]. Bu sorun aorta-aortik anastomoz geçiren 4 haftalık domuz yavrularında, bunlardan 5 tanesi Bioglue ile anastomik takviye yapılmış hayvanlarda yürütölen çalışmada desteklenmiştir. 7 hafta büyüme sonrası Bioglue ile müdahale edilmiş domuz yavruları kontrole kıyasla 1.5 mm ortalama aortik dairede artış elde edilmiştir [83]. Özet olarak kardiyak cerrahide süturların mekaniksel olarak desteklenmesi için Bioglue efektif bir hemostatik ajandır.



## **2.4. Hemostatik Örtüler**

### **2.4.1. Kuru Fibrin Örtüler**

Önceden de bahsedildiği gibi, glue ve köpük formunda insan ve sığır fibrin tedavilerinin abdominal bölgede, kozmetikte ve kardiyovasküler cerrahide kullanışlı olduğu bulunmuştur [84, 85] Ayrıca, kısa raf ömrü ve kullanmadan önce karıştırmaya olan ihtiyaç ve uygulama için kuru, stabil bir ortama olan ihtiyacın vurgulanması fibrin kullanımını kısıtlamaktadır. 1999'da, Amerikan ordusu yara bölgesinde koagülasyon faktörlerinin konsantrasyonunu arttırmak için gazlı bezlere liyofilize haldeki fibrinojen ve trombin ekleyerek kuru fibrin örtü malzemeleri (DFSD) geliştirmiştir. DFSD hayvan çalışmalarında çok başarılı olmuştur. Gazlı bezlere liyofilize haldeki fibrinojen ve trombin eklenmesi domuz arteriyel kanamalarda azalan kan kaybını göstermektedir [86, 87].

Aortal, femoral transeksiyonun yanı sıra böbrek, karaciğer yaralanmaları ile birlikte normal ve koagülopatik domuzlarda, DFSD standard gazlı bez tedavisine kıyasla kan kaybını azaltmaktadır [88-96].

DFSD klinik uygulama için FDA onayı almamıştır, ancak FDA kontrolü altında Irak ve Afganistan'da Amerikan güçleri tarafından araştırma aşamasındaki ilaç protokolü olarak kullanılmaktadır. Stabil olması, kullanım kolaylığı ve biyoabsorbabil bir ajan olmasından dolayı muharebe alanlarında ön bir başarı göstermiştir.

### **2.4.2. Kitin, Kitosan (RDH, HemCon)**

Kitin (poly-N-asetil glikozamin) artropodların iskeletlerinde bulunan bir polimerdir ve fermentasyon sırasında algler tarafından üretilen bir polisakkarittir. Kitin ve onun deasetile formu kitosan hemostatik özelliklere sahiptir [97]. Kitin örtülerin yaralanma bölgesine plateletlerin, pıhtılaşma faktörlerinin ve eritrositlerin hareketini ve

vazokonstruksiyonu sağladığına inanılmaktadır [98]. En önemli kitin örtülerinden bir tanesi rapid deployment hemostat (RDH) "Marine Polymer Technologies" tarafından imal edilmiş ve örtü başına 300 dolar maliyeti vardır. Hayvan çalışmasında, kitin minor yaralarının tedavisinde efektiftir, ancak birçok yara tipinde farklı sonuçlar göstermektedir [97]. Bir çalışmada, domuzlarda dalak yırtıklarına uygulanan RDH 23 saniyede koagülasyon sağlarken 173 saniyelik fibrin glue'dan daha hızlıdır [99]. Bunun aksine, domuzlarda yapılan diğer çalışmalar RDH'in standard gazlı beze üstün gelecek istatistiksel bir iyileşme sağlamadığını göstermiştir [100].

Hemcon gibi kitosan örtüler mekaniksel olarak yarayı tıkama ve çevre dokuya yapışma sayesinde işlevini yerine getirmektedir. Hemcon Amerikan güçleri tarafından Irak ve Afganistan'da kullanılmaktadır. Sivil hayatta Hemcon ile yapılan bir çalışma 34 vakadan 27'sinde kanamanın kontrol altına alındığını göstermektedir [101]. Kitosanın diğer bir avantajı asidik pH'larda polikationik doğasından dolayı gram negatif bakterilerin hücre membranını parçalamasıdır ve doğal bir antimikrobiyal özellik kazanmasıdır [102, 103]. Hemcon bandajdan küçük bir parça, bakteriyle kontamine fare yarasına uygulandığı zaman yüksek mikrobiyal etki gösterir ve dolaşıma bakterilerin ulaşımını ve sepsisten ölümü engeller [104, 105]. Sınırlı insan kullanımlarında Hemcon'un başarılı olmasına rağmen, hayvan denemeleri tutarsız sonuçlar vermektedir. Domuzdaki birkaç hepatik yaralanmaya uygulandığı zaman, standart gazlı bez basısı ile karşılaştırıldığında, Hemcon kan kaybını 10 kat daha da azaltıyor ve sağ kalma oranını % 28.6'dan % 87.5'lara çıkarıyor [106]. Ayrıca, domuzda kompleks kasık yaralanması kullanılarak yapılan bir çalışmada standart gazlı bez ile kıyaslandığında Hemcon uygulanmış domuzlar tekrar kanama ve ölüm oranı bakımından istatistiksel olarak bir fark göstermiyor. Hemcon'un hayvan çalışmalarındaki başarısızlığı uygulandığı zaman bandajın dokuya yapışmamasıdır [107].

Dikdörtgen Hemcon bandaj 2 tarafa sahiptir; yaraya yapışan aktif tarafı içeren kitosan

ve basınç yapılan yapışmaz taraf. Hemcon'un etkinliği iyi yapışıp yapışmamasına bağlıdır, yaralar düz olmadığından bandaj kesilerek yaraya uygun hale getirilir. Yaraya uygun olarak bandajın kesilmesi travma durumunda zordur ve deneyim ve tecrübe gerektirir.

Özet olarak Hemcon gibi kitosan örtüler RDH gibi kitin örtü malzemelerinden daha etkilidir. Yaraya uygulandığı zaman Hemcon kan kaybını efektif olarak azaltır ve antibakteriyel özellik kazandırır.

### **2.4.3. Mineral Zeolit (QuickClot)**

QuickClot gibi mineral zeolit hemostatik ajanlar silikon, magnezyum, alüminyum, sodyum oksit gibi inört materyallerden yapılmış moleküler elekler içeren granüler tozlardır. QuickClot yara bölgesinde sıvıyı absorblar ve bu yüzden hemostazisi stimüle etmek için eritrositleri, plateletleri, pıhtılaşma faktörlerinin lokal konsantrasyonunu artırır [99]. Stabil, kullanımı kolay ve paket başına 10 dolardır. Irak ve Afganistan'da Amerikan güçleri için hemostatik ajan olarak piyasaya sürülmüştür.

QuickClot düşük basınçlı kanamalar için çok etkindir ancak yüksek basınçlı kanamalar için daha az etki gösterir. Askeri ve gündelik yaşamda rapor edilen 103 çalışma da, vaka bölgesinde ilk uygulama olarak uygulandığında % 100 etkinlik gösterdiği görülmüştür ve koagülapatik ölümcül hastalarda son bir çare olarak hekimler tarafından kullanıldığında sadece başarısızlık oluşmuştur [108]. Ayrıca Irak'tan verilen diğer anektotlar yüksek basınçlı kanamaların QuickClot'u yara dışına ittiğini tanımlamaktadır. QuickClot eksternal kanamanın kontrol edilmesi için sadece onay almasına rağmen, yukarıdaki vakaların 20'sinde travma cerrahları tarafından intrakorporeal kullanımın örnekleridir.

Domuzdaki kompleks kasık yaralanmalarında ve gecikmiş hipotensif canlandırmalarda, QuickClot ile muamele edilmiş bütün bireyler hayatta kalmıştır,

standart gazlı bez ile muamele edilmişlerin sadece yarısı yaşamına devam edebilmiştir [100]. Bütün deneylerdeki QuickClot'un başarısı domuzun inguinal kavitedeki kan havuzundan kaynaklanmaktadır. Bunun aksine, insan arter transeksiyonları daha hızlı bir akıştadır ve havuz yoktur, bu da pıhtılaşmayı zorlaştırır, bu açıklama Irak'taki yüksek basınçlı kanamalarda QuickClot başarısızlığı ile uyumludur. Kompleks kasık yaralanması olan domuzlarda yapılan bir çalışmada, 12 domuzdan 11'i hayatta kalmıştır, insiz edilmiş damarları tamamen kaplamadığından komşu yumuşak dokulara göçünü engellediğinden ayak ölümü gerçekleşmiştir.

Yüksek basınçlı kanamalarda QuickClot'un etkinliğinin azalmasında üreticiler son jenerasyon ürünlere dikkati çekmektedir. Mineral zeolit gazlı bir mesh kese ile kuşatılmıştır. Zeolit olmaksızın kan akışıyla yıkanarak yara bölgesine basınç altında uygulanabilir. Yorkshire domuzlarında yayınlanmamış çalışmalarda Duke Üniversitesi Medikal Merkezi'nde zeolitin kuşatılması zordur ancak üstesinden gelinmiştir. Mineral zeolit tarafından sıvının absorpsiyonu ekzotermik bir prosestir, QuickClot'un başlangıç formülasyonunda, salınan sıcaklık dokularda hasara neden olabilir. Hayvan çalışmalarında ölçülen yara sıcaklığı kan akışına ve eklenen QuickClot miktarına bağlı olarak 42-70.8 °C aralığında değişmektedir. Rapor edilen 103 QuickClot kullanımından, hastaların % 25'i 3 yara vakası ile birlikte hafiften ağır ağrıların eşlik ettiği rapor edilmiştir. Üreticiler zeolitin ön hidratasyon ile daha az ekzotermik şekilde suyu absorblayacağına işaret etmektedirler.

Son jenerasyon ürünler QuickClot başlangıç formülasyonu tarafından konumlanmıştır ve bu problemlere işaret etmektedir. Zeolit cerrahi meşler içerisine gömülerek kompres olarak kullanılabilir ve zeolitin prehidratasyonu ile daha az ekzotermik reaksiyonla suyu absorblarlayabilir.

**Çizelge 2.3.** Topikal hemostatik ajanların fiyat ve boyut tanımlamaları [36].

<b>Topikal Hemostatik Ajanların Fiyat ve Boyut Tanımlamaları</b>			
<b>Ürün</b>	<b>Şirket</b>	<b>Fiyat (USD)</b>	<b>Tanım</b>
<u>Fiziksel ajanlar</u>			
Bone wax	Ethicon (Johnson and Johnson)	120	2.5 g
Ostene	Ceremed	75	2.5 g
<u>Absorblanabilir ajanlar</u>			
Gelatin köpük			
Gelfoam	Pharmacia and Upjohn (Pfizer)	85	1 sponge(8x12.5 cm)
Gelfilm	Pharmacia and Upjohn (Pfizer)	88	1 sponge(10x12.5 cm)
Oxide seluloz			
Surgifoam	Ethicon	22	1 sponge(12.5x8 cm)
Surgicel	Ethicon	33	1 pad (2x14 in)
Mikrofibriler Kollajen			
Avitene Flour	Davol	215	0.5 g
Avitene ultrafoam	Davol	120	1 sponge (2x6.25 cm)
Avitene ultrawrap	Davol	N/A	Artık üretilmiyor
Helistat	Integra	125	1 sponge (2.5 cmx5 cmx5mm)
Helitene	Integra	144	0.5 g
Instat	Ethicon	105	1 g
EndoAvitene	Davol	83	1 sponge (5cmx5mmx1mm preloaded)
<u>Biyolojik Ajanlar</u>			
Topikal trombin	Monarch	85	5000 IU her biri
Trombin JMI	Ethicon	115	5000 IU her biri
Evithrom	ZymoGenetics	100	5000 IU her biri
rhTrombin (recothrom)			
Fibrin sealants			
Tisseel	Baxter	160	2 ml
Evicel	Ethicon	208	2 ml
Crosseal	Ethicon	N/A	Artık üretilmiyor
Floseal	Baxter	250	5 ml
Platelet sealants			
Vitagel (formerly Costasis)	Orthovita	280	2 ml
<u>Sentetik ajanlar</u>			
Polyetilenglikol hidrojeller			
Coseal	Baxter	400	2 ml

Siyanoakrilatlar			
Dermabond	Ethicon	38	0.5 ml
Glutaraldehid çapraz bağlı albümin			
Bioglue	Cryolife	400	2 ml
Hemostatik örtüler			
Fibrin örtüler			
Kuru fibrin örtüler (DFSD)	American Red Cross	500-1000	1 bandaj (4x4 in)
Kitin/kitosan örtüler			
Hemcon	Hemcon Medical Technologies	120	1 bandaj (4x4 in)
Rapid deployment hemostat (RDH)	Marine Polymer Technologies	300	1bandaj
Mineral zeolit örtüler			
Quickclot	Z-medica	20	1 bandaj (4x4 in)

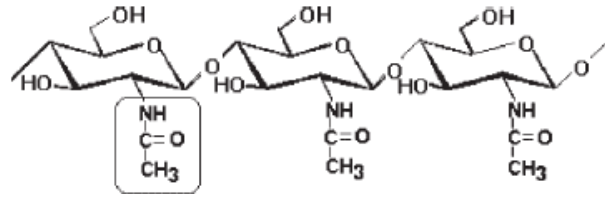
**Çizelge 2.4.** Şu an USA’de ticari olarak satılan hemostatik ürünler.

([https://biotextiles2013.wordpress.com/hemostatic\\_wound\\_dressings/](https://biotextiles2013.wordpress.com/hemostatic_wound_dressings/))

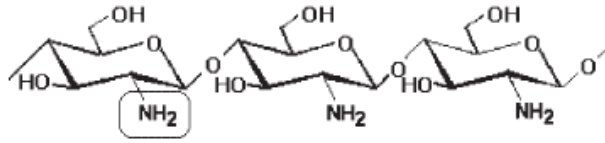
Örtü Malzemesi	Prokoagülant	Satıcısı
ChitoSeal™	Kitosan	Abbott Vascular
V+ Pad™	d-Glukozamin	Angiotech
HemCon Bandaj	Kitosan	Cardinal Health
Syvek™	Poly-n-asetil-glukozamin	Marine Polymer Technologies
Clo-Sur P.A.D.™	Kitosan	Medtronic
SafeSeal™	Polisakkarit (MPH)	Possis Medical
FemoStop HD™	Selüloz	Radi Medical Sytems
Stasys™	Polisakkarit (MPH)	St. Jude Medical
Neptune Pad™	Kalsiyum Aljinat	TZ Medical
D-Stat Dry™	Trombin, Sodyum karboksimetilselüloz, CaCl	Vascular Solutions

## 2.5. Kitosan ve Hemostazda Kullanımı

Kitosan rastgele dağılmış beta (1,4) bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminden oluşur. Kitosanın büyük bileşeni yengeç, karides istakoz ve böcek gibi kabukluların dış iskeletinden kökenlenir ve mantarların ve kahverengi alglerin hücre duvarları tarafından ekstraselular olarak üretilir. Kitosan nadiren doğada bulunur. *Mucor rouxii* gibi dimorfik funguslarda kitin üzerindeki deasetilaz enziminin faaliyetiyle oluşur [109].



**Kitin**



**Kitosan**

**Şekil 2.6.** Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.

Kitosan üzerindeki aminler asidik pH'da protonlanır ve kitosan zincirleri için pozitif yük taşır. Kitosan katyonik yapısından dolayı hemostatik ajan olarak seçilir. Çoğunlukla hücre yüzeyleri anyoniktir ve kitosanın elektrostatik etkileşimlerle yara bölgesindeki dokuya güçlüce yapışacağı düşünülmektedir.

Son yıllarda keşfedilen kitosan bazlı hemostatik ajanlar normal pıhtılaşma mekanizmasından ziyade plateletlerden bağımsız olarak fonksiyon görür. Kitosan güçlü bir pozitif elektriksel yüke sahip, negatif yüklü moleküllere güçlü şekilde bağlanabilen bir aminopolisakkarittir. Hızla gelişen dünyada, fonksiyonel, nontoksik, biyoyouyumlu, biyoabsorblanabilir ve biyobozunur biyopolimer ajan olarak dikkate değer

bir önem arz etmektedir. Potansiyel farmotik ve medikal uygulamalar için kullanımının kimyasal yapısına, moleküler boyutuna ve enzimatik hidrolizisine bağlı olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca kitosanın farklı biyolojik aktivitelerle farklı yapılara sahip olduğu kayda değer bir bilgidir.

Yeni hemostatik ajanlara benzemesinin yanı sıra, yara bölgesinde enfeksiyonu engelleyecek antimikrobiyal özellik gösterir. Genel olarak kitosan 3 reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. Amino grupları C(2), C(3)ve C(6) pozisyonlarında primer ve sekonder hidroksil grupları içerir. Bu gruplar spesifik uygulamalar için doku mühendisliğinde kullanışlı kitosan benzeri greft kopolimerizasyonu modifikasyonuna izin verir. Kitosanın kimyasal doğası mekanik ve biyolojik özelliklerini düzenleyecek kovalent ve iyonik modifikasyonlar için pek çok imkan sunar. Biyoaktif kitosanın her bir özel tipi enzimatik hidrolizis ve kimyasal bileşiminin değişmesiyle zaman içinde gelişir [110].

### **2.5.1. Kitosanın Hemostatik Ajan Olarak Medikal Alanda Kullanımı**

Kitosan kanayan yüzeye toz, solüsyon, kaplama, film, hidrojel, ve filament kompozit gibi farklı fiziksel formlarda direkt olarak uygulanmak için kullanılabilir. Son zamanlarda, kan kaybını durduran hemostatik ajan olarak işlev görecekt çok farklı ürünler dizayn edilmektedir [111-113] Bundan önce, Malette ve arkadaşları kitosanın hemostatik aktivitesini rapor etmiştir. Genel olarak kitosanın hemostatik aktivitesi normal bir hemostaz kaskadına bağlı değildir. Aksine, molekül ağırlığına, deasetilasyon derecesine ve kitosanın özelliklerine, hücre yüzeyindeki negatif yüklü moleküllere saldırmasını sağlayan polikatyonik özelliklerine bağlıdır [114]. Lee ve arkadaşları düşük molekül ağırlıklı kitosanın efektif koagülasyonu destekleyecek yetenekte olmadığını rapor etmiştir [115].

Olsen ve arkadaşları kitosan tuzunun farklı fiziksel formları ile kan koagülasyonunun olası mekanizmalarını açıklamışlardır. Hayvanlar üzerindeki farklı kitosan kompozitlerinin verimliliğini ayrıntılı tanımlayan deney sonuçlarını özetlemişlerdir [116]. Kitosan glutamat liyofilize film, kitosan glutamat ya da kollajen liyofilize pedler ve kitosan glutamate sulu solüsyon formları bulunmaktadır. Hoekstra ve arkadaşları arteriyel kanama bölgesi için tıkaç olarak mikrokristalin kitosan kullanmıştır ve



biyoyumlu bir polimer olarak karakterinden dolayı güvenli olduğu bulunmuştur. Modifiye kitosan örtüler kanama sonrası müdahale de önemli bir iyileşme göstermiştir ve ortalama arteriyel basınç aralıksız alınmıştır [117].

Başka bir çalışmada, kitosan ve suda çözünebilir kitin solüsyonu suda çözünür kitinin hidrofilik doğasından dolayı ve biyobozunur özelliğinden dolayı diğer bileşenlere kıyasla öne çıkan bir çekme direnci ve iyileştirilmiş bir yara iyileşmesi göstermiştir [118].

### **2.5.2. Kitosan ve Eritrositler**

Kitosan aktivitesinin spesifik mekanizması çok fazla araştırılmamıştır ancak araştırmacılar kitosan varlığında eritrositlerin koagülasyonunu göstermektedir [119-122]. Eritrositlerin yapışması, eritrositlerin çapraz bağlanması ile kitosan varlığında artmıştır. Kitosan polimer zinciri tarafından birbirine bağlanır ve yapay pıhtı üreten yakalanan hücreler latis formunda tekrar polimerize olur [123].

Eritrosit morfolojisindeki değişiklikler, kitosanın yapışmasına bağlı olarak in vivo çalışmada açıklanmıştır. Hücreler kan kaybını engellemek agregat oluşturmak için bağlanırlar. Klokkeve ve arkadaşları anestezi altındaki sıçanların eritrositlerinin tipik bikonkav morfolojisini kaybettiklerini ve birinin diğerine olağan olmayan bir ilgi gösterdiğini görmüştür. Ek olarak kitosan uygulanmış yaralar eritrosit pıhtısı ya da tıkaç formu alır. Bu pıhtıların morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş, sonuçtaki kan pıhtısı biri diğeriyile aynı ilgiyi göstermemiştir [124].

Kind ve arkadaşları derin bir karaciğer yaralanması kullanarak kitosanın heparinize ve kontrol sıçanlarında kan koagülasyonunda başarısız olduğunu göstermiştir. Bu olumsuz sonuç kullanılan metoda bağlanmıştır. Kullanılan pamuk aplikatörü pıhtı formasyonu boyunca derin yırtıktan uzağa çekilmiştir. Kitosanın azalan bu etkisi ve kanamaya eğimlilik korunmuştur. Kanla iletişimine bağlı olarak, kitosan suyu absorblaması ve temel hasarlı dokuya yapışan adhesiv malzeme içerisinde değiştirilmesiyle kanamayı durdurmuştur [125].

Fukasawa ve arkadaşları peritoneal abrazyonlar üzerine kitosanın yapışmasından dolayı sıçanların fibrinolitik aktivitesinin sınırlandırıldığını açıklamışlardır [126]. Kitosanın eritrositler üzerine etkisi pıhtı formasyonun kaybolması olarak göze çarpar [127].

### **2.5.3. Kitosanın Platelet Adhezyonu, Agregasyonu ve Aktivasyonu Üzerine Etkisi**

T.C. Chou ve arkadaşları konsantrasyona bağlı olarak kitosanın 5. ve 30. dakikada platelet adhezyonunu ve agregasyonunu indükleyecek yetenekte olduğunu rapor etmişlerdir. Bir tavşan modelinde, kitosan zamana bağlı olarak platelet yapışmasını ve doza bağlı olarak platelet çökmesini iyileştirmiştir. Bu araştırmacılar tavşan plateletlerini yıkamış ve 37 °C'de 3 dk ön ısıtmaya tabi tutmuşlardır. Kitosanın farklı konsantrasyonları, platelet çökmesini uyarmak için eklenmiştir. Sonuçlar hasarlı dokuda kitosanın etkileşimi olarak açıklanmıştır [128].

Kitosan filmin, platelet yapışmasını, agregasyonunu ve intrinsik kan koagülasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Shen ve arkadaşları kitosanın platelet agregasyonunu ve adhezyonunu plazma içerisindeki platelet konsantrasyonuna bağlı olarak agregasyon derecesini de not düşürerek uyardığını keşfetmişlerdir [129].

Okamoto ve arkadaşları kitinin kan pıhtısında kitosandan daha çok platelet agrege etmesine rağmen kitosanın kitinden daha efektif olarak işlev gördüğünü belirtmişlerdir [130].

Platelet agregasyonu direkt olarak kan koagülasyonunu belirtmez. Kitin ve kitosanın koagülasyon profili üzerindeki etkisi fiziksel özellikleri ile açıklanmıştır ve kimyasal yapıları ile özellikle aminoasit artıkları ile bağdaştırılmıştır. Elektron mikroskobu değerlendirmeleri baz alındığında uzayan süreçle birlikte plateletler kitin ve kitosanın yüzeyine daha güçlü bağlanır. Plateletler yapışır ve düzensiz biçimler halinde agrege olmuş kütleler halinde biri diğerine bağlanır. Kitosan platelet adhezyonunu destekleyecek ve Glikoprotein IIb/IIIa aktive etmek ve tromboksan A<sub>2</sub>/ADP salın intraselular sinyal reaksiyonlarını oluşturacak yetenektedir. Bu sinyaller platelet yayılımını ve adhezyon stabilitesinin gücünü artırır [131].

Qing He ve arkadaşları kitosan ve kitosan-heparin kompozit film kullanarak platelet adhezyonu ve aktivasyonunu ölçmüştür. Plateletçe zengin plazma ile muamele edilmiş bu filmin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri pösdopod formunda birçok platelet göstermiştir. Kito-hep kompozit film platelet yapışmasını inhibe etmiştir. Platelet aktivasyon testi için, kito-hep kompozit doku iskelesi tarafından indüklenen pozitif p-selektinlerin yüzdesi kitosana uyarılanlara kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Bu kompozit matriksteki artan platelet uyumluluğunu göstermektedir [132].

M. S. Lord ve arkadaşları kitosan varlığında yapışan plateletlerin aktin sitoskeletonini araştırmışlardır. % 0.01-1 (w/v) konsantrasyon aralığında kitosana yapışan plateletler ve yıldız şeklinde aktince zengin psödopod gelişimi gözlemlenmeksizin yuvarlak bir morfoloji göstermişlerdir. Plazmayla kaplanmış kitosana platelet yapışması radyal aktince zengin çıkıntılarla birlikte daha çok yayılan bir morfoloji göstermektedirler. Kitosana kaplı olan % 0.1 plazma ya da % 10 plazma içerisinde her birinde plateletlerin morfolojisinde farklılık yoktur. Platelet aktivasyon testi için, sağlıklı kandan izole edilen plateletlere kıyasla kitosana maruz kalan plateletler üzerinde artan p-selektin derecesi tespit edilmiştir. % 0.001-1 aralığındaki kitosana konsantrasyonunda kitosana yapışan plateletler tarafından artan derecede Integrin  $\alpha 2\beta 3$ 'ün ekspresyonu edildiği bulunmuştur.

Plateletlerin kitosana tarafından tek başına aktive edildiği bulunmuştur ve aktivasyonun kitosana tarafından adsorbe edilen proteinlerin varlığı tarafından düzenlendiği bulunmuştur [133].

**Çizelge 2.5.** Kitin ve kitosan içeren ticari ürünler [134].

Ürünler	Etki mekanizması
HemCon®	Dondurup kurutulmuş kitosan asetat tuzu, kan kaybını durdurmak, plateletleri iyileştirmek için acil durumlarda ana kullanım
Chitoflex®	Doku yüzeyine kuvvetlice yapışması ile birkaç kanamayı yumuşatıcı olarak dizayn edilmiş antibakteriyel ve biyouyumlu yara örtüsü, yara bölgesini stabilize eden ve tıkayan esnek bir bariyer formunda
Chitoseal®	Hemorajik yaralar için selüloz bir örtü ile destek, baskı süresini azaltma
Clo-Sur®	Vasküler yaralanma bölgesinde yara iyileşmesini uyarmak için topikal olarak uygulanır
TraumaStat®	Yüksek derecede poröz silica içeren dondurup kurutulmuş kitosan, birkaç kanamayı kontrol altına almak için eksternal geçici kullanım için önerilmektedir
Syvek-Patch®	Kırmızı kan hücrelerinin yapışması, plateletlerin aktivasyonu ile daha hızlı hemostazis yaratmak, diyagnostik operasyonlarda kateter değişimini takiben kanamayı kontrol altına almak
BST-CarGel®	Kitosan-gliserofosfat hidrojel, kırık hasarını onarmak için kullanılan biyobozunur jel
BST-CarGel®	Çok efektif manada dokuya yapışma, sızıntıyı ve mikrobiyal ihlalleri engelleyecek, normalden yaşamı tehdit eden arteriyel delikleri içeren yaralanmaların tedavisinde uygun
Celox	Ölümcül kanamalarda kullanılan, sadece 30 saniyede çok efektif, ısı oluşturmaz, ajan kırmızı kan hücreleri ile reaksiyona girdiğinde sağlam bir tıkaç oluşturma
Celox-A	Aplikatör ve piston salım sistemi, küçük penetre yaraların derinliklerinde reaksiyona girebilme yeteneğinde
Celox Trauma Gauze	Travmatik kanamaları kontrol altına alma ve serinlemeye yardımcı, birincil ve ikincil derece yanıklarda koruma
Chitipack S	Genellikle travmatik yaralar için ve cerrahi doku defektleri kullanım, kullanıma bağlı olarak caydırıcı bir skar oluşumu rapor edilmemiş, polietilentereftalat üzerinde desteklenme, büyük deri hasarlarının tedavisi için, sütür atmaya uygun olmayan hasarlar için uygun.
Chitipack P&C	Koton benzeri kitosan asetat tuzlarının etilen glikol, buz ve sodium hidroksit koagülasyon banyosunun içine spinlenmesi ile elde edilir, normal subkutan dokunun tekrar yapılanması ile vücut dokularının tekrar yapılanması ve derinin rejenerasyonu için kullanılabilir
Tegasorb	Kitosan partikülleri içeren bu örtü eksudayı absorplarken şişer, yumuşak bir jel üretir
Tegaderm film dressing	Su geçirmez örtünün bir tabakası hidrokolloidle örtülmüştür, kronik yaralarda, sakral yaralarda ve ayak ülserleri için kullanılır
Chitodine	Elemental halde iyodin adsorbe edilmiş kitosan toz, cerrahi örtülerin ve yaralanmış dokuların temizlenmesi ve dezenfeksiyonunda
QuikClot®	Büyük yaralar için uygun, kan kaybını durdurma, koagülasyon profilini hızlandırıcı adsorbent hemostatik ajan

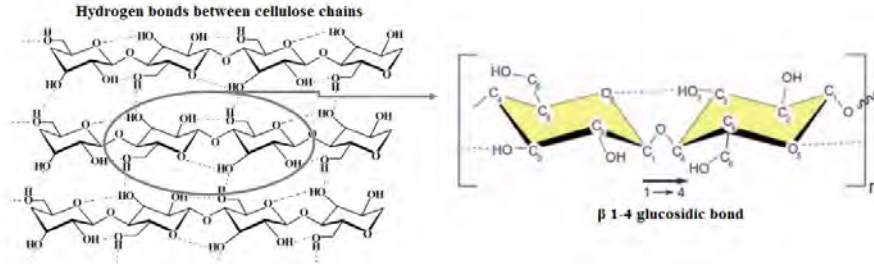
## 2.6. Selüloz ve Hemostazda Kullanımı

Selüloz, en bol bulunan biyobozunur materyallerden biri olarak ekonomik bir öneme sahiptir. Pamuğun (% 94 üzerinde) ve ağacın (% 50 üzerinde) ana bileşenidir. 30 yıldan daha fazla süredir, moleküler biyolojideki kaydedilen gelişmeler ve in vitro hücre sistemlerinin uygulanması doğada selülozun biyosentez mekanizmasının geniş çaplı araştırılmasıyla sonuçlanmıştır.

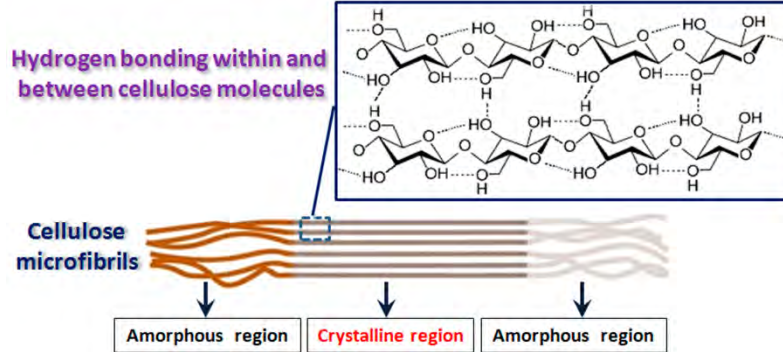
Bakteriyel selüloz bitki biyokütlesinin ana bileşenidir ve mikrobiyal ekstraselular polimerin temsilcisidir. Bakteriyel selüloz primer metabolizmanın spesifik ürünleridir ve esasen yapısal bir role sahip olduğundan koruyucu bir kılıftır. Bakteriyel selüloz *Asetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* ve *Sarcina* bakterileri tarafından sentezlenir [135]. Selüloz üzerindeki basit ve uygulamalı çalışmalar için model organizma olarak kullanılan gram negatif asetik asit bakterisi *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus* olarak tekrar klasifiye edilen) en etkili üreticidir [136, 137] Bu fotosentetik organizma glikoz, şeker, gliserol ya da diğer organik substratları kullanabilir ve bunları saf selüloza dönüştürebilir. Ağaç hamurundan elde edilen selülozun aksine, *Acetobacter* tarafından üretilen selüloz diğer kontamine edici polisakaritleri kullanmaz, izolasyon ve pürifikasyonu oldukça basittir, yoğun enerji ya da kimyasal proseslere ihtiyaç duymaz [138]. Araştırmalar selüloz yapısı ve özelliklerinin yanı sıra biyopolimer sentezinin mekanizması üzerine odaklanmıştır. Bakteriyel selülozun en önemli özelliklerinden biri onun kimyasal saflığıdır. Bitkisel selüloz genellikle hemiselüloz ve lignin ile bağlantılı olduğundan doğal olarak uzaklaştırması zordur. Bitki selülozuna kıyasla BS deri doku materyali olarak avantajlar sağlayacak yüksek kristalinite, çekme dayanımı, su absorpsiyon kapasitesi, iyi geçirgenlik, biyokompatibilite, degradasyona dirençlilik ve düşük çözünürlük gibi özelliklere sahiptir. BS pelikülleri kollajen yapısına benzer olarak ince nanofibriler bir yapı içeren asimetrik yapıya sahiptir. BS'un gerilim-gerinim cevap eğrisinin biçimi her iki nanofibriler yapının benzer yapısından dolayı karotid arterinkini andırmaktadır. Mannitol, gliserol gibi kültür ortamına farklı bileşenler eklenerek BS film üretilebilir. İki BS film kristalin özellikler bakımından çok zayıf bir farklılık gösterir. Mannitollü besiyerindeki BS selüloz fibrilleri daha incedir ve gliserollü ortama kıyasla daha küçük

poroziteye sahip ağısı formdadır.

Selüloz, beta-1,4 bağları ile bağlanmış dallanmamış glukopiranoz parçalarından oluşmaktadır. Bakteriyel selülozun başlangıç zinciri ortalama genişliği 1.5 nm olan doğal olarak oluşan en ince fibril olan subfibril şeklinde agregat olur. BS subfibrilleri mikrofibrillere [135], demetlere ve en sonunda şeritlere kristalize olur [137].



**Şekil 2.7.** Selüloz biriminin moleküler yapısı, beta 1-4 glukosidik bağlar ve zincirler arası hidrojen bağları gösterir.

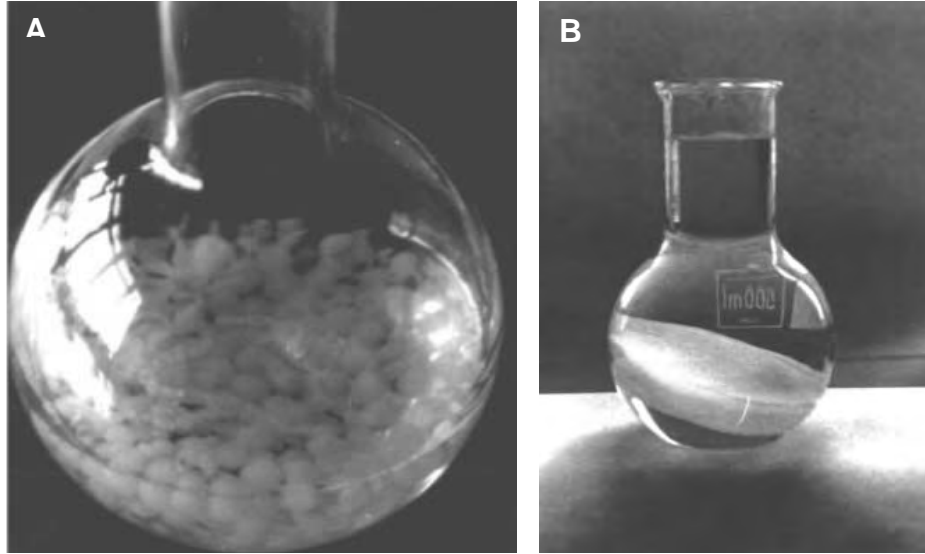


**Şekil 2.8.** Selüloz mikrofibrillerinin kristalin bölgeleri ile birlikte selüloz moleküler zincirleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.

Mikrobiyal selülozun uzunluğu 1-9 µm arasında değişen ince şeritler halinde ağısı yoğun bir yapıya sahiptir, hidrojen bağları tarafından stabilize edilir.

Makroskobik morfoloji kültür şartlarına bağlıdır [139, 140]. Statik şartlarda bakteri

oksijence zengin sıvı-hava ara yüzeyinde besiyerinin yüzeyinde selüloz örtü biriktirir. Selülozun subfibrileri mikrofibrillere kristalize olan ve besiyerinin içerisine doğru genişleyen bakteri hücresinin yüzeyinde linear olarak dizilmiş porlardan aralıksız çekilir. Bu yüzden deri benzeri peliküller *A. xylinum* hücreleri tarafından desteklenen, birbiri üzerine binmiş ve bükülmüş selüloz şeritleri paralel hale geçer. Çalkalamalı kültür metodu bakteriyel selülozun endüstriyel üretimi için uygundur ve farklı uygulamalarda ticari uygulama olarak görev yapar. Çalkalamalı kültürde üretilen BS peliküllerinden S-BS iplikleri daha sık dallanmıştır ve birbiriyle bağlantıdadır. Elektron mikroskobu açısından fark S-BS fibrilleri daha uzamış ve yukarıdakiyle çapraz geçiş halindedir. A-BS iplikleri karışmıştır ve eğimlidir. Watanebe ve arkadaşları çalkalamalı ortamda üretilen bakteriyel selülozun statik kültüre kıyasla daha düşük polimerizasyon ve kristalizasyon derecesine sahip olduğunu görmüştür. Bu bulgular çalkalamalı bakteriyel selülozun daha küçük partikül boyutunun statik bakteriyel selüloza kıyasla daha yüksek su tutma kapasitesini desteklemektedir [139]. ACP/MAS <sup>13</sup>C NMR analizleri selüloz I alfa içeriğinin çalkalamalı kültürde statik kültürde üretilenden daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu yüzden statik kültürden daha düşük elastite modülü, daha yüksek su tutma kapasitesi ve daha yüksek süspansiyon viskozitesi gösterir [141].



**Şekil 2.9.** Statik kültürde oluşan BS pelikülleri (A); durgun kültürde oluşan BS peleti (B).

Bakteriyel selüloz eşsiz yapısal ve mekanik özelliklerinden dolayı, çeşitli alanlarda aranan malzeme haline gelmiştir. BS fiberler 20-100 nm çapla birlikte yüksek boy en oranına sahiptir. Sonuç olarak BS yüksek yüzey alanına sahiptir. Bu özellikler yüksek hidrofilik doğa ile kombine edildiğinde yüksek bir sıvı yükleme kapasitesi ile sonuçlanır. Ayrıca biyokompatibilitesi, hidrofilitesi, transparan ve nontoksik oluşu onu farklı alanlarda geniş uygulamalar için cazip bir aday haline getirir. Çalışmaların çoğu BS den yapay deri, yapay kan damarı, yapay kornea, kalp kapağı protezleri, yapay üreter, yapay kemik, yapay kıkırdak, yağay sığır diz menisküsü ve ilaç, hormon ve proteinlerin salımı gibi ideal biyomedikal cihaz dizaynı üzerine yoğunlaşmıştır. [142].



**Şekil 2.10.** Bakteriyel selüloz bazlı materyallerin farklı biyomedikal uygulamaları.

Bakteriyel selülozun biyouyumluluğuna baktığımızda fibroblastlar ve kondrositler kokültür yapıldıktan sonra BS bileşenleri çıplak farelere implante edilmiştir. BS kokültürler çıplak farelerin derisi içerisine kadar iyice entegre olmuştur. Bundan dolayı BS, yukarıdaki koşullar altında hücre yapışması ve çoğalması için faydalıdır sonucuna varılmıştır [143].

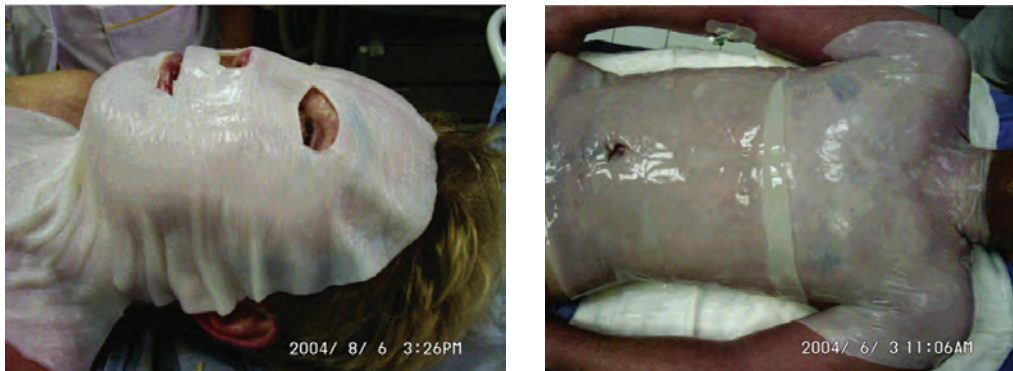


BALB/mice sırtında kalın deri yarası yaratılmış ve histolojik araştırmalar ticari ü rünlere kıyasla 7. günde BS grubunda yara bölgesinde önemli bir taze doku rejenerasyonu ve kapiler formasyonu göstermiştir [144].

Farklı kitosan matrikslere (iki farklı polimerizasyon derecesinde ve suda çözünebilir türevli kitosan) degradasyon ve BS kaynaklı nanokompozit filmler kitosan ve BS pelikülllerinin su bazlı süspansiyonları test edilerek hazırlanmıştır. Üretilen filmler oldukça transparan, esnek ve katıksız kitosana kıyasla mekanik özellikleri daha iyidir [145].

Diğer bir çalışmada farklı oranlarda (% 20/80'den 60/40 w/w) dondurarak (-30 ve -80) ve liyofilize edilerek mikrofibriler BS süspansiyonu ve kitosan solüsyonu karışımından polisakkarit bazlı BS/kitosan poröz doku iskelesi hazırlanmıştır. Karıştırma öncesi yüzey karboksil gruplarını geliştirmek için mikrofibriler BS 2,2,6,6-tetramethylpyperidine-1-oxyl-radikal (TEMPO)-aracılı oksidasyona maruz bırakılmıştır. Kompozit doku iskeleti por boyutu 120-280 µm arasında değişen, iyileşen kompres modülü ve gücü ile birlikte 3 boyutlu açık por yapısına sahiptir [146].

BS'nin klinik uygulamaları da bulunmaktadır. Örneğin BS'nin kronik yaralarda uygulanmasında ortalama % 75 epitalizasyon süresini ortalama 81 günden 79 güne indirmiştir. İyileşmeyen ülserlere uygulandığında, BS yara örtüleri standart bakıma kıyasla yaranın kapanması için geçen süreyi kısaltmıştır [147].



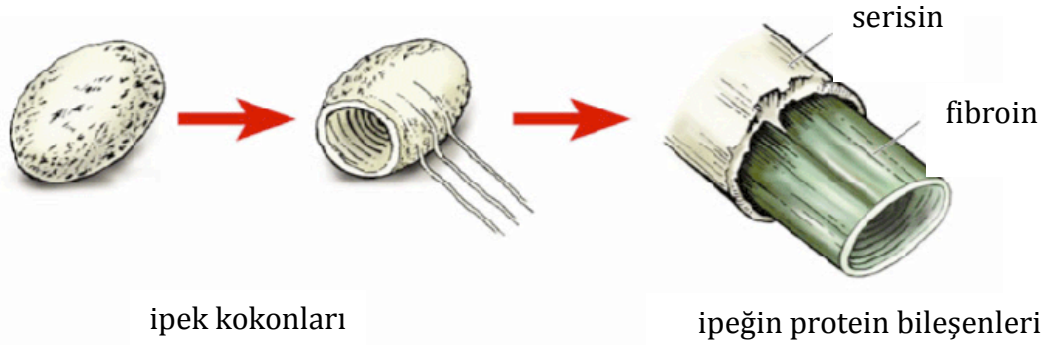
**Şekil 2.11.** Yaralanmış yüz ve toraksa uygulanan bakteriyel selüloz örtüleri. Farklı vücut boyutları için uygunluk, nemli bir çevre sağlama ve önemli derecede ağrı hissini azaltma [148].

## 2.7. İpek ve Hemostazda Kullanımı

İpek proteini, ipek üreten artropodların (ipek kurtçuklarında, örümcek, akrep, akar ve arılar gibi) salgı bezlerinde bulunur ve metaforozları süresince fiberler şeklinde spinlenir. İpek kurtçukları tekstil endüstrisinde kapsamlı şekilde kullanılan yerleşmiş bir fiberdir. Diğer taraftan örümceğin kanibalik doğası örümcekten üretilen ipeğin ticari üretimini kısıtlamaktadır [149]. Tek bir ipek kozasından elde edilen fiber verimliliği 600-1500 m iken tek bir örümceğin salgı bezinden sadece 137 m'dir ve örümcek ağından elde edilen ise 12 m'dir [150].

Örümcek ipeği doğada heterojendir. Bu yüzden ipek bazlı biyomateryaller ipek kurtçuğunun ipeğinden elde edilerek hazırlanır. *Bombxy mori* tarafından üretilen ipek *Bombycidae* ailesinin bir üyesidir. *B. mori* dut ipeği olarak bilinir. Diğer bir ipek üreten aile ise *Saturniidae* ailesidir ve dut olmayan ipek olarak bilinir.

Fibroin, ipek fibere mekaniksel kuvvet verir, serisin fibroin filamentlerini ipek ipliği şeklinde bağlar. Serisin tekstil işlemlerinde kullanılmasına rağmen, ipeğin biyoyumluluğu hakkındaki in vivo çalışmalar serisin kılıfın immun cevaptan sorumlu olduğunu, bakir ipek kullanıldığında sadece güçlü immun cevap oluştuğunu göstermektedir. Bu yüzden başlangıçta genellikle serisin doğal ipeğin alkali suyun içerisinde kaynatılmasıyla uzaklaştırılır. Bu süreç sakızın giderilmesi olarak adlandırılır. Bu süreç boyunca % 22-25 oranında bir ağırlık kaybı oluşur. Sakızı giderilmiş ipek inört olduğundan dikkati çekmektedir [151].



**Şekil 2.12.** İpek filamentinin bileşimi.

*Bombxy mori* ipek fibroin yüksek oranda üç tane aminoasit içerir, ortalama molar oranları sırasıyla 3:2:1 olacak şekilde glisin (G;Gly), alanin (A;Ala), ve serin (S; Ser) [152]. Yapı olarak doğal ipek fibroin Gly-Ala-Ser sekansının sıklıkla tekrarlandığı, kokonların spinlenmesi sırasında mekanik stres tarafından bir antiparallel beta tabakalı kristalin yapıdır (ipek II) [153, 154]. Bu aminoasitler küçük yan gruplarla birlikte moleküler zincirlerin sıkıca paketlenmesi imkanı sunar. Bu uzamış zig-zag zincirleri hidrojen bağları aracılığıyla birbiriyle etkileşime girer ve % 70 civarında yüksek fiber kristalinitesi ile beta tabakalı yapı kazandırır. Beta tabakaları arasında sadece Van der Waals kuvvetleri işler. Bu kristalin yapı, ipeğe blok bir kopolimer yapısı veren aspartik asit gibi daha büyük aminoasitleri içeren daha fleksibil amorf bir domain tarafından dağıtılır [155]. Bu yapısal karakteristik konfigürasyon ipeğe yüksek mukavemet ve fleksibilitiyi içeren eşsiz mekaniksel özellikler kazandırır.

İpek allojenik ya da ksenojenik doku kaynaklı diğer protein bazlı biyomateryallere kıyasla üstün özelliklere sahiptir. Bu materyallerin enfeksiyon riski yüksektir. Zorlu protein izolasyonu ve saflaştırma protokolünden dolayı bu materyaller pahalıdır. Bunun aksine, ipek yerleşmiş bir tekstil fiberidir ve yaklaşık 1000 metre ton üretilir ve yıllık işlenir. İpek fiber saflaştırma serisini giderilmiş ipek bazlı biyomateryaller için başlangıç materyali olarak basit bir alkali ya da enzim bazlı zank giderme prosedürü kullanılarak rutin olarak gerçekleştirilmektedir. Bu yüzden geleneksel ipek tekstil endüstrisinin büyük ölçekte üretim altyapısına uygunluğundan dolayı biyomedikal uygulamalar için ipek kullanımı ekonomik olarak avantajlıdır. İpeğin diğer doğal biyopolimerlere kıyasla avantajı üstün mekaniksel özellikler göstermesidir. Diğer önemli bir avantajı biyokompatibilitesi, su bazlı üretim, biyobozunurluk ve fonksiyonel modifikasyon için kolay ulaşılabilir kimyasal grupların varlığının oluşudur.

Sakızın giderilmesi (yapıştırıcı protein serisinin uzaklaştırılması) ipek fiber üretiminde ilk adımdır. Farklı diğer malzeme formatlarını üretmek için, sakızı giderilmiş ipek fiber, ipek solüsyonu elde etmek için çözülür. Bazı durumlarda, fiberleri çözmek zordur, ipek uygun tampon solüsyonları kullanılarak ipek kurtçuğu salgı bezlerinden direkt olarak ekstrakte edilebilir [156]. Son birkaç yıldır, mühendislikteki kolay kullanımından, ıslak şartlardaki harika mekanik özelliğinden, hücre büyümesi için

biyoyumlu oluşu, yüksek oksijen ya da su ve ilaç geçirgenliği ve enzimatik degradasyona dirençliliğinden dolayı ipek fibroinin biyomedikal ve biyoteknolojik kullanımına ilişkin artan bir ilgi vardır [157-159]. Bu avantajlar cerrahi suture, deri tedavisi, enzim immobilizasyonu, yara yanık örtü materyali, hücre kültürü için substrat, kontrollü ilaç salımı taşıyıcıları ve doku mühendisliği için doku iskelesi gibi biyomedikal uygulamaları için fayda sağlamaktadır.

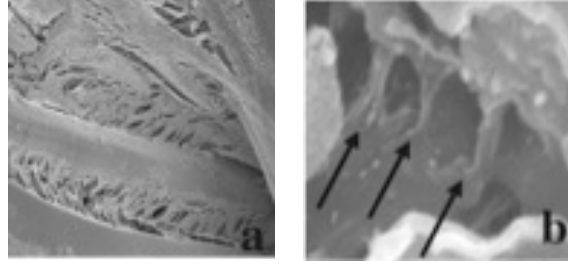
Umut vaat edici özelliklerine rağmen, fibroin bazlı biyomatemelerin biyomedikal uygulamaları tam anlamıyla çalışılmamıştır. Son zamanlarda, fibroin filmin inflamasyon makrofaj ve humoral immun cevabını, hücrelerde tam bir yayılma olmaksızın filopodları ile fibroine yapışmasını araştırmak için çalışılmaktadır [160]. Bunlara ek olarak ipek fibroinin kitosanla kombinasyonu ya da modifikasyonu ile ipek fibroinin yeni biyomedikal uygulamalarını oluşturmak için çalışmalar yapılmaktadır [161].

Hemostatik yara yanık örtü materyallerin uygulaması için, ipek fibroin serum proteinlerini adsorpsiyon yeteneğinden dolayı tercih edilmektedir. Serum proteinlerinin, fibrin(ojen)in, ipek fibroin fiberlere ve filmlere hidrofobik etkileşimlerle daha çok hidrofobik beta tabakalı zengin domainlerinden bağlandığı rapor edilmiştir [162]. Ayrıca ipek fibroin fabrikler üzerine serum proteinin adsorpsiyonu ipek fibroinin konformasyonu mühendislik yöntemleri ile düzenlendiğinde dramatik olarak değişmektedir [163]. Bu özellikler ipek fibroinin hemostatik örtü materyali için kullanışlı bir materyal olduğunu desteklemektedir.

### **2.7.1. İpeğin Kan Plazması ile Etkileşimi**

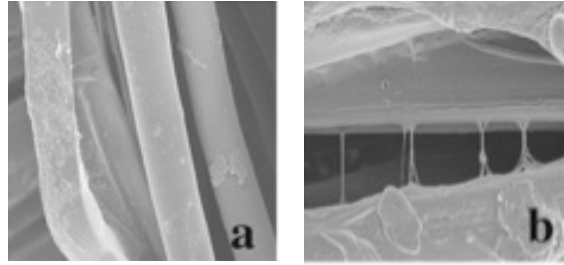
Plazma proteinleri ile fibroin materyali arasındaki etkileşim, ipek fibroin hemostatik yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi için anahtar noktadır. Şu anda, fibroin fiberlere proteinlerin yapışması hakkında sınırlı yayınlanmış çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda, Santin ve arkadaşları fibrinojenin fibroin fiberlere ve rejenerer filme bağlandığını rapor etmektedir [162]. Fibroin örnekleri, trombin ve faktör XIII içeren izole fibrinojen solüsyonu içerisinde inkübe etmişlerdir. Bilindiği gibi faktör XIII fibrin fibrillerinin pıhtı formuna çapraz bağlanmasını indüklerken, trombin de fibrinojenin

fibrine polimerizasyonunu aktive eder. Bu deneyler kalsiyum varlığında ve noksanlığında bağlanma prosesinde kalsiyuma bağlı enzimlerin rolünü araştırmak için gerçekleştirilmiştir. SEM'den de anlaşılacağı üzere, fibroin film herhangi bir görsel fibrin polimerizasyonu göstermez, fibroin fiberler kalsiyumdan bağımsız bir mekanizma aracılığı ile düzenli aralıklı bağlanma bölgeleri sayesinde fibrin demetlerine bağlanır (Şekil 2.13.)



**Şekil 2.13.** Kalsiyum varlığında polimerize fibrin içerisinde fibroin fabriklerin inkübasyonu sonrası fiber/pıhtı ara yüzeyin kriyo-SEM görüntüsü. a) fiberler ile köprü oluşturan laminar yapılar (x1500); b) bir fiberle kontakt halinde olan demetler (x50000). Oklar değme noktasının morfolojisini göstermektedir [163].

Başka bir çalışmada formaldehid kullanarak ipek fiberlerin yüzeyini modifiye etmişlerdir. Seyreltik formaldehid solüsyonu kullanılarak protein üzerindeki amino gruplarını bloke eden Schiff's bazı formasyonu aracılığı ile yaratılan uzatıcı kollar kovalent olarak fibroine bağlanır [164]. Oluşan imid grupları sulu ortam sayesinde dışarı çıkar ve alkole indirgenir, bu nedenle fiber yüzeyi daha hidrofilik bir karakter kazanır. Bu müdahale dramatik olarak fibroin fiberlere bağlanan fibrini (ojen) inhibe eder; birkaç temsili olmayan bölgede fibroin fiberlerine bağlanıp polimerize olan gevşek pıhtılar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ipek fibroinin doğal yapısı üzerindeki düzenli aralıklı hidrofobik domain varlığının polimerize fibrinojen ile birlikte etkileşim kurma yeteneğinde olduğunu göstermektedir (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14.** Kalsiyum varlığında polimerize fibrin içerisinde inkübasyondan sonra formaldehit ile etkileştirilmiş fibroin fiberlerin kriyo-SEM görüntüsü, a) doğal yüzey (x1500), b) iki polimer arasındaki etkileşimlerin nadir görülen bölgeleri (x3000) [163].

Bu sonuçlar fibroin fiberler üzerinde spesifik fibrin (ojen) bağlanma bölgelerinin var olabileceğini ve fiber yüzeyinde hidrofobik beta tabakaca zengin domainlerin polimerize fibrinojenle etkileşime girebilecek yetenekte olduğu konseptini desteklemektedir [162].

## 2.8. Vitamin K ve Hemostaz

Vitamin K, Gla-protein ailesine ait proteinlerin sentezi için zorunludur. Bu ailenin üyeleri özellikle karaciğerde oluşturulan 4 koagülasyon faktörüne özgüdür. Vitamin K normal kan koagülasyonu için gerekli olduğundan ismini oradan alır ve yarım yüzyıldır hemostazın sadece vitamin K içeren metabolik bir proses olduğuna inanılır. Bu görüş şimdiler de kabul görmemektedir. Gla olarak refere edilen gammakarboksigtutamat içerisindeki her bir protein, osteokalsinden (kemikteki non kollagenous zorunlu protein) Gla protein matriksine kadar (MGP, arterlerimizdeki potansiyel kalsifikasyon inhibitörü) ve büyümeyi durdurucu 6 protein sekansı (Gas6, hücre büyüme düzenlenmesinde görevli bir protein) sentezlenirken vitamin K faaliyetinin parmak izini taşıdıkları bulunmuştur. Kan koagülasyonunda görevli proteinler değişmeden karaciğerde sentezlendiğinden, yeni keşfedilen Gla-proteinleri diğer metabolik proseslerde anahtar fonksiyona sahiptir ve farklı dokularda sentezlenir.

Vitamin K'nın moleküler fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir; memeli hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan ve glutamat amino asidinin Gla dönüşümünü sağlayan gammaglutamat karboksilaz enzimi için kofaktör olarak görev yapar. Vitamin K, hidrokinon oksidasyonu, karboksilasyon reaksiyonu için enerji sağlar. Tüm Gla proteinleri ekstraselular matrikste ya da vücut sıvısında salgılayıcı protein olarak bulunur. Gla artıkları proteinlerde proteince yapışan güçlü kalsiyum bağlayan grupları oluşturur ve bu proteinlerin fonksiyonu için Gla artıklarının zorunlu olduğu bilinmektedir.

Vitamin K hepatik hücrelerle birlikte birkaç karboksilaz enzimi aktivitesi için zorunludur ve bu yüzden koagülasyon faktörlerinin VII, IX ve protrombin aktivasyonu için gereklidir. Bu faktörler memeli hücrelerinde bulunan endoplazmik bir enzim olan gamma-glutamil karboksilaz tarafından karboksillenir. Vitamin K bu proseste aktif koenzimdir, oksidasyon boyunca reaksiyon için enerji sağlar [165]. Karboksilasyon sonrasında, bu proteinler trombositlerin yüzeyindeki negatif yüklü fosfolipidler için ve koagülasyonu desteklemek için eğilim kazanır [166].

## **2.9. Protamin Sülfat ve Hemostaz**

Protamin sülfat, negatif yüklü parçalara ayrılmamış heparine bağlanan (UFH) somon balığı kökenli 5 kDa'luk bir katyonik polipeptittir [167]. Protamin ve heparin arasındaki moleküler etkileşimin mekanizması tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen, bu bağlanma heparinin antitrombin aracılı antikoagülan özelliğini nötralize etmeye yarar. Ayrıca, ortaya çıkan protamin-heparin kompleksi retiküloendotelial sistem tarafından hızlıca temizlenir [168]. Dolayısıyla, 30 yıldan fazladır UFH'in antikoagülan etkisini tersine çevirmek için protamin sıklıkla kullanılmaktadır. Protamin UFH'ın yarattığı önemli kanama komplikasyonlarının olduğu kişilerde tedavi için dikkate alınmaktadır [169]. Ayrıca, protamine rutin olarak kardiyak cerrahi ve kardiyopulmoner bypass (CPB)'a giren hastalar için istenen yüksek UFH konsantrasyonunu tersine çevirmek için operasyon sonrası uygulanır [170]. Sonuç olarak, hesaplamalar 2 milyar heparinize hastadan daha fazlasının her yıl protamin ile idare ettiğini desteklemektedir [171]. Paradoks olarak, in-vitro çalışmalar protaminin intrinsik

antikoagulant özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir [172, 173]. Protaminin doğasında var olan antikoagulant potansiyel özelliğine ilişkin ilgiden dolayı, protamin dozuna ilişkin şu anki fikir birliği 100 IU heparin başına 1 mg protamin ile sınırlıdır [169, 170]. Ayrıca, farmokinetik çalışmalar protaminin insan plazmasından (yarılanma ömrü 7.4 dakika) hızlıca temizlendiğini göstermektedir [174].

Hayvan çalışmaları protaminin düşük molekül ağırlıklı heparinin (LMWH) trombin inhibe edici aktivitesini nötralize ettiğini göstermesine rağmen, antifaktör Xa (FXa) aktivitesini kısmen nötralize edebilir [175, 176]. Bu yüzden, LMWH-tarafından indüklenen antikoagülasyon kalıntılarının geri dönüştürülmesi için protaminin klinik etkisi açık değildir. Protaminin klinikte yaygın kullanımına rağmen, onun intrinsik antikoagulant etkisi altında yatan moleküler mekanizma tam olarak tanımlanmamıştır. Protaminin artan konsantrasyonları (50-300 ug/ml) ile ilgili ön çalışmalar ex vivo heparinize hasta örneklerine eklenmiş ve heparin antikoagülasyonunun protamin heparin oranı 1.3.1 olduğunda maksimum geri dönüşüm olduğu görülmüştür [177]. Ayrıca, daha yüksek protamin eklenmesinin, heparin oranı (artan serbest protamin) aktif pıhtılaşma süresinde önemli bir uzamayla tanımlanmamış bir mekanizma ile sonuçlanır. Benzer şekilde, normal toplanmış plazmaya ex vivo protamin eklenmesi önemli derecede doku faktörü aracılı (TF) tromboelastografiyi azaltmıştır [178]. Protamin konsantrasyonuna bağlı olarak, önemli ölçüde pıhtı başlama süresini (R zamanı) arttırmakta, pıhtı yayılım oranını (alfa açısı) azaltmakta ve pıhtı gücünü (maksimum genlikte) düşürmektedir.

## **2.10. Kaolin ve Hemostaz**

Kaolin 1:1 tabakalı bir mineraldir. Mineralin bir tabakası oktohedral alumina ve oksijen atomlarını ve birbirine hidrojen bağlarıyla bağlanmış mineralin tekrarlayan tabakalarını içeren bir silika tetrahedral tabakadan oluşur. Silika/oksijen ve alumina/hidroksil tabakası olarak gösterilir. İyi paketlenmiş bir yapıdır ve kaolinit partiküller kolayca kırılmaz ve tabakaları birbirinden ayrılmaz. Bu yüzden yapının yüzeyi ve köşeleri boyunca daha fazla sorbsiyon aktivitesi oluşur. Kaolin az reaktif bir



kildir. Yüksek pH'ına bağılı olarak çevrenin pH'ına göre metallerin adsorpsiyonunu iyileştirebilir ya da inhibe edebilir.

Son zamanlarda yeni kaolin kaplı hemostatik gazlı bezlerin uygulama avantajı ve kolayca kaldırılabilmesi yönüyle iç organlarda kanama ve letal ekstremite modellerinde kanama kontrolündeki etkinliği gösterilmiştir. Sena ve arkadaşları domuzda birkaç hepatik yaralanmada kaolin kaplı gazlı bezde azalan kan kaybını ve canlandırma ihtiyacını göstermişlerdir [179]. Ayrıca, 20 yaşındaki erkeklerde yaşamı tehdit eden hemorajik gastrit de (intra-luminal kanama) direkt olarak kaolin kaplı gazlı bez uygulamasını rapor etmişlerdir. Kaolin, kaolin kaplı gazlı bezin aktif ajanıdır ve insan, hayvan ve bitkisel protein içermeyen, kendi biyolojik özelliğı olmayan tabakalı bir silika mineralidir. Örülmemiş polyester ve yapay ipek yüzeylere kolaylıkla uygulamak için bağlanır ve pıhtılaşma kaskadının başlaması için plateletleri ve Faktör XII'yi aktive ettiğı görülmüştür.

Cha'vez-Delgado ve arkadaşları kronik ya da hipertropik bademcik iltihabı olan ortalama 8 yaşında olan 230 hasta ile (138 çalışma grubu ve 92 kontrol grubu) kaolin ile iyileştirilmiş gazlı bezi kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Kaolin içeren grup da kontrol grubuna kıyasla uygulama süresi ve kan kaybı bakımından önemli bir azalma saptanmıştır. 5 dakika da kontrol grubundaki % 34.8 hastada hemostaz görülürken, % 84.8 hastada kaolin içeren gazlı bez kullanılarak başarıyla hemostaz sağlanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla operasyon sonrası 6 ve 12. saatte daha az ağrı görülmüştür. Kaolin içeren grubun daha az analjezik ilaç tedavisine ihtiyaç duyduğu, normal beslenme ve aktivitelerine kontrole göre daha hızlı döndüğü görülmüştür [180].

## 2.11. Fosfatidilkolin (PC) ve Hemostaz

Doku faktörü ve faktör VIIa kompleks (TF:FVIIa) tarafından katalizlenen reaksiyon gibi kan pıhtılaşma reaksiyonları fosfatidilserin gibi anyonik fosfolipid içeren membran yüzeylerinde gerçekleşir. Bu açıdan düşünüldüğünde, membrana bağlanma kan pıhtılaşma kaskadındaki adımlardan çoğunun fonksiyonu için kritiktir. Kan pıhtılaşma kaskadında birçok adım bir membran yüzeyindeki onun akraba düzenleyici proteinleri ile birlikte serin proteazlarının düzenlenmesine ihtiyaç duyar. Serin proteaz (örneğin VIIa, IXa ya da Xa) ve onun protein kofaktörü (doku faktörü, faktör VI-IIa ya da faktör Va, sırayla) membran yüzeyinde koagülasyonun fonksiyon görmesi ve düzenlenmesi için spesifik membran interaktif domainler içerir. Membran yüzeyi anyonik fosfolipidler içeriyorsa ki en aktif olanı fosfatidilserindir sadece pıhtılaşma faktörlerinin bağlanması ve düzenlenmesini destekler. Ancak membrana bağlanma, doku travma bölgesi için substratlar ve enzimlerin lokalize olmasından daha önemlidir. Membran katalizde kritik rol oynar, kan pıhtılaşma enzimleri gibi membran yüzeyinden salındığı zaman bir kez daha aktif olur. Amfifilik kimyasal yapılarından dolayı, fosfolipidler hücre membranının temel yapı taşı olarak çift tabakalı matriks halinde organize olurlar. Fosfolipidler yüklü bir baş gruba ve doymamışlığın farklı miktarlarını içeren bir hidrokarbon kuyruğa sahiptir. Önemli çalışmalar fosfolipid reaktifleri ile fonksiyonelize fosfolipid polimerizasyonu ya da postpolimerizasyon fonksiyonilasyonun bir sonucu olarak stabil membran mühendisliği üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin, Nakaya ve arkadaşları platelet yapışması ve protein adsorpsiyonu baskılanmış bir fosfolipid baş grubu ile bir alkil metakrilat monomeri sentezlemişlerdir [181]. Bu yüzden, fosfolipid içeren polimerler kan saflaştırma membranları, yapay kalp kapakları, yapay organlar ve birkaç diğer prostetik cihazlar için cazip adaylardır [182]. Biyoyumlu cihazlar geliştirmek için alternatif bir metot uygun substratların fosfolipidlerle kaplanması olmuştur [183].

Nonwoven fibröz membranlar lesitin solüsyonundan tek bir adımda oluşturulabilir. Elektroeğrilmiş fosfolipid fiberler çoklu sentetik stepler, kompleks elektroeğirme dizaynları kullanılmaksızın biyolojik bazlı yüksek yüzey alanlı membranların direkt

fabrikasyonu için bir potansiyel sunmaktadır. Mckee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada lesitinden elektroğrılmış membranlar hazırlamışlardır [184]. Lesitin konsantrasyonu arttıkça, misel morfolojisi küresel formdan silindirik forma dönüşmektedir ve yüksek konsantrasyonlarda silindirik miseller üst üste binmektedir.

## **2.12. Hemostazda Kullanılan Nanoteknolojik Yaklaşımlar**

Hemostaz, cerrahi prosedürlerde ve majör travma sonrası büyük bir problemdir. Sekonder hasara neden olmaksızın kanamayı durdurmak için birkaç efektif metot vardır. Bası, kotaterizasyon, ligasyon, ve klinik olarak indüklenen vazokonstruksiyon gibi basit girişimlerden başlayarak doktorluğun gelişiminden bu yana hemostaz geliştirmek için yollar bulunmuştur. Ancak günümüzde nanoteknolojinin medikal teknolojide değişiklikler için yeni imkanlar sunmasıyla son zamanlarda kanamayı durdurmak için yaraya uygulandığı zaman nano düzeyde yeniden düzenlenen materyaller kullanılmaktadır. Bu metot vücutta herhangi bir iyonik çevrede kanamayı durduran nanofiber bariyer formasyonudur, ayrıca materyal doğal l-amino asitlere parçalanır, çevre dokular tarafından onarım için kullanılabilir.

Rutledge ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hazırladıkları NHS-1 ve NHS-2 kendiliğinden düzenlenmiş solüsyonu beyinde, spinal kordda, karaciğerde, femoral arterde ya da memeli derisindeki yaraya uygulayarak hemostaz yaratmayı amaçlamışlardır. Bu materyaller sentetik, biyobozunur, ve herhangi bir kan ürünü, kollajen ya da biyolojik kontaminant içermezler. Arjininin platetet agregasyonunu inhibe etmesi NHS-1 deki arjininden kaynaklandığını desteklemektedir. NHS-1 ve NHS-2 solüsyonu kan akışını yavaşlatacak ve hasarlı dokunun onarımı için komşu dokuya hareketini kolaylaştıracak bir bariyer halinde düzenlenebilmektedir. Hazırlanan kendiliğinden düzenlenmiş nano hemostat solüsyonları 15 saniyeden daha az bir sürede hemostaz yaratmaktadır [185].

Ruan ve arkadaşları yaptığı çalışmada 9 artıklı bir peptit dizayn etmişlerdir. Peptit konsantrasyonu ve mekanik yarılmalara bağlı olarak balık ağı şeklinde güçlü bir nano

yapı oluşturmuşlardır. Bu peptit intramoleküler amfifiliktir, bir ucundaki bir çift iyonik kalıntılardan dolayı, Lys ve Glu ve diğer ucunda iyonik olmayan Phe, Cys ve Phe. Bu uzun fiberler dallanır ve % 99'dan daha fazla su içeren kendiliğinden iyileşen peptit hidrojel formunda üst üste binerler. Bu peptit hidrofobik model ilaç, pireni enkapsüle edebilir ve pireni kaplı mikrokristallerden lipozomlara yavaşça salabilir. Ürettikleri bu peptitin hemostatik aktivitesine bakabilmek için sıçan karaciğer sol lateral lobu seçilmiştir. 2. derece yara yüzeyi oluşturarak hazırlanan peptitler gazlı bez ile karşılaştırılmıştır. Gazlı bez 120 saniyede kanamayı durdururken %1'lik peptit solüsyonu 16 saniyede kanamayı durdurmuştur. Alınan sonuçlar peptitler tarafından kendiliğinden düzenlenen hidrojinin en umut vaat edici nano malzeme olduğunu savunmaktadır [186].

Shoffstall ve arkadaşları ise intravenöz hemostatik nanopartiküller (GRGDS-NP1) geliştirmişlerdir ve femoral arter yaralanmasını takiben oluşan kanamayı azaltma ve sıçanlarda öldürücü karaciğer travması sonrası hayatta kalma sürelerini uzatma yeteneklerini göstermişlerdir. Bu nanopartiküller poli (laktik –ko-glikolik asit)-b-poly l-lizin-b-poly(etilenglikol)'den hazırlanmıştır. Yüzeye konjuge edilmiş hedeflendirilmiş ligand yoğunluğu bu sistem aracılığı ile sıkıca kontrol edilebilmektedir. Çalışmada farklı yoğunlukların hemostaz ve biyoyayılım üzerindeki etkisi araştırılmıştır [187].

Kendiliğinden düzenlenmiş peptit nanofiber doku iskelelerinin hemostaz için kullanımına yönelik olarak Luo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada D-amino asitleri kullanarak 3 boyutlu nanofiber doku iskelesi formunda kiral kendiliğinden düzenlenmiş peptit d-EAK16 hazırlamışlardır ve hazırlanan bu malzeme eşleniği l-EAK16'dan farklıdır. Bu kiral peptitler D-amino asitler içerirler, d-EAK16 iyi düzenlenmiş nanofiber formunda düzenlenebilmektedir. Yaptıkları deneysel çalışmalarda %1 d-EAK16 karaciğer yaralanması hemostazı yaklaşık 20 saniye almıştır, ancak alternatif olarak D- ve L-aminoasitler içeren %1 E•A•K16 ve EA•K16 kullanılarak yaklaşık 70 ve 80 saniye almıştır [188].

Dai ve arkadaşları kanama kontrolü için bozunma ve antibakteriyel özelliği iyileştirilmiş gümüşle değiştirilmiş kalsiyum katkılanmış mezoporöz silika küreler

(AgCaMSS) geliştirmişlerdir. Simetrik hekzagonal AgCaMSS küreler 3.2 nm por boyutuna sahiptir. Alınan sonuçlar optimum AgCaMSS formulasyonunun önemli ölçüde kan pıhtılaşmasını desteklediğini, koagülasyon kaskadının intrinsik yolağını aktive ettiğini, trombosit yapışmasını uyardığını göstermiştir [189].

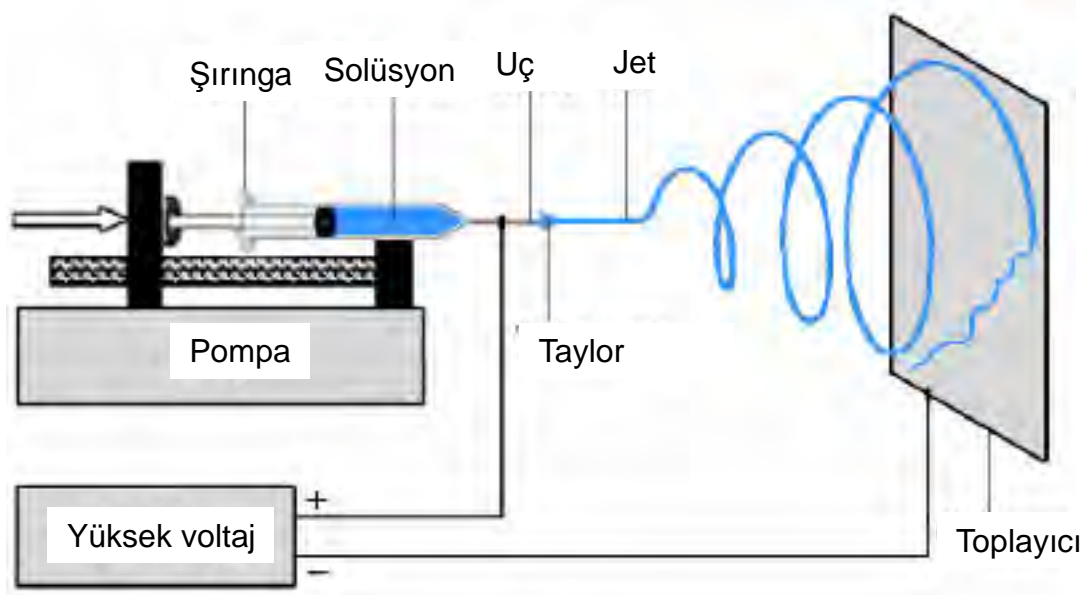
Dowling ve arkadaşları hızlıca kanı jelleştiren amfilik bir biyopolimer rapor etmişlerdir, ayrıca şeker bazlı supramolekülün eklenmesi ile jelasyonun altında yatan kendiliğinden düzenlenmenin geri dönüşümlü olabildiğini göstermişlerdir. Bu biyopolimer hidrofobik olarak modifiye edilmiş (hm) polisakkarit türevli kitosandır. Hm-kitosan heparinize insan kanı ile kantağa geçtiğinde, sıvı hızlıca elastik jel formuna geçer. Bunun aksine doğal kitosan (hidrofobik olmayan) kanı jelleştiremez. Jelasyon, kan hücrelerinin membranlarının içersine giren hm-kitosan üzerindeki hidrofob moleküllerden dolayı olmaktadır ve bu nedenle hücreler örneği çeken bir ağısı yapı içersine bağlanır. Jelasyon kan hücrelerinden bağımsız, siklodekstrinlerle gömülmüş iç hidrofobik cebinde bir supramoleküle sahip  $\alpha$ -siklodekstrinlerin eklenmesi ile tersine dönebilir, bu yüzden de hücre ağını paraçalayabilir. Küçük ve büyük hayvan kanama modellerinde yaratılan hemostazda artan etki, bir sıçan modelinde femoral ven transeksiyonunu kontrol altına almak için kanama süresinde % 90 bir azalma gözlemlenmişlerdir [190].

### **2.12.1. Elektroçirme ve Hemostatik Örtü Malzemesi Üretimi**

Önceleri "elektrostatik spinning" olarak bilinen elektroçirme prosesi, Zeleny tarafından 1914'de ilk olarak keşfedilmiştir ve küçük çaplı polimerik fiberlerin spinlenmesi için uygun bir teknik olarak bulunmuştur [191]. 1934' e kadar fiber formasyonuna ilişkin teknik zorluklar gelişimi geciktirmiştir, bu prosedürdeki cihazı kullanarak Formhals sentetik fiberlerin spinlenmesi prosesi için ilk US patentini yayınlamıştır [192]. Bu patentde, aseton/alkol solüsyonunda çözölen selöloz asetat hareketli bir toplayıcı üzerine fiberler halinde spinlenmiştir. Başlangıç patentini takip ederek, elektroçirme yöntemi kullanılarak çok sayıda polimerden nanofiberlerin geliştirilmesi prosesi başlamıştır. İlk başarı sonrasında, elektroğirmeye odaklanma

yerini fiber oluşum mekanizmasını anlamaya bırakmıştır. 1969'da Taylor jet oluşum prosesi ile ilgili ilk kez elektrostatik kuvvetler yzey gerilimini dengelediği zaman askıda duran damlacıktan gelişen Taylor konisi fenomenini açıklayan çalışmasını yayınlamıştır. Bu alışmada Taylor dzyeye kıyasla daha küçük çaplı fiberlerin oluşumunu açıklayan koninin ucundan bir fiber jetinin salımını gözlemlemiştir. Taylor konisinin keşfedilmesinden kısa bir süre sonra, ilgi daha çok elektroçirme proses/solüsyon parametreleri ve oluşan fiberlerin yapısal karakterizasyonları arasında ilişkinin anlaşılmasına kaymıştır. 1971'de Baumgarten poliakrilonitril/dimetilformamid solüsyonu kullanarak elektroçirilmiş fiberlerin yapısı üzerindeki proses parametrelerinin ve solüsyonunun etkisini çalışmıştır [194]. Fiber apı ve solüsyon viskozitesi arasında pozitif bir ilgi keşfetmiştir [193]. Aynı zamanda, diğer araştırmacılar diğer uygulamalar için elektrospin fibröz matrikslerin potansiyelini araştırmaya başlamışlardır. 1978'de, Annis ve Bornat vasküler protez olarak elektrospin poliüretan örtülerin uygunluğu değerlendirmiştir. 1985'de, Fisher ve Annis elektrospin arteriyel protezlerin uzun vadede in vivo performansı değerlendirmiştir [195]. Nanoteknolojiye olan ilgiden dolayı 1990'larda farklı polimerlerden nano boyutta çaplara sahip fiberlerin kolay fabrikasyonuna izin veren bu proses, elektroçirme yeniden ilgi odağı olmuştur. Elektroçirme tekniğindeki bu yeniden canlanma 1998 sonrasındaki yayınlarda artışla göze çarpmaktadır. şu ana kadar 50 farklı polimerden daha fazlası ince fiberler halinde başarılı bir şekilde spinlenmiştir.

Tipik bir elektroçirme kurgusu 3 bileşen içerir; yüksek bir voltaj kaynağı, kapiler u ya da pipet ve topraklanmış bir toplayıcı (şekil 2.15.). Elektroçirme süresi boyunca, yerçekim gücüyle ya da şırınga pompasıyla genellikle salınan, bir iğneden ya da pipetten askıda duran polimer solüsyonunun asılı damlacığına uygulanır [196].



Elektrospinning Bileşenleri

**Şekil 2.15.** Tipik bir elektroçirme kurgusunun bileşenleri.

Sıvı ve toplayıcı arasındaki atraktif güçlerin yanı sıra solüsyondaki benzer yüklerin ürettiği itici güçler solüsyon üzerinde gerilim kuvveti uygulamak için birlikte çalışırlar. Kapilerden elektrik gücüyle damlacık ayrılırken polimer solüsyonunun viskoelastik ve yüzey gerilim kuvvetleri askıda duran damlacığın hemisferik biçimini korur. Uygulanan voltaj kritik bir değeri aştığı zaman, kapilerin ucunda damlacığın yüzey gerilimi elektrostatik güçlerle dengelenir, Taylor konisi oluşur. Sonuç olarak, bir fiber jeti koninin ucundan fışkırır ve topraklanmış toplayıcı boyunca hızlanır. Fiber çekme prosesini açıklamak için iki farklı model önerilmektedir: bir fiberin küçük fiberler halinde ek filamente uzaması ya da ayrılması. Bazı araştırmacılar tek fiber teorisinin rapor ettiği "Fiber jet kaotik bir kırbaçlamaya maruz kalır ve polimer jetindeki benzer yükler arasındaki itici etkileşimlerden dolayı toplayıcı boyunca hızlanırken yörüngesinde bükülmeler olur" görüşünü desteklemektedir. Bu prosesinde toplayıcıya olan mesafe ve geçiş süresinin artması çözücü buharlaşma ve fiber incelmesinde yardımcı olur. Son çalışmalar yüksek hızlı görüntüleme yardımı ile fiber jetinin stabil olmayan zonunu görüntülemiştir. Bu çalışmalar bir çarpma instabilitesinin tek bir fiberin dönme ve bükülmesine neden olduğunu açıklığa kavuşturmuştur, bu nedenle

fiber bölünmesinde doğru olmayan düşünceler vardır [197,198]. Son teknik gelişmeler ve prosesin daha iyi anlaşılması ile birlikte nanometreden birkaç mikrometreye kadar çaplı sürekli fiberler farklı fibröz düzeneklerinde materyalleri farklı kullanarak oluşturulabilmektedir. Ayrıca düzeneğin basitliği, bu yöntemi akademi de ve endüstride oldukça aktif kılmaktadır.

Elektroçirme ile üretilmiş malzemelerin hemostazda kullanımına yönelik olarak sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Son zamanlarda nanoteknoloji uygulamalarının hemostazda yaratacağı etki araştırılmaya başlanmıştır. Jiang ve arkadaşları yara yüzeyine saniyeler içerisinde hemostazı sağlamak için n-octyl-2-cyanoacrylate (OCA) ultra ince fiberler biriktirmek için in-situ hava akışı ile yönlendirilen bir elektroçirme metodu kullanmışlardır. *In-vivo* ve *in-vitro* deneyler domuz karaciğer reseksiyonunda kendiliğinden düzenlenmiş OCA elektroçirilmiş membranların yüksek güce, iyi elastikiyete ve integriteye sahip olduğu görülmüştür [199].

Gu ve arkadaşları 2013'de yayınladıkları çalışmada nanofibröz hemostatik malzeme geliştirmek için kitosanı kullanmışlardır. Asidik kitosanın suda çözünürlüğünden dolayı, farklı alkalın solüsyonları optimum nötralizasyon şartı sağlayabilmek için tanımlanmıştır. Nötralize edilmiş kitosanın por boyutu ve kalınlığı ultra sonikasyon kullanılarak kontrol edilmiştir. Kanı pıhtılaştırma etkinliği kitosan sponge ve Surgicel'dan 1.35-3.41 kat daha iyi bulunmuştur [200].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Materyal ve Yöntemler

Tez çalışmalarında kullanılan *A. xylinum* ATCC 10245 Amerika Birleşik Devletleri, Tarımsal Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu'nda, Agricultural Research Service Culture Collection, ARS, USA) liyofilize formda temin edilmiştir. Bakteriyel selüloz üretimi için Hestrin-Schramm (HS) besi ortamı kullanılmıştır [201]. Kitosan 100 (moleküler ağırlığı 150,000 ve deasetilasyon derecesi %75-85, Sigma, USA) Protamin HCl (5000IU/5 ml), kaolin (Aluminum silicate hydroxide, Sigma) ve vitamin K (Konakion,10 mg/mL) temin edilmiştir. Elektrosin solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan trifloroasetikasit (TFA) Sigma, Almanya'dan satın alınmıştır.

Hazırlanan hemostatik örtü malzemelerinin karakterizasyonunda Fourier Transform IR spektrofotometresi (Perkin Elmer SpectrumOne, Nicolet 520, USA), atomik kuvvet mikroskobu (High Performance AFM Head, Nanomagnetics, Türkiye) ve taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JSM7000F, ABD) kullanılmıştır.

Hazırlanan kanama durdurucularının in vitro pıhtılaşma testleri Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanların kanları %3.8 sodyum sitrat içeren mavi kan tüplerine alınarak hemen çalışılmıştır.

#### 3.2. Bakteriyel Selüloz Üretimi

##### 3.2.1. *Acetobacter xylinum* Stok Kültürü

ATCC'den temin edilen liyofilize formdaki *Acetobacter xylinum* bakterisi Çizelge 3.1'de yer alan 100 ml besiyeri içerisine açıldıktan sonra 30 °C' de, 150 rpm karıştırma hızında 24 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri 1 M hidroklorik asit ve 1 M NaOH ile pH 5'e ayarlandıktan sonra 110 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *Acetobacter xylinum* bakterisinin stok besi yeri.

Besi Yeri İçeriği	
Glikoz	25 g/L
Pepton	3 g/L
Maya özütü	5 g/L

*Acetobacter xylinum* bakterisinden stok hazırlamak için Çizelge 3.1'de verilen besi yerinde üretilen bakteriler 1'er mL ependorf tüpler içerisine konularak % 10 steril gliserol eklenmiştir. Hazırlanan bakteri stokları vortekslenerek daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.2. Bakteriyel Selüloz Polimer Ortamı

Bakterinin ana üretimi için Çizelge 3.1'de verilen besi yeri hazırlanır ve 1 M hidroklorik asit ve 1 M NaOH ile pH 5'e ayarlandıktan sonra 110 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Stok olarak hazırlanmış -80 °C'de korunan *Acetobacter xylinum* bakterisinden besiyerlerine öze ucu ile ekim yapılarak 30 °C' de, 150 rpm karıştırma hızında 24 saat inkübe edilmiştir.

Bu çözelti aşı çözeltisi olarak kullanılmıştır. Bakteriyel selüloz üretimi için ise Çizelge 3.2'de verilen besi ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan içeriğin pH'ı 5'e ayarlanarak 30 °C'de durgun kültürde bakteriyel selülozun oluşumu gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2.** *Acetobacter xylinum* bakterisinin polimer ortamı.

Besi Yeri İçeriği	
Glikoz	20 g/L
Pepton	10 g/L
Maya özütü	10 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 mM

Üretilen bakteriyel selülozun saflaştırma işlemi için 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır. 80 °C'de NaOH solüsyonu içerisinde 5 saat boyunca bekleyen bakteriyel selüloz içerisindeki bakteri hücreleri parçalanmakta ve sulu çözelti fazına

geçmektedir. Ortamdaki safsızlıkları gidermek için bakteriyel selüloz distile su ile birkaç kez yıkanmıştır. Doku iskelesi hazırlama işlemi öncesi kurummasını engellemek için saf suda bekletilmiştir.

### 3.3. Bakteriyel Selüloz (BS) /Kitosan (KTS) Hemostatik Ajanların Hazırlanması

BS/KTS doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle % 1 asetik asit içerisinde % 2'lik kitosan solüsyonu hazırlanmıştır. BS/KTS oranı 2 g/mL olacak şekilde, solüsyon bir homojenizatör (IKA T18 UltraTuraks, Almanya) yardımı ile iyice karıştırılmıştır. Sonrasında bu karışıma 0.5 g CaCl<sub>2</sub> eklenerek tekrar homojenize edilmiştir. Böylece saf BS/KTS doku iskeleleri hazırlanmıştır. Modifiye edilmiş BC/KTS doku iskelelerinin hazırlanması için gerekli olan bileşenler ve oranları Çizelge 3.3' de verilmiştir. Kao/BS/KTS doku iskelelerinin hazırlanması için yukarıdaki hazırlanan karışıma 1 g kaolin eklenmiştir. Protamin sülfat (PS/BS/KTS) ve Vitamin K (Vit K/BS/KTS) kompozit doku iskelelerinin hazırlanması için ise saf bileşime sırasıyla 1 mL protamin sülfat ve 5 mL Vitamin K eklenerek karışımın homojen olması sağlanmıştır.

**Çizelge 3.3.** Saf BS/KTS ve modifiye kompozit hemostatik ajan bileşenlerinin miktarları.

Deney grupları	CaCl <sub>2</sub>	Kaolin	Vitamin K	Protamin Sülfat
BS/KTS	0.5 g			
SF kaplı BS/KTS	0.5 g	-	-	-
SF/PC kaplı BS/KTS	0.5 g	-	-	-
SF kaplı Kao/BS/KTS	0.5 g	(g/14g/7mL)		-
SF kaplı Vit K/BS/KTS	0.5 g	-	(mg/1.4 g/ 0.7mL)	-
SF kaplı PS/BS/KTS	0.5 g	-	-	(1000 IU/14g/7mL)

Farklı bileşimlerde hazırlanan hemostatik ajanlar 24 kuyucuklu polistiren doku kültür kaplarına konularak (2 g) – 80 °C'de (Revco ULT390–5-V31, USA) bir gece boyunca dondurulmuştur. Katılaştıran karışım 24 saat boyunca liyofilizatörde (CHRIST ALPHA 2-4LD, Germany) kurutulmuştur. Hazırlanan BS/KTS doku iskelelerinin sulu ortamdaki stabilitesini sağlayabilmek için kitosanın çapraz bağlama işlemi 70 °C sıcaklığındaki etüv

içerisinde epiklorohidrin (1-chloro-2, 3-epoxypropane) buharı altında gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Morfolojik Karakterizasyonlar**

#### **3.4.1. ATR-FTIR Spektroskopisi**

BS/KTS doku iskeleleri çapraz bağlanma reaksiyonu öncesi ve sonrası Fourier Transform IR spektrofotometresi (Perkin Elmer SpectrumOne, Nicolet 520, USA) ile karakterize edilmiştir. Ayrıca saf bakteriyel selülozun ve kitosanın da spektrumları karşılaştırma yapabilmek için alınmıştır.

Üst nanofibriler katman için hazırlanan saf ipek fibroin (SF) ve ipek fibroin/fosfatidilkolin (SF/PC) nanofibriler tabakaların da spektrumları alınarak karşılaştırılmıştır. Tüm spektrumlar  $4.000-500 \text{ cm}^{-1}$  aralığında alınmıştır.

#### **3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu**

Tez çalışmalarında hazırlanan saf bakteriyel selüloz, BS/KTS hemostatik ajanlar ve bunların kaolin, protamin sülfat ve vitamin K kombinasyonlarının karakterizasyonları taramalı elektron mikroskopisi (SEM) tekniği ile gerçekleştirilmiştir (JEOL, JSM7000F, ABD). Ayrıca hazırlanan poröz hemostatik ajanların üzerinin nanofibriler örtü ile kaplanmasında kullanılacak olan nanofibriler fosfatidilkolin ve ipek fibroinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Ortalama ipek fibroin ve fostatidilkolin fiber çapları görüntü işleme programı kullanılarak hesaplanmıştır (ImageJ, NIST). Nanofiber-poröz doku iskelesi enine kesit görüntüsü alabilmek için örnek sıvı nitrojene 10 dakika boyuna daldırılmış ve keskin bir bıçak yardımıyla kesilerek enine kesit elde edilmiştir. Tüm SEM incelemeleri için örneklerin yüzeyi altın ile 15 kV'da 5 dakika boyunca 5 nm kalınlığında kaplanmıştır.

#### **3.4.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu**

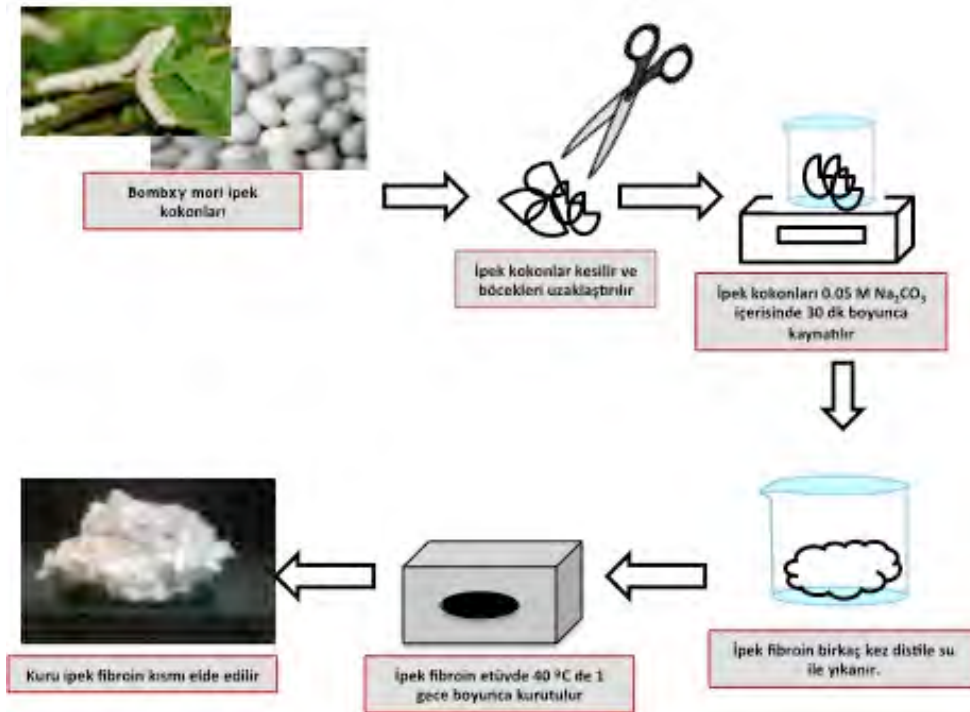
Liyofilizatörde kurutulan bakteriyel selüloz AFM görüntüsü için mika yüzey üzerine konmuştur. Görüntüler mika yüzey üzerinde, havada tapping modda AFM (High

Performance AFM Head, Nanomagnetics, Türkiye) ile alınmıştır. Eğim derecesi 5-10 nm, yay sabiti 1-5 N/m olan yumuşak silikon kantilever kullanılmıştır.

### 3.5. Elektroğırme Düzenegi

#### 3.5.1. İpek Fibroin Eldesi

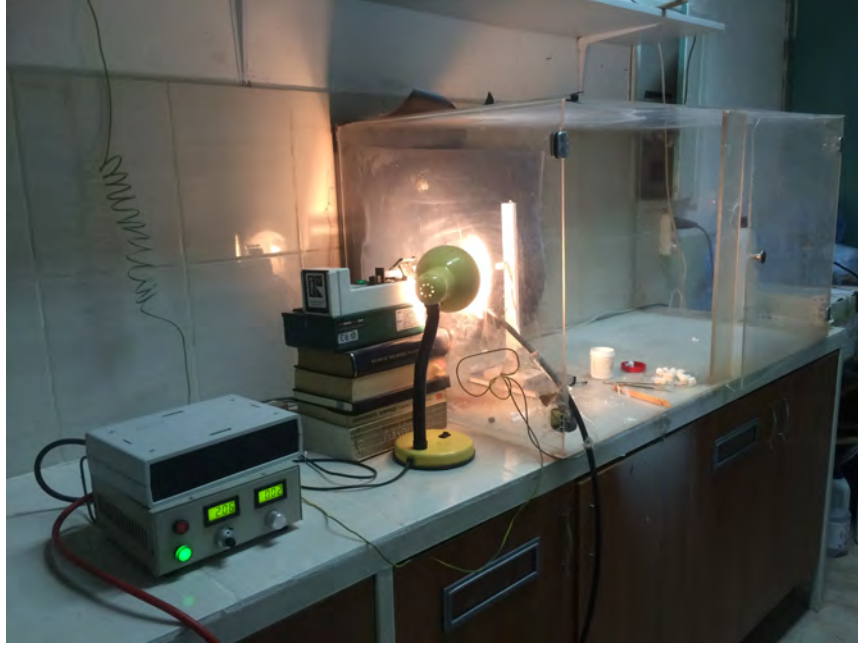
İpek fibroin kokonlarının sakızının giderilmesi yerleşmiş protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir [202]. Bombyx mori (Kozabirlik, Bursa, Türkiye) ipek kokonları küçük parçalara ayrılarak 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  içerisinde 30 dakika boyunca tutkal benzeri serisin dış tabakasının uzaklaştırılması için kaynatılır. Elde edilen ipek fibroin kısmı distile su ile yıkanarak 1 gece boyunca etüvde 40°C'de kurutulur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İpek kokonlarından ipek fibroin eldesinin şematik gösterimi.

### 3.5.2. BS/KTS Poröz Hemostatik Ajanlar Üzerine SF ve SF/PC Elektroeğirme Prosesi

Elektroeğirme düzeneği, bir yüksek gerilim güç kaynağı (Glassman Europe, Tadley, Birleşik Krallık), eğirme çözeltisini paslanmaz çelik iğneye ileten şırınga pompası (Harvard Apparatus, Edenbridge, Birleşik Krallık) ve metalik bir toplayıcıdan oluşmaktadır. Düzeneğin şematik gösterimi Şekil 3.2'de verilmiştir.



**Şekil 3.2.** Kullanılan elektroeğirme düzeneği.

BS/KTS hemostatik ajanların yüzeyinin nanofibriler ipek fibroin ile kaplanması için ajanlar toplayıcı üzerine monte edilmiştir. İpek fibroinin elektroeğirilmesi için % 12.5 (w/v)'lik ipek fibroin solüsyonu trifluoro asetik asit içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Proses parametresi olarak ipek fibroinin elektroeğirilmesi için optimum koşullar olarak; uygulanan elektriksel alan 20kV, akış hızı 0.4 ml/dk ve toplayıcı-iğne ucu arası mesafe 20 cm olacak şekilde ayarlanmıştır.

SF/PC kompozit elektroeğirme prosesi için trifluoro asetik asit içerisinde SF:PC oranı 5:1 (w/w) olacak şekilde elektroeğirme solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon için

proses parametreleri uygulanan elektriksel alan 16 kV, akış hızı 0.4 ml/dk ve toplayıcı-iğne ucu arası mesafe 20 cm olacak şekilde belirlenmiştir.

BS/KTS doku iskelelerinin yüzeyinin kaplanması için her iki solüsyonun yüzeyde 20 dakika boyunca elektroğrılması sağlanmıştır.

### **3.6. Porozite**

1 cm çapa sahip BS/KTS doku iskelelerinin ortalama por çapı ve yüzde olarak porozitesi civalı porozimetre (Quantachrome Corporation, Poremaster 60, Amerika) yardımıyla ölçülmüştür. Civalı porozimetreler, tepkimeye girmeyen, ıslatımsız bir sıvının yeterli basınç uygulanmadıkça küçük gözeneklere giremeyeceği fiziksel prensibine göre çalışmaktadırlar. Uygulanan basınç ile gözenek çapı arasındaki ilişki Washburn denklemi ile elde edilmektedir:

$$D = (-4\gamma \cos\theta) / P$$

Burada P uygulanan basınç, D gözenek çapı,  $\gamma$  cıvanın yüzey gerilimi (480 dyne/cm) ve  $\theta$  cıva ile gözenek duvarı arasındaki kontak açısıdır (genellikle 140°).

Ölçümler düşük basınçta (50 psi'a kadar) alınmıştır. 200-4  $\mu$ m çap aralığı analiz edilebilmiştir.

### **3.7. Mekanik Test (Basma Testi)**

BS/KTS doku iskelelerinin mekanik testleri universal test cihazı (Zwick, 250 kN, Amerika) kompresyon modunda gerçekleştirilmiştir. Dondurup kurutulmuş 1 cm çapında ve 1 cm yüksekliğindeki silindir şeklindeki hemostatik ajanlar silindirik eksene paralel olarak kompresyon altında 10 mN/dk'da test edilmiştir.

Kompresyon gücü iki quartz kristal paralel plakanın arasına yerleştirilen test örneğinin merkezinde görev yapacak bir prob kullanılarak uygulanmıştır. Kompresyon testleri kuru (ortam koşullarında) ve ıslak (PBS içerisinde, 37 C'de) BS/KTS doku iskeleleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hemostatik ajanlar PBS içerisinde (pH=7.4, 37 C'de) testin 30 dakika öncesine kadar bekletilir. Uygulanan kuvvete karşı %

deformasyon eğrisi çizilmiş ve kompresiv elastik modulus ( $E^*$ ) tüm hemostatik ajanlar için tanımlanmıştır. Basma testleri her grup için üç tekrarlı yapılmış olup ortalama değerler alınmıştır.

### **3.8. BS/KTS Hemostatik Ajanların PBS Absorblama Özellikleri**

BS/KTS doku iskelelerinin PBS alım çalışmaları, hemostatik ajanların (n=3) 37 °C'de fosfat tampon içerisinde (PBS, pH 7.4) 10 gün boyunca inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Farklı ağırlıklardaki BS/KTS hemostatik ajanların kuru ağırlıkları alınarak 10 mL'lik PBS solüsyonunun içerisine daldırılmıştır. PBS solüsyonu her gün yenilenmiştir. Önceden belirlenen zamanlarda, hemostatik ajanlar PBS solüsyonu içerisinden alınıp filtre kağıdı üzerine bırakılarak fazla suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hemostatik ajanların her gün tartımları yapılarak tekrardan PBS solüsyonu içerisine bırakılmıştır. Su alım oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Su alımı (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100\%$$

Bu eşitlikteki  $W_w$  hemostatik ajanların ıslak ağırlıkları,  $W_d$  ise kuru ağırlıklarıdır.

### **3.9. Hemostatik Ajanların Koagülasyonun Plazmatik Fazı Üzerindeki Etkisi (aPTT/ PTZ)**

Klinik standart koagülasyon testleri (protrombin zamanı (PTZ) ve aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) yarı otomatik bir koagülasyon cihazı (Diagnostica Stago, Start 4, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma 250-300 g ağırlığındaki dişi Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan alınan kan ile yapılmıştır. % 3.8 sodyum sitratlı tüpler üzerine alınan kanlar 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plateletce fakir plazma (PPP) elde edilmiştir. Her bir test için, örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde 1 mL PRP ile 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. PTZ testi için, 100 µL reaktif ve doku iskelelerinin inkübasyon ortamından alınan 50 µL numune test tübüne koyularak ölçüm alınmıştır. aPTT testi için 50 µL reaktif ve 50 µL numune test



tüpüne koyularak 180 saniye beklenmiş ve 50 µL 0.025 mol/L CaCl<sub>2</sub> test tüpüne eklenerek ölçümler alınmıştır.

### 3.10. Platelet Yapışma Testi

Platelet yapışması laktat dehidrogenaz testi kullanılarak tanımlanmıştır. Deney öncesinde, 250-300 g ağırlığındaki dişi Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan % 3.8 sodyum sitratlı tüpler üzerine alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plateletce zengin plazma (PRP) elde edilmiştir. Hazırlanan hemostatik ajanlar 1ml PRP ile 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir (n=3). 1 saatin sonunda başka bir tüpe alınan hemostatik ajanlar üzerine yapışan trombositler 0.25 mL %1'lik Triton X-100 ile parçalanmıştır. 10 dakika boyunca bekletildikten sonra lizatin, LDH kiti kullanılarak (Sigma-Aldrich, USA) laktat dehidrogenaz aktivitesine bakılmıştır. 450'nm de spektrofotometrik (Nanodrop Spektrofotometre, Thermo Sci.) ölçüm alınarak LDH konsantrasyonları tanımlanmıştır.

Hazırlanan hemostatik ajanların üzerine yapışan trombosit morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM, JEOL, JSM7000F, ABD) ile değerlendirilmiştir. Örnekler aynı miktardaki trombositçe zengin plazma ile 1 saat 37 °C'de muamele edilmiştir. Daha sonra % 2.5 glutaraldehid ile 1 saat fikse edilerek bir seri ethanol solüsyonundan geçirilmiştir (% 25, 50, 75, 90 and 100). Sonrasında örnekler hekzametildisilazan ile dehidre edilmiştir. Örnekler kurutulduktan sonra, SEM görüntülemesi için altın/palladyum karışımı ile kaplanmıştır.

### 3.11. İn-vitro Sağlıklı Tam Kan ve PRP Absorblama Oranı

Malzemelerin absorpsiyon verimliliği sağlıklı tam kanda ve PRP'de örneklerin ağırlığı başına maksimum sıvı absorpsiyonun ölçülmesi ile tanımlanmıştır. Öncelikle örneklerin ilk ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir ( $W_{kuru}$ ), daha sonra 250-300 g ağırlığındaki dişi Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan % 3.8 sodyum sitratlı tüpler üzerine alınan kandan 2 mL örnekler üzerine pipetlenmiştir. Filtre kağıdı ile fazla sıvı uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin yaş ağırlıkları tartılmıştır ( $W_{islak}$ ). Aynı prosedür tam kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen plateletce zengin plazma (PRP) içinde

izlenmiştir. Örneklerin absorpsiyon oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Absorpsiyon oranı (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100\%$$

Bu eşitlikteki  $W_w$  hemostatik ajanların ıslak ağırlıkları,  $W_d$  ise kuru ağırlıklarıdır. Her absorpsiyon deneyi için üç tekrarlı çalışılmıştır.

### 3.12. Hayvan Modelinde Hemostaz

Hazırlanan hemostatik malzemelerin hayvan uygulamaları için planlanan deney grupları aşağıdaki çizelge de belirtilmiştir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** Hayvan uygulamaları için oluşturulan deney grupları.

<b>Hemostatik Ajanlar</b>	
1	Kontrol grubu (Standart gazlı bez)
2	BS/KTS: Herhangi bir hemostatik etken madde ile modifiye edilmemiş BS/KTS poröz yapı (n=8)
3	SF kaplı BS/KTS: İpek fibroin nanofibriler yüzey ile kaplanmış BS/KTS poröz yapı (n=8)
4	SF/PC kaplı BS/KTS: İpek fibroin/fostatidilkolin nanofibriler yüzey ile kaplanmış ile BS/KTS poröz yapı (n=8)
5	SF kaplı Kao/BS/KTS: İpek fibroin nanofibriler yüzey ile kaplanmış kaolin katkıli BS/KTS poröz yapı (n=8)
6	SF kaplı Vit K/BS/KTS: İpek fibroin nanofibriler yüzey ile kaplanmış vitamin K katkıli BS/KTS poröz yapı (n=8)
7	SF kaplı PS/BS/KTS: İpek fibroin nanofibriler yüzey ile kaplanmış protamin sülfat katkıli BS/KTS poröz yapı (n=8)

Kontrol grubu olarak baz alınacak standart gazlı bez grubu diğer grupların ortalama ağırlıkları ile aynı olacak şekilde tartılarak hazırlanmıştır (Şekil 3.3)

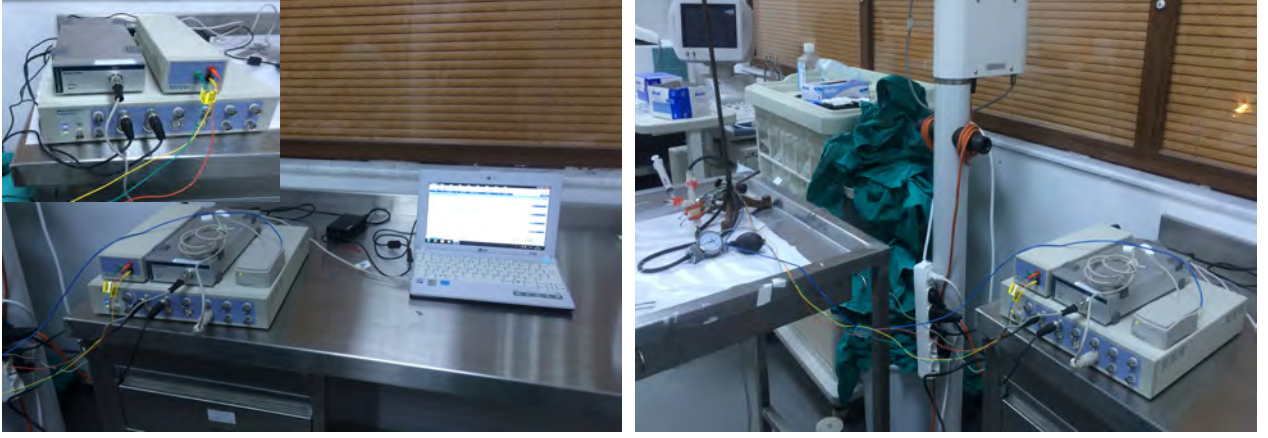


**Şekil 3.3.** Kontrol grubu olarak hazırlanan standart gazlı bezler.

Bu çalışma için toplam 117 adet ortalama 350-400 g Spraque Dawley cinsi dişi erişkin sıçan ayrılmıştır. Bunlardan 5 tanesi esas çalışma öncesi yapılacak pilot çalışmada kullanılmıştır. Hazırlanan hemostatik malzemelerin hayvan uygulamaları için iki model öngörülmüştür. Birinci modelde, 56 tane sağlıklı hayvanda femoral arter kanama modeli oluşturulmuştur, geriye kalan 56 hayvanda ise diyabet modeli oluşturularak yine femoral arterde kanama oluşturularak hemostatik malzemeler test edilmiştir.

### **3.12.1. Sağlıklı Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli**

Her iki tip kanama modelinde, deney süresince hayvanlar monitörize edilmiştir. Kan basıncı için karotis kanüle edilerek kan basıncı değerleri alınmıştır (Powerlab Bridge Amplifier, USA). Kalp ritmi değerleri ise hayvana yerleştirilen elektrotlar yardımı ile toplanmıştır. Kan basıncı ve kalp ritmi değerleri bir dijital veri toplayıcı sistem (Powerlab, AD Instruments) aracılığıyla kayıt altına alınmıştır. Kullanılan sistem Şekil 3.4'de verilmiştir.



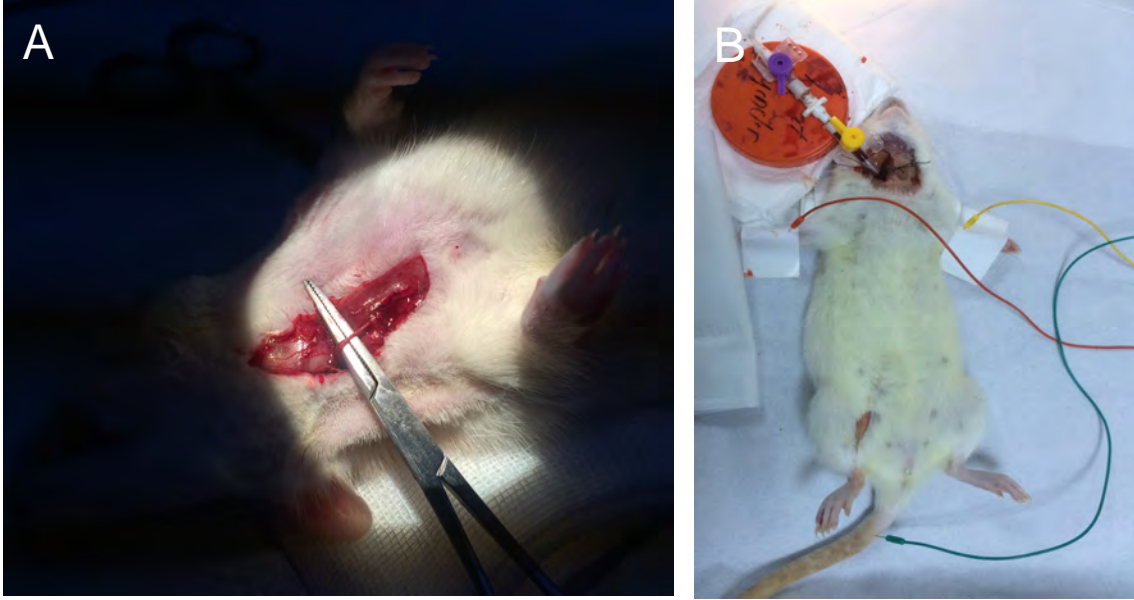
**Şekil 3.4.** Hayvanların monitörizasyonunda kullanılan dijital veri toplayıcı sistem.

Uygulama sırasında hayvanları kan gazı değerleri de (Gazlar: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BE (ecf), cSO<sub>2</sub>; Kimya: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, cTCO<sub>2</sub>, AGapK, Hct, cHgb; Metabolit: Glukoz, Laktat, Kreatin) takip edilmiştir (Epic Portable Vet Kan Gazı Cihazı, USA) (Şekil 3.5). Ayrıca deney sırasında deney gruplarının bir tanesinde aktif ajan olarak kullanılan kaolinin kanama bölgesinde oluşturduğu ısı dijital termometre ile (Sper Scientific Ltd, 2 Channel Type K/J - 800007) uygulama süresince ölçülmüştür.



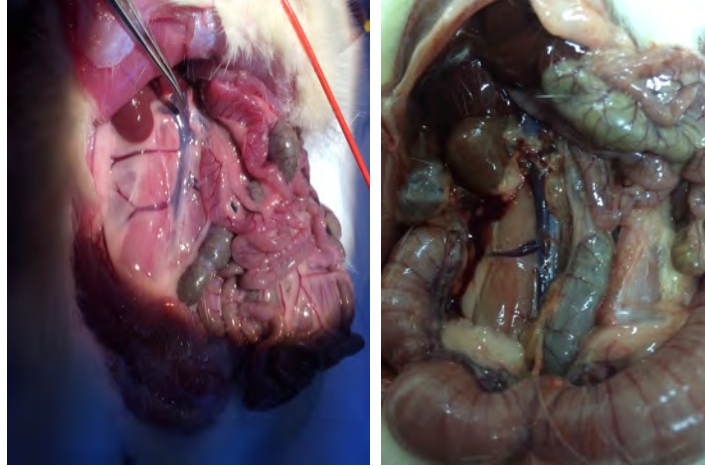
**Şekil 3.5.** Hayvanların kan gazı analizlerinde kullanılan portatif kan gazı cihazı.

Bu tip kanama modeli oluşturmak için hayvanlar deney öncesi standart diyetle beslenmiş ve deneyden bir gece önce besleme kesilerek sadece suya izin verilmiştir. Sıçanlar anestezi madde [ketamin/ksilazin, 2:1 (v/v)] ile uyutulmuştur. Sıçanların vücut sıcaklığı kontrol edilerek ısıtıcı lamba yardımı ile  $37\pm 0.5$  °C'de tutulmaya çalışılmıştır. Öncelikle karotis arterden hayvan kanüle edilerek kan basıncı değerleri alınmaya başlanmıştır. Elektrotlar da hayvan derisine tutturularak EKG değerleri kaydedilmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** Ratlarda kan basıncı ölçmek için kanülün yerleştirildiği karotis arter (A), kan basıncı ve EKG verilerinin alınması için yerleştirilen kanül ve elektrotlar (B).

Femoral arter kanama modeli için hayvanın pelvis bölgesinde bir kesi oluşturularak sağ femoral artere ulaşılmıştır (Şekil 3.7)



**Şekil 3.7.** Hemostatik ajanın uygulanacağı rat femoral arterin görüntüsü.

Sağ femoral arter 24 G'lik bir iğne yardımı ile delinmiş ve kanama oluştuktan sonra önceden ağırlığı bilinen hemostatik örtü malzemeleri, hemostatik ajanın içeriğinden haberdar olmayan bir uzman tarafından bölgeye uygulanmıştır. Her 30 saniyede bir hazırlanan hemostatik ajanların kanama bölgesindeki aktiviteleri kontrol edilerek 150 saniye sonrasında uygulamaya son verilmiştir. Hemostatik örtülerin uygulama sonrası yaş ağırlıkları da tartılarak kanama süreleri karşılaştırılmıştır. Uygulama sonunda hayvanların 1 saat boyunca hayatta kalma süreleri gözlemlenmiştir.

### **3.12.2. Diyabetik Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli**

Ratlarda diyabet oluşturmak için öncelikle hayvanlar tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Her bir hayvanın ağırlığına göre 45 mg/kg olacak şekilde taze sitrat tamponu (pH:4.5) içerisinde hazırlanan streptozisin çözeltileri bir gün öncesinden aç bırakılmış hayvanlara pelvis bölgesinden enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 3 gün sonra hayvanların kan şekeri değerleri ölçülmüştür. 250 mg/dL üzerindeki hayvanlar diyabetik olarak tanımlanmıştır.

Diyabet olan hayvanların da uygulama öncesinde karotis arteri açılarak kan basıncı değerleri ve elektrotlar yardımı ile elektrokardiyografisi alınmıştır. Kan gazı değerleri de uygulama sırasında ölçülmüştür. Sağlıklı hayvanlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli bu hayvalarda da oluşturulmuştur. Sağ femoral arter 24 G'lik bir iğne

yardımı ile delinmiş ve önceden ağırlığı tartılmış olan hemostatik örtü malzemeleri hemen kanama bölgesine uygulanmıştır. Uygulama hemostatik ajanın içeriğinden haberdar olmayan bir uzman tarafından yapılmıştır. Her 30 saniyede bir hazırlanan hemostatik ajanların kanama bölgesindeki aktiviteleri kontrol edilerek 150 saniye sonunda uygulamaya son verilmiştir. Hemostatik örtülerin uygulama sonrası yaş ağırlıkları da tartılarak gruplar arası total kan kaybı karşılaştırılmıştır. Uygulama sonunda hayvanların 1 saat boyunca hayatta kalma süreleri gözlemlenmiştir.

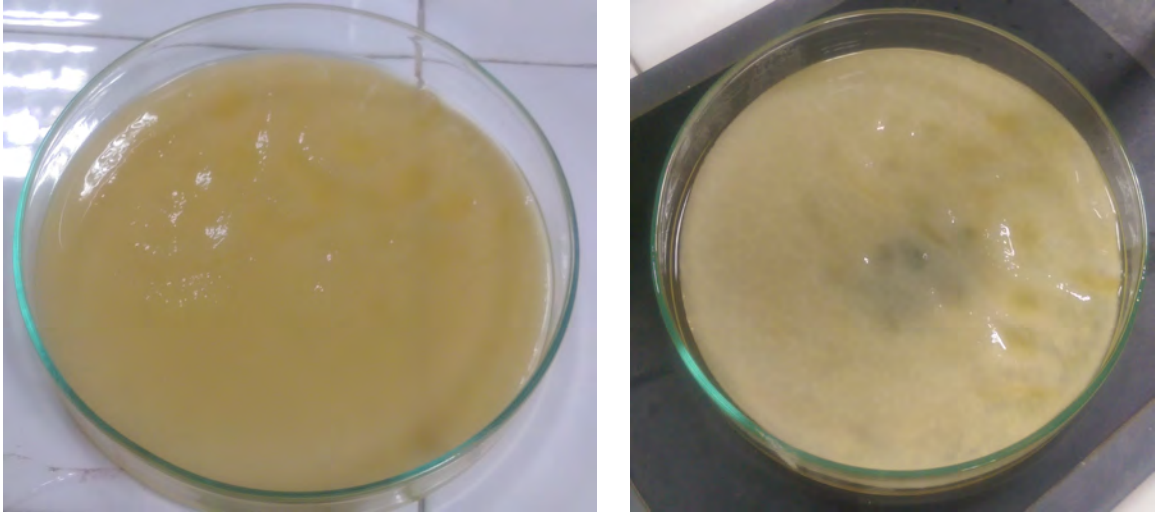
### **3.13. Histolojik İncelemeler**

Uygulama sonunda femoral arterin bir parçası uygulama yapılan taraftan alınmıştır. Bu dokular daha sonra parafine gömülmek üzere %10 formaldehid solüsyonunda fikse edilmiştir. Taze gönderilen dokulardan frozen cihazında kesit alındıktan sonra çözdürülen dokular rutin paraffin takip işlemi sonrasında hematoksilin-eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51-Floresan) incelenmiştir. Alınan kesitler nekroz, dejenerasyon ve inflamasyon cevabı bakımından incelenmiştir. Uygulama sonrası alınan kesitler, makrofaj varlığı kullanılan hemostatik örtülerin inflamasyon cevabı açısından değerlendirilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu

Hazırlanan tez kapsamında hemostatik ajanların hazırlanmasında kullanılacak olan bakteriyel selüloz "*Acetobacter xylinum*" bakterisi kullanılarak üretilmiştir. Bakterinin polimer ortamında ürettiği selüloz görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Selülozik fibriler yapı Hestrin-Schramm ortamının yüzeyinde kalın bir tabaka olarak elde edilmiştir.



**Şekil 4.1.** *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen selülozik fiber yapısı.

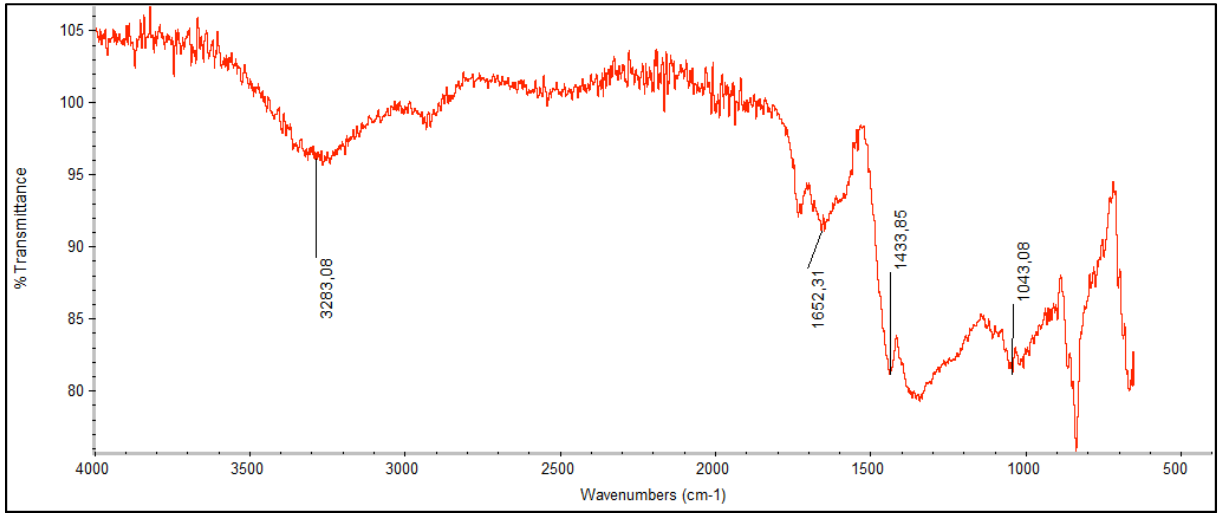
Bakteri artıklarını da içeren elde edilen bakteriyel selüloz seyreltik NaOH çözeltisi ve ısıya maruz bırakılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrası birkaç kez destile su ile yıkanarak bazik ortam giderilmiştir. Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen bakteriyel selüloz görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.





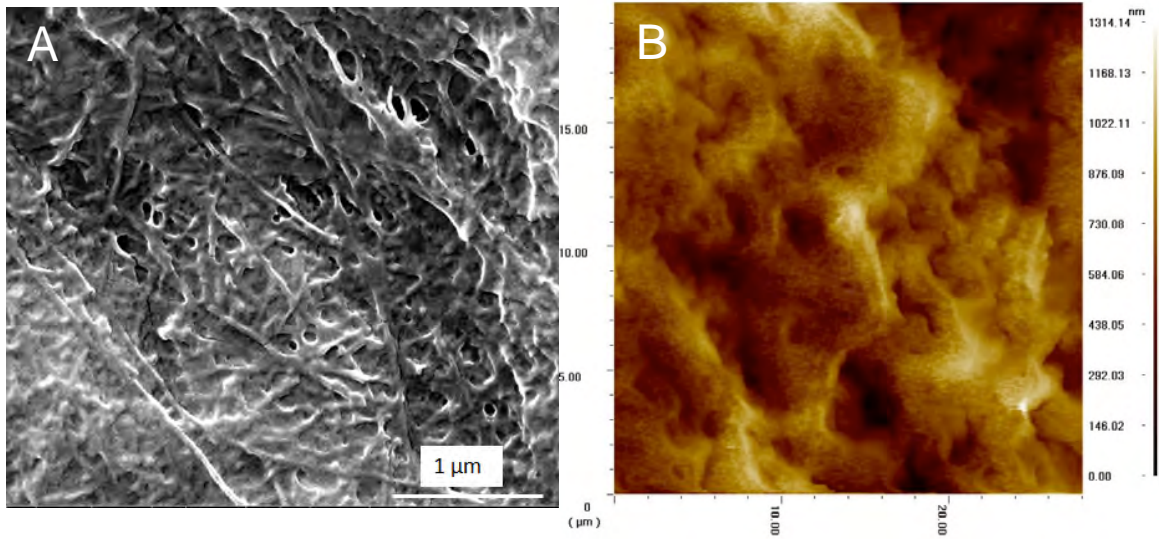
**Şekil 4.2.** Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen bakteriyel selüloz görüntüsü.

Bakteriyel selülozun karakterizasyonu ATR-FTIR ile yapılmıştır. Alınan spektrum Şekil 4.3'de verilmiştir. Hestrin-Schramm ortamında üretilerek elde edilen bakteriyel selülozun IR spektrumu  $3283\text{ cm}^{-1}$ 'de O-H gerinimini temsil eden güçlü bir absorpsiyon piki göstermiştir. Yine  $1652\text{ cm}^{-1}$ ,  $1433\text{ cm}^{-1}$  ve  $1043\text{ cm}^{-1}$ 'de sırasıyla COOH, karbonil grup ve C-O-C gerinimine ait olan pikler elde edilmiştir. Sun ve arkadaşları HS ortamında büyüyen *Acetobacter xylinum* bakterisinin ürettiği selülozun  $3400\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde IR spektrumu gösterdiğini rapor etmiştir [203].  $1644\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen güçlü pikin selüloz yapısındaki karboksilik asit (COOH) gruplarının varlığını doğruladığını göstermişlerdir.  $1428\text{ cm}^{-1}$ 'de elde edilen bandın ise BS'daki karbonil grubunun varlığına bağlamışlardır.  $1163\text{ cm}^{-1}$  ve  $1068\text{ cm}^{-1}$ 'deki bandlar BS'daki C-O-C fonksiyonun göstergesi olarak kaydedilmiştir. Bu veriler dikkate alındığında üretilen bakteriyel selülozun IR spektrumu literatürde elde edilen saf BS'nin spektrumu ile örtüşmektedir.



**Şekil 4.3.** Bakteriyel selülozun FTIR spektrumu.

Üretilen bakteriyel selülozun morfolojik yüzey karakterizasyonu ise SEM ve AFM ile yapılmıştır. Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi, elde edilen bakteriyel selüloz yapısı fibriller bir yüzey morfolojisi göstermektedir. Alınan AFM görüntüleri de yüksek yüzey alanı ile birlikte nanofiberlerin dağılımını desteklemektedir.

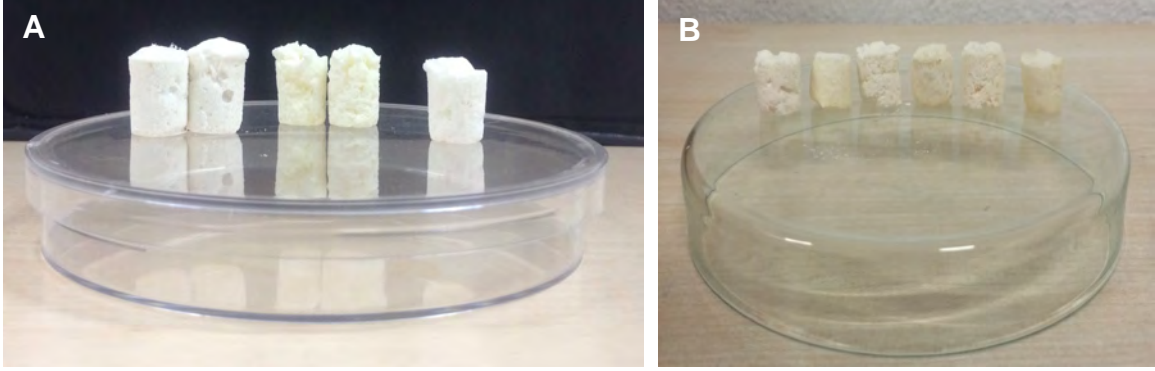


**Şekil 4.4.** A) BS'un taramalı elektron mikroskobu görüntüsü, B) atomik kuvvet mikroskobu görüntüsü.

#### 4.2. BS/KTS Hemostatik Ajanların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Üretilen BS, % 2'lik kitosan solüsyonu ve  $\text{CaCl}_2$  ile bir homojenizatör yardımı ile karıştırılıp dondurulup liyofilize edildikten sonra saf BS/KTS poröz doku iskeleleri hazırlanmıştır. Aynı şekilde sözü edilen bu karışıma hemostatik etken maddeler

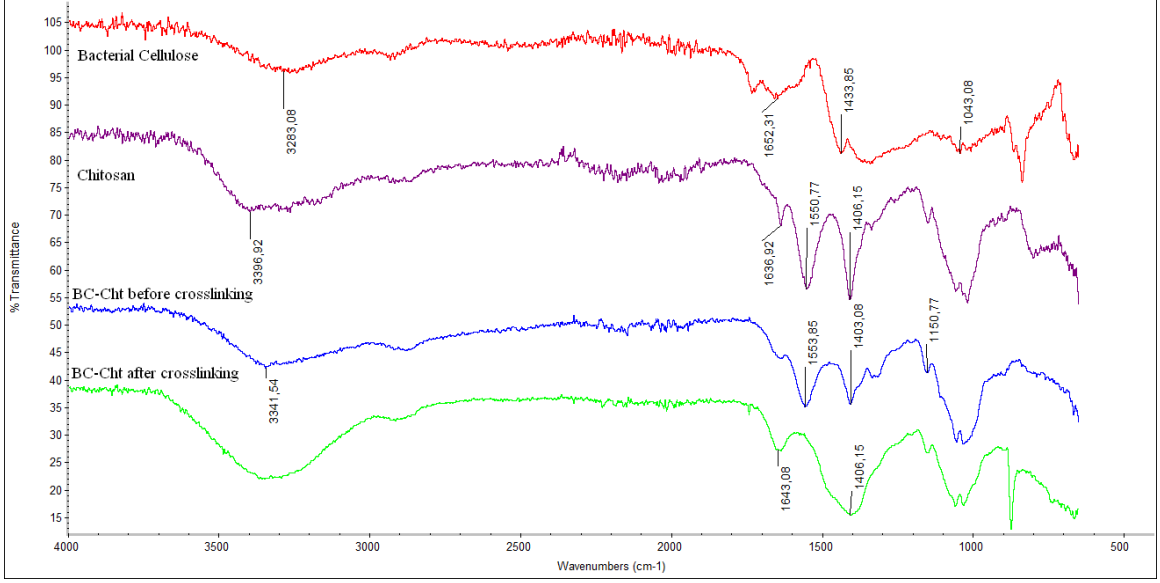
(Vit K, Kaolin ve PS) eklenerek kompozit hemostatik ajanlar da hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan hemostatik ajanların sulu ortamda stabilitesini sağlayabilmek için, ajanlar 70 °C'de 1 gece boyunca epiklorhidrin buharına maruz bırakılmıştır. Hemostatik ajanların çapraz bağlama öncesi ve sonrası alınan görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Liyofilize edilmiş BS/KTS hemostatik ajanlar; A) çapraz bağlanma öncesi, B) çapraz bağlanma sonrası.

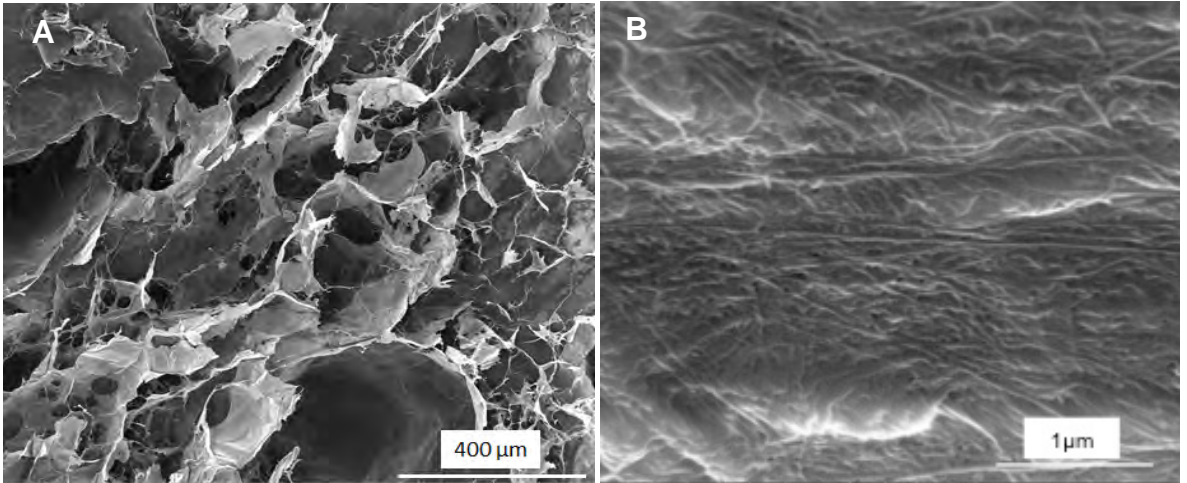
Hemostatik ajanların çapraz bağlama öncesi ve sonrası alınan görüntülerinden de anlaşılacağı üzere ECH buharı ile yapılan muamele hazırlanan yapıların morfolojisinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

Yapılan çapraz bağlama işleminin başarısı ATR-FTIR ile doğrulanmıştır. Hemostatik ajanların işlem öncesi ve sonrası IR spektrumları alınarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6). Bakteriyel selüloza özgü spesifik IR spektrumlarından 4.1'de bahsedilmiştir. Kitosan ise tipik bir IR spektrumunda 3396  $\text{cm}^{-1}$ , 1636  $\text{cm}^{-1}$ , 1550  $\text{cm}^{-1}$  ve 1406  $\text{cm}^{-1}$ 'de sırasıyla O-H; N-H; Amid I; Amid II; Amid III'e ait bandlar gösterir. BS/KTS kompozit hemostatik ajanın IR spektrumuna bakıldığında ise 3421  $\text{cm}^{-1}$ 'deki N-H gerinim bandı, O-H gerinim bandı ile kombine hale gelmiştir. Kitosanın yapıda varlığından dolayı 1632  $\text{cm}^{-1}$ , 1553  $\text{cm}^{-1}$  ve 1403  $\text{cm}^{-1}$ 'de sırasıyla Amid I, Amid II ve Amide III'e ait olan 3 yeni band gözlemlenmiştir [204]. Kitosanın ECH ile çapraz bağlama işlemi sonrası 1632  $\text{cm}^{-1}$ 'de bir amin deformasyonu olmuştur ve C-N gerinim bandındaki (1406  $\text{cm}^{-1}$ ) artış kitosanın  $\text{NH}_2$  gruplarındaki çapraz bağlanmayı desteklemektedir. Ayrıca C-O gerinimine karşılık gelen 1085  $\text{cm}^{-1}$ 'de elde edilen pik artmış ve genişlemiştir. Bu yüksek sıcaklıklar altında OH gruplarının çapraz bağlandığını göstermektedir [205].



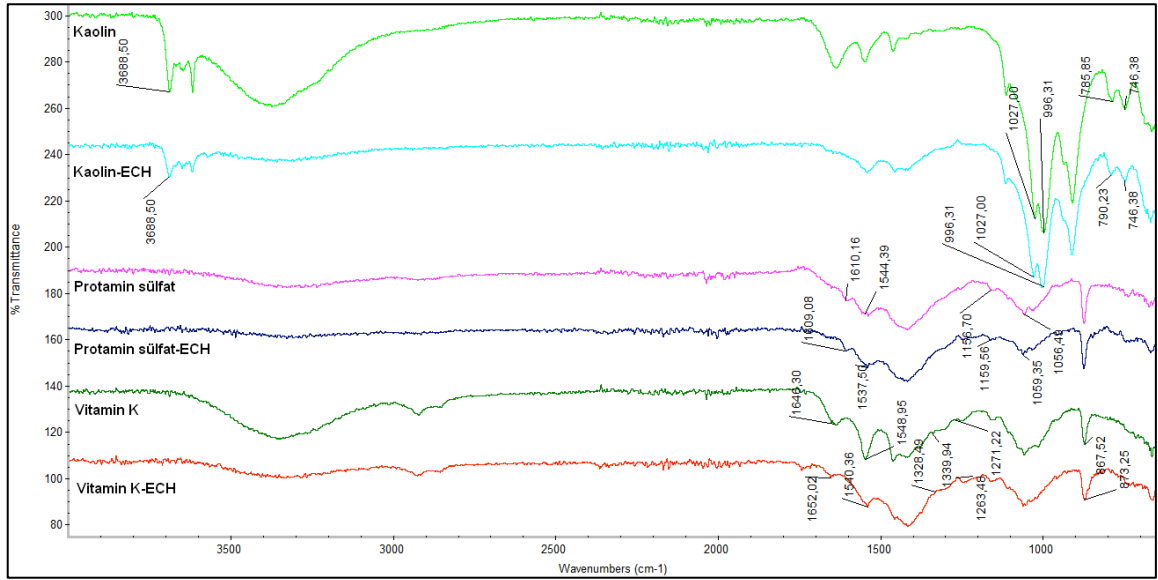
**Şekil 4.6.** Saf BS, KTS ve çapraz bağlanma öncesi ve sonrası BS/KTS hemostatik ajanların FTIR spektrumları.

Hazırlanan saf BS/KTS hemostatik ajanların morfolojik karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır (Şekil 4.7). Alınan SEM görüntülerinde açık ve birbiriyle bağlantılı bir por yapısı gösteren morfoloji elde edilmiştir. Şekil 4.7B'de iç duvar yapısının fibriller görüntüsü de alınmıştır. Ayrıca ECH buharı ile yapılan çapraz bağlama işleminin yapıda bir deformasyona neden olmadığı alınan görüntülerden de anlaşılmaktadır.



**Şekil 4.7.** Saf BS/KTS hemostatik ajanların SEM görüntüsü; A) Üstten alınan görüntü, B) İç duvar yapısının görüntüsü (Ölçek çubuğu: 400 ve 1 µm).

Şekil 4.8'de kaolin, vitamin K ve protamin sülfat katkı/BS/KTS hemostatik ajanların ECH buharı ile çapraz bağlanma öncesi ve sonrası FTIR spektrumları verilmiştir. Kaolin içeren grupta O-H gerinimine ait  $3688\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{SiO}_4$ 'deki SiO bandına ait  $1027$  ve  $996\text{ cm}^{-1}$ , Si-O simetrik gerinimine ait  $785$  and  $746\text{ cm}^{-1}$ 'de pikler alınmıştır [206]. Protamin sülfat içeren grupta ise  $1610$  and  $1544\text{ cm}^{-1}$ 'de primer aminlerin karakteristik bandları,  $1156$  ve  $1056\text{ cm}^{-1}$ 'de S=O simetrik ve asimetrik gerinim titreşimleri görülmüştür [207]. Vitamin K tipik bir FTIR spektrumunda ise C=O valens gerinimine ait  $1646\text{ cm}^{-1}$ ,  $1548$  ve  $1271\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik halkalara ait titreşimler ve  $1339\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O, C=C,  $867\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H komşu halkalardaki deformasyona ilişkin titreşimlere ait bandlar görülmüştür [208]. Çapraz bağlama işlemi sonrası da her grup için tipik pikler alınmıştır.



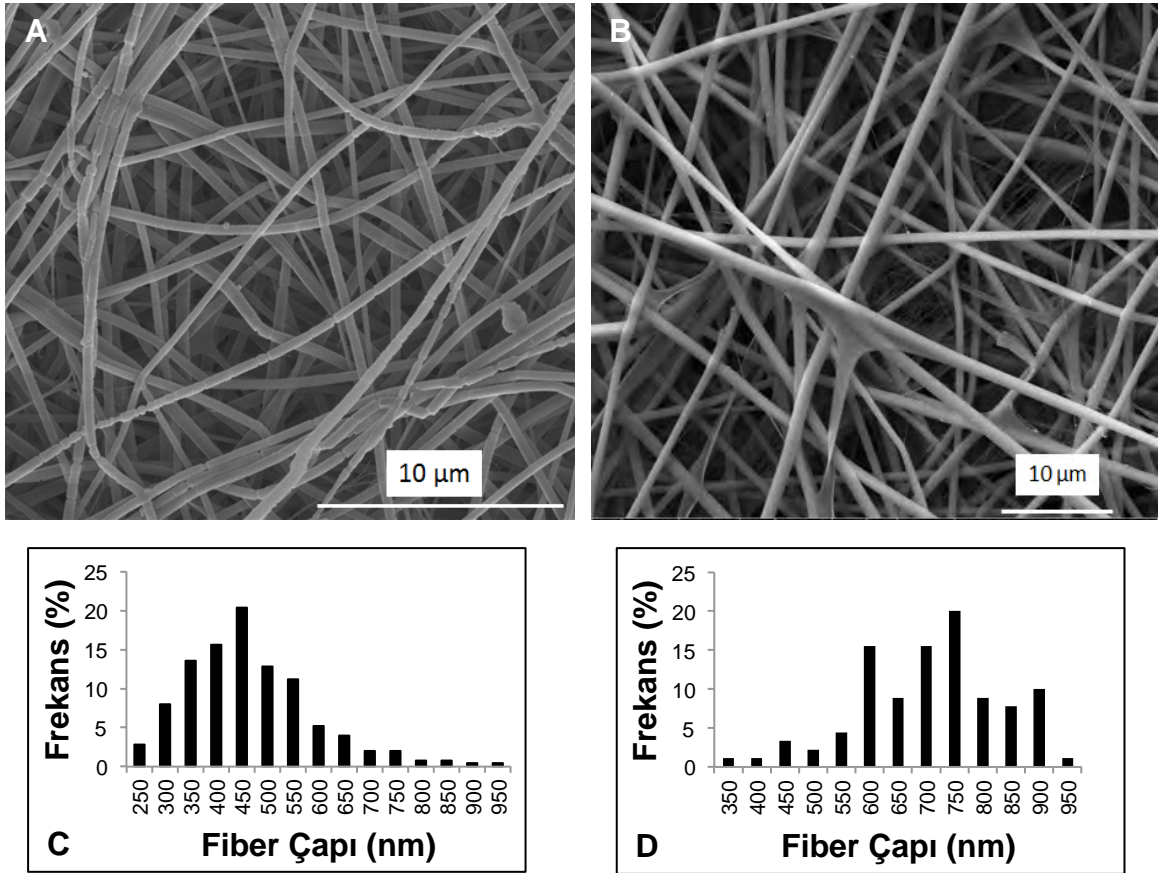
**Şekil 4.8.** Kaolin, Vit K ve PS katkı/BS/KTS hemostatik ajanların çapraz bağlanma sonrası FTIR spektrumları.

### 4.3. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Elektroeğirme ile Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

İpek fibroin kaplı BS/KTS, ipek fibroin/fosfatidilkolin kaplı BS/KTS ve yine ipek kaplı kompozit BS/KTS (Kao/BS/KTS, Vit K/BS/KTS, PS/BS/KTS) hemostatik ajanların hazırlanması için üretilen poröz yapıların yüzeyi elektroeğirme yöntemiyle kaplanmıştır. Kaplama öncesi saf ipek fibroin ve ipek fibroin/fosfatidilkolin

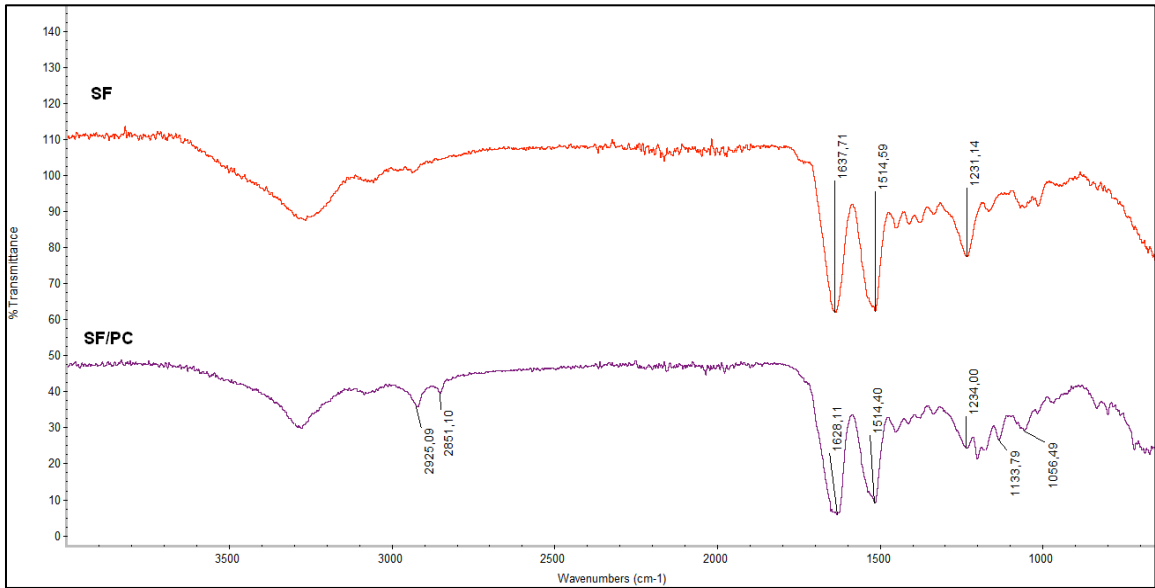
karışımının elektroğrilmesinden elde edilen SEM görüntüleri ve fiber çapı dağılımları Şekil 4.9'da verilmiştir.

Alınan SEM görüntülerinde hem saf SF hem de SF/PC karışımdan hazırlanan üst katman yapısında "bead" dediğimiz boncuksu yapıların varlığına rastlanmamıştır. Birbiriyle bağlantılı, poröz, defekt olmayan bir fiber morfolojisi elde edilmiştir. Elde edilen ortalama fiber çaplarına bakıldığında ise saf SF için ortalama çap 450 nm olarak bulunmuştur. Zhi Hai Fan ve arkadaşlarının 2011'de yapmış olduğu çalışmada da Schwann hücrelerinin biyokompatibilitesini araştırmak için hazırladıkları ipek fibroin doku iskelesinde ortalama çap 400 nm olarak rapor edilmiştir [209]. SF/PC nanofibriler tabakadaki ortalama çap ise 750 nm olarak bulunmuştur. Matthew ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmalarında lesitini tek başına spinleyerek kurtçuk şeklinde miseller halinde 1-5  $\mu\text{m}$  arası çaplara sahip olan bir fiber morfolojisi elde etmişlerdir [184].



**Şekil 4.9.** Saf SF (A, C) ve SF/PC (B, D) kompozit nanofibriler ajanların SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılımları (Ölçek çubuğu: 10  $\mu\text{m}$ ).

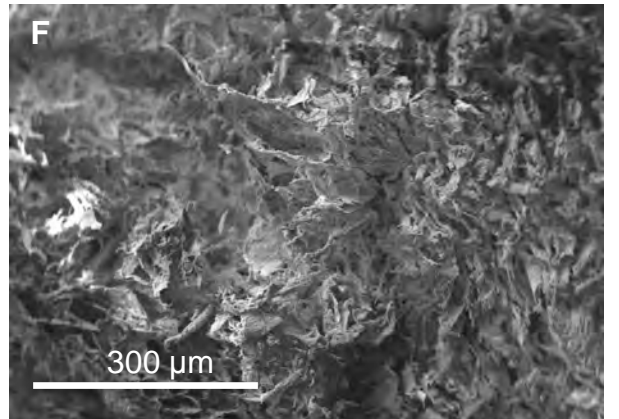
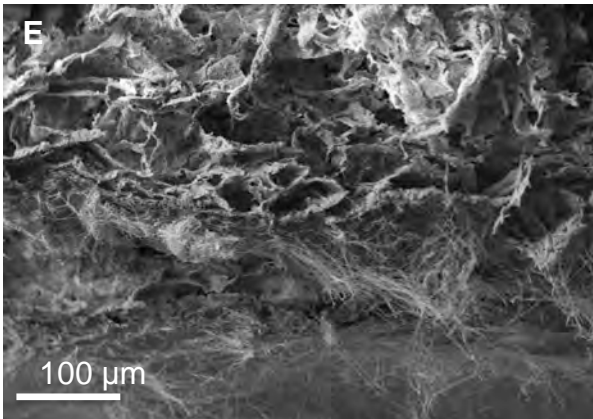
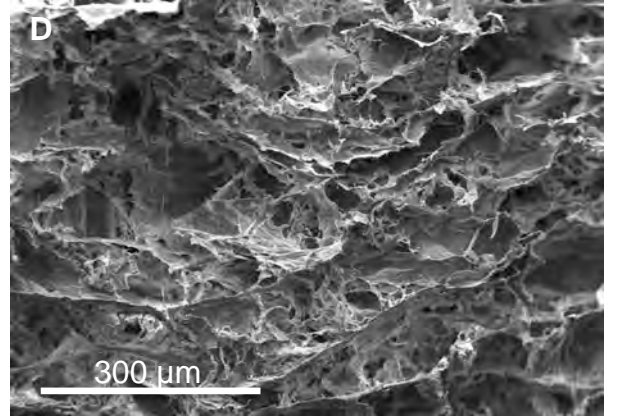
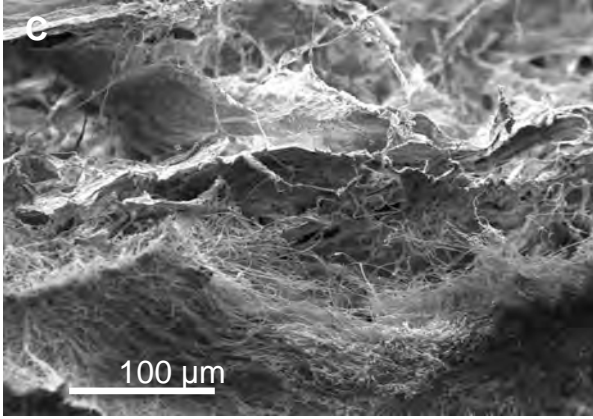
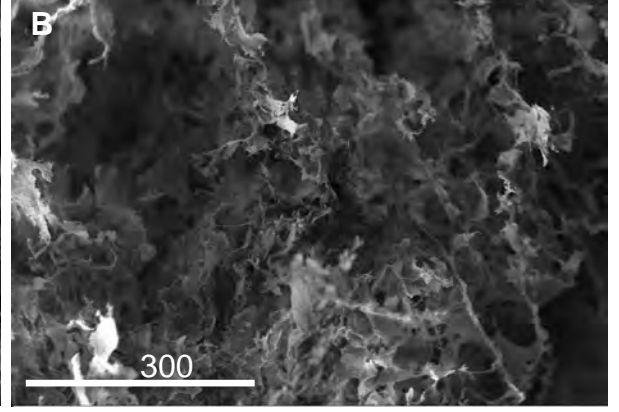
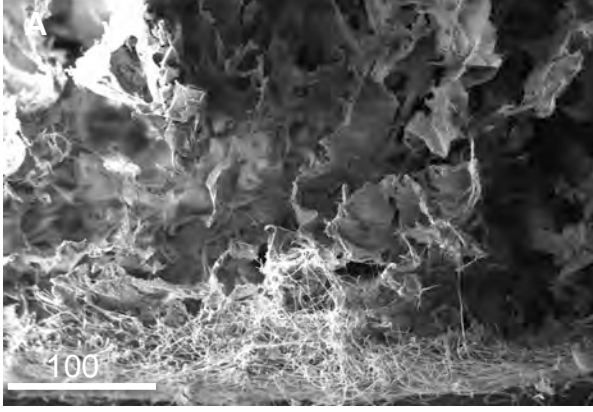
Üst katman malzemesi olarak seçilen SF ve SF/PC karışımının elektroçizme sonrası FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.10). Saf SF'in IR spektrumuna bakıldığında elde edilen pikler şöyledir; 1637  $\text{cm}^{-1}$  Amid I bandına ait spektrum, 1514  $\text{cm}^{-1}$ 'de Amid II spektrumuna ait bir band ve 1231  $\text{cm}^{-1}$ 'de Amid III bandına ait bir spektrum elde edilmiştir. Tipik olarak, silk fibroin yapısı sırasıyla N-H bükülmesi, C-H gerinimi ve C=O bükülmesi olmak üzere 3 karakteristik band gösterir; amid I ( $1700 \text{ cm}^{-1}$ - $1600 \text{ cm}^{-1}$ ), amid II ( $1540 \text{ cm}^{-1}$ - $1520 \text{ cm}^{-1}$ ) ve amid III ( $1300$ - $1220 \text{ cm}^{-1}$ ) [210].  $1600 \text{ cm}^{-1}$ 'de (Amid I) ve  $1515 \text{ cm}^{-1}$ 'de (Amid II) elde edilen bandlar ipek II yapısal konformasyonu (beta tabakalı yapı) simgelerken,  $1530 \text{ cm}^{-1}$  (Amid II) ve  $1229 \text{ cm}^{-1}$  (Amid III) ipek II konformasyonunu (random coil ve alfa heliks yapısı) resmetmektedir [211]. Elde edilen veriler ipek fibroine ait bütün spesifik bandların gözlemlendiğini göstermektedir. SF/PC yapısının IR spektrumuna bakıldığında ise C-H gerinimi,  $\text{PO}_2$  ve C-O-C'a ait spektrumlar sırasıyla  $2925$  ve  $2851 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1234$  ve  $1058 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1133 \text{ cm}^{-1}$ 'de elde edilmiştir. Bu veriler PC'e ait literatürde kaydedilen bandlar ile uyumaktadır [212]. Ayrıca karışımda yer alan ipek fibroin, kendine ait bandları da korumaktadır.



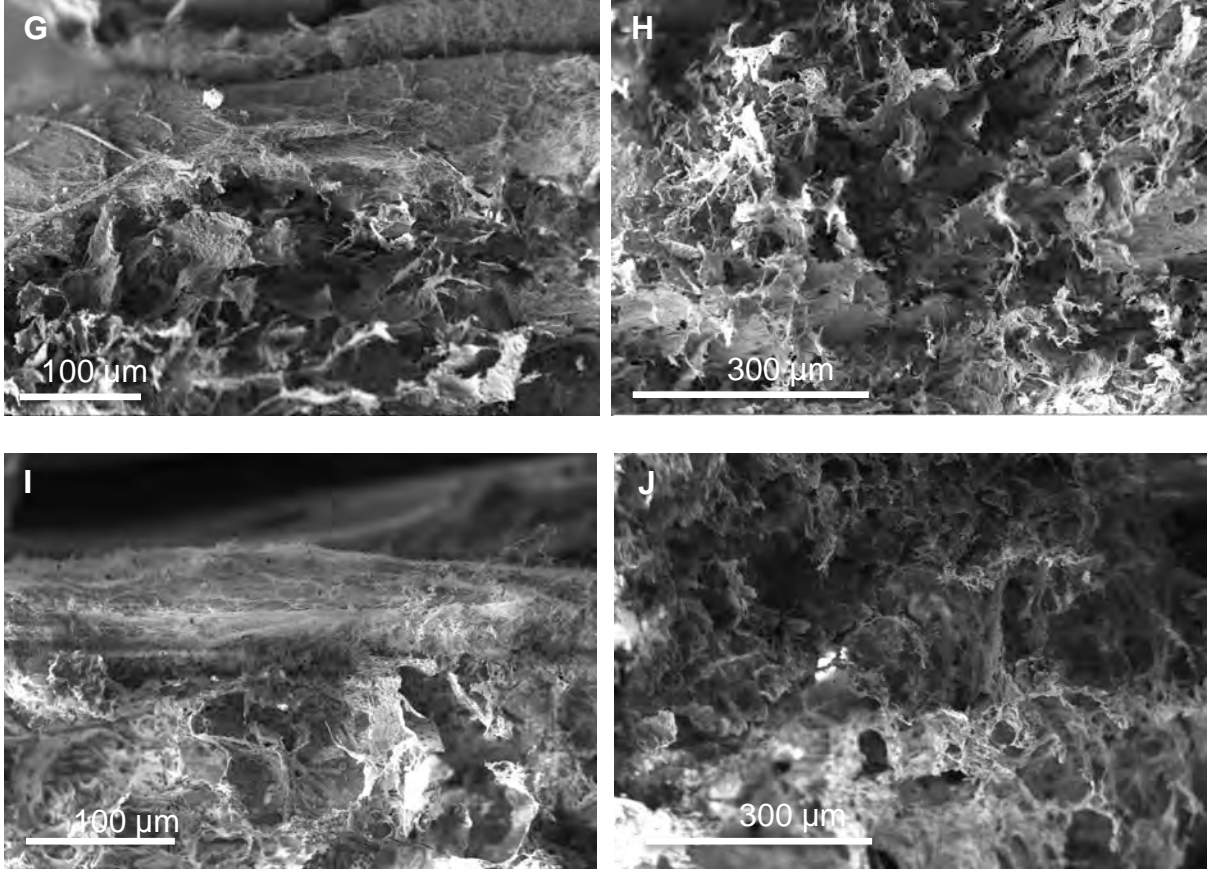
**Şekil 4.10.** Saf SF ve SF/PC kompozit nanofibriler ajanların FTIR spektrumu.

BS/KTS hemostatik ajanların nanofiber üst katman ve poröz alt katmandan oluşan bilayer görüntüsü SEM ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.11'de sol tarafta verilen görüntüler ajanların enine kesit görüntüleridir. İki tabakalı yapı bütün gruplarda görülmektedir. Nanofibriler SF ve SF/PC tabaka yapısı alt katman ile

bütünleşmiş durumdadır. BS/KTS poröz yapı görüntülerine bakıldığında ise dondurup kurutma prosesi sonrası tüm gruplarda yüksek derecede birbiriyle bağlantılı porlarla, açık bir por mikro yapısı elde edilmiştir.







**Şekil 4.11.** SF kaplı BS/KTS (A, B); SF/PC kaplı BS/KTS (C, D); SF kaplı Kao/BS/KTS (E, F); Vit K/BS/KTS (G, H) ve PS/BS/KTS (I, J) kompozit hemostatik ajanların SEM görüntüleri (sol görüntü bilayer tabaka görüntüsü, ölçek çubuğu: 100 µm; sağ görüntü alt poröz katman, ölçek çubuğu: 300 µm).

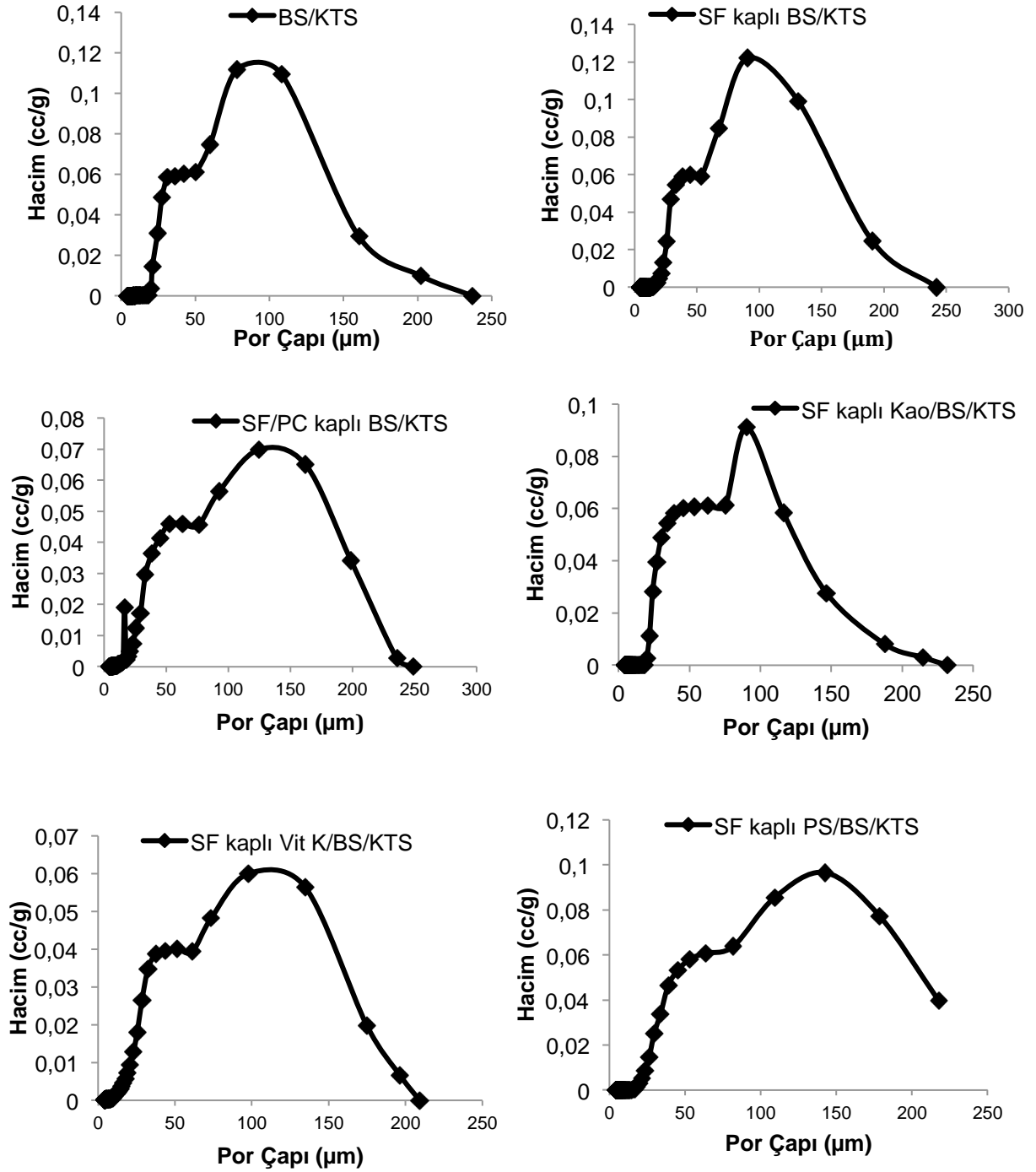
#### 4.4. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Poroziteleri

Hazırlanan saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların % porozite değerlerine ve ortalama por çapı dağılımlarına civalı porozimetre ile bakılmıştır. Alınan % porozite değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Değerlere bakıldığında gruplar arası % porozite değerleri yaklaşık birbirine yakındır. Protamin sülfat katkılı olan grupta porozite değeri %  $67 \pm 0.4$  olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların % porozite değerleri.

<b>Porozite (%)</b>	
<b>Deney Grupları</b>	<b>%</b>
<b>BS/KTS</b>	88±0.4
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	78±0.9
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	85±0.7
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	85±0.6
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	83±0.8
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	67±0.4

Hazırlanan grupların por çapı ( $\mu\text{m}$ ) histogramları ise Şekil 4.12'de verilmiştir. Tüm gruplarda por çapı 0-250  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. BS/KTS grubunda ortalama por çapı  $22\pm 0.4$   $\mu\text{m}$ , SF kaplı BS/KTS'de  $20\pm 0.3$   $\mu\text{m}$ , SF/PC kaplı BS/KTS'de  $26\pm 0.5$   $\mu\text{m}$ , SF kaplı Kao/BS/KTS'de  $24\pm 0.4$   $\mu\text{m}$ , SF kaplı Vit K/BS/KTS'de  $22\pm 0.4$   $\mu\text{m}$ , SF kaplı PS/BS/KTS'de  $21\pm 0.3$   $\mu\text{m}$  'dir. Por boyutu açısından bakıldığında tüm gruplarda ortalama por çapı aynıdır. Bu sonuç yapıya kaolin, vitamin K ya da protamin sülfat katkılanmasının por boyutu ve dağılımında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı yönünde yorumlanabilir.



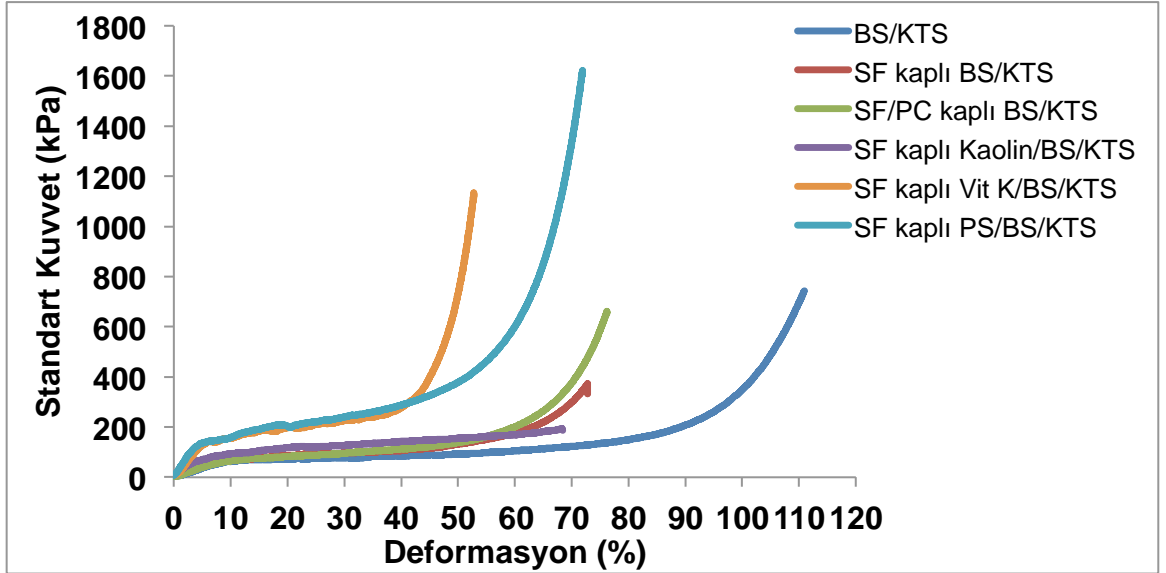
Şekil 4.12. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların por çapı histogramları.

#### 4.5. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Mekanik Özellikleri

Hazırlanan saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların mekanik özelliklerine basma testi yapılarak bakılmıştır. Kuru haldeki ajanların uygulanan kuvvete karşı gösterdikleri deformasyon Şekil 4.13'de verilmiştir. Hazırlanan ajanlar kuru halde iken uygulanan kuvvet ve deformasyon yüzdeleri bakımından incelendiğinde en

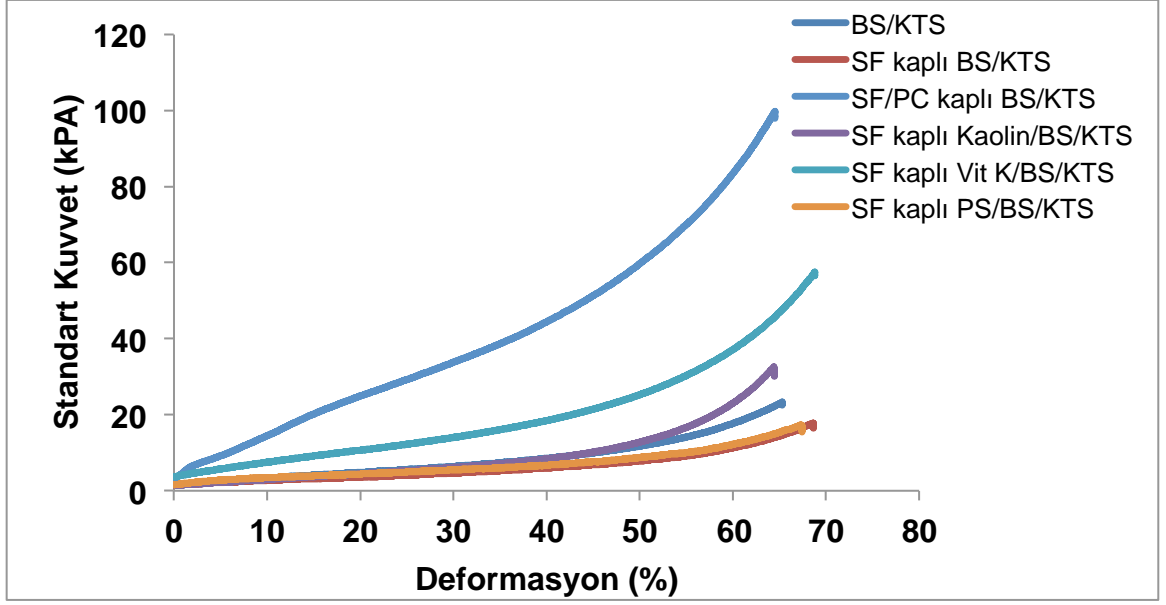
dayanıksız olarak SF kaplı BS/KTS gözükmetedir. BS/KTS ve SF/PC kaplı BS/KTS uygulanan kompresyona karşı verdikleri cevap bakımından benzerdir. SF kaplı Vit K/BS/KTS bu gruba göre daha iyi bir mekanik özellik göstermektedir. Oda koşullarında kuru hemostatik ajanlar ile yapılan testte en iyi cevabı SF kaplı PS/SF/KTS ve Kao/BS/KTS göstermektedir.

Tang ve arkadaşları üç boyutlu mezoporöz doku iskelesine (MBG) kaolin katkılayarak kaolini kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanmak üzere, mekanik özelliklerini ve biyouyumluluğunu araştırmışlardır. Sonuçlar yapıya kaolin eklenmesinin, MBG doku iskelelerini daha stabil hale getirdiğini ve mekanik özelliklerini iyileştirdiğini göstermiştir [213].



**Şekil 4.13.** Kuru haldeki saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların uygulanan kuvvete karşı gösterdiği deformasyon yüzdeleri.

PBS içerisinde bekletilen hemostatik ajanların basma testinin sonuçları Şekil 4.14'de verilmiştir. Islak haldeki saf ve kompozit ajanların kuvvete karşı verdikleri cevap karşılaştırıldığında BS/KTS, SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/SF/KTS gruplarının vermiş olduğu cevaplar benzerdir. Islak halde iken SF kaplı Kao/BS/KTS kuru formda gösterdiği başarıyı gösterememiştir. Bu koşullarda en iyi performansı SF/PC kaplı ve SF kaplı Vit K/BS/KTS göstermiştir.



**Şekil 4.14.** Islak haldeki saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların uygulanan kuvvete karşı gösterdiği deformasyon yüzdeleri.

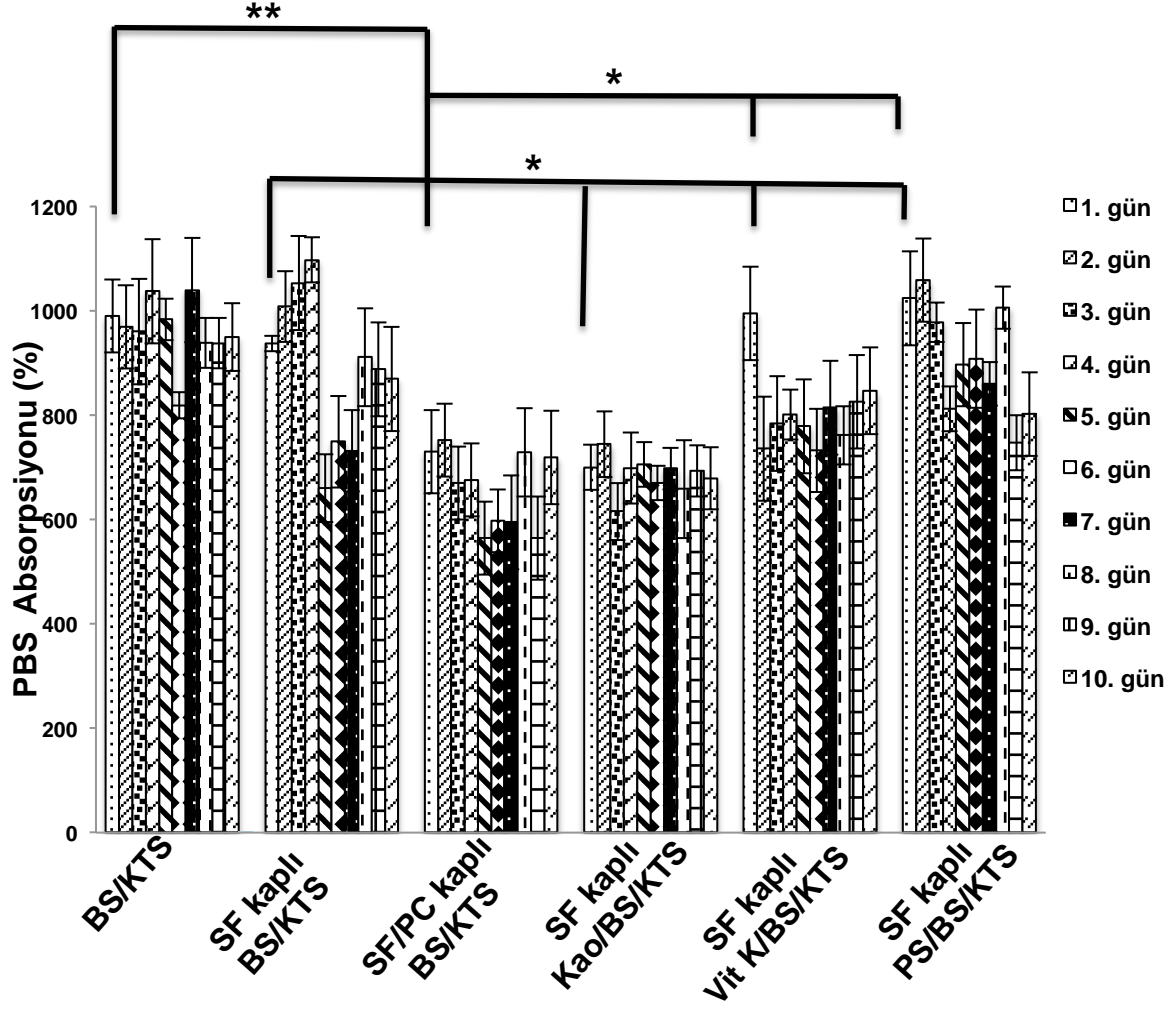
Test koşulları göz önüne alındığında, ıslak durumdaki hemostatik ajanların mekanik özelliklerinde dramatik bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak Nge ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kitosanı 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorid (EDC)- aracılı çağraz bağlama metodu ile bakteriyel selüloza entegre etmişlerdir. Çalışmadaki basma testinin sonuçları alınan değerler ile kıyaslandığında hazırlanan hemostatik ajanların performansları oldukça iyidir. Örneğin  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de liyofilize ettikleri BS/KTS'in (50:50 % ağırlıkça) ıslak haldeyken vermiş olduğu sıkıştırma modülü  $5.49 \pm 0.8$ 'dir [146]. Hazırlanan BS/KTS'in sıkıştırma modülü ise  $25 \pm 0.37$  olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.2.** Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların ıslak ve kuru mekanik özellikleri.

Deney Grupları	Ortalama por çapı (µm)	Kuru Durumda (oda koşullarında)		Islak Durumda (PBS'de, 37 °C)	
		E(kPa)	Deformasyon (%)	E(kPa)	Deformasyon (%)
BS/KTS	22±0.4	1331±74	83±3.83	25±0.37	66±0.10
SF kaplı BS/KTS	20 ±0.3	755±36	76±5.91	29±0.16	70±0.34
SF/PC kaplı BS/KTS	26 ±0.5	1344±63	80±6.25	139±0.94	66±0.30
SF kaplı Kao/BS/KTS	24± 0.4	2463±56	70±2.44	11±0.73	66±0.33
SF kaplı Vit K/BS/KTS	22 ± 0.4	1443±33	70±2.45	50±0.88	68±0.12
SF kaplı PS/BS/KTS	21 ± 0.3	3089±78	79±1.05	29±1.66	70±0.44

#### 4.6. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların PBS Alım Özellikleri

Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların 10 gün boyunca yapılan su absorplama yüzdelerini ölçen testin sonuçları Şekil 4.15'de verilmiştir. 1. gün sonunda alınan yüzdeler karşılaştırıldığında SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS, PS/BS/KTS değerleri ile Kao/BS/KTS arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Yine 1. gün sonunda BS/KTS grubunun su alım yüzdesi SF/PC kaplı BS/KTS'ye ( $p<0.005$ ) göre daha iyi bulunmuştur. SF kaplı Vit K/BS/KTS, PS/BS/KTS ve SF/PC kaplı BS/KTS arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 10. gün sonunda Kao/BS/KTS'ye kıyasla BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS daha iyi su alım yüzdesi sergilemiştir ( $p<0.05$ ). Test sürecince alınan PBS absorplama yüzdeleri göz önüne alındığında BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS/BS/KTS gruplarının SF/PC kaplı BS/KTS'ye göre özellikle Kao/BS/KTS'ye kıyasla anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.15. Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların PBS absorblama yüzdeleri (\*\*:  $p<0.005$ , \*:  $p<0.05$ ).

#### 4.7. Saf ve Kompozit BS/KTS Hemostatik Ajanların Koagülasyonun Plazmatik Fazı Üzerindeki Etkisi (aPTT/PTZ)

Sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanlardan alınan kanlar ile gerçekleştirilen PTZ (protrombin zamanı) ve aPTZ (aktif parsiyel tromboplastin zamanı) testlerinin sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Normal olarak Sprague cinsi sıçanlarda alınan PTZ süresi 13.6-16.6 saniye iken aPTT için 10.4-16.3 saniyedir [214]. Kontrol olarak plazma ile yapılan test sonuçları bunu doğrulamaktadır. Gazlı bez ile alınan sonuçlarda bir uzama gözlemlenmiştir. BS/KTS grubunda PTZ süresi 14 saniye olarak kaydedilirken aPTT süresi

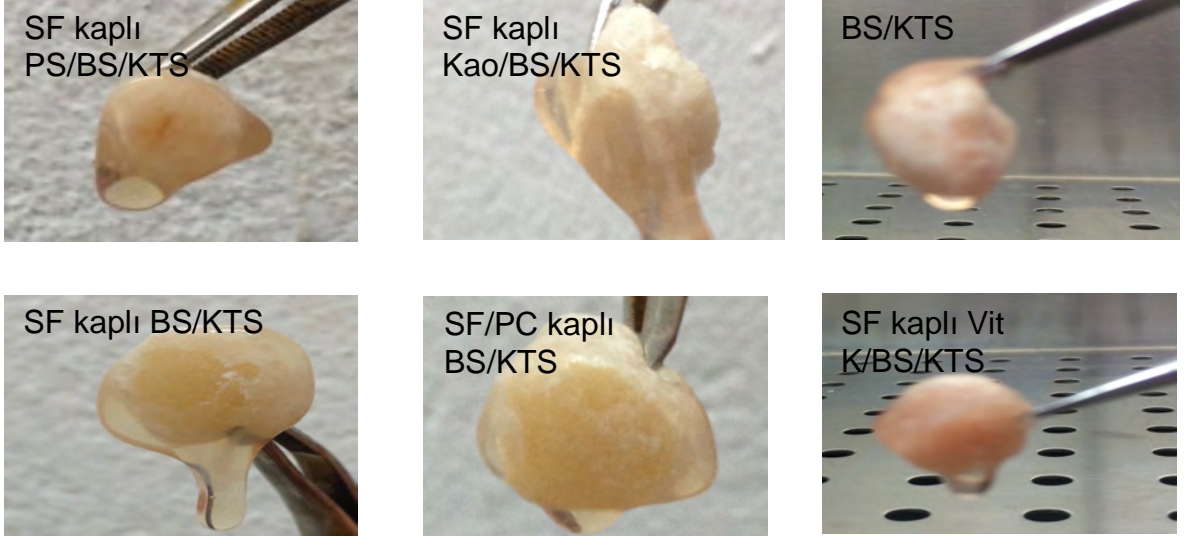
alınamamış, pıhtılaşma gözlemlenememiştir. SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve Kaolin BS/KTS'de olduğu gibi plazma ile etkileştirildikten sonra PTZ ve aPTT süreleri alınamamıştır. Bu durum plazma ile etkileşen bu gruplarda pıhtılaşma faktörlerinin hemostatik ajanlar tarafından toplanması olarak yorumlanmıştır. Ancak SF kaplı Kao/BS/KTS grubunda PTZ testinde bir süre alınabilmiştir. Bu da aPTT'yi aktive eden kaolinin PTZ'de aynı sonucu göstermemesine bağlanmıştır.

**Çizelge 4.3.** Sağlıklı ratların kan plazması ile yapılan PTZ ve aPTT test sonuçları.

Grup	PTZ (sn)	aPTT (sn)
Kontrol	15.8±0.45	42.0±0.3
Gazlı Bez	45±0.5	180 ±0.9
BS/KTS	14.0±0.5	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF/PC kaplı BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı Kao/BS/KTS	10.5±0.7	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı Vit K/BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı PS/BS/KTS	16.3±0.8	33.5±0.4

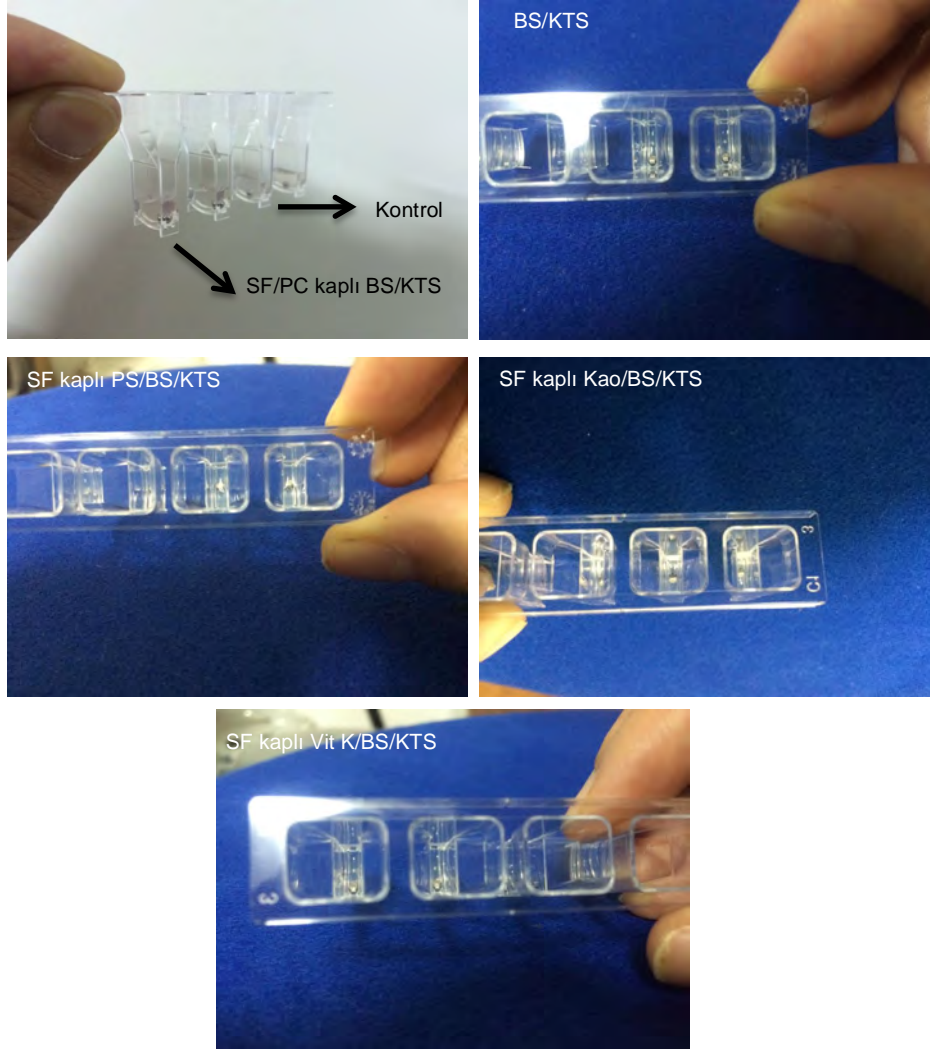
Şekil 4.16'da saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların sağlıklı ratlardan alınan kan plazması ile etkileştirildikten sonraki fotoğrafları verilmiştir. Fotoğraflarda da görüldüğü gibi plazma ile etkileşim sonrası hemostatik ajanların etrafında jel benzeri bir yapı oluşmuştur ve plazma içeriğini tamamen üzerine hapsetmiştir. PTZ ve aPTT testi sonucunda alınan veriler de bu görüntüyü destekler niteliktedir.





**Şekil 4.16.** Sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanların kanından elde edilen plazma ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların görüntüleri.

Şekil 4.17'de ise aPTT testleri sonucunda test küvetleri içerisinde oluşan görüntü sunulmuştur. Görüntülerde kontrol ve SF kaplı PS/BS/KTS grubunda bilye pıhtılaşma sonrası ortada kalırken BS/KTS, SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve Kaolin/BS/KTS gruplarında bilyeler test sonrası plazma içerisindeki hareketini devam ettirebilmektedir. Bu görüntü plazmada koagülasyonda görevli bileşenlerin hemostatik ajanlarca toplanması olarak yorumlanmaktadır.



**Şekil 4.17.** Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar ile etkileştirilen sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi erişkin rat plazması ile yapılan aPTT testi görüntüleri.

Çalışmada ikinci hayvan modeli olarak kullanılan diyabet oluşturulmuş ratlarda da PTZ ve aPTT testleri çalışılmıştır. Alınan veriler Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Çizelge 4.4'e göre kontrol grubunda PTZ süresi 16 saniye, aPTT süresi ise 150 saniye olarak bulunmuştur. Sağlıklı ratların kanları ile yapılan pıhtılaşma yolakları testlerinde de gözlemlendiği gibi SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve Kaolin BS/KTS gruplarında plazma ile etkileşim sonrası PTZ ve aPTT süreleri alınamamıştır. Sağlıklı ratlardan alınan kan plazması testlerine kıyasla diyabetik ratlarda uzayan bir pıhtılaşma süresi tanımlanmıştır.

**Çizelge 4.4.** Diyabetik ratların kan plazması ile yapılan PTZ ve aPTT test sonuçları.

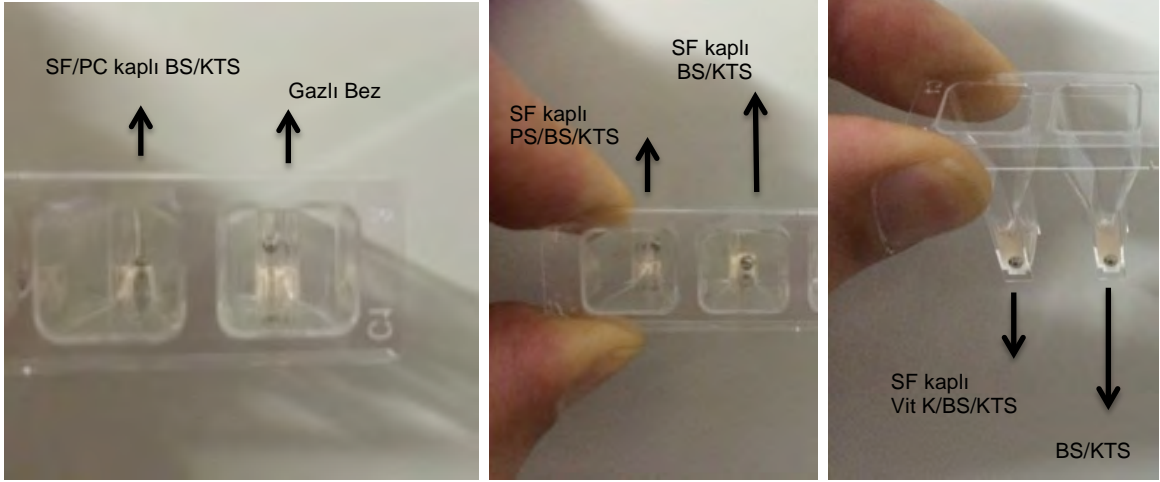
Grup	PTZ (sn)	aPTT (sn)
Kontrol	16±0.3	150.0±0.3
Gazlı Bez	50±0.3	210 ±0.7
BS/KTS	180±0.5	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF/PC kaplı BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı Kao/BS/KTS	10.5±0.7	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı Vit K/BS/KTS	Pıhtılaşma görüldü	Pıhtılaşma görüldü
SF kaplı PS/BS/KTS	45±0.6	180±0.5

Şekil 4.18'de diyabetik ratlardan alınan kan plazması ile etkileştirilen örneklerin 1 saat sonraki görüntüsü verilmiştir. Sağlıklı rat plazmasında olduğu gibi diyabetik rat plazması da örneklerin çeperlerinde bir jel görüntüsü oluşturmuştur.



**Şekil 4.18.** Diyabetik Sprague Dawley cinsi dişi erişkin sıçanların kanından elde edilen plazma ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların görüntüleri.

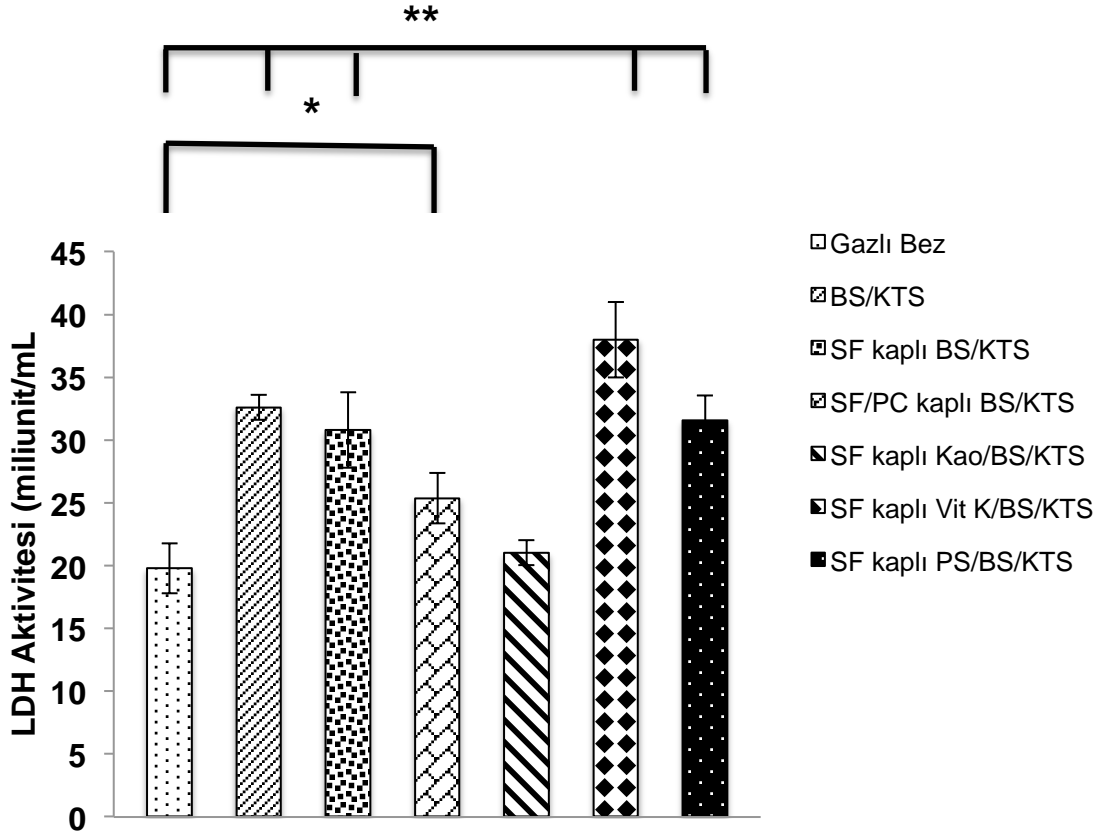
Şekil 4.19'da ise örnekler ile etkileştirilen diyabetik ratlardan alınan kan plazmasının aPTT testi sonrasında test küvetleri içerisinde oluşturduğu görüntü verilmiştir. Sağlıklı ratlarda olduğu gibi gazlı bez ve SF kaplı PS/BS/KTS grubunda bilye pıhtılaşma sonrası ortada kalırken BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF/PC kaplı BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS gruplarında bilyeler test sonrası plazma içerisindeki hareketini devam ettirebilmektedir.



**Şekil 4.19.** Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar ile etkileştirilen diyabetik Sprague Dawley cinsi dişi erişkin rat plazması ile yapılan aPTT testi görüntüleri.

#### 4.8. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Aktivite Testi

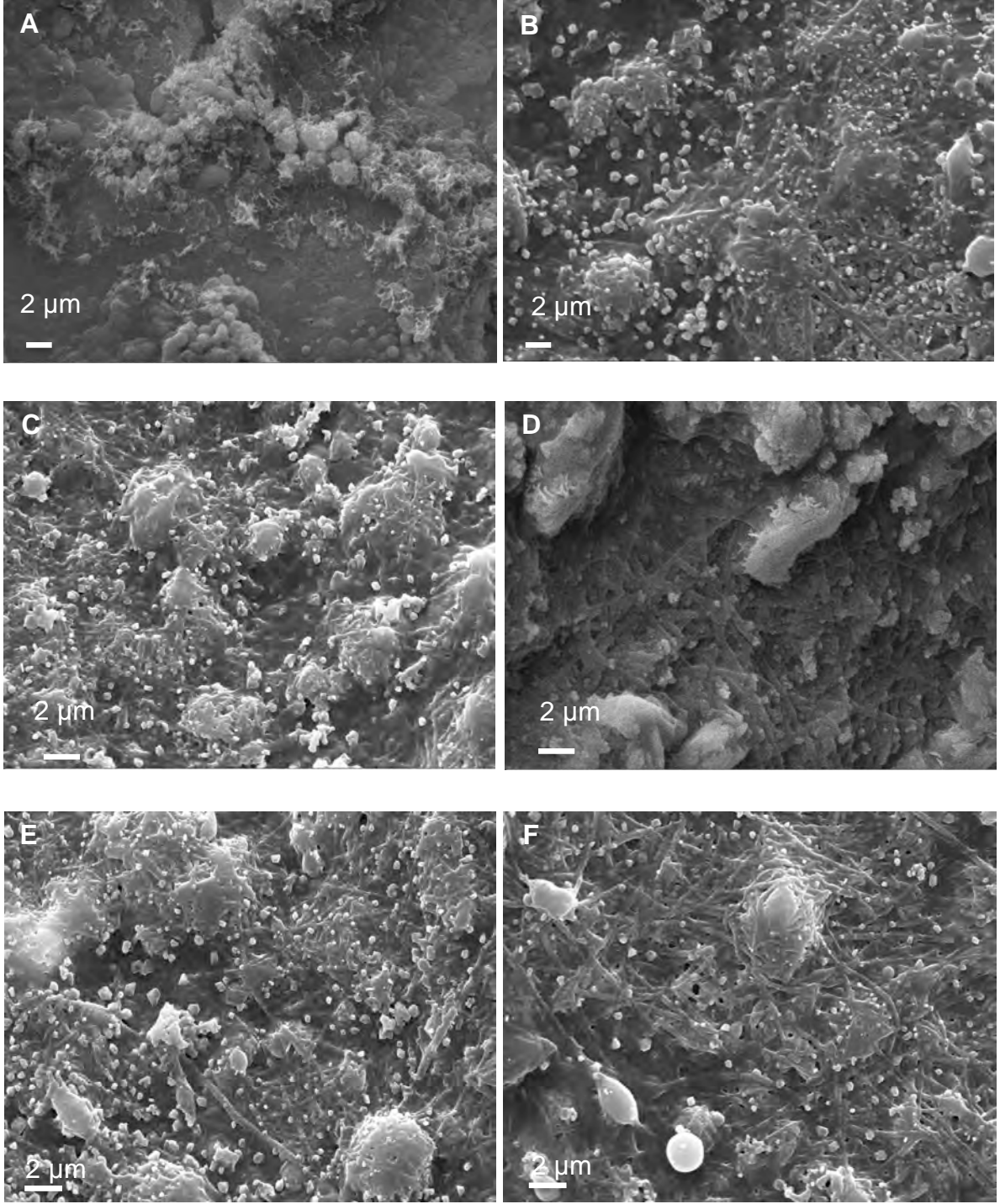
Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar üzerine yapışan plateletlerin LDH aktivitesi ölçülmüştür. Sağlıklı ratlardan alınan kan plazması ile 30 dakika boyunca etkileştirilen örneklerin LDH değerleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Alınan sonuçlara göre SF/PC kaplı BS/KTS üzerindeki LDH aktivitesi dolayısıyla platelet adhezyonu gazlı beze kıyasla anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Yine BS/KTS, SF kaplı BS/KTS ve Vit K/BS/KTS, SF kaplı PS/BS/KTS ile gazlı bez arasında alınan LDH konsantrasyonu bakımından anlamlı bir fark vardır ( $p < 0.005$ ). SF kaplı Vit K/BS/KTS, BS/KTS, SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/BS/KTS, SF kaplı Kaolin/BS/KTS'a göre daha iyi bir LDH aktivitesi sergilemiştir ( $p < 0.005$ ).



**Şekil 4.20.** Sağlıklı ratların PRP ile etkileştirilen örneklerde LDH aktivitesi

(\*\* :  $p < 0.005$ , \* :  $p < 0.05$ ).

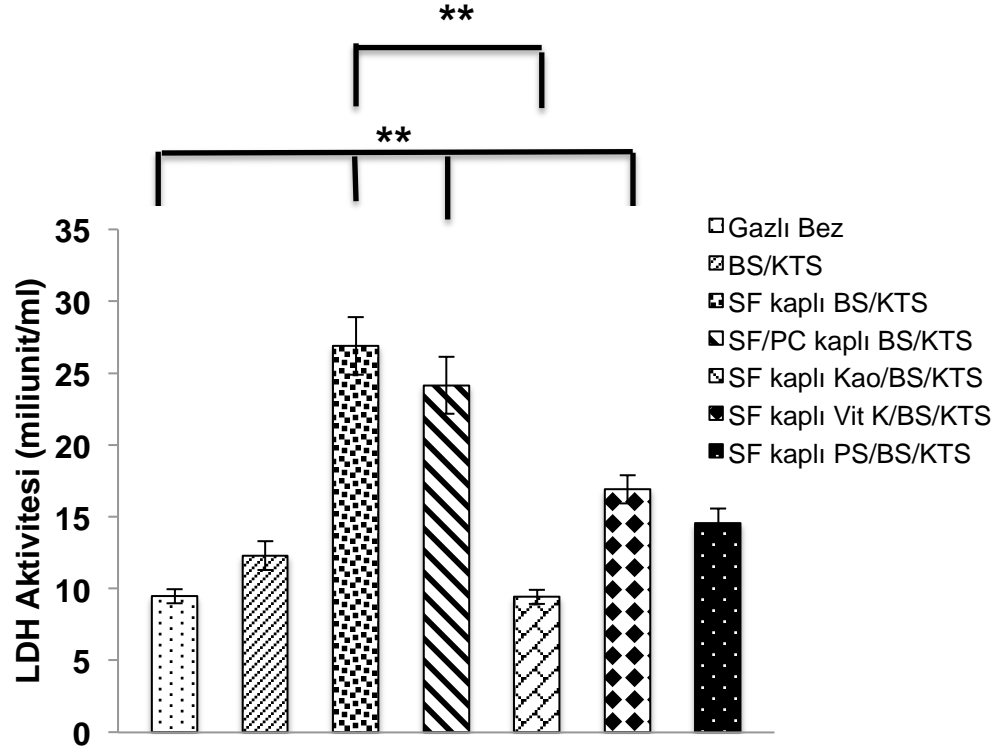
Saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar 1 mL sağlıklı rat plazması ile etkileştirildikten sonra fikse edilmiş ve SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.21) Alınan görüntüleri bakıldığında özellikle kompozit BS/KTS grubu üzerinde BS/KTS ve SF kaplı Kaolin/BS/KTS'ye kıyasla daha çok platelet agregasyonu ve yayılımı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.21.** Sağlıklı ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklere yapışan plateletler; BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), Vit K/BS/KTS ve PS/BS/KTS (F) (Ölçek çubuğu: 2 µm).

Şekil 4.22'de ise diyabet oluşturulmuş ratların kan plazması ile gerçekleştirilen LDH aktivite sonuçları verilmiştir. Sonuçlara göre SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K/BS/KTS üzerine yapışan plateletlerin aktivitesi gazlı beze kıyasla anlamlı bir farklılık göstermektedir ( $p < 0.005$ ). SF kaplı BS/KTS, kaolin katkılı

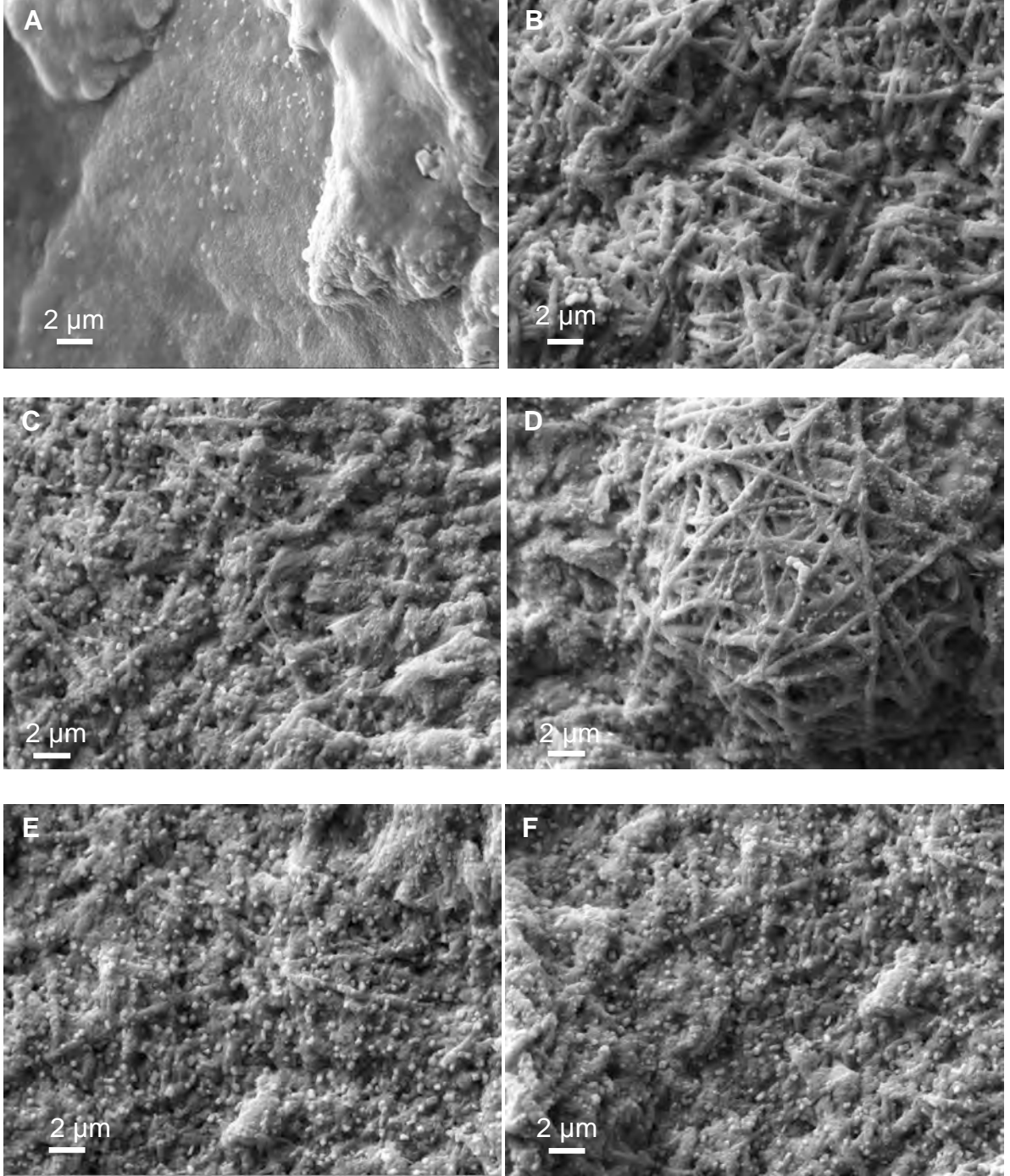
kompozit gruba ( $p<0.005$ ) ve BS/KTS'ye nazaran anlamlı bir platelet konsantrasyonunu üzerinde toplayabilmiştir ( $p<0.005$ ). Ancak sağlıklı rat plazması ile diyabetik rat plazmasının LDH aktivite değerleri genel olarak incelendiğinde diyabetik rat plazması ile etkileştirilen hemostatik ajanlar sağlıklı rat plazması ile kıyaslandığında daha düşük bir LDH aktivitesi sergilemiştir.



**Şekil 4.22.** Diyabetik ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklerde LDH aktivitesi (\*\*:  $p<0.005$ ).

Diyabetik ratlardan alınan kan plazması ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar üzerindeki platelet adhezyonu alınan SEM görüntüleri ile Şekil 4.23'de verilmiştir. Yüzey üzerine tutunan platelet sayısı bakımından değerlendirme yapıldığında, kompozit BS/KTS üzerine BS/KTS'a kıyasla daha çok platelet yapıştığı alınan görüntülerden de anlaşılmaktadır. Nanofibriler yüzeyin platelet adhezyonunu iyileştirdiği yönünde bir sonuca varılabilir.

Wan ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada nanofiber varlığının platelet adhezyonu ve aktivasyonunu desteklediğini, topografi ve yüzey yükünün bunda önemli rol oynadığını göstermişlerdir [215].



**Şekil 4.23.** Diyabetik ratlardan alınan PRP ile etkileştirilen örneklerle yapışan trombositler: BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), Vit K/BS/KTS (E) ve PS/BS/KTS (F) (Ölçek çubuğu: 2 µm).



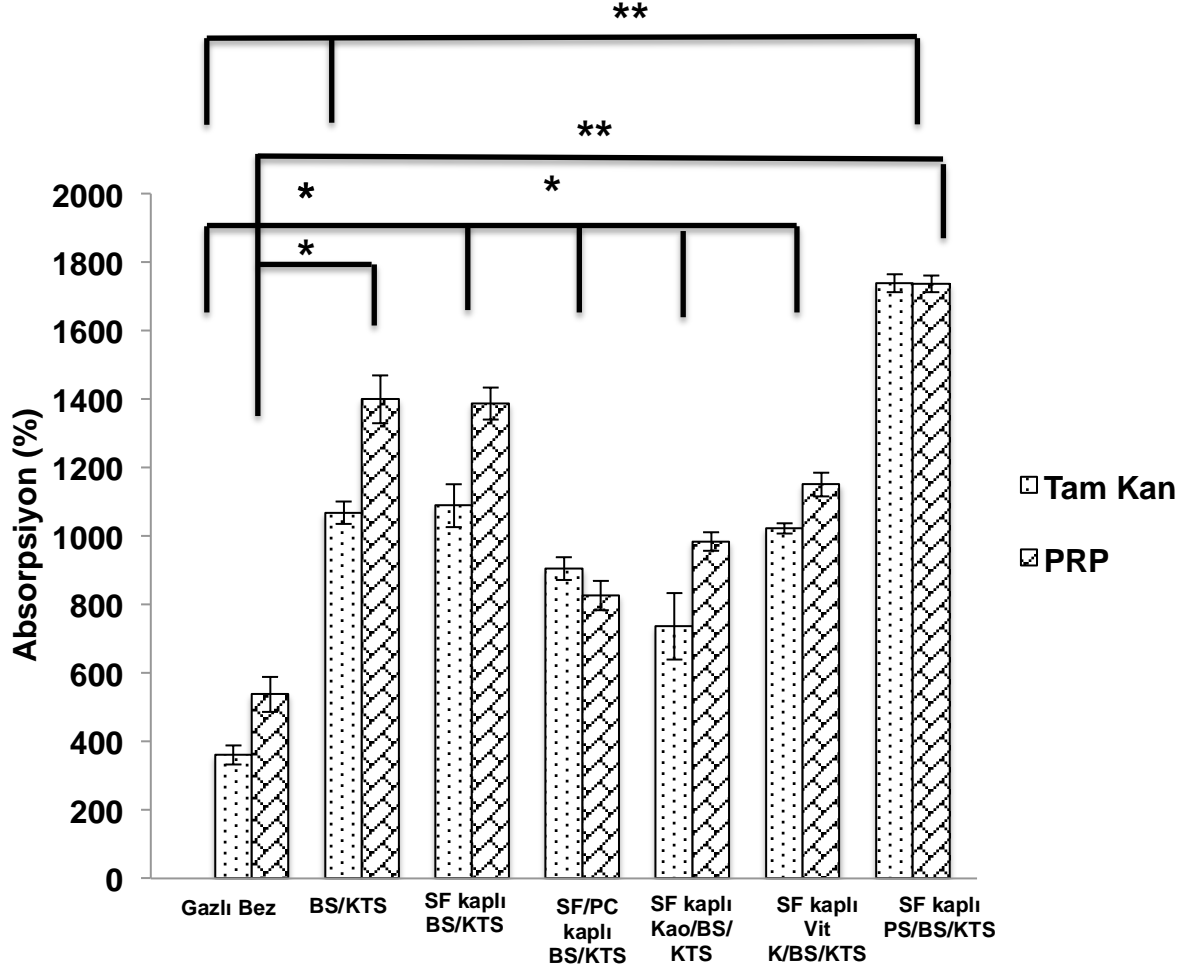
#### 4.9. İn-vitro Sağlıklı Tam Kan ve PRP Absorblama Oranı

Şekil 4.24'de hemostatik ajanların sağlıklı rat kan ve plazmasını absorpsiyon yüzdeleri verilmiştir. Saf ve kompozit hemostatik ajanların hem PRP'yi hem de tam kanı absorplama yüzdeleri gazlı beze kıyasla anlamlı derecede farklı çıkmıştır ( $p<0.05$ ). Tam kanı içerisinde hapsetme bakımından hazırlanan gruplar arasında bir kıyaslama yapıldığında tüm gruplar kaolinle modifiye edilmiş gruba göre büyük bir farklılık göstermiştir ( $p<0.05$ ). Sağlıklı tam kanı en fazla absorplayan ise SF kaplı PS/BS/KTS olmuştur.

PRP absorblama oranı bakımından bir değerlendirme yapılacak olursa, gazlı bez  $537\pm 51$ 'lik bir yüzde ile deney grupları içerisinde en düşük performansı sergilemiştir. Hazırlanan deney gruplarında sırasıyla absorplama yüzdeleri şöyledir;  $1399\pm 70$ ,  $1386\pm 40$ ,  $826\pm 40$ ,  $983\pm 20$ ,  $1150\pm 30$ ,  $1736\pm 20$ . Tam kanda olduğu gibi en yüksek PRP absorplama yüzdesini SF kaplı PS/BS/KTS göstermiştir. Tüm grupların kaoline kıyasla yüzdelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ).

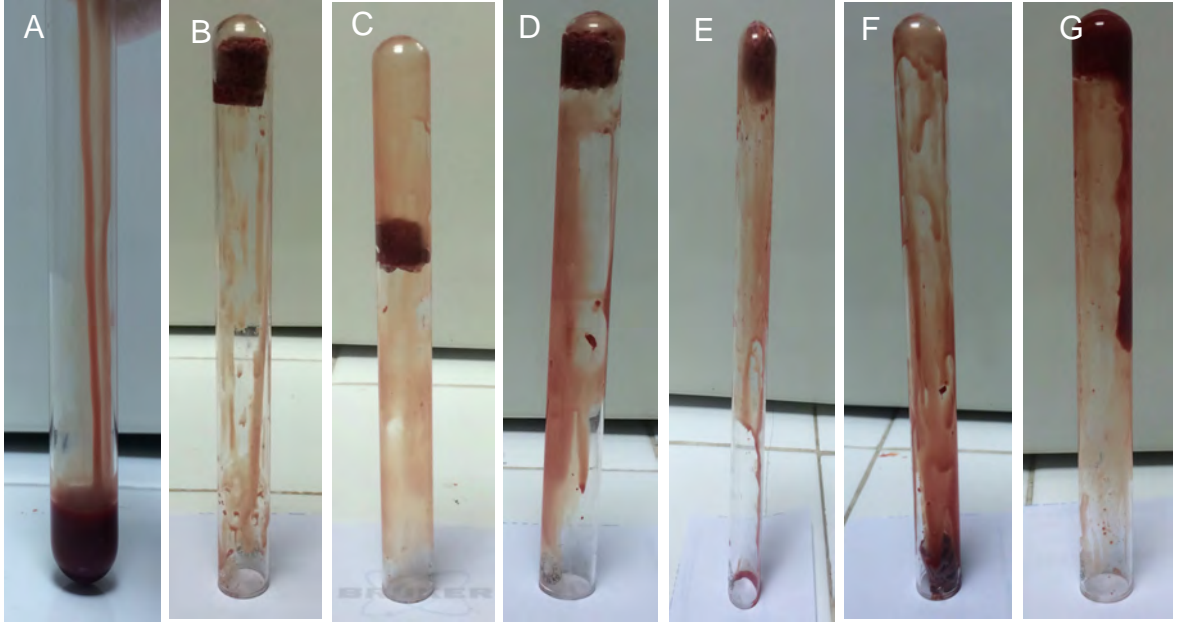
Dai ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada antibakteriyel gümüşle değiştirilmiş mezoporöz silika küreler (AgCaMSS) rat femoral arter ve karaciğer yaralanması modelinde kullanılmıştır [189]. Çalışmada hazırladıkları kürelerin in vitro sağlıklı kanı absorblama yeteneklerine bakmışlardır. Toz haldeki AgCaMSS % 285.2 oranında bir absorplama yüzdesi gösterirken granül AgCaMSS % 198.4'lük bir değer vermiştir.

Grupların sağlıklı tam kan ve PRP'yi absorplama da çizmiş oldukları performans farklılık göstermemektedir. Genel itibariyle grupların tam kan ve PRP'de vermiş oldukları değerler birbirine yakındır.



**Şekil 4.24.** Sağlıklı ratlardan alınan tam kan ve PRP'nin saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtüler tarafından absorplanma yüzdeleri (\*\*:  $p < 0.005$ , \*:  $p < 0.05$ ).

Şekil 4.25'de ise sağlıklı ratlardan alınan tam kan ile etkileştirilen hemostatik ajanların absorplama yetenekleri alınan fotoğraflarla gösterilmiştir. Tüm gruplar tam kanı içerisinde hapsederken gazlı bez tam kanı absorplayamamıştır.



**Şekil 4.25.** Sağlıklı ratlardan alınan tam kan ile etkileştirilen hemostatik ajanlar; gazlı bez (A), BS/KTS (B), SF kaplı BS/KTS (C), SF/PC kaplı BS/KTS (D), SF kaplı Kao/BS/KTS (E), SF kaplı Vit K/BS/KTS (F) ve SF kaplı PS/BS/KTS (G).

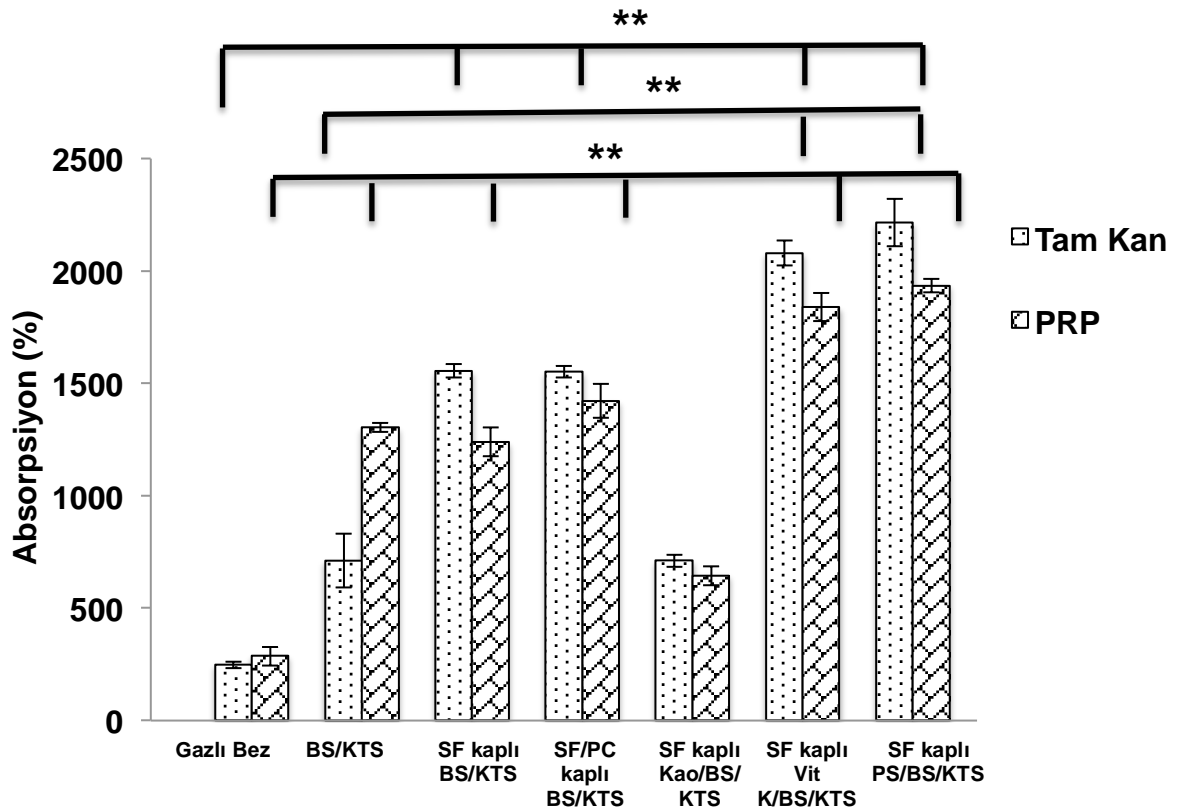
Diyabetik tam kan ve plazması ile yapılan in vitro absorpsiyon testi sonuçları Şekil 4.26'da sunulmuştur. Gazlı bezin tam kanı absorplama yüzdesi  $247 \pm 5$  iken SF kaplı PS/BS/KTS için su absorplama yüzdesi  $2214 \pm 56$  olarak bulunmuştur. Gazlı bez ile diğer gruplar tam kan absorplama yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS/BS/KTS önemli bir farklılık göstermektedir ( $p < 0.005$ ). Aynı şekilde SF kaplı Kaolin/BS/KTS grubuna kıyasla saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanlar daha iyi performans sergilemektedir ( $p < 0.05$ ). Tam kanı absorplama oranları bakımından değerlendirildiğinde en yüksek absorplama yüzdesini SF kaplı Vit K ve PS/BS/KTS göstermiştir.

PRP absorplama yüzdeleri bakımından değerlendirilecek olursa kaolin içeren modifiye grup da olmak üzere tüm gruplar gazlı bez ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık göstermektedir ( $p < 0.05$ ). Kaolin ile modifiye edilmiş grup, diğer gruplarla kıyaslandığında ise diğer grupların daha iyi absorplama yüzdeleri gösterdiği görülmüştür ( $p < 0.05$ ). En yüksek absorplama yüzdesini ise SF/PC kaplı BS/KTS ve SF kaplı BS/KTS göstermiştir.

PRP ve tam kan absorblama yüzdeleri bakımından gruplar değerlendirildiğinde her iki durumda da genel eğilim aynıdır. Sağlıklı ratların verdiği sonuçlarda olduğu gibi PRP ve tam kan absorpsiyon yüzdeleri bakıldığında SF kaplı PS/BS/KTS en iyi performansı sergileyen grup olmuştur.

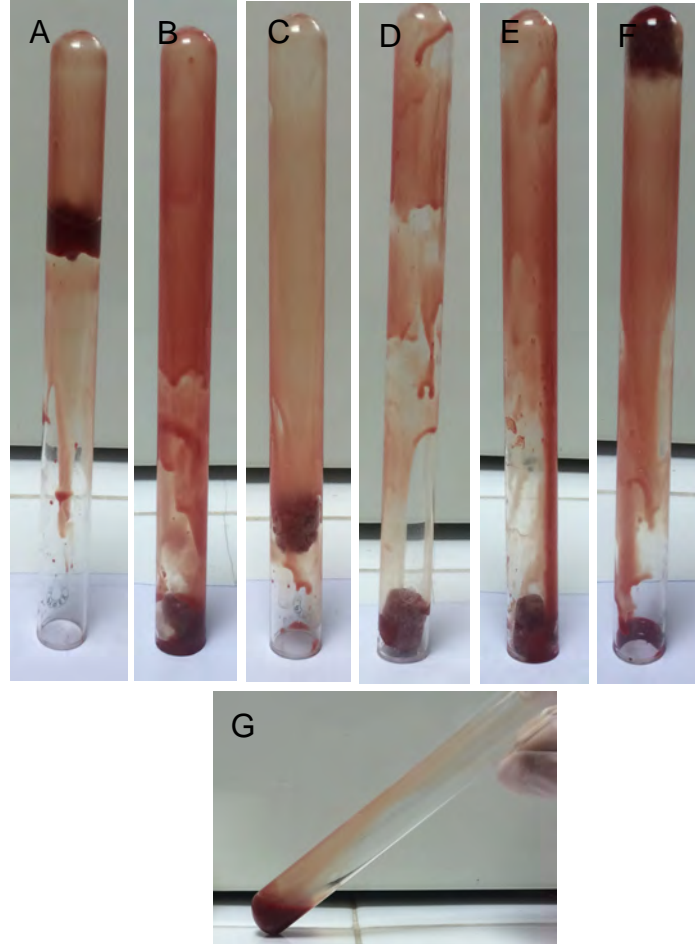
Grupların normal ve diyabetik kandaki absorblama yüzdeleri incelendiğinde diyabetik kanda alınan değerler daha iyidir. Örneğin SF kaplı PS/BS/KTS'nin absorblama yüzdesi sağlıklı bireylerde  $1736 \pm 20$  iken diyabetiklerde  $2214 \pm 56$  olmuştur.

Diabetes mellitus halk dilinde şeker hastalığı koagülasyon sisteminin kronik platelet aktivasyonu ve azalan fibrinolitik potansiyeli ile nitelendirilmektedir. Son zamanlarda sayısız çalışma şeker hastası olanlarda farklı platelet fonksiyonunun olduğunu göstermektedir. Farklı agonistlere (ADP, trombin, kollajen) karşı iyileşen platelet agregasyonu tip I ve II diyabetik hastalarında gösterilmiştir [216, 217].



**Şekil 4.26.** Diyabetik ratlardan alınan tam kan ve PRP'nin saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtüler tarafından absorplanma yüzdeleri (\*\*:  $p < 0.005$ ).

Şekil 4.27'de 2 mL diyabetik tam kan ile etkileştirildikten hemen sonra ters düz edilen hemostatik ajanların fotoğrafları görülmektedir. Gazlı bez haricindeki tüm gruplar saniyeler içerisinde tüm kanı absorplarken, içerisinde gazlı bez bulunan tüp kan ile dolu kalmıştır.



**Şekil 4.27.** Diyabetik ratlardan alınan tam kan ile etkileştirilen hemostatik ajanlar; BS/KTS (A), SF kaplı BS/KTS (B), SF/PC kaplı BS/KTS (C), SF kaplı Kao/BS/KTS (D), SF kaplı Vit K/BS/KTS (E), SF kaplı PS/BS/KTS (F) ve gazlı bez (G).

#### 4.10. Hayvan Modelinde Hemostaz

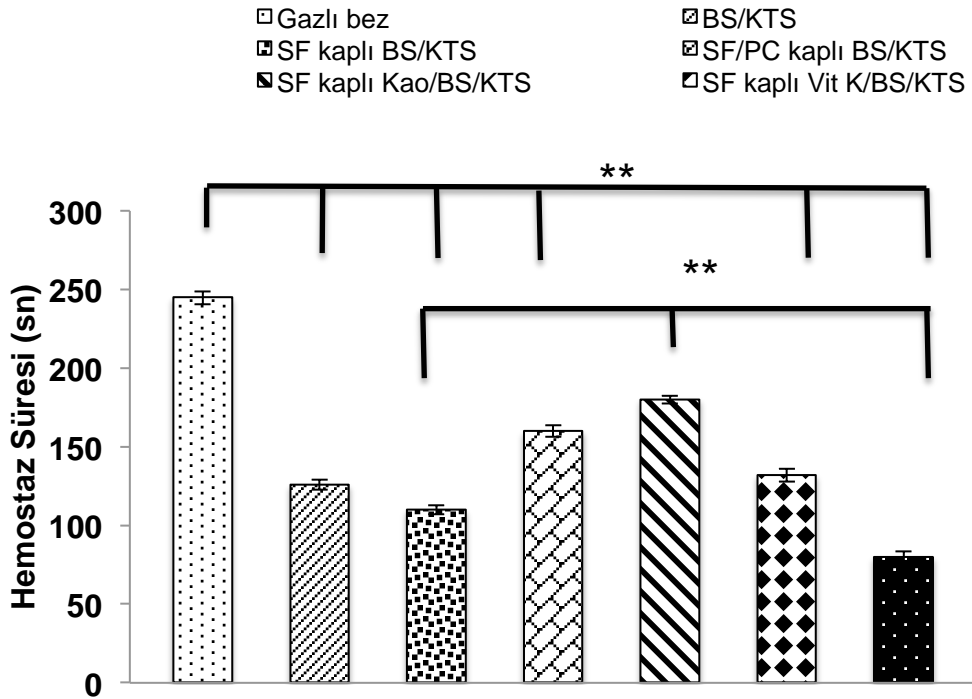
##### 4.10.1 Sağlıklı Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli

Sağlıklı ratlarda yaratılan femoral arter kanama modelinde hemostatik malzemelerin kanamayı durdurma süreleri Şekil 4.28'de verilmiştir. Gazlı bez  $245 \pm 4$  saniyede kanamayı durdurmuştur. Diğer grupların kanamayı durdurma süreleri  $180 \pm 2$  ve  $80 \pm 3$  saniye arasında değişmektedir. Hazırlanan tüm hemostatik

örtülerin kanamayı durdurma süreleri gazlı beze göre kıyaslandığında anlamlı derecede farklılık bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kaolin katkılı grup dışındaki örtülerde bu farklılık oldukça artmıştır ( $p<0.005$ ). Grupları kendi aralarında değerlendirdiğimizde kaolin katkılı grup en yüksek hemostaz süresini vermiştir. En düşük hemostaz süresini  $80\pm 0.3$  saniye ile SF kaplı PS/BS/KTS göstermiştir.

Luo ve arkadaşları hazırladıkları üç boyutlu kendiliğinden düzenlenmiş peptit nanofiber doku iskelelerini karaciğer yara iyileşmesi modelinde denemişlerdir ve hemostaz süresini 80 saniye olarak rapor etmişlerdir [188].

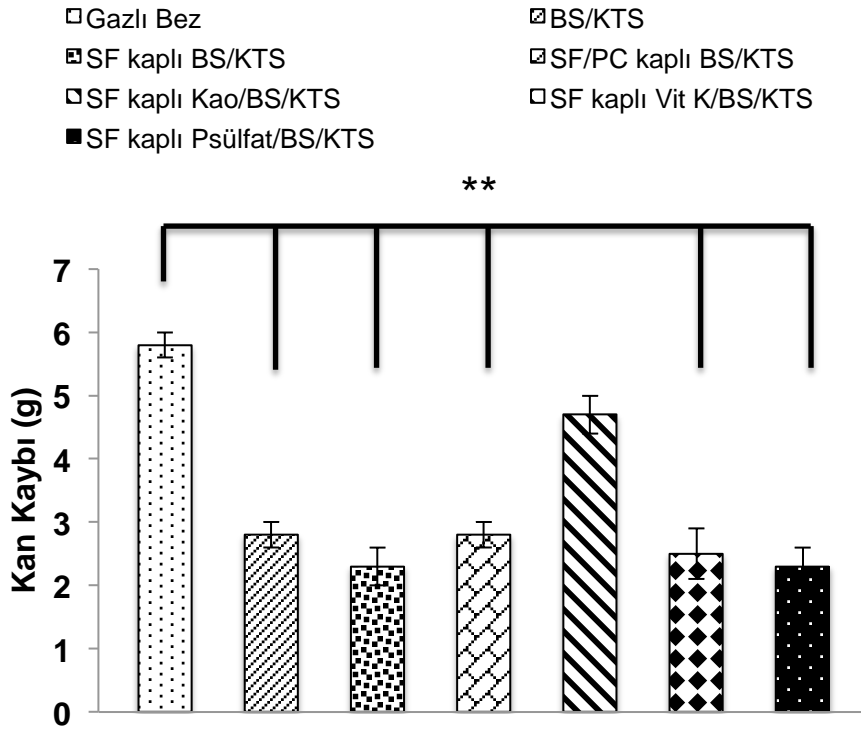
Henderson ve arkadaşları dihidroksi asetonun (MPEG-pDHA) polimerize sekansı, PEG'lenmiş kolayca emilebilir, non-toksik topikal bir hemostatik ajan geliştirmişlerdir. Sprague cinsi ratların lateral hepatektomi modelinde denedikleri bu malzeme kanama süresini 97 saniyeye düşürmüştür [218].



**Şekil 4.28.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanların kanamayı durdurma süreleri (\*\*:  $p<0.005$ ).

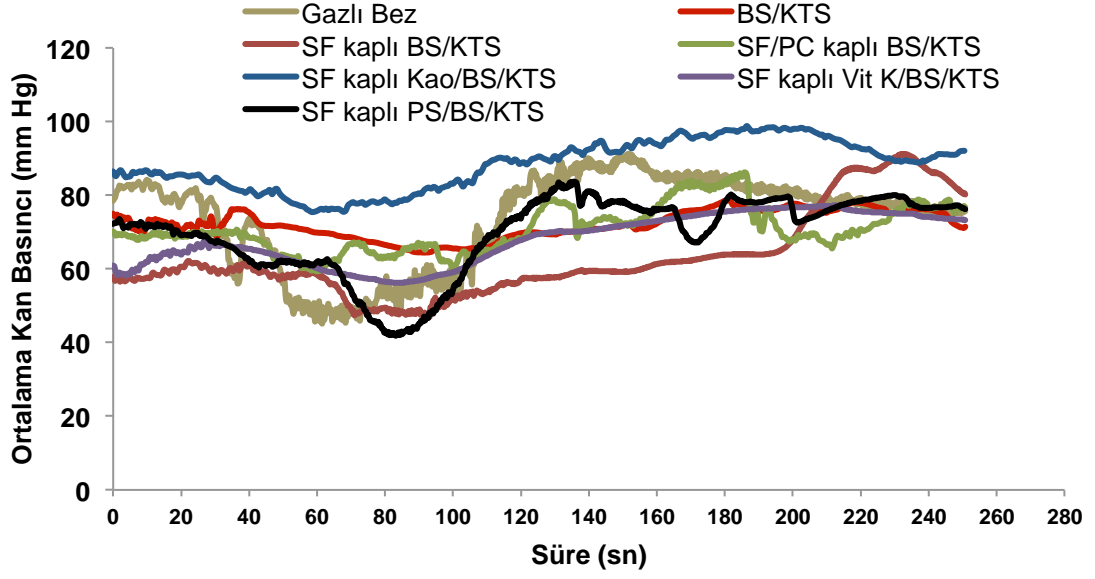
Şekil 4.29'da ise uygulama sonrası hemostatik örtülerin ilk ve son ağırlıklarının farkı ve oluşan kanamanın eklenmesi ile elde edilen kan kaybı miktarları gram olarak sunulmuştur. Hemostatik örtü gruplarında, tüm gruplar gazlı beze kıyasla daha az kan kaybettirmiştir ( $p<0.005$ ). SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/BS/KTS kısa hemostaz süresi oluşturmalarının yanı sıra daha az kan kaybettirmişlerdir.

Nur ve arkadaşları liyofilizasyon yöntemiyle hazırladıkları jelatin köpüğü rat böbrek modelinde denemişler ve kanama miktarını  $3.02\pm 2.9$  g olarak bulmuşlardır [219].



**Şekil 4.29.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra oluşan kan kaybı (\*\*:  $p<0.005$ ).

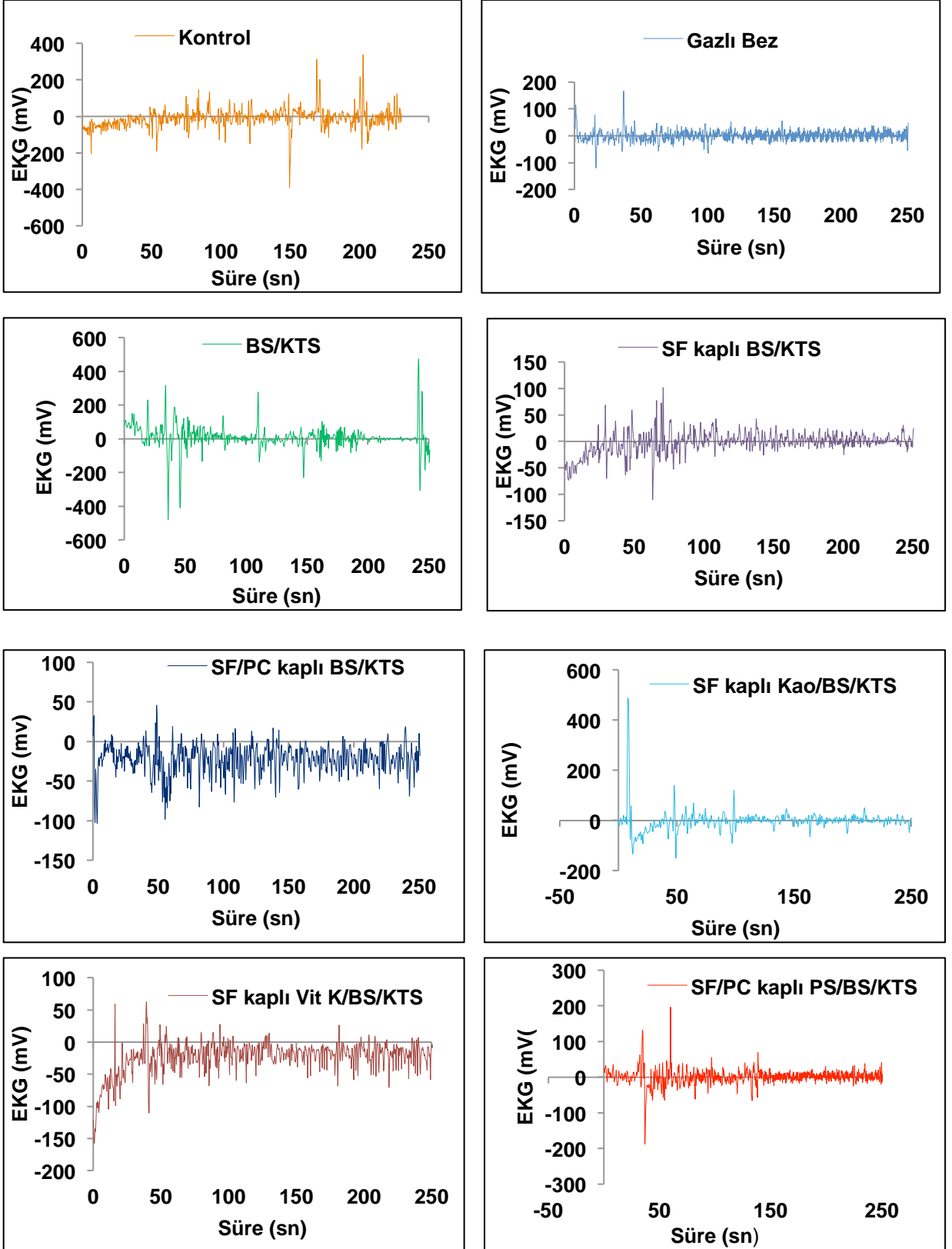
Şekil 4.30'da ise hemostatik ajanların uygulanması öncesi ve sonrasında alınan ortalama arteriyel basınçdaki değişim verilmiştir. Tüm gruplarda yaralanma kan basıncında hızlı bir düşüşe neden olmuştur (50-60 mm Hg). Ancak uygulama sonrasında kan basıncında iyileşme olmuş ve stabil bir değer kazanmıştır.



**Şekil 4.30.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince ortalama arteriyel basınç.

Şekil 4.31’de sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri sunulmuştur.





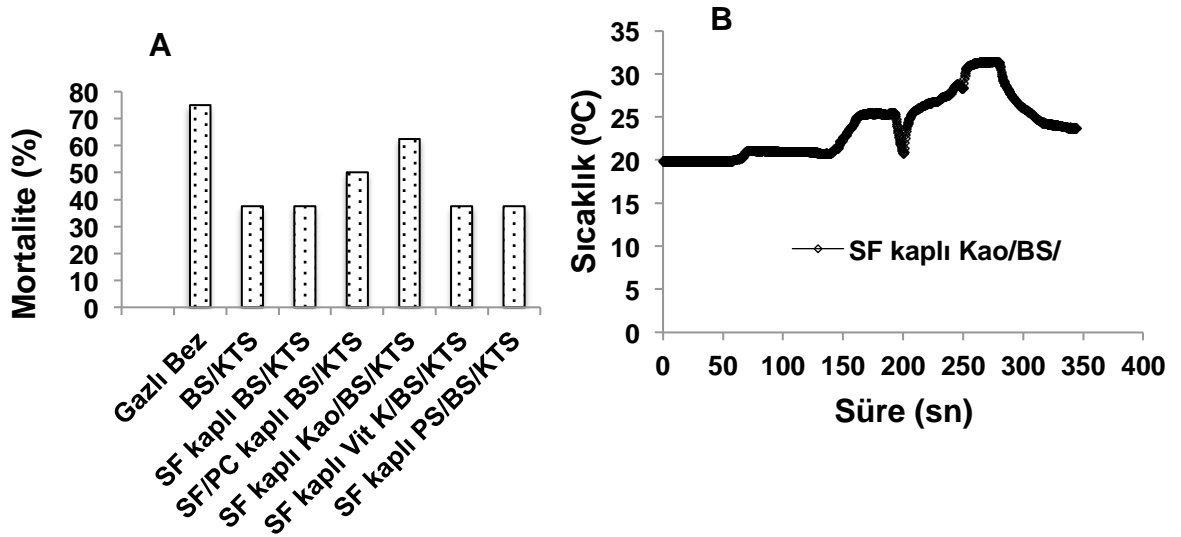
**Şekil 4.31.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri.

Şekil 4.32A'da hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra hayvanların % ölüm oranları verilmiştir. Gazlı bezde ölüm oranı % 75'lere ulaşırken BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS/BS gruplarında ölüm oranı yarıya indirilmiştir.

Celox Gauze ve ChitoGauze gibi ticari ürünler için hayatta kalma yüzdesi sırasıyla % 90 ve 70 olarak kaydedilmiştir. Combat Gauze için bu yüzde 60 olarak bulunmuştur [220].

Şekil 4.32B'de ise sağlıklı ratlarda femoral arter kanama modelinde uygulanan SF kaplı Kao/BS/KTS grubunun kanama bölgesinde oluşturduğu sıcaklık değişimi ölçülmüştür. Uygulama öncesinde 20 °C'de seyreden sıcaklık kaolin katkılı grubun hemostazı sağlamak üzere yerleştirilmesiyle 30 °C'ye çıkararak yaklaşık 10 °C'lik bir sıcaklık farkı oluşmuştur.

Arnaud ve arkadaşları bir ticari ürün olan ACS<sup>+</sup> (mineral Al/Si/Zeolit)'nin ve 9 ticari ürünün domuzda oluşturdukları modelde etkinliklerini araştırmışlardır. Sonuçlara göre ACS<sup>+</sup> çalışmada 2 dakika içerisinde 7.2±8.7'lik bir sıcaklık artışına neden olmuştur [221].



**Şekil 4.32.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli sonrası ölüm oranları (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS'de uygulama sırasındaki sıcaklık değişimi(B).

Çizelge 4.5'de hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra ölçülen kan metabolit değerleri verilmiştir. Srague cinsi sağlıklı bir ratın ortalama kan glikoz, laktat ve kreatin değerleri sırasıyla şöyledir; glikoz 134-219 mg/dL, laktat 0.4-2.2 mg/dL, kreatinin 0.1-5.6 mg/dL'dir [222, 223]. Alınan değerlere bakıldığında laktat ve kreatin değerlerinin normal sınırlar arasında olduğu gözlemlenmiştir. Sadece glikoz değerlerinin özellikle SF kaplı PS/BS/KTS grubunda uygulama yapıldıktan sonra arttığı görülmüştür.

**Çizelge 4.5.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan metabolit değerleri.

Gruplar	Metabolit		
	Glu(mg/dl)	Lac(mmol/L)	Krea( $\mu$ mol/L)
<b>BS/KTS</b>	287.5 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.03	33 $\pm$ 0.8
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	226.5 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.05	42 $\pm$ 0.7
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	255.5 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.21	38.5 $\pm$ 0.1
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	272.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.07	24 $\pm$ 0.8
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	337 $\pm$ 0.3	1.09 $\pm$ 0.17	23.5 $\pm$ 0.7
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	268.5 $\pm$ 0.1	1.03 $\pm$ 0.11	24 $\pm$ 0.1
<b>Gazlı Bez</b>	271 $\pm$ 0.1	0.95 $\pm$ 0.2	19 $\pm$ 0.1

Çizelge 4.6'da ise sağlıklı ratlardan uygulama sonrası alınan kan gazı değerleri sunulmuştur. Kan gazı bazında alınan değerlerin normal ortalama değerleri sırasıyla şöyledir; pH 7.26-7.44, pCO<sub>2</sub> 26-54 mm Hg, pO<sub>2</sub> 93-102 mm Hg, cHCO<sub>3</sub> 12.2-25.4 mmol/L, BE (ecf) -13.3-1.2 mmol/L, cSO<sub>2</sub> 10-89 mmol/L [224, 225]. pH değerleri tüm gruplarda normal sınırlar içerisinde seyretmektedir. pCO<sub>2</sub> değerleri de sadece SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/BS/KTS grubunda küçük bir artış

göstermiştir. Kandaki oksijen miktarında tüm gruplarda artış kaydedilmiştir. Kandaki bikarbonat konsantrasyonu açısından değerlendirildiğinde tüm gruplarda küçük oynamalar kaydedilse de SF kaplı BS/KTS konsantrasyonu 31 mmol/L olarak bulunmuştur. Ekstraselüler baz fazlalığı [BE (ecf)] değerleri ise tüm gruplarda normal aralıklarda seyretmiştir.

**Çizelge 4.6.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde, hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan gazı değerleri.

Gruplar	Gazlar					
	pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	pO <sub>2</sub> (mmHg)	cHCO <sub>3</sub> (mmol/L)	BE (ecf) (mmol/L)	cSO <sub>2</sub> (%)
BS/KTS	7.4 ±0.1	35.9±0.1	121.5±0.3	22±0.3	1.1±0.3	98.2±0.1
SF kaplı BS/KTS	7.3±0.03	58.6±0.06	85.3±0.9	31±1.5	5.1±1.0	94.9±0.1
SF/PC kaplı BS/KTS	7.4±0.07	39.1±0.1	97.4±0.12	24.6±0.4	2.6±0.14	97.7±0.1
SF kaplı Kao/BS/KTS	7.3±0	47.9±0.9	120±0.7	26.8±0.6	1.3±0.07	98.4±0.2
SF kaplı PS/BS/KTS	7.3±0.01	57.4±0.1	91.1± 0.3	28.7±0.07	2.5± 0.14	95.9±0.5
SF kaplı Vit K/BS/KTS	7.37±0.02	44.7±0.1	94±0.1	26.1±0.7	0.9± 0.1	96,8±0.1
Gazlı Bez	7.3±0.1	44.7±0.1	90.4±0.1	26.6±0.3	1.7±0.1	96.1±0.3

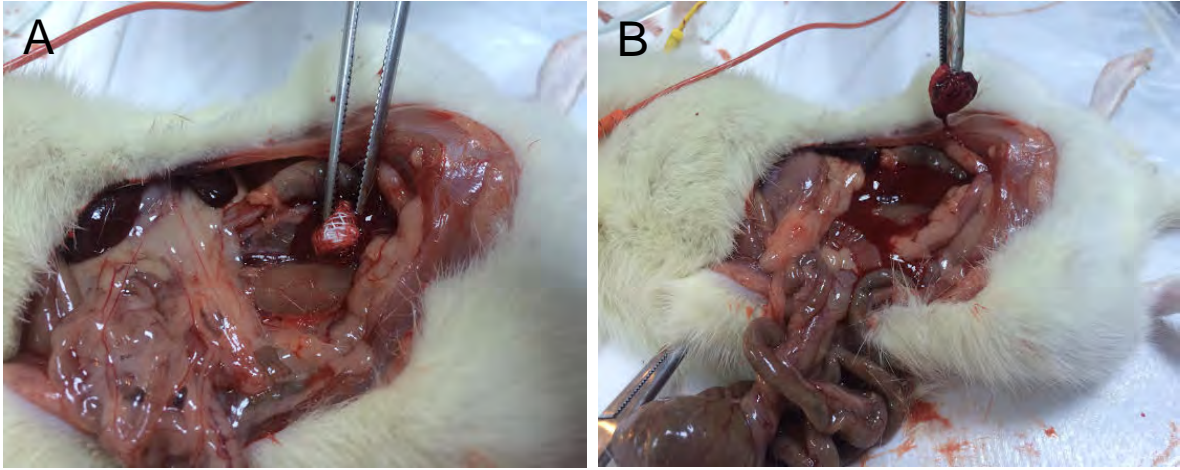
Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde, hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan kimyası değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Sağlıklı bir rat için hesaplanmış kan normal elektrolit değerleri; Na<sup>+</sup> 142-163 mmol/L, K<sup>+</sup> 4.3-5.2 mmol/L, Ca<sup>++</sup> 0.27-1.26 mmol/L, Cl<sup>-</sup> 101-116 mmol/L, cTCO<sub>2</sub> 13-27.1 mmol/L, Hct (%) 36-44, cHgb 12.1-15.9 g/dL’dir [226, 227]. Alınan elektrolit değerleri incelendiğinde tüm parametrelerin normal sınırlar

içerisinde olduğu görülmektedir.  $Ca^{++}$  elektrolit miktarındaki küçük artışlar hemostatik ajandan salınan  $Ca^{++}$  iyonları şeklinde yorumlanmıştır.

**Çizelge 4.7.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan kimyası değerleri.

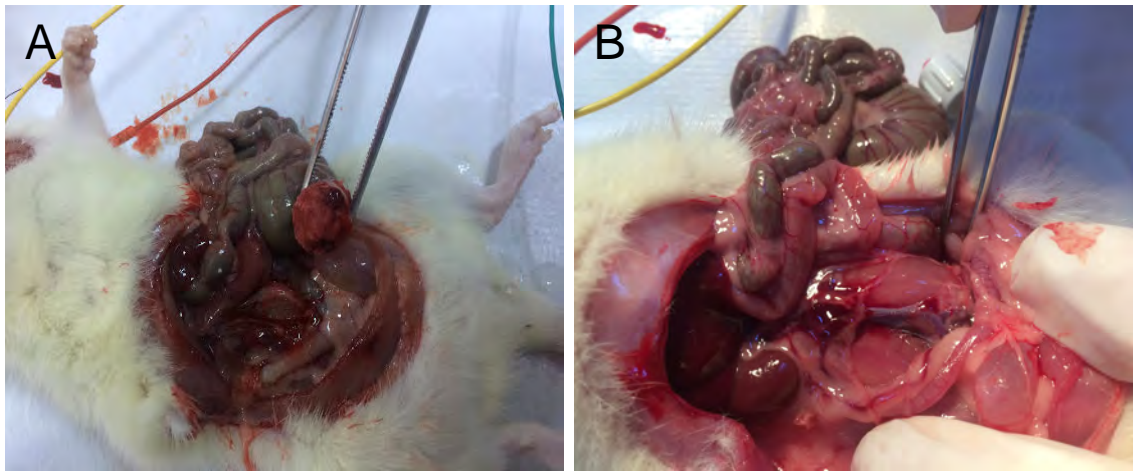
Gruplar	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Ca <sup>++</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	cTCO <sub>2</sub> (mmol/L)	Hct (%)	cHgb (g/dL)
<b>BS/KTS</b>	146.5 ±0.7	5.1±0.1	1.3±0.1	108.5±0.7	23.1±0.4	39±0.1	13.2±0.4
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	143.5±0.1	5.1±0.1	1.26±0.07	103±0.1	32.8±0.17	40.5±0.5	13.8±0.1
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	150±0.2	5.25±0.1	1.41±0.07	109±0.1	25.85±0.5	35±0	11.95±0.07
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	145.5±0.3	5.25±0.2	1.38±0.07	107.5±0.3	28.3±0.7	38.5±0.2	13,05±0.4
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	145.5±0.1	4.3±0.3	1.37± 0.02	104.5± 0.7	30.5± 0.1	40±0.2	13.6± 0.9
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	145±0.1	4.6±0.3	1.38±0.03	105±0.1	27.5±0.7	38±0.4	13.1± 0.1
<b>Gazlı Bez</b>	145.5±0.7	4.6±0.6	1.34±0.01	105.5±0.7	28±0.7	38±0.1	12.9±0.5

Şekil 4.33-4.36'da femoral arter kanama modelinde hemostatik ajanların uygulanıp kaldırıldıktan sonra bölgede oluşan kanama varlığı alınan fotoğraflarda gösterilmiştir. Şekil 4.33'de gazlı bezin uygulanması sırasında ve sonrasında bölgede oluşan kan, hemostazın sağlanamadığının göstergesidir.

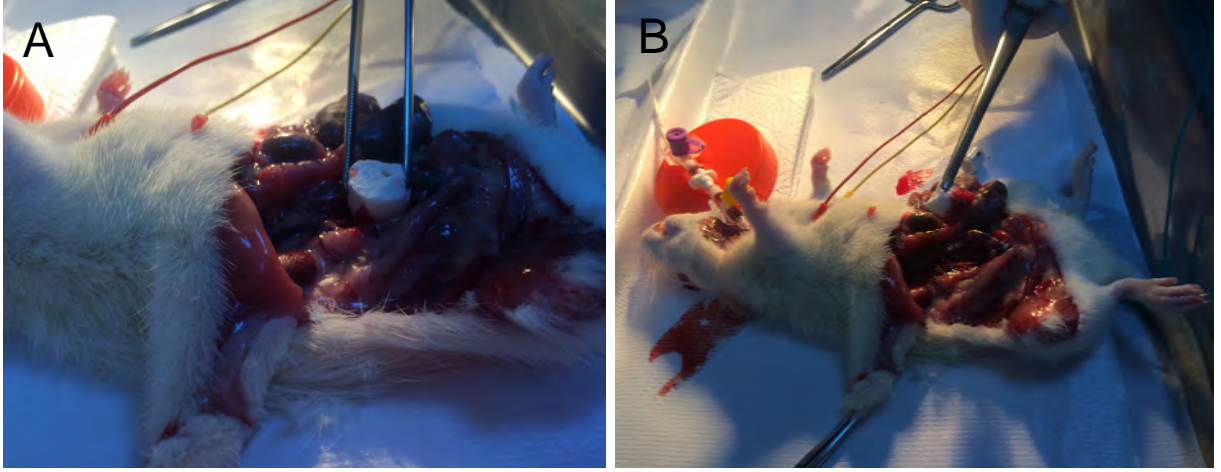


**Şekil 4.33.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde gazlı bez uygulaması ve sonrasında oluşan kan kaybı.

Şekil 4.34 ve 4.35'de SF ve SF/PC kaplı BS/KTS uygulanması sonrasında alınan fotoğraflar görülmektedir. Uygulama sonrası kanın durdurulduğu ve herhangi bir sızıntının dahi olmadığı alınan fotoğraflarda da görülmektedir.

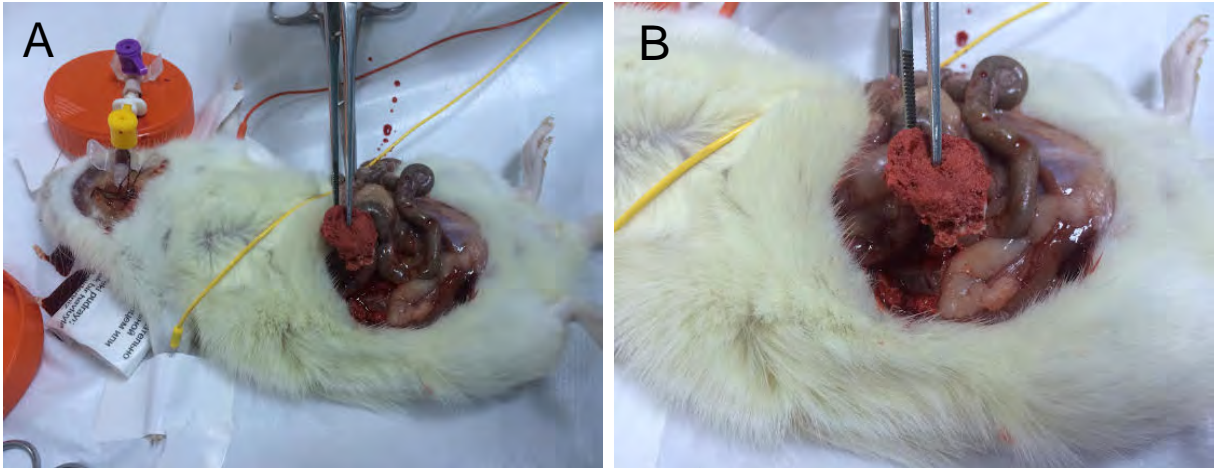


**Şekil 4.34.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı BS/KTS uygulaması ve sonrası.



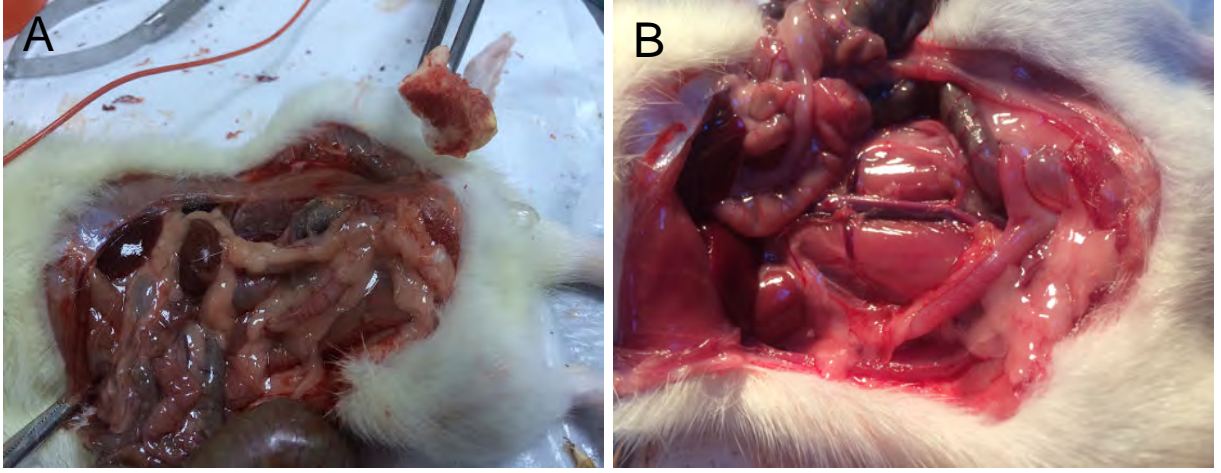
**Şekil 4.35.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeline SF/PC kaplı BS/KTS uygulaması ve sonrası.

Şekil 4.36'da ise hemostatik ajan olarak ratlara SF kaplı Kao/BS/KTS uygulanmıştır. Uygulama sonrası bölgede oluşan sızıntı ve malzemenin yapısında oluşan deformasyon görülmektedir.



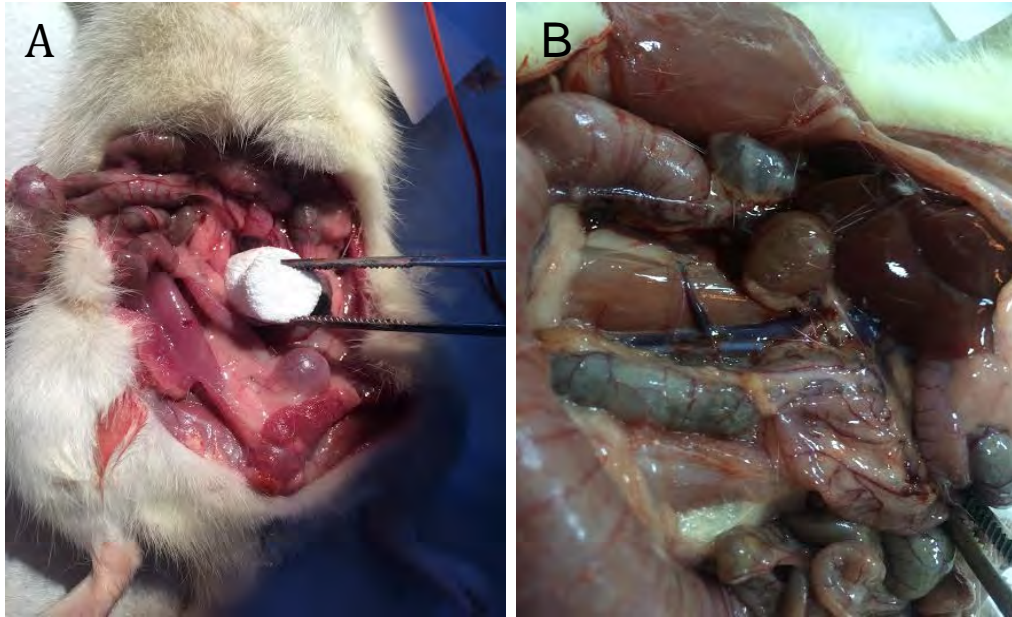
**Şekil 4.36.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeline SF kaplı Kao/BS/KTS uygulaması ve sonrası.

SF kaplı Vit K/BS/KTS uygulanan femoral arter bölgesi Şekil 4.37'de görülmektedir. Bu grupta da uygulama sonrası kanama bölgesindeki kanama durdurulabilmiş ve bölgede stabilizasyon sağlanmıştır.



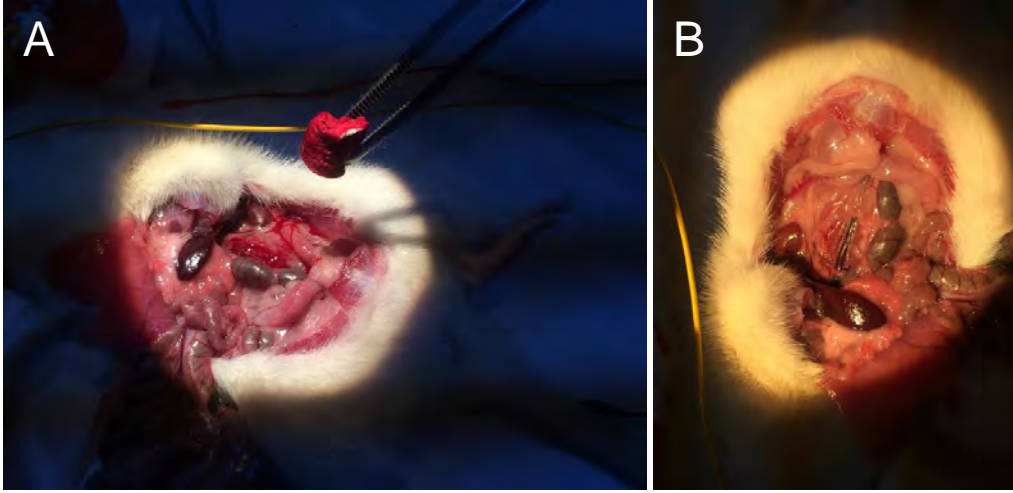
**Şekil 4.37.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı Vit K/BS/KTS uygulaması ve sonrası.

Şekil 4.38 ve 4.39'da ise uygulanan BS/KTS ve SF kaplı PS/BS/KTS hemostatik örtülerin ve uygulama sonrası bölgenin fotoğrafları verilmiştir. Her iki hemostatik örtü malzemesi de femoral arter de başarıyla hemostazı sağlayabilmiştir.



**Şekil 4.38.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde BS/KTS uygulaması ve sonrası.





**Şekil 4.39.** Sağlıklı ratlarda oluşturulan kanama modelinde SF kaplı PS/BS/KTS uygulaması ve sonrası.

#### **4.10.2. Diyabetik Ratlarda Femoral Arter Kanama Modeli**

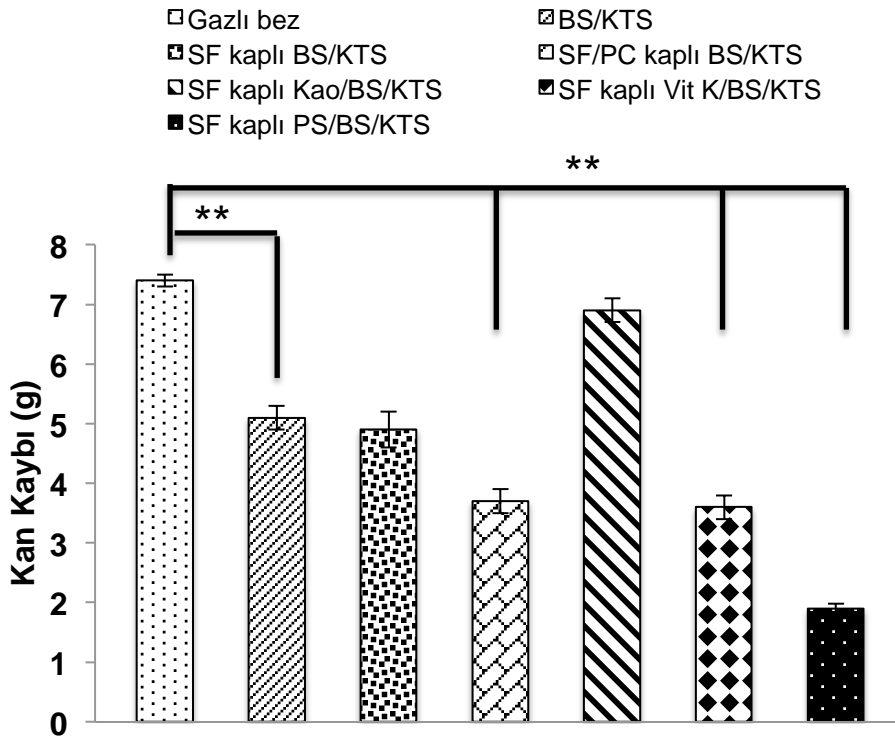
Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinin aynısı diyabetik ratlarda da oluşturulmuş ve hazırlanan hemostatik ajanların etkinliği bu modelde de denenmiştir. Diyabet oluşturulan hayvanların genel görüntüsü Şekil 4.40'da verilmiştir. Sağlıklı ratlar ile yapılan deneylerde elde edilen hemostazı oluşturma süresi, kan kaybı miktarı ve uygulama boyunca hayatta kalma yüzdesi verileri diyabetik ratlar için de oluşturulmuştur. Şekil 4.41'de diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde kullanılmak üzere hazırlanan hemostatik ajanların kanamayı durdurma süreleri verilmiştir. BS/KTS ve SF kaplı Kaolin/BS/KTS dışında hazırlanan hemostatik örtülerin kanamayı durdurma süreleri gazlı beze kıyasla anlamlı olarak farklıdır ( $p < 0.05$ ). Kaolin katkılı grup ile kıyaslandığında SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS içeren hemostatik örtüler daha iyi bir süre kaydetmiştir ( $p < 0.05$ ). En kısa hemostaz süresine 138 saniye ile Vit K ve 144 saniye ile SF kaplı BS/KTS ulaşmıştır.



olmuştur. Aynı şekilde kaolin katkılı olan grup diğer kompozit BS/KTS hemostatik ajanlara nazaran daha kötü bir performans sergilemiştir.

Diyabetik ve sağlıklı ratlarda alınan hemostaz süresi ve toplam kan kaybı baz alındığında diyabetik grupta sağlıklı olanlara kıyasla bir uzama ve artış söz konusudur.

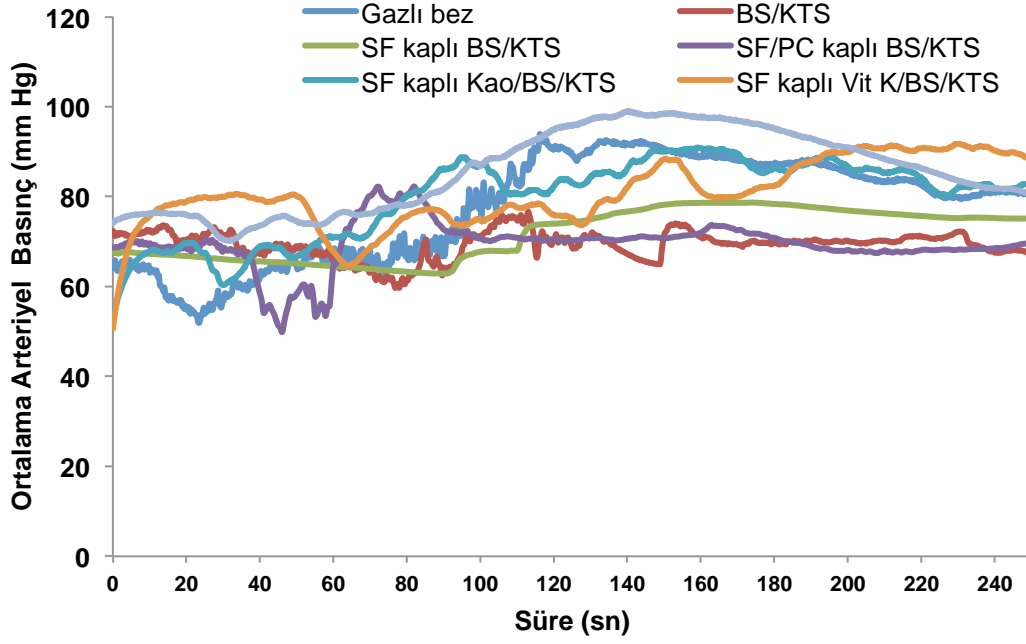
Nnah ve arkadaşları endojen 4 medikal bitkinin yaprak ekstraktlarının hemostatik özelliklerini alloxan ile indüklenmiş diyabetik ratlar üzerinde araştırmışlardır. Toplam kanama süresi, kanamayı durdurma ve platelet yapışması yönünden ekstraktların etkinliklerini incelemişlerdir. Sağlıklı ratlara kıyasla diyabetik ratlarda pıhtılaşma ve total kanama süresinde kontrole kıyasla artış gözlemlenmiştir [228].



**Şekil 4.42.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra oluşan kan kaybı (\*\*:  $p < 0.005$ ).

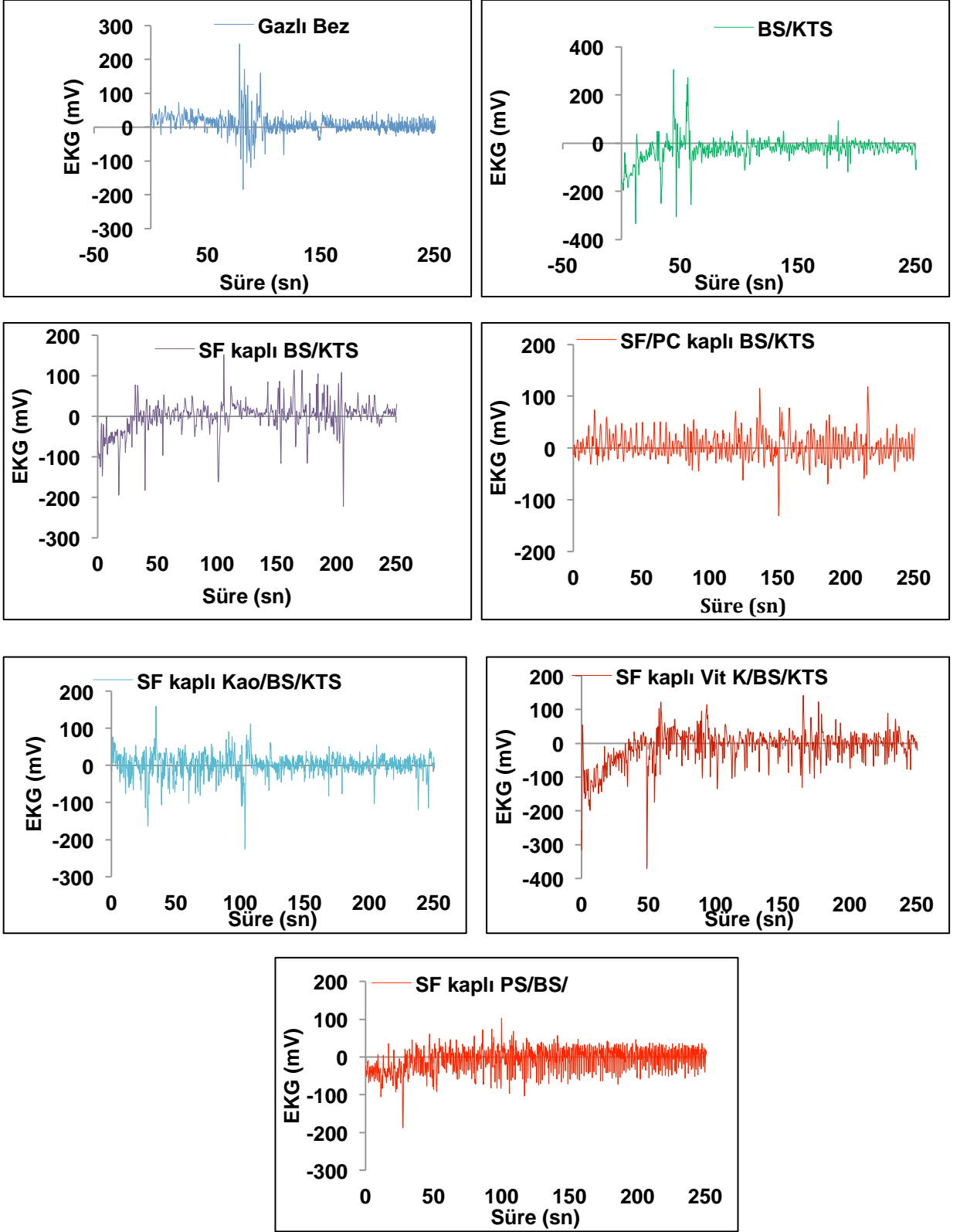
Şekil 4.43'de diyabetik ratlarda femoral arter kanama modelinin oluşturulması ve hemostatik ajanların uygulanması boyunca alınan ortalama arteriyel basınç değerleri verilmiştir. Femoral arterde kanama oluşturulmasını takiben arteriyel basınçta bir düşüş meydana gelmiştir ve uygulama sonrası basınç eski değerini

kazanarak normal seyirlerde devam etmiştir. Gazlı bez grubunda bu düşüş diğer gruplara kıyasla daha fazla olmuştur. Her iki grupta da hem sağlıklı hem de diyabetik ratlarda ortalama olarak hemostatik ajan uygulanan gruplarda kanama müdahale öncesi ve sonrasında ratların yaşamlarını tehdit edici basınç değişiklikleri olmamıştır.



**Şekil 4.43.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince ortalama arteriyel basınç.

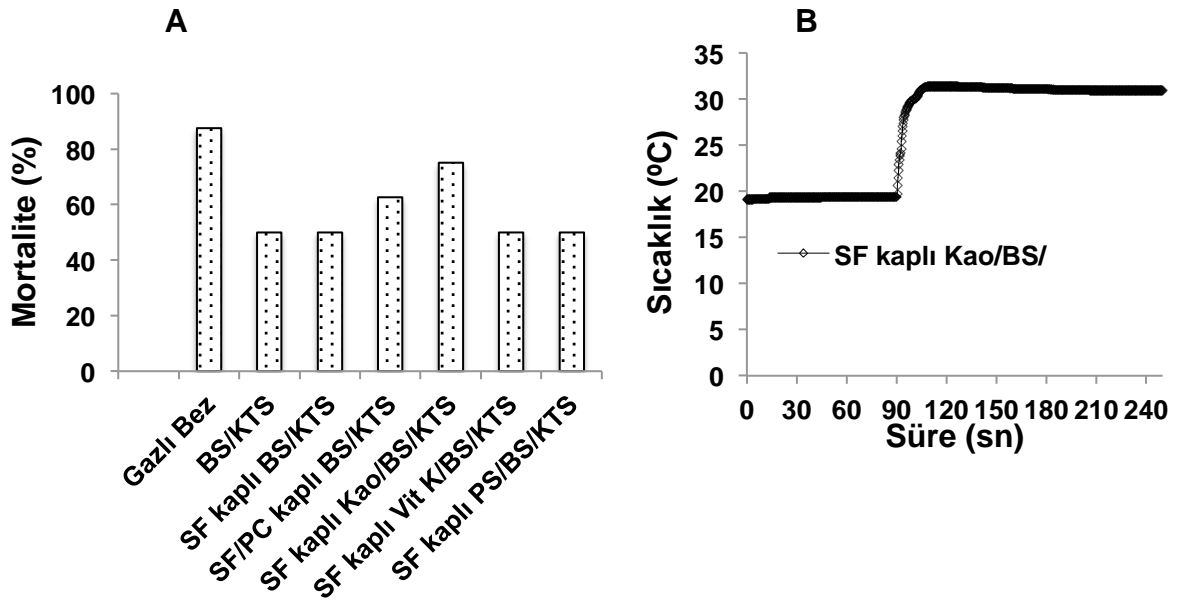
Şekil 4.44'de diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG grafikleri verilmiştir.



**Şekil 4.44.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri.

Şekil 4.45A'da ise diyabetik ratlardaki mortalite yüzdeleri verilmiştir. Gazlı bez 8 hayvandan sadece birisinin hayatta kalmasını sağlarken kompozit gruplarda uygulama yapılan hayvanların 8'inden 4'ü hayatta kalabilmiştir. Bu oran sağlıklı hayvanların yüzdesine bakıldığında biraz düşüktür.

Kaolin uygulamasına bağlı olarak kanama bölgesinde ölçülen sıcaklıklar Şekil 4.45B'de sunulmuştur. Sağlıklı ratlarda olduğu gibi 20 °C'den 31 °C'e kadar artış gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.45.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli sonrası ölüm oranları (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS'de uygulama sırasındaki sıcaklık değişimi (B).

Çizelge 4.8.'de diyabetik ratların kan gazı analizleri sonucu elde edilen glukoz, laktat ve kreatin değerleri verilmiştir. STZ (streptozisin) ile indüklenen diyabetik ratlarda yapılan bir çalışmada glukoz için ortalama değer  $611 \pm 32.78$  (mg/dl), laktat için  $3.18 \pm 0.03$  (mmol/L), kreatin için  $0.55 \pm 0.06$  (mg/dL) olarak bulunmuştur [222]. Glikoz ve kreatin için uygulama sonrası kan gazından elde edilen metabolik değerler diyabetik bir rat için normal sınırlardadır. Ancak laktat değeri SF/PC kaplı BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS'de artmıştır.

**Çizelge 4.8.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan metabolit değerleri.

Gruplar	Metabolit		
	Glu(mg/dL)	Lac(mmol/L)	Krea( $\mu$ mol/L)
<b>BS/KTS</b>	484.5 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.3	8 $\pm$ 0.11
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	531 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.6	21 $\pm$ 0
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	607 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 0.2
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	574.5 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.2	23 $\pm$ 0.8
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	467 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.2	31 $\pm$ 0.1
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	539 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.1	26.5 $\pm$ 0.3
<b>Gazlı Bez</b>	525.5 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.1	14.5 $\pm$ 0.1

Diyabetik ratlardaki femoral arter kanama modelinde hemostaz sağlandıktan sonra alınan kan gazı değerleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. Diyabetik ratlar ile yapılan bir çalışmada pH, pCO<sub>2</sub>. ve pO<sub>2</sub> için alınan ortalama değerler sırasıyla şöyledir; 7.35 $\pm$ 0.15, 41 $\pm$ 3 mm Hg, 150 $\pm$ 10 mm Hg [227]. Çalışmada alınan veriler bu bilgi ile uyumludur. Ancak pCO<sub>2</sub> değerleri SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS gruplarında artmıştır.

**Çizelge 4.9.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan gazı değerleri.

Gruplar	Gazlar					
	pH	pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	pO <sub>2</sub> (mm Hg)	cHCO <sub>3</sub> (mmol/L)	BE (ecf) (mmol/L)	cSO <sub>2</sub> (%)
<b>BS/KTS</b>	7.3 ±0.03	51±0.13	83±0.1	28.6.5±0.5	3.2±0.49	94.7±0.39
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	7.4±0.01	43.5±0.1	83.6±0.7	27.6±0.4	3.05±0.4	96.2±0.9
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	7.2±0.2	85.4±0.5	57±0.3	32.5±0.2	4.9±0.1	67.6±0.3
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	7.3±0.03	47.9±0.5	97.6±0.4	27.5±0.6	2.2±0.07	97.2±0.07
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	7.44±0.04	46.3±0.2	99.2± 0.01	31.7±0.1	7.6± 0.1	97.6±0.1
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	7.3±0.2	61.8±0.3	69.3±0.5	28.1±0.3	1.7± 0.1	68.8±0.4
<b>Gazlı Bez</b>	7.3±0.06	52.8±0.3	91.5±0.04	31.05±0.2	5.9±0.3	96.6±0.1

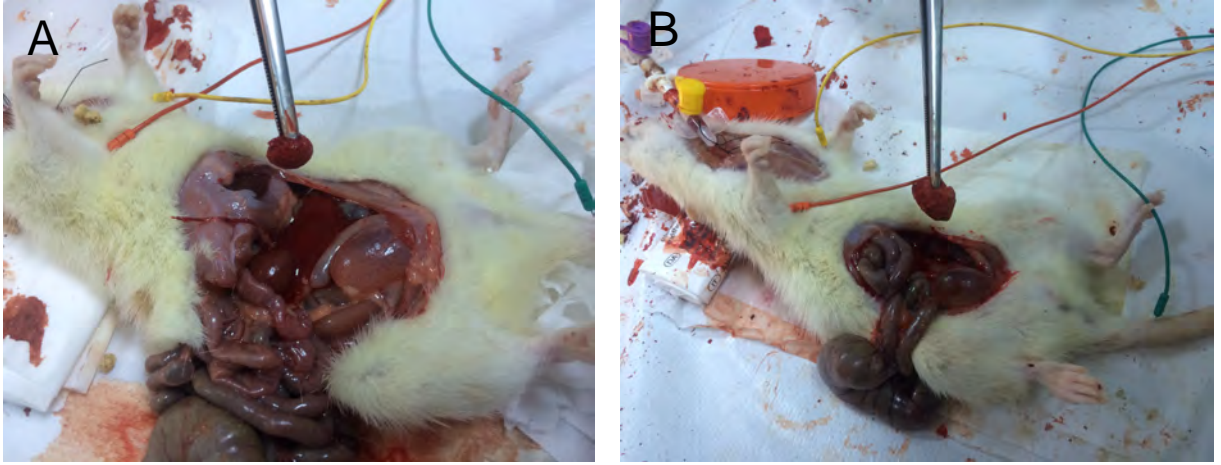
Çizelge 4.10'da ise hemostaz sonrası alınan kan gazındaki elektrolit konsantrasyonları sunulmuştur. Diyabetik bir rat için alınan normal elektrolit değerleri şöyledir; Na<sup>+</sup> 129.7±11.3, K<sup>+</sup> 23.7±11.51, Cl<sup>-</sup> 101.75±3.59, Hct (%) 39.17±2.78, cHgb (g/dl) 14.77±0.73 [226]. Sonuçlara bakıldığında Na<sup>+</sup> elektroliti konsantrasyonunda tüm gruplar bazında bir artış söz konusudur. Diğer parametreler beklenen değerlerde seyretmektedir.



**Çizelge 4.10.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde hazırlanan hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra alınan kan kimyası değerleri.

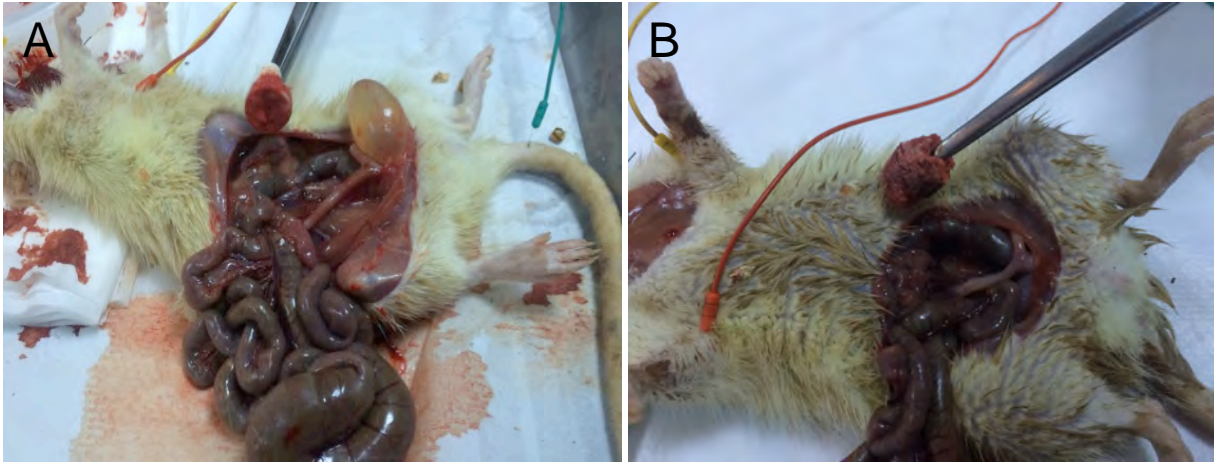
Gruplar	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Ca <sup>++</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	cTCO <sub>2</sub> (mmol/L)	Hct (%)	cHgb (g/dL)
<b>BS/KTS</b>	144 ±0.4	4.05±0	1.3±0	101.5±0.2	30.2±0.5	38.5±0.2	13.2±0.7
<b>SF kaplı BS/KTS</b>	146±0.2	3.8±0.4	1.1±0.1	105.5±0.3	29±0.5	38.5±0.3	13.1±0.1
<b>SF/PC kaplı BS/KTS</b>	141±0.1	4.9±0.8	1.3±0.1	103±0.1	35.1±0.4	40±0.2	13.4±0.9
<b>SF kaplı Kao/BS/KTS</b>	142±0.0	3.8±0.4	1.4±0	100.5±0.7	29±0.7	38.5±0.7	13.0±0.2
<b>SF kaplı PS/BS/KTS</b>	141.5±0.7	4.3±0.2	1.3± 0	99.5± 0.7	33.1± 0.1	37.5±0.2	12.7± 0.6
<b>SF kaplı Vit K/BS/KTS</b>	148.5±0.1	4.5±0.1	0.8±0.4	111±0.7	30±0.4	39±0.2	13.3± 0.9
<b>Gazlı Bez</b>	142±0.1	4.2±0.2	1.3±0.02	101±0.1	32,6±0.2	38±0.14	12.9±0.4

Şekil 4.46-49'da diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde uygulanan hemostatik örtülerin ve kanama bölgesinin fotoğrafları verilmiştir. Şekil 4.46'da gazlı bez uygulaması görülmektedir. Uygulama sonrası femoral arter bölgesinde kanama durdurulamamış ve hemostaz sağlanamamıştır.



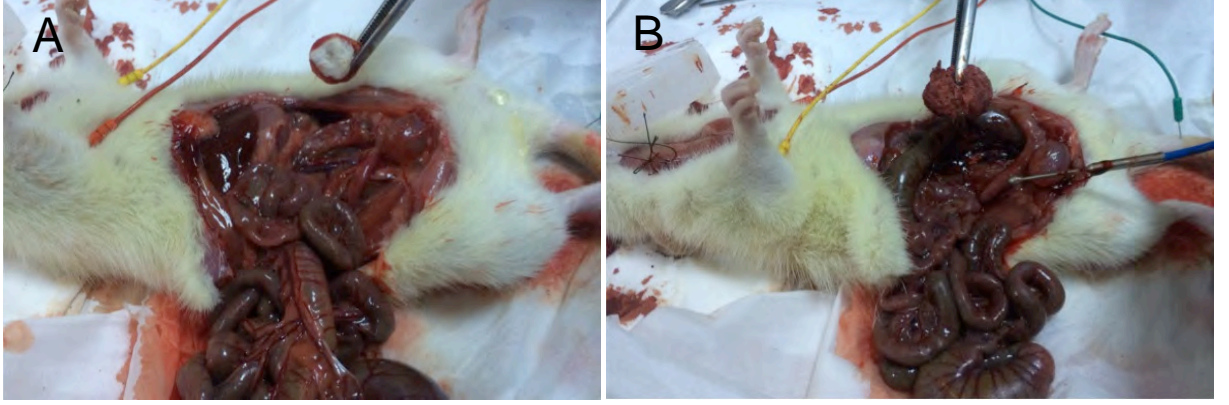
**Şekil 4.46.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde gazlı bez uygulaması ve sonrasında oluşan kan kaybı (A ve B).

BS/KTS (A) ve SF kaplı BS/KTS (B)'in femoral arterdeki kanamaya uygulandığı sonrası Şekil 4.47'de verilmiştir. Bu hemostatik ajanlar kullanılarak hemostaz başarıyla sağlanmış ve bölgede herhangi bir kan sızıntısına rastlanmamıştır.



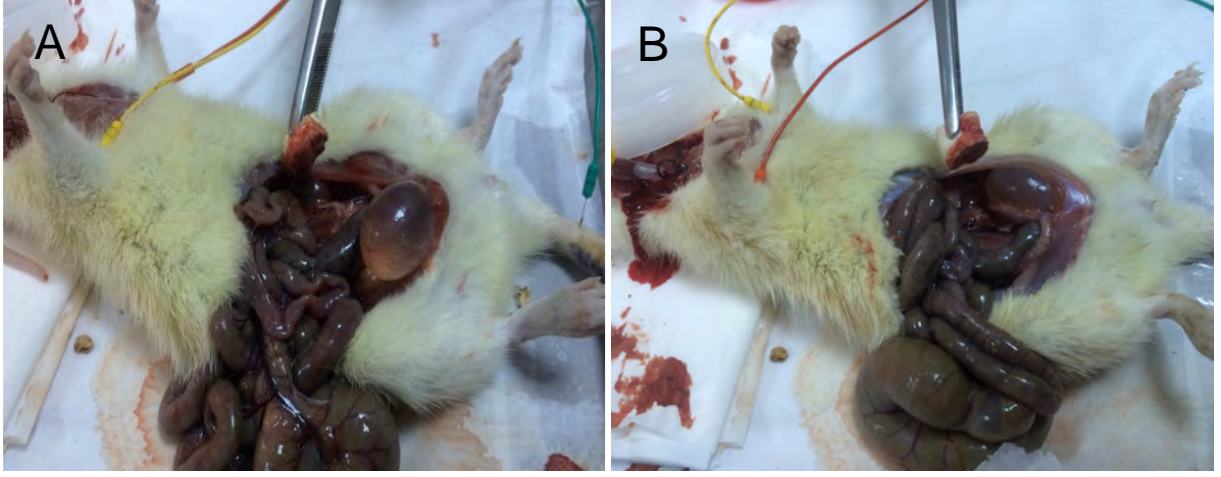
**Şekil 4.47.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde BS/KTS (A) ve SF kaplı BS/KTS (B) uygulaması sonrası.

SF/PC kaplı BS/KTS (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS (B)'in uygulaması Şekil 4.48'de verilmiştir. SF/PC kaplı BS/KTS'nin kanama sonrası hala bir kısmı kuru kalırken kaolin içeren grup tamamen kanı absorbe etmiş ve formunu kaybetmiştir. Bu grubun uygulandığı bölgede küçük kan sızıntıları kendini göstermektedir.



**Şekil 4.48.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF/PC kaplı BS/KTS (A) ve SF kaplı Kao/BS/KTS (B) uygulaması sonrası.

Şekil 4.49'da Vit K/BS/KTS (A) ve SF kaplı PS/BS/KTS (B) uygulaması fotoğrafları sunulmuştur. Her iki grup da başarıyla hemostazı sağlayabilmiş ve bölgede tekrardan oluşabilecek kanamanın önüne geçilebilmiştir.

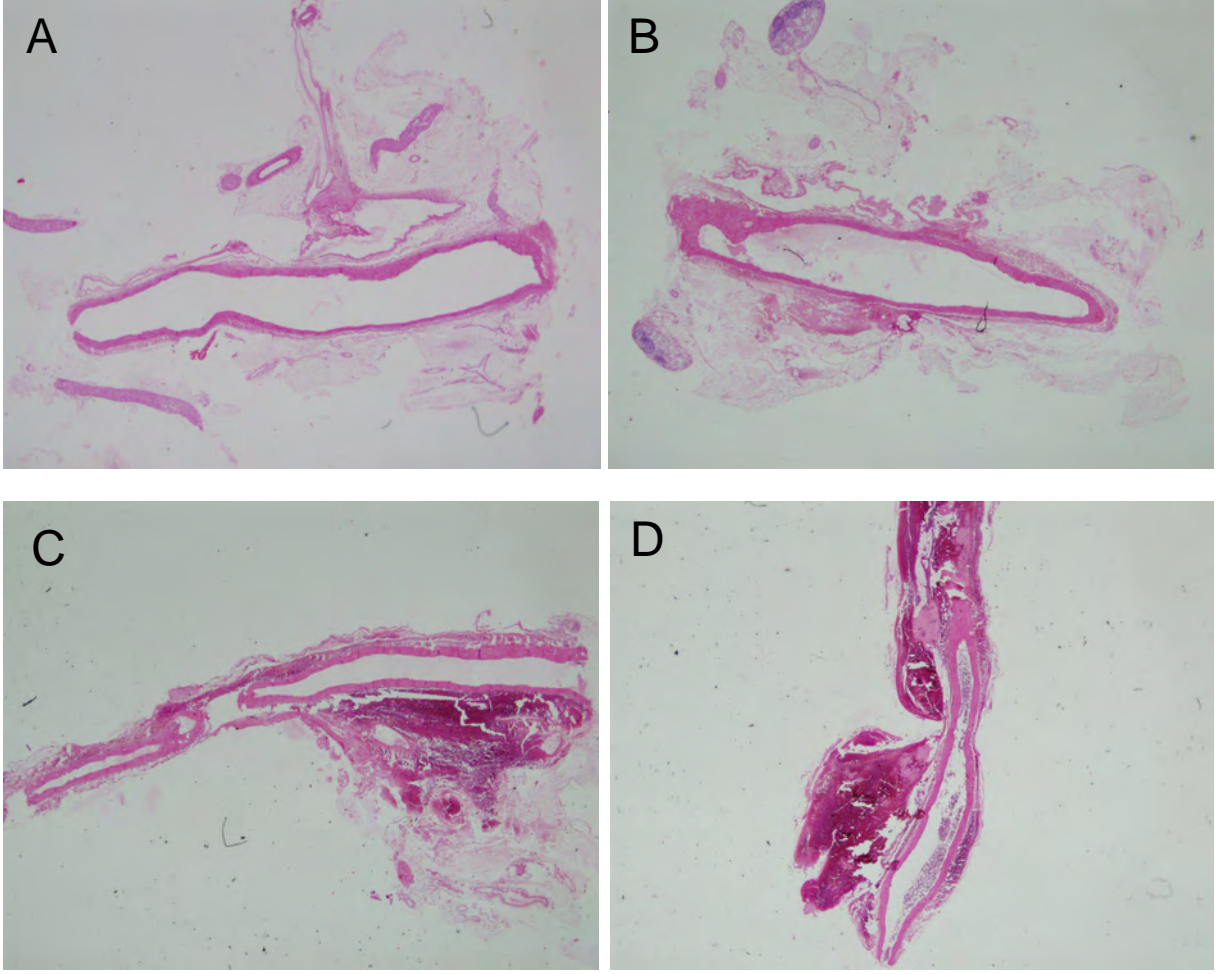


**Şekil 4.49.** Diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde SF kaplı Vit K/BS/KTS (A) ve SF kaplı PS/BS/KTS (B) uygulaması sonrası.

#### 4.11. Histolojik İncelemeler

##### 4.11.1. Sağlıklı Ratlarda Oluşturulan Femoral Arter Kanama Modelinde Histolojik İncelemeler

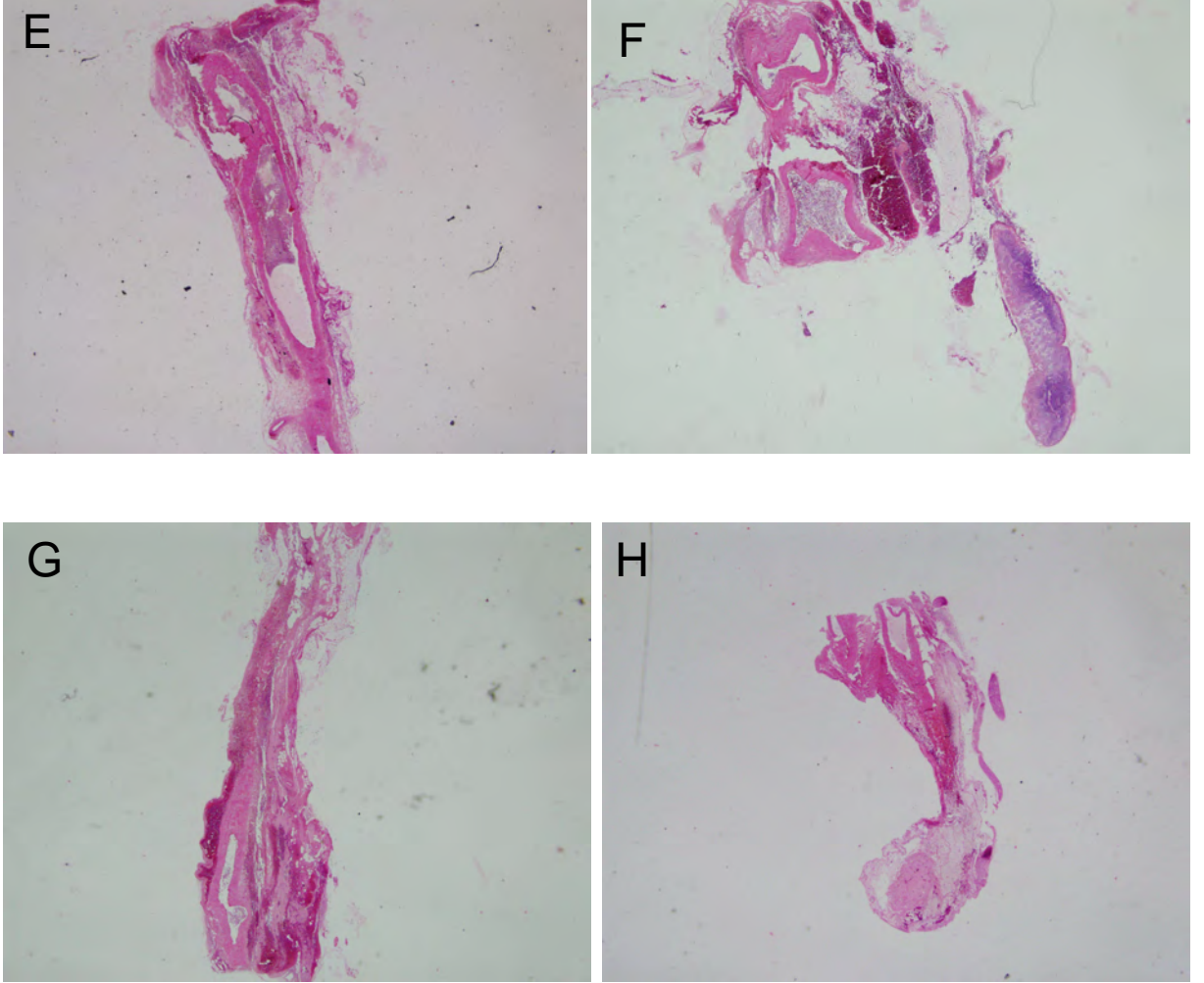
Uygulama sonrasında femoral arterden alınan dokular, kesit alma işlemlerinden sonra hematoksilin-eozin ile boyanarak bölgede oluşan inflamasyon cevabı araştırılmıştır. Şekil 4.50-A'da herhangi bir uygulama yapılmamış femoral arter kesiti verilmiştir. Kesitlerde damar duvarı oldukça belirgindir. B'de ise gazlı bez uygulaması sonrası alınan doku kesiti görüntüsü yer almaktadır. Damar duvarının dışında hemen iki yanında daha koyu-mor renkle boyanan inflamasyon görüntüsü farkedilmektedir. Şekil 4.50-C-D'de ise saf BS/KTS ve SF kaplı BS/KTS uygulaması sonrası boyanan dokular görülmektedir. Her iki grupta da herhangi bir inflamasyon varlığına rastlanmamıştır.



**Şekil 4.50.** Sağlıklı ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (A) Kontrol, (B) Gazlı bez, (C) BS/KTS, (D) SF kaplı BS/KTS.

Şekil 4.51’de de SF/PC kaplı BS/KTS (E), SF kaplı Kao/BS/KTS (F), SF kaplı Vit K/BS/KTS (G), SF kaplı PS/BS/KTS (H) uygulaması sonrası hematoksilen-eozin ile boyanan doku fotoğrafları verilmiştir. Şekil 4.51’de de SF/PC kaplı BS/KTS (E), SF kaplı Kao/BS/KTS (F), SF kaplı Vit K/BS/KTS (G), SF kaplı PS/BS/KTS (H) uygulaması sonrası hematoksilen-eozin ile boyanan doku fotoğrafları verilmiştir. SF/PC kaplı damar kesitinde herhangi bir inflamasyon cevabı gözlemlenmezken özellikle kaolin katkılı grupta büyük, geniş bir inflamasyon bölgesi görülmektedir. Literatürde alümina silikat türevli hemostatik ajanların oluşturdukları ekzotermik reaksiyondan dolayı uygulama bölgesinde sıcaklığın arttığı ve yangılara neden olduğu bilinmektedir [229].

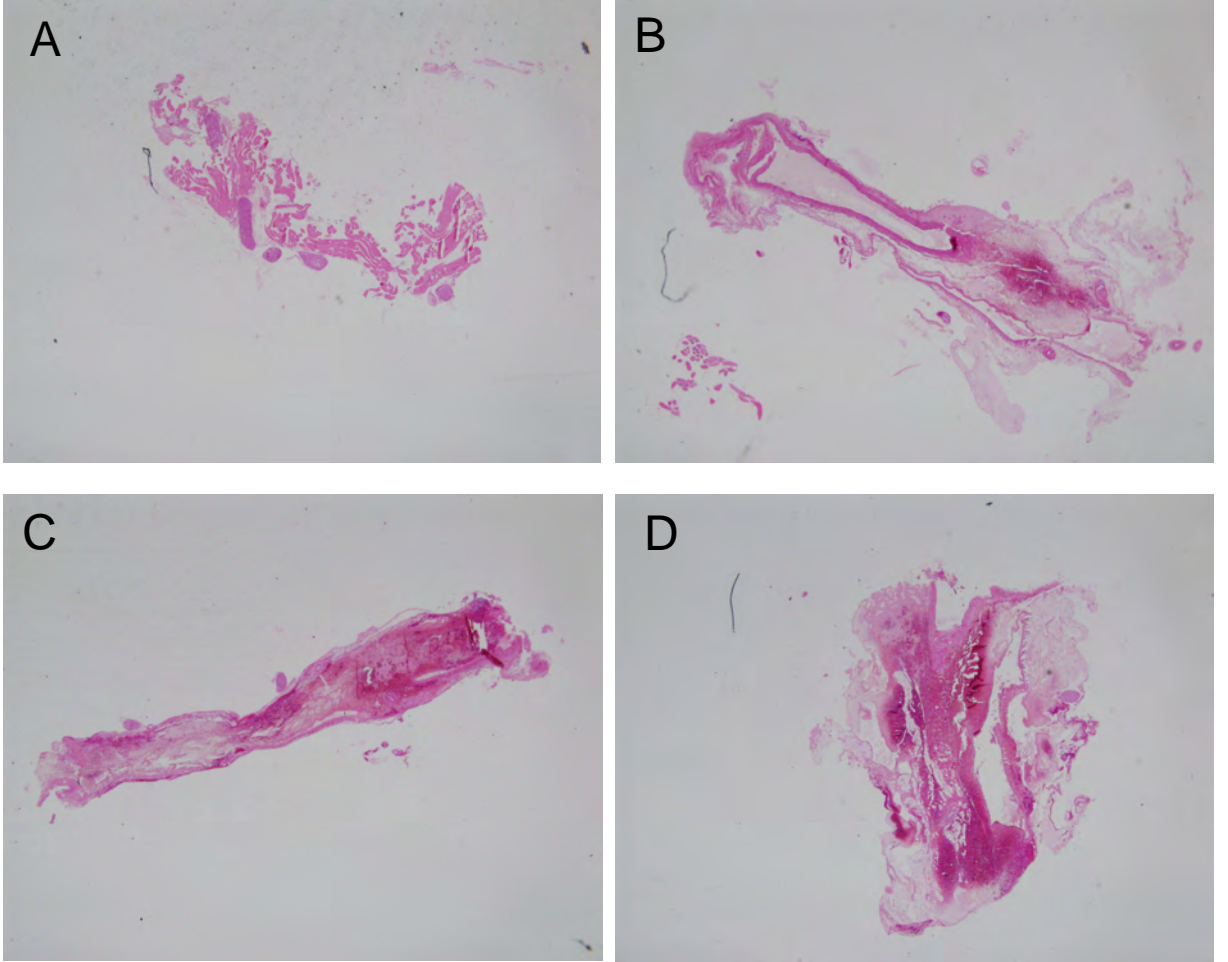
SF kaplı Vit K/BS/KTS (G), SF kaplı PS/BS/KTS (H) uygulaması sonrası hematoxilen-eozin ile boyanan damar kesitleri incelendiğinde her iki grup da herhangi bir inflamasyon cevabı oluşmamıştır.



**Şekil 4.51.** Sağlıklı ratlarda hematoxilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (E) SF/PC kaplı BS/KTS, (F) SF kaplı Kao/BS/KTS, (G) SF kaplı Vit K/BS/KTS, (H) SF kaplı PS/BS/KTS.

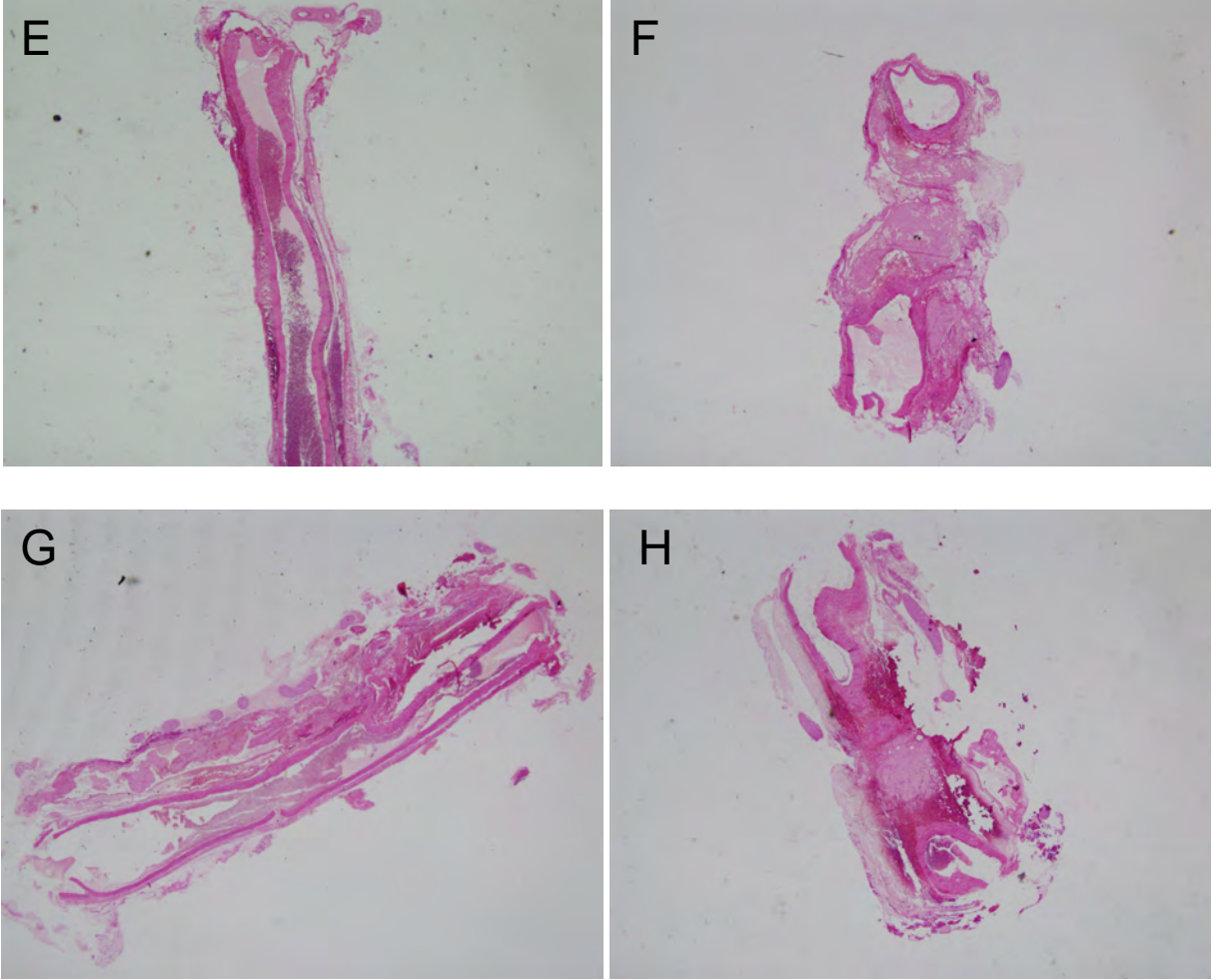
#### 4.11.2. Diyabetik Ratlarda Oluşturulan Femoral Arter Kanama Modelinde Histolojik İncelemeler

Şekil 4.52'de diyabetik ratlardan alınan femoral arter doku kesitleri verilmiştir. Gazlı bez BS/KTS, SF kaplı BS/KTS gruplarında herhangi bir inflamasyon varlığına rastlanmamıştır.



**Şekil 4.52.** Diyabetik ratlarda hematoksilin-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (A) Kontrol, (B) Gazlı bez, (C) BS/KTS, (D) SF kaplı BS/KTS.

Şekil 4.53'de ise SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Kao/BS/KTS, SF kaplı Vit K/BS/KTS, SF kaplı PS/BS/KTS'nin dokudaki cevabı görüntülenmiştir. Grupların tümünde herhangi bir inflamasyon cevabına rastlanmamıştır. Kaolin katkılı olan grupta da uygulanan hemostatik ajana karşı bir yanıt oluşmamıştır.



**Şekil 4.53.** Diyabetik ratlarda hematoksilen-eozin ile boyanan femoral arter doku kesitleri: (E) SF/PC kaplı BS/KTS, (F) SF kaplı Kao/BS/KTS, (G) SF kaplı Vit K/BS/KTS, (H) SF kaplı PS/BS/KTS.



## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- ✓ Hazırlanacak hemostatik ajanın alt katmanını oluşturacak olan selüloz, "*Acetobacter xylinum*" bakterisinden Hestrin-Schram ortamında üretilmiştir ve sonrasında saflaştırılmıştır.
- ✓ Sentezlenen selülozun IR spektrumunda yapıdaki O-H, COOH, karbonil grup ve C-O-C gerinimine ait olan pikler elde edilmiştir. Morfolojik yüzey karakterizasyonu ise SEM ve AFM ile yapılmıştır. Alınan SEM ve AFM görüntülerinde bakteriyel selüloz yapısı fibriler bir yüzey morfolojisi göstermektedir. Alınan görüntüler yüksek yüzey alanı ile birlikte nanofiberlerin dağılımını desteklemektedir.
- ✓ Hazırlanan saf ve kompozit hemostatik ajanların sulu ortamda stabilitesini sağlayabilmek için ajanlar 70 C°de 1 gece boyunca epiklorhidrin buharına maruz bırakılmıştır. Epiklorhidrin ile çapraz bağlama işlemi öncesi ve sonrası alınan spektrumlar karşılaştırılmıştır. Kitosanın ECH ile çapraz bağlama işlemi sonrası 1632 cm<sup>-1</sup>'de bir amin deformasyonu olmuştur ve C-N gerinim bandındaki (1406 cm<sup>-1</sup>) artış kitosanın NH<sub>2</sub> gruplarındaki çapraz bağlanmayı desteklemektedir. Ayrıca C-O gerinimine karşılık gelen 1085 cm<sup>-1</sup>'de elde edilen pik artmış ve genişlemiştir. Bu yüksek sıcaklıklar altında OH gruplarının çapraz bağlandığını göstermektedir.
- ✓ Saf BS/KTS hemostatik ajanların SEM ile yapılan morfolojik karakterizasyonlarında açık ve birbiriyle bağlantılı bir por yapısı görülmüştür. Üç boyutlu poröz alt katmanın iç duvar yapısı incelendiğinde fibriler görüntü de göze çarpmaktadır. Ayrıca ECH buharı ile yapılan çapraz bağlama işleminin yapıda bir deformasyona neden olmadığı alınan görüntülerden de anlaşılmaktadır.
- ✓ Kaolin, vitamin K ve protamin sülfat katkılı kompozit hemostatik ajanların ECH buharı ile çapraz bağlanma öncesi ve sonrası FTIR spektrumları alınmıştır.

Her ajan için tipik pikler alınmıştır. ECH buharının yapıda bir etkisi görülmemiştir.

- ✓ Nanofibriler örtü ile kaplanmış bilayer saf ve kompozit hemostatik ajanların hazırlanması için poröz yapıların yüzeyi elektroçirime yöntemiyle kaplanmıştır. Kaplamada kullanılan saf ipek fibroinin ve ipek fibroin/fostatidilkolin karışımının elektroçirilmesiyle elde edilen tabakaların SEM görüntüleri alınmış ve fiber çap dağılımları hesaplanmıştır. Hem ipek fibroin hem de ipek fibroin/fostatidilkolin yapısında birbiriyle bağlantılı, poröz, defekt olmayan bir fiber morfolojisi elde edilmiştir. Ortalama çaplar; ipek fibroin için 450 nm, ipek fibroin/fostatidilkolin ikilisi için 750 nm olarak bulunmuştur. SF/PC blendin alınan FTIR spektrumun da her iki bileşenin de spesifik pikleri görülmüştür.
- ✓ BS/KTS alt katman üzerine SF ve SF/PC nanofibriler üst tabaka olacak şekilde bilayer tabakanın enine kesit SEM görüntüleri alınmıştır. İki tabakalı yapı bütün gruplarda görülmektedir. Yüksek derecede birbiriyle bağlantılı porlarla, açık bir por mikro yapısı elde edilmiştir.
- ✓ Hazırlanan saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların % porozite değerlerine ve ortalama por çapı dağılımlarına civalı porozimetre ile bakılmıştır. Gruplar arası % porozite değerleri yaklaşık birbirine yakındır (~%80). Sadece protamin sülfat katkılı olan grupta porozite değeri %  $67 \pm 0.4$  olarak bulunmuştur.
- ✓ Hemostatik ajanların alınan por çapı ( $\mu\text{m}$ ) histogramlarına göre tüm gruplarda por çapı 0-250  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. Bu sonuç yapıya kaolin, vitamin K ya da protamin sülfat katkılanmasının por boyut ve dağılımında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı yönünde yorumlanmaktadır.
- ✓ Hemostatik ajanların kuru ve ıslak halde iken basma testi yapılarak mekanik özellikleri incelenmiştir. Kuru halde iken uygulanan kuvvet ve deformasyon yüzdeleri bakımından incelendiğinde en dayanıksız olarak SF kaplı BS/KTS

gözükmektedir. BS/KTS ve SF/PC kaplı BS/KTS ajanlar uygulanan kompresyona karşı verdikleri cevap bakımından benzerdir. SF kaplı Vit K/BS/KTS bu gruba göre daha iyi bir mekanik özellik göstermektedir. Oda koşullarında kuru hemostatik ajanlar ile yapılan testte en iyi cevabı SF kaplı PS/SF/KTS ve Kaolin/BS/KTS göstermektedir.

- ✓ Hemostatik ajanların ıslak halde iken mekanik özelliklerine bakıldığında ise BS/KTS, SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/SF/KTS gruplarının vermiş olduğu cevaplar benzerdir. SF kaplı Kaolin/BS/KTS kuru formda gösterdiği başarıyı gösterememiştir. Bu koşullarda en iyi performansı SF/PC kaplı ve SF kaplı Vit K/BS/KTS göstermiştir.
- ✓ Hemostatik ajanlar 10 gün boyunca PBS içerisinde bekletilerek su alım yüzdeleri hesaplanmıştır. 10. gün sonunda Kao/BS/KTS'ye kıyasla BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS daha iyi su alım yüzdesi sergilemiştir ( $p < 0.05$ ). Test sürecince alınan PBS absorplama yüzdeleri göz önüne alındığında BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS/BS/KTS gruplarının SF/PC kaplı BS/KTS'ye göre özellikle Kaolin/BS/KTS'a kıyasla anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur.
- ✓ Hemostatik ajanların in vitro koagülatif özelliklerini ölçmek için sağlıklı ve diyabetik ratların plazmasında PTZ ve aPTT testleri çalışılmıştır. BS/KTS ve kaolin katkılı olan ajanlarda PTZ süresi alınmış ancak aPTT süreleri alınamamış, pıhtılaşma gözlemlenememiştir. SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K gruplarında PTZ ve aPTT süreleri alınamamıştır. Bu durum plazma ile etkileşen bu gruplarda pıhtılaşma faktörlerinin hemostatik ajanlar tarafından toplanması olarak yorumlanmıştır. Plazma ile etkileştirildikten sonra alınan fotoğraflarda bunu destekler niteliktedir. Hemostatik ajanların etrafında jel benzeri bir yapı oluşmuştur.
- ✓ Diyabetik grupta yine SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K BS/KTS gruplarında plazma ile etkileşim sonrası PTZ ve aPTT süreleri alınamamıştır. Sağlıklı rat plazması ile etkileştirilen hemostatik ajanların etrafında görülen jel

benzeri yapı diyabetik rat plazması deneylerinde de görülmüştür. Sağlıklı ratlardan alınan kan plazması testlerine kıyasla diyabetik ratlarda uzayan bir pıhtılaşma süresi tanımlanmıştır.

- ✓ Sağlıklı ve diyabetik rat plazması ile hemostatik ajanlar üzerine yapışan platelet konsantrasyonunu belirlemek için LDH aktivitesi çalışılmıştır. Alınan sonuçlara göre SF kaplı Kaolin ve PS/BS/KTS örtüler üzerindeki LDH aktivitesi dolayısıyla platelet adhezyonu gazlı beze kıyasla anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Yine BS/KTS, SF kaplı BS/KTS ve Vit K/BS/KTS, SF/PC kaplı BS/KTS ile gazlı bez arasında alınan LDH konsantrasyonu bakımından anlamlı bir fark vardır ( $p < 0.005$ ). Saf ve kompozit BS/KTS örtüler kıyaslandığında ise SF kaplı PS/BS/KTS'in SF/PC kaplı ve SF kaplı BS/KTS'ye kıyasla LDH aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). SF kaplı Vit K/BS/KTS, BS/KTS, SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Kaolin/BS/KTS'a göre daha iyi bir LDH aktivitesi sergilemiştir ( $p < 0.005$ ).
- ✓ Hemostatik ajanlar üzerine yapışan plateletler SEM ile karakterize edilmiştir. Özellikle kompozit BS/KTS örtüler üzerinde BS/KTS ve SF kaplı Kaolin/BS/KTS'ye kıyasla daha çok platelet agregasyonu ve yayılımı gözlemlenmiştir.
- ✓ Diyabetik ratların LDH aktivitelerine bakıldığında SF ve SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K/BS/KTS üzerine yapışan plateletlerin aktivitesi gazlı beze kıyasla anlamlı bir farklılık göstermektedir ( $p < 0.005$ ). SF kaplı BS/KTS kaolin katkılı kompozit gruba ( $p < 0.005$ ) ve SF/BS'ye nazaran anlamlı bir platelet konsantrasyonunu üzerinde toplayabilmiştir ( $p < 0.05$ ). Ancak sağlıklı rat plazması ile diyabetik rat plazmasının LDH aktivite değerleri genel olarak incelendiğinde diyabetik rat plazması ile etkileştirilen hemostatik ajanlar sağlıklı rat plazması ile kıyaslandığında daha düşük bir LDH aktivitesi sergilemiştir.
- ✓ Diyabetik ratlardan alınan kan plazması ile etkileştirilen saf ve kompozit BS/KTS hemostatik örtülerin SEM görüntüleri platelet adhezyonu bakımından incelendiğinde kompozit BS/KTS örtüler üzerine BS/KTS'a kıyasla daha çok

platelet yapıştığı alınan görüntülerden de anlaşılmaktadır. Buradan nanofibriler yüzeyin platelet adhezyonunu iyileştirdiği yönünde bir sonuca varılabilir.

- ✓ Sağlıklı ratlarda yapılan tam kan ve PRP absorplama çalışmalarında en yüksek tam kan ve plazma absorplama yüzdesini sırasıyla  $1738 \pm 20$  ve  $1736 \pm 20$  ile protamin sülfat katkılı olan grup göstermiştir. Saf ve kompozit hemostatik ajanların hem PRP'yi hem de tam kanı absorplama yüzdeleri gazlı beze kıyasla anlamlı derecede farklı çıkmıştır ( $p < 0.05$ ). Ayrıca PRP absorplama da tüm grupların kaoline kıyasla yüzdelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). PRP ve tam kan absorpsiyon profili bakımından gruplar açısından bir farklılık yoktur.
- ✓ Diyabetik tam kan ile yapılan in vitro absorpsiyon testi sonuçlarına bakılacak olursa en yüksek absorplama yüzdesini SF kaplı Vit K ve PS/BS/KTS göstermiştir. SF kaplı PS/BS/KTS'nin absorplama yüzdesi  $2214 \pm 56$  olarak bulunmuştur. PRP'de ise en yüksek absorplama yüzdesini ise SF/PC kaplı BS/KTS ve SF kaplı BS/KTS göstermiştir. Sağlıklı bireylerde olduğu gibi diyabetik ratlarda da saf ve kompozit BS/KTS hemostatik ajanların absorpsiyon yüzdeleri gazlı beze kıyasla anlamlı derecede farklı bulunmuştur.
- ✓ Tam kan ve PRP absorplama yüzdelerini sağlıklı ve diyabetik bireylerde kıyasladığımızda grupların diyabetik kanda alınan değerleri daha iyidir. Örneğin SF kaplı PS/BS/KTS'in absorplama yüzdesi sağlıklı bireylerde  $1736 \pm 20$  iken diyabetiklerde  $2214 \pm 56$  olmuştur.
- ✓ Deney gruplarının PRP ve tam kan absorplama oranları görsel fotoğraflarda da desteklenmiştir. Hem sağlıklı hem de diyabetik bireylerde gazlı bez haricindeki tüm gruplar saniyeler içerisinde tüm kanı absorplarken, içerisinde gazlı bez bulunan tüp kan ile dolu kalmıştır.
- ✓ Hazırlanan hemostatik ajanların başarısı sağlıklı ve diyabetik ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modelinde araştırılmıştır. Hemostaz süresi,

total kan kaybı, uygulama sırasında bireylerin fizyolojik parametrelerindeki değişiklikler gözlemlenmiştir.

- ✓ Sağlıklı bireylerde alınan kanamayı durdurma süresi sonuçlarına göre gazlı bez  $245\pm 4$  saniyede kanamayı durdurmuştur. Hazırlanan tüm hemostatik örtülerin kanamayı durdurma süreleri gazlı beze göre kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Grupları kendi aralarında değerlendirdiğimizde kaolin katkılı grup en yüksek hemostaz süresini vermiştir. En düşük hemostaz süresini  $80\pm 0.3$  saniye ile SF kaplı PS/BS/KTS göstermiştir.
- ✓ Sağlıklı bireylerde oluşan kanama miktarları değerlendirildiğinde SF kaplı BS/KTS ve SF kaplı PS/BS/KTS kısa hemostaz süresi oluşturmalarının yanı sıra daha az kan kaybettirmiştir. Gazlı bez de kan kaybı miktarı  $5.8\pm 0.2$  g iken SF kaplı BS/KTS'de ve SF kaplı Vit K/BS/KTS'de sırasıyla alınan değerler şöyledir;  $2.3\pm 0.5$  ve  $2.5\pm 0.2$  g. Tüm gruplar gazlı beze kıyasla daha az kan kaybettirmiştir ( $p<0.005$ ).
- ✓ Sağlıklı bireylerin uygulama sırasında alınan ortalama arteriyel basınç değerlerine baktığımızda kanamayı oluşturmanın hemen ardından düşen kan basıncı sonrasında normale dönmüş ve normal değerlerde seyretmeye devam etmiştir.
- ✓ Sağlıklı ratlarda oluşturulan femoral arter kanama modeli süresince hayvanlardan alınan EKG değerleri sunulmuştur. EKG verilerine bakıldığında tüm gruplarda hafif taşikardi gözlemlenmektedir.
- ✓ Sağlıklı ratlarda hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra 1 saat boyunca hayvanlar gözlemlenmiş ve % ölüm oranları hesaplanmıştır. Gazlı bezde ölüm oranı %75'lere ulaşırken BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS/BS gruplarında %37,5 ile ölüm oranı yarıya indirilmiştir.
- ✓ Sağlıklı ratlarda femoral arter kanama modelinde uygulanan SF kaplı

Kao/BS/KTS grubunun kanama bölgesinde oluşturduğu sıcaklık değişimi ölçülmüştür. Uygulama sonrası ve öncesi karşılaştırıldığında kaolin katkılı grubun hemostaz bölgesinde 10 °C'lik bir sıcaklık artışına neden olduğu görülmüştür.

- ✓ Sağlıklı bireylerde hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra kan metabolitlerine glikoz, laktat ve kreatine; kan gazlarına pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cHCO<sub>3</sub>, BE (ecf), cSO<sub>2</sub>, kan elektrolitlerine Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>, cTCO<sub>2</sub>, Hct (%), cHgb bakılmıştır. Sonuçlara göre uygulama sonrasında genel anlamda kanda gazlar, metabolitler ve elektrolitler bakımından normal değerler alınmıştır. Glikoz değerlerinin özellikle SF kaplı PS/BS/KTS grubunda uygulama yapıldıktan sonra arttığı görülmüştür. Kandaki bikarbonat konsantrasyonu açısından değerlendirildiğinde SF kaplı BS/KTS konsantrasyonunda artış bulunmuştur.
- ✓ Femoral arter kanama modelinde hemostatik ajanlar uygulanıp kaldırıldıktan sonra bölgede oluşan kanama varlığı görsel fotoğraflarla desteklenmiştir. Gazlı bez uygulanması sırasında ve sonrasında bölgede biriken kan görülmektedir. Diğer gruplarda bölge tamamen kandan temizlenirken kaolin katkılı grupta küçük sızıntılar ve uygulama sonrası yapıda deformasyon gözlemlenmiştir.
- ✓ Hazırlanan hemostatik ajanların etkinlikleri bir de diyabetik femoral arter modelinde test edilmiştir. Hemostaz süreleri kıyaslandığında BS/KTS ve SF kaplı Kaolin/BS/KTS dışında hazırlanan hemostatik örtülerin kanamayı durdurma süreleri gazlı beze kıyasla anlamlı olarak farklı bulunmuştur (p<0.05). Kaolin katkılı grup ile diğer gruplar kıyaslandığında SF kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K ve PS içeren hemostatik örtüler daha iyi bir süre kaydetmiştir (p<0.05). En kısa hemostaz süresine 138 saniye ile Vit K ve 144 saniye ile SF kaplı BS/KTS ulaşmıştır.
- ✓ Kanama oluşturma miktarlarına bakılacak olursa gazlı bez grubuna kıyasla kaolin içeren grup dışında tüm gruplar anlamlı bir üstünlük sağlamıştır (p<0.005). En az kanamayı oluşturan ise protamin sülfat içeren grup olmuştur. Diyabetik ve sağlıklı ratlarda alınan hemostaz süresi ve toplam kan kaybı baz

alındığında diyabetik grupta sağlıklı olanlara kıyasla bir uzama ve artış söz konusu olmuştur.

- ✓ Diyabetik ratlarda uygulama boyunca hayvan monitörize edilmiş ve arteriyel basınç, EKG değerleri toplanmıştır. Femoral arterde kanama oluşturulmasını takiben arteriyel basınçta bir düşüş meydana gelmiş ve tekrar artarak uygulama boyunca stabilizasyonunu korumuştur. Her iki grupta da hem sağlıklı hem de diyabetik ratlarda müdahale öncesi ve sonrasında ratların yaşamlarını tehdit edici arteriyel basınç değişiklikleri olmamıştır. Diyabetik ratların EKG değerlerinde de hafif taşikardik belirtiler gözlemlenmiştir.
- ✓ Diyabetik ratlardaki mortalite yüzdelerine göre gazlı bezde %87.5 olan ölüm oranı saf ve kompozit hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra %50'lere düşmüştür. Hemostatik ajan uygulanan gruplarda ölüm oranını indirgeme diyabetik olanlarda sağlıklı olanlara kıyasla biraz düşüktür.
- ✓ Kaolin uygulamasına bağlı olarak kanama bölgesinde ölçülen sıcaklıkta sağlıklı ratlarda olduğu gibi 20 °C'den 31 °C'ye bir artış gözlemlenmiştir.
- ✓ Diyabetik bireylerde hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra kandaki metabolitlere, gazlara ve elektrolit seviyelerine bakılmıştır. Tüm parametreler normal değerlerde seyretmiştir. Ancak laktat değeri SF/PC kaplı BS/KTS ve SF kaplı Vit K/BS/KTS'de artmıştır. Elektrolitlerden de Na<sup>+</sup> elektroliti konsantrasyonunda tüm gruplar bazında bir artış söz konusudur.
- ✓ Diyabetik ratlarda femoral arter kanama modelinde hemostatik ajanlar uygulanıp kaldırıldıktan sonra bölgede kanamanın tekrar oluşup oluşmadığı alınan fotoğraflarla değerlendirilmiştir. Sağlıklı olan grupta olduğu gibi gazlı bez hemostazı sağlayamamıştır. Kaolin dışındaki gruplarda bölgede kan varlığına rastlanmamıştır.
- ✓ Histolojik incelemeler için uygulama yapılan femoral arterden alınan doku parçaları hematoksil-eozin ile boyanarak bölgede oluşan inflamasyon cevabı araştırılmıştır. Sağlıklı ratlarda hemostatik ajanlar uygulandıktan sonra



gazlı bez, ve SF kaplı Kao/BS/KTS'de inflamasyon varlığına rastlanmıştır. BS/KTS, SF kaplı BS/KTS, SF/PC kaplı BS/KTS, SF kaplı Vit K/BS/KTS ve PS/BS/KTS gruplarında temiz bir damar yapısı elde edilmiştir. Diyabetik modelde ise tüm gruplar histolojik incelemelerde negatif çıkmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] D. S. Kauvar and C. E. Wade, "The epidemiology and modern management of traumatic hemorrhage: US and international perspectives.," *Crit. Care*, vol. 9 Suppl 5, pp. S1–9, Jan. **2005**.
- [2] S. Murray, "Global injury and violence.," *CMAJ*, vol. 174, no. 5, pp. 620–1, Feb. **2006**.
- [3] J. M. Blocksom, C. Sugawa, S. Tokioka, and M. Williams, "The Hemoclip: a novel approach to endoscopic therapy for esophageal perforation.," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 49, no. 7–8, pp. 1136–8, Aug. **2004**.
- [4] J. Hambleton, "Coagulation: Consultative Hemostasis," *Hematology*, vol. 2002, no. 1, pp. 335–352, Jan. **2002**.
- [5] S. J. Konturek and W. Pawlik, "Physiology and pharmacology of prostaglandins.," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 31, no. 2 Suppl, p. 6S–19S, Feb. **1986**.
- [6] I. A. Greer, "Therapeutic progress--review XXVIII. Platelet function and calcium channel blocking agents.," *J. Clin. Pharm. Ther.*, vol. 12, no. 4, pp. 213–22, Aug. **1987**.
- [7] M. Hoffman, "The cellular basis of traumatic bleeding.," *Mil. Med.*, vol. 169, no. 12 Suppl, pp. 5–7, 4, Dec. **2004**.
- [8] K. F. Binmoeller, F. Thonke, and N. Soehendra, "Endoscopic hemoclip treatment for gastrointestinal bleeding.," *Endoscopy*, vol. 25, no. 2, pp. 167–70, Feb. **1993**.
- [9] C. Schonauer, E. Tessitore, G. Barbagallo, V. Albanese, and A. Moraci, "The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose.," *Eur. Spine J.*, vol. 13 Suppl 1, pp. S89–96, Oct. **2004**.
- [10] B. Petersen, A. Barkun, S. Carpenter, P. Chotiprasidhi, R. Chuttani, W. Silverman, N. Hussain, J. Liu, G. Taitelbaum, and G. G. Ginsberg, "Tissue adhesives and fibrin glues.," *Gastrointest. Endosc.*, vol. 60, no. 3, pp. 327–33, Sep. **2004**.
- [11] A. J. Quick, "Hemostasis in surgical procedures.," *Surg. Gynecol. Obstet.*, vol. 128, no. 3, pp. 523–32, Mar. **1969**.
- [12] R. H. Cobden, E. L. Thrasher, and W. H. Harris, "Topical hemostatic agents to reduce bleeding from cancellous bone. A comparison of microcrystalline collagen, thrombin, and thrombin-soaked gelatin foam.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 58, no. 1, pp. 70–3, Jan. **1976**.
- [13] G. D. Boon, "An overview of hemostasis.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 21, no. 2, pp. 170–9, Jan. **1993**.

- [14] K. J. Clemetson, "Platelets and primary haemostasis.," *Thromb. Res.*, vol. 129, no. 3, pp. 220–4, Mar. **2012**.
- [15] F. van Herrewegen, J. C. M. Meijers, M. Peters, and C. H. van Ommen, "Clinical practice," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 171, no. 2, pp. 207–214, Sep. **2011**.
- [16] H. R. Champion, R. F. Bellamy, C. P. Roberts, and A. Leppaniemi, "A profile of combat injury.," *J. Trauma*, vol. 54, no. 5 Suppl, pp. S13–9, May **2003**.
- [17] A. Sauaia, F. A. Moore, E. E. Moore, K. S. Moser, R. Brennan, R. A. Read, and P. T. Pons, "Epidemiology of trauma deaths: a reassessment.," *J. Trauma*, vol. 38, no. 2, pp. 185–93, Feb. **1995**.
- [18] R. F. Bellamy, "The causes of death in conventional land warfare: implications for combat casualty care research.," *Mil. Med.*, vol. 149, no. 2, pp. 55–62, Feb. **1984**.
- [19] H. E. Sigerist, *A History of Medicine: Early Greek, Hindu, and Persian Medicine*, vol. 0. **1987**.
- [20] A. Aris, "Hemostatic herbs," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 74, no. 4, p. 1291, Oct. **2002**.
- [21] E. Stone, *Medicine among the American Indians*. 1978.
- [22] T.-C. Tan and P. M. Black, "Sir Victor Horsley (1857-1916): pioneer of neurological surgery.," *Neurosurgery*, vol. 50, no. 3, pp. 607–11; discussion 611–2, Mar. **2002**.
- [23] T. C. Howard and R. R. Kelley, "The effect of bone wax on the healing of experimental rat tibial lesions.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 63, pp. 226–32, Jan. **1969**.
- [24] T. G. Brightmore, P. Hayes, J. Humble, and A. D. Morgan, "Haemostasis and healing following median sternotomy.," *Langenbecks Arch. Chir.*, vol. Suppl, pp. 39–41, Jan. **1975**.
- [25] O. G. Anfinsen, B. Sudmann, M. Rait, G. Bang, and E. Sudmann, "Complications secondary to the use of standard bone wax in seven patients.," *J. Foot Ankle Surg.*, vol. 32, no. 5, pp. 505–8, Jan. **1993**.
- [26] M. Lavigne, K. R. Boddu Siva Rama, J. Doyon, and P.-A. Vendittoli, "Bone-wax granuloma after femoral neck osteoplasty.," *Can. J. Surg.*, vol. 51, no. 3, pp. E58–60, Jun. **2008**.
- [27] O. Ateş, S. R. Cayli, and I. Gürses, "Bone wax can cause foreign body granuloma in the medulla oblongata.," *Br. J. Neurosurg.*, vol. 18, no. 5, pp. 538–40, Oct. **2004**.

- [28] L. Brignol, L. Guyot, O. Richard, and C. Chossegras, “« Abcès atypique » jugal après extraction de dents de sagesse: complication de l'utilisation de cire hémostatique,” *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, vol. 108, no. 2, pp. 150–152, Apr. **2007**.
- [29] B. Sudmann, G. Bang, and E. Sudmann, “Histologically verified bone wax (beeswax) granuloma after median sternotomy in 17 of 18 autopsy cases.,” *Pathology*, vol. 38, no. 2, pp. 138–41, Apr. **2006**.
- [30] P. Johnson and D. Fromm, “Effects of bone wax on bacterial clearance.,” *Surgery*, vol. 89, no. 2, pp. 206–9, Feb. **1981**.
- [31] S. E. Katz and J. Rootman, “Adverse effects of bone wax in surgery of the orbit.,” *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 12, no. 2, pp. 121–6, Jun. **1996**.
- [32] F. Robicsek, T. N. Masters, L. Littman, and G. V Born, “The embolization of bone wax from sternotomy incisions.,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 31, no. 4, pp. 357–9, Apr. **1981**.
- [33] M. Y. Wang, J. K. Armstrong, T. C. Fisher, H. J. Meiselman, G. J. McComb, and M. L. Levy, “A new, pluronic-based, bone hemostatic agent that does not impair osteogenesis.,” *Neurosurgery*, vol. 49, no. 4, pp. 962–7; discussion 968, Oct. **2001**.
- [34] T. Wellisz, J. K. Armstrong, J. Cambridge, Y. H. An, X. Wen, Q. Kang, C. M. Hill, and T. C. Fisher, “The effects of a soluble polymer and bone wax on sternal healing in an animal model.,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 85, no. 5, pp. 1776–80, May **2008**.
- [35] T. Wellisz, Y. H. An, X. Wen, Q. Kang, C. M. Hill, and J. K. Armstrong, “Infection Rates and Healing Using Bone Wax and a Soluble Polymer Material,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 466, no. 2, pp. 481–486, Jan. **2008**.
- [36] H. E. Achneck, B. Sileshi, R. M. Jamiolkowski, D. M. Albala, M. L. Shapiro, and J. H. Lawson, “A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use.,” *Ann. Surg.*, vol. 251, no. 2, pp. 217–28, Feb. **2010**.
- [37] M. Sabel and W. Stummer, “Haemostasis in spine surgery. The use of local agents: Surgicel and Surgifoam,” *Eur. Spine J.*, vol. 13, no. S01, pp. S97–S101, May **2004**.
- [38] H. A. Wilkinson, S. Baker, and S. Rosenfeld, “Gelfoam paste in experimental laminectomy and cranial trephination,” *J. Neurosurg.*, vol. 54, no. 5, pp. 664–667, May **1981**.
- [39] V. K. Frantz, “ABSORBABLE COTTON, PAPER AND GAUZE : (OXIDIZED CELLULOSE).,” *Ann. Surg.*, vol. 118, no. 1, pp. 116–26, Jul. **1943**.

- [40] Y. Tomizawa, "Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review.," *J. Artif. Organs*, vol. 8, no. 3, pp. 137–42, Jan. **2005**.
- [41] M. F. Ibrahim, C. Aps, and C. P. Young, "A foreign body reaction to Surgicel mimicking an abscess following cardiac surgery.," *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 22, no. 3, pp. 489–90; author reply 490, Sep. **2002**.
- [42] Y. Tomizawa, M. Endo, M. Kitamura, A. Shiikawa, Y. Yagi, and H. Koyanagi, "[Coronary artery bypass graft stenosis suspected to be due to hemostatic agents: a case report].," *Kyobu Geka.*, vol. 44, no. 9, pp. 764–6, Aug. **1991**.
- [43] T. Igari, F. Iwaya, T. Abe, K. Hagiwara, M. Tanji, H. Satokawa, M. Watanabe, H. Midorikawa, Y. Sato, and M. Kashida, "[A case of foreign body granuloma after aortic valve replacement].," *Kyobu Geka.*, vol. 43, no. 7, pp. 550–2, Jul. **1990**.
- [44] T. Banerjee and K. Goldschmidt, "'Surgiceloma' manifested as cauda equina syndrome.," *South. Med. J.*, vol. 91, no. 5, pp. 481–3, May **1998**.
- [45] A. R. Brodbelt, J. B. Miles, P. M. Foy, and J. C. Broome, "Intraspinal oxidised cellulose (Surgicel) causing delayed paraplegia after thoracotomy--a report of three cases.," *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, vol. 84, no. 2, pp. 97–9, Mar. **2002**.
- [46] W. H. Zucker and R. G. Mason, "Ultrastructural aspects of interactions of platelets with microcrystalline collagen.," *Am. J. Pathol.*, vol. 82, no. 1, pp. 129–42, Jan. **1976**.
- [47] W. R. Wagner, J. M. Pachence, J. Ristich, and P. C. Johnson, "Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents.," *J. Surg. Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 100–8, Dec. **1996**.
- [48] W. M. Abbott and W. G. Austen, "The effectiveness and mechanism of collagen-induced topical hemostasis.," *Surgery*, vol. 78, no. 6, pp. 723–9, Dec. **1975**.
- [49] R. K. Low, M. E. Moran, and J. E. Goodnight, "Microfibrillar collagen hemostat during laparoscopically directed liver biopsy.," *J. Laparoendosc. Surg.*, vol. 3, no. 4, pp. 415–20, Aug. **1993**.
- [50] J. H. Lawson, K. A. Lynn, R. M. Vanmatre, T. Domzalski, K. F. Klemp, T. L. Ortel, L. E. Niklason, and W. Parker, "Antihuman Factor V Antibodies After Use of Relatively Pure Bovine Thrombin," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 79, no. 3, pp. 1037–1038, Mar. **2005**.
- [51] J. G. Schoenecker, R. K. Johnson, A. P. Leshner, J. D. Day, S. D. Love, M. R. Hoffman, T. L. Ortel, W. Parker, and J. H. Lawson, "Exposure of Mice to Topical Bovine Thrombin Induces Systemic Autoimmunity," *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 5, pp. 1957–1969, Nov. **2001**.

- [52] R. D. SARRE, "Evaluation of aeolian sand transport equations using intertidal zone measurements, Saunton Sands, England," *Sedimentology*, vol. 35, no. 4, pp. 671–679, Aug. **1988**.
- [53] M. R. Sarfati, D. J. DiLorenzo, L. W. Kraiss, and S. W. Galt, "Severe Coagulopathy following Intraoperative Use of Topical Thrombin," *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 18, no. 3, pp. 349–351, May **2004**.
- [54] W. C. Chapman, N. Singla, Y. Genyk, J. W. McNeil, K. L. Renkens, T. C. Reynolds, A. Murphy, and F. A. Weaver, "A Phase 3, Randomized, Double-Blind Comparative Study of the Efficacy and Safety of Topical Recombinant Human Thrombin and Bovine Thrombin in Surgical Hemostasis," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 205, no. 2, pp. 256–265, Aug. **2007**.
- [55] J. Rousou, S. Levitsky, L. Gonzalez-Lavin, D. Cosgrove, D. Magilligan, C. Weldon, C. Hiebert, P. Hess, L. Joyce, and J. Bergsland, "Randomized clinical trial of fibrin sealant in patients undergoing re sternotomy or reoperation after cardiac operations. A multicenter study.," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 97, no. 2, pp. 194–203, Feb. **1989**.
- [56] B. Sileshi, H. E. Achneck, and J. H. Lawson, "Management of surgical hemostasis: topical agents.," *Vascular*, vol. 16 Suppl 1, pp. S22–8, Jan. **2008**.
- [57] S. Samudrala, "Topical hemostatic agents in surgery: a surgeon's perspective.," *AORN J.*, vol. 88, no. 3, pp. S2–11, Sep. **2008**.
- [58] F. Richter, D. Schnorr, S. Deger, I. Trk, J. Roigas, A. Wille, and S. A. Loening, "Improvement of hemostasis in open and laparoscopically performed partial nephrectomy using a gelatin matrix-thrombin tissue sealant (FloSeal).," *Urology*, vol. 61, no. 1, pp. 73–7, Jan. **2003**.
- [59] R. S. Pruthi, J. Chun, and M. Richman, "The use of a fibrin tissue sealant during laparoscopic partial nephrectomy.," *BJU Int.*, vol. 93, no. 6, pp. 813–7, Apr. **2004**.
- [60] G. S. Gerber and B. R. Stockton, "Laparoscopic Partial Nephrectomy," *J. Endourol.*, vol. 19, no. 1, pp. 21–24, Jan. **2005**.
- [61] M. D. Palm and J. S. Altman, "Topical hemostatic agents: a review.," *Dermatol. Surg.*, vol. 34, no. 4, pp. 431–45, Apr. **2008**.
- [62] D. M. Toriumi and A. A. Bagal, "Cyanoacrylate tissue adhesives for skin closure in the outpatient setting.," *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 35, no. 1, pp. 103–18, vi–vii, Feb. **2002**.
- [63] K. J. Farion, M. H. Osmond, L. Hartling, K. F. Russell, T. P. Klassen, E. Crumley, and N. Wiebe, "Tissue adhesives for traumatic lacerations: a systematic review of randomized controlled trials.," *Acad. Emerg. Med.*, vol. 10, no. 2, pp. 110–8, Feb. **2003**.

- [64] P. Coulthard, M. Esposito, H. V Worthington, M. van der Elst, O. J. F. van Waes, and J. Darcey, "Tissue adhesives for closure of surgical incisions.," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 5, p. CD004287, Jan. **2010**.
- [65] P. J. Belletrutti, J. Romagnuolo, R. J. Hilsden, F. Chen, B. Kaplan, J. Love, and P. L. Beck, "Endoscopic management of gastric varices: efficacy and outcomes of gluing with N-butyl-2-cyanoacrylate in a North American patient population.," *Can. J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 11, pp. 931–6, Nov. **2008**.
- [66] Y. Onozato, S. Kakizaki, H. Iizuka, K. Mori, D. Takizawa, T. Ohyama, K. Arakawa, H. Arai, H. Ishihara, T. Abe, N. Sohara, K. Sato, H. Takagi, and M. Mori, "Ectopic varices rupture in the gastroduodenal anastomosis successfully treated with N-butyl-2-cyanoacrylate injection.," *Acta Med. Okayama*, vol. 61, no. 6, pp. 361–5, Dec. **2007**.
- [67] L. Cheng, Z. Wang, C. Li, F. Cai, Q. Huang, E. Linghu, W. Li, G. Chai, G. Sun, Y. Mao, Y. Wang, J. Li, P. Gao, and T. Fan, "Treatment of gastric varices by endoscopic sclerotherapy using butyl cyanoacrylate: 10 years' experience of 635 cases.," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 120, no. 23, pp. 2081–5, Dec. **2007**.
- [68] K. Mumtaz, S. Majid, H. Shah, K. Hameed, A. Ahmed, S. Hamid, and W. Jafri, "Prevalence of gastric varices and results of sclerotherapy with N-butyl 2 cyanoacrylate for controlling acute gastric variceal bleeding.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1247–51, Feb. **2007**.
- [69] P. Noophun, P. Kongkam, S. Gonlachanvit, and R. Rerknimitr, "Bleeding gastric varices: results of endoscopic injection with cyanoacrylate at King Chulalongkorn Memorial Hospital.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 47, pp. 7531–5, Dec. **2005**.
- [70] R. Yoshimatsu, Y. Takeuchi, H. Morishita, N. Iida, H. Okabe, T. Yamagami, and T. Nishimura, "Successful embolisation of intrahepatic portosystemic venous shunt using coils and n-butyl cyanoacrylate through two approach routes," *Br. J. Radiol.*, vol. 79, no. 947, pp. e162–e165, Nov. **2006**.
- [71] T. Yamagami, K. Kanda, T. Kato, T. Hirota, K. Nishida, R. Yoshimatsu, T. Matsumoto, and T. Nishimura, "Embolisation of proximal anastomotic pseudoaneurysm developing after surgical repair of abdominal aortic aneurysm with a bifurcated graft with n-butyl cyanoacrylate," *Br. J. Radiol.*, vol. 79, no. 948, pp. e193–e195, Dec. **2006**.
- [72] J. Brunkwall, G. Ruemenapf, H. J. Florek, W. Lang, and T. Schmitz-Rixen, "A single arm, prospective study of an absorbable cyanoacrylate surgical sealant for use in vascular reconstructions as an adjunct to conventional techniques to achieve haemostasis.," *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, vol. 48, no. 4, pp. 471–6, Aug. **2007**.
- [73] O. Aziz, M. S. Rahman, V. G. Hadjianastassiou, J. Kokotsakis, M. Vitali, A. Cherian, A. Darzi, and T. Athanasiou, "Novel applications of Dermabond (2-

- octyl -cyanoacrylate) in cardiothoracic surgery.," *Surg. Technol. Int.*, vol. 16, pp. 46–51, Jan. **2007**.
- [74] A. Hill, T. D. Estridge, M. Maroney, E. Monnet, B. Egbert, G. Cruise, and G. T. Coker, "Treatment of suture line bleeding with a novel synthetic surgical sealant in a canine iliac PTFE graft model.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 3, pp. 308–12, May **2001**.
- [75] C. P. Napoleone, G. Oppido, E. Angeli, and G. Gargiulo, "Resternotomy in pediatric cardiac surgery: CoSeal(R) initial experience," *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 6, no. 1, pp. 21–23, Oct. **2006**.
- [76] W. F. Konertz, M. Kostelka, F. W. Mohr, R. Hetzer, M. Hübler, J. Ritter, J. Liu, C. Koch, and J. E. Block, "Reducing the incidence and severity of pericardial adhesions with a sprayable polymeric matrix.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 76, no. 4, pp. 1270–4; discussion 1274, Oct. **2003**.
- [77] M. M. Saunders, Z. C. Baxter, A. Abou-Ellella, A. R. Kunselman, and J. C. Trussell, "BioGlue and Dermabond save time, leak less, and are not mechanically inferior to two-layer and modified one-layer vasovasostomy.," *Fertil. Steril.*, vol. 91, no. 2, pp. 560–5, Feb. **2009**.
- [78] J. E. Bernie, J. Ng, V. Bargman, T. Gardner, L. Cheng, and C. P. Sundaram, "Evaluation of hydrogel tissue sealant in porcine laparoscopic partial-nephrectomy model.," *J. Endourol.*, vol. 19, no. 9, pp. 1122–6, Nov. **2005**.
- [79] C. A. Uribe, L. Eichel, S. Khonsari, D. S. Finley, J. Basillote, H. K. Park, C. C. Li, C. Abdelshehid, D. I. Lee, E. M. McDougall, and R. V Clayman, "What happens to hemostatic agents in contact with urine? An in vitro study.," *J. Endourol.*, vol. 19, no. 3, pp. 312–7, Apr. 2005.
- [80] G. Biggs, J. Hafron, J. Feliciano, and D. M. Hoenig, "Treatment of splenic injury during laparoscopic nephrectomy with BioGlue, a surgical adhesive," *Urology*, vol. 66, no. 4, pp. 882.e3–882.e5, Oct. **2005**.
- [81] J. Passage, H. Jalali, R. K. W. Tam, S. Harrocks, and M. F. O'Brien, "BioGlue Surgical Adhesive--an appraisal of its indications in cardiac surgery.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 74, no. 2, pp. 432–7, Aug. **2002**.
- [82] R. Mejia and D. S. Thomson, "A new technique for repair of atrioventricular disruption complicating mitral valve replacement.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 75, no. 6, pp. 1973–4, Jun. **2003**.
- [83] S. A. LeMaire, Z. C. Schmittling, J. S. Coselli, A. Undar, B. A. Deady, F. J. Clubb, and C. D. Fraser, "BioGlue surgical adhesive impairs aortic growth and causes anastomotic strictures.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 73, no. 5, pp. 1500–5; discussion 1506, May **2002**.



- [84] M. G. Ochsner, M. E. Maniscalco-Theberge, and H. R. Champion, "Fibrin glue as a hemostatic agent in hepatic and splenic trauma.," *J. Trauma*, vol. 30, no. 7, pp. 884–7, Jul. **1990**.
- [85] W. Brands, J. Haselberger, C. Mennicken, and M. Hoerst, "Treatment of ruptured kidney by gluing with highly concentrated human fibrinogen.," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 18, no. 5, pp. 611–3, Oct. **1983**.
- [86] M. J. Larson, J. C. Bowersox, R. C. Lim, and J. R. Hess, "Efficacy of a fibrin hemostatic bandage in controlling hemorrhage from experimental arterial injuries.," *Arch. Surg.*, vol. 130, no. 4, pp. 420–2, Apr. **1995**.
- [87] M. R. Jackson, S. A. Friedman, A. J. Carter, V. Bayer, J. R. Burge, M. J. MacPhee, W. N. Drohan, and B. M. Alving, "Hemostatic efficacy of a fibrin sealant-based topical agent in a femoral artery injury model: a randomized, blinded, placebo-controlled study.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 26, no. 2, pp. 274–80, Aug. **1997**.
- [88] A. E. Pusateri, S. J. McCarthy, K. W. Gregory, R. A. Harris, L. Cardenas, A. T. McManus, and C. W. Goodwin, "Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine.," *J. Trauma*, vol. 54, no. 1, pp. 177–82, Jan. **2003**.
- [89] J. B. Holcomb, A. E. Pusateri, R. A. Harris, N. C. Charles, R. R. Gomez, J. P. Cole, L. D. Beall, V. Bayer, M. J. MacPhee, and J. R. Hess, "Effect of dry fibrin sealant dressings versus gauze packing on blood loss in grade V liver injuries in resuscitated swine.," *J. Trauma*, vol. 46, no. 1, pp. 49–57, Jan. **1999**.
- [90] J. B. Holcomb, A. E. Pusateri, R. A. Harris, T. J. Reid, L. D. Beall, J. R. Hess, and M. J. MacPhee, "Dry fibrin sealant dressings reduce blood loss, resuscitation volume, and improve survival in hypothermic coagulopathic swine with grade V liver injuries.," *J. Trauma*, vol. 47, no. 2, pp. 233–40; discussion 240–2, Aug. **1999**.
- [91] A. E. Pusateri, J. B. Holcomb, R. A. Harris, M. J. MacPhee, N. C. Charles, L. D. Beall, and J. R. Hess, "Effect of fibrin bandage fibrinogen concentration on blood loss after grade V liver injury in swine.," *Mil. Med.*, vol. 166, no. 3, pp. 217–22, Mar. 2001.
- [92] A. E. Pusateri, B. S. Kheirabadi, A. V Delgado, J. W. Doyle, J. Kanellos, J. M. Uscilowicz, R. S. Martinez, J. B. Holcomb, and H. E. Modrow, "Structural design of the dry fibrin sealant dressing and its impact on the hemostatic efficacy of the product.," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 70, no. 1, pp. 114–21, Jul. **2004**.
- [93] A. F. Morey, J. G. Anema, R. Harris, V. Gresham, R. Daniels, R. W. Knight, D. Beall, M. Macphee, and R. L. Cornum, "Treatment of grade 4 renal stab

- wounds with absorbable fibrin adhesive bandage in a porcine model.," *J. Urol.*, vol. 165, no. 3, pp. 955–8, Mar. **2001**.
- [94] J. L. Sondeen, A. E. Pusateri, V. G. Coppes, C. C. E. Gaddy, and J. B. Holcomb, "Comparison of 10 Different Hemostatic Dressings in an Aortic Injury," *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care*, vol. 54, no. 2, pp. 280–285, Feb. **2003**.
- [95] B. S. Kheirabadi, E. M. Acheson, R. Deguzman, J. L. Sondeen, K. L. Ryan, A. Delgado, E. J. Dick, and J. B. Holcomb, "Hemostatic efficacy of two advanced dressings in an aortic hemorrhage model in Swine.," *J. Trauma*, vol. 59, no. 1, pp. 25–34; discussion 34–5, Jul. **2005**.
- [96] E. M. Acheson, B. S. Kheirabadi, R. Deguzman, E. J. Dick, and J. B. Holcomb, "Comparison of hemorrhage control agents applied to lethal extremity arterial hemorrhages in swine.," *J. Trauma*, vol. 59, no. 4, pp. 865–74; discussion 874–5, Oct. **2005**.
- [97] D. Kulling, J. N. Vournakis, S. Woo, M. V Demcheva, D. U. Tagge, G. Rios, S. Finkielstein, and R. H. Hawes, "Endoscopic injection of bleeding esophageal varices with a poly-N-acetyl glucosamine gel formulation in the canine portal hypertension model.," *Gastrointest. Endosc.*, vol. 49, no. 6, pp. 764–71, Jun. **1999**.
- [98] Y. Ikeda, L. H. Young, J. N. Vournakis, and A. M. Lefer, "Vascular effects of poly-N-acetylglucosamine in isolated rat aortic rings.," *J. Surg. Res.*, vol. 102, no. 2, pp. 215–20, Feb. **2002**.
- [99] M. W. Chan, S. D. Schwaitzberg, M. Demcheva, J. Vournakis, S. Finkielstein, and R. J. Connolly, "Comparison of poly-N-acetyl glucosamine (P-GlcNAc) with absorbable collagen (Actifoam), and fibrin sealant (Bolheal) for achieving hemostasis in a swine model of splenic hemorrhage.," *J. Trauma*, vol. 48, no. 3, pp. 454–7; discussion 457–8, Mar. **2000**.
- [100] H. B. Alam, Z. Chen, A. Jaskille, R. I. L. C. Querol, E. Koustova, R. Inocencio, R. Conran, A. Seufert, N. Ariaban, K. Toruno, and P. Rhee, "Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in Swine.," *J. Trauma*, vol. 56, no. 5, pp. 974–83, May **2004**.
- [101] M. A. Brown, M. R. Daya, and J. A. Worley, "Experience with chitosan dressings in a civilian EMS system.," *J. Emerg. Med.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–7, Jul. **2009**.
- [102] G. J. Tsai and W. H. Su, "Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*.," *J. Food Prot.*, vol. 62, no. 3, pp. 239–43, Mar. **1999**.
- [103] E. I. Rabea, M. E.-T. Badawy, C. V Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, "Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action.," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457–65, Jan. **2003**.

- [104] M. Burkatovskaya, A. P. Castano, T. N. Demidova-Rice, G. P. Tegos, and M. R. Hamblin, "Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice.," *Wound Repair Regen.*, vol. 16, no. 3, pp. 425–31, Jan. **2008**.
- [105] M. Burkatovskaya, G. P. Tegos, E. Swietlik, T. N. Demidova, A. P. Castano, and M. R. Hamblin, "Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 22, pp. 4157–64, Aug. **2006**.
- [106] S.-Y. Ong, J. Wu, S. M. Moochhala, M.-H. Tan, and J. Lu, "Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4323–32, Nov. **2008**.
- [107] B. G. Kozen, S. J. Kircher, J. Henao, F. S. Godinez, and A. S. Johnson, "An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot.," *Acad. Emerg. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 74–81, Jan. **2008**.
- [108] P. Rhee, C. Brown, M. Martin, A. Salim, D. Plurad, D. Green, L. Chambers, D. Demetriades, G. Velmahos, and H. Alam, "QuikClot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses.," *J. Trauma*, vol. 64, no. 4, pp. 1093–9, Apr. **2008**.
- [109] M.N.V. Ravi Kumar and S. M. Hudson, "Chitosan, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Informa Healthcare ." May. **2008**.
- [110] J. Zhang, W. Xia, P. Liu, Q. Cheng, T. Tahirou, W. Gu, and B. Li, "Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications.," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 7, pp. 1962–87, Jan. **2010**.
- [111] I. Wedmore, J. G. McManus, A. E. Pusateri, and J. B. Holcomb, "A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations.," *J. Trauma*, vol. 60, no. 3, pp. 655–8, Mar. **2006**.
- [112] V. Y. Sohn, M. J. Eckert, M. J. Martin, Z. M. Arthurs, J. R. Perry, A. Beekley, E. J. Rubel, R. P. Adams, G. L. Bickett, and R. M. Rush, "Efficacy of three topical hemostatic agents applied by medics in a lethal groin injury model.," *J. Surg. Res.*, vol. 154, no. 2, pp. 258–61, Jun. **2009**.
- [113] S. B. Gustafson, P. Fulkerson, R. Bildfell, L. Aguilera, and T. M. Hazzard, "Chitosan dressing provides hemostasis in swine femoral arterial injury model.," *Prehosp. Emerg. Care*, vol. 11, no. 2, pp. 172–8, Jan. **2007**.
- [114] W. G. Malette, H. J. Quigley, R. D. Gaines, N. D. Johnson, and W. G. Rainer, "Chitosan: a new hemostatic.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 36, no. 1, pp. 55–8, Jul. **1983**.
- [115] V. F. P. Lee, *Solution and Shear Properties of Chitin and Chitosan*. **1975**.

- [116] J. Zhang, W. Xia, P. Liu, Q. Cheng, T. Tahirou, W. Gu, and B. Li, "Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications.," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 7, pp. 1962–87, Jan. **2010**.
- [117] A. Hoekstra, H. Struszczyk, and O. Kivekäs, "Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites.," *Biomaterials*, vol. 19, no. 16, pp. 1467–71, Aug. **1998**.
- [118] Y. W. Cho, Y. N. Cho, S. H. Chung, G. Yoo, and S. W. Ko, "Water-soluble chitin as a wound healing accelerator.," *Biomaterials*, vol. 20, no. 22, pp. 2139–45, Nov. 1999.
- [119] S. B. Rao and C. P. Sharma, "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 21–8, Jan. **1997**.
- [120] H. S. Whang, W. Kirsch, Y. H. Zhu, C. Z. Yang, and S. M. Hudson, "Hemostatic Agents Derived from Chitin and Chitosan.," *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.*, vol. 45, no. 4, pp. 309–323, Oct. **2005**.
- [121] W. Janvikul, P. Uppanan, B. Thavornnyutikarn, J. Krewraing, and R. Prateepasen, "In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives.," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 445–451, Oct. **2006**.
- [122] P. R. Klokkevold, H. Fukayama, E. C. Sung, and C. N. Bertolami, "The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits.," *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 57, no. 1, pp. 49–52, Jan. **1999**.
- [123] A. G. Arand and R. Sawaya, "Intraoperative chemical hemostasis in neurosurgery.," *Neurosurgery*, vol. 18, no. 2, pp. 223–33, Feb. **1986**.
- [124] *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments*. CRC Press, **2013**.
- [125] G. M. Kind, S. D. Bines, E. D. Staren, A. J. Templeton, and S. G. Economou, "Chitosan: evaluation of a new hemostatic agent.," *Curr. Surg.*, vol. 47, no. 1, pp. 37–9, Jan. **1990**.
- [126] M. Fukasawa, H. Abe, T. Masaoka, H. Orita, H. Horikawa, J. D. Campeau, and M. Washio, "The hemostatic effect of deacetylated chitin membrane on peritoneal injury in rabbit model.," *Surg. Today*, vol. 22, no. 4, pp. 333–8, Jan. **1992**.
- [127] B. Lorkowska-Zawicka, K. Kamiński, J. Ciejka, K. Szczubiałka, M. Białas, K. Okoń, D. Adamek, M. Nowakowska, J. Jawień, R. Olszanecki, and R. Korbut, "Inactivation of heparin by cationically modified chitosan.," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 7, pp. 3953–69, Jul. **2014**.

- [128] T.-C. Chou, E. Fu, C.-J. Wu, and J.-H. Yeh, "Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 302, no. 3, pp. 480–3, Mar. **2003**.
- [129] E.-C. Shen, T.-C. Chou, C.-H. Gau, H.-P. Tu, Y.-T. Chen, and E. Fu, "Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible bio-material for platelet-rich plasma preparation.," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 17, no. 5, pp. 572–8, Oct. **2006**.
- [130] Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, and S. Minami, "Effects of chitin and chitosan on blood coagulation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 53, no. 3, pp. 337–342, Aug. **2003**.
- [131] C. C. Wu, F. N. Ko, T. F. Huang, and C. M. Teng, "Mechanisms-regulated platelet spreading after initial platelet contact with collagen.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 220, no. 2, pp. 388–93, Mar. **1996**.
- [132] Q. He, Q. Ao, K. Gong, L. Zhang, M. Hu, Y. Gong, and X. Zhang, "Preparation and characterization of chitosan-heparin composite matrices for blood contacting tissue engineering.," *Biomed. Mater.*, vol. 5, no. 5, p. 055001, Oct. **2010**.
- [133] M. S. Lord, B. Cheng, S. J. McCarthy, M. Jung, and J. M. Whitelock, "The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins.," *Biomaterials*, vol. 32, no. 28, pp. 6655–62, Oct. **2011**.
- [134] M. H. Periyah, A. S. Halim, A. R. Hussein, A. Z. M. Saad, A. H. A. Rashid, and K. Noorsal, "In vitro capacity of different grades of chitosan derivatives to induce platelet adhesion and aggregation.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 52, pp. 244–9, Jan. **2013**.
- [135] R. Jonas and L. F. Farah, "Production and application of microbial cellulose," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 101–106, Jan. **1998**.
- [136] H. Yamada, K. Kumada, and M. Yanagida, "Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast.," *J. Cell Sci.*, vol. 110 ( Pt 1, pp. 1793–804, Aug. **1997**.
- [137] M. Yamada, T. Murata, S. Hirose, G. Lavorgna, E. Suzuki, and H. Ueda, "Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*.," *Development*, vol. 127, no. 23, pp. 5083–92, Dec. **2000**.
- [138] Krassig, *Cellulose*. CRC Press, **1993**.
- [139] K. Watanabe, M. Tabuchi, Y. Morinaga, and F. Yoshinaga, "Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture," *Cellulose*, vol. 5, no. 3, pp. 187–200, Sept. **1998**.

- [140] S. Yamanaka and J. Sugiyama, "Structural modification of bacterial cellulose," *Cellulose*, vol. 7, no. 3, pp. 213–225, Sept. **2000**.
- [141] H. Ougiya, K. Watanabe, Y. Morinaga, and F. Yoshinaga, "Emulsion-stabilizing Effect of Bacterial Cellulose," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 61, no. 9, pp. 1541–1545, Jun. **2014**.
- [142] C. Chang and L. Zhang, "Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects," *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 1, pp. 40–53, Feb. **2011**.
- [143] F. G. Torres, S. Commeaux, and O. P. Troncoso, "Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials.," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 864–78, Jan. **2012**.
- [144] L. Fu, Y. Zhang, C. Li, Z. Wu, Q. Zhuo, X. Huang, G. Qiu, P. Zhou, and G. Yang, "Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 24, p. 12349, May **2012**.
- [145] S. C. M. Fernandes, L. Oliveira, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, C. P. Neto, A. Gandini, and J. Desbrières, "Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose," *Green Chem.*, vol. 11, no. 12, p. 2023, Dec. **2009**.
- [146] T. T. Nge, M. Nogi, H. Yano, and J. Sugiyama, "Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold," *Cellulose*, vol. 17, no. 2, pp. 349–363, Jan. **2010**.
- [147] N. Lin and A. Dufresne, "Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect," *Eur. Polym. J.*, vol. 59, pp. 302–325, Aug. **2014**.
- [148] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown, "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications.," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jan. **2007**.
- [149] F. G. Omenetto and D. L. Kaplan, "New opportunities for an ancient material.," *Science*, vol. 329, no. 5991, pp. 528–31, Jul. **2010**.
- [150] R. Lewis, "Unraveling the Weave of Spider Silk," *Bioscience*, vol. 46, no. 9, pp. 636–638, Oct. **1996**.
- [151] H. K. Soong and K. R. Kenyon, "Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery.," *Ophthalmology*, vol. 91, no. 5, pp. 479–83, May **1984**.
- [152] S.-W. Ha, "Structural study of Bombyx mori silk fibroin during processing for regeneration," Jan. **2005**.
- [153] J. Magoshi, Y. Magoshi, M. A. Becker, M. Kato, Z. Han, T. Tanaka, S. Inoue, and S. Nakamura, "Crystallization of silk fibroin from solution," *Thermochim. Acta*, vol. 352–353, pp. 165–169, Jul. **2000**.

- [154] B. Lotz and F. Colonna Cesari, "The chemical structure and the crystalline structures of Bombyx mori silk fibroin.," *Biochimie*, vol. 61, no. 2, pp. 205–14, Jan. **1979**.
- [155] G. Franz and S. Alban, "Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 17, no. 6, pp. 311–4, Dec. **1995**.
- [156] B. B. Mandal and S. C. Kundu, "A novel method for dissolution and stabilization of non-mulberry silk gland protein fibroin using anionic surfactant sodium dodecyl sulfate.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 99, no. 6, pp. 1482–9, Apr. **2008**.
- [157] N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, "Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial.," *Biomaterials*, vol. 11, no. 6, pp. 430–4, Aug. **1990**.
- [158] J. Chen, N. Minoura, and A. Tanioka, "Transport of pharmaceuticals through silk fibroin membrane," *Polymer (Guildf.)*, vol. 35, no. 13, pp. 2853–2856, Jun. **1994**.
- [159] J. Gu, X. Yang, and H. Zhu, "Surface sulfonation of silk fibroin film by plasma treatment and in vitro antithrombogenicity study," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 199–202, May **2002**.
- [160] M. Santin, S. P. Denyer, A. W. Lloyd, and A. Motta, "Domain-Driven Binding of Fibrin(Ogen) onto Silk Fibroin Biomaterials," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 17, no. 3, pp. 195–208, May **2002**.
- [161] X. Chen, W. Li, Z. Shao, W. Zhong, and T. Yu, "Separation of alcohol-water mixture by pervaporation through a novel natural polymer blend membrane-chitosan/silk fibroin blend membrane," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 73, no. 6, pp. 975–980, Aug. **1999**.
- [162] A. Apap-Bologna, A. Webster, F. Raitt, and G. Kemp, "The influence of calcium ions on fibrinogen conformation," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 995, no. 1, pp. 70–74, Mar. **1989**.
- [163] A. Motta, C. Migliaresi, A. W. Lloyd, S. P. Denyer, and M. Santin, "Serum Protein Absorption on Silk Fibroin Fibers and Films: Surface Opsonization and Binding Strength," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 17, no. 1, pp. 23–35, Jan. **2002**.
- [164] P. S. Panesar, S. Kumari, and R. Panesar, "Potential Applications of Immobilized  $\beta$  -Galactosidase in Food Processing Industries," *Enzyme Res.*, vol. 2010, pp. 1–16, Jan. **2010**.
- [165] B. Furie and B. C. Furie, "Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation.," *Blood*, vol. 75, no. 9, pp. 1753–62, May **1990**.

- [166] E. W. Davie, "Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade.," *Thromb. Haemost.*, vol. 74, no. 1, pp. 1–6, Jul. **1995**.
- [167] J. C. Horrow, "Protamine: a review of its toxicity.," *Anesth. Analg.*, vol. 64, no. 3, pp. 348–61, Mar. **1985**.
- [168] J. A. Carr and N. Silverman, "The heparin-protamine interaction. A review.," *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, vol. 40, no. 5, pp. 659–66, Oct. **1999**.
- [169] T. Baglin, T. W. Barrowcliffe, A. Cohen, and M. Greaves, "Guidelines on the use and monitoring of heparin.," *Br. J. Haematol.*, vol. 133, no. 1, pp. 19–34, Apr. **2006**.
- [170] J. Hirsh, K. A. Bauer, M. B. Donati, M. Gould, M. M. Samama, and J. I. Weitz, "Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).," *Chest*, vol. 133, no. 6 Suppl, p. 141S–159S, Jun. **2008**.
- [171] S. J. Wright, W. B. Murray, W. A. Hampton, and H. Hargovan, "Calculating the protamine-heparin reversal ratio: a pilot study investigating a new method.," *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 7, no. 4, pp. 416–21, Aug. **1993**.
- [172] A. S. Brecher and A. R. Roland, "Protamine inhibits formation of the covalent factor IXa-anti-thrombin complex.," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 19, no. 6, pp. 591–6, Sep. **2008**.
- [173] A. J. Chu, Z. G. Wang, M. Raicu, S. Beydoun, and N. Ramos, "Protamine inhibits tissue factor-initiated extrinsic coagulation.," *Br. J. Haematol.*, vol. 115, no. 2, pp. 392–9, Nov. **2001**.
- [174] J. Butterworth, Y. A. Lin, R. Prielipp, J. Bennett, and R. James, "The pharmacokinetics and cardiovascular effects of a single intravenous dose of protamine in normal volunteers.," *Anesth. Analg.*, vol. 94, no. 3, pp. 514–22; table of contents, Mar. **2002**.
- [175] J. Van Ryn-McKenna, L. Cai, F. A. Ofofu, J. Hirsh, and M. R. Buchanan, "Neutralization of enoxaparine-induced bleeding by protamine sulfate.," *Thromb. Haemost.*, vol. 63, no. 2, pp. 271–4, Apr. **1990**.
- [176] P. C. Uppuluri, D. Kristol, R. R. Arora, and C. R. Spillert, "Coagulant effects of protamine sulfate on human blood in absence of heparin," in *2003 IEEE 29th Annual Proceedings of Bioengineering Conference*, p. 248, **2003**.
- [177] A. Perkas, "A comparison of the quantitative action of protamine and heparin on blood coagulation. Significance in clinical and laboratory usage.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 73, no. 5, pp. 676–81, May **1980**.



- [178] V. G. Nielsen, "Protamine enhances fibrinolysis by decreasing clot strength: role of tissue factor-initiated thrombin generation.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 81, no. 5, pp. 1720–7, May **2006**.
- [179] M. J. Sena, G. Douglas, T. Gerlach, J. K. Grayson, K. O. Pichakron, and D. Zierold, "A pilot study of the use of kaolin-impregnated gauze (Combat Gauze) for packing high-grade hepatic injuries in a hypothermic coagulopathic swine model.," *J. Surg. Res.*, vol. 183, no. 2, pp. 704–9, Aug. **2013**.
- [180] M. E. Chávez-Delgado, C. V. Kishi-Sutto, X. N. Albores de la-Riva, M. Rosales-Cortes, and P. Gamboa-Sánchez, "Topic usage of kaolin-impregnated gauze as a hemostatic in tonsillectomy.," *J. Surg. Res.*, vol. 192, no. 2, pp. 678–85, Dec. **2014**.
- [181] S. Nakai, T. Nakaya, and M. Imoto, "Polymeric phospholipid analogs, 11. Synthesis and polymerization of 2-aminoethyl 2-(p-methacryloyloxybenzoyloxy)ethyl hydrogen phosphate," *Die Makromol. Chemie*, vol. 179, no. 10, pp. 2349–2353, Oct. **1978**.
- [182] A. Korematsu, Y. Takemoto, T. Nakaya, and H. Inoue, "Synthesis, characterization and platelet adhesion of segmented polyurethanes grafted phospholipid analogous vinyl monomer on surface," *Biomaterials*, vol. 23, no. 1, pp. 263–271, Jan. **2002**.
- [183] H. K. Kim, K. Kim, and Y. Byun, "Preparation of a chemically anchored phospholipid monolayer on an acrylated polymer substrate.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 17, pp. 3435–44, Jun. **2005**.
- [184] M. G. McKee, "Phospholipid Nonwoven Electrospun Membranes," *Science (80- )*, vol. 311, no. 5759, pp. 353–355, Jan. **2006**.
- [185] R. G. Ellis-Behnke, Y.-X. Liang, D. K. C. Tay, P. W. F. Kau, G. E. Schneider, S. Zhang, W. Wu, and K.-F. So, "Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale.," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 4, pp. 207–15, Dec. **2006**.
- [186] L. Ruan, H. Zhang, H. Luo, J. Liu, F. Tang, Y.-K. Shi, and X. Zhao, "Designed amphiphilic peptide forms stable nanoweb, slowly releases encapsulated hydrophobic drug, and accelerates animal hemostasis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 13, pp. 5105–10, Mar. **2009**.
- [187] A. J. Shoffstall, L. M. Everhart, M. E. Varley, E. S. Soehnlén, A. M. Shick, J. S. Ustin, and E. B. Lavik, "Tuning Ligand Density on Intravenous Hemostatic Nanoparticles Dramatically Increases Survival Following Blunt Trauma," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 8, pp. 2790–2797, Aug. **2013**.
- [188] Z. Luo, S. Wang, and S. Zhang, "Fabrication of self-assembling d-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis," *Biomaterials*, vol. 32, no. 8, pp. 2013–2020, Mar. **2011**.

- [189] C. Dai, Y. Yuan, C. Liu, J. Wei, H. Hong, X. Li, and X. Pan, "Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5364–75, Oct. **2009**.
- [190] M. B. Dowling, R. Kumar, M. A. Keibler, J. R. Hess, G. V. Bochicchio, and S. R. Raghavan, "A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action," *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3351–3357, May **2011**.
- [191] J. Zeleny, "The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces," *Phys. Rev.*, vol. 3, no. 2, pp. 69–91, Feb. **1914**.
- [192] "Process and apparatus for preparing artificial threads." 02-Oct-**1934**.
- [193] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T. Yong, Z. Ma, and R. Ramaseshan, "Electrospun nanofibers: solving global issues," *Mater. Today*, vol. 9, no. 3, pp. 40–50, Mar. **2006**.
- [194] D. Annis, A. Bornat, R. O. Edwards, A. Higham, B. Loveday, and J. Wilson, "An elastomeric vascular prosthesis.," *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, vol. 24, pp. 209–14, Jan. **1978**.
- [195] A. C. Fisher, L. De Cossart, T. V How, and D. Annis, "Long term in-vivo performance of an electrostatically-spun small bore arterial prosthesis: the contribution of mechanical compliance and anti-platelet therapy.," *Life Support Syst.*, vol. 3 Suppl 1, pp. 462–5, Jan. **1985**.
- [196] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, and M. P. Brenner, "Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory," *Phys. Fluids*, vol. 13, no. 8, p. 2201, Aug. **2001**.
- [197] A. L. Yarin, S. Koombhongse, and D. H. Reneker, "Bending instability in electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Phys.*, vol. 89, no. 5, p. 3018, Mar. **2001**.
- [198] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning," *J. Appl. Phys.*, vol. 87, no. 9, p. 4531, May **2000**.
- [199] K. Jiang, Y.-Z. Long, Z.-J. Chen, S.-L. Liu, Y.-Y. Huang, X. Jiang, and Z.-Q. Huang, "Airflow-directed in situ electrospinning of a medical glue of cyanoacrylate for rapid hemostasis in liver resection," *Nanoscale*, vol. 6, no. 14, p. 7792, Jul. **2014**.
- [200] B. K. Gu, S. J. Park, M. S. Kim, C. M. Kang, J.-I. Kim, and C.-H. Kim, "Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 97, no. 1, pp. 65–73, Aug. **2013**.

- [201] H. S. and S. M., "Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose," Oct. **1954**.
- [202] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, "Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin.," *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 10, pp. 1612–31, Oct. **2011**.
- [203] D. Sun, J. Yang, and X. Wang, "Bacterial cellulose/TiO<sub>2</sub> hybrid nanofibers prepared by the surface hydrolysis method with molecular precision.," *Nanoscale*, vol. 2, no. 2, pp. 287–92, Feb. **2010**.
- [204] J. Kim, Z. Cai, H. S. Lee, G. S. Choi, D. H. Lee, and C. Jo, "Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application," *J. Polym. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 739–744, Jul. **2010**.
- [205] A. E. Donius, M. A. Kiechel, C. L. Schauer, and U. G. K. Wegst, "New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. Part II: mechanical properties.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 81, p. 20120946, Apr. **2013**.
- [206] Y. M. Liew, H. Kamarudin, A. M. Mustafa Al Bakri, M. Luqman, I. Khairul Nizar, C. M. Ruzaidi, and C. Y. Heah, "Processing and characterization of calcined kaolin cement powder," *Constr. Build. Mater.*, vol. 30, pp. 794–802, May **2012**.
- [207] Y. Jiang, Q. Sun, L. Zhang, and Z. Jiang, "Capsules-in-bead scaffold: a rational architecture for spatially separated multienzyme cascade system," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 47, p. 9068, Nov. **2009**.
- [208] "Vitamin k2 microspheres." 23-Oct-**2014**.
- [209] Z. H. Fan, Z. G. Xie, B. Q. Zuo, P. Zhang, L. B. Li, Y. X. Shen, and H. X. Zhang, "The Biocompatibility of Olfactory Ensheathing Cells on the Silk Fibroin Scaffolds," in *Advanced Materials Research*, vol. 175–176, pp. 224–229, **2011**.
- [210] X. Hu, D. Kaplan, and P. Cebe, "Determining Beta-Sheet Crystallinity in Fibrous Proteins by Thermal Analysis and Infrared Spectroscopy," *Macromolecules*, vol. 39, no. 18, pp. 6161–6170, Sep. **2006**.
- [211] M. A. de Moraes, G. M. Nogueira, R. F. Weska, and M. M. Beppu, "Preparation and Characterization of Insoluble Silk Fibroin/Chitosan Blend Films," *Polymers (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 719–727, Dec. **2010**.
- [212] J. M. Nzai and A. Proctor, "Soy lecithin phospholipid determination by fourier transform infrared spectroscopy and the acid digest/arseno-molybdate method: A comparative study," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 1, pp. 61–66, Jan. **1999**.

- [213] W. Tang, Y. Yuan, D. Lin, H. Niu, and C. Liu, "Kaolin-reinforced 3D MBG scaffolds with hierarchical architecture and robust mechanical strength for bone tissue engineering," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 24, pp. 3782–3790, May **2014**.
- [214] M. V Wohlauser, E. E. Moore, J. Harr, E. Gonzalez, M. Fragoso, and C. C. Silliman, "A standardized technique for performing thromboelastography in rodents.," *Shock*, vol. 36, no. 5, pp. 524–6, Nov. **2011**.
- [215] L.-S. Wan and Z.-K. Xu, "Polymer surfaces structured with random or aligned electrospun nanofibers to promote the adhesion of blood platelets.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 89, no. 1, pp. 168–75, Apr. **2009**.
- [216] M. E. Carr, "Diabetes mellitus: a hypercoagulable state.," *J. Diabetes Complications*, vol. 15, no. 1, pp. 44–54, Jan. **2001**.
- [217] A. Hughes, B. A. McVerry, L. Wilkinson, A. H. Goldstone, D. Lewis, and A. Bloom, "Diabetes, a hypercoagulable state? Hemostatic variables in newly diagnosed type 2 diabetic patients.," *Acta Haematol.*, vol. 69, no. 4, pp. 254–9, Jan. **1983**.
- [218] P. W. Henderson, D. J. M. Kadouch, S. P. Singh, P. N. Zawaneh, J. Weiser, S. Yazdi, A. Weinstein, U. Krotscheck, B. Wechsler, D. Putnam, and J. A. Spector, "A rapidly resorbable hemostatic biomaterial based on dihydroxyacetone," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 9999A, no. 2, p. NA–NA, May **2009**.
- [219] "A gelatin sponge comprising an active ingredient, its preparation and use." 24-Nov-**2010**.
- [220] B. L. Bennett, L. F. Littlejohn, B. S. Kheirabadi, F. K. Butler, R. S. Kotwal, M. A. Dubick, and J. A. Bailey, "Management of External Hemorrhage in Tactical Combat Casualty Care: Chitosan-Based Hemostatic Gauze Dressings - TCCC Guidelines-Change 13-05.," *J. Spec. Oper. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 40–57, Jan. **2014**.
- [221] F. Arnaud, T. Tomori, W. Carr, A. McKeague, K. Teranishi, K. Prusaczyk, and R. McCarron, "Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 10, pp. 1708–13, Oct. **2008**.
- [222] D. N. Sari, S. Endardjo, and D. I. S. Santoso, "Blood lactate level in Wistar rats after four and twelve week intermittent aerobic training," *Med. J. Indones.*, vol. 22, no. 3, p. 141, Aug. **2013**.
- [223] B. H. Chin, S. J. Kozbelt, and L. J. Sullivan, "Measurement of 14 Blood Components in Rats, Dogs, and Mice Using CentrifichemR Analyzer," *Toxicol. Pathol.*, vol. 7, no. 2, pp. 10–13, Feb. **1979**.
- [224] *The Laboratory Rat: Biology and Diseases, 1. cilt.* **2013**.

- [225] R. Uribe-Escamilla, P. S. Aparicio, A. C. Izquierdo, and A. Alfaro-Rodríguez, "Reference Values for Electrolytes and Blood Gases in Wistar Rats with Permanent Cerebral Ischemia: The Effect of Treatment with Glycine on Gasometry and Electrolytes," *Multiciencias*, vol. 11, no. 4, pp. 378–386, **2011**.
- [226] T. Matsuzawa, Y. Hayashi, M. Nomura, T. Unno, T. Igarashi, T. Furuya, K. Sekita, A. Ono, and Y. Kurokawa, "A survey of the values of clinical chemistry parameters obtained for a common rat blood sample in ninety-eight Japanese laboratories," *J. Toxicol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 25–44, Feb. **1997**.
- [227] C. L. Alemán, R. M. Más, I. Rodeiro, M. Noa, C. Hernández, R. Menéndez, and R. Gámez, "Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months," *Lab. Anim.*, vol. 32, no. 4, pp. 457–66, Oct. **1998**.
- [228] I. Nnah, "Blood Coagulation Tests and Platelets Counts in Diabetic Rats Treated with *Ficus sur*, *Jatropha tanjorensis*, *Mucuna pruriens* and *Chromolaena odorata* Leaf Extracts," *Int. Blood Res. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 47–53, Jan. **2015**.
- [229] Y. Li, H. Li, L. Xiao, L. Zhou, J. Shentu, X. Zhang, and J. Fan, "Hemostatic Efficiency and Wound Healing Properties of Natural Zeolite Granules in a Lethal Rabbit Model of Complex Groin Injury," *Materials (Basel)*, vol. 5, no. 12, pp. 2586–2596, Dec. **2012**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Zeynep KARAHALİLOĞLU

Doğum Yeri : KIRIKKALE

Medeni Hali : Bekar

E-posta : zeynok@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı,  
Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara, Türkiye

## Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Eğitimi Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp A. D., Ankara

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Orta seviye

Almanca : Orta Seviye

## İş Deneyimi

2008 – 2009 : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi)

2009-2015 : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp A. D (Araştırma  
Görevlisi)

## **Deneyim Alanları**

**Doku Mühendisliği ve Biyomalzeme:** Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere biyomalzemelerin üretimi , modifikasyon ve karakterizasyon çalışmaları.

**Biyokompatibilite:** Hazırlanan biyomalzemenin *in-vivo* ve *in-vitro* biyouyumluğunun, etkinliklerinin araştırılması. Hayvan modellerinin oluşturulması.

**Mikrobiyal Kaynaklı Polimerler:** Bakteriyel ve fungal kaynaklı biyopolimerlerin üretim ve karakterizasyon çalışmaları. Bu malzemelerden yola çıkarak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik biyomateryallerin tasarlanması.

**Elektroeğirme:** Farklı polimerlerden elektroeğirme yöntemiyle biyomalzemelerin hazırlanması, karakterizasyon ve yüzey modifikasyon çalışmaları. Elektroeğirilmiş yapıların farklı doku mühendisliği uygulamalarında kullanımının *in-vivo* ve *in-vitro* deneylerle araştırılması.

## **Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

“Nanoteknolojik Yaklaşımlarla Koagülatif Sistemlerin Geliştirilmesi“ (014BİYP604003). Proje bütçesi 34.840 TL, Yardımcı Araştırmacı) Hacettepe Üniversitesi, Öğretim Üyesi yetiştirme Programı Destek Projesi.

## **Tezden Üretilmiş Yayınlar**

## **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**