**kı**

**İLAÇ DIŞI ÇALIŞMALAR İÇİN PROTOKOL BİLGİLERİ FORMU H.3 (FORM 14)**

|  |
| --- |
| **PROTOKOL ADI & KODU** |
| **İnsan Plasentasından Tip IV Kolajen Eldesi ve Hücre Migrasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması** |

| GİZLİLİK UYARISI |
| --- |
| **Bu belge gizlidir ve araştırma ekibinin bilgisi dışında basılamaz ve çoğaltılamaz.** |

|  |
| --- |
| **Protokol Adı ve Kodu** |
| İnsan Plasentasından Tip IV Kolajen Eldesi ve Hücre Migrasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması |

|  |
| --- |
| **1. ÇALIŞMANIN ÖZETİ** |
| Kolajen, memelilerin tüm proteinlerinin yaklaşık % 30’unu oluşturan hücre dışı matrisin (ECM) önemli bir proteinidir. Şimdiye kadar, en az 29 farklı tip kolajen tanımlanmaktadır. İnsanlarda bulunan ve literatürde rapor edilen en az yirmi farklı kolajen tipi vardır. Hemen hemen tüm bağ dokularında ve interstisyel membranın baskın bileşeninde eksprese edilmektedir. Kemik, cilt, tendonlar, kornea, kan damarı duvarları ve diğer bağ dokuların yapısal ve mekanik yapı iskelesini (matris) oluşturan lifler halinde birleşmektedir. Kolajen tip IV, dokular için mekanik destek sağlayan hücre dışı matrisin özel formu olan bazal membranların önemli bir bileşenidir. Kolajen tip IV, hücre adezyon reseptörleri, ligand ve diğer proteinler için bir iskele görevi görmektedir. Ayrıca doku oluşumunda, farklılaşmada, homeostazda ve yeniden şekillenmede anahtar rol oynamaktadır. Kolajenin tüm organlar ve dokular açısından önemi büyüktür. Organların gelişimine yardımcı olur; yara ve doku iyileşmesinde; kornea, diş etleri onarımında; kemik ve kan damarı onarımında ve en önemlisi de hücrenin çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma gibi biyolojik fonksiyonlarına yardımcı olmasıyla büyük önem taşımaktadır. Deri, kemik, kıkırdak gibi birçok doku ve organa hem yapısal hemde mekanik destek sağlayan kolajen, hücreler tarafından sentezlenmektedir. Kolajen üretimi yirmili yaşlardan itibaren her yıl %1 oranında azalır. Otuzlu yaşlarda üretim belirgin bir şekilde düşerken, elli yaşından sonra vücuttaki kolajen içeriğinin yaklaşık yarısı tükenmektedir. Kolajen miktarındaki bu azalma deri, kemik ve kıkırdak başta olmak üzere yaşlanma ve bazı sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Kolajen eksikliği vücutta önemli sorun ve hastalıkları beraberinde getirmektedir. Kolajen eksikliği en belirgin ciltte farkedilir; cilt sıkılığını kaybederek sarkmaya başlar ve kırışıklıklar oluşur. Aynı zamanda, kemiklerin uçlarındaki kıkırdak yapı yüksek miktarda kolajen içermektedir. Eklemlerdeki kolajenin kaybı, kemik-kemik temasını artırmakta ve eklem ağrıları neden olmaktadır. Lupus ve romatoid artrit gibi hastalıklarda da kolajen eksikliği eklem hasarı ve beraberinde harekette azalmalara yol açabilmektedir. Tıp alanında da yanık, yara ve kas deformitelerinde de kolajen desteği tedavide önemlidir. Bütün bu sebeplerden dolayı vücudun ihtiyacı olan kolajen ile desteklenmesi sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek biyouyumluluk ve düşük immünojenite nedeniyle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için çok önemlidir. Azalan kolajen miktarını desteklemek için kolajen içeren preparatların kullanımı son yıllarda oldukça artmıştır. Genellikle sığır, balık ve tavuk gibi hayvansal kaynaklı kolajen ürünleri kullanılmaktadır. Kolajen, memelilerin çeşitli doku ve organlarında yaygın olarak bulunur. Organlardan ve dokulardan kolayca elde edilmekte ve büyük miktarlarda saflaştırılmaktadır. Bu kolajenler, doku mühendisliği uygulamaları için uygun yapısal, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özelliklere sahiptir. Ayrıca biyolojik olarak parçalanabilmekte, sitotoksik etki göstermemekte, hücresel bağlanmayı ve büyümeyi desteklemektedir. Son birkaç yılda başta dermatoloji ve plastik cerrahi olmak üzere kolajen kullanımı in-vivo ve in-vitro olarak artmıştır.  Anne ile bebek arasındaki besin, oksijen ve diğer maddelerin alışverişini sağlayan plasenta, kolajen açısından oldukça zengindir. Plasenta hamilelik sırasında bebeğe yeterli oksijen ve besin temini oluşturup bebekteki fetal atıkların uzaklaştırılmasını, endojen ve eksojen maddelerin değişimini sağlamaktadır. Tip I, Tip III, Tip IV ve Tip V kolajen açısından olan zengin plasenta, doğum sonrası annenin vücudundan çıkartılmakta ve tıbbi atık protokollerine uygun olarak bertaraf edilmektedir. Sadece plasenta değil ayrıca plasental membranlar da doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta biyomateryal olarak kullanılmaktadır. Plasentaların mükemmel antibakteriyel, anti-inflamatuar önleyici özelliklere sahip olduğu geçmiş çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu da plasentayı uygun bir klinik ürün kaynağı yapmaktadır. Plasenta yüksek oranda kolajen içermektedir. Plasentadan elde edilen kolajen ise diğer kaynaklara göre daha yüksek biyouyumluluğa sahiptir.  Bu projede kolajen açısından zengin biyolojik atık materyali olan plasentadan kolajen izolasyonunu yapmayı amaçlamaktayız. Bu amaçla 20-35 yaş aralığındaki 5 sağlıklı gebenin plasentaları kullanılacaktır. Kolajen miktarı yaş ile orantılı olarak azalmaktadır. Bu yüzden projede yer alması planlanan gebelerin yaş sınırlaması 20-35 olarak belirlenmiştir. Böylece biyolojik atık materyalinden endüstride kullanılabilecek bir ürün elde edilebileceği, aynı zamanda hastanelerin plasenta atık materyalinin geri dönüşüm masraflarının azaltılabileceği inancındayız.  Bu kapsamda İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Klinikleri’nde rutin takipleri yapılan toplamda 5 sağlıklı gebenin doğum sonrası plasentaları bu projeye dahil edilecektir. Plasentadan farklı ekstraksiyon yöntemlerinin bir arada kullanılması ile kolajen elde edilecektir. Ayrıca elde edilen tip IV kolajenin hücre kültüründe insan fibroblast hücre hattında, yara iyileşmesi ve hücre migrasyonuna etkisi olup olmayacağı araştırılacaktır. |

|  |
| --- |
| 2. ÇALIŞMANIN GEREKÇESİ VE AMAÇLARI |
| **Giriş ve Çalışmanın Gerekçesi:** |
| *(Araştırmanın insanlar üzerinde uygulanmasının gerekliliği, uygulamanın daha önce ülkemizde veya başka ülkelerde yapılıp yapılmadığı, yapılmışsa bu çalışmadan beklenen ek veriler veya bu çalışmanın diğerlerinden farkları, beklenen yararları bilimsel veriler çerçevesinde açıklanmalı)*  Kolajen, yüksek protein içeriğine sahiptir. Yapısal-fonksiyonel özelliklerinden dolayı dokuların temel yapı taşlarındandır. Kolajen yüksek su tutma kapasitesi özelliği jel oluşumuna neden olurken, stabilize etme özelliği deri, kıkırdak ve kemik gibi dokularda destek görevi görmektedir. Kolajen gıda, ilaç, dermatolojik ürünler dışında hücre kültürü, deri, film ve biyomedikal malzemeler gibi endüstrinin farklı alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğu ticari kolajen ürünü balık (tuna balığı, yılan balığı, köpek balığı vs.), domuz ve sığırlardan elde edilmektedir.  Balıktan elde edilen kolajenler doğaya daha az sera gazı salınımına sebep olması açısından tercih edilirken, az miktarda amino asit içermeleri (prolin ve hidroksiprolin) nedeniyle memeli kolajeninden daha düşük bir stabiliteye ve denatürasyon sıcaklığına sahiptir. Bu da insan vücut sıcaklığında kolayca denatüre olabileceği için balık kolajeninin işlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden biyomedikal uygulamalarda kullanımı sınırlıdır. Ayrıca her yıl kolajen eldesi amacıyla birçok deniz canlısı ile birlikte 73-100 milyon köpek balığı öldürülmekte ve besin zincirine müdahale edilmektedir.  Domuz ve sığırdan elde edilen kolajende ise hayvandan insanlara bazı hastalıklar (deli dana, şap hastalığı vs.) geçebilmektedir. Ayrıca bu hayvanlardan kolajen elde ederken doğaya yüksek sera gazı salınımı ve İslam kültür anlayışına göre kaynak tercihleri değişiklik göstermektedir. Artan tüketim talebinin karşılamak için yeni kolajen kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır.  İnsan plasentası yüksek kolajen içermektedir. Gebelik sürecinin sonlanmasıyla birlikte tıbbi atık haline gelen bu doku bertaraf edilmektedir. Tıbbi atık bertarafı kurumlar için oldukça yüksek maliyete neden olmaktadır. İnsan plasentasının kolajen eldesiyle endüstriye kazandırılması hakkında yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda ülkemizde bu alanda uygulanan veya planlanan bir girişimin olmadığı, dünyada ise bu konuda sınırlı sayıda yayının olduğu gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak farklı kolajen kaynağı ihtiyacını insan plasentasından elde etmeyi amaçlamaktayız. Bu amaca ulaşmak için, enzimatik hidroliz ve tuzla çöktürme gibi bazı protein ekstraksiyon yöntemleri kullanılacaktır. Enzimatik hidroliz yöntemi ile kolajen fragmanları doğal formlarını koruyabilmektedir. Bu yöntem ile daha az atık materyal açığa çıkmakta ve işlem süresi kısalmaktadır. Aynı zamanda güvenilir bir yöntemdir. Bu doğrultuda insan plasentasından uygun kalitede ve saflıkta tip IV kolajen elde edilecektir. Daha sonra elde edilen kolajenin in vitro fibroblast hücrelerinde yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenecektir. Projenin sonucunda hastanelerdeki tıbbi atık mali yükünü azaltmayı ve tıbbi atık olan bu plasentaları tip IV kolajen olarak endüstriye kazandırılmayı amaçlamaktayız. |
| **Çalışmanın Ana Amacı** |
| İnsan plasentasından tip IV kolajenin elde edilmesi, elde edilen kolajenin SDS ve Western Blot yöntemi ile karakterize edilmesidir. |
| **Çalışmanın İkincil Amacı** |
| Elde edilen kolajen, in vitro insan fibroblast hücrelerinde yara iyileşmesi ve hücre migrasyonuna etkisi araştırılması amaçlanmaktadır |

|  |
| --- |
| **3. ÇALIŞMANIN HİPOTEZ (LER)İ** |
| Kolajen yara iyileşmesinde önemli role sahip bir proteindir. Kolajenin tiplerinden biri olan tip IV kolajen, bazal membranlarda bulunan önemli bir bileşendir. Kolajen memelilerin çeşitli doku ve organlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Organlardan ve dokulardan kolayca izole edilebilmekte ve büyük miktarlarda saflaştırılabilmektedir. İzole edilen kolajenler sitotoksik değildir ve biyolojik olarak parçalanabilir. Ayrıca hücresel bağlanmayı ve büyümeyi destekmekte, çeşitli şekillerde işlenebilmekte ve hücrelerin migrasyonunu ve hayatta kalmasını düzenlemektedir. Plasenta, bebeğe besin ve oksijen sağlayan içinde birçok protein, vitamin ve mineraller bulunan önemli bir organdır. Günümüzde revaşta olan kolajen, vücut için birçok yarara sahiptir ve plasentada bol miktarda bulunmaktadır. İnsan plasentası ise anneden alındıktan sonra tıbbi atık olarak atılmaktadır. Bu biyolojik atık materyalinin doğumdan sonra anneye ya da bebeğe herhangi bir yararı bulunmamaktadır. Projemizde insan plasentasından tip IV kolajen elde edilecek ve bu kolajen daha sonra yara iyileşmesindeki önemini vurgulamak için insan fibroblast hücre hattı üzerinde test edilecektir. Bu proje biyolojik atık miktarının azaltmasında ve insan plasentasının endüstriye kolajen olarak kazandırılmasında önemli bir destek sağlayacaktır. Projenin başarısına göre farklı kolajen tipleri için yeni çalışmalara kapı açabileceği düşünülmektedir. |

|  |  |
| --- | --- |
| **4. ARAŞTIRILACAK POPULASYON & GÖNÜLLÜLERİN SEÇİMİ** | |
| **Hastalık Adı** | Yok |
| **Gönüllü Sayısı & Özellikleri** | **Kadın Yaş aralığı:** 20-35 kadın  **Sağlıklı:** 5 gebe  **Hasta (Hastalığın adı) :** -  **Toplam sayı:** 5 |
| **Gönüllülerin Çalışmaya Katılmasına İlişkin Düzenlemeler** | |
| *Çalışmaya dahil etmek üzere hangi yöntemlerle gönüllüye ulaşılabileceği yazılmalıdır: Duyuru, gönüllü havuzu, diğer yöntemler.* | |
| **Çalışmaya Alınma Kriterleri** | |
| Gönüllülerin 20-35 yaş aralıklarında olmalı  Gönüllülerin gönüllülük olur formunu doldurmuş olmaları  Çalışmaya dahil edilecek gönüllüler: 5 sağlıklı gebe | |
| **Çalışmaya Alınmama Kriterleri** | |
| Gönüllülerin 18 yaşından küçük ve gönüllülük olur formunu doldurmamış olmaları | |
| **Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri ve Bu Durumda Yapılacak Uygulamalar** | |
| Gönüllü bireyin gebeliğinin doğum dışında (düşük, kürtaj) sonlanması   * Bu durumda gönüllü çalışmadan çıkarılacak, uygun başka bir gönüllü gebe bulunacaktır. | |

|  |
| --- |
| **5. ÇALIŞMA TASARIMI & METODU** |
| **Çalışma Tasarımı** |
| Projemizde uygun sağlıklı gebelerin seçimi yapılacaktır. Sağlıklı gebelerin birçok rutin testler ile takibi yapıldıktan sonra annenin rızası ile doğum esnasında plasenta alınacaktır. Numune alımından sonra plasenta ön işleme sokulacaktır. Ön işlemden sonra kolajen ekstraksiyon yöntemleri ile kolajen eldesi sağlanacaktır. SDS ve Western Blot analizleri yapılıp kolajen IV tespit edilecektir. Daha sonra kolajen tip IV’ün yara iyileşmesi ve hücre migrasyonundaki etkisine bakmak için hücre kültüründe insan fibroblast hücre hattı üzerinde denenecektir. |
| **Çalışma Metodunun Ayrıntıları** |
| **Kolajen ekstraksiyonu:**  Plasenta anneden alınıp distile su ile yıkandıktan sonra+ 4 ℃ de parçalara ayrılacaktır. Parçalara ayrılmış plasenta üzerine, 18 gr NaCI 500 ml suda çözündükten sonra 280 ml etanol eklenecektir ve son hacim 2 L olacak şekilde kalanına su eklenecektir. Çözelti karıştırıcıda 30 dk karıştırıldıktan sonra santrifüjlenecektir. Aynı yıkama süreci 1 kere daha tekrarlanacaktır. Karıştırıcıda 8 saat karıştırılıp santrifüjlenecektir. Son hacim gene 2 L olacak şekilde santrifüjden çıkan pelete + 4 ℃ de 0.05M sitric acid, 0.01N HCI koyulup pH 1.9’a ayarlanacaktır. Çözeltinin pH’ı NaOH ile 3.2 ‘e çıkarılacaktır. Çözelti 2 saat karıştırılıp santrifüjlenecektir. Etanol ile ilk kez yıkama için; 20 ℃ de pelete 1 L etanol eklenecektir. 20 ℃ de gece boyunca çözelti karıştırılıp santrifüj edilecektir. 2. etanol ile yıkama için 1. etanol ile yıkama prosedürü tekrarlanacaktır. Çözelti 2 saat kadar karıştırıldıktan sonra santrifüj edilecektir. Asit ile yıkama için santrifüjden çıkan pelete + 4 ℃ de 0.01 N HCI eklenecektir. Çözelti + 4 ℃ de 8 saat boyunca karıştırıldıktan sonra 18 gram NaCI eklenecek ve çözelti 30 dakika bekletilecektir. Çözelti daha sonra santrifüj edilecek ve dokunun asit ile yıkama işlemi tamamlanacaktır. Pepsin sindirimi için 17 ℃ de 0.02 M sitrik asit ve ayarlanan hacme göre pepsin eklenecektir. Sürekli olarak yavaşça 17 ℃ de karıştırılarak pH 2.3 ‘te 15 saat sindirim sağlanacaktır. pH sürekli kontrol edilerek 2.3 ‘ten sapmaması sağlanacaktır. Eğer gerekirse çözelti santrifüj edilecektir. Tip IV kolajen ekstraksiyonu için süpernatant korunacaktır. Süpernatantı daha berrak hale getirmek için süpernatant hacme göre ayarlı filtrelerden geçirilecektir. Tip IV kolajen saflaştırma işlemi yapılacaktır. Daha sonra asit kolajen çökeltisine aseton eklenecektir. Daha sonra kimyasal bir başlık içinde steril hava akımı ile kurutma sağlanacaktır. Sonuçta tip IV kolajen kuru fibrilleri elde edilecektir.  **Saflaştırma**  Plasental dokunun ilk sindirimi için pepsinin dozu optimize edilmeli. Kolajen IV’ ün ilk sindirimi boyunca temel olarak dokudan ekstrakte edilebilir. Tip IV kolajeni içermesi gereken süpernatantı toplamak için sindirilmiş dokunun santrifüjü (Çökelme Tip I ve Tip III kolajen ekstraksiyonu için kullanılabilir). 2 N NaOH ile 7.5 pH’ta pH nötralizasyonu- 2 saat için sıcaklık 10 ℃ (pepsin inaktivasyonu). Sonra pH’ı 2 N HCI ile 5’e ayarla- 10℃ de gece boyu inkübasyon. Çökeltideki saf olmayan içeriği uzaklaştırmak için santrifüj edilir. Süpernatantı NaCI 70 g/ l ‘ e ayarla 16 ℃ de pH 7.5 olacak şekilde ve gece boyu inkübasyon. Çökeltiyi toplamak için santrifüjle, 0.01N HCI’de çökeltiyi çöz ve 4 ℃ de pH ‘ı 2 ‘e ayarla. pH 7.2’de 0.01 M Sodyum fosfat ile çökeltiyi ayarla. 18 ℃ sıcaklıkta gece boyu inkübasyon. Süpernatantı santrifüj ile topla ve herhangi çökmeyen maddeleri uzaklaştırdığından emin ol.  Süpernatantı 100 g/ L NaCI’e ayarla (pH 7.2’de gece boyu 17 ℃ ‘de). Çökeltiyi toplamak için santrifüj. 0.01 N HCI’de p H 2’ e ayarlayarak peleti çöz. Tip IV kolajenin asit çözeltisini filtrele. 41 g/l NaCI olacak şekilde NaCI ekle ve gece boyu inkübasyon yap. Çökmüş Tip IV kolajeni santrifüjle. Kimyasal bir başlık altında aseton dehidrasyon süreci. Tip IV kolajen asit tozunu topla. (Önce aseton ya da etanol ile müdahale ve ardından liyofilizasyon ya da kuru hava)  **SDS jel elektroforezi:**  Örnekler 2 adet 6% SDS-poliakrilamid jel üzerinde 30 µg protein yüklenip kompakt-PAGE aparatı kullanılarak 70 mA/jel sabit akımda elektroforeze tabi tutulacaktır. Yürütülen jellerden biri daha sonra %15 metanol (v/v) ve %5 asetik içinde %0,05 Coomassie Blue ile boyanacak ve %30 oranında metanol (v/v) ve %10 asetik asit (v/v) ile fazla boya uzaklaştırılacaktır. Diğer jel antikor ile işaretlenmek üzere membrana transfer edilecektir.  **Kolajen Kaplama:**  5 mg kolajen 5 ml steril %0,25 asetik ile sulandırılacak ve yavaşça karıştırılacaktır. 2°C ve 8°C'de gece boyunca manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılacaktır. Eğer hala çözünmeyen maddeler varsa çözelti yaklaşık 2 dk boyunca 300 rpm da santrifüj edilir. Kolajen %0,25 asetik ile istenen konsantrasyona seyreltilecektir. Tipik bir son kaplama konsantrasyonu 10 µg/ cm2 ile 100 µg/ cm2 olacaktır (Optimal belirlemek için muhtemelen test gerekecektir). Kültür yüzeyine uygun miktarda seyreltilmiş kolajen eklenecektir. Oda sıcaklığında veya 37°C'de üzeri kapalı olarak 1-2 saat inkübe edilecektir. Yüzey kuruyana kadar inkübe edildikten sonra kalan fazla materyal aspire edilir. Kaplanmış yüzeyi steril dengeli bir tuz solüsyonu ile dikkatlice durulanacaktır (Yüzeyleri çizmekten kaçınılarak). Kalan malzeme kaplanmış yüzeyden aspire edilecektir. Kaplanmış kültür kapları artık kullanıma hazır olmuş olacaktır. Kurumuş kültür kapları, steril kültür kabininde UV ışığına maruz bırakılıp etanol ile durulanarak strilize edilecektir. Kaplanmış kültür kapları 2 ila 10°C'de saklanacaktır.  **Hücre Kültürü ve Hücre Migrasyonu:**  Elde edilen kolajen kültür matrisi olarak kaplandıktan sonra insan fibroblast hücre hattında hücre göçü yara iyileşmesi üzerindeki etkisine bakılacaktır. Birincil insan fibroblast hücre hattı İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi’ Merkezi Araştırmalar laboratuvarından temin edilecektir. İlk olarak flaskımızı inkübatörden çıkardıktan sonra fazla medium çekilerek adheren hücreleri tripsinize edilecektir. Daha sonra tripsin FBS içeren medium kullanarak inaktif hale getirilecek ve hücreler toplanarak tripan blue ile sayılacaktır. Kolajen kaplı 24 well platelere ekilerek 24 saat tutunmaları beklenilecektir. İnkübasyon sonrasında yara modeli oluşturmak için 200 mikrolitre pipet ucu kullanılarak platelere çizik atılacaktır. Pipet yara modeli yapılırken dik bir şekilde tutulmalıdır. Hücrelerin kollajen kaplı 24 well plate’lerde 24,48,72 saat sonrasındaki migrasyon kapasitesi değerlendirilecektir.  **İstatistiksel analiz:**  SDS jel elektroforezden elde edilen sonuçlar bant boylarına göre marker ile karşılaştırılacak ve oluşan bantlar kolajen tiplerine göre isimlendirilecektir. Western blot ile elde edilen bant ticari alınacak insan kolajeni ile karşılaştırılacak ve yapılan prosedürün başarısı tartışılacaktır. Yara modeli oluşturulan fibroblast hücreleri kolajen ile mualeme edildikten sonra 0. 24. 48. ve 72 saatlerde mikroskop ile görüntülenecektir. Image J kullanılarak alan ölçümü yapılacaktır. Yara genişliği yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanacaktır (Tz sıfır zamanı, Tx ölçüm zamanı).  Yüzde yara genişliği=[(Yara genişliği Tz- Yara genişliği Tx) / Yara genişliği Tz]×100  Ayrıca manuel sonuçlardan elde edilen alan ve ortalama uzunluk arasındaki farkı karşılaştırmak için eşleştirilmiş t-testleri, kontrol grubu ve farklı zaman dilimlerindeki sonuçları kendi aralarında analiz etmek için İki Yönlü ANOVA testi kullanılacaktır. 0,05' ten küçük anlamlı p değerleri olarak kabul edilecektir. |
|  |
| **Çalışma Günlerindeki & Vizitlerdeki İşlemlerin Tanımlanması** |
| Yok |
| **Randomizasyon (Rasgeleleştirme) Yöntemi & Önemi (varsa)** |
| Yok |
| **Körlük Yöntemi & Önemi (varsa)** |
| Yok |
| **Hasta Uyumunun Sağlanması** |
| İzmir Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi’ne doğum için gelen gebelerden plasenta örneği istenecektir. Doğum esnasında kadın doğum uzmanı ve ekibi tarafından plasenta alınacaktır. Gönüllüler araştırmanın amacı ve içeriği hakkında bilgilendirildikten sonra Gönüllü Olur Formu imzalatılarak çalışmaya dahil edilecektir. |
| **Kullanılacak Malzemeler & Saklama Koşulları & Sorumluluklar** |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Malzeme Adı** | **Kullanım Gerekçesi** | **Saklama**  **Koşulları** |
| Penisilin (streptomisin) / l glutamin | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | -20℃ |
| PBS (fosfat tampon salin) | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | 2-8℃ |
| Nitroselüloz membran | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | 15-30℃ |
| Coomasie mavisi | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| NaCI (Sodyum Klorür) | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Asetik asit | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| NaOH (sodyum hidroksit) | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Tripsin- EDTA 100 ml | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | -20℃ |
| Bloklama tamponu (10x) | Western çalışmasında kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Transfer tamponu (20X) | Western çalışmasında kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Pepsin | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. | 2-8 ℃ |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | 2-8 ℃ |
| FBS (Fetal sığır serum) | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | -20 ℃ |
| Tris-HCI | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| SDS polyacrilamid jel | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 2-8 ℃ |
| N,N’-metilen-bis (Akrilamid) | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Tetrametilendiamin (TEMED) | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Amonyum Persülfat (APS) | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Gliserol | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| ß-Merkaptoetanol | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| TCA (Trikloroasetik asit) | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| Brom fenol mavisi | SDS jel elektroforezinde kullanılacaktır. | 20-25 ℃ (oda sıcaklığı) |
| DMSO (Dimetilsulfoxide) | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | 15-30 ℃ |
| İnsan kolajen tip IV antikor | Western çalışmasında kullanılacaktır. | + 4 ℃ |
| İnsan kolajeni tip IV | Western çalışmasında kullanılacaktır. | + 4 ℃ (1-2 hafta) |
| İnsan fibroblast hücre hattı | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | -80 ℃ |
| Karbondioksit tüpü | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. | 51.7 ℃ |
| 12 ve 24 lük kültür kabı | Hücre kültüründe hücre migrasyonunda kullanılacaktır. |  |
| 10μl’lik Pipet Ucu | Tüm çalışma basamaklarında kullanılacaktır. |  |
| 100μl ‘lik Pipet Ucu | Tüm çalışma basamaklarında kullanılacaktır. |  |
| 1000μL’lik Pipet Ucu | Tüm çalışma basamaklarında kullanılacaktır. |  |
| 25 cm2 flask | Hücre kültürü pasajlamasında kullanılacaktır. |  |
| 75 cm2 flask | Hücre kültürü pasajlamasında kullanılacaktır. |  |
| 50 ml Falkon | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. |  |
| Beher (3000ml) | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Cam Mezür (500ml) | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Cam Mezür (100ml) | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Neşter Sapı | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Tek KullanımlıkNeşter Bıçakları | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Cam Petri Kapları, 90x20 mm | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| pH metre standard | Kolajen ekstraksiyonunda kullanılacaktır. |  |
| Serolojik pipetler (5 ml-10ml-25ml) | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacaktır. |  |

|  |
| --- |
| 6. ÇALIŞMA VERİLERİNİN TOPLANMASI |
| **Verilerin Kaydedilmesi/ Olgu Rapor Formları** |
| Her bir hasta için olgu rapor formu hazırlanıp gönüllü kişiler tarafından imzalanacaktır. Aynı zamanda veriler tıbbi belgeleme ve etik prosedürlerine uygun bir şekilde bir excel dosyasında bir araya getirilerek saklanacaktır. |
| **Yorumlanma, Raporlanma Yöntemleri** |
| SDS ve Western Blot analizi ile kolajen tip IV saptanacaktır. Kolajen saptandıktan sonra hücre kültüründe hücre migrasyonuna bakmak için kolajen kaplı 24 well plate üzerine fibroblast hücreleri ekilecektir. Hücreler tutunduktan sonra kuyularda pipet ucu ile yara oluşturulacaktır. Platelerin 0, 24,48 ve 72. saat görüntüleri çekilecek ve migrasyon kapasitesi formül yardımıyla değerlendirilecektir. |
| **Değerlendirme Kriterleri** |
| Ayrıca manuel sonuçlardan elde edilen alan ve ortalama uzunluk arasındaki farkı karşılaştırmak için eşleştirilmiş t-testleri, kontrol grubu ve farklı zaman dilimlerindeki sonuçları kendi aralarında analiz etmek için İki Yönlü ANOVA testi kullanılacaktır. 0,05' ten küçük anlamlı p değerleri olarak kabul edilecektir. |

|  |
| --- |
| **7. CERRAHİ PROSEDÜRLER (varsa)** |
| Yok |

|  |
| --- |
| **8. GÖNÜLLÜ GÜVENLİĞİNİN SAĞLANMASI İÇİN ÖNGÖRÜLEN ÖNLEMLER & UYARILAR** |
| Plasentası alınacak olan gönüllü gebe kadınlar bazı testlerden (HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-1-RNA, HTLV-DNA, parvovirus B19-DNA, Torch Paneli (Rubella IgG- IgM, Toxo IgG-IgM, CMV IgG-IgM, HSV Tip I IgG-IgM, HSV Tip II IgG-IgM)) geçirildikten sonra sağlıklı oldukları tespit edilecektir. Bu çalışma kapsamında güvenlik önlemi gerektirecek tek işlem plasenta alma işlemidir. Çalışmamız kapsamında plasenta alma işlemleri İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Kadın Doğum Hastanesi’nde deneyimli kişiler tarafından yapılacaktır. Plasenta alma işleminde aseptik teknikler uygulanacaktır.  Deneyimli ekip ve kadın doğum uzmanı ile plasenta alınacaktır. |

|  |
| --- |
| **9. ÇALIŞMANIN DURDURULMASINI GEREKTİRECEK KOŞULLAR** |
| Yok |

|  |
| --- |
| **10. İSTATİSTİKSEL PROSEDÜRLER** |
| **Örneklem Büyüklüğü** |
| Örneklem büyüklüğü 5’tir. Projenin amaç ve hedeflerine ulaşabilmek için kullanacağımız plasentalardan istediğimiz oranda kolajen çıkmalıdır. Plasentanın boyutuna göre kolajen miktarı değişiklik göstermektedir. Bu proje için sonunda elde edilecek kolajen miktarı için yaklaşık olarak 5 sağlıklı gebenin plasentasına ihtiyaç duymaktayız. Bu yüzden örneklemimiz 5 sağlıklı gebedir. |
| **İstatistiksel & Analitik Yöntemler** |
| SDS jel elektroforezden elde edilen sonuçlar bant boylarına göre marker ile karşılaştırılacak ve oluşan bantlar kolajen tiplerine göre isimlendirilecektir. Western blot ile elde edilen bant ticari alınacak insan kolajeni ile karşılaştırılacak ve yapılan prosedürün başarısı tartışılacaktır. Yara modeli oluşturulan fibroblast hücreleri kolajen ile mualeme edildikten sonra 0. 24. 48. ve 72 saatlerde mikroskop ile görüntülenecektir. Image J kullanılarak alan ölçümü yapılacaktır. Yara genişliği yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanacaktır (Tz sıfır zamanı, Tx ölçüm zamanı).  Yüzde yara genişliği=[(Yara genişliği Tz- Yara genişliği Tx) / Yara genişliği Tz]×100  Ayrıca manuel sonuçlardan elde edilen alan ve ortalama uzunluk arasındaki farkı karşılaştırmak için eşleştirilmiş t-testleri, kontrol grubu ve farklı zaman dilimlerindeki sonuçları kendi aralarında analiz etmek için İki Yönlü ANOVA testi kullanılacaktır. 0,05' ten küçük anlamlı p değerleri olarak kabul edilecektir. |

|  |
| --- |
| **11. ETİK & YASAL GEREKLİLİKLER & KALİTE GÜVENCESİNİN SAĞLANMASI** |
| **İyi Klinik Uygulamalar & İyi Laboratuvar Uygulamaları & Helsi**  **nki Bildirgesi** |
| Araştırmacılar çalışmayı “Helsinki Bildirgesi” nin ilkeleri ya da araştırmanın yürütüldüğü ülkenin yasaları ve yönetmelikleri ile tam bir uyum içinde yürütülmesini sağlayacak ve çalışmanın İyi Klinik Uygulamalarında açıklanan ilkelere ya da bireye daha fazla koruma sağlıyorsa, yerel yasalara tam anlamıyla bağlı kalacaktır. |
| **Hastaların Bilgilendirilmesi ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Oluru** |
| Çalışmaya katılan her bireye çalışmanın amaçları, yöntemleri, hedefleri ve olası tehlikeleri açıklanacak ve yazılı bir onay alınacaktır. Bu sorumluluk araştırmacıya aittir. Araştırmacı yazılı bilgilendirilmiş onayı belgelemek için yerel etik kurul tarafından onaylanmış bir onay formu kullanacaktır. Yasal olur verme ehliyeti bulunmayan ya da bunu veremeyecek durumda olan bireyler bu çalışmaya dahil edilmeyecektir.  Araştırmacı ya da onun tayin ettiği kişi/bireylerin çalışmayı girmeyi reddetme ya da herhangi bir zaman herhangi bir nedenden ötürü çalışmadan ayrılma konusunda tamamen serbest olduklarını açıklayacaktır.  Eğer emniyet ile ilgili yeni bilgiler risk/yarar değerlendirmesinde önemli değişiklikler ile sonuçlanırsa, gerektiği takdirde olur formu yenilenecek ve güncellenecek; halen tedavi edilmekte olanlar da dahil olmak üzere tüm bireylere yeni bilgi verilecek, imzalanmış formun bir kopyası verilecek ve onlardan çalışmaya devam etmeleri için olur alınacaktır. |
| **Gizliliğin Sağlanması** |
| Araştırıcılar hastaların isimlerinin saklı kalmasını ve bireylerin kimliklerinin yetkisiz taraflardan korunmasını temin edecektir. Hastalar yalnızca olgu rapor Formu üzerindeki isim-soyisim baş harfleri ve randomizasyon numarası ile tanımlanacak; hastanın tanınmasını sağlayan herhangi bir belgenin baş araştırmacı tarafından tam bir gizlilikle saklanacak, İyi Klinik Uygulamaları ve yasal gereklilikler doğrultusunda araştırmacının hastaların dosyalarını incelemek üzere uygun yasal otorite /otoritelere izin verebilecektir. |
| **Protokol Değişiklikleri ve Değişikliklerin Onaylanması** |
| Tüm protokol düzenlemeleri protokolde yapılacak herhangi bir değişikliğin hayata geçirilmesinden önce, hastaların güvenliğini ya da çalışmanın yürütülmesini etkileyebilecek herhangi bir düzenleme için yerel etik kuruldan onay alınacaktır. |
| **Yerel Etik Kurulun Bilgilendirilmesi** |
| Bu protokol ve bireye verilen bütün ekler (birey bilgilendirme formları ya da bilgilendirilmiş olur almak için kullanılan çalışma tanımları gibi) araştırmacı tarafından Yerel Etik Kurula sunulacak, çalışma başlatılmadan önce Yerel Etik Kurulun hangi tarihte toplandığını ve onayın alındığı da belirten yazı şeklinde belgelenip araştırmacıya verilecektir. Yerel etik kurul onayı alındıktan sonra protokolde yapılan herhangi bir değişiklik de yerel prosedürlere ve düzenleme gereksinimlerine göre araştırmacı tarafından Etik Kurul’a sunulacaktır.  Araştırmacı ciddi olayları yerel etik kurula bildirmek ve yıllık rapor sunmak ve ilave herhangi bir lokal bildirim gereğini yerine getirmek zorundadır. |
| **Kayıtların Saklanması ve Kalite Güvencesi Önlemleri** |
| Gebenin klinik kaynak belgeleri (bunlar genellikle projede Olgu rapor formlarından bağımsız olan anahtar  etkinlik/emniyet parametrelerini kaydetmek için önceden tanımlanır) gebe hastane/klinik kayıtlarını, orijinal  test raporlarını, imzalı bilgilendirilmiş olur formlarını içerecektir. Araştırıcının bu iki tip belgeyi çalışmanın  tamamlanması ya da durdurulmasının ardından en az 2 yıl süreyle saklaması gerekmektedir. Bu zaman  dolduktan sonra belgeler yerel yönetmeliklere uygun olarak yok edilebilir.  Çalışma kayıtları arasında gebeyi tanımlayıcı nitelik taşıyanları gizli tutulacaktır; ancak istisna olarak bu  kayıtlar, çalışmanın destekleyicisine, devlet kuruluşlarına verilebilir ve bunlar tarafından denetlenebilir.  Araştırmacıya destekleyici tarafından sağlanan bütün bilgiler, başka türlü belirtilmediği takdirde gizli olarak  kabul edilmelidir. |
| **Mali ve Cezai Sorumluluk** |
| Rutin dışı işlemlerin masraflarının ve araştırma kapsamında gönüllünün zarar gördüğü durumlarda masrafların destekleyici tarafından karşılanacaktır. Çalışmanın protokolü dışına çıkması durumunda ise mali ve cezai sorumluluk sorumlu araştırıcıya aittir. |

|  |
| --- |
| **12. ÇALIŞMANIN İZLENMESİ & DENETLENMESİ** |
| Bu çalışma İKÇÜ BAP (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri) kapsamında gerçekleştirilecektir. Bu proje kapsamında da 6 ayda bir proje koordinatörlüğüne rapor verilecektir. Çalışma sonunda ise proje heyetine bitirme raporu sunulacaktır. |

|  |
| --- |
| **13. REFERANSLAR** |
| * 1. Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. Journal of cosmetic dermatology, 17(1), 20-26.   2. Boatman, E. M., Goodwin, M. B., Holman, H. Y. N., Fakra, S., Zheng, W., Gronsky, R., &   Schweitzer, M. H. (2019). Mechanisms of soft tissue and protein preservation in Tyrannosaurus rex. Scientific reports, 9(1), 1-12.   * 1. Chang, T. L., Wu, S. F., Wang, D. Y., & Huang, C. H. (2020). A unified method for different placental products species identification. Pharmacognosy Magazine, 16(68), 8.   2. Gulevsky, A. K., & Shcheniavsky, I. I. (2020). Collagen Structure: Metabolism, Production and Industrial Aplication. Biotechnologia Acta, 13(5), 42-61.   3. Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2016). Type I collagen. In Biochemistry of collagens, laminins and elastin (pp. 1-11). Academic Press.   4. Jander R, Rauterberg J, Glanville RW. (1983) Further characterization of the three polypeptide chains of bovine and human short‐chain collagen (intima collagen). European journal of biochemistry, 133(1), 39-46.   5. León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed collagen—Sources and applications. Molecules, 24(22), 4031   6. Özge, A. T. A., & Tavman, Ş. Kolajen Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. 383-395. |

**\* Tüm sayfalar sorumlu araştırmacı tarafından imzalanmalıdır.**

Tarih **/** İmza

## SORUMLU ARAŞTIRMACI