

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BÜYÜME FAKTÖRLERİNİ SIRALI SALAN KİTOSAN DOKU
İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ
UYGULAMALARI**

Eda GÖZ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2014

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

09.07.2014

Eda GÖZ

ÖZET

Doktora Tezi

BÜYÜME FAKTÖRLERİNİ SIRALI SALAN KİTOSAN DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ ve KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI

Eda GÖZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Sunulan tez çalışması kapsamında kemik dokunun doğal iyileşme sürecinde varlığı bilinen ve hücrel fonksiyonlar üzerinde çoğalma ve farklılaşma gibi değişik etkilere sahip olan iki farklı büyüme faktörünün, kontrollü ve sıralı salımını gerçekleştirmek için bir sistem üretilmiş ve kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla tez kapsamındaki çalışmaların ilk aşamasında büyüme faktörlerinin yükleneceği poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) ve jelatin partiküllerin sentez koşullarının belirlenmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon difüzyonu yöntemi ile hazırlanan PHBV partiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında SEM, TEM, DSC, FTIR, parçacık boyut dağılımı ve degradasyon çalışmaları yürütülmüştür. Diğer taraftan su-yağ emülsiyonu ile hazırlanan jelatin partiküllerin karakterizasyonunda SEM, FTIR ve su tutma kapasitesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücre üremesi üzerinde etkili olduğu bilinen PDGF-BB jelatin partiküllere emdirilerek, hücre farklılaşması üzerinde etkili olduğu bilinen BMP-6 ise PHBV partiküllere ikili emülsiyon yöntemi ile yüklenmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşamasında üç boyutlu yapıda olan kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonrasında BMP-6 içeren PHBV partiküller ile PDGF-BB içeren jelatin partiküller doku iskelesine yüklenmiş ve salım davranışları ELISA testi ile analiz edilmiştir. Tez çalışmasının son bölümünde BMP-6 ve PDGF-BB yüklü kitosan doku iskeleleri ile MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattının kullanıldığı hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve büyüme faktörlerinin hücre göçü ve üremesi ile farklılaşması üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki hücre yapışması, üremesi ve morfolojisi MTT ve SEM analizleri ile hücre farklılaşması ise von Kossa ve RT-PCR analizleri ile belirlenmiştir. PDGF-BB ve BMP-6'nın birlikte yüklendiği ve farklı hızlarda salındığı doku iskelelerinin büyüme faktörlerinin tek tek kullanıldığı doku iskelelerine göre hücre üremesi ve farklılaşmasında avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır.

Temmuz 2014, 142 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, PHBV, jelatin, kitosan doku iskelesi, sıralı salım

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PREPERATION OF CHITOSAN SCAFFOLDS WITH SEQUENTIAL DELİVERY OF GROWTH FACTORS for BONE TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Eda GÖZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

The aim of this study is to prepare a system for controlled and sequential release of growth factors effective for cell migration/proliferation or differentiation in natural healing of bone tissue. For this purpose, synthesis and characterization studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and gelatin particles were carried out. PHBV particles prepared by emulsion diffusion were characterized with SEM, TEM, DSC, FTIR, DLS and degradation studies. Moreover, gelatin particles synthesized by water in oil emulsion were also characterized with SEM, FTIR and swelling studies. PDGF-BB known to be effective for cell proliferation was embedded in gelatin particles and BMP-6 known to be effective for cell differentiation was loaded into PHBV particles by emulsion diffusion. Three dimensional chitosan scaffolds were prepared by freeze-drying method and characterization studies were carried out. After that PHBV particles including BMP- 6 and gelatin particles including PDGF-BB were loaded into chitosan scaffolds. Release behavior of BMP-6 and PDGF-BB from chitosan scaffolds were analyzed by using ELISA kits. Cell culture studies were conducted to examine the effect of growth factors on cell migration, proliferation and differentiation. For this purpose MC3T3-E1 pre-osteoblast cell line was used. In order to observe cell proliferation and differentiation MTT, SEM, von Kossa and RT-PCR analyses were carried out. As a result, combination of PDGF-BB and BMP-6 with different release rates from scaffold was more advantageous than PDGF-BB and BMP-6 when used individually for cell proliferation and differentiation.

July 2014, 142 pages

Key Words: Bone Tissue Engineering, PHBV, gelatin, chitosan scaffold, sequential release

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren engin fikirleriyle bilimsel olarak gelişmemde katkıda bulunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince 11B4343006 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın bir bölümünün yürütülmesinde destek sağlayan ve Tez İzleme Komitesi'nde bulunarak değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Kazandırmış olduğu iş disiplini ve lisansüstü çalışmalarım boyunca verdiği cesaretle desteklerini esirgemeyen ve Tez İzleme Komitesi'nde bulunarak değerli katkılarını paylaşan Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım boyunca verdiği manevi destekler ile cesaretlendiren Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) şükranlarımı sunarım. Hücre kültür çalışmaları kapsamında her türlü desteği veren Tolga Demirtaş'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında verdikleri manevi desteklerinden dolayı grup arkadaşlarım Ceren Dinçer'e, Emre Yüksel'e, Zafer Çıplak ve Ayşe Nur Eroğlu'na teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi ve desteğini hayatım boyunca hissedeceğim sevgili eşim Arif Erinç Göz'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eda GÖZ

Ankara, Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Doku Mühendisliği	4
2.2 Kemik Doku Mühendisliği	7
2.2.1 Kemik yapısı ve özellikleri.....	7
2.2.2 Kemik rejenerasyonu	9
2.2.3 Kemik doku mühendisliği yaklaşımı	11
2.2.4 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler	12
2.2.4.1 Polisakkarit bazlı kitosan	19
2.2.5 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler	20
2.2.6 Büyüme faktörleri ve kemik doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörleri	22
2.2.6.1 Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	26
2.2.6.2 Kemik morfojenik proteini (BMP-6)	27
2.3 Büyüme Faktörlerinin Taşınma Stratejisi.....	29
2.4 Büyüme Faktörlerinin Yüklenmesinde Kullanılan Partiküller	37
2.4.1 Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan partiküllerin üretim yöntemleri	39
2.4.2 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV)	43
2.4.3 Jelatin	45
2.5 Büyüme Faktörlerinin Kontrollü Salınımının Matematiksel Analizi	47
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1 Deneyisel Çalışmada Kullanılan Malzemeler	51
3.2 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) Partiküllerin Sentezi	53

3.3	PHBV Partiküllere Model Protein BSA Yüklenmesi ve Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi	56
3.4	PHBV Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	57
3.4.1	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi	57
3.4.2	Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....	57
3.4.3	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	57
3.4.4	Parçacık boyut dağılımı analizi ve zeta potansiyeli.....	57
3.4.5	Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	58
3.4.6	PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları	58
3.5	Jelatin Partiküllerin Sentezi	58
3.6	Jelatin Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	59
3.6.1	SEM analizi.....	59
3.6.2	FTIR analizi	59
3.6.3	Jelatin partiküllerin su tutma kapasitesinin belirlenmesi	59
3.6.4	Jelatin partiküllere BSA yüklenmesi.....	60
3.7	PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Çalışmaları	60
3.8	PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi	60
3.9	Kitosan-Temelli Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	61
3.10	PHBV ve Jelatin Partiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi	61
3.10.1	PHBV partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi	61
3.10.2	Jelatin partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi.....	62
3.11	Kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışması	62
3.11.1	Gözenek boyut dağılımı	62
3.11.2	Mekanik dayanım testi.....	63
3.11.3	Su tutma kapasitesi	63
3.11.4	Yoğunluk tayini	63
3.12	Kitosan Doku İskelelerinden PDGF-BB ve BMP-6 Salımı	64
3.13	Hücre Kültür Çalışmaları.....	64
3.13.1	Hücre kültür koşulları	64
3.13.2	MTT analizi	65
3.13.3	Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve EDX analizi	66
3.13.4	Hücre farklılaşmasının incelenmesi.....	66
3.14	İstatistiksel Analiz.....	68

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	70
4.1 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) Partiküllerin Sentezi	70
4.2 PHBV Partiküllere Model Protein BSA Yüklenmesi ve Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi	79
4.3 PHBV Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	80
4.3.1 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....	81
4.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	81
4.3.3 Parçacık boyut dağılımı analizi ve zeta potansiyeli.....	82
4.3.4 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	84
4.3.5 PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları	85
4.4 Jelatin Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	86
4.5 PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi	89
4.6 Kitosan-Temelli Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	94
4.7 BMP-6/PHBV ve PDGF-BB/Jelatin Partiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi	95
4.7.1 BMP-6/PHBV partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi.....	95
4.7.2 PDGF-BB/JelatinPartiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi.....	97
4.8 Kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışmaları.....	98
4.8.1 Gözenek boyut dağılımı	98
4.8.2 Mekanik dayanım testi.....	99
4.8.3 Su tutma kapasitesi	100
4.8.4 Yoğunluk tayini	102
4.9 Kitosan Doku İskelelerinden PDGF-BB ve BMP-6 Salımı.....	103
4.10 Hücre Kültür Çalışmaları.....	105
4.10.1 MTT analizi	106
4.10.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve EDX Analizi	109
4.10.3 Hücre farklılaşmasının incelenmesi.....	113
5. SONUÇLAR.....	120
KAYNAKLAR.....	124
EKLER.....	134
EK 1 BSA kalibrasyon grafiği.....	135
EK 2 PHBV ve jelatin partikülden BSA salımının matematiksel analizi.....	136
EK 3 Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı.....	137

ÖZGEÇMİŞ.....	139
----------------------	------------

SİMGELER DİZİNİ

k	Taşıyıcının yapısal özelliklerine bağlı sabit
k_H	Higuchi hız sabiti
W_s	Yaş ağırlık
W_o	Kuru ağırlık
M_t/M_∞	Salınan protein kesri
n	Difüzyonel zaman sabiti
m	Salınmayan protein miktarı

Kısaltmalar

PHBV	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat)
CS	Kitosan
PDGF	Trombosit kayanıklı büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteini
VEGF	Damar endotel büyüme faktörü
IGF-1	İnsülin büyüme faktörü
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
RT-PCR	Gerçek zamanlı protein zincir reaksiyonu
EDX	Enerji dağıtıcı X ışını analizi
% EE	Enkapsülasyon verimliliği
PLA	Poli laktik asit
PLGA	Poli laktik ko glikolik asit
DD	Deasetilasyon dercesi
DMEM	Dulbecco's modifed eagles medium
DPBS	Dulbecco's phosohated buffer saline
FBS	Fetal sığır serum
BSA	Sığır serum albumin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliği yaklaşımı	5
Şekil 2.2 Doku mühendisliği yaklaşımını oluşturan temel faktörler.....	6
Şekil 2.3 Kemik dokusunda yer alan yapılar	9
Şekil 2.4 Kemik rejeneasyonu.....	10
Şekil 2.5 Çözücü döküm partikül uzaklaştırma yöntemi (Levengood ve Zhang 2014)..	15
Şekil 2.6 Faz ayrımı yöntemi (Levengood ve Zhang 2014).....	15
Şekil 2.7 Fiber bağlama yöntemi (Mikos vd. 1993).....	16
Şekil 2.8 Elektroegirme yöntemi	17
Şekil 2.9 Gaz köpükleştirme yöntemi	17
Şekil 2.10 Eriyik kalıplama yöntemi.....	18
Şekil 2.11 Hızlı prototip yöntemler (3D baskılama sistemi)	18
Şekil 2.12 Dondurarak kurutma yöntemi (Levengood ve Zhang 2014)	19
Şekil 2.13 Kitinin deasetilasyon tepkimesi	19
Şekil 2.14 Büyüme faktörlerinin hücre dışı matriks ile etkileşimi (Lee vd. 2011).....	23
Şekil 2.15 Büyüme faktörlerinin hücreleri etkileme mekanizması (Chen 2010).....	24
Şekil 2.16 PDGF sinyal mekanizması.....	27
Şekil 2.17 BMP 6 sinyal mekanizması	28
Şekil 2.18 Büyüme faktörlerinin taşınma stratejisi	29
Şekil 2.19 Büyüme faktörlerinin fiziksel enkapsülasyonu ve kimyasal immobilizasyonu (Lee vd. 2011)	30
Şekil 2.20 Büyüme faktörlerinin kimyasal immobilizasyonu.....	30
Şekil 2.21 Büyüme faktörlerinin fiziksel adsorpsiyonu	31
Şekil 2.22 Büyüme faktörlerinin salımına yönelik kullanılan yapılar (Chen vd. 2010).....	36
Şekil 2.23 Emülsiyon difüzyonu yöntemi	40
Şekil 2.24 Porojen (Tuz) uzaklaştırma yöntemi.....	41
Şekil 2.25 İkili emülsiyon yöntemi	41
Şekil 2.26 Nanoçöktürme yöntemi.....	42
Şekil 2.27 Su-yağ emülsiyonu	43
Şekil 2.28 PHBV'nin kimyasal yapısı	44

Şekil 2.29 Jelatinin kimyasal yapısı	45
Şekil 2.30 Kollajenin hidrolizi ile asidik ve bazik jelatin eldesi (Tabata ve Ikada 1998).....	46
Şekil 2.31 Büyüme faktörlerinin salım mekanizması (Mehta vd. 2012)	48
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan PHBV, jelatin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	53
Şekil 3.2 Emülsiyon difüzyonu yöntemi.....	54
Şekil 3.3 İkili emülsiyon yöntemi	56
Şekil 4.1 Homojenizasyon parametrelerinin PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi	71
Şekil 4.2 Farklı derişimlerdeki PHBV varlığında elde edilen partiküllerin SEM görüntüleri	73
Şekil 4.3 Yüzey aktif madde türü ve derişiminin PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi	75
Şekil 4.4 Çözücü ve çözücü kombinasyonlarının PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi	77
Şekil 4.5 BSA yüklü PHBV partiküllere ait SEM görüntüleri	79
Şekil 4.6.a. Boş PHBV ve b. BSA/PHBV partiküllere ait TEM görüntüleri.....	81
Şekil 4.7. a. PHBV polimerine b. PHBV nanokürelere ait FTIR spektrumu.....	82
Şekil 4.8 PHBV partiküllere ait parçacık boyut dağılımı	83
Şekil 4.9. a. BSA, b. PHBV c. BSA/PHBV partiküllere ait DSC termogramları.....	84
Şekil 4.10 PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları	85
Şekil 4.11 Jelatin mikropartiküllerin SEM görüntüleri.....	86
Şekil 4.12 Schiff bazlarının oluşum tepkimesi	87
Şekil 4.13 Jelatin mikrokürelere ait FTIR spektrumu.....	88
Şekil 4.14 BSA'nın PHBV partiküllerden salım grafiği.....	90
Şekil 4.15 BSA'nın jelatin partiküllerden salım grafiği.....	92
Şekil 4.16 BSA'nın PHBV ve jelatin partiküllerden sıralı salımı.....	93
Şekil 4.17 Kitosan doku iskeleleri a. (x500), b. (x200)	95
Şekil 4.18 BMP-6/PHBV yüklü doku iskeleleri	96
Şekil 4.19 Jelatin yüklü kitosan doku iskeleleri.....	97
Şekil 4.20 BMP-6 ve PDGF-BB'nin kitosan doku iskelelerinden salımı.....	103

Şekil 4.21 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken ●p<0.05)	107
Şekil 4.22 4. gün SEM görüntüleri a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)	109
Şekil 4.23 7. gün SEM görüntüleri a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)	110
Şekil 4.24 14. gün SEM görüntüleri a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)	112
Şekil 4.25 CS/PDGF-BB/BMP-6 doku iskelesi SEM (x 2,500) ve EDX spektrumu...	113
Şekil 4.26 von Kossa analizi	113
Şekil 4.27 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl Runx2 gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken ●p<0.05)	115
Şekil 4.28 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB/BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl KOL I gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken ●p<0.05)	116
Şekil 4.29 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6 kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl OPN gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken ●p<0.05)	118

Şekil 4.30 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl OCN gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken ●p<0.05)	119
---	-----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler	14
Çizelge 2.2 Büyüme faktörleri kaynakları ve aktiviteleri	25
Çizelge 2.3 Büyüme faktörlerinin taşındığı yapılar ve salım profilleri	34
Çizelge 2.4 Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan partikül sistemleri.....	38
Çizelge 2.5 Büyüme faktörlerinin salım kinetiğinde kullanılan matematiksel modeller.....	49
Çizelge 3.1 PHBV partiküllerin üretimi için incelenen parametreler	55
Çizelge 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.....	68
Çizelge 4.1 Homojenizasyon parametrelerinin PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi	72
Çizelge 4.2 Çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlı jelatin partiküllere ait FTIR spektrumları.....	88
Çizelge 4.3 Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı	98
Çizelge 4.4 Kitosan doku iskelelerinin elastik modülü.....	99
Çizelge 4.5 Kitosan doku iskelelerinin denge şişme değeri.....	101
Çizelge 4.6 Doku iskelelerinin yoğunluk değerleri.....	102
Çizelge 4.7 Kitosan-temelli doku iskelelerine ait özellikler	103

1. GİRİŞ

Kemik dokusu yüksek damar oluşumu potansiyeline sahip kollajen I ağırlıklı olmak üzere protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan organik yapı ile kalsiyum fosfat ve sitrat gibi inorganik bileşiklerden meydana gelmektedir (Salgado vd. 2004). Kemik vücutta iskelet yapısının temel bileşenini oluşturmakla birlikte, yüksek oranda kendisini yenileme özelliklerine sahiptir. Bunun yanı sıra iç organları dış etkilerden koruma ve mineral depolama gibi fonksiyonlara da sahiptir. Kemik dokusunun yer aldığı iskelet sisteminin canlıların hareketini sağlamada en önemli temel birim olması nedeniyle kemikte meydana gelen hasarlar bireyin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Diğer taraftan yapılan istatistiklere göre 2020 yılına kadar kemik dokusuna ilişkin rahatsızlıklara sahip birey sayısının iki kat oranında artması beklenmektedir (Amini vd. 2012). Bu nedenle kemik enfeksiyonu gibi çeşitli kemik hastalıkları ya da travmalara bağlı kemik kayıplarından dolayı kemik rejenerasyonuna ilişkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir.

Kemik doku rejenerasyonuna ilişkin tedavi yöntemleri arasında en popüler ve avantajlı olanı hastanın sağlıklı kemik bölgesinden alınan otogreftlerin kullanıldığı durumdur. Ancak hastada yeni bir kemik hasarının olması durumunda kemik elde edilememesi gibi çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır (Salgado vd. 2004). Bu nedenle kemik dokunun hasar görmesiyle meydana gelen ileri derece rahatsızlıklarda günümüz tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması nedeniyle alternatif olarak doku mühendisliği yaklaşımı öne çıkmıştır (Stevens 2008). Doku mühendisliği yaklaşımı, kaybedilen dokunun *in-vitro* ortamda üretilerek hasarlı bölgeye implante edilmesi esasına dayanmaktadır. Hasarlı dokuların onarılarak işlevlerini yeniden kazanmaları için tasarlanan, canlı hücreler ve biyosinyal moleküller ile doğal ya da sentetik biyomalzemelerin bir arada bulunduğu hibrid sistemler ile yapılan başarılı çalışmalar, doku mühendisliğine olan ilgiyi arttırmıştır. Diğer taraftan doğal ortamda fonksiyonel doku oluşumu sırasındaki tüm hücresel faaliyetler hücre büyüme faktörleri, hücre dışı matriks yapı ve hücrelerin içinde bulunduğu ve birbirleri ile etkileşim halinde olduğu dinamik ve karmaşık bir mikroçevrede (niş) gerçekleşmektedir. Bu durumda, hücrenin yapay bir hücre dışı matrikste (doku iskelesi) çoğalarak fonksiyonel doku oluşturma sürecinde, uygun

biyokimyasal ve fizikokimyasal faktörler bir araya getirilerek, doğal doku oluşum sürecinin en iyi şekilde taklit edilmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliği yaklaşımı ile hazırlanan hibrid sistemlerdeki ilk temel bileşen hücrelerdir. Kemik dokusu rejenerasyonuna ilişkin olarak çeşitli hücre kaynakları kullanılmaktadır. Kemik iliği stroma hücreleri, osteoblastlar, MC3T3-E1 hücre hatları ve kök hücreler bunlardan en önemlileridir.

Biyolojik olayların karmaşık yapısı incelendiğinde, hücre büyüme faktörlerinin önemli bir role sahip olduğu görülmektedir (Lanza vd. 2007). Hücre büyüme faktörleri, hücre üremesi, göçü, farklılaşması ve metabolik faaliyetler gibi hücresel fonksiyonları düzenleyen, hücre-hücre ve hücre-biyomalzeme etkileşimlerinde görev alan biyosinyal moleküllerdir. Kemik dokunun doğal iyileşme süreci incelendiğinde, kemik morfojenik proteini (BMP), damar endotel büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi birden çok büyüme faktörünün bu süreçte yer aldığı bilinmektedir (Lanza vd. 2007). Hücre üremesi ve göçü gibi fonksiyonlar üzerinde etkili olan büyüme faktörlerinin kemik dokunun iyileşme sürecinin erken döneminde etkili olduğu, ve bunu hücre farklılaşmasını sağlayan biyosinyal moleküller ile olan etkileşimlerin izlediği görülmektedir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) pre-osteoblast ile fibroblast hücrelerin üreme ve göçü üzerinde etkili olduğu bilinen bir büyüme faktörüdür. TGF- β ailesinin bir üyesi olan kemik morfojenik proteinleri (BMPs), kemik oluşumunda pozitif etki gösteren ve hücre farklılaşmasında rolü olan bir biyosinyal grubudur. Kemik morfojenik protein-6 (BMP-6) bu grubun önemli üyelerinden biridir. Bununla birlikte, büyüme faktörlerinin uzun süreli etkinliğinin sağlanabilmesi, uygun taşıyıcı sistemlere yüklenerek kontrollü salımı ile mümkün olabilmektedir. Bu kapsamda 3-boyutlu doku iskeleleri kullanılabildiği gibi polimerik yapıda mikro ve nanoküreler de kullanılmaktadır. Çoğunlukla, protein yapıda olan büyüme faktörünün hızlı denatürasyonu ve yarılanma ömürlerinin kısa olması gibi problemlerden dolayı büyüme faktörü içeren mikro ve nanoküre yapılar, hücrelerin tutunmasını ve doğal ortam koşullarını sağlayacak 3-boyutlu doku iskelelerine yüklenerek hasarlı dokunun olduğu bölgeye yerleştirilmektedir. Çeşitli doğal ve sentetik polimerlerden üretilen bu iskelelerde sıkça tercih edilen polimerlerden biri, doğal bir polimer olan kitosan adlı

polisakkarittir. Doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak kullanılacak doku iskelesi yüzeyinin hücre yapışması ve yayılmasına izin verecek şekilde gözenekli ve içsel bağlantılı olması ile birlikte, biyobozunur özellikte olması gerekmektedir. Gözeneklilik hücre büyümesini, infiltrasyonunu ve dokudaki besin ve atık maddelerin difüzyonunu sağlaması için yeterince yüksek olmalıdır. Bunun yanı sıra hazırlanan üç boyutlu yapının yeterli mekanik dayanıma sahip olması gerekmektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında kemik doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla toksik olmayan ve biyobozunur yapıdaki doku iskelelerinin üretilmesi hedeflenmiştir. Hazırlanan sistemde kemik dokunun doğal iyileşme sürecine benzer şekilde PDGF-BB ve BMP-6'nın sıralı ve kontrollü salımını sağlamak üzere degradasyon hızları birbirinden farklı olan jelatin ve poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) partiküller kullanılmıştır. Büyüme faktörü içermeyen PHBV partiküllerin üretim koşulları emülsiyon difüzyonu yöntemi ile belirlendikten sonra BMP-6 içeren PHBV partiküller ikili emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Jelatin partiküller ise su-yağ emülsiyonu ile hazırlandıktan sonra PDGF-BB emdirilerek yüklenmiştir. BMP-6 ve PDGF-BB'nin *in-vitro* salım çalışmaları kitosan doku iskelelerinden gerçekleştirilmiştir. Büyüme faktörlerini içeren partiküllerin yer aldığı doku iskeleleri hazırlanmış ve salım sonuçları ELISA testi ile analizlenmiştir. Son aşamada hazırlanan yapının MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi için hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Bu kapsamda kitosan doku iskeleleri üzerindeki hücre yapışması, üremesi ve morfolojisi MTT ve SEM analizleri ile hücre farklılaşması ise von Kossa ve RT-PCR analizleri ile belirlenmiştir.

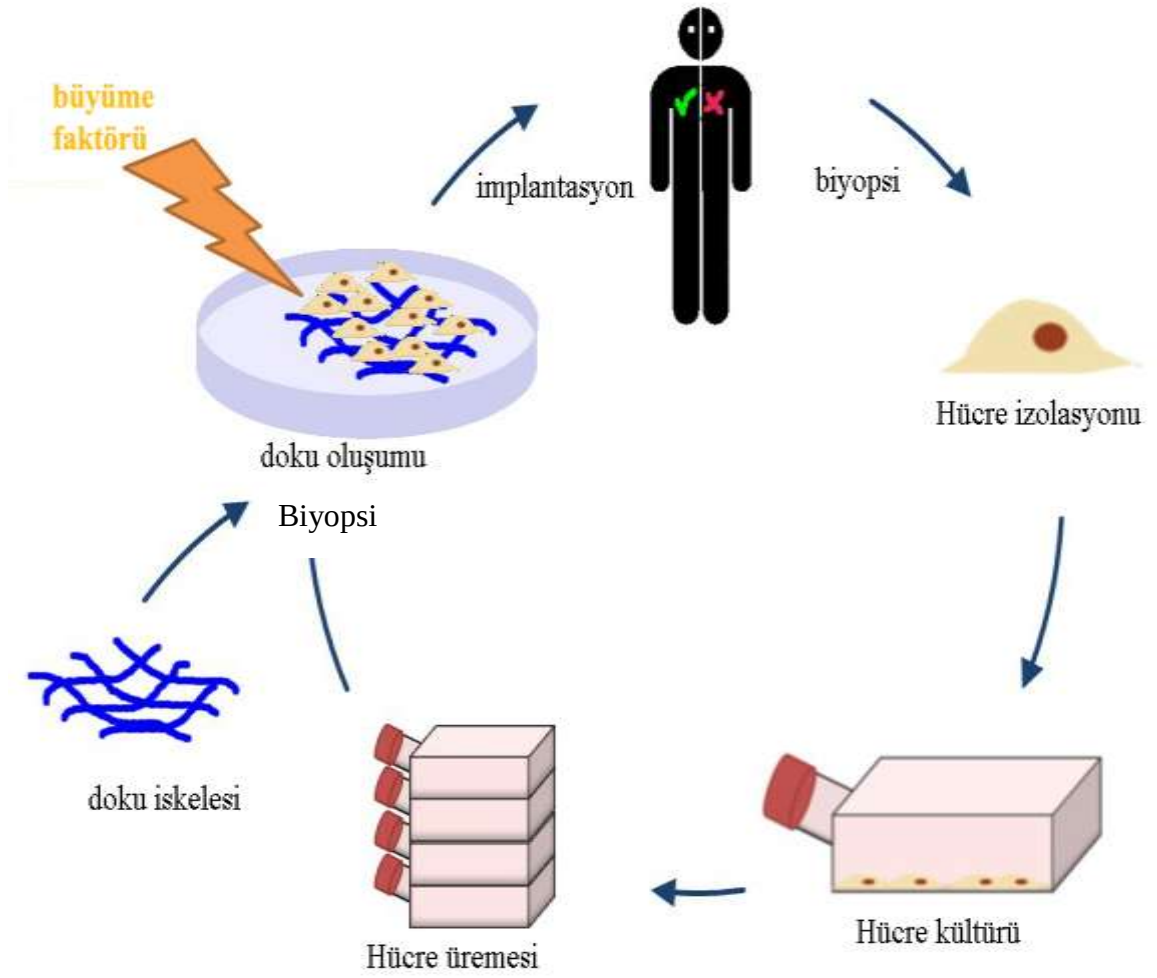
2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili genel bilgiler beş ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde doku mühendisliği tanımlanmış sonrasında doku mühendisliği yaklaşımları ve bileşenleri açıklanmıştır. İkinci bölümde kemik dokusu ve kemik doku mühendisliği ile ilgili bilgiler verilmiştir. Üçüncü bölümde kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, hücreler ve sahip olması gereken özellikler hakkında bilgi verilmiştir. Dördüncü bölümde ise kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan büyüme faktörleri ve salım mekanizmaları açıklanmıştır. Ayrıca kontrollü salım sisteminin sağlanabilmesi için büyüme faktörlerinin yüklendiği PHBV ve jelatin partiküllerin üretim yöntemlerine ilişkin bilgilere de yer verilmiştir. Son bölümde büyüme faktörlerinin salımının matematiksel analizine ilişkin geliştirilen modeller sunulmuştur.

2.1 Doku Mühendisliği

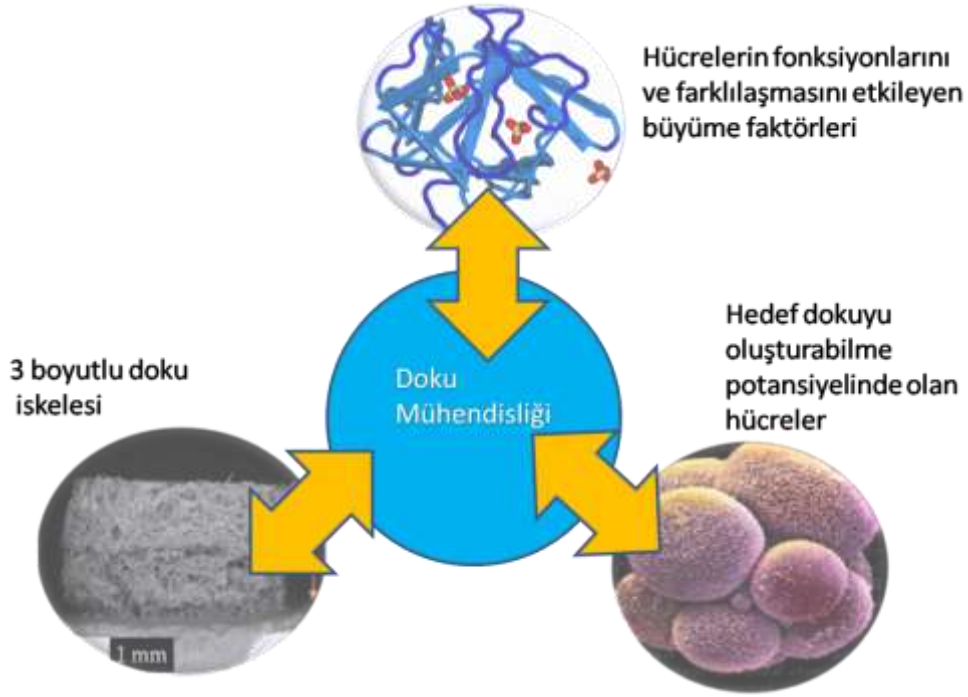
Kanser, travma ya da kaza sonucu hasar gören organ ve dokuların tedavisinde geleneksel yöntem olarak bilinen transplantasyon cerrahisi ile başarılı sonuçlar alınmasına karşın her dokunun naklinin mümkün olmaması, organ uyumsuzluğu, implantasyon sonrasında enfeksiyon riskinin olması ve immunolojik etkiler nedeniyle pek çok dezavantaj ile karşılaşmaktadır (Tabata 2009) Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için temeli transplantasyon cerrahisine dayalı olan doku mühendisliği yaklaşımları geliştirilmiştir. Doku mühendisliği, mühendislik prensiplerini ve yaşam bilimlerini kullanarak doku ve organ fonksiyonlarını iyileştirmeyi, geliştirmeyi ve bazı durumlarda yeniden sağlamayı amaçlayan, başta malzeme mühendisliği, hücre biyolojisi ve tıbbi bilimler olmak üzere birçok alanın kesiştiği bilim dalıdır (Gümüşderelioğlu 2011).

Doku mühendisliği yaklaşımı hücrelerin biyopsi yoluyla hastadan alınarak kontrollü kültür ortamlarında doku iskelesi adı verilen ve biyomalzemelerden oluşan yapay destek dokuları üzerinde biyosinyal moleküller varlığında kültüre edilmesi ve sonrasında elde edilen yapının hasarlı bölgeye yerleştirilmesi ile doku rejenerasyonun gerçekleştirilmesi prensibine dayanır (Cardea vd. 2010) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Doku mühendisliği yaklaşımı

Doku mühendisliği yaklaşımları ile doku rejenerasyonunda üç temel bileşen bulunmaktadır. İlki doku oluşumunda etkili olduğu bilinen hücrelerdir. İkinci bileşen vücut içerisindeki gerçek doku mikroçevresini (hücre dışı matriks) taklit etmek amacıyla biyouyumlu ve biyobozunur yapıdaki polimerlerden oluşan 3 boyutlu doku iskeleleridir. Son bileşen ise doku oluşumu sürecinde çeşitli hücreler işlevleri düzenleyen biyosinyal moleküllerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Doku mühendisliği yaklaşımını oluşturan temel faktörler

Doku mühendisliği yaklaşımı ile doku rejenerasyonunda bu bileşenlerin tekli ya da çoklu kombinasyonlarının olduğu farklı stratejiler bulunmaktadır (Tabata 2009). İlk strateji doku rejenerasyonunda sadece biyomalzemelerin kullanılmasıdır. Burada, hazırlanan doku iskelelerinin hasarlı bölgeye direk olarak yerleştirilmesi ile sağlıklı hücrelerin çoğalması için gerekli mikroçevrenin oluşturulması amaçlanmaktadır. İkinci stratejide uygun bir vericiden ya da hastanın kendisinden alınan hücreler hasarlı bölgeye doğrudan enjekte edilmektedir. Üçüncü olarak ise hücreler aktiviteyi düzenleyen biyosinyal molekülleri hasarlı dokuya enjekte edilmekte veya uygun biçimde (polimerik taşıyıcılara veya doku iskelelerine yüklenerek) yerleştirilmektedir. Ancak, bu yaklaşım doku kayıplarının büyük olduğu durumlarda yetersiz kalmaktadır (Chen 2010, Gümüşderelioğlu 2011). Doku mühendisliğindeki en çarpıcı ve üzerinde en çok çalışılan strateji ise doku iskeleleri ve büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığı yapıların hazırlanmasıdır. Hedeflenen doku rejenerasyonu için çoğaltılan sağlıklı hücreler büyüme faktörleri ile birlikte gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç boyutlu doku iskelelerine ekildikten sonra hasarlı bölgeye yerleştirilmektedir. Büyüme faktörleri varlığında kemotaktik ve mitojenik aktiviteler ile hücrelerin hasarlı bölgeye göçü ve ardından

farklılaşmasıyla doku rejenerasyonu başlamakta ve sağlıklı hücrelerin kendilerine ait büyüme faktörlerini salgılamasıyla doku rejenerasyonu devam etmektedir.

2.2 Kemik Doku Mühendisliği

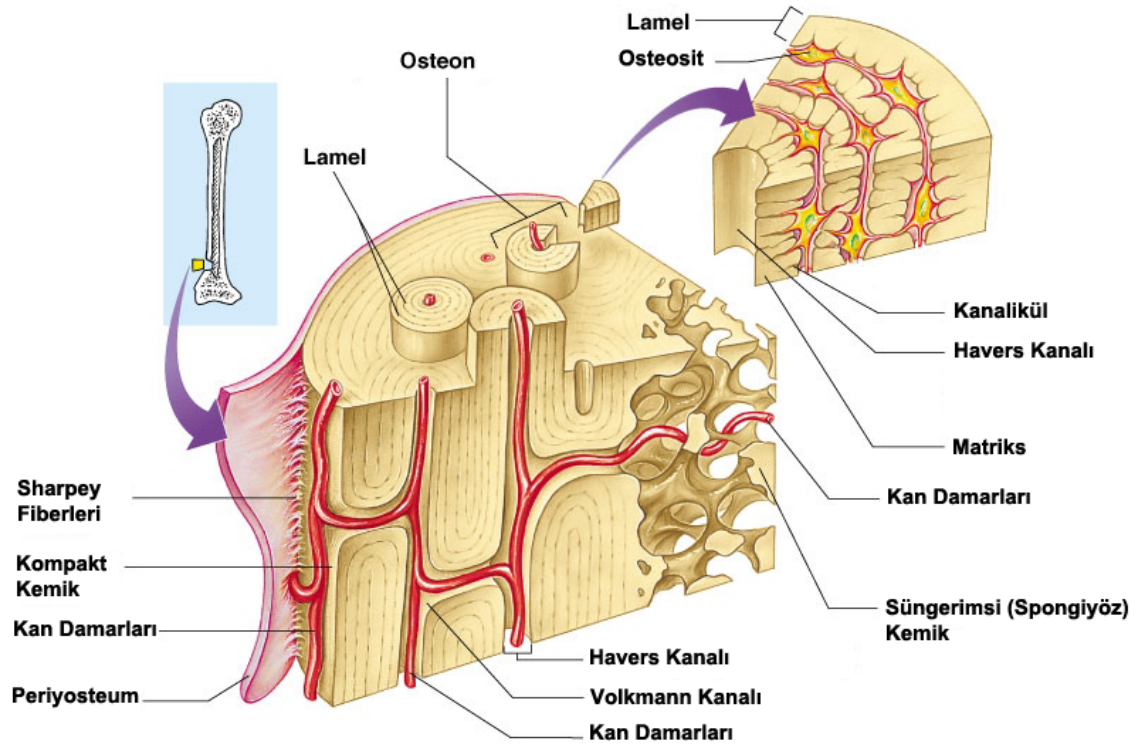
2.2.1 Kemik yapısı ve özellikleri

Kemik yüksek iyileşme kapasitesine sahip dinamik ve oldukça damarlı bir dokudur (Salgado vd. 2004). Kemik organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi hücreler, lifler ve temel maddelerden oluşmuştur ancak yapısındaki kalsiyum yoğunluğundan dolayı sertleşmiştir. Kemik, iskelet sisteminin temel yapıtaşını oluşturmakta ve vücuda yapısal destek sağlamaktadır. Kaslarla birlikte hareketi sağlama, kan hücrelerini üretme, yük taşıma ve iç organları korumanın yanı sıra kandaki önemli elektrolitlerin derişimini ayarlayarak homeostazda görev alır (Salgado vd. 2004). Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin ve metabolik koşullara duyarlı doku olması nedeniyle aktif doku olma özelliğini taşımaktadır.

İskelet sistemindeki değişik yük taşıma koşulları makroskopik ve mekanik açıdan farklı özelliklerde ve farklı boyutsal dağılıma sahip kemik yapılarının oluşmasını sağlamıştır. Eklemlerde yer alan uzun kemiklerden kafatasındaki yassı kemiklere ve omurlardaki düzensiz kemiklere kadar iskelet yapısında 206'dan fazla kemik türü bulunmaktadır. Kemik dokusu organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. Bunun yanı sıra kemiğin kompakt ve spongiyöz (süngerimsi) olmak üzere iki ayrı formu bulunmaktadır. Kompakt kemik sıkı olarak düzenlenmiş, boşluk içermeyen bir doku iken süngerimsi kemik dokusu gevşek ve geniş boşluklara sahiptir. Süngerimsi kemiklerde yer alan bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Vücudun femur gibi uzun kemik içeren ekstremitesi ele alınacak olursa bu kemiğin iki uç tarafı veya eklemlerin bulunduğu bölge epifiz, bunların arasında yer alan uzun bölgeye ise diyafiz adı verilir. Epifiz bölgesi kemiğin oluşumunda rol oynar ve epifiz plağı adını alır. Diyafiz bölümü ise kompakt kemik dokusundan oluşmaktadır Kafatası gibi yassı kemiklerin her iki tarafı kompakt, içi veya ortası ise süngerimsi kemiklerden oluşmaktadır (Salgado vd. 2004).

Kemik dokusunun olgunlaşması, onarımı ve resorpsiyonu yapıda yer alan **osteoblastlar**, **osteositler** ve **osteoklastlar** gibi üç hücre çeşidinin etkileşimiyle gerçekleşir. **Osteoblastlar** kemik dokusunda matriksin yapımından sorumludur. Bunun yanı sıra osteoblastlar bölgesel olarak kalsiyum ve fosfat dengesini ayarlar ayrıca hidroksiapatit kristallerinin oluşumunu sağlar. **Osteositler** ise kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücresi adını alır. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından tek başlarına sentez yapamazlar ancak diğer kemik hücreleri ile etkileşerek kemik oluşumunu ve iyileşmesini koordine ederler. **Osteoklastlar** kalsiyumun kemik dokusundan kana salınmasında aktif rol oynayarak, vücut sıvılarında kalsiyum derişiminin homeostatik düzenlenmesinde görev alırlar (Lienemann vd. 2012).

Kemikler periyosteum adı verilen osteojenik aktivitesi olan bağ dokusuyla çevrilidir. Periyosteumun kemiğe destek sağlanmasında, kemiğin beslenmesinde, gelişiminde ve onarımında büyük önemi vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Endosteum ise kemik iliği kavitesini ve kompakt kemik iliğinin kanal sistemlerini çevreleyen ince bir retüküler bağ dokusudur. Kompakt bir kemiğin mikroskobik incelenmesinde dokunun uzun eksenine paralel yerleşmiş olan havers kanalları etrafında 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür. Havers kanallarını birbirine bağlayan kanallara ise Volkman kanalları adı verilir. Kemik hücreleri bu kanalların içinde bulunan kan damarlarının getirdiği besin maddeleri ile beslenir. Osteositler lameller arasına sıkışmış lakin içerisinde yer almakatdır. Lakünler birbirleriyle kanalikül adı verilen ince kanalcıklarla ilişki kurar. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda difüzyon olayı meydana gelmediğinden kanal ve kanalikürler vasıtasıyla kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve gerekli olan besinler hücrelere kadar ulaşır. Kemiğin yapısı şekil 2.3’de sunulmuştur.



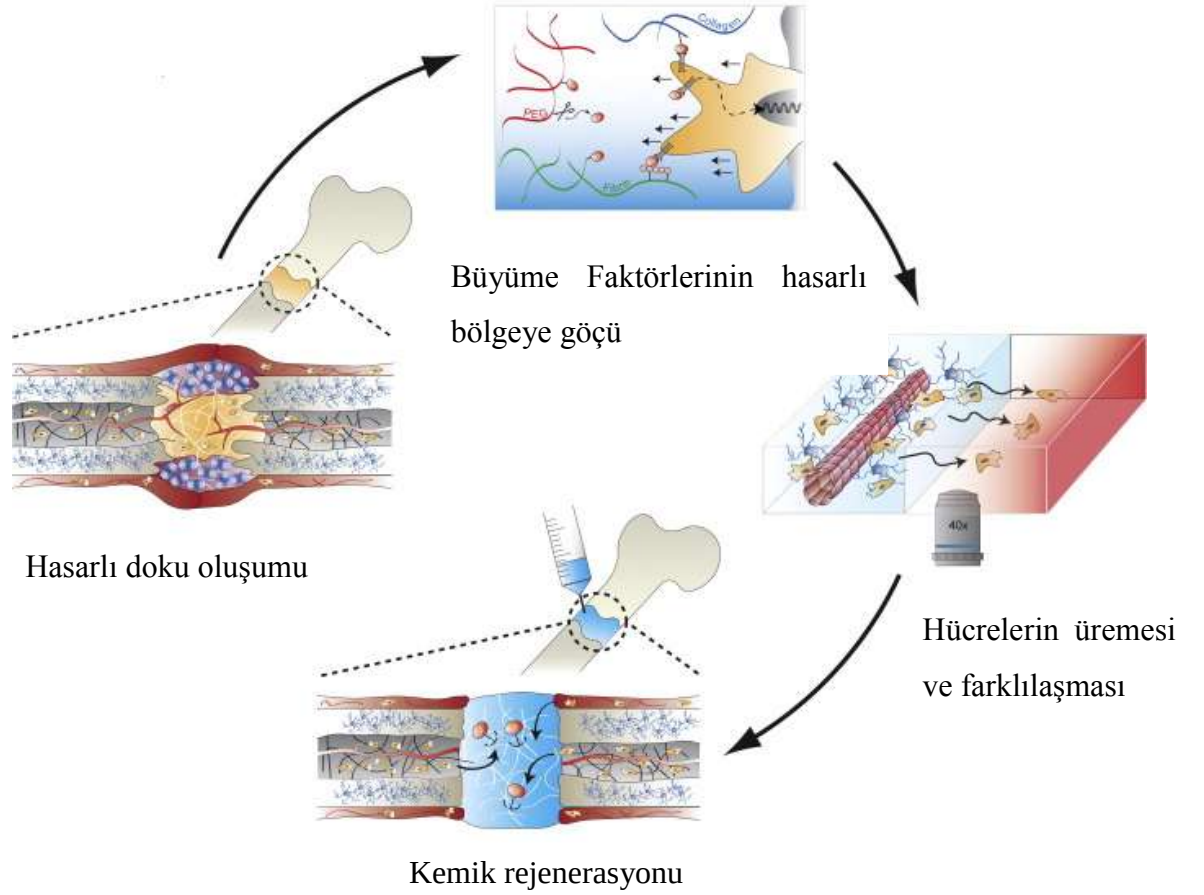
Şekil 2.3 Kemik dokusunda yer alan yapılar

Kemiğin yapısı incelendiğinde göze çarpan özelliklerinden bir çoğu matriks yapısıyla ilgilidir. Malzeme açısından düşünüldüğünde kompozit bir madde olduğu bilinen kemiğin matrisi iki bileşenden oluşmaktadır. Birincisi kollajen lifler (tip I), protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan organik bölüm iken, diğeri kalsiyum, fosfat, sitrat ve magnezyum gibi maddelerin yer aldığı inorganik bölümdür. İnorganik bölümde kalsiyum ve fosfatın hidroksipatit kristalleri şeklinde olması kemik sertliğine ve dayanımı arttırmaktadır.

2.2.2 Kemik rejenerasyonu

Kemik rejenerasyonu oldukça karmaşık ve dinamik bir proses olmakla birlikte biyoaktif moleküllerin varlığında hücre göçü ve üremesi ile birlikte gerçekleştirilir (Nandagiri vd. 2011). Kemik dokusunda herhangi bir hasar meydana geldiğinde dokunun kan damarlarındaki hasarlara bağlı olarak kanama ve ardından pıhtılaşma oluşur (Mehta vd. 2012). Hasarlı bölgede bozulmuş dokunun ortadan kaldırılmasında nötrofiller ve makrofajlar önemli yere sahiptir (Lienemann vd. 2012). Nötrofiller ve makrofajlardan

salınan hücre göçü ve üremesi üzerinde etkili olan büyüme faktörleri yaralı bölgeye hücre göçünü sağlamakla beraber, doku iyileşmesi ile birlikte hücrelerin kendi büyüme faktörlerini salgılayarak doğal doku oluşumuna benzer olarak kemik rejenerasyonunun tamamlanmasını sağlarlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Kemik rejeneasyonu

Diğer taraftan bölgede yer alan fibroblastlardan salınan anjiojenik büyüme faktörleri varlığında kemik dokusunda yoğun olarak bulunan damarların oluşumu gözlenebilmektedir. Oluşan yeni yapıya kemik kallusu adı verilir. Bu arada hasarlı bölgedeki periyosteum ve endoteumun osteoblastları çoğalarak hücre katı oluştururlar. Bölgede eş anlı olarak intra-membranöz kemikleşme de meydana gelir. Onarım sırasında öncelikle olgunlaşmayan primer kemik dokusu gelişmekte daha sonra sekonder olarak tanımlanan asıl kemik doku oluşmaktadır. Böylece sonuçta hasarlı bölgede fonksiyonlarını yerine getirebilir onarılmış kemik elde edilmiş olur.

2.2.3 Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Kemiğin yüksek oranda kendini yenileyebilme potansiyeli nedeniyle özellikle genç popülasyonda herhangi bir müdahaleye gerek kalmadan iyileşme görülmektedir. Buna rağmen tümörlerin olduğu bölgeler gibi geniş defektlerde cerrahi müdahalelere gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda kemik hasarlarının giderilmesine yönelik olarak allogreft (kadavradan alınan kemik), zenogreft (başka canlı türünden alınan kemik) ile metallere, sentetik malzemeler ve biyoseramikler gibi yapılar kullanılmaktadır. Ancak allogreft ve zenogreftler uygulama sırasında immun yanıt geliştirme veya immun baskılayıcı tedaviye neden olabilmektedirler. Ortaya çıkan bu problemlerin üstesinden gelebilmek amacıyla hastanın kendisinden alınan (otogreftleme) kemik parçasının hasarlı bölgeye implantasyonu gerçekleştirilmektedir. Böylece yapının etkinliğinin korunması sağlanır ve uygulama sırasında immun yanıt gelişme riski veya immun baskılayıcı tedaviye gereksinim duyulmaz. Otogreftleme yöntemi diğer yöntemlere göre üstün özelliklere sahip olmasına rağmen hasarlı dokunun onarılmasında büyük ölçüde kemik elde edilmesinde fazla cerrahi operasyon gerektirmesi gibi dezavantajlarından dolayı bazı kısıtlamalara sahiptir (Stevens 2008).

Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak biyomalzemelerin ve hücre terapisinin sinerjik etkisi büyük öneme sahiptir. Kemik doku mühendisliği uygulamaları kapsamında mezenkimal kök hücrelerin kullanımı 1980'li yıllara dayansa da özellikle hayvan modellerinde osteoblastların kullanımına da rastlanmaktadır (Stevens 2008). Kemik doku mühendisliği yaklaşımında kemik rejenerasyonunun sağlanması için doku iskelesi, hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler ve büyüme faktörleri ön plana çıkmaktadır. Bu üç temel bileşenin tümü birlikte kullanılabileceği gibi sadece büyüme faktörleri ya da büyüme faktörleri ile doku iskelelerinin birlikte kullanıldığı yapılar da söz konusu olmaktadır (Park vd. 2000, De la Riva vd. 2010, Kim vd. 2012). Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile kemik rejenerasyonunda büyüme faktörlerinin hücre göçü ve farklılaşmasını sağlamaları açısından büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir. Büyüme faktörlerinin protein yapıda olmaları ve yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle hedef dokuya ulaşabilme potansiyellerini arttırabilmek için çeşitli partikül sistemlere yüklendiği çalışmalar da mevcuttur (Yilgor vd. 2009). Böylelikle

kemik rejenerasyonu kapsamında kontrollü salım sağlanarak yaralı dokunun onarımı gerçekleştirilmektedir.

2.2.4 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Literatürde yer alan yayınlar incelendiğinde kemik doku mühendisliği çalışmalarına yönelik olarak inorganik, doğal, sentetik malzemelerden elde edilen doku iskelesi, kapsül ya da partikül formda biyomalzemelerin kullanıldığı görülmektedir (Yılgör vd. 2009, De la Riva vd. 2010, Vo vd. 2012).

Doku iskeleleri sentetik ve doğal polimerlerden hazırlanabilmekle birlikte hücre dışı matrikse benzemeleri açısından oldukça büyük öneme sahiptir. Doku iskeleleri hücreler için uygun yapışma ve yayılma yüzeyleri oluşturmalarının yanı sıra mekanik dayanımı sağlamaktadır (Bose vd. 2012). Özellikle kemik doku mühendisliği kapsamında doku rejenerasyonunun amaçlandığı çalışmalarda yapının osteokondüktif ve osteoindüktif kapasitelerinin yüksek olması gerekmektedir. Böylelikle osteoindüktif malzeme varlığında hücre farklılaşması meydana gelmekte ve kemik oluşumu gözlenmektedir. Osteokondüktif özellik ise hücrelerin üremesine bağlı olarak üç boyutlu kemik yapısını oluşturmada etkilidir.

Kemik doku mühendisliği kapsamında kullanılacak olan doku iskelelerinin içsel bağlantılı ve belli oranda gözenekli olması gerekmektedir. Gözenekli yapı hücrenin besin ve metabolit aktarımında ve yapıya yapışıp üremesi açısından önemlidir. Yeterli gözenekliliğin sağlanmadığı durumlarda doku iskelesinin gözenekleri hücreler tarafından kapatılacak ve hücre canlılığının sağlanması için gerekli olan besin ve metabolit alış veriş sağlanamayacaktır. Diğer taraftan özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskelesinin belirli mekanik dayanım değerine sahip olması gerekmektedir. Çoğu kez yüksek gözeneklilik düşük mekanik dayanıma neden olmaktadır (Tanır vd. 2014).

Doku iskelelerinin sahip olması gereken bir diğer özellik vücutta bozunabilen biyobozunur yapıda olmalarıdır (Levengood ve Zhang 2014). Bu özellik hücreler üreyip,

hücre dışı matriksi oluşturma kapasitesine ulaştıklarında doku iskelelerinin vücutta bozunabilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak metaller ve seramikler daha az kullanılırken doğal ve sentetik yapıda biyobozunur polimerlerin daha fazla tercih edilmesi söz konusu olmuştur. Doğal polimerlerin hücre dışı matrikse olan benzerlikleri yüksek biyouyumlulukları ve doğal çevredeki enzimlerle bozunabilme gibi özellikleri nedeniyle doku iskelesi üretiminde oldukça sık kullanılmaktadır. Sentetik polimerler ise doğal polimerlere göre kimyasal ve mekanik açıdan daha iyi özellikte olan malzemelerdir. Sentetik polimerlerin en önemli dezavantajı bozunmaları sonucunda istenmeyen ürünlerin oluşmasıdır. Bozunma ürünleri nedeniyle hasarlı bölgede pH dengesinin bozulmasına bağlı olarak meydana gelen iltihaplanma sorunlarında bağışıklık sisteminin tepkisi ortaya çıkmaktadır.

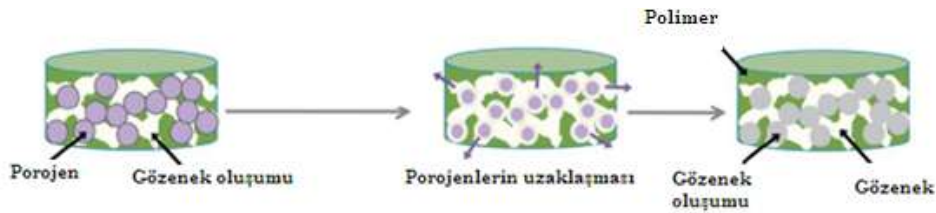
Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik çalışmalarda doğal polimerler kapsamında kollajen, jelatin, kitosan ve aljinat gibi yapılar kullanılabilirken sentetik polimerlerden poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL), poli (propilen fumerat) (PPF) kullanılabilir. Bu kapsamda büyüme faktörlerinin kontrollü salımını gerçekleştirmek için çeşitli partikül, fiber ve 3 boyutlu doku iskelesi formlarında polimerik yapılar sentezlenmektedir. Literatürde partikül ve doku iskelelerinin birlikte ya da ayrı bulunduğu yapılara rastlanmaktadır. Kemik doku mühendisliği çalışmaları kapsamında literatürde yer alan doku iskeleleri ve özellikleri çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Doku iskelesi	Özellikleri
Kitosan (Park vd. 2000)	Üç boyutlu ve kemik doku mühendisliğine yönelik olarak osteokondüktif kapasiteye sahip Gözenek boyutu: 100 µm
Kondroit sülfat-kitosan (Park vd. 2000)	Kondroit sülfat ile kitosan arasında oluşan iyonik etkileşime bağlı doku iskelesi üretimi 150-200 µm aralığında gözenek boyutu ve içsel bağlantılı
Polipropilen doku iskelesi (Holland vd. 2003)	Farklı çapraz bağlanma oranlarında hidrojel yapıda 20-60 kPa mekanik dayanım
Brushite-kitosan (De la Riva vd. 2010)	Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak yüksek resorpsiyon kapasitesine sahip doku iskeleleri Ortalama gözeneklilik: %53.1 Ortalama Gözenek boyutu: 10-100µm
Kitosan-aljinat-nanohidroksiapatit doku iskelesi (Peter vd. 2010)	Kitosan jelatin ve nano yapıda hidroksiapatitten oluşan kompozit yapı Nanopartikül eklenmesi ile doku iskelelerinin yoğunluğunu arttırmakta Nano yapıda hidroksiapatit eklenmesi su tutuma kapasitesini azaltmakta Ortalama Gözenek boyutu: 150-350 µm
Poli-d-laktik asit/Aljinat doku iskelesi (Kanczler vd. 2010)	Kontrollü salım sistemine yönelik farklı degradasyon hızlarına sahip polimerlerden oluşan yapı Ortalama gözenek boyutu: 250 µm Ortalama gözeneklilik: %70
PHBV/PLGA doku iskelesi (Huang vd. 2010)	Ortalama gözeneklilik: %30-81 Mekanik dayanım: 1-1.12 MPa
PHB/Kitosan doku iskelesi (Mendonça vd. 2012)	Ortalama gözeneklilik: %70 Mekanik dayanım: 13.07±0.014 MPa
Kitosan-jelatin-nanoSiO ₂ doku iskelesi (Kavya vd. 2013)	İçsel bağlantılı, 250-400 µm gözenek boyut dağılımına sahip, 0.3-1 MPa mekanik dayanım

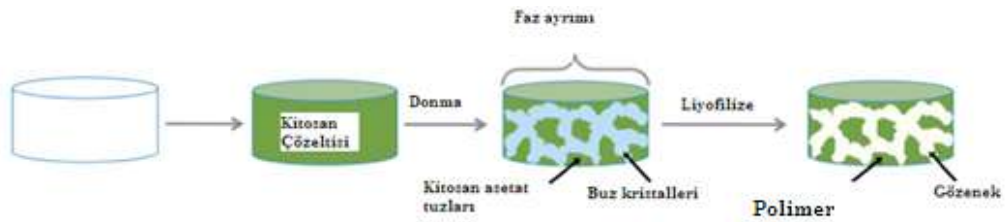
Çizelge 2.1’de yer alan doğal ve sentetik polimerlerden hazırlanan doku iskelelerinin üretimine yönelik kullanılan yöntemler aşağıda sunulmuştur.

Çözücü döküm partikül uzaklaştırma yönteminde polimer çözeltisine suda çözünebilir partiküller eklendikten sonra çözelti istenilen şekilde olan kaba dökülmektedir. Çözücünün buharlaştırma ya da liyofilizasyon ile uzaklaştırılmasının ardından elde edilen yapıda porojen görevi gören partiküllerin uzaklaştırılmasıyla gözenekli yapı elde edilmektedir (Şekil 2.5) (Arıkan 2013).



Şekil 2.5 Çözücü döküm partikül uzaklaştırma yöntemi (Levengood ve Zhang 2014)

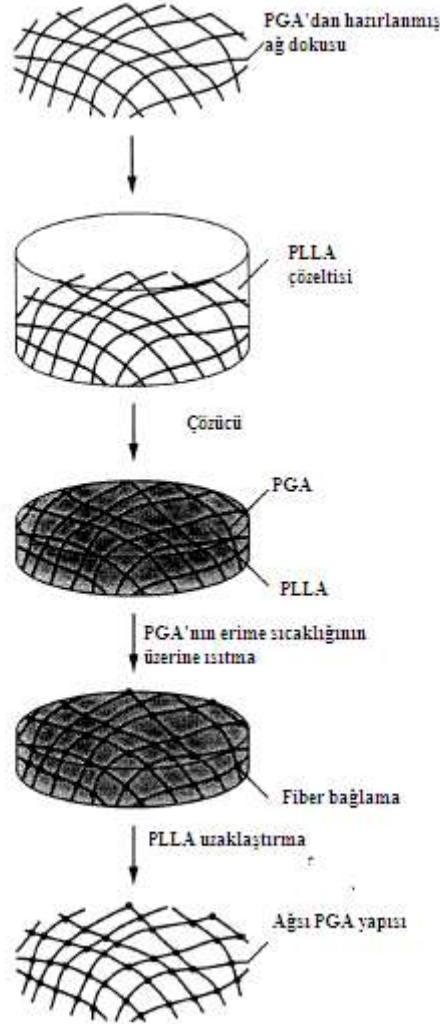
Faz ayrımı yönteminde kullanılan polimer-su emülsiyonları belirli sıcaklıklarda termodinamik olarak kararsız hale getirilmekte ve faz ayrımının meydana gelmesi için serbest enerji düşürülmektedir (Şekil 2.6). Bu yöntemde öncelikle polimerce zengin ve fakir olmak üzere iki faz meydana gelmekte ve ardından polimerce zengin fazın katılaşması ile gözenekli yapı elde edilmektedir (Arıkan 2013).



Şekil 2.6 Faz ayrımı yöntemi (Levengood ve Zhang 2014)

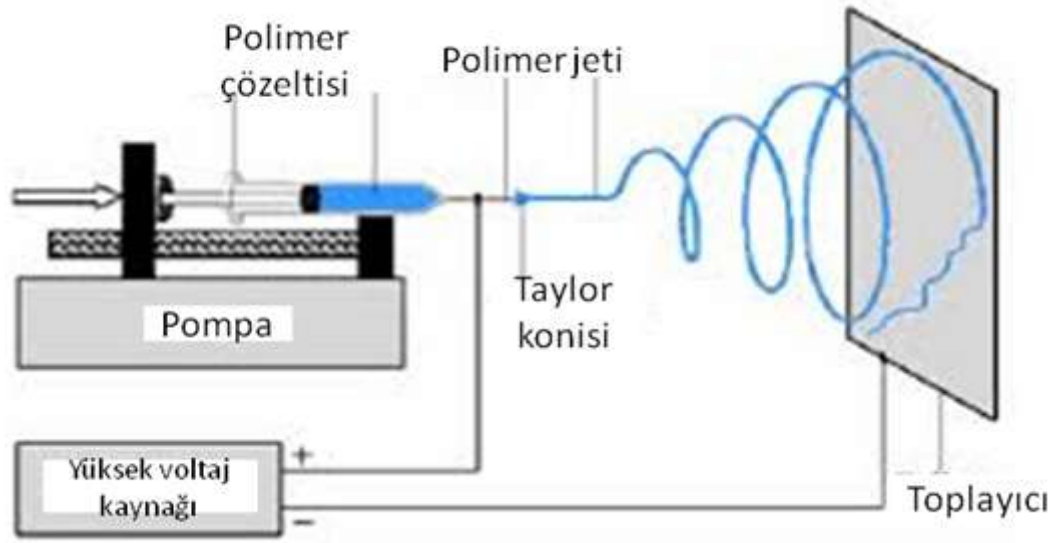
Fiber bağlama poliglikolik asit (PGA) ameliyat ipliklerinin üretiminde kullanılan en eski yöntemlerden birisidir (Şekil 2.7). Fiber bağlama yöntemi temelde PGA ve poli-l-laktik asit (PLLA) kompozit yapısının oluşmasına dayanmaktadır. PGA’dan hazırlanmış ağ dokusu üzerine PGA’yı çözmeyen PLLA çözeltisi eklenmekte ve elde edilen kompozit

yapının PGA'nın erime sıcaklığının üzerine ısıtılmasıyla temas etmekte olan PGA iplikçiklerinin fiziksel olarak birleşmesi sağlanmaktadır (Gümüşdereioğlu 2011).



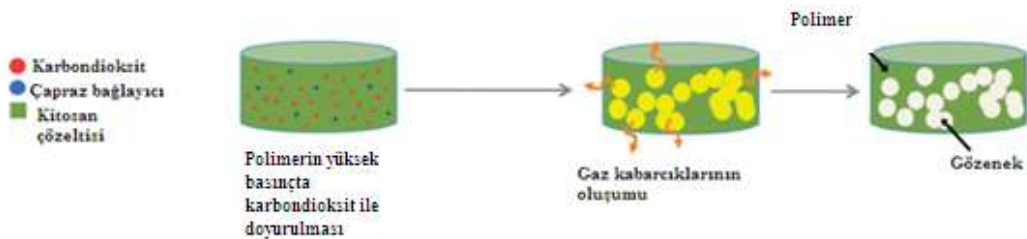
Şekil 2.7 Fiber bağlama yöntemi (Mikos vd. 1993)

Elektroeğirme yöntemi ise elektrostatik kuvvetler varlığında polimerlerin fiber yapıda elde edilmesini sağlayan yöntemdir (Şekil 2.8). Elektroeğirme yöntemi ile daha çok iki boyutlu doku iskeleleri üretilmekle birlikte temelde uygulanan elektrostatik kuvvetlerin polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yenmesi sonucunda fiber jet formunda olan akışın toplayıcı plaka üzerinde karasız fiber yapı oluşturmaya dayanır. Elektroeğirme yöntemi doku mühendisliği uygulamalarında oldukça basit ve ucuz bir olması nedeniyle çok tercih edilmektedir (Levengood ve Zhang 2014).



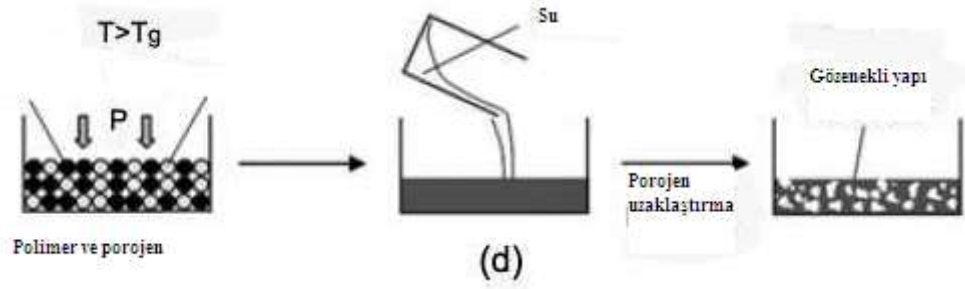
Şekil 2.8 Elektroeğirme yöntemi

Gaz köpükleştirme yönteminde ise çoğunlukla köpükleştirme ajanları olarak bilinen sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve sodyum bikarbonat (NaHCO_3) gibi maddeler kullanılarak gözenekli yapılar hazırlanmaktadır. Bu yöntemde köpükleştirme ajanlarının asitle etkileşmesi veya yüksek sıcaklıkta bozunmasıyla ortaya çıkan karbondioksit baloncukları polimer matriksin içine hapsolarak gözenekli yapının oluşmasını sağlar (Şekil 2.9) (Demirtaş vd. 2008).



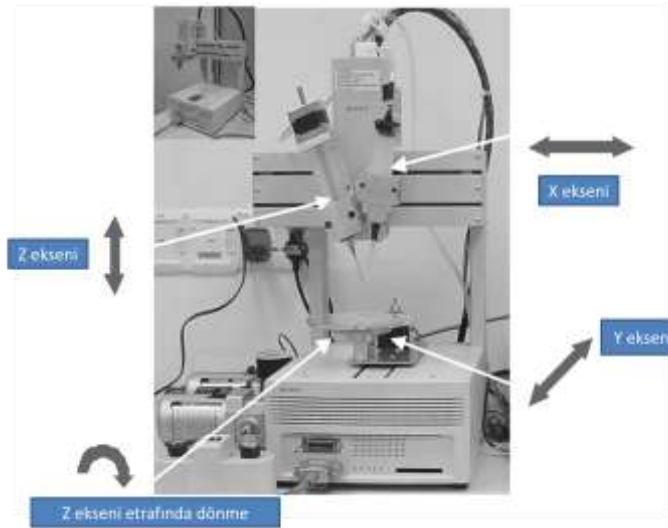
Şekil 2.9 Gaz köpükleştirme yöntemi

Doku iskelesi üretiminde kullanılan diğer bir yöntem olan **eriyik kalıplama** polimerin camsı geçiş sıcaklığının üzerine kadar ısıtılmasıyla elde edilen jelin porojenler varlığında basınç altında sıkıştırılmasına dayanmaktadır (Şekil 2.10). Partiküllerin uzaklaştırılması sonucunda gözenekli yapılar elde edilmektedir (Arıkan 2013).



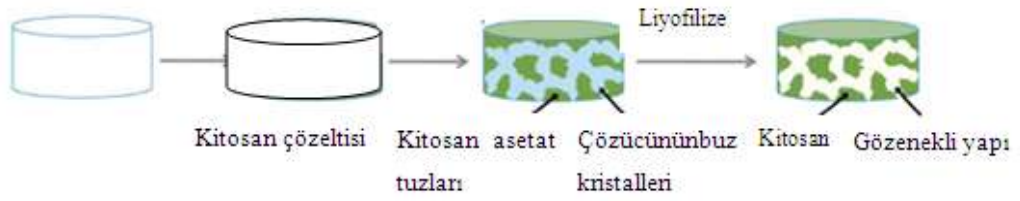
Şekil 2.10 Eriyik kalıplama yöntemi

Hızlı prototip yöntemler ise bilgisayar uygulamalarına dayanan bir yöntemdir (Şekil 2.11). 3D baskılama, stereolitografi, birleşmiş biriktirme modelleme ve seçici lazer sinterleme hızlı prototip yöntemleri arasında sayılmaktadır (Bose vd. 2012).



Şekil 2.11 Hızlı prototip yöntemler (3D baskılama sistemi)

Tez çalışması kapsamında kitosan doku iskeleleri **dondurarak kurutma yöntemi** ile hazırlanmıştır. Dondurarak kurutma yönteminde polimerin uygun çözücüde çözünmesinin ardından çözelti hızla dondurulmakta ve yüksek vakum altında çözücünün ayrılması sağlanmaktadır (Tıǧlı vd. 2007). Yöntemde kullanılan polimer-çözücü türüne göre yapraksı ya da kapiler benzeri mikro yapılar elde edilebilmektedir. Örneğin kitosanın seyreltik asetik asit ortamında çözünmesi ve ardından dondurulmasıyla kitosan çözeltisi içerisinde oluşan buz kristalleri kitosan asetat tuzlarından ayrılır ve ardından buz kristallerinin süblimleşmesiyle gözenekli yapıda doku iskeleleri elde edilir (Şekil 2.12).

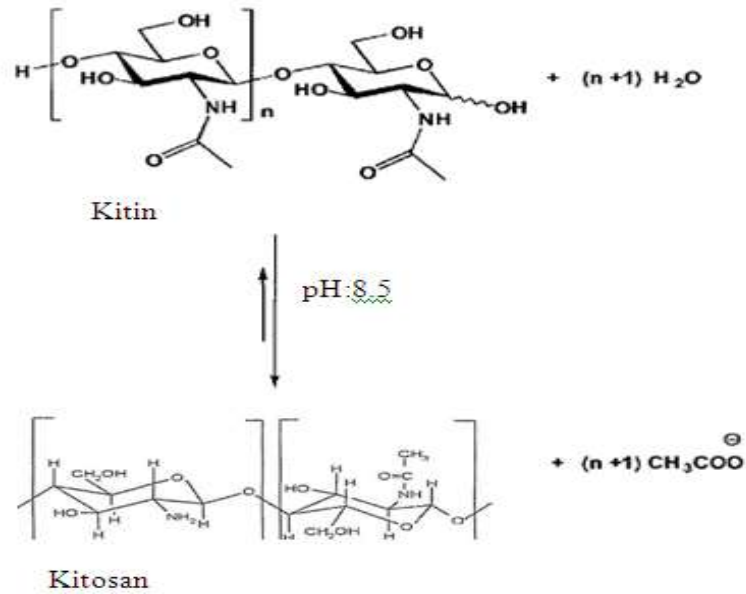


Şekil 2.12 Dondurarak kurutma yöntemi (Levengood ve Zhang 2014)

Tez çalışması kapsamında doku iskeleleri katyonik bir polimer olan polisakkarit bazlı kitosan ile üç boyutlu doku iskeleleri hazırlanmıştır. Polisakkarit bazlı kitosan ile ilgili genel bilgiler bölüm 2.2.4.1’de sunulmuştur.

2.2.4.1 Polisakkarit bazlı kitosan

Kitosan doğrusal yapıda 1-4-2-asetamit-2 deoksi-β-D glukon (N-asetil-D-glikozamin) ile 1-4-2-amino-2-deoksi-β-D-glukan (D-glikozamin) yapılarından oluşan yar kristalin özelliğe sahip bir polimerdir (Croisier ve Jerome 2013). Kitosan doğada bulunmamakla birlikte kitinin kısmi olarak deasetilasyonu sonucunda elde edilmektedir. Kitinin deasetilasyonu bazik koşullarda kimyasal hidroliz ya da kitin deasetilaz grubuna ait enzimler varlığında enzimatik hidroliz ile gerçekleşir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Kitinin deasetilasyon tepkimesi

Kitosana ait molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi gibi parametreler kaynağı ve üretimine bağlı olarak değişmektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesi zincirdeki amino grupları sayısına bağlıdır ve bu değer D-glikozaminin, D-glikozamin ile N-asetil D-glikozaminin toplamına oranlanması ile bulunur. Literatürde kitosanın deasetilasyon derecesi % 60-100 arasında değişirken molekül ağırlığı 300-1000 kDa arasındadır. (Croisier ve Jerome 2013). Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi kitosanın yüzey yük yoğunluğunu, kristalinitesini, çözünürlüğünü, enzimatik degradasyonunu ve hücre etkileşimlerini etkilemektedir. Örneğin deasetilasyon derecesi yükseldikçe hücre yapışması ve biyodegradasyon hızı artmaktadır. Kitosan pH:7'nin üzerinde çözünmemektedir. pH<6 değerinde seyreltik asit ortamında serbest amino gruplarının yapısına proton katılmasıyla çözünebilir hale gelir.

Kitosan sert ve yumuşak dokulardaki yara iyileşme sürecinde olumlu etkiler göstermesi nedeniyle çeşitli ihtiyaçlara yanıt verebilecek doku iskelelerinin üretimi için uygun bir biyomalzemedir. Bunun yanı sıra çeşitli farmakolojik ajanlar ve biyolojik aracı moleküller için taşıyıcı olarak kullanılabilmesi kitosanın bir diğer üstün özelliğidir (Akman 2007). Diğer taraftan yapısındaki amino ve hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle spesifik uygulamalarda gerekli olan kimyasal modifikasyonlar için uygun bir polimerdir. Literatürde kemik doku mühendisliği çalışmalarına yönelik olarak iki boyutlu fiber yapıların yanı sıra en çok tercih edilen formları gözenekli üç boyutlu yapılardır (Lima vd. 2013). Bunun yanı sıra kontrollü salım sistemlerinde kitosan partiküllerin kullanıldığı çalışmalara rastlamak da mümkündür (Mantripragada ve Jayasuriya 2014).

2.2.5 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler

Doku mühendisliğinin temel bileşeni olan hedef dokuyu oluşturabilme potansiyelinde olan hücrelerin özellikleri başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Kaynaklarına göre hücreler hastanın kendinden alınan (otolog), başka bir insandan elde edilen (allojenik) ve başka bir canlı türünden elde edilen (ksenojenik) olmak üzere üçe ayrılabilir. Doku rejenerasyonu sırasında kullanılan hücrelerin etkinliğinin korunması, uygulama esnasında immun yanıt gelişme riski veya immun baskılayıcı tedavi gerektirmemesi gibi nedenlerden dolayı otolog hücrelerin kullanımı daha uygun olmaktadır. Diğer taraftan

kullanılacak ideal hücrenin kolay elde edilebilmesi, *in vitro* olarak kolay çoğaltılması, immunojenik olmaması ve hedeflenen dokuya benzer protein ekspresyonuna sahip olması gerekmektedir (Salgado vd. 2004). Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak yapılan çalışmalarda yaygın olarak osteoblastlar ve kök hücreler kullanılmaktadır. Osteoblast serisini oluşturan hücreler kemik metabolizması ile ilgili temel hücrelerdir. Kemğin organik matriksini sentezler ve mineralizasyon sürecinde fonksiyon görürler. Bunun yanı sıra dolaşımda bulunan hormon, büyüme faktörleri veya fiziksel uyarımlar etkisiyle salgılanan sitokinler ile yönlendirilen mekanizmalarla kemik dokusunun yapım, yıkım ve yeniden şekillendirilmesinde rol alırlar. Osteoblastlar kemik yapım ve yıkım olaylarının düzenlenmesindeki rolleri ile kalsiyum fosfat gibi minerallerin kan düzeylerinin homeostazında da görev alırlar. Osteoblastlar bütün bu özelliklerinin yanı sıra immunojenik yanıt vermemeleri ve biyopsi yoluyla kolay elde edilebilmeleri açısından önemli avantajlara sahiptir. Ancak, az sayıda osteoblast elde edilmesi ve bu hüvrlerin çoğaltılmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle doku rejenerasyonunda doku iskelesi üzerinde taşınabilen hücre sayısı az olmaktadır. Daha fazla sayıda osteoblast hücre elde edilmesinde kullanılan hayvan deneklerinde immun yanıt oluşma riski ve hastalık taşıma potansiyeli açısından bazı riskler ortaya çıkabilmektedir.

Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak kullanılan diğer hücre tipleri hücre hatları, kök hücreler ve kemik iliği stroma hücreleridir. Hücre hatları kaynaklarının belli olması ve pasajlanarak bir çok kez çoğaltılabilmeleri gibi avantajlara sahiptir. Kök hücreler ise yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olmakla birlikte embriyonik kök hücreler ve erişkinden elde edilmiş kök hücreler kullanılabilmektedir. Embriyonik kök hücreler blastositin iç hücre kitlesinden elde edilir ve osteoblastlara farklılaşabilir. Embriyonik kök hücrelerin kullanımında etik sorunların yanı sıra farklılaşmanın tam olarak sağlanamaması, teratom ve benzeri tümoral oluşumlara yol açabilmesi ve elde edilen dokunun immunolojik uyumsuzluğu gibi sorunlarla karşılaşılabilir (Salgado vd. 2004). Erişkin kök hücreler bulundukları dokunun dışındaki hücrelere farklılaşabilmekle birlikte kemik iliği, periost, kas, yağ, beyin ve deri dokularında bulunmaktadır. Diğer taraftan kemik doku oluşturmaya yönelik olarak kullanılan kemik iliği stroma hücreleri kemik iliği mononükleer hücrelerin bir alt grubudur ve kemik iliği aspirasyon malzemelerinden izole edilirler (Akman 2007).

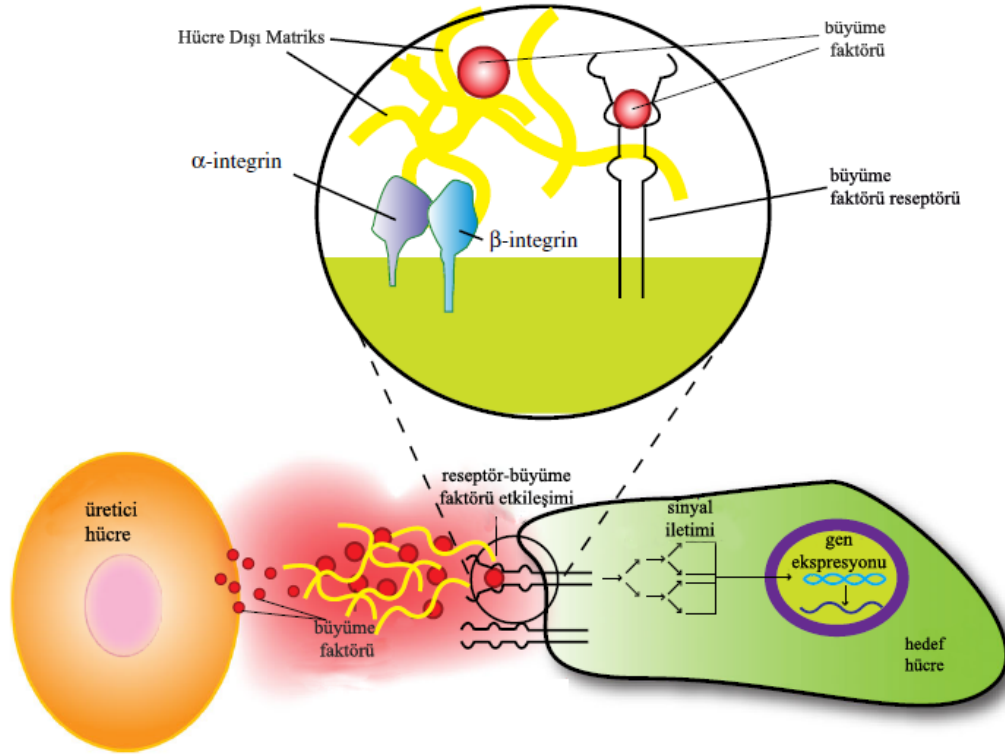
Ayrıca, kemik iliği stroma hücreleri daha düşük seviyede immün yanıt oluşturma özelliğine sahiptir. Kemik iliğinden izole edilen hücrelerdeki kök hücre sayısının düşük olması nedeniyle bu hücrelerin *in vitro* koşullarda sitokin ve büyüme faktörleri ile muamele edilerek hedef hücre sayısının artırılması gerekmektedir.

2.2.6 Büyüme faktörleri ve kemik doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri suda çözünebilir özellikte olup pek çok hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir (King ve Krebsbach vd. 2012). Ayrıca doku mühendisliği yaklaşımında, dokuların yeniden modellenmesinde yaralı ve hasar görmüş dokuların iyileşme sürecinin temel bileşenini oluşturmaktadır. Dokuların yeniden modellenmesi, yara oluşumundan dokuların onarımına kadar geçen süre içerisinde gerçekleşmektedir. Histolojik yöntemler dokuların iyileşme sürecinde etkin olan hücre tipleri hakkında bilgi verse de yara iyileşmesini başlatan ve süreci devam ettiren mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Büyüme faktörleri ve diğer sitokinlerin özelliklerinden yola çıkan araştırmalar bu biyosinyal moleküllerin yaralanma ile başlayıp iyileşme ile son bulan doku yenilenme sürecinde önemli ve etkin bir rol oynadıklarını ortaya koymaktadır (Lanza vd. 2007).

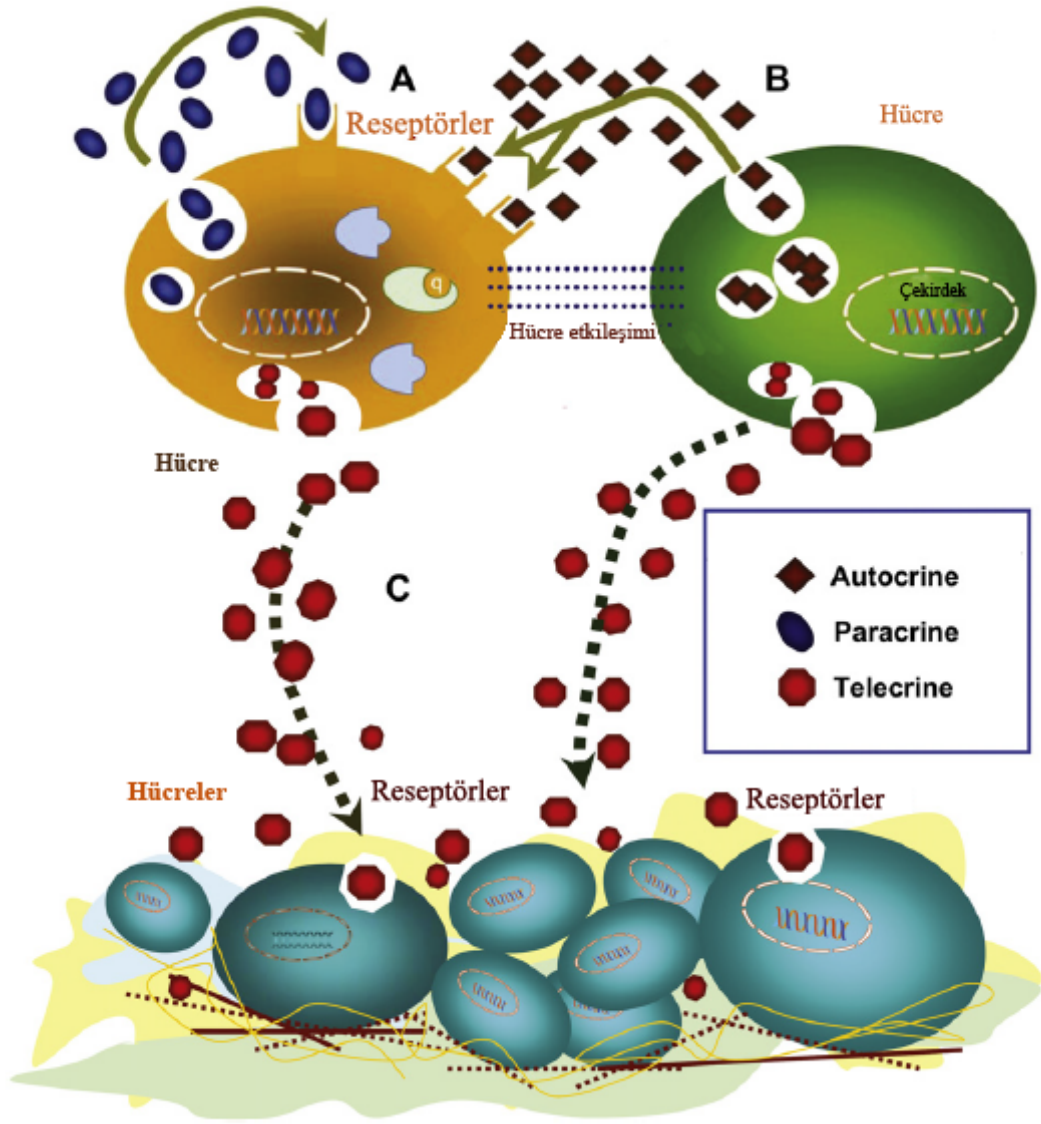
Büyüme faktörleri serum bileşiminde çok düşük derişimlerde (10^{-9} , 10^{-11} M) bulunan ve dokuların büyüme ve gelişiminden sorumlu olan oligopeptit yapısındaki moleküllerdir. Hücre bölünmesi ve farklılaşmasını doğrudan uyaran bu biyosinyal moleküller hücresel aktiviteleri modüle eden mekanizmaların anlaşılması açısından son derece önemli moleküller haline gelmişlerdir (King ve Krebsbach vd. 2012). Büyüme faktörleri varlığında tetiklenen spesifik hücre cevabı, üreme, göç veya farklılaşma gibi pek çok farklı hücre aktivitesi ile sonuçlanabilmektedir. Spesifik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmadan önce bu biyosinyal moleküllerin biyolojik fonksiyonları ve hücre dışı matris içerisindeki rolleri aydınlatılmalıdır. Büyüme faktörlerinin hücre aktiviteleri üzerindeki etkilerinin, bu biyosinyal moleküllerin hücre yüzeyindeki reseptörler ile etkileşerek kompleks oluşturmaları sonucu olduğu düşünülmektedir (Vo vd. 2012). Sinyal iletim mekanizması sağlıklı hücre tarafından büyüme faktörünün salımı ile

başlamaktadır. Büyüme faktörü molekülleri hedef hücre üzerindeki transmembran reseptörlere bağlanarak hücre davranışını yönetir. Sinyallerin hücre çekirdeğine iletilmesi hücre iskeletinde protein fosforilasyonu, iyon değişimleri, metabolik değişiklikler, gen ekspresyonu, protein sentezi ve biyolojik cevap olmak üzere birbirini takip eden kompleks olaylar sonucunda gerçekleşir (Lee vd. 2011, Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Büyüme faktörlerinin hücre dışı matriks ile etkileşimi (Lee vd. 2011)

Doku mühendisliği yaklaşımı ile hedeflenen doku rejenerasyonunda, fonksiyonel yapıların elde edilmesi için büyüme faktörleri anahtar görevi görmektedir. Büyüme faktörleri sağlıklı hücreler tarafından üretilebileceği gibi (*autocrine*) hücre dışı matriksi çevreleyen dış ortamda da bulunabilir (*paracrine* ya da *telecrine*) (Chen vd. 2010, Şekil 2.15)



Şekil 2.15 Büyüme faktörlerinin hücreleri etkileme mekanizması (Chen 2010)

Doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan büyüme faktörlerinin kaynakları ve aktiviteleri çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Büyüme faktörleri kaynakları ve aktiviteleri

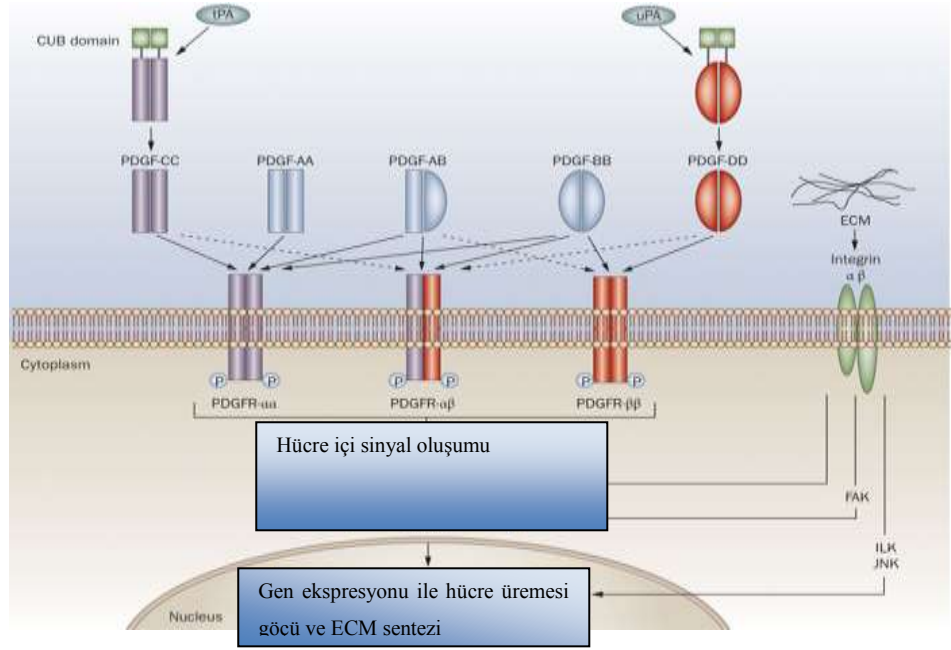
Büyüme Faktörü	Kaynağı	Aktivitesi
PDGF	Plateletler, endotel hücreler ve plasenta	Bağ dokusu, yumuşak kas ve glial hücrelerinin üremesi
BMP-6	Fibroblastlar, kemik hücreleri, plateletler	Mezankimal kök hücrelerin kemik ve kıkırdağa farklılaşması ve hücre üremesi
EGF	Sub-maksiler bezler, Brunner bezi	Mezankimal kök hücrelerin, glial ve epitel hücrelerin üremesi
TGF- α	Dönüştürülmüş hücreler	Yara iyileşmesi
FGF	Pek çok farklı hücreler	Pek çok hücre tipinin çoğalması, bazı kök hücrelerin inhibe edilmesi ve mezoderm oluşumu
NGF	Mast hücreleri, kemik iliği stroma hücreleri ve keratinositler	Nöronların çoğalması ve yaşamını devam ettirmesi
TGF- β	T-helper ve natural killer (NK) hücreler	Yara iyileşmesi, anti enflamatuar özellik makrofaj ve lenfositlerin çoğalmasının önlenmesi
IGF-1	Karaciğer	Pek çok hücre tipinin çoğalması
IGF-2	Pek çok farklı hücreler	Fetal orijinli pek çok hücre tipinin üremesi

Tez çalışması kapsamında anjiojenik etkiye sahip olan PDGF-BB ve osteojenik potansiyele sahip olan BMP-6 kullanılmıştır. PDGF-BB ve BMP-6'ya ilişkin detaylı bilgiler Bölüm 2.2.6.1 ve Bölüm 2.2.6.2'de sunulmuştur.

2.2.6.1 Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) her biri 100 amino asit içeren A ve B zincirlerinden oluşan dimerik yapıda bir moleküldür (Steenfos 1994). PDGF'in farklı etkilere sahip olduğu bilinen ve sentez aşamasında endoplazmik retikulumda disülfid bağları ile çapraz bağlanma sonucu oluşan üç farklı formu vardır. Bunlar PDGF-BB, PDGF-AA ve PDGF-AB olarak tanımlanmaktadır. PDGF yara iyileşmesini başlatabilen trombositlerden, makrofajlardan endotel hücrelerden ve fibroblastlardan salgılanabilmektedir. Bunun yanı sıra yara iyileşmesinde en etkili başlatıcı olmakla birlikte yaralı bölgeye ilk göç eden ve vücut içerisinde en yüksek oranda bulunan büyüme faktörüdür. Trombositlerden salınan PDGF makrofaj ve nötrofiller için kemotaktik etki (hücre göçünü başlatıcı etki) gösterirken fibroblastlar için mitojenik etkiye (hücre bölünmesini başlatıcı etki) sahiptir (Reves vd. 2012). Yara iyileşmesinde bu hücrelerin sıralı olarak yaralı bölgede bulunması gerekmektedir.

Dimerik yapıda olan PDGF'in farklı hücresel aktiviteleri organize etmek için bağlandığı α ve β reseptörleri bulunmaktadır. 1066 tane amino asit içeren α reseptörü ve 1074 amino asit içeren β reseptörü transmembran glikoprotein olmakla birlikte hücre dışı reseptörlere bağlanmak için immunoglobulin bölgelere ve sitoplazmik bölgede tirozin kinaz enzimlerine sahiptir (Bennett ve Schultz 1993). PDGF'in reseptöre bağlanması ile tirozin otofosforilasyonu başlamakta ve hücre içi sinyal iletimi ile genler uyarılmakta ve gen ekspresyonu gerçekleşmektedir (Şekil 2.16).

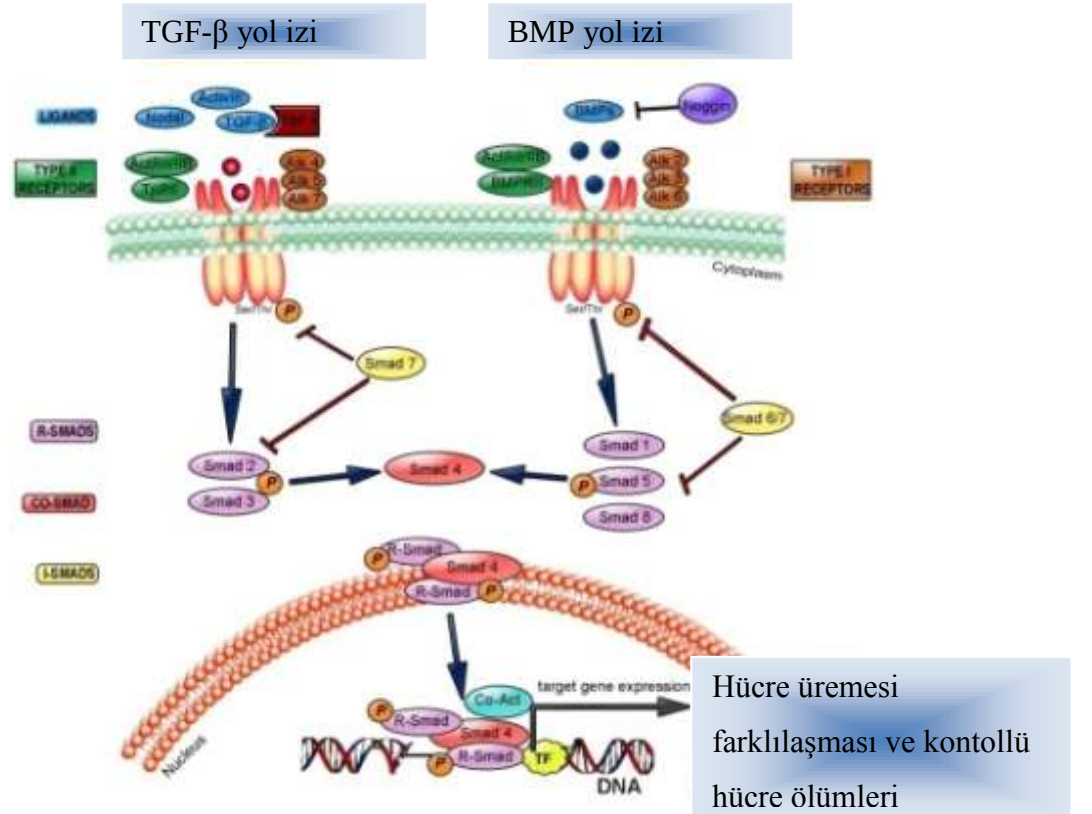


Şekil 2.16 PDGF sinyal mekanizması

2.2.6.2 Kemik morfojenik proteini (BMP-6)

Osteoindüktif kapasiteye sahip olan kemik morfojenik proteini (BMP) TGF- β (*transforming growth factor*) ailesinin alt grubunda yer almaktadır. TGF- β ailesi yapısal olarak ilişkili 100'den fazla polipeptit büyüme faktörünü içeren ve gelişimi çok yönlü kontrol eden bir gruptur (Vo vd. 2012). BMP grubu üyeleri BMP-1 dışında TGF- β ailesine dahildir ve primer aminoasit sekanslarının benzerliğine göre dört farklı alt gruba ayrılmıştır. İlki BMP-2 ve BMP-4'ün yer aldığı grup iken ikincisi BMP-5, BMP-7 ve BMP-6'yı içeren gruptur. Üçüncü ve dördüncü gruplar sırasıyla GDF-5, GDF-6, GDF-7 ve BMP-3'ü ve GDF-10 gibi büyüme faktörlerini içermektedir (Soran 2010). Kemik morfojenik proteinleri *autocrine* ve *paracrine* mekanizmalarıyla hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak çeşitli hücresel aktiviteleri organize ederler. Kısaca TGF- β faktörleri serin/threonin kinazları olarak bilinen iki reseptörün bir araya gelerek birinin diğerini fosforlaması ve oluşan bu kompleksin de SMAD proteinlerini aktive etmesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenler (Zhang vd. 2014). Reseptörler fonksiyonel özelliklerine göre tip I ve tip II olmak üzere ikiye ayrılırlar. Büyüme faktörlerinin ilgili reseptörlere bağlanması sonucunda gen ekspresyonu başlatılır.

Gen ekspresyonundan önce meydana gelen sinyal iletimi adımı iki farklı ligand bağlanma türü gözlenir. Bunlardan ilki ligandın tip II reseptöre doğrudan bağlanması ve bu kompleksin daha sonra tip I reseptör ile bağlanması esasına dayanan ve TGF- β /aktivin reseptörleri için karakteristik olan bağlanma çeşididir. İkinci bağlanma ise BMP grubu karakteristiklerine aittir. Burada tip I ve tip II BMP reseptörleri liganda beraber bağlanırlar. Bu aktif kompleksin oluşmasının ardından tip II reseptörü tip I reseptörünü fosforlayarak aktif hale getirir ve meydana gelen bu kompleks de hücre çekirdeğine sinyal iletilen SMAD proteinlerini fosforlar (Zhang vd. 2014). SMAD proteinleri şekil 2.17’de gösterildiği biçimde hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA’ya bağlanma yeteneği sayesinde DNA ile kompleks oluşturabilen protein ailesidir.



Şekil 2.17 BMP 6 sinyal mekanizması

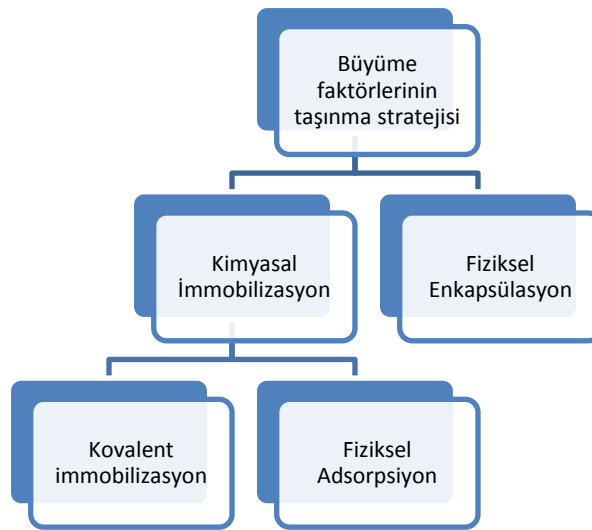
Şekil 2.17 incelendiğinde sinyal iletiminde büyük öneme sahip olan SMAD proteinlerinin farklı türlerinin olduğu görülmektedir. Serin ve threonin kinazın bir araya gelip birinin diğerini fosforlaması adımı sona erdikten sonra R-SMAD’lar sinyal iletimini gerçekleştirmek

üzere SMAD I, SMAD 5 ve SMAD 8'e ihtiyaç duymaktadır. Şekil 2.17'den de anlaşılacağı gibi bunlar Type I reseptörün substratlarıdır. Co-SMAD ie R-SMAD'larla birleşerek sinyal iletiminde görev alan yapılardır. Diğer taraftan I-SMAD'lar inhibisyon amaçlı ortamda bulunmaktadır.

Şekil 2.17 incelendiğinde BMP-6'nın sinyal iletiminin son adımı olan gen ekspresyonunda hücre farklılaşması, hücre üremesi ve kontrollü hücre ölümlerinde etkin olduğu görülmektedir.

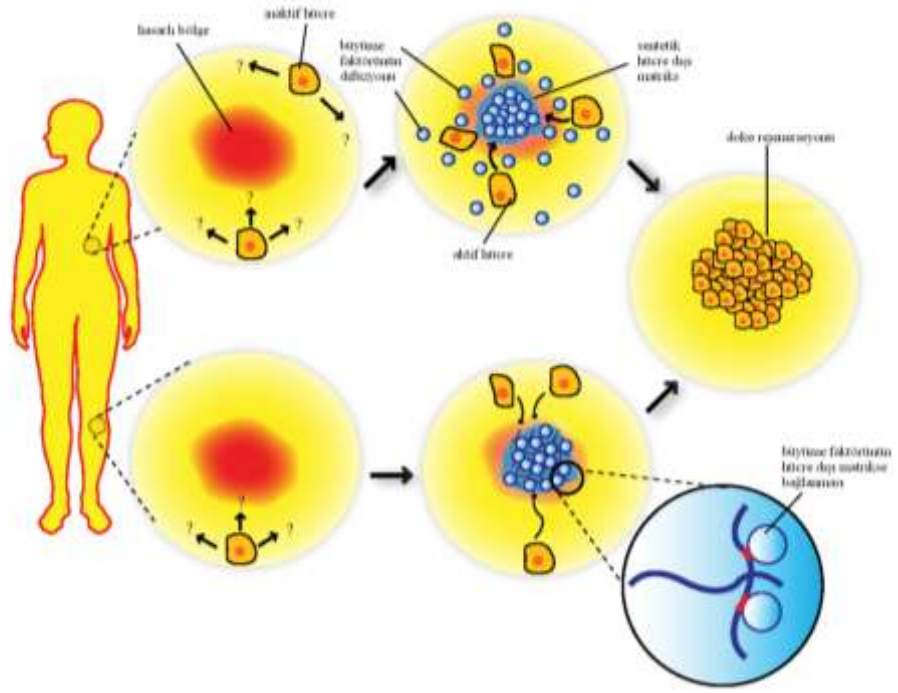
2.3 Büyüme Faktörlerinin Taşınma Stratejisi

Doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak büyüme faktörleri doğal ve sentetik polimerlerden elde edilen yapılar ile taşınabilmektedir (Lee vd. 2011). Büyüme faktörlerinin taşıyıcı sisteme yüklenmesi için kullanılan stratejiler şekil 2.18'de sunulmuştur.



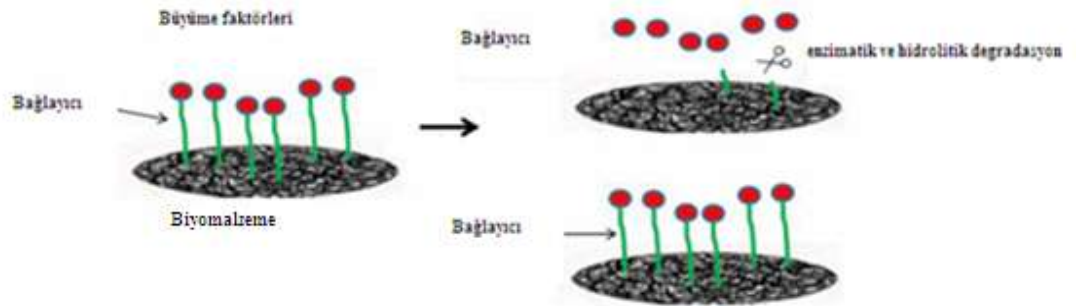
Şekil 2.18 Büyüme faktörlerinin taşınma stratejisi

Büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemlere yüklenmesi için geliştirilen bu iki önemli strateji büyüme faktörlerinin matriks içine ya da yüzeyine kimyasal immobilizasyonu ve taşıyıcı sistemlere fiziksel enkapsülasyonudur (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Büyüme faktörlerinin fiziksel enkapsülasyonu ve kimyasal immobilizasyonu (Lee vd. 2011)

Kimyasal immobilizasyonda büyüme faktörü ile polimerik yapı arasında afiniteye bağlı ya da kimyasal bir bağ oluşumu görülmektedir (Şekil 2.20).

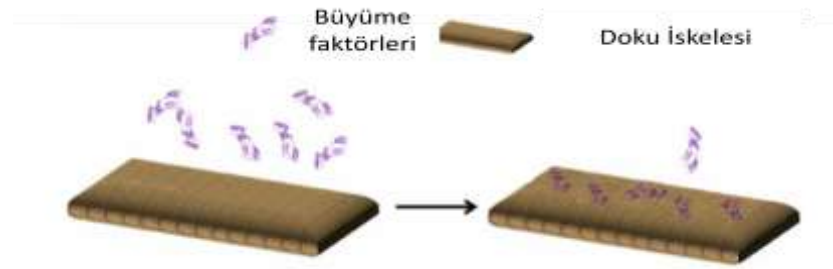


Şekil 2.20 Büyüme faktörlerinin kimyasal immobilizasyonu (Mehta vd. 2012)

Bu yöntemde matriks yapı ile etkileşen hücreler immobilize haldeki büyüme faktörleri ile karşılaştıklarında lokalize bir sinyalizasyon mekanizması oluşmakta ve hücre davranışı kontrol edilmektedir (Lee vd. 2011).

Kimyasal immobilizasyon **fiziksel adsorpsiyon ve kovalent immobilizasyon** olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kovalent immobilizasyon kapsamında büyüme faktörlerinin hücre dışı matriks ile etkileşimi doğrudan kovalent immobilizasyon ile gerçekleşmektedir.

Fiziksel adsorpsiyon van der Waals kuvvetleri altında ya da hidrofobik etkileşimler ile moleküllerin yüzeye tutunmasını sağlar (King ve Krebsbach 2012) (Şekil 2.21) .



Şekil 2.21 Büyüme faktörlerinin fiziksel adsorpsiyonu (King ve Krebsbach 2012)

Büyüme faktörlerinin doku iskeleleri gibi biyomalzemelerin yüzeyine adsorpsiyonu malzememenin sahip olduğu fizikokimyasal özellikler ile ayarlanabilmektedir. Bunlar, yüzey serbest enerjisi, hidrofilik/hidrofobik denge, polarite, malzemeye ait temas açısı, yüzey yükü ve buna bağlı olarak tanımlanan elektrostatik etkileşimler, fonksiyonel gruplar, yüzeye ait mikro ve nanotopografi ile pürüzlülük ve kristalinite olarak tanımlanmaktadır (Vladkova 2010). Biyomalzemenin sahip olduğu bu fizikokimyasal özelliklerin yanı sıra çözeltinin sahip olduğu iyonik direnç ve ortamda bulunan diğer proteinlerin varlığı da biyomalzeme yüzeyinde adsorplanan büyüme faktörü miktarını etkilemektedir. Fiziksel adsorpsiyonda ortamda bulunan büyüme faktörlerinin biyomalzeme yüzeyine taşınımı difüzyon, akış ve termal konveksiyon ile sağlanabilmektedir (King ve Krebsbach 2012).

Fiziksel adsorpsiyonda büyüme faktörü ile biyomalzeme arasında meydana gelen etkileşimde proteine özgü spesifik mekanizmalar söz konusu olmasına karşın çözeltide yer alan farklı protein çiftlerinin bir arada bulunma olasılığı biyomalzeme yüzeyinde farklı konformasyon ve oryantasyonlarda yapıların oluşmasına neden olabilmektedir.

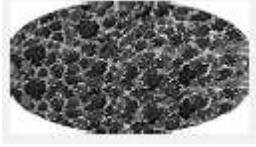
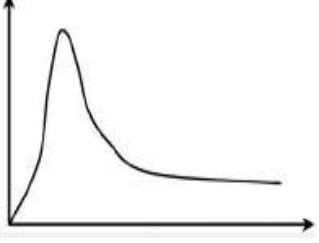
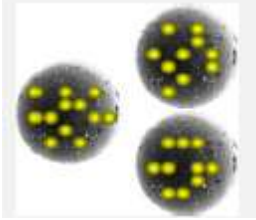
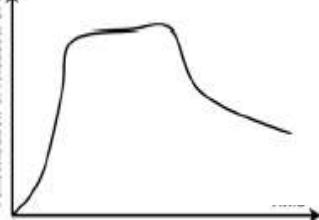
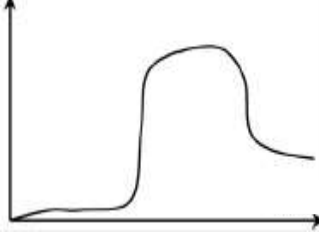
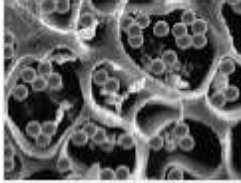
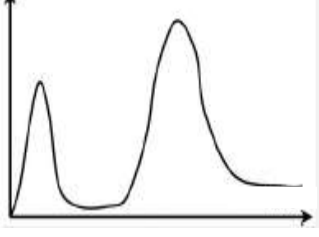
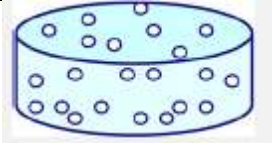
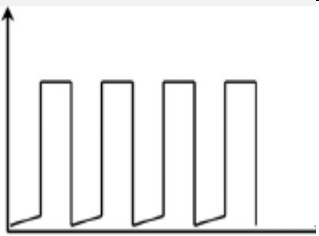
Ayrıca fiziksel adsorpsiyonda meydana gelen bu protein konformasyonlarının yeterli oranda kontrol edilememesi, proteinlerin yapıdan desorpsiyonu ve yıkama adımlarında uzaklaşma olasılığı ile büyük moleküllerin yüzeye tutunmasında meydana gelen zorluklar fiziksel adsorpsiyonun dezavantajları arasında sayılabilmektedir. Diğer taraftan fiziksel adsorpsiyon ile biyomalzeme yüzeyine tutunmuş olan büyüme faktörlerinin salımında oluşabilecek ani salım nedeniyle büyüme faktörlerinin hedef dokuya ulaşmasında bir takım sorunlar ile karşılaşılabilir. Boerckel vd. 2011 tarafından yapılan *in vivo* çalışmada kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), kollajen doku iskelesine fiziksel adsorpsiyon ile yüklenmiş ve ani salım gözlenmiştir. Elde edilen salım grafikleri sonucuna göre sürekli salım sağlanamadığı ve BMP-2'nin çok düşük miktarlarının hedef dokuya ulaşabildiği belirtilmiştir. Wei vd. 2007 tarafından yapılan çalışmada ise BMP-7'nin poli-l-laktik asit (PLLA) doku iskelesine fiziksel adsorpsiyon ile yüklenmesi durumunda kemik oluşumunun gözlenemediği sonucuna ulaşılmıştır.

Kovalent immobilizasyonda büyüme faktörleri ile taşıyıcı polimerik yapı fonksiyonel gruplar ile birbirine bağlanmaktadır. Kovalent immobilizasyon için fibronektin, laminin, elastin heparin gibi biyopolimerik jeller kullanılabilir. Diğer taraftan büyüme faktörlerinin taşıyıcı mekanizma ile etkileşimini sağlayabilecek özellikte olan küçük oligopeptit yapıda protein çiftlerinin kullanılabilirliği de görülmektedir (Lee vd. 2011). Büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemin yüzeyine immobilizasyonunda yüzeyin kimyasal reaktivitesi oldukça önemlidir ve bu nedenle yüzeyde kovalent bağ oluşumunu destekleyecek nitelikte fonksiyonel gruplara ihtiyaç duyulmaktadır (Vladkova 2010). Bu durum büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemin yüzeyine kimyasal immobilizasyonu ile oldukça kararlı yapıların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Kimyasal immobilizasyon fiziksel adsorpsiyon ile karşılaştırıldığında büyüme faktörleri ile taşıyıcı sistem arasında güçlü bir etkileşim meydana gelmekte ve uzun süreli salımlarda tercih edilmektedir. Kimyasal immobilizasyonun fiziksel adsorpsiyona göre bir diğer üstün tarafı ise özellikle doku mühendisliği uygulamalarında büyüme faktörlerinin matriks halinde birleşmiş (*matrix-tethered*) kararlı yapılarının elde edilmesini sağlamasıdır. Böylece reseptörlere bağlanıp aktif hale gelen büyüme faktörlerinin daha yavaş degradasyonu sağlanmaktadır. Ancak büyüme faktörünün dozu ile taşıyıcı sistemin

fizikokimyasal özellikleri arasındaki doğru dengenin sağlanmasının zorluğu kimyasal immobilizasyonun dezavantajları arasında gösterilebilir. Diğer taraftan immobilizasyon sırasında büyüme faktörlerine ait biyoaktif fonksiyonel grupların bozulması nedeniyle büyüme faktörlerinin biyoaktivitelerini kaybedebileceği bilinmektedir (Lee vd. 2011).

Büyüme faktörlerinin taşıyıcı mekanizmaya yüklenmesine ilişkin olarak kimyasal immobilizasyona göre daha sık tercih edilen **fiziksel enkapsülasyon yönteminde** büyüme faktörleri çoğunlukla polimerlerden elde edilen yapılar içerisine hapsedilmekte taşıyıcı sistemden çevre dokuya salım önceden programlanmış şekilde difüzyon ile gerçekleşmektedir. Büyüme faktörlerinin fiziksel enkapsülasyonunda enjekte ya da transplante edilebilen yeterli mekanik dayanıma sahip malzemeleri üretmek mümkündür. Burada önemli olan nokta büyüme faktörü moleküllerinin işlemler sırasındaki sert, kimyasal ve fiziksel koşullardan etkilenmemesi ve biyolojik aktivitelerini korumalarıdır. Enkapsülasyon için poli (α -hidroksi asitler), poli (orto esterler), poli (anhidritler) gibi sentetik polimerlerden hazırlanan nano/mikro partiküller kullanılabildiği gibi doğal polimer olan keratin, kollajen, jelatin, elastik, kitosan ve aljinat gibi yapılar da kullanılabilmektedir. Büyüme faktörlerinin kontrollü salım profilleri çizelge 2.3'de sunulmuştur.

Çizelge 2.3 Büyüme faktörlerinin taşındığı yapılar ve salım profilleri

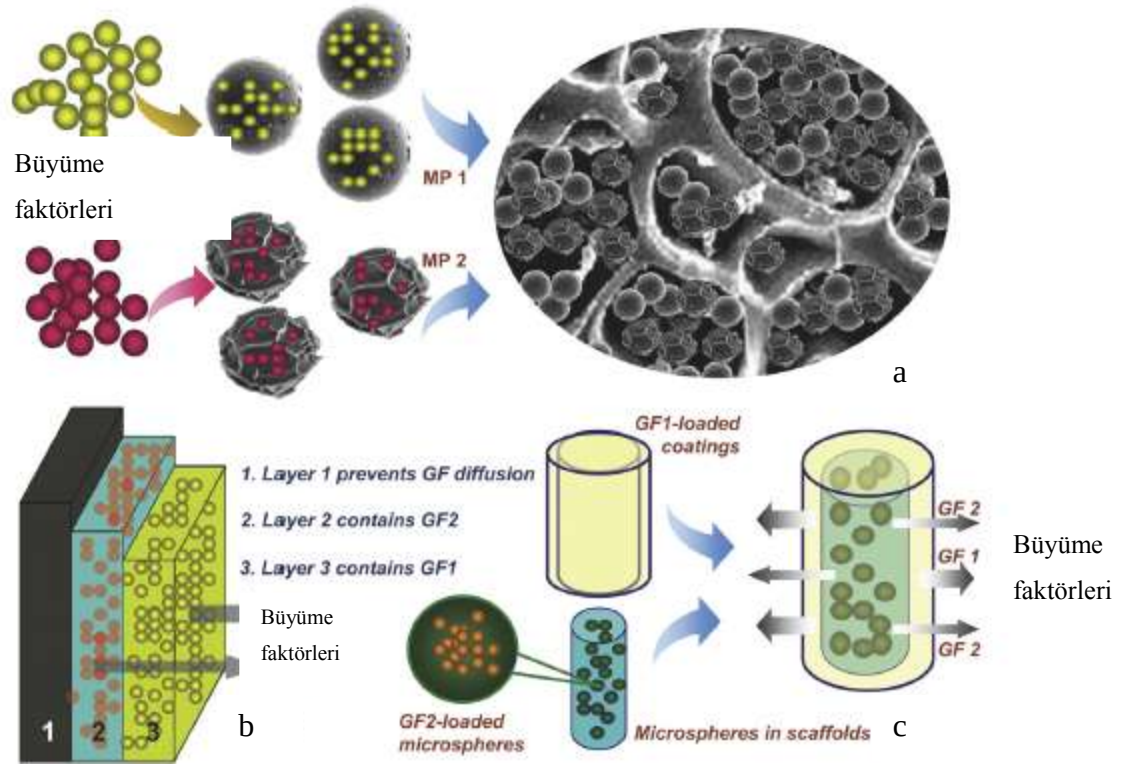
	Büyüme faktörünün yüklenme şekli	Büyüme faktörünün taşındığı yapı	Salım profili	Salım modeli
a	Direk olarak doku iskelesine yükleme (<i>Bolus</i> enjeksiyon)			Ani (<i>Burst</i>) Salım
b	Büyüme faktörlerinin düşük oranda çapraz bağlı partiküllere yüklenmesi			Kontrollü salım
c	Büyüme faktörlerinin yüksek oranda çapraz bağlı partiküllere yüklenmesi			Gecikmeli salım
d	Büyüme faktörlerinin partiküller varlığında doku iskelesine yüklenmesi			<i>Pulse</i> salım
e	Kovalent immobilizasyon (sıcaklık ve pH gibi etkilere duyarlı polimerler)			<i>Pulse</i> salım

Çizelge 2.3.a incelendiğinde büyüme faktörlerinin enkapsüle edilemesine ilişkin olarak bilinen en basit yöntemlerden birisi olan doğrudan yükleme yöntemi görülmektedir. Bu yöntemde büyüme faktörlerinin yer aldığı doku iskeleleri, emdirme ve difüzyon yöntemleri ile hazırlanabilmektedir (Chen vd. 2010). Ancak büyüme faktörlerinin taşınmasına ilişkin kullanılan bu sistem az miktarda proteinin taşınmasına olanak sağlaması ve ani salıma neden olması nedeniyle tercih edilmez. Ani salım, büyüme faktörlerinin protein yapıda olması ve yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle doku iyileşme sürecinde hedef dokuya ulaşmalarında bir takım sorunlara neden olmaktadır. Li vd. 2009 tarafından kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak yapılan çalışmada rekombinant human BMP-2 büyüme faktörü poliüretan doku iskelerine doğrudan yüklenmiş ve ani salımın meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır. Çizelge 2.3.b-c'de yer alan şekillerde büyüme faktörlerinin farklı oranlarda çapraz bağlanmış yapılara yüklendiği görülmektedir. Kontrollü salım sistemlerine ilişkin çalışmalarda polimerler çapraz bağlanarak büyüme faktörlerinin ani salımının önlendiği sistemlere rastlanmaktadır (Kim vd. 2012). Çapraz bağlanma oranı arttıkça çizelge 2.3.c'de görüldüğü gibi gecikmeli salım meydana gelmektedir. Partiküller ile doku iskelelerinin birlikte kullanıldığı çizelge 2.3.d'deki yapılar incelendiğinde partiküllerin farklı salım davranışlarına bağlı olarak önceden programlanmış şekilde *pulse* salım gözlenebilmektedir. Bu yapı farklı veya aynı salım davranışlarına sahip olan polimerik partiküllerin doku iskeleleri içerisine yüklendiği yapılar ile de hazırlanabilmektedir. Böylece sıralı ve eş anlı salım kinetiklerine sahip kompozit yapılar elde edilebilmektedir (Jacklenec vd. 2008, Patel vd. 2008). Çizelge 2.3.e'de yer alan sistemde pH ve sıcaklık gibi etkilere duyarlı akıllı polimerlerin varlığında fiziksel koşulların değişimine bağlı programlanmış olarak *pulse* salım meydana gelmektedir (Klouta ve Mikos 2008).

Doğal doku iyileşmesi süreçleri incelendiğinde birbirini takip eden üç fazdan oluştuğu görülmektedir. Bunlar 1) inflamatuvar faz, 2) üreme fazı, 3) maturasyon fazı olarak tanımlanabilir (Sinno ve Prakash 2013).

Büyüme faktörleri farklı hücre popülasyonları arasında iletişim sağlaması ve hücreyel aktiviteleri düzenlemesi gibi özellikleri açısından doku iyileşmesinde oldukça öneme sahip olan moleküllerdir. Doku iyileşmesi sürecinde büyüme faktörlerinin birlikte yer

aldığı karmaşık sinyal yol izleri söz konusudur. Farklı salım mekanizmalarına sahip polimerler kullanılarak hazırlanan taşıyıcı sistemler, birden fazla büyüme faktörünün enkapsülasyonun yanı sıra, doğal dokuların iyileşme sürecini taklit edecek sıralı salım sistemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlamaktadır (Chen vd. 2010). Bu kapsamda kullanılacak olan büyüme faktörlerinin sinerjik etki gösterebilmesi nedeniyle uygun kombinasyonları önem kazanmaktadır (Mehta vd. 2012). Literatürde yer alan çalışmalarda kemik doku mühendisliğine yönelik olarak BMP-2 /TGF- β 3, VEGF/BMP-4, BMP-2/BMP-7 ve BMP-2/IGF-1 kombinasyonlarının kullanıldığı görülmektedir (Simmons vd. 2004, Oest vd. 2007, Yilgor 2009, Strobel vd. 2011). Doku rejenerasyonuna ilişkin olarak uygun büyüme faktörleri kombinasyonlarının belirlenemediği durumlarda inhibisyon etkisinin ortaya çıktığı görülmektedir (Vonau vd. 2001). Çoklu büyüme faktörlerinin salımına ilişkin olarak partikül temelli salım mekanizmalarına ait değişik konfigürasyonlarda yapıların oluşturulması mümkün olmaktadır (Şekil 2.22).



Şekil 2.22 Büyüme faktörlerinin salımına yönelik kullanılan yapılar (Chen vd. 2010)

Şekil 2.22.a incelediğinde iki farklı büyüme faktörü partiküle yüklendikten sonra doku iskelesi içerisine yüklenmektedir. Elde edilen bu yapı farklı veya aynı salım meknizmasına sahip olan partiküllerin doku iskelelerine yüklenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yapı ile doğal doku iyileşme sürecinde önemli olan farklı salım hızlarına sahip olan partiküller varlığında sıralı salım sağlanabilmektedir. Şekil 2.22.b’de gösterilen formda ise partiküllere yüklü olan büyüme faktörleri tabakalar halinde farklı yapılara yüklenerek salımı gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla 3 nolu olan en dıştaki tabakadan büyüme faktörü ilk olarak salınırken aynı zamanda 1 nolu ve 2 nolu tabakadan salımı da engelleyecektir. Şekil 2.22.c ise çekirdek-kabuk olarak tanımlanan ve sıralı salım çalışmalarına yönelik olarak kullanılan yapılardan birisidir. Temelde kompozit bir yapı olmakla birlikte kabuk kısmı ilk salınması hedeflenen büyüme faktörü ile kaplı iken iç kısımda partikül formuna yüklenmiş büyüme faktörleri yer almaktadır.

Tez çalışması kapsamında kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak gerçek doku oluşumunu taklit eder nitelikte salım hızları birbirinden farklı olan partikül temelli sistemlerden trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) ve kemik morfojenik proteini (BMP-6) salımı üzerine çalışmalar yapılmıştır. Kontrollü salımın gerçekleştirilmesi amacıyla büyüme faktörlerinin yüklendiği poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) ve jelatin partiküllere ilişkin bilgiler Bölüm 2.4’de sunulmuştur.

2.4 Büyüme Faktörlerinin Yüklenmesinde Kullanılan Partiküller

Büyüme faktörlerinin kontrollü salımının sağlanması amacıyla sentetik ya da doğal polimerlerden partiküller elde edilebilmektedir. Sentetik polimerler kapsamında poli (α -hidroski asitler), poli (orto esterler), poli (anhidritler), dekstrin, poliglikolik asit (PGA) ve poli laktik asit (PLA)’nın kopolimerleri kullanılabilir. Büyüme faktörlerinin enkapsüle edildiği sentetik malzemeler ile büyüme faktörlerinin çevre dokuya kolaylıkla salımı ve hücrel aktiviteleri düzenlendiği bilinmektedir.

Partikül temelli sistemlerden bir diğeri olan lipozom temelli partiküller büyüme faktörlerinin enkapsüle edildiği yapılar arasında yer almaktadır. Liposom temelli

sistemlerin üretim aşamasında organik çözücü kullanımının kısıtlanması nedeniyle biyoyoumluluğu artmaktadır (Lee vd. 2011).

Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan partikül sistemleri kapsamında yer alan diğer bir yapı doğal polimerlerdir. Doğal polimerlerin sentetik polimerlerden farklı olarak suda çözünbilmesi ve ılımlı koşullarda elde edilebilmesi gibi özellikler nedeniyle taşıma sırasında büyüme faktörlerinin biyoaktivitelerini çok etkilemediği bilinmektedir (Lee vd. 2011). Diğer taraftan doğal polimerlerin degradasyonu sonucunda zararlı ürünlerin ortaya çıkmaması sentetik polimerlere göre üstün taraflar arasında sayılmaktadır. Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan çeşitli partikül sistemleri çizelge 2.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4 Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan partikül sistemleri

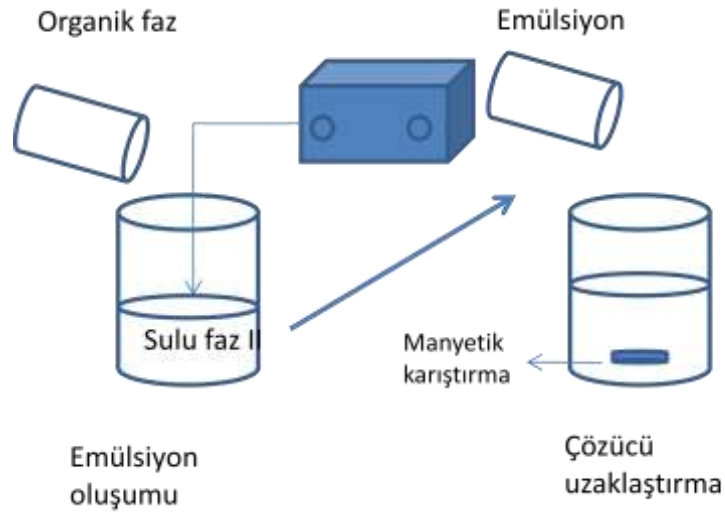
Partikül Sistemleri	Özellikleri
Kitosan mikroküre (Kim vd. 2003)	TGF- β ’nin kontrollü salımının sağlanmasına yönelik olan mikroküre-doku sikelesi sistemi
Jelatin mikroküre ve polietilen glikol doku iskelesi (Holland vd. 2003)	TGF- β 1 ‘in kontrollü salımının incelenmesi amacıyla farklı çapraz bağlanma oranlarında jealtin partiküller
PLGA mikroküre ve PLA doku iskelesi (Jacklenec vd. 2008)	Farklı degradasyon ve çapraz bağlanma oranlarına sahip PLGA ve jelatin partiküller ile IGF-I ve TGF- β ’nin birlikte ve sıralı salımını sağlayan yapı
Jelatin mikroküre (Patel vd. 2008)	VEGF ve BMP-2’nin birlikte salımını sağlayan yapı
PLGA mikroküre ve jealtin mikroküre (Patel vd. 2008)	Farklı çapraz bağlanma oranlarına sahip jelatin ve farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA’dan hazırlanan PLGA mikropartikülleriden BMP*2 salımı
PLGA ve PHBV nanoküre (Yilgor vd. 2009)	BMP-2 ve BMP-7’nin sıralı salımını sağlayan degradasyon hızları birbirinden farklı olan PLGA ve PHBV partikül sistemleri
Jelatin mikroküre ve kitosan jel sistemi (Kim vd. 2012)	Farklı çapraz bağlanma oranlarına sahip olan jelatin partikül varlığında BMP-2 ve IGF-I’in sıralı salımı

Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan doğal ve sentetik polimerlerden partikül üretim yöntemlerine ilişkin bilgiler Bölüm 2.4.1’de sunulmuştur.

2.4.1 Büyüme faktörlerinin yüklenmesinde kullanılan partiküllerin üretim yöntemleri

Polimerik partiküllerin üretim yöntemleri *bottom-up* ve *top-down* olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Astete ve Sabliov 2006). *Bottom up* tekniği monomerden başlamakla birlikte emülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonu, ara yüzey polimerizasyonu gibi yöntemlerle sentez gerçekleştirilmektedir. *Top-down* tekniği önceden hazırlanmış polimerler ile yürütülmekte ve yaygın olarak emülsiyon difüzyonu, porojen (tuz) uzaklaştırma, ikili emülsiyon, nanoçöktürme yöntemleri ile partikül üretimini kapsamaktadır. Ayrıca bu yöntemlerden farklı olarak doğal polimerlerden elde edilen partiküllerin üretimine ilişkin olarak su-yağ emülsiyonu yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur.

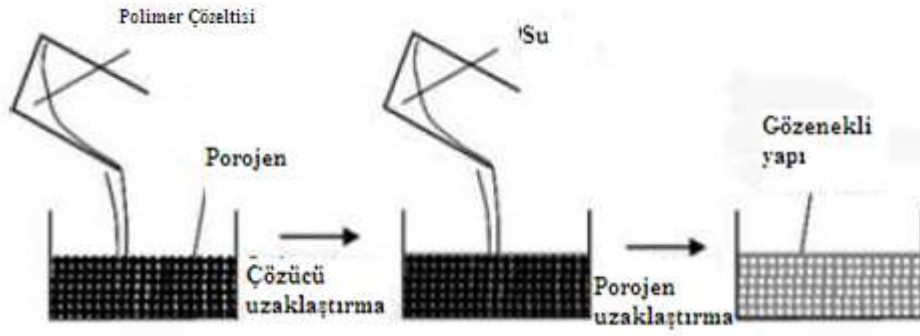
Emülsiyon difüzyonu yönteminde polimer bir su ile kısmi olarak karışabilen organik faz (benzil alkol, propilen karbonat, kloroform, diklorometan) içerisinde çözünmekte ve ardından uygun bir yüzey aktif madde içeren (anyonik sodyum dedosil sülfat, polivinil alkol, didodesil dimetil amonyum bromür) sulu faz ile emülsifiye edilmektedir (Şekil 2.23). Bu yöntemde emülsiyon partiküllerinin arasından organik çözücünün ve suyun karşılıklı difüzyonu ile partikül oluşumu sağlanmaktadır (Astete ve Sabliov 2006).



Şekil 2.23 Emülsiyon difüzyonu yöntemi

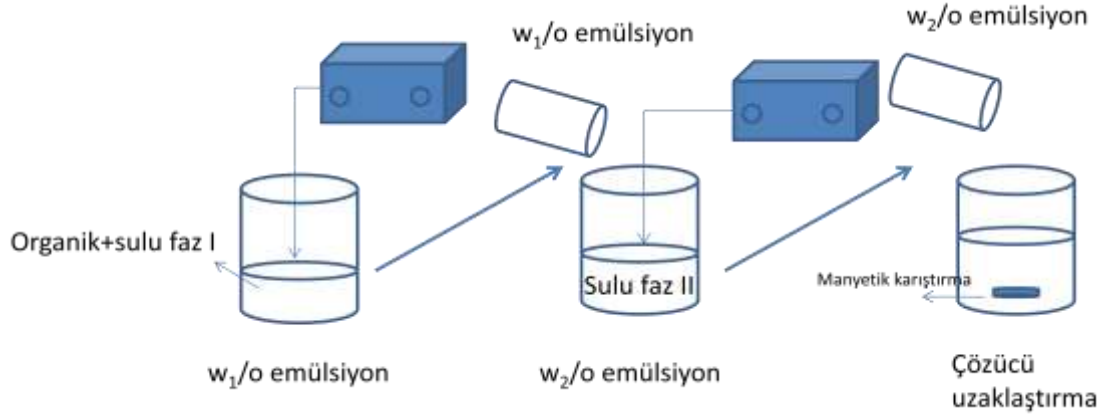
Bu yöntemde partikül oluşumunu etkileyen parametreler arasında polimer derişimi, çözücü türü, polimerin molekül ağırlığı, organik fazın viskozitesi karıştırma hızı yer almaktadır. Temelde organik fazın viskoz kuvvetlerinin yenilmesine bağlı olarak partikül oluşumu gerçekleştiğinden yüzey aktif maddeyi içeren sulu faz ile polimeri içeren organik fazın emülsifiye edilmesinde kullanılan homojenizatörün de gücü ve homojenizasyon süresi önemli olmaktadır.

Porojen (Tuz) uzaklaştırma yönteminde polimer aseton, tetrahidrofuran (THF) gibi su ile karışabilen organik çözücülerde çözölmektedir. Organik faz yüksek yüzey gerilimi oluşturularak sulu faz ile emülsifiye edilmektedir. Sulu faz yüzey aktif madde içermekle birlikte organik fazda çözünmeyen tuz gibi porojen yapıları da içermektedir (Şekil 2.24). Emülsiyon difüzyonundan farklı olarak porojenlerin olması nedeniyle çözücü difüzyonu meydana gelmemektedir. Bunun yerine oluşturulan polimer ve yüzey aktif madde emülsiyonuna hızla saf su eklenmekte ve hafif karıştırma altında organik fazın sulu faza geçmesiyle iyonik dirençler kırılarak partikül oluşumu sağlanmaktadır. Bu yöntemde de emülsiyon difüzyonuna benzer şekilde partikül oluşumunda polimer derişimi, molekül ağırlığı, homojenizatör hızı ve süresi ile yüzey aktif madde ve çözücünün türü önemli olmaktadır.



Şekil 2.24 Porojen (Tuz) uzaklaştırma yöntemi

İkili emülsiyon yöntemi kontrollü salım ve ilaç salım sistemlerine yönelik uygulamalarda partikül sentezi için kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir (Şekil 2.25)

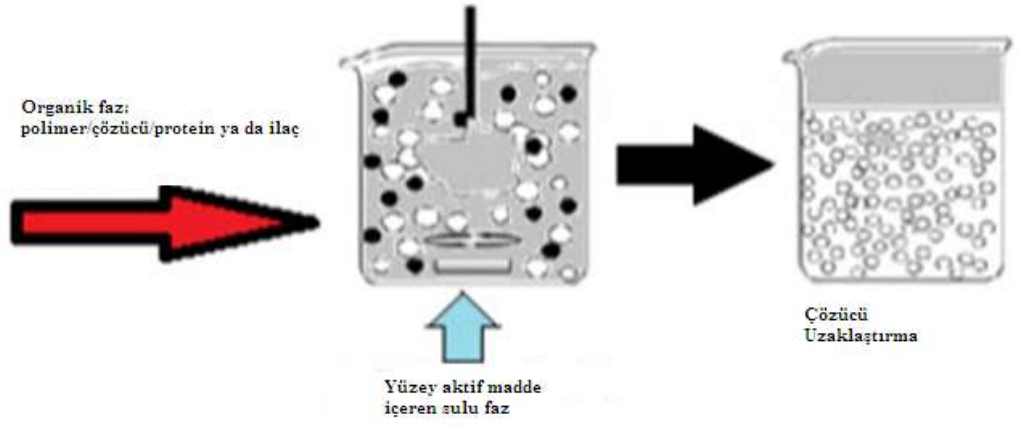


Şekil 2.25 İkili emülsiyon yöntemi

Emülsiyon difüzyonu yöntemine çok benzemekle birlikte ikili emülsiyon yönteminde ilaç ya da büyüme faktörünü içeren birinci sulu faz polimer içeren organik faz içerisinde dağıtılarak birinci emülsiyon elde edilmektedir. Elde edilen birinci emülsiyon yüzey aktif maddenin yer aldığı ikinci sulu faz içerisine alınmasının ardından oluşan yüzey gerilimlerinin yenilmesi amacıyla homojenizasyona tabi tutulmaktadır. Elde edilen ikili emülsiyondan organik fazın uzaklaştırılması amacıyla ikili emülsiyon belli oranda yüzey aktif madde içeren seyreltme fazına aktarılmakta ve karıştırılarak organik fazın difüzyonu sağlanmaktadır. Yöntemde çoğunlukla kloroform, diklorometan ve bu çözücülere göre daha az toksik olduğu bilinen etil asetat kullanılmaktadır (Rao ve Geckeler 2011).

İkili emülsiyon yönteminde polimer derişimi, çözücü ve yüzey aktif madde türü ve homojenizasyon parametreleri partikül oluşumunda önemlidir (Astete ve Sabliov 2006).

Nanoçöktürme yöntemi çoğunlukla hidrofofik yapıların enkapsülasyonunda kullanılmakla birlikte gerekli modifikasyonlar yapılarak hidrofilik bileşenlerin de enkapsülasyonu gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.26).

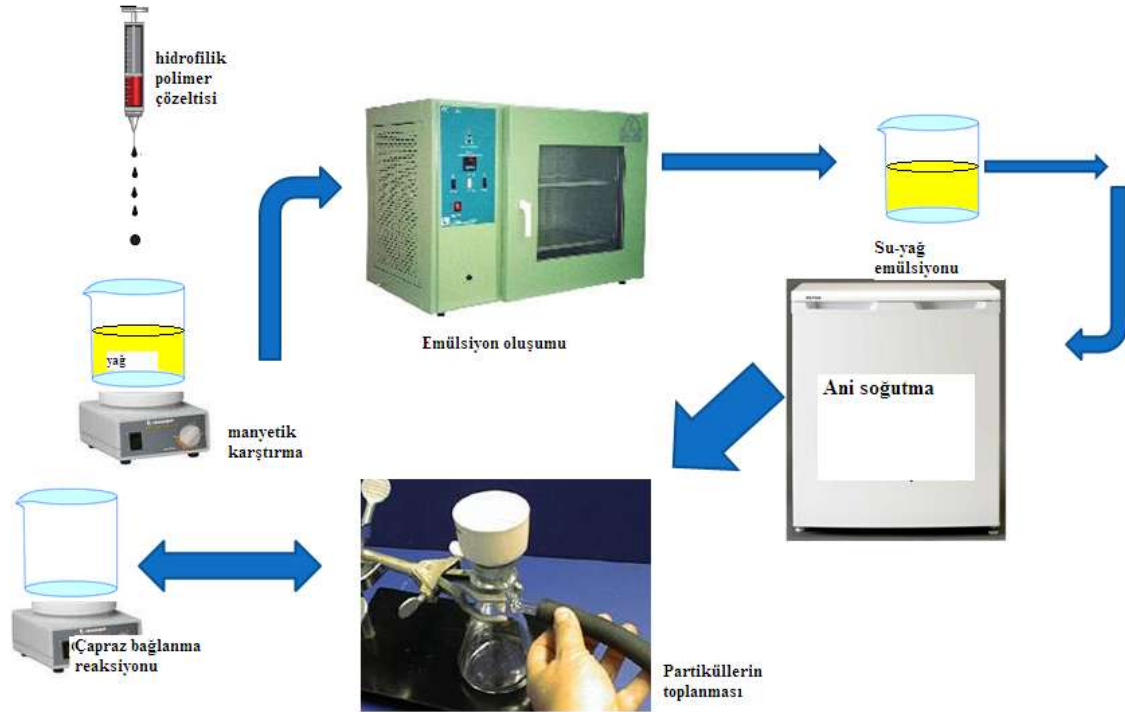


Şekil 2.26 Nanoçöktürme yöntemi

Bu yöntemde polimer ve protein yapı ya da ilaç polar yapıda su ile karışabilen aseton, asetonitril etanol ve metanol gibi çözücülerde çözülmekte ve ardından yüzey aktif madde içeren sulu faza kontrollü bir şekilde damlatılmaktadır. Partiküller diğer yöntemlere benzer şekilde organik çözücünün difüzyonu sonucunda oluşmaktadır. Organik çözücü çoğunlukla vakum altında uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntemde polimer/yüzey aktif oranı, polimer derişimi, yüzey aktif madde türü ve çözücü türü partikül oluşumunu etkileyen parametreler arasındadır (Astete ve Sabliov 2006).

Su-yağ emülsiyonu yönteminde sulu fazda çözünebilen hidrofilik yapıdaki polimer partiküllerin hazırlanmasına yönelik çalışmalarda polimer yağ gibi bir ortamda kontrollü bir şekilde damlatılarak emülsifiye edilir. Ardından polimer çözeltisinin jelleşme sıcaklığının altına ani olarak soğutulmasıyla polimerik partiküllerin oluşumu sağlanır. Partiküller vakum altında süzildükten sonra çapraz bağlanma reaksiyonu uygun çapraz bağlayıcılar varlığında gerçekleştirilir (Şekil 2.27). Su-yağ emülsiyonunda yağın

sıcaklığı, karıştırma hızı partikül oluşumunda etkili parametreler arasında tanımlanmaktadır.

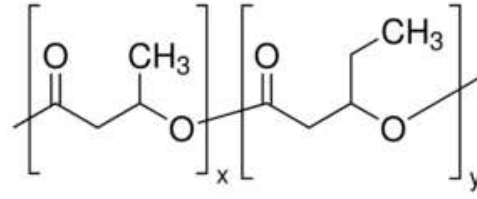


Şekil 2.27 Su-yağ emülsiyonu

Tez çalışması kapsamında doğal polimer olan poli(3-hidroksi bütirat-3-hidroksi valerat) (PHBV) ve jelatin partiküller kullanılmış ve Bölüm 2.4.2’de PHBV ve Bölüm 2.4.3’de jelatine ilişkin bilgiler verilmiştir.

2.4.2 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV)

PHBV, polihidroksibütirat (PHB) ve polihidroksivalerat (PHV) biyobozunur poliestерlerden polihidroksialkanatların (PHA) alifatik alt grubunda yer almaktadırlar (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 PHBV'nin kimyasal yapısı

PHB ve PHV doğal polimerlerdir. PHA'lar şeker bazlı besi ortamlarında mikrobiyal faaliyetle elde edilirler. *Alcaligenes entrophus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas oleovorans* ve genetik modifiye edilmiş bakteriler fermentasyon ortamında uygun koşullar sağlandığında PHB ile PHV'nin kopolimerini sentezleyip hücre içinde biriktirmektedir. Bakterilerde insandaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi depo görevini görmektedir. Reserv karbon kaynağı olarak depolanan bu polimerlerin hücre içi derişimleri özellikle genetik olarak modifiye edilmiş olanlarda % 90'ların üzerine çıkmaktadır.

Polimerler termoplastik özellikte olmakta birlikte PHB yüksek kristaliniteye sahiptir. PHV ise PHB'ye göre yarı kristallik gösterir ve bu nedenle biyomedikal uygulamalarda kopolimerleri şeklinde kullanılır.

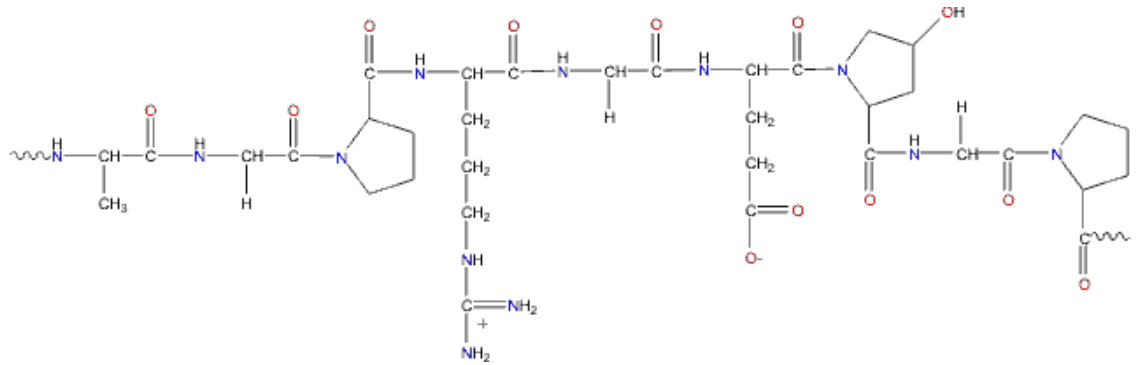
PHB ve PHV bakteriler tarafından üretilen depolimeraz enzimleri sayesinde doğal olarak parçalanır ve bozunma süreleri 20 gün olarak belirlenmiştir. Bu durum yaklaşık 100 günde bozunabilen sentetik polimerlere göre üstün tarafları arasında sayılmaktadır (Gümüşderelioğlu 2011).

Literatürde yer alan yayınlar incelendiğinde ilaç ve büyüme faktörlerinin partikül sistemlerine yüklenmesi çoğunlukla ikili emülsiyon tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Diğer taraftan protein ya da ilaç yükleme çalışmaları dışında yer alan partikül sistemlerinin hazırlanmasına ilişkin olarak emülsiyon difüzyonu yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında PHBV partiküllerin üretim koşullarının belirlenmesine ilişkin yapılan çalışmalar Bölüm 2.4.1'de açıklanan şekilde **emülsiyon difüzyonu yöntemi** ile yürütülmüştür. Hücre farklılaşması üzerinde etkili olduğu bilinen

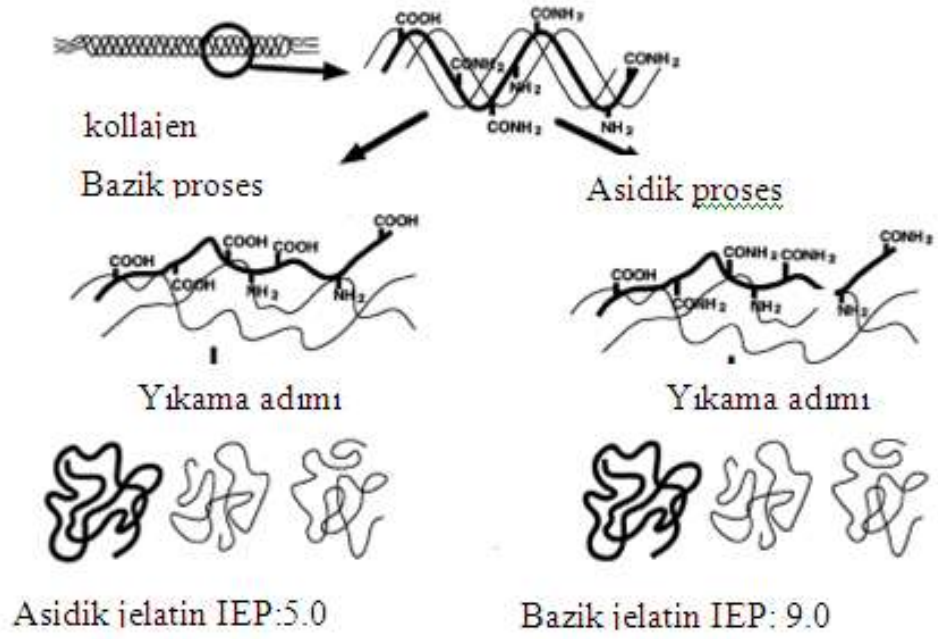
BMP-6 PHBV partiküllere Bölüm 2.4.1’de açıklanan şekilde **ikili emülsiyon yöntemi** ile yüklenmiştir. Yılgor vd. 2009 tarafından yapılan çalışmada BMP-7 ve BMP-2’nin yüklendiği PLGA ve PHBV partiküller ikili emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Huan vd. 2010 tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise PHBV partiküller emülsiyon difüzyonu yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Benzer olarak Bhardwaj vd. 2009 tarafından yapılan çalışmada PLGA nanopartikülleri emülsiyon difüzyonu yöntemi ile hazırlanmıştır.

2.4.3 Jelatin

Jelatin biyoyumlu ve biyobozunur yapıda bir malzeme olmakla birlikte vücutta toksik etki göstermemesi nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında sıkça kullanılan bir hayvansal kaynaklı bir doğal polimerdir (Şekil 2.28). Jelatin genel olarak sığır ya da domuz derisi tendonlarından elde edilen kollajenin asidik ya da bazik koşullarda hidrolizi ile elde edilmektedir (Şekil 2.29).



Şekil 2.29 Jelatinin kimyasal yapısı



Şekil 2.30 Kollajenin hidrolizi ile asidik ve bazik jelatin eldesi (Tabata ve Ikada 1998)

Şekil 2.30'da bazik proseste kollajenin amit gruplarının hidrolizi sonucunda yüksek yoğunlukta karboksil grubuna sahip negatif yüklü gelatin elde edilmektedir. Bu durum jelatinin izoelektrik noktasını (IEP: 5.0) düşürmektedir. Asidik proseste ise kollajenin elektrostatik doğasından kaynaklı olarak modifiye etmenin zorluğundan dolayı kollajene ait amit grupları yeterli oranda hidroliz olamamakta ve sonuç olarak kollajene yakın değerlerde izoelektrik noktasına (IEP: 9.0) sahip bazik jelatin elde edilmektedir (Tabata ve Ikada 1998).

Jelatinin farklı izoelektrik noktalarına bağlı olarak tanımlanan asidik ve bazik olma durumları kontrollü salım sistemlerinde önemlidir. Salım çalışmalarında asidik bir proteinin olması durumunda taşıyıcı malzeme olarak bazik jelatin seçilmektedir ve böylelikle sürekli salım sağlanabilmektedir. Bu durum pozitif ve negatif yüklü jelatin ve proteinin poli-iyon oluşturmak üzere iyonik etkileşim kurmasına dayanmaktadır (Tabata ve Ikada 1998).

Bunun yanı sıra jelatin doku mühendisliği uygulamalarında genel olarak hidrojel (Ratanavaraporn vd. 2011) ve partikül formlarında (Patel vd. 2008) hazırlanarak

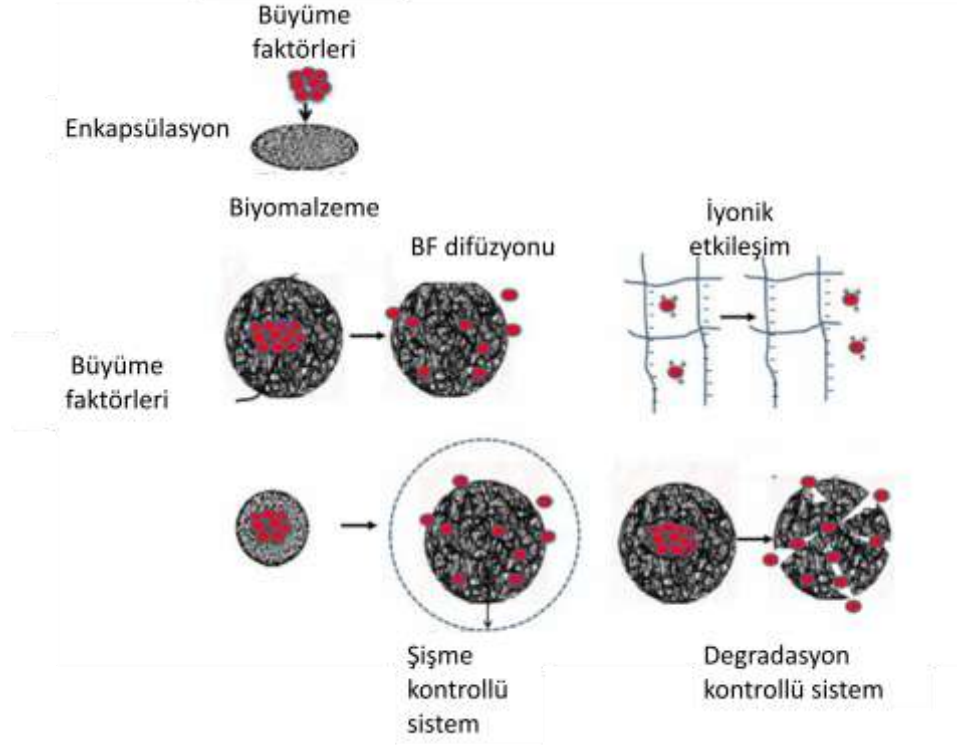
kullanılmaktadır. Ancak sulu ortamlarda çözünemediğinden dolayı uzun süreli biyomedikal uygulamalarda çapraz bağlanması gerekmektedir. Çapraz bağlanma sonucunda yapının mekanik dayanımı arttırılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında PDGF-BB jelatin partiküllere yüklenmiştir. Literatürde jelatin partiküllerin hazırlanmasına yönelik çalışmalarda yağ gibi bir ortamda emülsifiye edilmiş jelatin çözeltisinin jelleşme sıcaklığının altına ani olarak soğutulmasıyla jelatin partiküllerin oluşumu sağlanmıştır (Holland vd. 2003, Reis vd. 2006). Kollajenin hidrolizi sonucu elde edilen jelatinin sulu çözeltisi 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda üçlü helezonun ve sert üç boyutlu ağ yapının oluşumuna bağlı olarak katılaşmaktadır. Sıcaklık 30°C'nin üstüne çıktığında ise yapının konformasyonu helezondan daha esnek bir yaya dönüşmekte ve böylece jel tekrar sıvı hale geçmektedir Bu nedenle jelatin partiküllerin oluşturulmasında jelatinin 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda çözeltilerinin hazırlandığı görülmektedir (Holland vd. 2003, Kim vd. 2012). Sıcaklığın etkisi ile jel haline gelen çözelti emülsiyon oluşturulmak üzere kontrollü bir şekilde çoğunlukla yağın kullanıldığı emülsiyon ortamı içine damlatılmakta ve hızla soğutma ile jelatin parçacıklarının oluşumu sağlanmaktadır. Elde edilen partiküller vakum altında filtre edildikten sonra formaldehit, glutaraldehit ve glioksal gibi çapraz bağlayıcı varlığında çapraz bağlanmaktadır (Holland vd. 2003, Reis vd. 2006).

2.5 Büyüme Faktörlerinin Kontrollü Salımının Matematiksel Analizi

Büyüme faktörlerinin kontrollü salımında elde edilen yapıların difüzyon faktörü, iyonik yük etkileşimi, degradasyon/erozyon ve polimerin şişme davranışı gibi parametreler önem kazanmaktadır (Şekil 2.31). Kontrollü salım sistemlerine ilişkin olarak genellikle şişme ve degradasyon kontrollü sistemler ile poli-iyonik kompleksin kurulduğu sistemler tercih edilmektedir. Hidrofilik yapıda olan aljinat, jelatin gibi yapılarda salım mekanizması şişme kontrollü olarak tanımlanır. Diğer taraftan asidik ya da bazik karakterde olan jelatin de asidik ve bazik karakterde olan büyüme faktörleri ile poli-iyon kompleksleri kurularak kontrollü salım sağlanmaktadır (Tabata ve Ikada 1998). Degradasyon kontrollü sistemler için hidrolitik, enzimatik, termal ve fotokimyasal olarak

degradasyon türleri tanımlanabilmektedir. Sıklıkla karşılaşılan degradasyon mekanizmaları hidrolitik ve enzimatik olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.31 Büyüme faktörlerinin salım mekanizması (Mehta vd. 2012)

Bu kapsamda salınan büyüme faktörlerinin miktarlarının belirlenmesinde ve salım kinetiğinin analizinde çeşitli matematiksel modeller önerilmiştir. Bu modellerden en yaygın olanları difüzyon temelli olarak bilinen yarı ampirik ve ampirik modeller ile mekanistik modelleri kapsamaktadır. Büyüme faktörlerinin salımı için sıklıkla kullanılan modeller çizelge 2.5’de sunulmuştur.

Çizelge 2.5 Büyüme faktörlerinin salım kinetiğinde kullanılan matematiksel modeller

Model ismi	Modelin denklemi
Higuchi modeli	$\frac{Mt}{M_{\alpha}} = kt^{1/2}$ $100-m = kt^{1/2}$
Korsmeyer Peppas modeli	$\frac{Mt}{M_{\alpha}} = kt^n$ $100-m = kt^n$
Sıfırıncı mertebe salım modeli	$M_t = M_0 + kt$
Birinci mertebe salım modeli	$\ln M_t = \ln M_0 + kt$
Hixon-Crowell modeli	$3 \overline{100} - 3 \overline{m} = kt$

Salım kinetiğinin matematiksel analizi kapsamında diğer bir kütle aktarım mekanizması olarak bilinen şişme kontrollü sistemler, erozyon kontrollü sistemler ve afinite temelli modeller için ampirik ve yarı ampirik modeller ile mekanistik modeller önerilmiştir (Lauzon vd. 2012). Kontrollü salım sistemlerinde yer alan difüzyon kontrollü salım sistemlerinde sıklıkla Higuchi modeli kullanılmaktadır. Difüzyon kontrollü sistemlerde salım hızı büyüme faktörünün suda çözünmeyen bir polimerden difüzyonu ile kontrol edilmektedir. Diğer taraftan Higuchi modelinde difüzyon katsayının sabit kaldığı, büyüme faktörü moleküllerinin ortalama çapının difüzyon mesafesinden küçük olduğu ve salım boyunca denge koşullarının kararlı olduğu varsayımları yapılmaktadır.

Çizelge 2.5'de yer alan Higuchi modeline ait denklem incelendiğinde salınan büyüme faktörü miktarının zamanın karekökü ile orantılı olduğu görülmektedir. Ampirik formda tanımlanan Higuchi modelinin genelleştirilmiş hali Korsmeyer Peppas tarafından önerilen modeldir. Korsmeyer Peppas modelinde yer alan n ve k sabitleri salım sisteminin geometrik ve yapısal karakteristikleri hakkında bilgi vermektedir. İlaç ve büyüme faktörü

gibi protein yapıda olan moleküllerin salımına ilişkin olarak Higuchi modelinden farklı sıfırıncı mertebe, birinci mertebe, Hixon-Crowell modelleri de önerilmiştir. Genel olarak salım mekanizmasını belirlemek için, sıfır ve birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixon-Crowell eşitliklerine uyum iyiliği (*goodness of fit*) testi yapılmaktadır (Gürsoy 2002). Ancak partikülden salımda, salım üzerine etki eden matriks içindeki protein miktarının başlangıç derişimi, proteinin çözünürlüğü, gözeneklilik, kıvrım oranı (tortosite), çözücünün bileşimi ve matriksi oluşturan polimerin yapısı gibi pek çok parametre olduğundan *in vivo* çalışmalarda sıfırıncı mertebe salım kinetiğinin genellikle elde edilemediği gözlenmektedir (Gürsoy 2002). Sıfırıncı mertebeden meydana gelen bu sapma difüzyon mesafesinin değişimi ile açıklanmaktadır. Bu nedenle difüzyon bir başka deyişle Fick yasasına uyumlu olarak salım (*Fickian difüzyon*) Higuchi modeli ile açıklanmaktadır.

Hidrofilik yapıdaki polimerlerde görülen ve diğer bir kütle aktarım mekanizması olarak tanımlanan şişme kontrollü sistemlerde Fick yasasından farklı olarak proteinin polimer fazdan difüzlenemediği görülmektedir. Bu sistemlerde çözücünün polimer matriksine girmesiyle polimer şişmekte ve camsı geçiş sıcaklığının deney sıcaklığının altına düşmesi ile şişen polimerin içinde yer alan proteinin difüzyonu gerçekleşmektedir. Diğer bir deyişle camsı bir polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde salım meydana gelmektedir. Bu tür salım davranışlarına kitosan, jelatin, aljinat gibi yapılarda rastlanmaktadır (Lauzon vd. 2012). Bu tür yapılardan salım davranışları Çizelge 2.5’de yer alan Korsmeyer-Peppas denklemi ile incelenebilmektedir. Denklemden yer alan k ve n değerlerine bağlı olarak salım türü belirlenmektedir. $n=0.5$ olduğunda Fickian Difüzyon $0.5 < n < 1$ iken *Non-Fickian* $n=1$ iken zamandan bağımsız (0. derece) salım olan “*Case II*” ve $n > 1$ iken “*Super Case II*” salım davranışı gözlenmektedir. Şişme kontrollü sistemlerde genellikle $n > 1$ olan Super Case II salım davranışı söz konusu olmaktadır (Soran 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan deneysel çalışmalar ile ilgili bilgiler sunulmuştur. İlk bölümde jelatin ve poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) partiküllerin üretimi, karakterizasyonu ve partiküllerden model protein sığır serum albumin (BSA) kullanılarak gerçekleştirilen salım çalışmalarına değinilmiştir. Sonraki bölümde kitosan doku iskelelerinin üretimi açıklanmıştır. Üçüncü bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan kemik morfojenik proteini (BMP-6) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) moleküllerinin sırasıyla PHBV ve jelatin partiküllere yüklenmesi, ardından PDGF-BB ve BMP-6 yüklü partikülleri içeren kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu çalışmalarına yer verilmiştir. Buna ek olarak, büyüme faktörlerinin kitosan doku iskelelerinden salım çalışmalarına değinilmiştir. Son bölümde ise PDGF-BB ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreleri ile yürütülmüş olan hücre kültür çalışmaları ile ilgili deneysel yöntemler açıklanmıştır.

3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında BMP-6 yüklü partiküllerin sentezinde kullanılan poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV, % 12 hidroksivalerik asit), organik çözücü diklorometan (DCM), mutlak etanol, yüzey aktif madde olarak kullanılan polivinil alkol (PVA, M_w : 10000-23000 g/mol % 98 hidrolize) ve didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB, M_w : 462.63 g/mol), fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) hazırlanmasında kullanılan tabletler ve TRIS-HCL Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. PHBV partiküllerin üretim koşullarının belirlendiği çalışmalarda kullanılan kloroform Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

PDGF-BB yüklü partiküllerin sentezinde kullanılan jelatin (type B; pI = 4.7–5.2), aseton, zeytin yağı (*olive oil*) ve jelatin partiküllerin çapraz bağlanmasında kullanılan glioksal (% 40, w/w) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

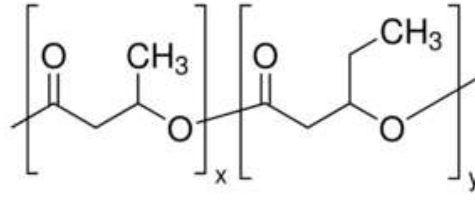
PHBV ve jelatin partiküllerden protein salımının incelendiği çalışmalarda model protein olarak kullanılan sığır serum albumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA, M_w : 66 kDa) ve BSA tayininde kullanılan Brilliant Blue G 250 Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Kitosan doku iskelelerinin üretiminde kullanılan kitosan (deasetilasyon derecesi (DD) >% 85) ve asetik asit (% 100) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kitosan doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen yoğunluk tayini deneylerinde kullanılan n-hekzan Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

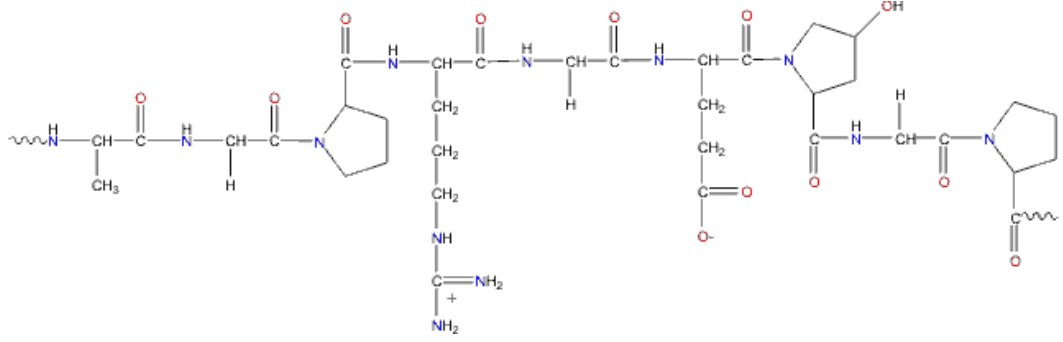
Büyüme faktörlerini içeren kitosan doku iskelelerinin üretiminde kullanılan kemik morfojenik proteini (BMP-6, cat no: CKH) Cell Science (ABD) firmasından trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB, cat no: ELH-PDGFBB-001) Ray Biotech (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM+L glutamin), fetal sığır serum (FBS), tripsin-EDTA (0.01 % tripsin/10 mM EDTA), penisilin streptomisin, β -gliserol fosfat, ve askorbik asit Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücrelerin metabolik aktivitelerinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin SEM ile morfolojik analizi için örnek hazırlamada kullanılan hekzametildisilazan (HMDS) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, hücre fiksasyon işleminde kullanılan glutaraldehit (% 25, v/v) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. RNA izolasyonunda kullanılan Trizol ise Invitrogen (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

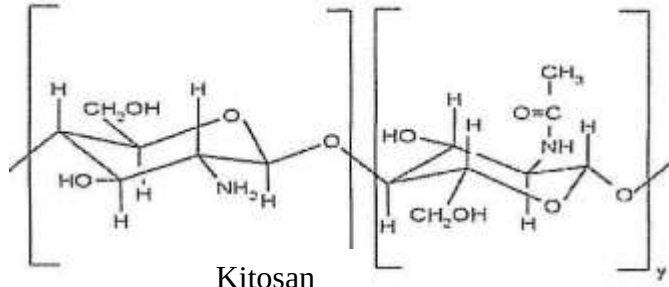
Tez çalışması kapsamında büyüme faktörlerini içeren partiküllerin hazırlanmasında kullanılan jelatin ve PHBV'nin kimyasal yapıları ile doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan kitosanın kimyasal yapısı şekil 3.1'de verilmiştir.



PHBV



Jelatin

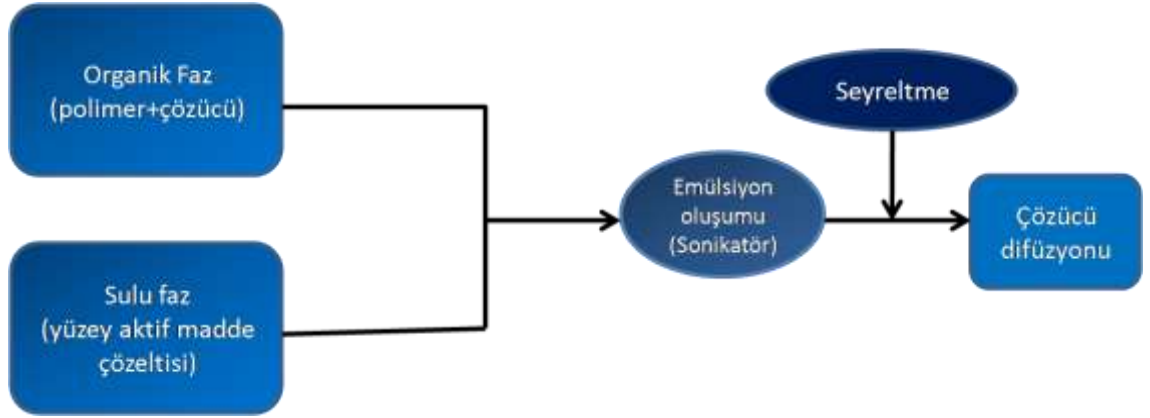


Kitosan

Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan PHBV, jelatin ve kitosanın kimyasal yapıları

3.2 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) Partiküllerin Sentezi

Tez çalışması kapsamında BMP-6 büyüme faktörlerinin kontrollü salımının sağlanabilmesi amacıyla kullanılan PHBV partiküllerin en uygun üretim koşullarının belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. PHBV partiküllerin üretimi emülsiyon difüzyonu yöntemi (Dinarvand vd. 2011, Palomoor vd. 2014) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Emülsiyon difüzyonu yöntemi

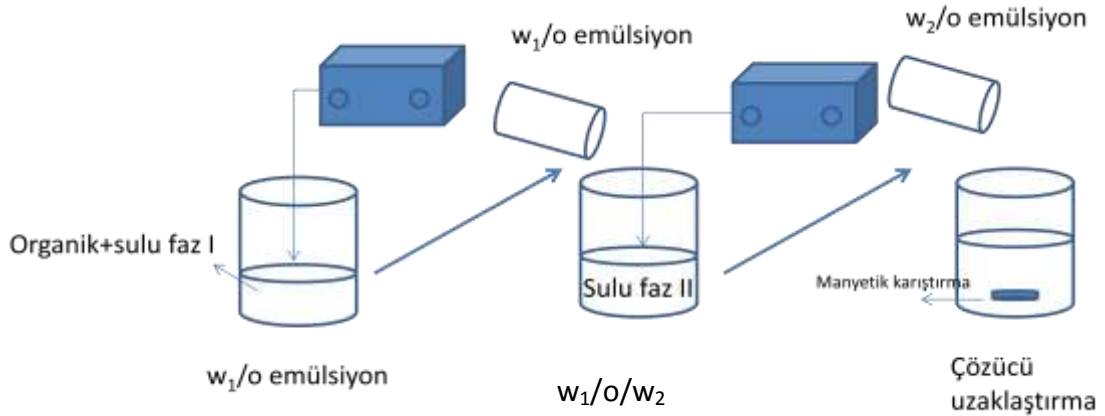
PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi olduğu bilinen ve proses parametreleri olarak tanımlanan polimer derişimi, yüzey aktif madde derişimi ve türü, çözücü türü ve kombinasyonları ile homojenizasyon gücü ve süresinin etkileri incelenmiştir. İncelenen parametreler çizelge 3.1’de sunulmuştur. Emülsiyon difüzyonu yönteminde belirlenen derişimlerde hazırlanan PHBV çözeltisi (organik faz), farklı derişimlerde yüzey aktif madde içeren sulu faza eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sonunda organik çözücünün uzaklaştırılması amacıyla, elde edilen emülsiyon seyreltilerek +4°C’de 12 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Organik çözücünün uzaklaştırılmasının ardından elde edilen çözelti 10,000 rpm hızda 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Ardından yüzey aktif maddenin uzaklaştırılması amacıyla iki kez 10 mM TRIS-HCl (pH:7.40) tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Santrifüj ile toplanan partiküller -20°C’de 24 saat süreyle dondurulduktan sonra -80°C’de liyofilizatörde (Christ, Germany) 24 saat süreyle kurutulmuştur.

Çizelge 3.1 PHBV partiküllerin üretimi için incelenen parametreler

Polimer derişimi (w/v)	Organik çözücü türü	Yüzey Aktif Madde Türü	Yüzey Aktif Madde Derişimi (w/v)	Seyreltme fazı yüzey aktif madde derişimi (w/v)	Sonikasyon süresi (dakika)	Sonikasyon Gücü (rpm)
% 1-% 2-% 4	DCM	PVA	% 2 ,4, 10	% 0.3	7,10,15	10,000-15,000-17,500
% 2	Kloroform	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	DCM:EtOH (30:70)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	DCM:EtOH (50:50)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	DCM:EtOH (70:30)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	Kloroform:EtOH (30:70)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	Kloroform:EtOH (50:50)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	Kloroform:EtOH (70:30)	PVA	4%	% 0.3	15	17,500
% 2	DCM	DMAB	% 2, 3, 4	% 0.1	15	17,500

3.3 PHBV Partiküllere Model Protein BSA Yüklenmesi ve Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2’de açıklanan yöntemle sentezlenen PHBV partiküllere model protein BSA ikili emülsiyon yöntemi (Yılğör vd. 2009, Cun vd. 2011) ile yüklenmiştir. İkili emülsiyon yöntemi şekil 3.3’de şematik olarak gösterilmiştir. Yöntemde BSA içeren sulu faz (w_1 , 0.01g/100 μ l) % 2 derişimde PHBV içeren organik faz (o) ile vortekslenerek (Heidolph, Germany) birinci emülsiyon (w_1/o) hazırlanmıştır. Ardından birinci emülsiyonun % 4 (w/v) derişimde yüzey aktif madde içeren (PVA) sulu faza (w_2) eklenerek homojenize edilmesiyle ikinci emülsiyon ($w_1/o/w_2$) elde edilmiştir. Homojenizasyon işleminde organik çözücünün uzaklaştırılması amacıyla elde edilen emülsiyon seyreltilerek +4°C’de 12 saat süreyle karıştırılmıştır. Organik çözücünün uzaklaştırılmasının ardından elde edilen çözelti 10,000 rpm hızda 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Elde edilen partiküller yüzey aktif maddenin uzaklaştırılması amacıyla iki kez 10 mM TRIS-HCl (pH:7.40) tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Santrifüj ile toplanan partiküller -20°C’de 24 saat süreyle dondurulduktan sonra -80°C’de liyofilizatörde 24 saat boyunca kurutulmuştur.



Şekil 3.3 İkili emülsiyon yöntemi

BSA yüklü PHBV partiküllerin sentezi aşamasında 10,000 rpm hızda 10 dakika süre ile santrifüj sonucunda elde edilen supernatantlar, Bradford yöntemi ile (Bradford 1976, Ginty vd. 2008, Chaudhari vd. 2013) analizlenmiş ve Eşitlik 3.1 yardımıyla indirekt olarak enkapsülasyon verimliliği (% EE) hesaplanmıştır.

$$\%EE = 1 - \left[\frac{\text{supernatant derişimi} * \text{ml supernatant}}{\text{yüklenen miktar}} \right] \quad (3.1)$$

3.4 PHBV Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi

Bölüm 3.2 ve 3.3'te açıklanan şekilde hazırlanan liyofilize haldeki PHBV ve BSA yüklü PHBV partiküllerin morfolojileri, örneklerin altın-paladyum ile kaplanması ardından SEM (FEI Quanta 400 F, USA) ile analiz edilmiştir. Partiküller için ortalama çap dağılımı, SEM görüntülerinin farklı noktalarından ölçümler alınarak Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) yazılımı ile tespit edilmiştir. Partiküllere ait çap değerleri ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

3.4.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Liyofilize haldeki PHBV ve BSA yüklü PHBV partiküller TEM (FEI Tecnai G² Spirit, Bio TWIN, USA) ile incelenmiştir. Analizden önce örnekler etanol ile 1:3 oranında seyreltilmiş ve karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılarak 80 kV voltaj altında incelenmiştir.

3.4.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Tez çalışması kapsamında üretilen PHBV partiküllerin ve ticari PHBV'nin kimyasal yapılarının karşılaştırılması amacıyla FTIR (Shimadzu 8400 S) analizi gerçekleştirilmiştir. Potasyum bromür (KBr) kullanılarak tablet haline getirilen örneklerin analizi 4000-500 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yürütülmüştür.

3.4.4 Parçacık boyut dağılımı analizi ve zeta potansiyeli

Parçacık boyut dağılımı analizi, 25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Zeta Sizer Nano S Malvern Instruments, UK). Analizden önce örnekler 1:100 oranında damıtık su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerin yüzey yükünün tayin edilmesi amacıyla

parçacıkların zeta potansiyeli değerleri de ölçülmüştür (Zeta Sizer Nano S Malvern Instruments, UK).

3.4.5 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

PHBV ve BSA yüklü PHBV partiküllerin fiziksel durumlarının belirlenmesi için azot atmosferi altında DSC (DSC60 Shimadzu, Japan) analizi gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş örneklerden 2 mg tartılarak 5°C/dk hızda 50°C'den 200°C'ye kadar ısıtma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.6 PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları

Degradasyon çalışmaları 37°C ve 30 rpm çalkalamalı ortamda PBS (pH:7.4) içerisindeki BSA yüklü PHBV partiküller ile yürütülmüştür. Belirli zaman aralıklarında (3, 10, 15 ve 21. günler) degradasyon ortamından uzaklaştırılan partiküller 10,000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Partiküller saf su ile iki kez yıkama işleminin ardından -80°C'de liyofilizatörde kurutulmuştur. Vakum ortamında altın-paladyum ile kaplanan partiküllerin yapısı Bölüm 3.4.1'de açıklanan şekilde SEM analizi ile incelenmiştir.

3.5 Jelatin Partiküllerin Sentezi

Tez çalışmasında PDGF-BB büyüme faktörlerinin kontrollü salımını sağlamak amacıyla kullanılacak jelatin partiküller su-yağ emülsiyonu yöntemi (Holland vd. 2003) ile hazırlanmıştır. Yöntemde 1g jelatin 60°C'de 2 saat süreyle 10 ml deiyonize suda çözölmüştür. Daha sonra 60 ml yağın içine damlatılarak su-yağ emülsiyonu hazırlanmıştır. Damlatma işleminin ardından 15°C'de inkübatörde 500 rpm hızda 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda +4°C'de 50 ml aseton varlığında 1 saat karıştırıldıktan sonra vakum altında süzülmüştür. Mikroküre formunda toplanan jelatin partiküller asetonla üç kez yıkandıktan sonra çapraz bağlama reaksiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla 20 mM glioksal çözeltisi içine alınmış ve bir gece boyunca

çapraz bağlayıcı çözeltisinde bekletilmiştir. Bu işlemin ardından çapraz bağlı mikroküreler etanol ile yıkanmış ve -80°C’de liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.6 Jelatin Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1 SEM analizi

Bölüm 3.5’te açıklandığı şekilde hazırlanan jelatin partiküllerin morfolojilerinin belirlenmesi SEM (FEI Quanta 400 F, USA) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilize haldeki partiküller altın-paladyum ile kaplandıktan sonra SEM altında inceleme gerçekleştirilmiştir.

3.6.2 FTIR analizi

Jelatin ve çapraz bağlı jelatin partiküllerin fonksiyonel gruplarının tayin edilmesi amacıyla yüzey infrared spektrumları FTIR-ATR spektrofotometresi ile (Perkin Elmer, Spectrum one, ABD) incelenmiştir. Spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında kaydedilmiş ve Perkin-Elmer, Spectrum One yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.6.3 Jelatin partiküllerin su tutma kapasitesinin belirlenmesi

Çapraz bağlı jelatin mikrokürelerin su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla şişme deneyleri (Holland vd. 2003) gerçekleştirilmiştir. PDGF-BB büyüme faktörü jelatin partiküllere emdirme yöntemi ile yükleneceğinden partiküllerin su tutma kapasitesinin belirlenmesi önemlidir. Liyofilizatörde kurutulmuş olan 50 mg jelatin mikroküre PBS (pH:7.4) (20 ml) ortamında 24 saat boyunca 100 rpm’de çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. Ardından boş ağırlığı bilinen petrilere (W_v) aktarılmış ve inkübasyon sonunda yaş ağırlığı tartılmıştır (W_{sv}). Yaş ağırlığı belirlenen mikroküreler 24 saat vakumda bekletilerek kurutulmuş ve ardından kuru ağırlığı tartılmıştır (W_{dv}). Gram mikroküre başına absorplanan su miktarının (S ; ml su/g mikroküre) hesaplanması amacıyla Eşitlik 3.2 kullanılmıştır. Çalışmalar beş paralel örnek ile gerçekleştirilmiş ve denge şişme değerleri ortalama±standart sapma olarak sunulmuştur.

$$S = \frac{W_{sv} - W_{dv}}{W_{dv} - W_v} \quad (3.2)$$

3.6.4 Jelatin partiküllere BSA yüklenmesi

Tez çalışması kapsamında model protein BSA jelatin partiküllere emdirme yöntemi ile yüklenmiştir. Dondurularak kurutulmuş olan jelatin partiküller, denge şişme değerine göre belirlenmiş olan 0.1 g/ml derişimde BSA çözeltisi içinde 37°C, 30 rpm çalkalamalı inkübatörde üç saat boyunca inkübe edilmiş ve BSA yüklü jelatin partiküller hazırlanmıştır.

3.7 PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Çalışmaları

BSA içeren PHBV ve jelatin partiküllerden *in-vitro* salım çalışmaları % 0.1 (w/v) sodyum azid içeren PBS (pH:7.4) ortamında 37°C'de 30 rpm'de gerçekleştirilmiştir. 20 mg BSA yüklü partiküller ile yürütülen çalışmada, ilk 2 saat yarım saatte bir 6. saate kadar saat başı ve 24. saatten itibaren 24 saatte bir 300 µl salım ortamı uzaklaştırılmıştır. Toplanan örneklerdeki proteinin kantitatif olarak miktarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford 1976, Ginty vd. 2008, Chaudhari vd. 2013). Kantitatif değerlerin hesaplanmasında bilinen BSA derişimleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılmıştır (EK 1 Şekil 1). Salım ortamı 37°C'de sodyum azid içeren PBS ile yenilenerek çalışmaya devam edilmiştir. Sonuçlar değerlendirilerek kümülatif salım miktarları belirlenmiştir.

3.8 PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

PHBV partikülden BSA salımına ilişkin olarak *in-vitro* salım çalışmalarına ilişkin kinetik veriler Higuchi denklemi olarak bilinen Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır (Higuchi 1963, Gürsoy 2002).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2} \quad (3.3)$$

Eşitlikte görülen t : zaman, M_t/M_∞ : salınan protein kesri ve k : Higuchi salım hız sabitini ($\text{zaman}^{-1/2}$) karakterize etmektedir. Bu denklemde $\ln (M_t/M_\infty)$ değerleri $t^{1/2}$ 'ye karşı grafiğe geçirilmiş ve eğim değerinden k_H Higuchi salım hız sabiti belirlenmiştir.

Jelatin partikülden BSA salımına ilişkin olarak gerçekleştirilen *in-vitro* salım çalışmalarına ait kinetik verileri Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte M_t/M_∞ : salınan protein kesrini t : zaman k : taşıyıcının yapısal özelliklerini içeren sabiti ve n : difüzyonel salım kinetiği mekanizmasıyla ilişkili sabiti karakterize etmektedir. Salım mekanizması grafiksel olarak hesaplanan n ve k değerleri ile belirlenmiştir. Bu iki değer hesaplanması için $\ln(M_t/M_\infty)$ $\ln(t)$ değerine karşılık grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğrunun eğiminden n değeri hesaplanmıştır.

3.9 Kitosan-Temelli Doku İskelelerinin Hazırlanması

Üç boyutlu gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak kurutma (*freeze-drying*) yöntemi (Tıgılı vd. 2007) ile elde edilmiştir. 0.2 M asetik asitte % 2 (w/v) derişimde hazırlanan kitosan çözeltisi 24 gözlü Petri kaplarına (TPP, İsviçre) dökülerek -20°C 'de 1 gece süreyle dondurulmuş ve ardından -80°C 'de 4 gün boyunca liyofilize edilmiştir. Stabilizasyon işlemleri için kitosan doku iskeleleri % 96 etanolde (v/v) 1 gün bekletildikten sonra % 70 (v/v) etanolde 1 saat bekletilmiş ardından stabilize haldeki doku iskeleleri liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.10 PHBV ve Jelatin Partiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi

3.10.1 PHBV partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi

BMP-6 içeren liyofilize edilmiş PHBV partiküller kitosan doku iskelelerine üretim aşamasında yüklenmiştir. PHBV partiküller 1 ml saf su içerisinde dağıtıldıktan sonra 24 saat boyunca karıştırılmış olan kitosan çözeltisine eklenmiş ve ardından 2 saat süreyle

karıştırma işlemine devam edilmiştir. PHBV içeren kitosan çözeltisi 24 gözlü Petri kaplarına dökülerek 1 gün süreyle dondurulmuş ardından 4 gün boyunca liyofilize edilmiştir. PHBV partikülleri içeren doku iskeleleri Bölüm 3.9’da açıklanan şekilde etanol ile stabilizasyon işleminin ardından liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.10.2 Jelatin partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi

PDGF-BB içeren jelatin partiküller kitosan doku iskelesine emdirme yöntemiyle yüklenmiştir. Stabilize edilmiş doku iskelelerine her bir doku iskelesi başına 300 µl PBS içerisinde dağıtılan 1.5 mg jelatin partikül emdirilerek örnekler hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.11 Kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışması

Kitosan temelli doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları aşağıda açıklanan dört farklı grup ile gerçekleştirilmiştir.

- **I. Grup:** Boş kitosan doku iskelesi (CS)
- **II. Grup:** PDGF-BB yüklü jelatin partikül içeren kitosan doku iskelesi (CS/PDGF-BB)
- **III. Grup:** BMP-6 yüklü PHBV partikül içeren kitosan doku iskelesi (CS/BMP-6)
- **IV. Grup:** BMP-6 ve PDGF-BB yüklü PHBV ve jelatin partikül içeren kitosan doku iskelesi (CS/PDGF-BB+BMP-6)

3.11.1 Gözenek boyut dağılımı

Kitosan temelli doku iskelelerinin gözenek çapı dağılımı civa porozimetre (MIP, Quantachrome, USA) kullanılarak belirlenmiştir. 480 erg/cm² yüzey gerilimine sahip olan civa ıslatmayan sıvı olarak kullanılmıştır. Analizler 140° temas açısı değerinde ve düşük basınç aralığında (0-50 psi) gerçekleştirilmiştir.

3.11.2 Mekanik dayanım testi

Mekanik dayanım testleri için 10x4 mm boyutundaki doku iskeleleri 1 saat süreyle PBS (pH:7.4) ortamında bekletilmiştir. Basma testleri sabit çapraz başlık altında 100 N yük ile gerçekleştirilmiştir (Zwick/Roell Z250 universal testing machine, Almanya). Test sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrisinin doğrusal bölgesinin eğim değeri alınarak elastik modül değerleri hesaplanmıştır.

3.11.3 Su tutma kapasitesi

Kitosan temelli doku iskelelerinin su tutma kapasitelerini belirlemek amacıyla şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kuru ağırlıkları belirlenen (W_o) doku iskeleleri 37°C'deki 25 ml PBS (pH:7.4) ortamına alınmıştır. Örnekler belirli zaman aralıklarında (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 ve 240. dakika) PBS ortamından uzaklaştırılarak ağırlıkları belirlenmiştir (W_s). Örneklerin su tutma oranları Eşitlik 3.5 kullanılarak kuru temelde hesaplanmıştır. Çalışmalar her grup için 3 paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir.

$$Su\ tutma\ oranı = \frac{W_s - W_o}{W_o} \quad (3.5)$$

3.11.4 Yoğunluk tayini

Yoğunluk tayini deneyleri Bölüm 3.11'de açıklanan dört gruba ait örneklerden 10x4 mm boyutlarında ve 3'er paralel örnek ile yürütülmüştür. Kuru ağırlıkları analitik terazi ile belirlenen kitosan doku iskeleleri pens yardımıyla kitosan tarafından absorplanmayan hidrofobik bir organik çözücü olan n-hekzan içine daldırılmış ve çözelti yer değiştirme yöntemiyle hacim farkı belirlenmiştir. Kuru ağırlık değerinin hacim farkı değerine bölünmesiyle yoğunluk değerleri belirlenmiştir.

3.12 Kitosan Doku İskelelerinden PDGF-BB ve BMP-6 Salımı

CS/PDGF-BB, CS/BMP-6 ve CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskeleleri Bölüm 3.10.1 ve Bölüm 3.10.2’de açıklanan şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri yaklaşık olarak 100 ng BMP-6 ve 100 ng PDGF-BB içermektedir.

BMP-6 ve PDGF-BB proteinlerinin kitosan doku iskelelerinden salım çalışması Bölüm 3.11’de verilen her bir gruptan 3 paralel örnek ile % 0.1 sodyum azid içeren 2 ml PBS (pH:7.4) ortamında 37°C ve 30 rpm çalkalama koşullarında 21 gün süre ile gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında 500 µl salım ortamı uzaklaştırılmış ve BMP-6 için Cell Science (ABD), trombosit kaynaklı büyüme faktörü için Ray Biotech (ABD) firmasından temin edilen ELISA kitleri ile analizlenmiştir.

3.13 Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında hazırlanan kitosan bazlı doku iskelelerinin, kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla *in vitro* koşullarda MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda Bölüm 3.11’de açıklanan dört grup kitosan doku iskelesi kullanılmış, doku iskeleleri üzerindeki hücre üremesi ve farklılaşması incelenmiştir.

3.13.1 Hücre kültür koşulları

Hücre kültür çalışmaları fibroblastik morfolojiye sahip, osteoblasta farklılaşan MC3T3-E1 hücreleri (No: RCB 1126 Riken Hücre Bankası, Japonya, ikilenme süresi 36 saat) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler % 10 (v/v) FBS ve % 1 (v/v) penisilin streptomisin içeren α-MEM besi ortamında 37°C’de % 5 CO2 içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir.

CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6 ve CS/PDGF-BB+BMP-6 olmak üzere 4 farklı doku iskelesi kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmaları 24 gözlü polistiren hücre kültür

kaplarında (Costar, USA) gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmaları öncesinde 10x2 mm boyutlarındaki doku iskeleleri 240 dakika süreyle etilen oksit altında sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Erna, EE0003TP). Sterillenen doku iskeleleri Parafilm ile kaplanmış 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiş ve hücre ekimi öncesinde yarım saat süreyle koşullandırılmış ortamda bekletilmiştir.

Üretildikleri kültür koşullarında doygunluk tabakasına ulaşan MC3T3-E1 hücreleri % 0.25'lik tripsin enzimi ile gerçekleştirilen tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden ayrılmışlardır. Santrifüjlenen hücreler taze besi ortamında tekrar süspanse edilmiştir. Hemositometrik sayım sonrasında hücre yoğunluğu 2.5×10^4 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine 50 µl hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin tutunması için geçen 2 saatlik sürenin sonunda doku iskeleleri üzerine 1'er ml besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Kültürün ikinci gününde besi ortamı uzaklaştırılarak farklılaşma ortamı eklenmiştir. Farklılaşma ortamı, α -MEM içerisine % 10 FBS, %1 penisilin streptomisin, 10 mM gliserol fosfat ve 50 µg/ml askorbik asit eklenerek hazırlanmıştır. İnkübasyon işlemleri 37°C'de, % 95 neme ve % 5 CO₂ içeriğine sahip inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II, Laminar akış kabini, İtalya) yürütülmüştür.

3.13.2 MTT analizi

Doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 pre-osteoblast hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri seçilen zaman aralıklarında (1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günlerde) 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucunda tetrazolyum bileşeni formazan kristallerine dönüşmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri ölçülerek üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı kantitatif olarak tayin edilmektedir. MTT analizinde belirlenen zaman aralıklarında doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, ardından her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. 37°C'deki etüvde 3 saatlik inkübasyon sürecinin ardından doku iskeleleri

üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de mikro plaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

3.13.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve EDX analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin doku iskeleleri üzerindeki morfolojilerinin, yapışma, farklılaşma ve yayılma potansiyellerinin görüntülenmesi için kültürün 4 ve 7 ve 14. günlerinde alınan örneklerle SEM (FEI Quanta 400 F, USA) analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizi öncesinde hücre fiksasyonu yapılmıştır. Bu amaçla doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, iskeleler ikişer kez DPBS (pH: 7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL % 2.5’luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve örnekler analiz yapılana kadar PBS içinde 4°C’de saklanmıştır. SEM analizi öncesinde, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem için iskeleler %30, %50, %70, %90 ve %100’lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2’şer dk ve 400 µl heksametildisilazan (HMDS) içerisinde de 5 dk bekletilmişlerdir. Örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM-EDX görüntüleri alınmıştır.

3.13.4 Hücre farklılaşmasının incelenmesi

MC3T3-E1 preosteoblastik hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla von Kossa ve gerçek zamanlı protein zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri yapılmıştır.

von Kossa analizi

Hücrelerin matriks mineralizasyonunun belirlenmesi amacıyla Von Kossa analizleri gerçekleştirilmiştir. Kültürün 21. gününde alınan örnekler PBS ile yıkanmış ve -20 °C’de ki saf etanol ile oda sıcaklığında 20 dakika fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Von Kossa boyama için hücreler deiyonize su ile yıkanmış ve ardından % 5 AgNO₃ ile 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler tekrar deiyonize su ile yıkanarak 2 dakika ultraviyole (UV) ışını uygulanmıştır. Mineralizasyona bağlı renk değişimi optik mikroskop altında gözlemlenmiştir.

Gerçek Zamanlı Protein Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin **Runx2**, **kollajen I**, **osteokalsin**, **osteopontin** ve **β-aktin** ekspresyon seviyeleri RT-PCR (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) ile belirlenmiştir. Analiz için kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve örnekler RNAase içermeyen Ependorf tüplerine aktararak -80°C'de saklanmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu için Qiagen (ABD) RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Steril iğne ile parçalanmış her bir örneğin üzerine 500 µl Trizol eklenerek 25-30 saniye vortekslenmiş ve örnekler 2 saat 4°C'de bekletilmiştir. Ardından trizol içerisindeki örneklerin üzerine 125 µL kloroform eklenerek çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 12,000 g'de santrifüjlenmiştir. Oluşan sıvı faz yeni bir RNase içermeyen Ependorf tüpe aktarılmıştır. Daha sonra RNA içeren sulu faza 400 µL % 70'lik etanol eklenerek vortekslenmiştir. RNA içeren % 70'lik etanol karışımı kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmış ve 13,000 rpm'de 15 saniye santrifüjlenmiş ve alta geçen sıvı atılmıştır. Kit içerisinde bulunan tampon çözeltiler ile gerçekleştirilen yıkamaların ardından kolon 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında elde edilen RNA boş bir Ependorf tüpüne aktararak üzerine 50 µl RNA içermeyen su eklenmiş ve saflaştırılan RNA 1 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilmiştir. Elde edilen saf RNA derişimleri nanodrop (Thermoscientific 2000c, ABD) analizleri ile belirlenmiş ve örnekler -80°C'de saklanmıştır.

Hücrelerden elde edilen mRNA'lardan cDNA sentezi için Applied Biosystems (ABD) firmasından satın alınan kit kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için kit içeriğinde bulunan 2 µl tampon, 0.8 µl deoksinükleotid trifosfat (dNTP), 1 µl reverse transkriptaz, 2 µl random primer, 1 µl RNase inhibitörü ve 11.2 µl RNase içermeyen su karıştırılarak yaklaşık 2 µl mRNA çözeltisine eklenmiştir. Toplam 20 µl'lik reaksiyon 25°C'de 10

dakika, 40°C’de 120 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır.

cDNA örneklerinden belirlenen genlerin tayini için Roche (İsviçre) firmasından temin edilen kit kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için kit içeriğinde bulunan 4 µl Eva Green, 0.3 µl primer forward, 0.3 µl primer reverse ve 12.4 µl PCR grade su 3 µl cDNA örneği ile karıştırılmıştır. Bu basamakta cDNA amplifikasyonu için kullanılan forward primer ve reverse primer dizileri seçilen genler için çizelge 3.2’de sunulmuştur. Gen tayini için 3 basamaklı bir döngü programı uygulanmıştır. RT-PCR (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) cihazında 95°C’de 15 dakika denatürasyon, 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 20 saniye, 72 °C’de 20 saniye amplifikasyon ve 60°C’de 20 saniye 95°C’de 20 saniye erime basamaklarından oluşan toplam 45 döngüden sonra gen ifadeleri analiz edilmiştir. β -aktin “house-keeping” gen olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri

β-aktin	Forward primer -5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' Reverse primer -5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
Runx2	Forward primer -5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC-3' Reverse primer -5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC-3'
Kollajen I	Forward primer -5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3' Reverse primer -5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
Osteokalsin	Forward primer -5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3' Reverse primer -5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Osteopontin	Forward primer -5'-CACTTTCCTCCAATCGTCCCTAC-3' Reverse primer -5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'

3.14 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte

sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Tukey testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

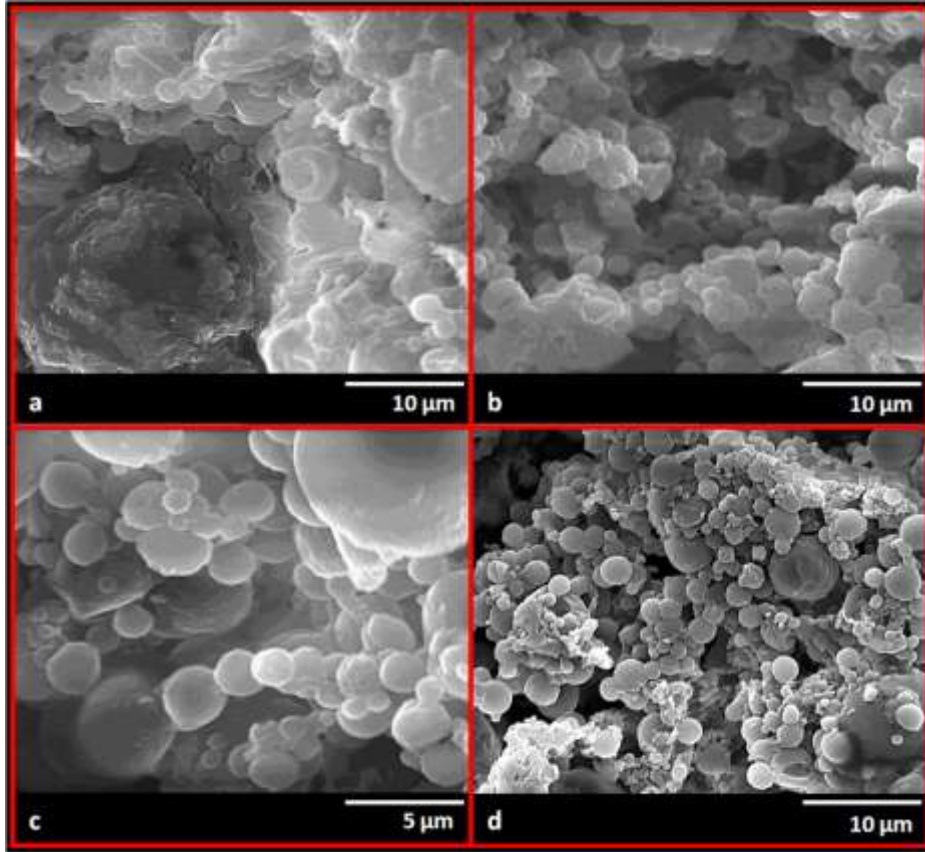
Bu bölümde kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak tasarlanan ve büyüme faktörlerini sıralı salan kitosan doku iskelelerinin elde edilmesi için gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait sonuçlar sunulmuştur. İlk olarak, poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) ve jelatin partiküllerin sentez yöntemleri ve karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlara yer verilmiştir. Daha sonra model protein sığır serum albumin (*bovine serum albumin*, BSA) varlığında salım çalışmaları ve matematiksel analizine ilişkin sonuçlar sunulmuştur. İkinci bölümde ise, kitosan doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyon çalışmalarına ait bulgulara değinilmiştir. Üçüncü bölümde, kemik morfojenik proteini (*bone morphogenic protein*, BMP-6) içeren PHBV partiküller ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (*platelet derived growth factor*, PDGF-BB) içeren jelatin partiküllerin hazırlanması, kitosan doku iskelelerine yüklenmesi ve salım çalışmalarına ilişkin sonuçlar sunulmuştur. Son bölümde ise, BMP-6 ve PDGF-BB yüklü kitosan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyelini araştırmak üzere MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreleri ile yürütülmüş hücre kültür çalışmalarına ilişkin bulgulara yer verilmiştir.

4.1 Poli (3-hidroksi bütirat-ko-3-hidroksi valerat) (PHBV) Partiküllerin Sentezi

PHBV partiküller Bölüm 3.2’de açıklandığı şekilde emülsiyon difüzyonu yöntemi ile sentezlenmiştir. Emülsiyon difüzyonu yönteminde polimer derişimi, yüzey aktif madde türü ve derişimi, çözücü ve çözücü kombinasyonları ile homojenizasyon gücü/süresi gibi pek çok proses parametreleri partikül oluşumunu etkilemektedir (Astete ve Sabliov 2006). Bu proses parametrelerinin PHBV partikül boyutu üzerine etkisini incelemek amacıyla çalışmalar yürütülmüş ve elde edilen partiküllerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle sulu faz ile organik faz arasında oluşan viskoz kuvvetleri yenmek için gerekli olan **homojenizasyon gücü ve süresinin** belirlenmesine ilişkin çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamdaki çalışmalar %2 (w/v) PHBV derişimindeki (DCM içerisinde) polimer çözeltisi ile %4 (w/v) polivinil alkol (PVA)

varlığında gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon parametrelerinin partikül oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla homojenizasyon süresi ve gücü sırasıyla 10,000-17,500 rpm ve 7-15 dakika arasında değiştirilmiştir. Farklı koşullarda elde edilen partiküllere ait SEM görüntüleri şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1 Homojenizasyon parametrelerinin PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi

a. 15,000 rpm 10 dakika (x10000), b. 15,000 rpm 15 dakika (x10000), c. 17,500 rpm 10 dakika (x20000) ve d. 17,500 rpm 15 dakika (x10000) [%2 (w/v) PHBV, DCM, % 4 PVA (w/v)]

10,000 rpm homojenizasyon hızında homojenizasyon süresine bağlı olmaksızın partikül oluşumu gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra, 7 dakika homojenizasyon süresi de homojenizasyon gücüne bağlı olmaksızın partikül oluşumu için yeterli olmamıştır. Homojenizasyon hızı 15,000 rpm değerine çıkarıldığında 10 dakika homojenizasyon süresinde şekil 4.1.a’da görüldüğü gibi koagüle yapılar elde edilmiştir. Homojenizasyon süresi 15 dakikaya çıkarıldığında 15,000 rpm’de mikron boyutunda partiküller oluşmuştur ($1.57 \pm 0.21 \mu\text{m}$) (Şekil 4.1.b). Bu durum 15,000 rpm’de elde edilen kayma geriliminin viskoz kuvvetleri yenmede yeterli olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Homojenizasyon hızı 17,500 rpm değerine çıkarıldığında 10 ve 15 dakikalarda parçaçık boyutunda azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Ancak 17,500 rpm 10 dakika homojenizasyon parametreleri ile elde edilen SEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.1c) partikül boyutlarının büyük ve çap dağılımı aralığının geniş olduğu sonucuna varılmıştır. 17,500 rpm homojenizasyon gücünde süre 15 dakikaya uzatıldığında, mikron altı boyutlarda (531 ± 150 nm) partiküllerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.d). Elde edilen sonuçlar çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

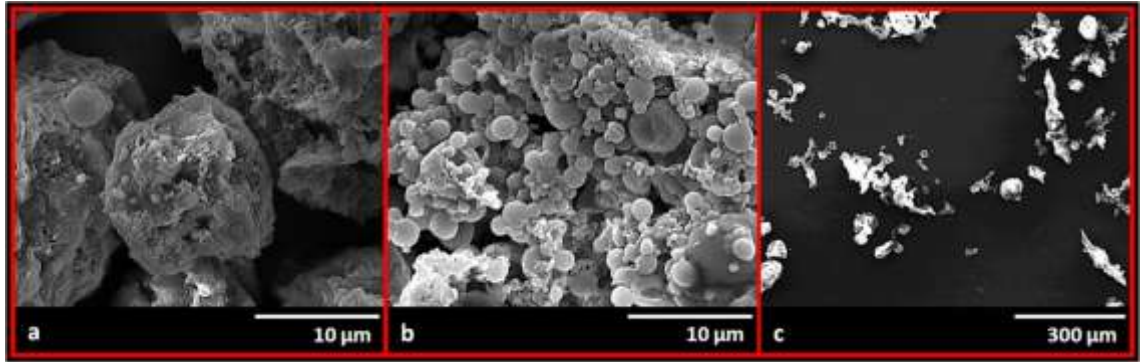
Çizelge 4.1 Homojenizasyon parametrelerinin PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi

Homojenizasyon süresi (dakika)	Homojenizasyon hızı (rpm)	Partikül oluşumu
7	10,000-15,000-17,500	Partikül oluşumu gözlenmemiştir.
10	15,000	Koagüle yapıda partikül oluşumu söz konusudur.
	17,500	821.4 ± 50 nm
15	15,000	$1.57\pm0.21\mu\text{m}$
	17,500	531 ± 150 nm

Literatürde homojenizasyon hızı ve süresinin partikül oluşumu ve partikül çapı üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalarda biyoaktif moleküllerin enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılan poliester yapıdaki biyobozunur poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA)

partiküller üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Gasparini vd. 2008 tarafından yapılan çalışmada yüksek homojenizasyon hızı ve süresinin daha yüksek yüzey gerilimi oluşturmaya bağlı olarak daha küçük boyutta PLGA partiküllerin elde edilmesinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra Budhian vd. 2007 tarafından yapılan çalışmada artan homojenizasyon hızı ve sürelerinde PLGA nanopartiküllerinin çaplarının azaldığı gözlenmiştir. Benzer olarak Chaisri vd. 2009 çalışmasında homojenizasyon hızının 10,000 rpm'den 8,000 rpm'e düşürülmesi sonucunda partikül boyutunda artış olduğu sonucuna varmışlardır. Literatürde yer alan bir diğer çalışmada PLGA partiküllerin ortalama boyut dağılımının homojenizasyon hızının 12,000 rpm olduğu duruma kadar azaldığı ve daha yüksek sonikasyon gücünde değişmediği sonucu bulunmuştur (Kwon vd. 2001).

Sunulan tez çalışması kapsamında **polimer derişiminin** etkisinin incelendiği çalışmalarda % 1, 2 ve 4 (w/v) derişimlerde DCM ile hazırlanan PHBV çözeltileri kullanılmıştır. 17,500 rpm ve 15 dakika homojenizasyon koşullarında %4 PVA varlığında gerçekleştirilen homojenizasyon sonrası farklı derişimlerdeki PHBV çözeltilerinden elde edilen partiküller SEM ile analiz edilmiş ve sonuçlar şekil 4.2'de sunulmuştur. Şekil 4.2 incelendiğinde, PHBV derişiminin artmasıyla partikül çaplarında artış olduğu sonucuna varılmıştır.



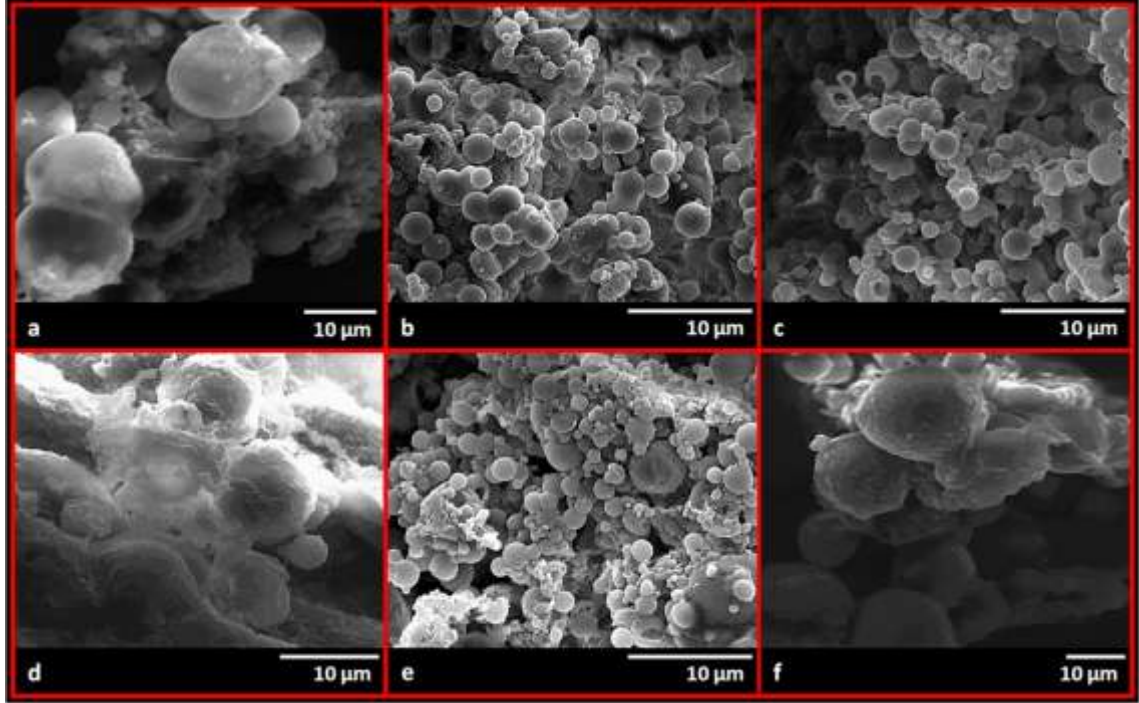
Şekil 4.2 Farklı derişimlerdeki PHBV varlığında elde edilen partiküllerin SEM görüntüleri

a. %4 (w/v) (x250), b. % 2 (w/v) (x10000), c. % 1 (w/v) (x10000) [% 4 PVA (w/v), 17,500 rpm 15 dakika, DCM]

Literatürde polimer derişiminin partikül oluşumu üzerine etkisinin incelendiğı çalışmalarda, derişimin artması sonucu partikül çaplarında artış olduğı sonucuna varılmıştır (Kwon vd. 2001, Teng vd. 2010). Organik fazda viskoz kuvvetler ile yüzey gerilimi kuvvetlerinin büyüklüğü partikül çapını etkilemektedir (Budhian vd. 2007). Yüksek polimer derişimi viskoz kuvvetlerin artmasına neden olmakta ve partikül oluşumuna direnç oluşturmaktadır (Budhian vd. 2007). Polimer derişiminin artışına bağılı olarak meydana gelen viskoz etkileşimler sonucu, çözücü uzaklaştırma adımında hidrofobik olan DCM, kloroform gibi çözücülerin sulu faza geçişinde difüzyonel bir kısıtlama meydana gelmektedir (Poletto vd. 2008). Bunlara ek olarak yüksek polimer derişimlerinde yüzey aktif madde molekülleri emülsiyon fazında koagülasyonu önlemede yetersiz kalmaktadır (Budhian vd. 2007). Düşük polimer derişimlerinde ise sentez esnasında organik fazın viskozitesinin yeterli olmamasına bağılı olarak kayma gerilimi-viskoz kuvvetler dengesinin sağlanmadığından küresel morfolojiden farklı, düzensiz yapılar ortaya çıkmaktadır. Tez alışması kapsamında %4 PHBV derişiminde deforme halde globular aglomeratlar oluştuğı gözlenmiştir (Şekil 4.2.a). Mikron altı partiküller %2 PHBV derişiminde elde edilmiştir (Şekil 4.2.b). Bununla birlikte, partikül oluşumu için minimum bir PHBV derişiminin olması gerektiğı sonucuna ulaşılmıştır. %2 PHBV derişiminin altında partikül oluşumu gözlenmemiştir. Küresel formda partiküller yerine koagüle haldeki düzensiz morfolojide yapılar elde edilmiştir (Şekil 4.2.c)

Yüzey aktif madde türü ve derişiminin partikül oluşumu üzerine etkisinin incelendiğı çalışmalarda stabilizasyon karakterleri birbirinden farklı olan non-iyonik PVA (% 2, 4, 10 w/v) ve katyonik yapıdaki DMAB (% 2, 3, 4 w/v) kullanılmıştır (Jacklenec vd. 2008, Song vd. 2008). Her iki yüzey aktif madde de PLGA gibi poliester yapıdaki partiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan maddeler olmakla birlikte, stabilizasyon karakterleri birbirinden farklıdır. DMAB düşük kritik misel derişimine sahip olan ve partiküllerin koagüle olmasını elektrostatik itme gücü ile engelleyen bir yüzey aktif maddedir. Diğer taraftan non-iyonik yapıdaki PVA'nın partikül oluşumundaki stabilizasyon mekanizması sterik etkinin engellenmesine dayanmaktadır (Sahana vd. 2008, Song vd. 2008). alışmalar DCM içerisinde hazırlanan % 2 (w/v)

PHBV derişiminde, 17,500 rpm 15 dakika homojenizasyon koşulları sabit tutularak yürütölmüştür.



şekil 4.3 Yüzey aktif madde türü ve derişiminin PHBV partiköl oluşumu üzerine etkisi

a. %2 (w/v) DMAB (x10,000), b. %3 (w/v) DMAB (x10,000), c. %4 (w/v) DMAB (x10,000), d. %2 (w/v) PVA (x10,000), e. %4 (w/v) PVA (x10,000), f. %10 (w/v) PVA (x10,000)
[%2 (w/v) PHBV, 17, 500 rpm 15 dakika, DCM]

DMAB varlığında elde edilen PHBV partiköllerin SEM görüntüleri şekil 4.3.a-c’de verilmiştir. %2 (w/v) DMAB derişiminde partiköl oluşumu gözlenmezken düzensiz kogöle yapılar elde edilmiştir (şekil 4.3.a). DMAB derişimi %3 (w/v)’e çıkarıldığında (şekil 4.3.b) partiköl oluşumu gözlenirken % 4 (w/v) DMAB varlığında daha küçük boyutta partiköller elde edilmiştir (şekil 4.3.c). Image J programı ile %3 (w/v) DMAB derişimlerinde partiköl çapı 1.17 ± 0.22 µm olarak bulunurken %4 (w/v) DMAB derişiminde 724 ± 228 nm çapında mikron altı partiköllerin elde edildiğı sonucuna varılmıştır (şekil 4.3.c).

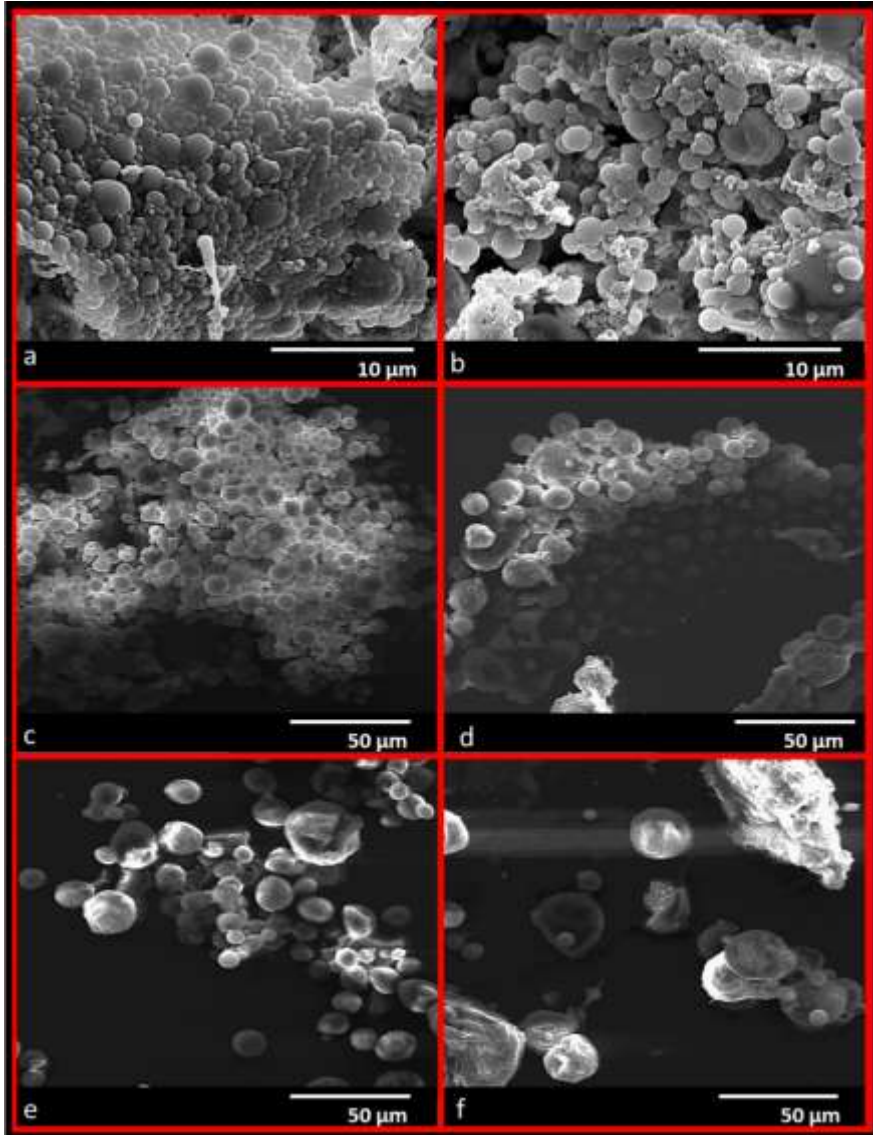
Yüzey aktif madde olarak PVA’nın kullanıldığı çalışmalarda %2 (w/v) PVA derişiminde partiköl oluşumu gözlenmemiştir (şekil 4.3.d). Bu durum PVA derişiminin düşük olmasına bağılı olarak partiköllerin stabilizasyonunda yetersiz kalması sonucu

polimer agregatların oluşumu ile açıklanabilir. Yüzey aktif madde derişiminin %4 (w/v)'e çıkarılması ile aglomerasyonun önleğiği ve küresel formda partiküllerin elde edildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3.e). %10 PVA (w/v) derişiminde partikül boyutunda belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.3.f). Bu durum, yüksek yüzey aktif madde derişimine bağlı olarak sulu fazın viskozitesinin artması ve partikül üretimi için gerekli olan net kayma gerilimini baskılaması şeklinde yorumlanmaktadır (Budhian vd. 2007).

Literatürde DMAB ve PVA'nın yüzey aktif madde olarak kullanıldığı çalışmalarda her iki yapının poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) partikül oluşumu ve çapı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DCM ve etil asetat çözücülerinde DMAB ile daha küçük boyutta PLGA partiküllerin oluştuğu belirtilmiştir (Sahana vd. 2008). Benzer olarak Kwon vd. 2001 tarafından yapılan çalışmada PLGA nanopartikül oluşumuna yönelik olarak propilen karbonatın çözücü olarak kullanıldığı durumda DMAB ile PVA karşılaştırılmış ve DMAB varlığında daha küçük boyutta partiküller sentezlendiği sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan Song vd. 2008 tarafından yapılan çalışmada DCM'nin organik çözücü olarak kullanıldığı sistemde PVA ve DMAB'ın PLGA partikül oluşumu üzerine etkisi incelenmiş ve DMAB varlığında PLGA nanopartikül boyutunun arttığı belirtilmiştir. PLGA partikül çaplarında elde edilen bu farklı sonuçlar kullanılan yüzey aktif madde kadar seçilen organik çözücülerin de önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Song vd. 2008). PLGA gibi poliestер yapısında olan PHBV'nin kullanıldığı tez çalışması kapsamında Song vd. 2008 çalışmasına benzer olarak DCM'nin çözücü olarak kullanıldığı ve yüzey aktif madde DMAB varlığında büyük ve geniş boyut dağılıma sahip partiküller elde edilmiştir.

PHBV partiküllerin üretilmesinde en uygun proses koşullarının belirlendiği çalışmalar kapsamında son olarak **çözücü ve çözücü kombinasyonlarının** partikül oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Emülsiyon-difüzyon yönteminde, polimerin bulunduğu organik faz ile yüzey katif maddenin bulunduğu sulu faz arasında bir termodinamik denge kurulmalıdır. Organik çözücünün uzaklaştırılması aşamasında ikinci emülsiyon basamağında ortama eklenen su bu denge durumunu bozarak organik

çözücünün su fazına difüzyonunu sağlar. Organik çözücünün taşınımı ile partikül oluşumu gerçekleştiğinden partikül çapları kullanılan organik çözücüye bağlı olarak değişim göstermektedir (Poletto vd. 2008). Sunulan tez çalışmasında hazırlanan %2 (w/v) polimer ve % 4 (w/v) PVA derişimi ile 17,500 rpm 15 dakika koşullarında gerçekleştirilen çalışmalarda farklı çözücülerin kullanılmasıyla elde edilen partiküllerin SEM görüntüleri şekil 4.4’de sunulmuştur.



Şekil 4.4 Çözücü ve çözücü kombinasyonlarının PHBV partikül oluşumu üzerine etkisi

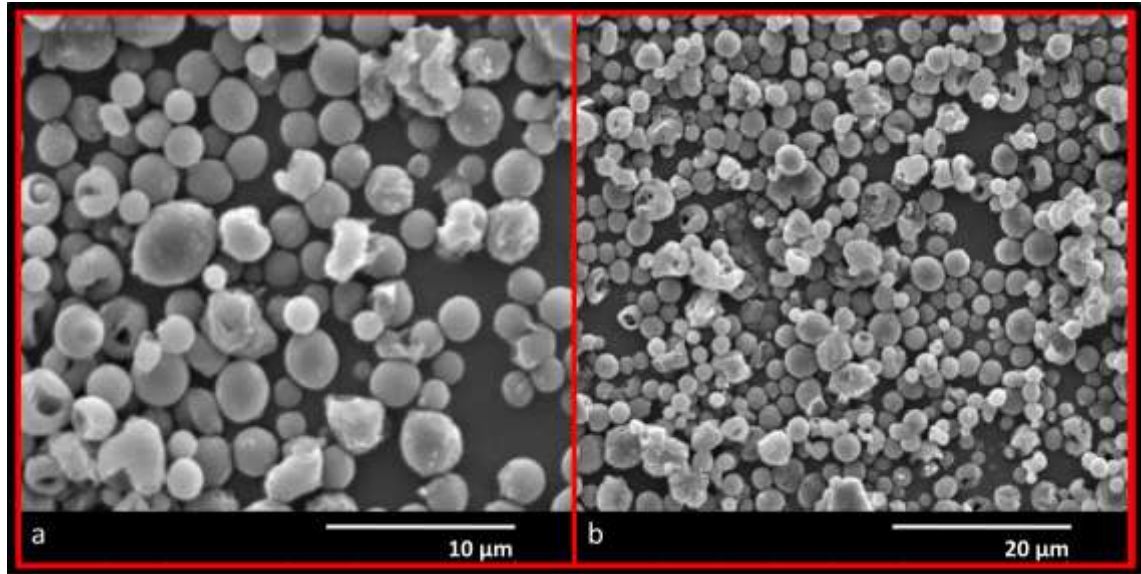
a. kloroform (x10000), b. DCM (x10000), c. DCM:etanol (50:50) (x2000) d. DCM:etanol (70:30) (x2000), e. kloroform:etanol (50:50) (x2000), f. kloroform:etanol (70:30) (x2000) [% 2 (w/v) PHBV, % 4 (w/v) PVA, 17,500 rpm, 15 dakika]

Şekil 4.4.a,b incelendiğinde kloroform ve DCM ile yapılan çalışmalarda küresel formda PHBV partikülleri elde etmek mümkün olmuştur. Image J yazılımı ile DCM varlığında partikül çapı 531 ± 150 nm iken kloroform kullanıldığı durumda 778.93 ± 162 nm olarak belirlenmiştir. DCM varlığında daha küçük boyutlarda partikül elde edilmesinin nedeni su ile karışabilirliğinin kloroforma göre yüksek olması olarak açıklanabilir. Kloroform ve diklorometan benzer yüzey gerilimine sahip olmakla birlikte (kloroform: 32.8 dyn/cm, DCM: 28.3 dyn/cm) oldukça farklı oranlarda su ile karışabilirlik değerlerine sahiptir (kloroform: 1:200, DCM: 1:50) (Weast 1974). DCM'nin kloroforma göre su ile karışabilirliğinin yüksek olması sonucunda, organik fazın sulu faza hızlı difüzyonu sağlanmakta ve daha küçük boyutlarda partikül elde edilebilmektedir. Literatürde, partikül boyutunu küçültmek amacıyla hidrofobik çözücülerin hidrofilik çözücüler ile birlikte kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır (Poletto vd. 2008). Tez çalışması kapsamında da PHBV için iyi çözücü olduğu bilinen hidrofobik karakterdeki DCM ve kloroformun hidrofilik karakterdeki etanol ile çözücü kombinasyonları hazırlanmıştır. Çalışmalarda etanolün varlığı çözücü uzaklaştırma adımında organik çözücülerin hızlı bir şekilde difüzlenerak uzaklaştırılmasını sağlamasına karşın SEM görüntüleri incelendiğinde partikül boyutunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.4.c,d). Çözücü kombinasyonlarının kullanıldığı çalışmalar sonucunda elde edilen SEM görüntülerinde DCM:etanol (50:50) oranında olduğu durumda (Şekil 4.4.c) üretilen partiküllerin boyut dağılımı Image J programı kullanılarak 5.15 ± 0.65 µm olarak belirlenmiştir. Diklorometanın hacimce arttırıldığı durumda [DCM:etanol (70:30)] elde edilen SEM görüntüsünden (Şekil 4.4.d) partikül boyutunun 4.50 ± 0.93 µm'ye düştüğü gözlenmiştir. Kloroform varlığında hazırlanan kombinasyonlar için alınan SEM görüntülerinde kloroform:etanol (50:50) olduğu durumda 12.13 ± 1.81 µm (Şekil 4.4.e) iken kloroform:etanol (70:30) olduğu durumda 5.29 ± 0.90 µm gibi mikron boyutunda partiküllerin (Şekil 4.4.f) elde edildiği sonucuna varılmıştır. Çalışmalar kapsamında hidrofilik yapıda olan etanolün ortamda bulunması, polimerin organik fazda olan çözünürlüğünü azaltarak derişimin artmasına neden olmaktadır. Partikül boyutlarındaki bu artış, partikül oluşumu sırasında polimerin organik fazdaki düşük çözünürlüğüne bağlı olarak derişiminin artmasının, çözücünün hızlı uzaklaştırılmasından daha etkin bir parametre olduğunu göstermektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda BMP-6 büyüme faktörünün kontrollü salımında kullanılan üzere üretilen PHBV partiküllerin üretimindeki en iyi koşullar DCM ile hazırlanan %2 (w/v) polimer derişimine sahip PHBV çözeltisi, %4 (w/v) derişimde PVA yüzey aktif maddesi ve 17,500 rpm 15 dakika homojenizasyon koşulları olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen partiküllerin çapı SEM görüntülerinden Image J programı ile 531 ± 150 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.b)

4.2 PHBV Partiküllere Model Protein BSA Yüklenmesi ve Enkapsülasyon Verimliliğinin Belirlenmesi

PHBV partiküller için en uygun üretim koşulların belirlenmesinin ardından model protein BSA'nın yüklenmesi çalışmaları Bölüm 3.3'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İkili emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan BSA yüklü PHBV partiküllere ilişkin SEM görüntüleri şekil 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.5 BSA yüklü PHBV partiküllere ait SEM görüntüleri

a. (x10,000) b. (x5,000) [% 2 (w/v) PHBV, % 4 (w/v) PVA, 17,500 rpm, 15 dakika]

BSA'nın PHBV partiküllere yüklenip enkapsülasyon değerinin belirlenmesi BMP-6'nın yüklenmesine ilişkin yapılacak çalışmalar için model oluşturmıştır. İkili emülsiyon yöntemi protein, ilaç gibi pek çok yapının mikro ya da nanopartiküllere yüklenmesinde

kullanılan yaygın yöntemlerden birisidir. Yüklenen proteinlerin enkapsülasyon verimliliği polimerin hidrofobisitesi, molekül ağırlığı ve kimyasal yapısı gibi parametrelere bağlıdır (Yeo ve Park 2004).

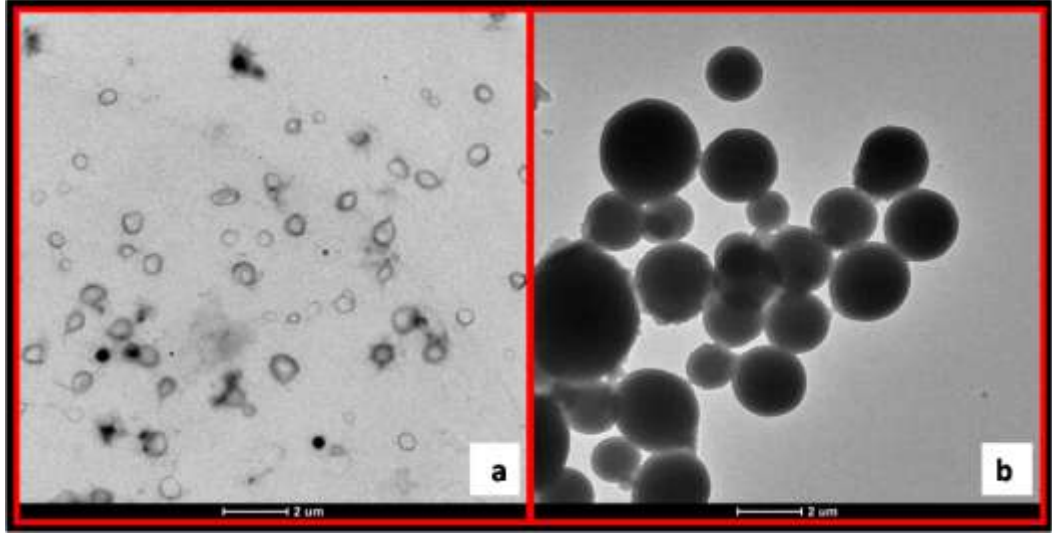
Tez çalışması kapsamında model protein BSA'nın PHBV partiküllere enkapsülasyon verimliliği Bradford yöntemi kullanılarak **% 21.14±2.20** olarak hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen düşük enkapsülasyon verimliliği değerinin hidrofobik yapıdaki PHBV'nin hidrofilik yapıdaki BSA ile tam olarak etkileşememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Duan vd. 2010 tarafından yapılam çalışmada benzer olarak PHBV partiküller için BSA enkapsülasyon verimliliği değeri %18.06±0.86 olarak elde edilmiştir. Yilgor vd. 2009 çalışmasında ise ön işlem görmüş PHBV partiküllerin BSA enkapsülasyon verimliliği değerini %16.72±1.06 olarak belirtmiştir. Tez çalışması kapsamında kullanılan polimerin ön işlem görmemesi ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle yüksek enkapsülasyon verimliliği bulunması molekül ağırlığının enkapsülasyon verimliliği üzerinde etkili bir parametre olduğunu göstermektedir.

4.3 PHBV Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen **PHBV** ve BSA yüklü PHBV (**BSA/PHBV**) partiküllerin karakterizasyon çalışmaları Bölüm 4.1 ve 4.2'de yer alan SEM analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda en uygun üretim koşulları belirlenmiş olan partiküller kullanılarak TEM, FTIR, parçacık boyut dağılımı, katyonik ve non iyonik yüzey aktif madde varlığında yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla zeta potansiyeli ve diferansiyel taramalı kalorimetre analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca BSA varlığında PHBV partiküllerin salım ortamındaki degradasyon davranışlarını incelemek amacıyla degradasyon çalışmaları yürütülmüştür.

4.3.1 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Liyofilize haldeki boş PHBV ve BSA/PHBV partiküllerin morfolojisinin belirlenmesi için TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TEM görüntüleri şekil 4.6'da sunulmuştur.

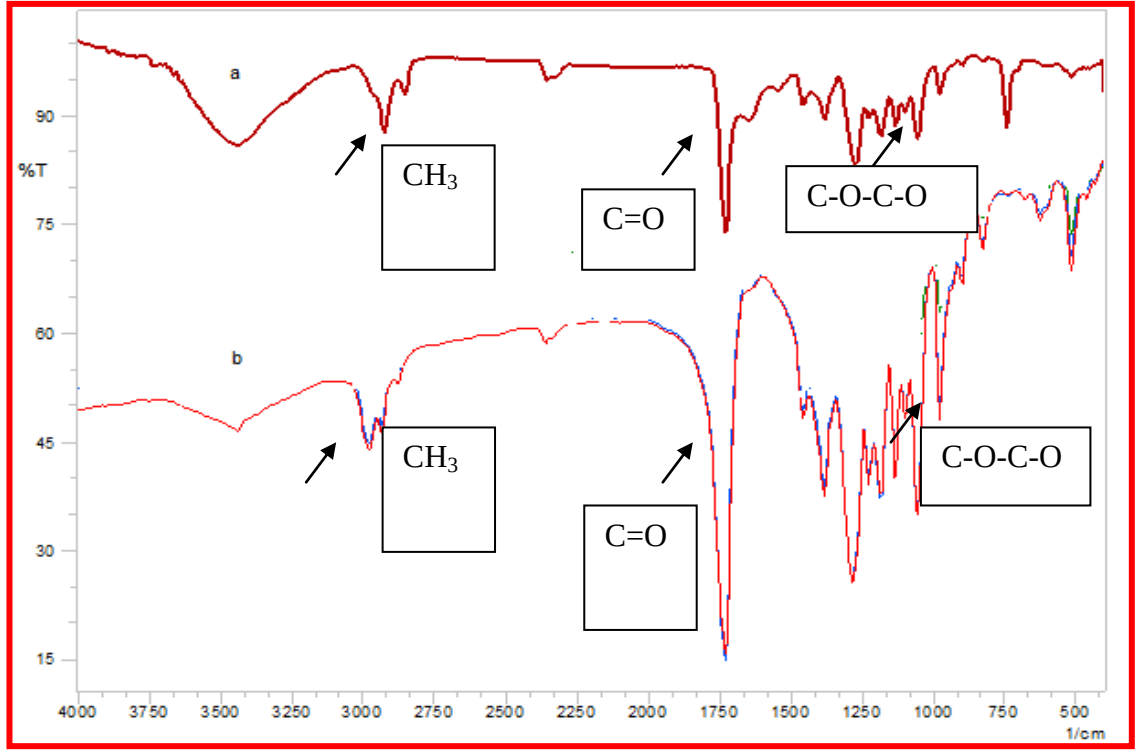


Şekil 4.6.a. Boş PHBV ve b. BSA/PHBV partiküllere ait TEM görüntüleri

Şekil 4.6.a,b incelendiğinde, hem PHBV hem de BSA/PHBV’de küresel formda partiküllerin olduğu görülmektedir. PHBV (Şekil 4.6.a) ve BSA/PHBV (Şekil 4.6.b) partiküllere ait TEM görüntüleri karşılaştırıldığında BSA’nın yapıya homojen olarak katıldığı ve BSA’nın varlığı ile partikül boyutunun arttığı gözlenmektedir. Image J ile yapılan boyut dağılımı analizinde BSA/PHBV için partikül boyutu $1.85 \pm 0.30 \mu\text{m}$, PHBV için ise $367 \pm 121 \text{ nm}$ olarak belirlenmiştir.

4.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Tez çalışması kapsamında sentezlenen PHBV partiküllerin ve ticari PHBV’nin fonksiyonel gruplarının karşılaştırılması amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. FTIR analizine ilişkin elde edilen spektrum şekil 4.7’de sunulmuştur.

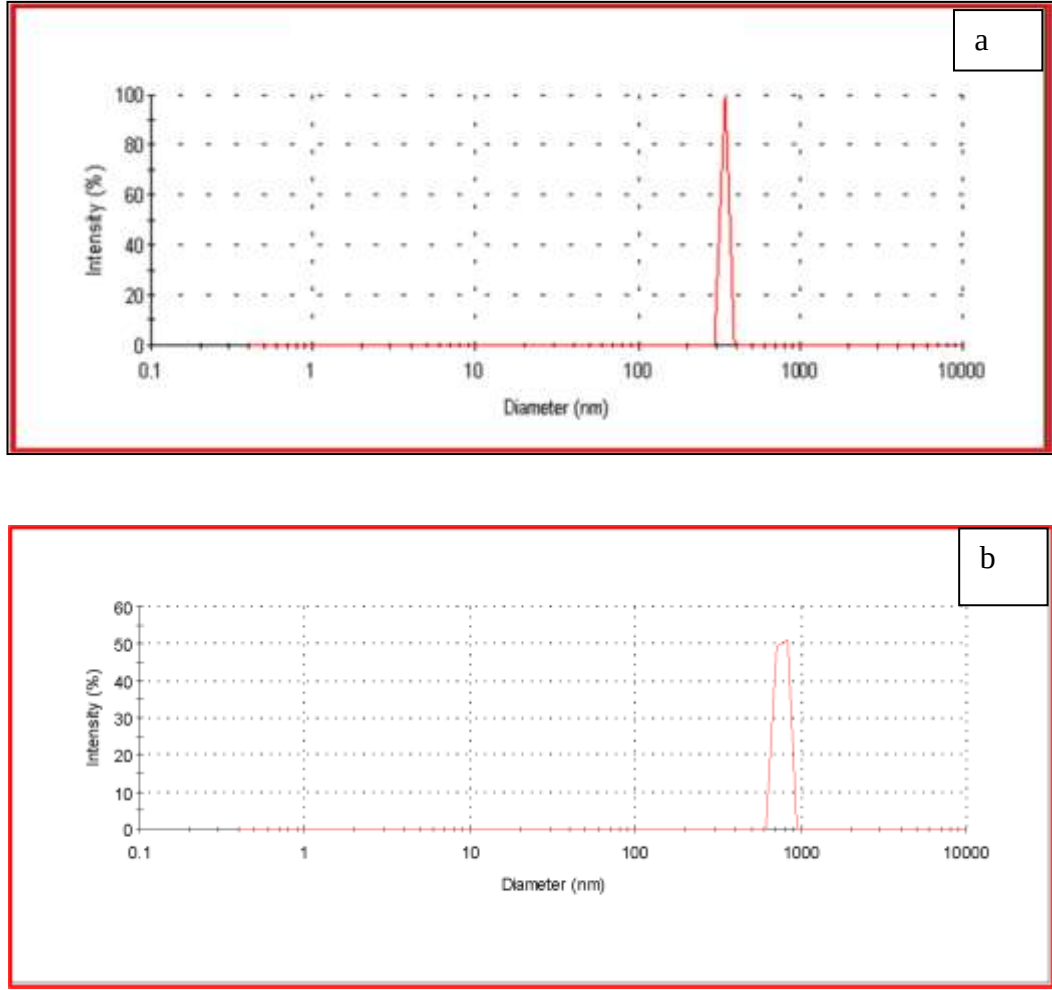


Şekil 4.7. a. PHBV polimerine b. PHBV nanokürelere ait FTIR spektrumu

Şekil 4.7’de bulunan FTIR spekturumları incelendiğinde, PHBV partiküllerin yapısında üretim aşamasında bir değişiklik olmadığı görülmektedir. 2900 ve 2850 cm^{-1} dalga sayılarındaki pikler CH_3 gruplarına ait piklerdir. 1720 cm^{-1} ’de bulunan şiddetli pik C=O karboksil grubuna ait piktir. 800-975 cm^{-1} ’de C-O-C-O gerilmesine ait absorpsiyon bantları görülmektedir. Çalışmalar sonucunda elde edilen karakteristik pikler literatürdeki değerler ile uyumludur (Farago vd. 2008).

4.3.3 Parçacık boyut dağılımı analizi ve zeta potansiyeli

Tez çalışması kapsamında % 4 (w/v) PVA ve % 4 DMAB (w/v) varlığında sentezlenen PHBV partiküllere ilişkin parçacık boyut dağılımı analizi gerçekleştirilmiştir. Partiküllere ait boyut dağılımı grafikleri şekil 4.8’de sunulmuştur.



Şekil 4.8 PHBV partiküllere ait parçacık boyut dağılımı

a. % 4 (w/v) PVA, b. % 4 DMAB (w/v)

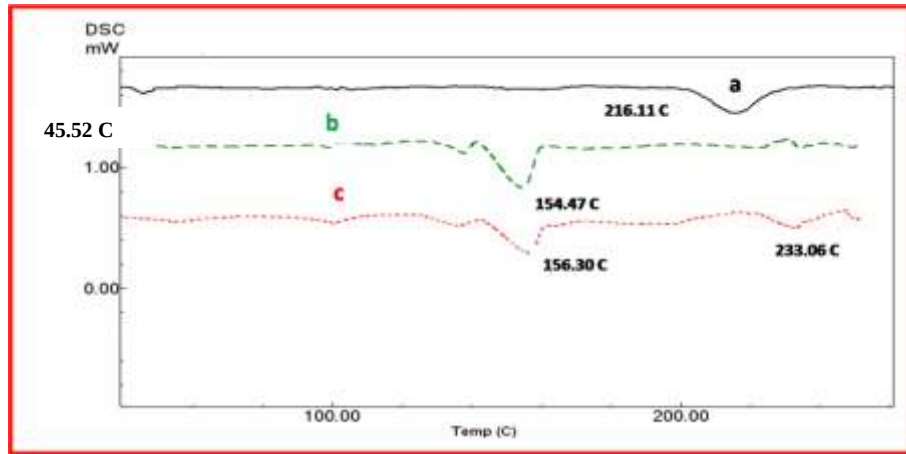
Şekil 4.8’de yer alan parçacık boyut dağılımı grafikleri incelendiğinde PVA varlığında daha küçük boyutlarda partikül oluşumu görülmektedir (Şekil 4.8.a). Bu durum SEM analizi ile elde edilen sonuçlar ile uyumludur (Şekil 4.3.e). SEM analizinde Image J programı ile ortalama partikül boyutu 531 ± 150 nm olarak hesaplanırken, DLS analizinde bu değer 300-400 nm olarak bulunmuştur. Diğer taraftan DMAB varlığında gerçekleştirilen DLS analizine göre (Şekil 4.8.b) ortalama boyut dağılımı 600-900 nm arasında belirlenmiştir. SEM analizinde ise Image J programı ile ortalama partikül boyutu 724 ± 228 nm olarak ölçülmüştür. PVA ve DMAB kullanılarak hazırlanan PHBV partiküllerin ortalama boyut dağılımı için SEM ve DLS analizlerinde meydana gelen bu fark ölçüm yöntemlerinin birbirinden farklı olması ile açıklanabilir. Ancak her iki durumda da PVA varlığında partikül çapı ve çap dağılımı daha düşüktür. Literatürde

mikron altı boyutta üretilen PHBV'nin partikül boyutunu azaltmaya yönelik olarak PHBV polimerinin ön işleme tabi tutulduğu çalışmalar yer almaktadır. Baran vd. 2002 tarafından yapılan çalışmada molekül ağırlığını azaltmak için sodyum borhidrür (NaBH_4) ile ön işlem görmüş PHBV polimerinden sentezlediği partiküllerin ortalama boyutunu 200-450 nm arasında olduğunu belirtmiştir.

PVA ve DMAB varlığında elde edilen partiküllerin yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen zeta potansiyeli ölçümlerinde **% 4 (w/v) PVA varlığında -15.9 mV** ve **% 4 (w/v) DMAB varlığında ise 28.6 mV** değerleri elde edilmiştir. DMAB'ın katyonik yapıda olması yüzey yükünün pozitif değer olmasına neden olmuştur. PVA varlığında hazırlanan boş PHBV partiküllerin negatif yüzey yükü değeri literatür ile uyumludur (Vilos vd. 2012).

4.3.4 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

PHBV ve BSA/PHBV partiküllerin fiziksel durumlarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen DSC analizine ilişkin termogramlar şekil 4.9'da sunulmuştur.



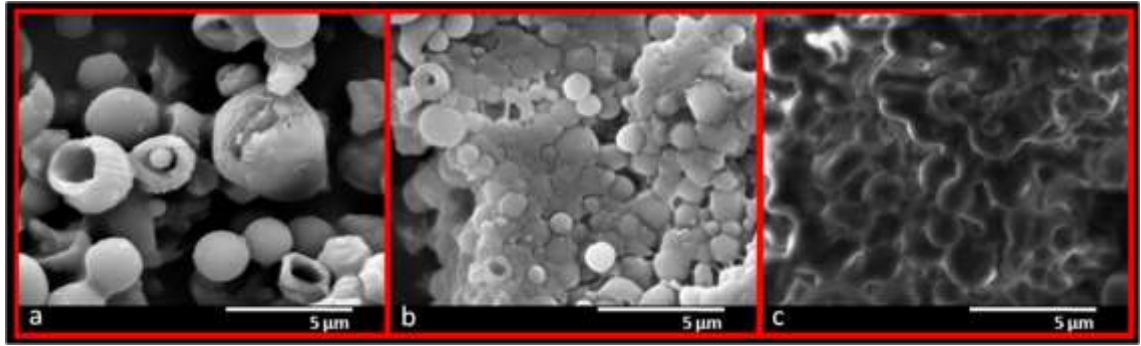
Şekil 4.9.a. BSA, b. PHBV, c. BSA/PHBV partiküllere ait DSC termogramları

Şekil 4.9'da yer alan BSA'ya ait termogram incelendiğinde 45.52 °C ve 216.11 °C'de iki adet endotermik pik olduğu görülmektedir. BSA yüklü PHBV partikülüne ait termogramda 45.52°C'de yer alan pikin kaybolması BSA'nın yapıya katıldığını doğrulamaktadır (Grillo vd. 2010). 216.11°C'de yer alan ikinci endotermik pikin

233.06 °C'ye kayması ise BSA'nın PHBV yapısına katılması ile oluşan van der Waals etkileşimi (hidrofobik etkileşim) ya da BSA'nın amino grupları ile PHBV'nin karbonil gruplarının etkileşimi sonucunda ortaya çıkması şeklinde açıklanabilir (Grillo vd. 2010).

4.3.5 PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları

Tez kapsamında kullanılan PHBV partiküllerin degradasyonu Bölüm 3.4.6'da açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve SEM analizi ile karakterize edilmiştir. Degradasyon çalışmalarına ait SEM görüntüleri şekil 4.10'da sunulmuştur.



Şekil 4.10 PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları

a. 3.gün (x20,000), b. 10. gün (x20,000) c. 21.gün (x20,000)

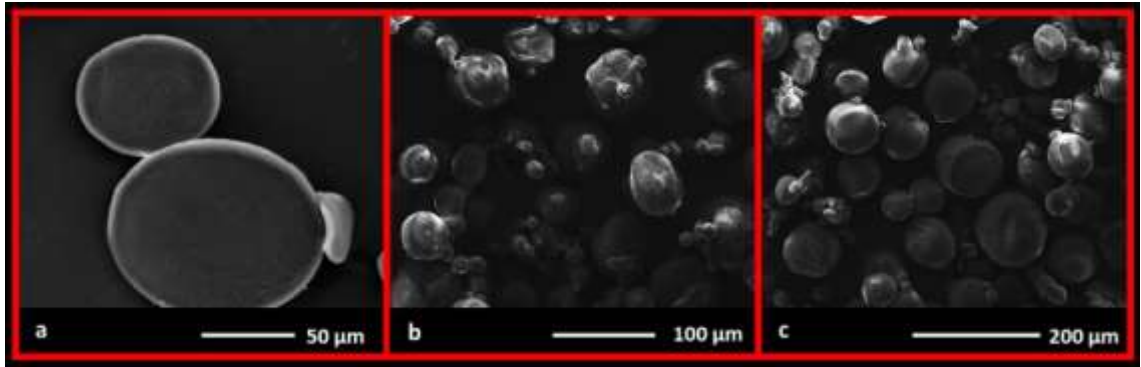
Şekil 4.10 incelendiğinde 3. günün sonunda partikül yapısında önemli bir değişim gözlenmezken (Şekil 4.10.a) 10. güne gelindiğinde partikül yapısında bozunmaların başladığı görülmüştür (Şekil 4.10.b). 21. günün sonunda partiküller yapısal kararlıklarını kaybederek koagüle agregatlar oluşturmuşlardır (Şekil 4.10.c). Poliester bazlı biyobozunur polimerlerin degradasyonu, suyun yapıya absorplanması ile başlayan yığın yapının degradasyonu ile gerçekleşmektedir. Suyun yapıya girmesiyle meydana gelen hidroliz sonucu polimer zincirinde bulunan ester bağları kopmakta ve mekanik bütünlük bozularak kütle kayıpları meydana gelmektedir. Poliester bazlı partikül sistemlerine enkapsüle edilmiş olan biyokatif moleküllerin salımı ise yığın yapıda oluşan bu degradasyona bağlıdır (Lao vd. 2011).

Tez çalışması kapsamında üretilen PHBV partiküllerin degradasyon çalışmalarında 21 gün sonunda mekanik bütünlüğün bozulup agregatların oluştuğu gözlenmiştir. Yılgor

vd. 2009 tarafından yapılan çalışmada da benzer olarak PHBV partiküllerin degradasyon çalışması 21 gün süre ile gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda mekanik bütünlüğün kaybolduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4.4 Jelatin Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında PDGF-BB'nin yükleneceği çapraz bağlı jelatin mikroküreler Bölüm 3.5'de açıklandığı şekilde sentezlenmiştir. Jelatin partiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında SEM, FTIR ve şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Jelatin mikrokürelere ait SEM görüntüleri şekil 4.11'de sunulmuştur.



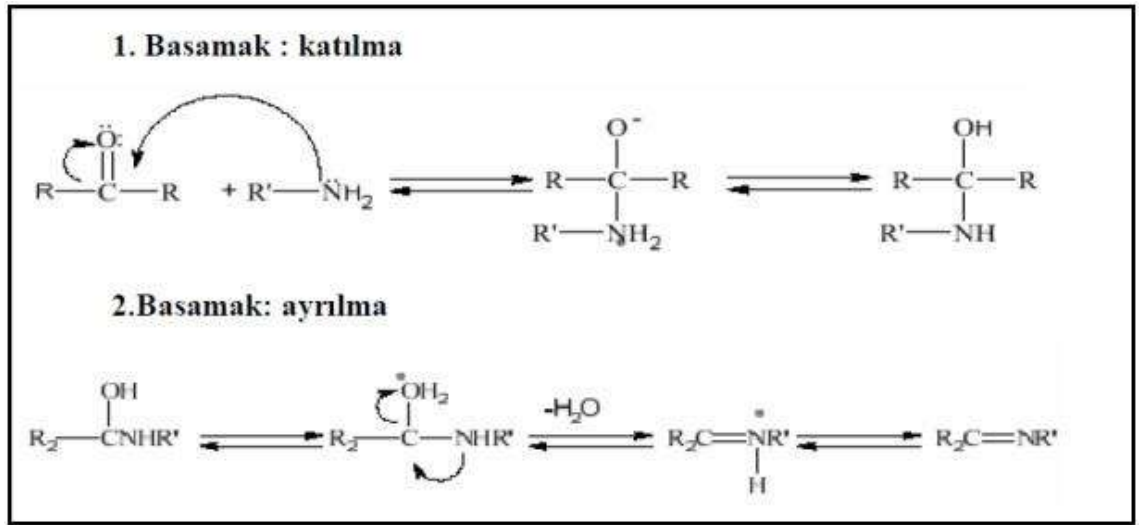
Şekil 4.11 Jelatin mikropartiküllerin SEM görüntüleri

a. (x2,000) b. (x750) c. (x500)

Tez çalışması kapsamında PDGF-BB büyüme faktörünün yükleneceği jelatin partiküller asidik jelatin (type B; pI = 4.7–5.2) kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrollü salım çalışmalarında asidik jelatin ve PDGF-BB (pI: 9.8) gibi bazik özellikler gösteren büyüme faktörleri arasında poli-iyon kompleksi oluşmakta ve ani salımlar engellenmektedir (Tabata ve Ikada 1998). Elde edilen jelatin partiküllerin ortalama partikül boyutu 50-100 µm arasında değişmektedir.

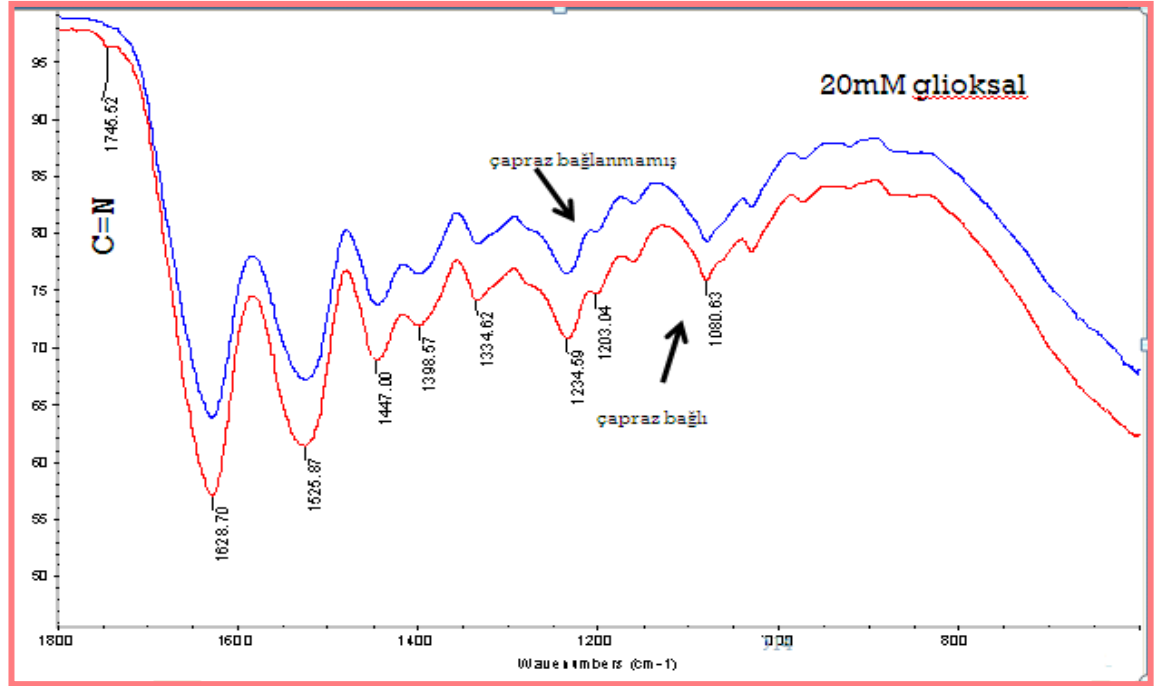
Jelatin partiküllerin sentezinde en önemli adım çapraz bağlanma reaksiyonunun gerçekleştiği adımdır. Jelatinin salım ve hücre kültür ortamları gibi sulu ortamlarda kararlılığının sağlanması ve çözünürlüğünün azaltılması amacıyla çapraz bağlayıcı ortamında reaksiyonun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Literatürde jelatinin çapraz bağlanmasında glutaraldehit ve glioksal gibi farklı çapraz bağlayıcı ajanlar

kullanılmaktadır (Patel vd. 2008, Kim vd. 2012). Tez çalışması kapsamında glutaraldehite göre daha az toksik olması nedeniyle glioksal kullanılmıştır. Jelatin partiküllerin glioksal ile çapraz bağlanma reaksiyonu *Schiff* bazları yolu ile meydana gelmektedir (Kim vd. 2012). *Schiff* bazlarının oluşumu jelatinin amino grupları ile glioksalin karbonil grupları arasındaki tepkime sonucu ortaya çıkmaktadır. *Schiff* bazları şekil 4.12’de gösterildiği şekilde katılma ve ayrılma tepkimeleri ile oluşur.



Şekil 4.12 *Schiff* bazlarının oluşum tepkimesi

Jelatinin çapraz bağlanma oranı taşıdığı biyomolekülün salım kinetiğini etkilemesi açısından önemlidir. Literatürde jelatinin çapraz bağlanma reaksiyonu için 10-50 mM arasında çapraz bağlayıcı derişimi kullanılmaktadır (Kim vd. 2012). Tez çalışması kapsamında çapraz bağlanma reaksiyonları 15 saat boyunca, 20 mM glioksal varlığında yürütülmüştür. 20 mM derişimde çağraz bağlayıcı çözeltisi jelatin partiküllerin mekanik bütünlüğünün ve büyüme faktörünün salımının sağlanmasında yeterli olmuştur. Çapraz bağlayıcı derişiminin artması büyüme faktörünün salınmasında engel oluşturabilmektedir. Düşük derişimler ise jelatin partikülün yapısal bütünlüğünün sağlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Elde edilen jelatin partiküllerin FTIR-ATR spektrumları şekil 4.13’de sunulmuştur.



Şekil 4.13 Jelatin mikrokürelere ait FTIR spektrumu

Çapraz bağlanmamış jelatin mikrokürelere ait FTIR spektrumu incelendiğinde $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yer alan amid I bandı C=O esneme vibrasyonundan kaynaklanmaktadır. $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısındaki amid II bandı ise C-N esneme ve N-H bükülme vibrasyonlarına aittir. Çapraz bağlı yapıda tüm pikler varlığını korurken, 1750 cm^{-1} dalga sayısında oluşan omuz *Schiff* bazlardan kaynaklanan C=N esnemesinden kaynaklanmaktadır (Kim vd. 2012). Spektruma ait veriler çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2 Çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlı jelatin partiküllere ait FTIR spektrumları

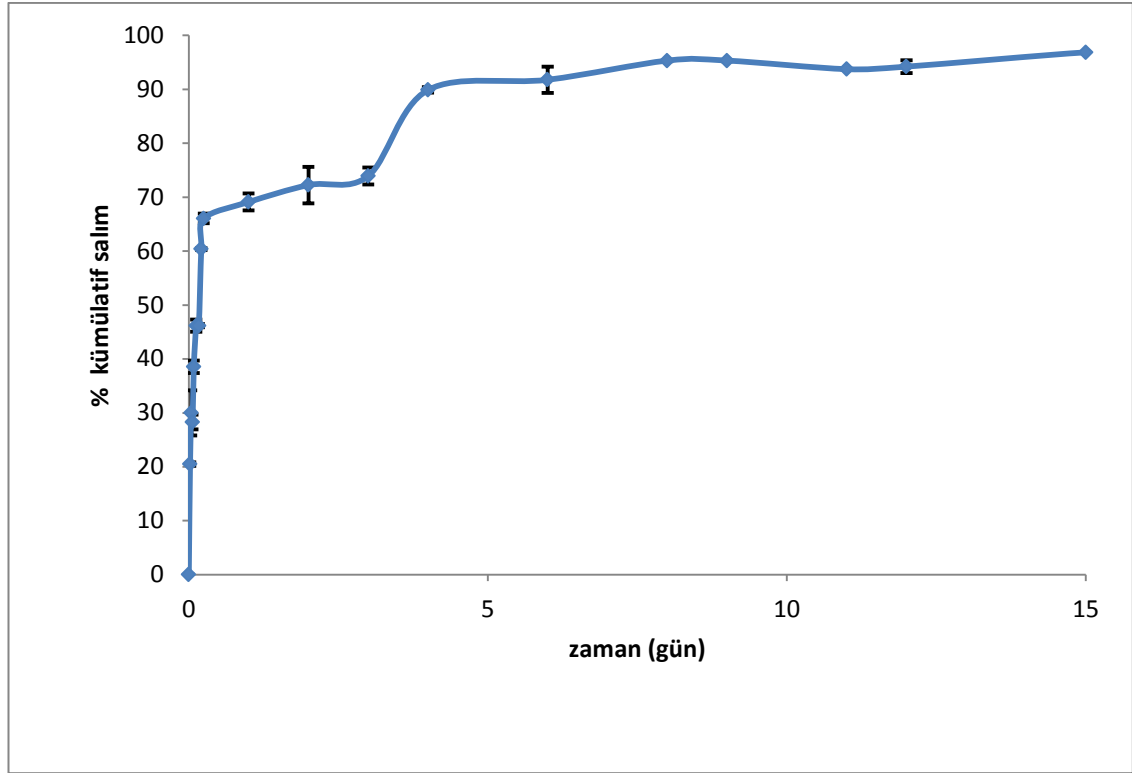
Jelatin Partikül	Tanımlama	Dalga sayısı (cm^{-1})
Çapraz bağlanmamış	C=O esneme vibrasyonu (Amid I) bandı	1650
	C-N esneme ve N-H bükülme (Amid II) bandı	1530
Çapraz bağlı	C=O esneme vibrasyonu (Amid I) bandı	1650
	C-N esneme ve N-H bükülme (Amid II) bandı	1530
	C=N esnemesi (<i>Schiff</i>) bazı	1750

Literatürde çapraz bağlayıcının denge şişme oranına etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı şişme oranlarının elde edildiği görülmektedir. Holland vd. 2003 tarafından yapılan çalışmada 10 mM ve 40 mM glutaraldehit varlığında denge şişme değerlerini sırasıyla 12.2 ± 0.9 ve 10.5 ± 0.4 ml su/g mikroküre olarak belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan ve 20 mM glioksal ile çapraz bağlanan jelatin partiküllerin su tutma kapasitesine ilişkin çalışmalar sonucunda denge şişme değeri 19.08 ± 1.86 ml su/g mikroküre olarak bulunmuştur. Jelatinin denge şişme değerinin belirlenmesi jelatin partiküllere yüklenmesi düşünülen PDGF-BB ile yürütülecek olan çalışmalarda önemlidir. Sunulan tez çalışması kapsamında jelatin partiküllere PDGF-BB yüklenmesi emdirme yoluyla gerçekleştirileceğinden partiküllerin denge şişme değerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Jelatin mikropartiküllere PDGF-BB yüklenmesinin öncesinde partikülden salım davranışının ve kinetiğinin belirlenmesi amacıyla model protein BSA ile çalışmalar yapılmıştır. Denge şişme değerine göre hazırlanan BSA çözeltisinin tamamının partiküllere emdirilmesi sağlanmış böylelikle enkapsülasyon verimliliği % 100 olarak alınmıştır.

4.5 PHBV ve Jelatin Partiküllerden BSA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak spesifik büyüme faktörlerinin sıralı salımının hedeflendiği tez çalışması kapsamında hücre üremesi ve farklılaşması üzerinde etkili olduğu bilinen PDGF-BB ve BMP-6 büyüme faktörlerinin sırasıyla jelatin ve PHBV partiküllere yüklenmesinin öncesinde model protein BSA varlığında salım kinetiğinin belirlenmesine yönelik ön çalışmalar yürütülmüştür. Yürütülen bu ön çalışmaların amacı, degradasyon hızları birbirinden farklı olarak seçilen PHBV ve jelatin partiküllere yüklenerek sıralı salım davranışının incelenmesi ve doğrulanmasıdır. Bu nedenle Bölüm 3.3 ve Bölüm 3.6.4'de açıklanan şekilde hazırlanan BSA yüklü PHBV ve jelatin partiküller kullanılmıştır. Salım ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler analizlenmiş ve kümülatif salım grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 4.14 BSA'nın PHBV partiküllerden salım grafiği

Şekil 4.14'de BSA'nın PHBV partiküllerden kümülatif salımı verilmiştir. Grafik incelendiğinde “*biphasic*” salım davranışı görülmektedir. “*Biphasic*”salımda erken dönemde, tamamen enkapsüle olmamış ve yüzeyde tutunmuş olan protein molekülleri ani salım davranışı gösterirken daha sonraki dönemlerde gerek difüzyon gerekse de degradasyon ile birlikte daha yavaş salım davranışı görülmektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlarda PHBV partiküllere yüklenen BSA'nın tamamının 15 günde salındığı belirlenmiştir.

Kinetik veriler incelendiğinde yüklenen BSA'nın başlangıçtaki ani salım (*burst release*) oranı % 46.18 ± 0.31 olarak bulunmuştur. 3. günün sonunda salınan BSA miktarı % 73.94 ± 1.57 olarak tespit edilmiş ve 15 günün sonunda bu oran yavaşlayarak % 96.08 ± 0.06 değerine ulaşmıştır. Erken dönemdeki yüksek salım değerleri BSA'nın hidrofilik yapısına bağlı olarak hidrofobik yapıdaki PHBV'ye tam olarak katılamaması ve yüzeye yakın proteinlerin erken dönemde hızla salınması olarak açıklanabilir. Geç dönemde ise BSA salım değerinin yavaşlayıp sabitlenmesi salım mekanizmasının

difüzyon ve degradasyona bağlı olduğu sonucunu vermektedir. Salım oranlarına ilişkin sayısal veriler incelendiğinde PHBV partikülden BSA salımının “*biphasic*” salıma uygunluğu doğrulanmaktadır. Literatürde BSA salım grafikleri incelendiğinde erken dönemlerdeki ani salımı takiben yavaş salım profilinin olduğu “*biphasic*” salım profillerine rastlanmaktadır (Sahoo vd. 2002).

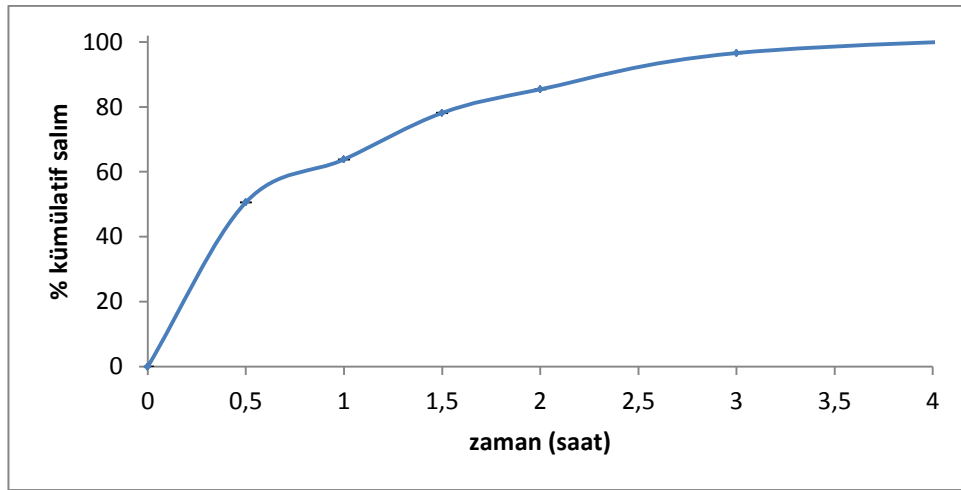
Partiküllerden salım mekanizmasının matematiksel analizi kapsamında sıfırncı mertebe, birinci mertebe, Higuchi ve Hixon-Crowell modelleri önerilmektedir (Hughes 2005, Gürsoy 2002). Genel olarak salım mekanizmasını belirlemek için, etken madde salımında sıfır ve birinci derece, Higuchi, Hixon-Crowell eşitliklerine uyum iyiliği (*goodness of fit*) testi yapılmaktadır. Partikülden salımda, salım üzerine etki eden matriks içindeki protein miktarının başlangıç derişimi, proteinin çözünürlüğü, gözeneklilik, kıvrım oranı (tortosite), çözücünün bileşimi ve matriksi oluşturan polimerin yapısı gibi pek çok parametre olduğundan *in vivo* çalışmalarda sıfırncı mertebe salım kinetiğinin genellikle elde edilemediği gözlenmektedir (Gürsoy 2002). Sıfırncı mertebeden meydana gelen bu sapma difüzyon mesafesinin değişimi ile açıklanmaktadır (Hui vd. 1987). Difüzyon bir başka deyişle Fick yasasına uyumlu olarak salım (Fickian difüzyon) ise Eşitlik 3.3’de verilen Higuchi denklemi ile ifade edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında da PHBV partiküllerin salım kinetiğinin belirlenmesine ilişkin yürütülen deneylerde alınan veriler çeşitli modellere uyarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda PHBV partikülden BSA salımına ilişkin olarak *in vitro* salım mekanizması belirlenmesinde Eşitlik 3.3’deki Higuchi denkleminin en uygun sonucu verdiği bulunmuştur.

PHBV partikülün salım kinetiğinin matematiksel analizinde salım çalışmasının erken dönemlerindeki veriler alınarak mekanizma belirlenmiştir. Salınan protein kesri M_t/M_∞ değerinin $t^{1/2}$ ’ye karşı grafiğe (EK 2 Şekil 1) geçirilmesi ile Higuchi zaman sabiti **$k=0.447 \text{ s}^{-1/2}$** olarak bulunmuştur ($R^2=0.984$). Bulunan k değeri literatürden (Yilgor vd. 2009, Bhatt ve Shah 2012) yüksek olmakla birlikte bunun nedeninin hidrofilik yapının hidrofobik yapıda taşıma zorluğundan kaynaklanmasıdır. Hidrofobik-hidrofilik salım

sistemlerinde hidrofobik yapının protein yükleme kapasitesinin kısıtlı olması ve buna bağlı olarak ani salımın gerçekleşmesi nedeniyle yüksek kinetik hız sabiti değerinin ortaya çıkması söz konusudur. Ayrıca kinetik çalışmalarda salımın erken dönemlerindeki veriler kullanıldığı için partikül içindeki protein miktarının doygunluk derişimi değerinden yüksek olması da kinetik hız sabiti değerinin yüksek olmasına neden olmaktadır (Gürsoy 2002).

Jelatin partiküllerden BSA salım çalışmaları PHBV ile aynı şekilde ve eş zamanlı alınan örnekler ile gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örneklerin analizlenmesi ile elde edilen kümülatif salım grafiğı şekil 4.15’de sunulmuştur.

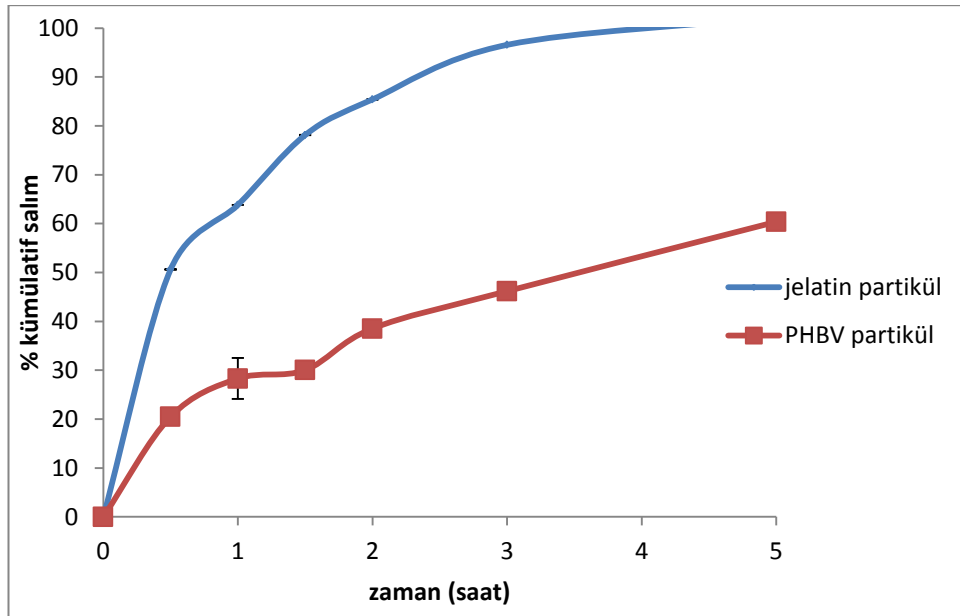


Şekil 4.15 BSA'nın jelatin partiküllerden salım grafiğı

Jelatin partiküllerden salım kinetiğinin matematiksel analizini gerçekleştirmek üzere Eşitlik 3.4'deki denklem kullanılmıştır. Bu eşitlik *Fick* yasasından sapmaya ilişkin olarak salım kinetiğı belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu tür salım kinetiğinde protein polimer fazdan difüzlenemez ancak çözücü polimer matriksine girince polimer şişer ve camsı geçiş sıcaklığı deney sıcaklığının altına düşerek şişen polimer proteinin difüzyonuna izin verir. Bu camsı polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde olan salım Eşitlik 3.4 ile ifade edilir. Buradaki k ve n değerlerine bağlı olarak salım mekanizması belirlenir. $n=0.5$ olduğunda *Fickian* Difüzyon $0.5 < n < 1$ iken

Non-Fickian $n=1$ iken zamandan bağımsız (0. derece) salım olan “*Case II*” ve $n>1$ iken “*Super Case II*” olduğu sonucuna varılır (Gürsoy 2002).

Tez çalışması kapsamında elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan grafikten $n=2.259$ ve $k=2.55$ olarak bulunmuştur (EK 2, Şekil 2). Verilere göre *Super Case II* salım kinetiğine sahip olan jelatin mikrokürelerin şişmeye bağlı olarak hızlı bir salım yaptığı doğrulanmıştır. Şekil 4.15’deki jelatin partiküllerden BSA salım grafiği incelendiğinde “*biphasic*” salım profilinin olduğu gözlenmektedir. “*Biphasic*” salım profilinde 1. saate kadar meydana gelen ani salım daha sonraki zamanlarda yavaşlayarak yaklaşık 4. saatte sabitlenmiştir. PHBV ve jelatin partiküllerden BSA salım çalışmalarına ilişkin olarak elde edilen şekil 4.14 - 4.15’deki grafikler incelendiğinde PHBV partiküllerden yaklaşık 15 günde, jelatin partiküllerden ise 4-5 saat gibi kısa bir sürede salımın tamamlandığı görülmüştür. Degradasyon hızları ve salım mekanizmalarının farklı olmasına bağlı olarak PHBV ve jelatin partiküllerden elde edilen BSA salım profilleri (Şekil 4.16) çalışmada kullanılması hedeflenen BMP-6 ve PDGF-BB büyüme faktörleri için model oluşturmaktadır.



Şekil 4.16 BSA'nın PHBV ve jelatin partiküllerden sıralı salımı

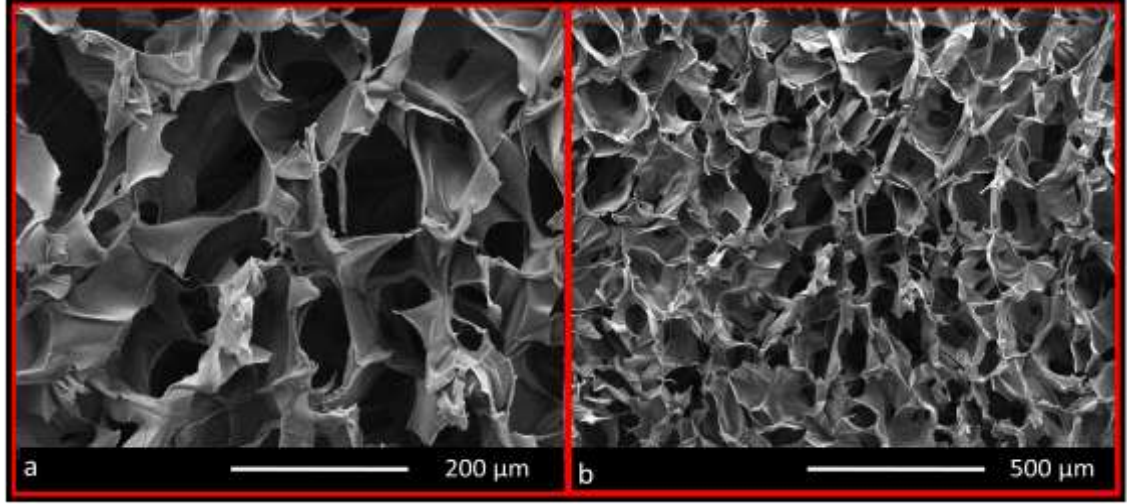
BSA ile yürütülen salım çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre hücre üremesi ve göçü üzerinde etkili olduğu bilinen PDGF-BB erken dönemde salınması amacıyla jelatin partiküllere hücrelerin farklılaşma davranışı üzerinde etkili olduğu bilinen BMP-6 ise PDGF-BB'yi takiben salınması için PHBV partiküllere yüklenmiştir.

4.6 Kitosan-Temelli Doku İskelelerinin Hazırlanması

Kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak kullanılan 3 boyutlu biyobozunur kitosan doku iskeleleri Bölüm 3.9'da açıklandığı şekilde dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır.

Katyonik polimer olan kitosanın, yapısal olarak hücre dışı matriksin önemli bileşenlerinden olan glikozaminoglikan yapısına benzerlik göstermesi hücre morfolojisi ve hücresel fonksiyonların kontrol edilmesinde oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan doku iskelelerinin yüksek içsel bağlantıya (*interconnectivity*) ve kontrol edilebilir biyobozunurluk derecesine sahip olması istenmektedir (Tıǧlı vd. 2007). Doku mühendisliği uygulamalarında kitosanın doku destek malzemesi olarak seçilmesinde biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi biyoyumluluğu, antibakteriyel, hidrofilik özellikleri ve enzimatik olarak parçalanabilmesi gibi parametreler en önemli nedenler arasındadır (Khor ve Lim 2003). Spesifik olarak kitosanın osteokondüktif özellikleri de kemik doku mühendisliği uygulamalarında geniş yer tutmasına olanak sağlamaktadır (Çetin 2010).

Tez çalışması kapsamında >% 85 DD'ne sahip kitosan kullanılarak doku iskeleleri hazırlanmıştır. Elde edilen kitosan doku iskelelerine ait SEM görüntüleri şekil 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.17 Kitosan doku iskeleleri

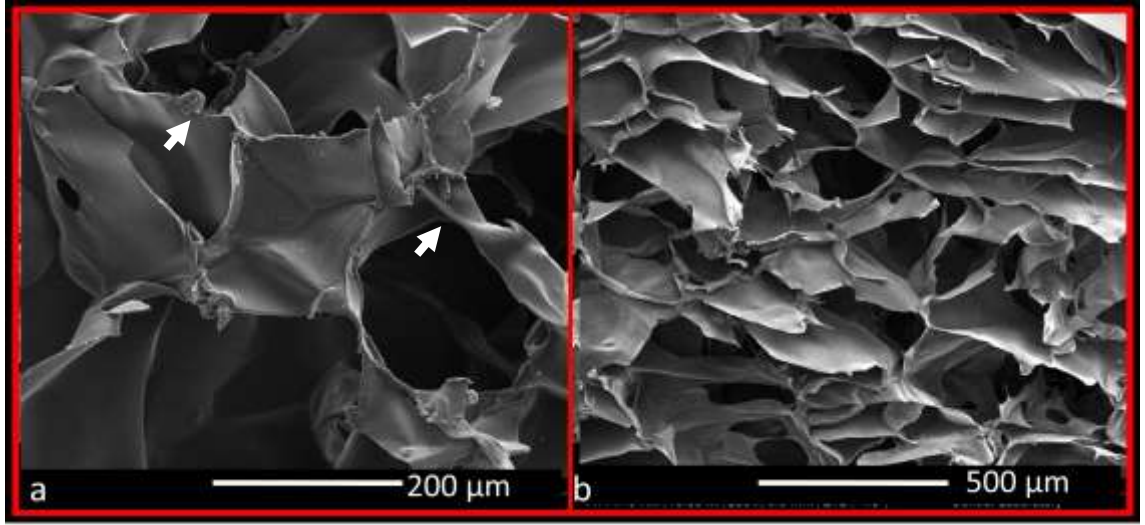
a. (x500), b. (x200)

Elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen kitosan doku iskelelerinin içsel bağlantılı ve gözenekli yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ortalama gözenek boyut dağılımının J Microvision programı ile yapılan değerlendirmede 100-200 µm aralığında değiştiği gözlenmiştir. Gözenek boyut dağılımı, hücre yapışması ve kemik büyümesi için uygundur (Li vd. 2005).

4.7 BMP-6/PHBV ve PDGF-BB/Jelatin Partiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi

4.7.1 BMP-6/PHBV partiküllerin kitosan doku iskelesine yüklenmesi

BMP-6 içeren PHBV (BMP-6/PHBV) partiküllerin doku iskelelerine yüklenmesi Bölüm 3.10.1’de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. BMP-6/PHBV partikül yüklü kitosan doku iskelelerine ilişkin SEM görüntüleri şekil 4.18’de sunulmuştur.



Şekil 4.18 BMP-6/PHBV yüklü doku iskeleleri

a. (x500) , b. (x200)

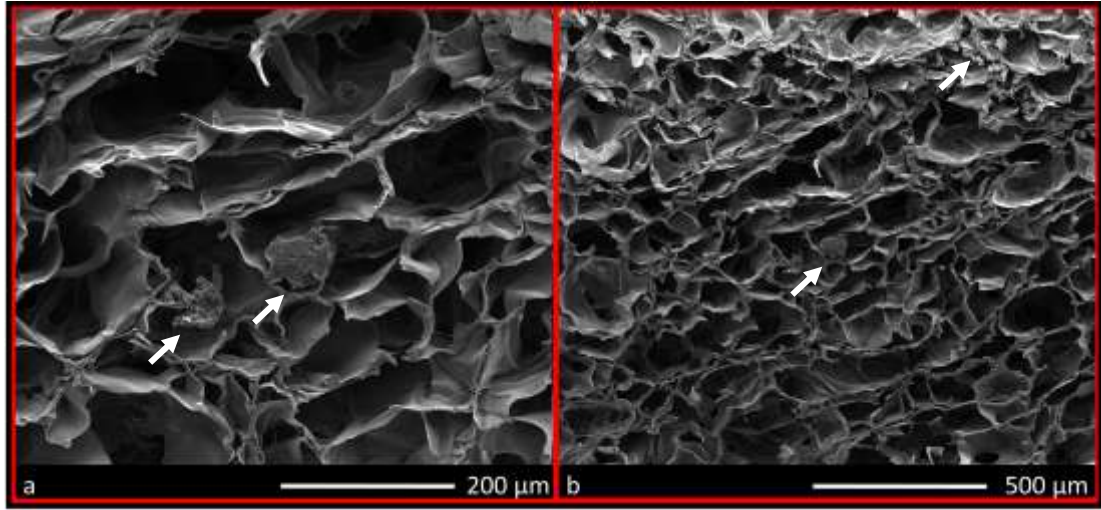
Mikro ve nanopartiküllerin doku iskelelerine yüklenerek hazırlandığı taşıma sistemlerinde karşılaşılan en önemli problemlerden birisi partiküllerin agregasyonudur. Bu durumun üstesinden gelmek için kullanılan yöntem partiküllerin doku iskelesine üretim aşamasında eklenmesidir (Perets vd. 2003).

Şekil 4.18 incelendiğinde doku iskelelerinin üretimi sırasında kitosan çözeltisine karıştırılmış olan PHBV partiküllerin doku iskelelerinin gözenek duvarı içerisinde homojen olarak dağıldığı gözlenmektedir. Bunun yanı sıra, PHBV partikül varlığında kitosan doku iskelelerinin içsel bağlantılılığının korunduğu belirlenmiştir. Şekil 4.18.b - 4.17.b karşılaştırıldığında PHBV varlığında kitosan doku iskelelerinin gözenek boyutunun arttığı ve homojenlikten saptığı görülmektedir.

Genel olarak dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan doku iskelelerinde, hidrofobik yapıdaki mikrokürelerin yüzeyindeki su moleküllerinin dondurulup kurutulması sonucu doku iskelesinde boyut dağılımının değiştiği gözlenmektedir. Üretim aşamasında eklenen hidrofobik yapıdaki PHBV partiküller tarafından oluşturulan güçlü itme kuvvetleri de oluşan sterik etkiye bağlı olarak doku iskelesinin mikro yapısını değiştirmektedir (Banerjee vd. 2009).

4.7.2 PDGF-BB/JelatinPartiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi

PDGF-BB içeren jelatin partiküller kitosan doku iskelesine Bölüm 3.10.2’de açıklandığı şekilde emdirme yöntemiyle yüklenmiştir. Kitosan kitinin kısmi olarak deasetilasyonu sonucu oluşmaktadır. Deasetilasyon sonucunda yapıdaki asetamit birincil amin grubuna dönüşmekte ve buna bağlı olarak kitosan hidrofilik karakter kazanmaktadır. Bu nedenle hidrofilik karakterde olan mikropartiküllerin yüzeyden emdirilmesi üretim aşamasındaki yüklemeye göre daha uygundur. PDGF-BB/Jelatin partiküllerin doku iskelesine emdirilmesiyle elde edilen SEM görüntüleri şekil 4.19’da sunulmuştur.



Şekil 4.19 Jelatin yüklü kitosan doku iskeleleri

a. (x500), b. (x200)

Şekil 4.19 incelendiğinde çapraz bağlı jelatin partiküllerin yapıya başarılı bir şekilde katıldığı görülmektedir. Literatürde biyoaktif moleküllerin kontrollü salımının sağlanması amacıyla çeşitli çalışmalar yer almaktadır Bu çalışmaların bazılarında jelatin üretim aşamasında ortama eklenirken sınırlı sayıda olan çalışmalarda emdirilerek yükleme yöntemi kullanılmıştır (Patel vd. 2008, Kim vd. 2012). Jelatin partiküllerin kitosan doku iskelesine emdirilerek yüklenmesi partiküllerin herhangi bir mekanik etki varlığında yapısının bozulmasını engellemesi açısından tercih edilen bir yöntemdir. Diğer taraftan sıralı salım çalışmalarında jelatinin yüzeye yakın kısımlara yerleştirilmesiyle erken dönemde salınmasını sağlamaktadır.

4.8 Kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışmaları

Büyüme faktörlerinin sıralı salımının hedeflendiği tez çalışması kapsamında Bölüm 3.11’de açıklanan şekilde boş kitosan **CS**, PDGF-BB içeren jelatin partiküllerin yer aldığı kitosan **CS/PDGF-BB**, BMP-6 içeren PHBV partiküllerin yer aldığı kitosan **CS/BMP-6** ve PDGF-BB içeren jelatin partiküller ile BMP-6 içeren PHBV partiküllerin yer aldığı kitosan **CS/PDGF-BB+BMP-6** grupları için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında partiküller varlığında kitosan doku iskelelerinin davranışına ilişkin elde edilen sonuçlar aşağıdaki bölümlerde sunulmuştur.

4.8.1 Gözenek boyut dağılımı

Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı analizleri Bölüm 3.11.1’de açıklandığı şekilde civa porozimetresi ile gerçekleştirilmiştir. Üretilen kitosan doku iskeleleri için gözenek boyut dağılımı histogramları (EK 3, Şekil 1)’ de sunulmuştur. Histogramlardan elde edilen gözenek boyut dağılımı değerleri çizelge 4.3’de sunulmuştur.

Çizelge 4.3 Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı

Doku iskelesi	Gözenek dağılımı (μm)
CS	30-150
CS/PDGF-BB	10-50
CS/BMP-6	40-200
CS/PDGF-BB+BMP-6	5-50

Kitosan doku iskelesi ve partiküllerin bulunduğu diğer gruplara ait histogramlarda çok küçük gözenek boyutlarının bulunması içsel bağlantının olduğu sonucunu

doğrulamaktadır. CS/BMP-6 doku iskeleleri boş kitosan ile kıyaslanıldığında CS/BMP-6 doku iskelesinin daha yüksek gözenek boyutuna sahip olduğu görülmektedir (40-200 μ m). PHBV'nin üretim aşamasında yapıya katılması ile elde edilen yapıda meydana gelen sterik etki sonucu CS doku iskelesinden daha büyük gözeneklere sahip yapı ortaya çıkmıştır. Jelatin partiküllerin mikron boyutunda olması (50-100 μ m) ve doku iskelelerinin üretiminden sonra emdirme yöntemi ile yüklenmesi sonucunda doku iskelelerinin gözeneklerini tıkadığı sonucuna ulaşılmıştır. Jelatin partikülleri içeren CS/PDGF-BB ve CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskelelerinde en düşük gözenek boyutu elde edilmiştir.

4.8.2 Mekanik dayanım testi

Mekanik dayanım değerleri hedef dokulara bağlı olarak değişmekle birlikte kemik doku mühendisliği uygulamalarında elde edilen yapıların mekanik dayanımı oldukça önemlidir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımının test edilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde 100 N yük, 2 mm/dk hızda örnekler üzerine uygulanmıştır. Elde edilen gerilim gerinim eğrilerinin doğrusal bölgesinin eğiminden elastik modül değerleri hesaplanmıştır. Doku iskelelerinin elastik modülüne ilişkin sonuçlar çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Kitosan doku iskelelerinin elastik modülü

Doku iskelesi	Elastik modül (kPa)
CS	3.04 $\pm$ 0.73
CS/PDGF-BB	9.72 $\pm$ 2.53
CS/BMP-6	2.13 $\pm$ 0.17
CS/PDGF-BB+BMP-6	2.90 $\pm$ 1.08

Çizelge 4.4 incelendiğinde CS/PDGF-BB doku iskelelerinin mekanik dayanımının diğer gruplara göre yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum jelatin içeren kitosan doku iskelelerinin düşük gözenek boyutuna (10-50 μm) bağlı olarak daha dayanıklı yapı oluşturması şeklinde yorumlanabilir. PHBV içeren yapıların düşük elastik modül değerleri ise PHBV'nin yüksek kristalinitesi ve kolay kırılabilirliğinden kaynaklanmaktadır (Chen vd. 2002, Choi vd. 2004). Bunun yanı sıra PHBV içeren grupların jelatin içeren gruplara göre daha yüksek gözenek boyutu da mekanik dayanımını azaltıcı yönde etkileyen bir parametre olarak düşünülebilir.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde kitosan ve partikül içeren kitosan yapıların mekanik dayanımına ilişkin olarak çok geniş aralıklarda (0.0038-2.56 MPa ve 0.059-0.125 MPa) değerler olduğu görülmüştür (Li vd. 2005, Subramanian vd. 2005, Hsieh vd. 2007, Nanadagiri vd. 2011, Jana vd. 2012, Kavva vd. 2013).

Bu çalışmalarda yapının mekanik dayanımının, özellikle gözenek yapısı ve içsel bağlantılılık gibi parametrelerden etkilendiği yönünde sonuçlar yer almaktadır. Literatürde mekanik dayanım değeri 0.035 MPa'dan düşük olan hidrate haldeki kitosan doku iskelelerinde yapının ortamdaki suyu absorplaması sonucunda mekanik dayanımın azaldığı sonucuna yer verilmektedir (Tanır vd. 2014). Diğer taraftan kitosan doku iskelelerinin gözenek boyutundaki artış da yapının mekanik dayanımının azalmasına neden olmaktadır (Karageorgiu ve Kaplan 2005). Tez çalışması kapsamında yapılan gözenek boyut dağılımı analizleri ile elastik modül değerlerinin uyumlu olarak değiştiği görülmüştür. Ek 3'de yer alan histogramlar incelendiğinde gözenek boyutu yüksek olan PHBV içeren kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımı düşük çıkmıştır (2.13 ± 0.17 kPa).

4.8.3 Su tutma kapasitesi

Tez çalışması kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin su tutma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.11.3'de açıklandığı şekilde şişme deneyleri yapılmıştır. Doku iskelelerinin belli oranda su tutma kapasitesi özellikle hücre kültür deneylerinde besin ve metabolitlerin ortama alınması için önemlidir. Deneysel çalışmalar kapsamında

hazırlanan kitosan doku iskelelerinin denge şişme değerine ilişkin sonuçlar çizelge 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.5 Kitosan doku iskelelerinin denge şişme değeri

Doku iskelesi	Denge şişme değeri
CS	19.86±1.70
CS/PDGF-BB	6.45±0.26
CS/BMP-6	24.22±1.20
CS/PDGF-BB+BMP-6	6.41±1.10

Çizelge 4.5 incelendiğinde yapıda jelatin partiküllerin bulunması (CS/PDGF-BB ve CS/PDGF-BB/BMP-6) şişme oranını azaltırken PHBV partiküllerin varlığının (CS/BMP-6) şişme oranının artmasına neden olduğu görülmektedir. PHBV partiküllerin üretim aşamasında kitosan doku iskelesine eklenmesiyle gözeneklerin ve içsel bağlantılı yapının stabilitesi artmış ve böylece su absorplama hızları ve kapasitelerinde artış meydana gelmiştir. Jelatin partiküller varlığında denge şişme değerinin düşmesi ise hidrofilik yapıdaki jelatin partiküllerin ortamdaki suyu absorplayarak şişmesi ve kitosan doku iskelelerinin gözeneklerini tıkamasından kaynaklanmaktadır.

Genel olarak kitosan doku iskelelerinin su tutma kapasitesi mekanik dayanımı ve gözenekliliği gibi pek çok parametreden etkilenmektedir (Tanır vd. 2014). Hidrate olmuş yapıların mekanik dayanımının azalması yüksek su tutma kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Su molekülleri kitosan doku iskelelerinde plastikleştirici etkisine neden olduğundan mekanik dayanımı azaltmaktadır. Elde edilen denge şişme değerlerine göre CS/PDGF-BB ve CS/PDGF-BB/BMP-6 doku iskelelerinin düşük şişme oranları mekanik olarak daha kuvvetli bir yapının elde edildiği sonucunu doğrulamaktadır.

Bu sonuç Çizelge 4.4’de elde edilen mekanik dayanım sonuçları ile uyumludur. Bunun yanı sıra EK 3 Şekil 1’de yer alan gözenek boyut dağılımı grafikleri incelendiğinde CS/PDGF-BB doku iskelelerinin CS ve CS/BMP-6’ya göre daha küçük gözenek boyut dağılımına sahip olması denge şişme oranının düşük olmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra jelatin içeren doku iskelelerinde jelatinin şişmesine bağlı olarak gözenekleri tıkanması nedeniyle de denge şişme oranı değeri düşük olarak elde edilmiştir.

4.8.4 Yoğunluk tayini

Kitosan temelli doku iskelelerinin yoğunluk tayini Bölüm 3.11.4’de açıklandığı şekilde çözücü yer değiştirme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Kitosan doku iskelelerinin yoğunluk değerlerine ilişkin sonuçlar çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6 Doku iskelelerinin yoğunluk değerleri

Doku iskelesi	Yoğunluk (g/ml)
CS	0.096±0.03
CS/PDGF-BB	0.15±0.02
CS/BMP-6	0.17±0.05
CS/PDGF-BB+BMP-6	0.18±0.02

Çizelge 4.6 incelendiğinde partikül içeren doku iskelelerinin yoğunluk değeri boş kitosandan yüksek olmakla birlikte jelatin ya da PHBV partikülün varlığı gruplar arasında yoğunluk değerinde önemli ölçüde farklılığa neden olmamıştır.

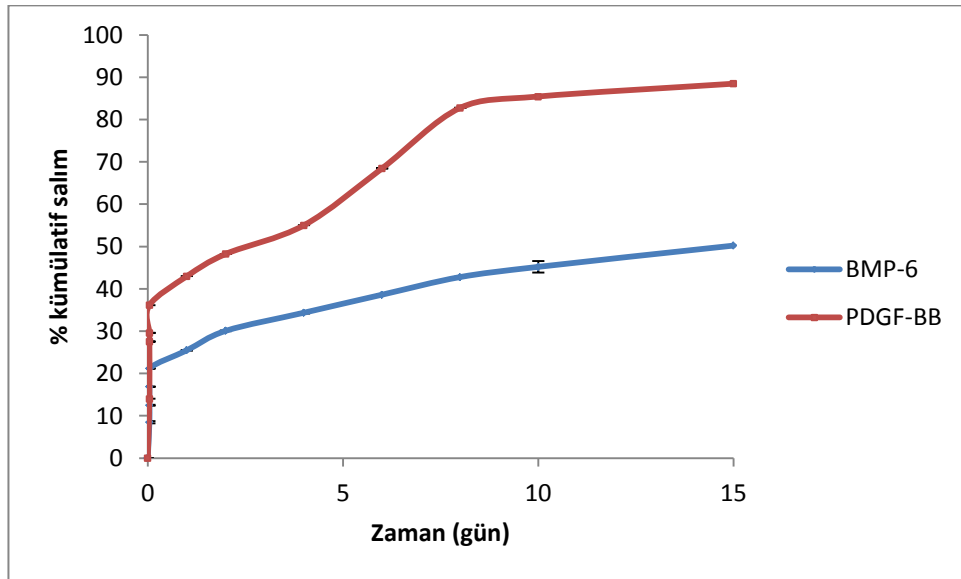
Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen kitosan doku iskelelerine ait temel özellikler çizelge 4.7’de toplu halde özetlenmiştir.

Çizelge 4.7 Kitosan-temelli doku iskelelerine ait özellikler

Doku iskelesi	Gözenek boyutu (μm)	Denge şişme değeri	Elastik modül (kPa)	Yoğunluk (g/ml)
CS	30-150	19.86 $\pm$ 1.70	3.04 $\pm$ 0.73	0.096 $\pm$ 0.03
CS/PDGF-BB	10-50	6.45 $\pm$ 0.26	9.72 $\pm$ 2.53	0.15 $\pm$ 0.02
CS/BMP-6	40-200	24.22 $\pm$ 1.20	2.13 $\pm$ 0.17	0.17 $\pm$ 0.05
CS/PDGF BB+BMP-6	5-50	6.41 $\pm$ 1.10	2.90 $\pm$ 1.08	0.18 $\pm$ 0.02

4.9 Kitosan Doku İskelelerinden PDGF-BB ve BMP-6 Salımı

PDGF-BB ve BMP-6 büyüme faktörlerinin kitosan doku iskelelerinden salımı Bölüm 3.12’de açıklandığı şekilde ELISA testi ile takip edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerden 450 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine karşılık gelen derişim miktarları hesaplanarak kümülatif salım değerlerine geçilmiştir. Salım deneyleri 21 gün boyunca sürdürülmüştür. PDGF-BB ve BMP-6 sıralı salımına ilişkin olarak elde edilen kümülatif salım grafiğı şekil 4.20’de sunulmuştur.



Şekil 4.20 BMP-6 ve PDGF-BB'nin kitosan doku iskelelerinden salımı

Şekil 4.20 incelendiğinde degradasyon hızı PHBV'ye göre yüksek olduğu bilinen jelatin partiküllerden salım yaklaşık 7 günde tamamlanmıştır. Bu sonuç Bölüm 4.5’de yer alan BSA varlığında elde edilen salım süresinden (4 saat) yüksektir. Bunun nedeni bazik karakterli PDGF-BB'nin asidik karakterli jelatin partiküller arasında poli-iyon

kompleksi oluşturmasına bağlı olarak açıklanabilir. BMP-6 ya ilişkin değerler incelendiğinde ise 15. günde kümülatif olarak 50.21 ± 0.12 oranında salım gerçekleşmiştir. Elde edilen bu sonuç model protein BSA varlığında elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Ayrıca jelatinin şişme kontrollü salım mekanizması nedeniyle kısa zamanda degradasyon gerçekleşip salım tamamlanmaktadır. PHBV partiküllerden ise erken dönemde yzeyeye yakın olan BMP-6 molekülleri hızla salınmakta ve sonrasında salım difüzyon ve degradasyon kontrollü olarak devam etmektedir. Literatürde degradasyon hızlarının birbirinden farklı olduğu PLGA ve PHBV yapılarında da benzer olarak sıralı salım profilleri elde edilmiştir. Yilgor vd. 2009 çalışmasında degradasyon hızı birbirinden farklı olan PLGA ve PHBV partiküllere sırasıyla BMP-2 ve BMP-7 yüklemiştir. Kümülatif salım grafikleri incelendiğinde degradasyon hızı yüksek olan PLGA'dan BMP-2'nin 21 günde tam olarak salındığı gözlenirken PHBV'den BMP-7 salım oranı kümülatif olarak yaklaşık %60 oranında gözlenmiştir.

Literatürde yer alan yayınlarda sıralı salımın takibine yönelik olarak doku iskelelerinin farklı şekillerde polimer kombinasyonlarından hazırlanması söz konusu olmaktadır. Bunlardan en sık tercih edileni doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak kullanılan doku iskelesine direk yükleme ya da partiküller varlığında kitosan doku iskelelerinden salım çalışmalarıdır (Kim vd. 2012, Raiche ve Puelo 2004, Kempen vd. 2009, Kanczler vd. 2010, De la Riva vd. 2010). Kim vd. 2012 tarafından yapılan çalışmada kitosan doku iskelelerinden BMP-2 ve IGF-1'in sıralı salımına ilişkin olarak BMP-2' direk olarak kitosan doku iskelesine yüklenirken IGF-1 jelatin partiküller içerisinde kitosan doku iskelesine yüklenmiştir. Elde edilen kümülatif salım grafikleri incelendiğinde kitosan doku iskelesi ortamında bulunan BMP-2'nin IGF-1'e göre hızlı salındığı sonucu elde edilmiştir. Kempen vd. (2009) tarafından yapılan diğer bir alışmadax kemik doku mühendisliğine yönelik olarak damar oluşumu üzerine etkili olduğu bilinen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile kemik oluşumu üzerine etkisi olduğu bilinen BMP-2'nin sıralı salım kinetiğini incelenmiş ve degradasyon hızı PLGA'ya göre yüksek olan jelatinde bulunan VEGF'in daha kısa sürede salındığı sonucuna ulaşılmıştır. De la Riva vd. 2010 çalışmasında kalsiyum fosfat içeren kitosan doku iskelesine VEGF ve PDGF yükleyerek sıralı salım kinetiğini takip etmiştir. Sıralı

salım mekanizmasını oluşturmak için VEGF aljinat mikrokürelere, PDGF ise direk olarak doku iskelesine yüklenmiştir. PDGF'in direk olarak doku iskelesinde olması sebebiyle VEGF'e göre daha hızlı salındığı sonucu elde edilmiştir.

In vivo koşullardaki kemik doku rejenerasyonunda, yaralı dokunun iyileşme süreci genel olarak büyüme faktörlerinin sıralı salımına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Salım kinetiği çalışmalarında büyüme faktörlerinin direk olarak doku iskelesine yüklenmesi erken dönemde salımı sağlayabilirken, büyüme faktörlerinin yarılanma sürelerinin kısa olmasına bağlı olarak hedef dokuya ulaşabilme potansiyellerinde azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında kemik doku rejenerasyonuna yönelik seçilen büyüme faktörleri jelatin ve PHBV partiküllere yüklendikten sonra doku iskelesine yüklenmiştir.

Şekil 4.20'de sunulan ve farklı salım hızlarını gösteren grafik jelatin partiküllere yüklenen ve hücre göçü ve çoğalmasını sağlayan PDGF-BB'nin erken dönemde salındığını, hücre farklılaşması üzerine etkili olan ve PHBV partiküllere yüklenen BMP-6'nın daha geç dönemde salındığını göstermektedir. Bu durum *in vivo* koşullardaki kemik rejenerasyonunu taklit eder niteliktedir.

4.10 Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları Bölüm 3.11'de açıklanan şekilde boş kitosan (**CS**), PDGF-BB içeren jelatin partiküllerin yüklendiği kitosan (**CS/PDGF-BB**), BMP-6 içeren PHBV partiküllerin yüklendiği kitosan (**CS/BMP-6**) ve BMP-6 içeren PHBV ile PDGF-BB içeren jelatin partiküllerin birlikte bulunduğu kitosan doku iskeleri (**CS/PDGF-BB+BMP-6**) ile yürütülmüştür. Preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile 21 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yapılmıştır.

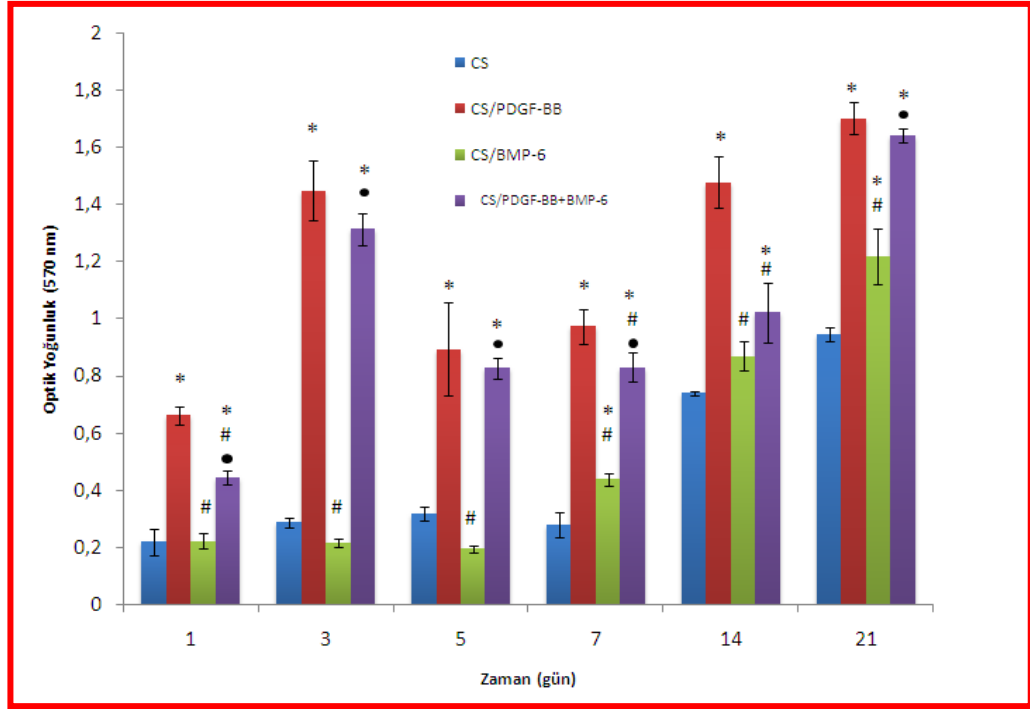
Doku iskelelerine yüklenmesi gereken BMP-6 ve PDGF-BB miktarının belirlenmesinde literatürdeki değerler esas alınmıştır (Soran 2006, Yilgor vd. 2009). Çalışma kapsamında 10x2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelesinde yaklaşık 100 ng BMP-

6 içeren 2 mg PHBV partikül ve yaklaşık 100 ng PDGF-BB içeren 1.5 mg jelatin yüklenmiştir.

Hücre kültürü süresince yapılan analizler ile preosteoblastik hücrelerin kitosan temelli doku iskeleleri üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları incelenmiştir. PDGF-BB ve BMP-6 büyüme faktörlerini tek başlarına ve birlikte kullanıldığı durumlarda hücresel davranışlara olan etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4.10.1 MTT analizi

MC3T3-E1 pre-osteoblast hücrelerin kitosan doku iskelelerindeki üremesi 21 günlük kültür periyodunda Bölüm 3.13.2’de açıklanan mitokondriyal aktivitenin belirlendiği MTT analizi ile incelenmiştir. Aktif metabolizmaya sahip hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerinin oluşumunu sağlamaktadır. MTT’nin formazana indirgenme mekanizması net olarak açıklanmamasına karşın NAD(P)-H bağımlı oksidoredüktaz enzimi varlığında pozitif yüklü MTT’nin indirgenmesi gerçekleşmektedir (Vistica vd. 1991). MTT’nin aktif metabolizmaya sahip hücre varlığında formazan kristallerine indirgenmesi sonucu oluşan mor renkli çözeltinin absorbansı üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile orantılıdır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen MTT analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm’de belirlenen optik yoğunluk değerleri cinsinden şekil 4.21’de sunulmuştur.



Şekil 4.21 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken * $p<0.05$; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken # $p<0.05$; kontrol grubu CS/BMP-6 iken • $p<0.05$)

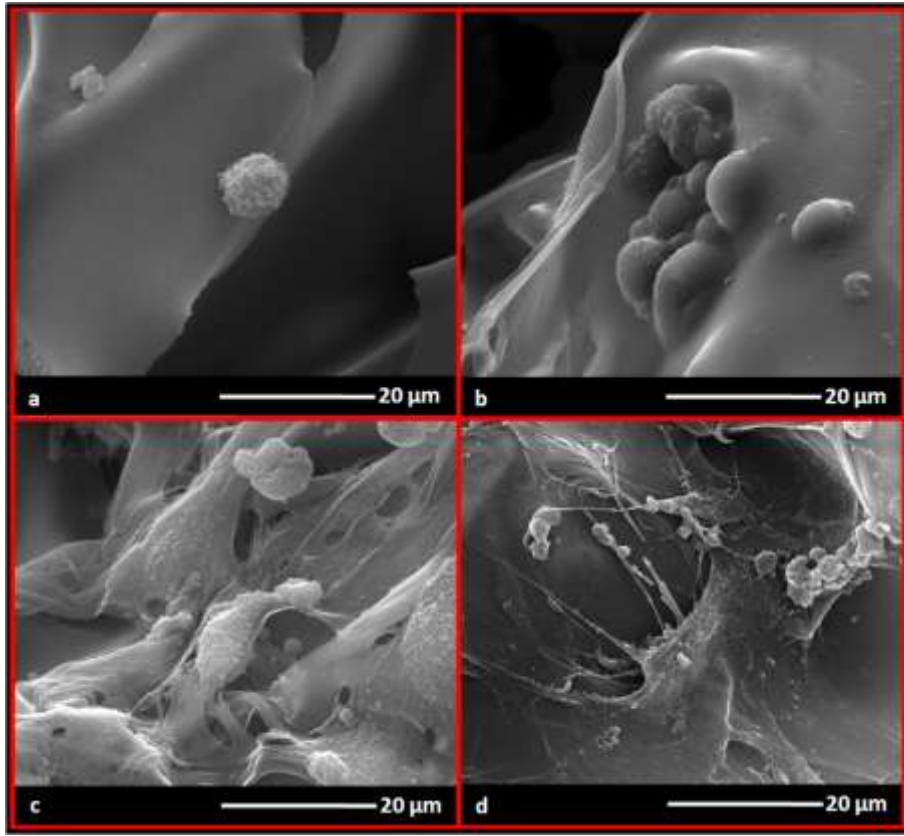
Doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalarda hücre canlılığının belirlendiği MTT analizinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde her dört iskelenin de hücrelerin tutunup çoğalmasına uygun olduğu görülmektedir. Bu sonuç üç boyutlu, gözenekli ve süngerimsi yapıdaki kitosan doku iskelelerinin hücre tutunması ve çoğalmasını desteklediğini göstermektedir (Tıgılı vd. 2007, Beşkardeş vd. 2012). Bununla birlikte gruplar arasındaki farklılıklar kültürün ilk gününden itibaren ortaya çıkmaktadır. PDGF-BB içeren doku iskelelerindeki hücre yoğunluğunun diğer doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu görülmektedir. Kültürün ilk günlerinde görülen bu fark 21 günlük kültür süresince devam etmiştir. PDGF-BB'nin erken dönemdeki mitojenik potansiyeli, hücre üremesini arttırdığı ve preosteoblast ve mezenkimal kökenli hücrelere karşı kemotaktik etkisinin olduğu bilinmektedir (Park vd. 2000). Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde farklı yapıdaki (kitosan-poli(L-laktid) doku iskeleleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda da PDGF-BB'nin osteoblast hücrelerin üremesi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Lee vd. 2002). BMP-6'nın tek

başına kullanıldığı doku iskelelerinde (CS-BMP-6) hücre üremesi boş kitosan doku iskelelerine (CS) benzer şekilde devam etmiştir. Kültürün ilk beş gününde CS-BMP-6 ve CS doku iskelelerinde hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte kültürün 7 ve 21. günlerinde tek başına BMP-6 içeren doku iskelelerindeki hücre üremesinin CS doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç, BMP-6'nın sadece osteojenik farklılaşmayı değil aynı zamanda hücre üremesinde de etkisinin olduğunu göstermiştir. Akman vd. 2010 tarafından yapılan çalışmada MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik karakterlerini araştırmak üzere BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır. BMP-6 varlığında hazırlanan doku iskeleleri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında erken dönemde BMP içeren yapı ile kontrol grubu arasında fark gözlenmezken kültürün ilerleyen dönemlerinde BMP-6 içeren gruplarda yoğun hücre üremesinin olduğunu belirtmişlerdir. CS/PDGF-BB ve CS/BMP-6 doku iskelelerindeki hücre canlılığı karşılaştırıldığında, PDGF-BB'nin beklenen etkisi sonucu CS/PDGF-BB doku iskelelerine tutunan hücre sayısının ve kültürün ilerleyen sürelerindeki hücre üremesinin CS/BMP-6 doku iskelelerine kıyasla anlamlı olarak fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Heri iki büyüme faktörünü içeren CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskelelerindeki hücre canlılığı değerlendirildiğinde her iki büyüme faktörünü de içeren CS ve CS/BMP-6 gruplarına kıyasla hücre artışının fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskeleleri ile PDGF-BB'nin tek başına kullanıldığı CS/PDGF-BB grupları arasında anlamlı farklar bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç, hücre canlılığının arttırılmasında PDGF-BB'nin etkinliğini ortaya koymaktadır. BMP-6 tek başına kullanıldığında hücre çoğalmasında fark yaratmasına karşın bu etki kültürün 7. gününden itibaren ortaya çıkmaktadır. PDGF-BB içeren gruplarda ise hücre sayısındaki artış tüm kültür süresince devam etmektedir. Bu veriler BMP-6'nın farklılaşmış hücrelerin üremesinde daha aktif rol oynarken PDGF-BB'nin hem erken dönem preosteoblastlarda hem de farklılaşmış osteoblastik hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

4.10.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve EDX Analizi

Hücrelerin doku iskeleleri üzerine tutunması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Bu nedenle MC3T3-E1 hücrelerinin CS, CS/BMP-6 CS/PDGF-BB ve CS/PDGF-BB+BMP-6 içeren doku iskelelerindeki morfolojileri SEM ile analizlenmiştir. Kültürün 4. 7. ve 14. günlerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.22- 4.24’de sunulmuştur.



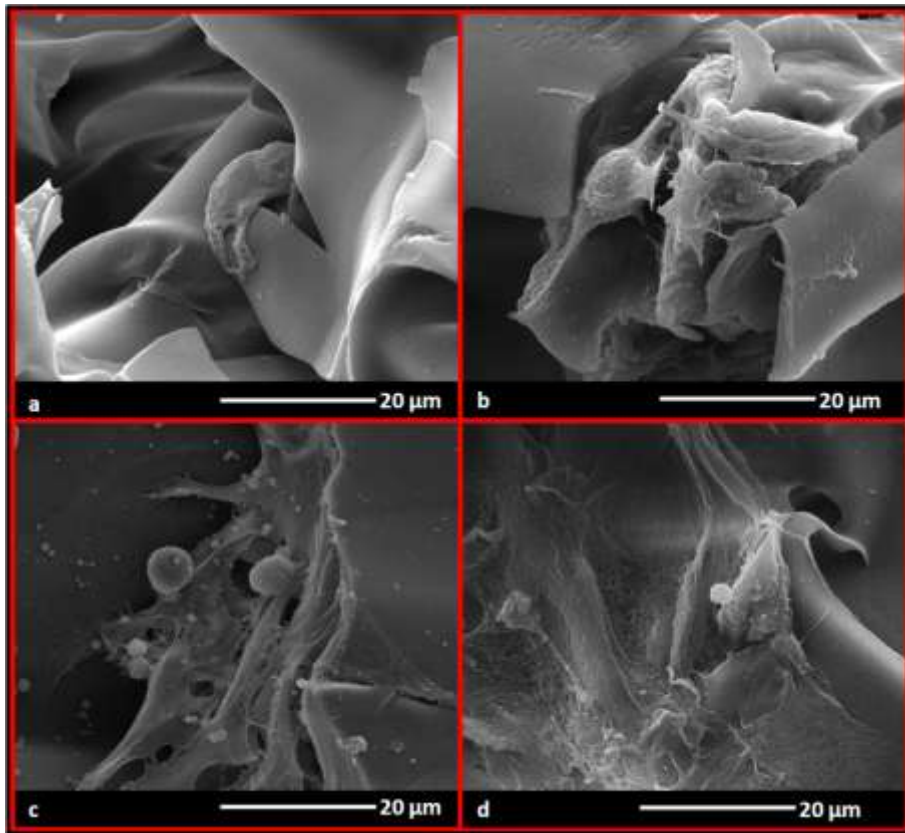
Şekil 4.22 4. gün SEM görüntüleri

a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)

Şekil 4.22 incelendiğinde kültürün 4. gününde CS doku iskelelerinde az sayıda ve küresel formda hücrelerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.22.a). BMP-6 içeren CS/BMP-6 doku iskelelerinde ise hücre yoğunluğu CS doku iskelesine göre daha fazla olmakla birlikte hücrelerin küresel yapılarını korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.22.b). PDGF-BB içeren CS/PDGF-BB grubunda (Şekil 4.22.c) boş kitosan ve BMP-6 içeren gruplara göre hücre yoğunluğunun arttığı ve doku iskelelerinin duvarlarına tutunan hücrelerin

yayılmaya başladığı görülmüştür. CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskelelerinde ise hücre morfolojisinin diğer gruplarla kıyaslandığında büyük ölçüde farklılık gösterdiğini söylemek mümkündür. Heri iki büyüme faktörünü içeren bu iskelelerde yüzeye tutunup yayılan hücrelerin 4. günden itibaren hücre-hücre bağlantılarını oluşturmaya başladıkları görülmüştür (Şekil 4.22.d).

Kültürün 7. gününe ait SEM görüntüleri incelendiğinde tüm gruplarda hücrelerin küresel formdan uzaklaşarak yayılmaya başladıkları görülmüştür (Şekil 4.23.a-d).



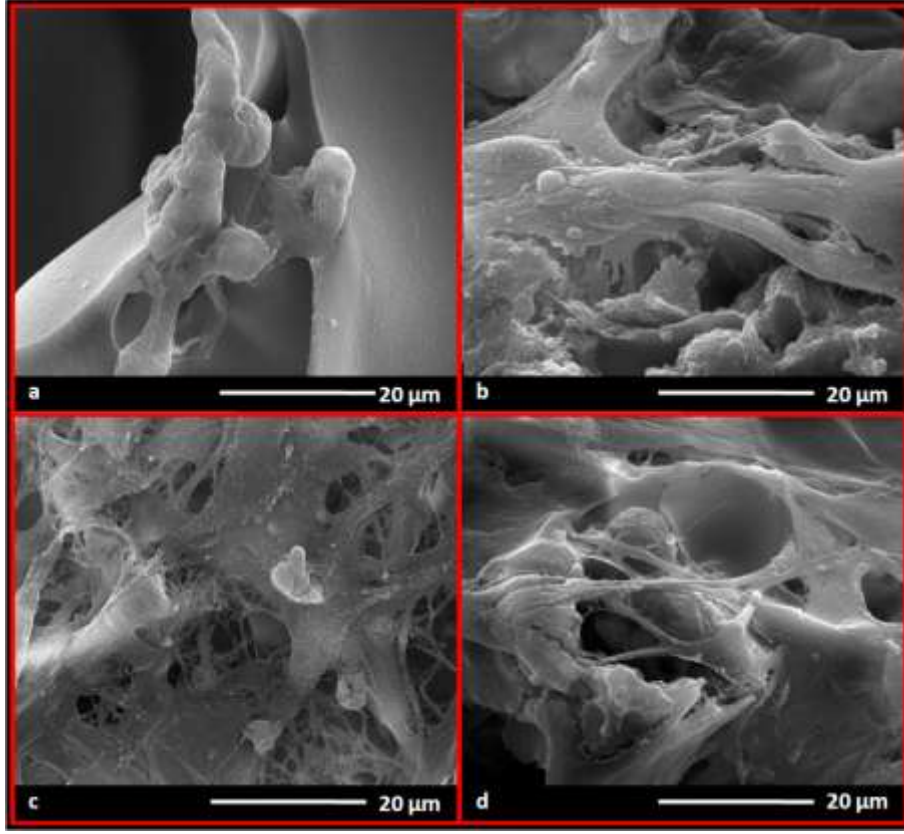
Şekil 4.23 7. gün SEM görüntüleri

a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)

Boş kitosan doku iskelelerinde (Şekil 4.23.a) hücre yoğunluğu 4. güne benzer olarak azdır. Bu durum MTT analizinden elde edilen sonuçlarla da uyumludur. CS/BMP-6 doku iskelelerinden alınan SEM görüntülerinde hücre yoğunluğunun CS doku iskelelerine benzer olduğu görülmektedir. Buna karşın, CS/BMP-6 yüzeyine tutunan

hücrelerin 7. gün sonundaki morfolojileri CS doku iskelesine tutunmuş olan hücrelerden farklıdır. Bu sonuç, BMP-6'nın hücre farklılaşmasının başlangıç basamağını oluşturabilecek ve farklılaşmayı indükleyebilecek morfolojik değişimlerde etkili olduğunu göstermektedir. PDGF-BB'nin tek başına kullanıldığı doku iskelelerinde ise 4. günde yüzeye tutunmuş olan hücrelerin yayılarak fibroblastik morfolojiyi oluşturdukları ve doku iskeleleri gözenekleri arasına *lamellipodiol* uzantılar ile tutundukları gözlenmiştir. SEM görüntülerinde belirlenen küresel formdaki hücreler ise CS+PDGF-BB yüzeyindeki hücre yoğunluğunu arttıracak hücrelerin doku iskelesi yapısına katıldığını göstermektedir. Her iki büyüme faktörünü de içeren CS/PDGF-BB+BMP-6 doku iskelelerindeki hücre yoğunluğu MTT analizinde elde edilen sonuçlara paralel olarak CS/PDGF-BB doku iskelelerindeki hücre yoğunluğuna benzerdir (Şekil 4.23.d). 7. günün sonunda elde edilen görüntülerde hücrelerin doku iskelesinin yapısını oluşturan duvarlarda tamamen yayılarak gözenek boşluklarını kapattığı görülmektedir (Şekil 4.23.d).

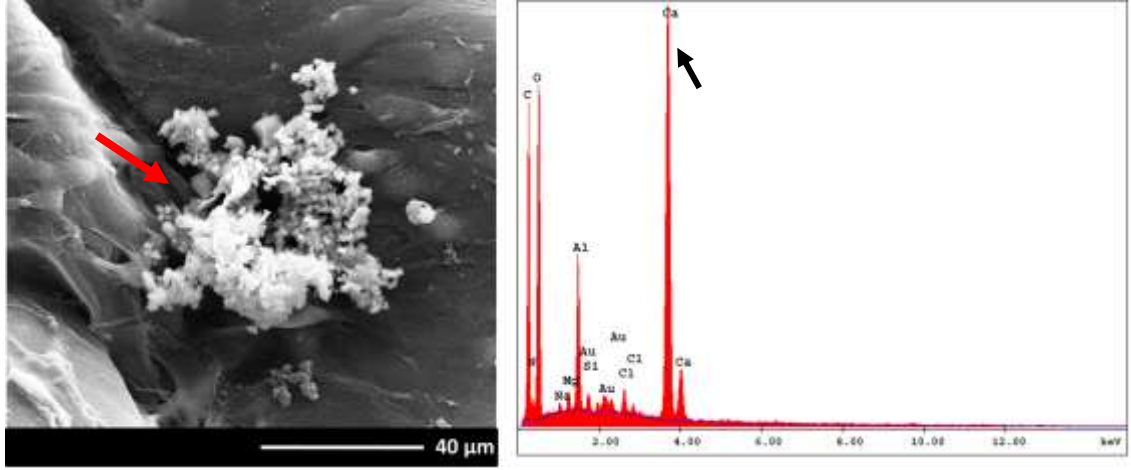
Kültürün 14. gününde alınan SEM görüntüleri incelendiğinde kültürün 4. ve 7. gününe benzer şekilde CS doku iskelelerine tutunmuş az sayıda hücre gözlenmiştir (Şekil 4.24.a).



Şekil 4.24 14. gün SEM görüntüleri

a. CS, b. CS/BMP-6, c. CS/PDGF-BB, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6 (x5,000)

Diğer taraftan BMP-6 içeren grupta kültürün diğer günlerine göre hücre yapışması ve yayılmasında belirgin artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.24.b). Bu durum kültürün 14. gününe ait MTT analizi sonuçları ile uyumludur. CS/BMP-6 doku iskelesine tutunan hücrelerdeki morfolojik yapı da göze çarpmaktadır. PDGF-BB içeren doku iskelelerinden alınan SEM görüntüsünde hücrelerin tamamen doku iskelesi üzerinde yayıldığı gözlenmiştir. Hücreler arası bağlantılar doku iskelelerinin gözeneklerini kapatacak şekilde hücre dışı matrikse özgü yoğun bir ağ yapı oluşturmuştur (Şekil 4.24.c). BMP-6 ve PDGF-BB içeren gruptaki yoğun hücre üremesi hücre dışı matriksin üretimi ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.24.d). Hücre farklılaşması üzerinde etkili olduğu BMP-6'nın kemik oluşumuna yönelik olarak mineral oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yürütülen çalışmaya ait EDX spektrumu ve SEM görüntüsü şekil 4.25'de sunulmuştur.



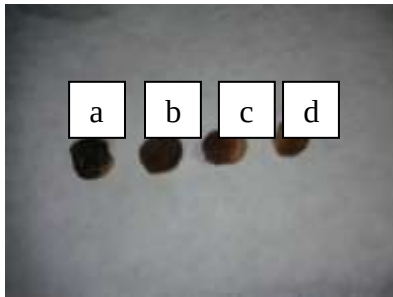
Şekil 4.25 CS/PDGF-BB/BMP-6 doku iskelesi SEM (x 2,500) ve EDX spektrumu

Şekil 4.25'deki EDX spektrumu incelendiğinde Ca pikinin varlığı yapıda mineral oluşumunu doğrulamaktadır. Ayrıca kültürün 7. gününde alınan SEM görüntüsünde de mineral oluşumunun meydana geldiği görülmektedir.

4.10.3 Hücre farklılaşmasının incelenmesi

von Kossa analizi

Hücrelerin matris mineralizasyonunun belirlenmesi için von Kossa analizleri gerçekleştirilmiştir. Von kossa analizi sonuçları şekil 4.26'da sunulmuştur.



Şekil 4.26 von Kossa analizi

a. CS, b. CS/PDGF-BB, c. CS/BMP-6, d. CS/PDGF-BB/ BMP-6

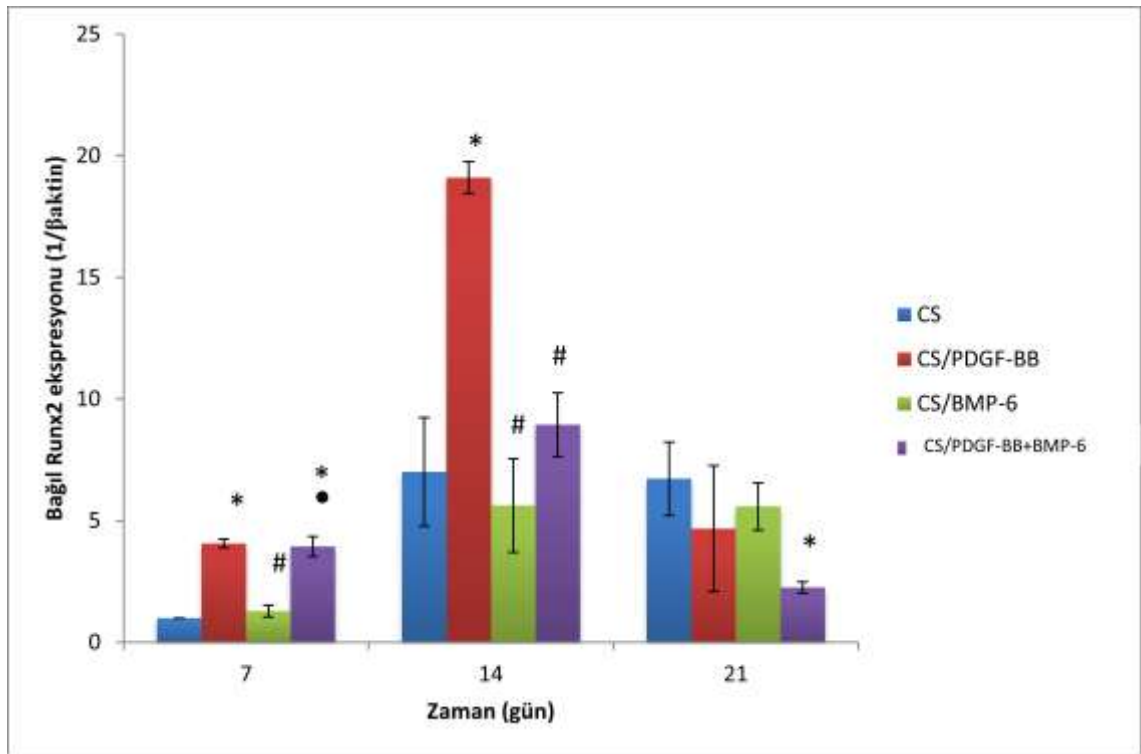
Şekil 4.26 incelendiğinde bütün gruplarda pozitif yönde mineral oluşumu gözlenmiştir. Akman vd. 2010 çalışmasında kitosan doku iskelesine matriks oluşumuna yönelik gerçekleştirdiği von Kossa deneylerinde gerek BMP-6 yüklü gerekse de boş gruplarda mineral oluşumuna bağlı olarak renk değişimi meydana geldiği gözlenmiştir. Fakat BMP-6'nın osteoindüktif kapasitesinden kaynaklı olarak diğer gruplardan daha fazla mineral oluşumu ve buna bağlı olarak daha fazla renk değişimi meydana geldiği belirtilmiştir. Tez çalışması kapsamında BMP-6 içeren gruplarda beklenenden daha az renk değişimi olması BMP-6 varlığında daha az hücre yapışmasının olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi

Gerçek zamanlı protein zincir reaksiyonu DNA'nın belirli bir bölgesinin *in vitro* ortamda hızlı bir şekilde çoğaltılması ile nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Gibson vd. 1996). PCR yönteminde izole edilen DNA veya RNA spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımıyla sayısal olarak çoğaltılmaktadır. Yöntemde çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan ışığa yapan *SYBR Green* gibi boyalar kullanılmakta ve böylece çoğalmaya bağlı DNA artışı floresan miktar ile ölçülmektedir. RNA molekülü varlığında gerçekleştirilen PCR çalışmalarında öncelikte tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle retrovirüslerden elde edilen ters transkriptaz (*reverse transcriptase*) enzimi varlığında mRNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA doğrudan PCR işleminde kullanılmaktadır. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde gerçekleştiğinden elektroforeze gereksinim duyulmadan hedef bölge saptanabilmektedir. Analizin gerçekleşmesi için oluşturulacak tepkimedeki bileşenler şu şekildedir: 1) çoğaltılacak olan kalıp DNA 2) DNA dizisini spesifik olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler 3) Taq polimeraz enzimi 4) deoksinükleotid fosfatlar ve 5) uygun pH ve iyon dengesini sağlayacak tampon çözelti. PCR denatürasyon, birleşme ve sentez basamaklarından oluşan analizin bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Denatürasyon basamağında 95°C'ye ısıtılan DNA yapısındaki iki zincir birbirinden ayrılır ve DNA tek iplikçik haline gelir. Birleşme basamağında sıcaklık 50-52°C'ye düşürülerek reverse ve forward primerler tek iplikçik halindeki DNA molekülü üzerinde

yer alan spesifik bölgeleri tanıyarak bağlanır. Sentez aşaması olan son basamakta ise sıcaklık 70-72°C'ye çıkarılarak Taq polimeraz enzimi varlığında zincir ucuna nükleotidler yerleşir ve böylece hedeflenen DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

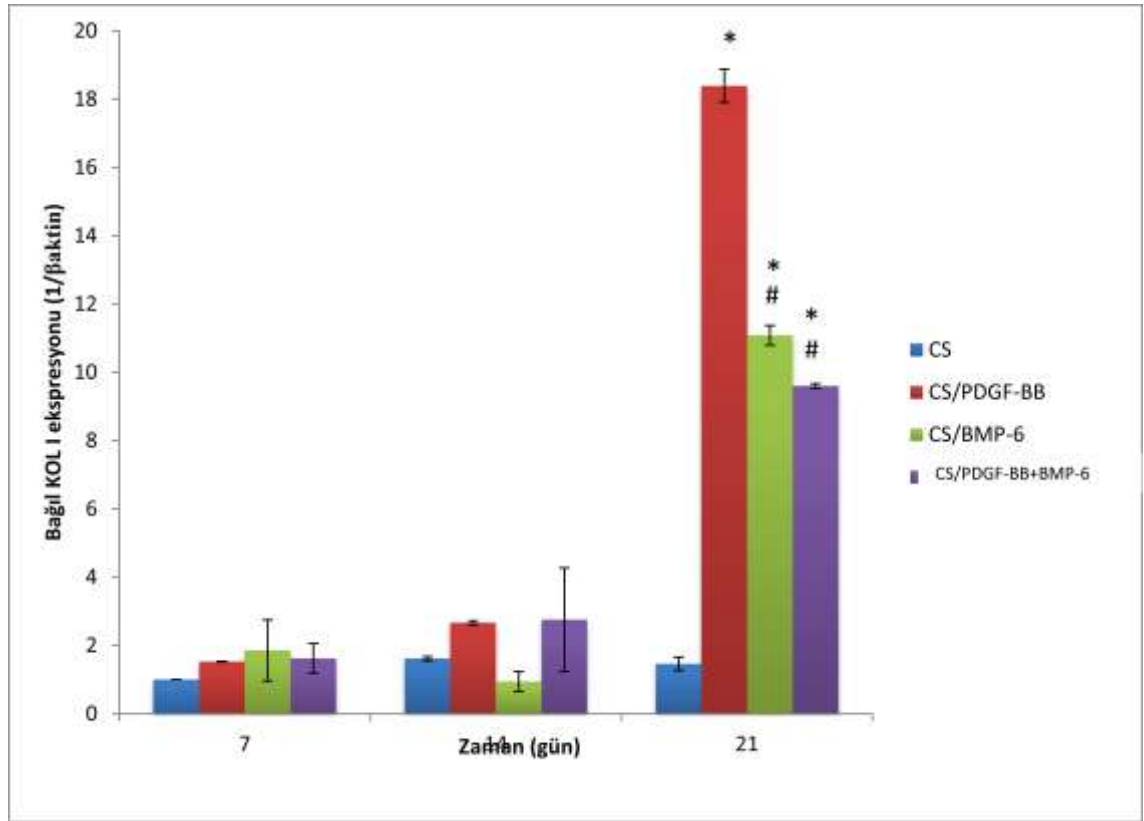
Sunulan tez çalışması kapsamında kitosan temelli doku iskelelerine ekilen MC3T3-E1 preosteoblastik hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki tip1 kollajen (KOL I), Runx2, Osteokalsin (OCN) ve Osteopontin (OPN) gen ifadeleri RT-PCR ile belirlenmiştir.



Şekil 4.27 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl Runx2 gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3, kontrol grubu CS iken *p<0.05; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken #p<0.05; kontrol grubu CS/BMP-6 iken •p<0.05)

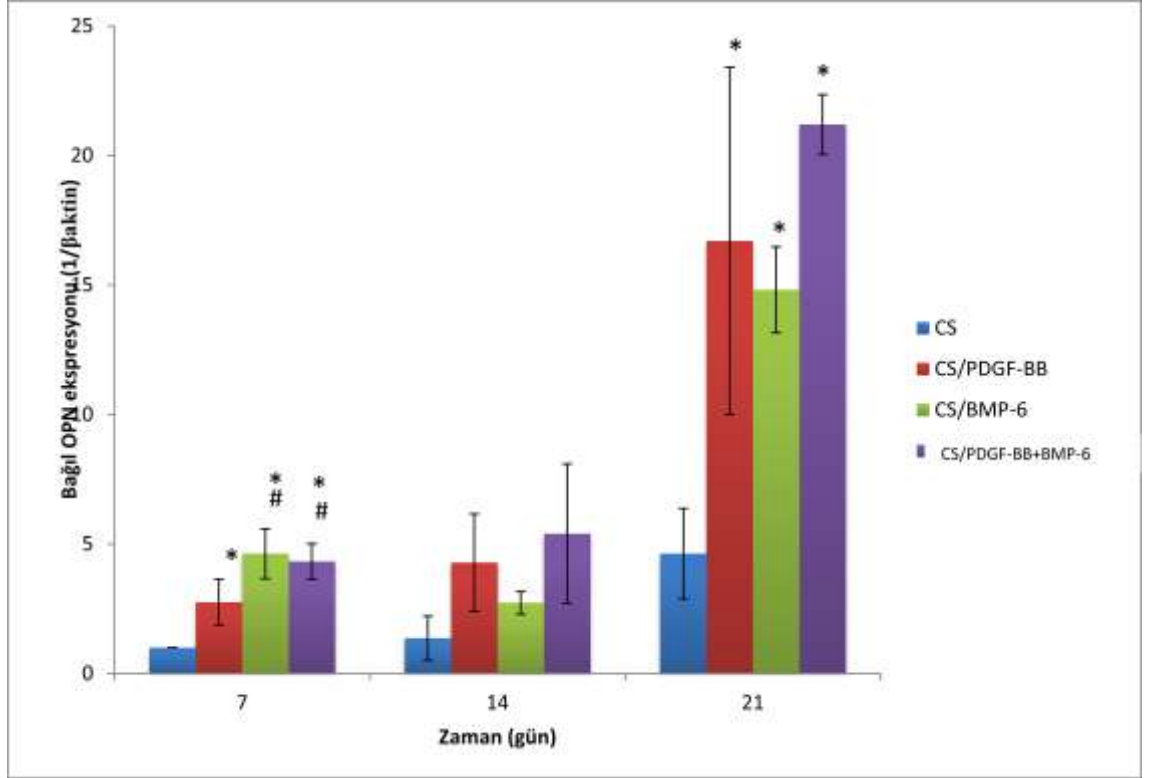
Hücrel farklılaşma genel olarak üç aşamadan meydana gelmektedir: İlki üreme fazı (erken dönem), ikincisi ekstraselüler matriksin oluşması ve matürasyon fazı (orta dönem), son adım ise mineralizasyon fazıdır (gecikme fazı). Her aşama belli genlerin ekspresyonu ile tanımlanır. Osteoblast spesifik faktör olarak bilinen Runx2 erken

dönemde kemik matriks proteinlerinin ekspresyonlarını başlatan bir gendir. (Lee vd. 2010). Tez çalışması kapsamında Runx2 gen ifadesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.27’de verilmiştir. 7. günde CS/PDGF-BB ve CS/PDGF-BB+BMP-6 gruplarında Runx2 ekspresyon seviyesinin CS ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Büyüme faktörlerinin her ikisinin de bulunduğu doku iskelelerinden elde edilen Runx2 seviyeleri, BMP-6’nın tek başına kullanıldığı duruma göre oldukça yüksektir. Tüm gruplar için Runx2 seviyesi 14. günde en yüksek değerine ulaşmıştır. Doku iskeleleri üzerindeki Runx2 ekspresyonu kültürün 14. gününde boş kitosan grubuna göre CS/PDGF-BB’de 2.7 kat, CS/PDGF-BB+BMP-6’da 1.2 kat daha fazladır. Kültürün erken dönemlerinde PDGF-BB grubunda Runx2 ekspresyonunun daha yüksek olmasının bu grupta yüksek hücre üremesi sonucuna bağlı olduğu düşünülmektedir.



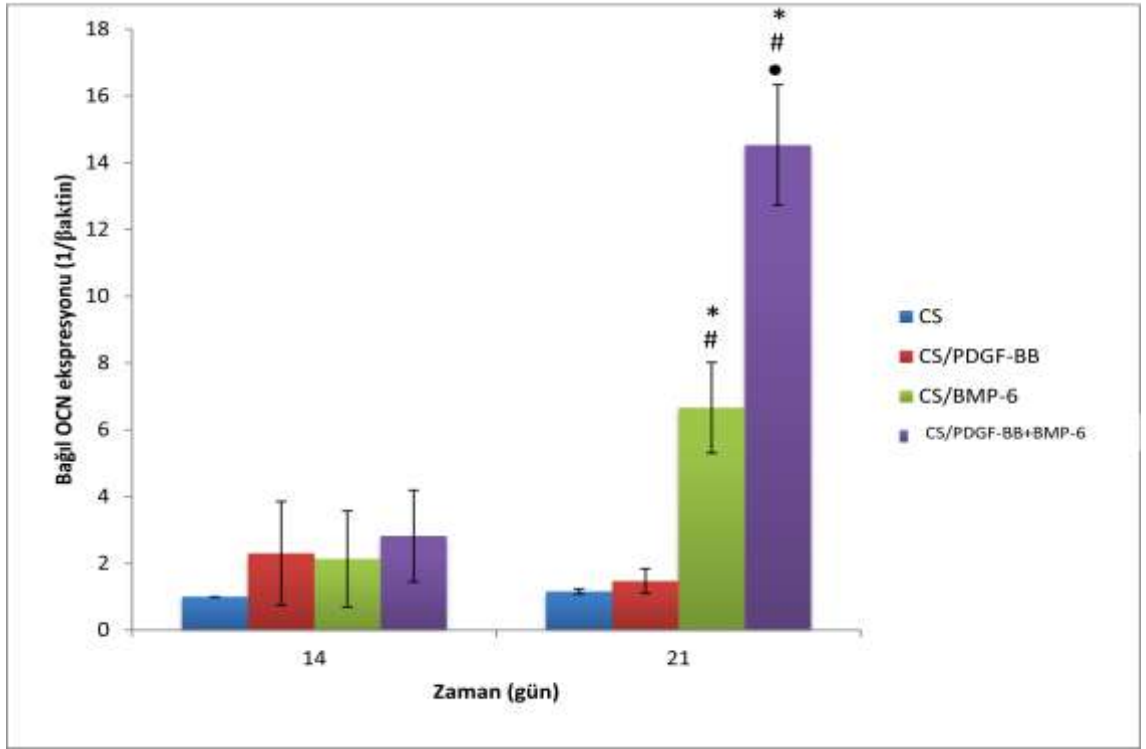
Şekil 4.28 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB/BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl KOL I gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, kontrol grubu CS iken $*p<0.05$; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken $\#p<0.05$; kontrol grubu CS/BMP-6 iken $\bullet p<0.05$)

Kollajen, organik matriksin yaklaşık %90'ını oluşturmakla birlikte osteoblastlar tarafından sentezlenir. Kollajenin organizmada en fazla bulunan çeşidi kollajen tip-I'dir. Kollajen kemiğin temel yapısıdır ve mekanik dayanımın sağlanmasında oldukça önemlidir (Gordon vd. 2007). Tez çalışması kapsamında doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin kollajen I ekspresyonları incelendiğinde CS doku iskelelerinde KOL-I seviyesinde kültür süresi boyunca bir artışın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.28). bu sonuç büyüme faktörlerini içermeyen kitosan yapısının kemik oluşumunu desteklemediği şeklinde yorumlanabilir. Tüm doku iskelelerinde 7 ve 14. günlerde elde edilen KOL I seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Kollajen tip I yeni kemiğin oluşumu sırasındaki hücre çoğalması sırasında çoğalan osteoblastlar tarafından salgılanmaktadır. Tip I kollajen üretiminin farklılaşma ve olgunlaşma döneminde azaldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Tunçay 2013). Tez çalışması kapsamında KOL-I ekspresyon seviyeleri incelendiğinde KOL-I'in 21. günde başka bir deyişle geç dönemde artış gösterdiği sonucuna varılmıştır. 21. gün değerleri kendi içinde incelendiğinde KOL-I seviyesinin PDGF-BB içeren gruplarda boş kitosana oranla oldukça fazla olduğu görülmektedir. BMP-6'nın tek başına kullanıldığı doku iskelelerinde de KOL-I ekspresyonu boş kitosan göre yaklaşık 7.58 kat fazladır ($p<0.05$). Geç dönemde gözlemlenen KOL-I ekspresyonu hücrelerin farklılaşma adımında hücre dışı matriksi sentezlemesine devam etmeleri şeklinde yorumlanabilir (D'Alonzo 2002).



Şekil 4.29 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6 kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl OPN gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, kontrol grubu CS iken $*p<0.05$; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken $\#p<0.05$; kontrol grubu CS/BMP-6 iken $\bullet p<0.05$)

Kemik hücrelerinde mineralizasyon düzenlenmesinde görev alan ve önemli bir aracı protein olan osteopontinin ekspresyonlarının incelendiği çalışmalarda (Şekil 4.29) 7. günde BMP-6 içeren gruptaki ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre yüksek olduğu sonucu bulunmuştur. Tüm gruplarda osteopontin seviyesi kültür süresi boyunca artış göstermiş ve 21. günde en yüksek seviyelere ulaşmıştır.



Şekil 4.30 CS, CS/PDGF-BB, CS/BMP-6, CS/PDGF-BB+BMP-6/kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1'lere ait bağıl OCN gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=3$, kontrol grubu CS iken $*p<0.05$; kontrol grubu CS/PDGF-BB iken $\#p<0.05$; kontrol grubu CS/BMP-6 iken $\bullet p<0.05$)

Osteokalsin, kemik dokusunda mineralizasyon ve kalsiyum iyon dengesini sağlamakla görevli bir proteindir. Kemiğin temel iki bileşeni olan kollajen ve hidroksiapatite bağlanabilmektedir. Serumda yüksek oranda bulunan osteokalsin kemik mineral yoğunluğunun artışına işaretler. Olgun osteoblast oluşumunun bir göstergesi olan osteokalsin farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkar (Tunçay 2013). Tez çalışması kapsamında doku iskeleleri üzerinde üreyen hücrelerin osteokalsin ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.30), BMP-6 içeren gruplarda CS ve CS/PDGF-BB doku iskelelerine oranla OCN seviyelerinde önemli bir fark olduğu sonucuna varılmıştır. BMP-6'nın osteoindüktif kapasitesine bağlı olarak osteoblastik farklılaşma adımı kemik oluşumunu artırıcı yönde matriks mineralizasyonunu desteklemektedir (Çetin 2010). Her iki büyüme faktörlerini içeren doku iskelelerinde PDGF-BB'nin etkisiyle çoğalan hücre sayısının CS/BMP-6 doku iskelelerinden fazla olması (Şekil 4.21) CS/PDGF-BB+BMP-6'daki OCN ekspresyon seviyelerindeki artışı açıklamaktadır.

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında kemik doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla toksik olmayan ve biyobozunur yapıdaki doku iskelelerinin üretilmesi hedeflenmiştir. Hazırlanan sistemde kemik dokunun doğal iyileşme sürecine benzer şekilde PDGF-BB ve BMP-6'nın farklı hızlarda ve kontrollü salımını sağlamak üzere degradasyon hızları birbirinden farklı olan jelatin ve poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) partiküller kullanılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- PHBV partiküllerin üretimi amacıyla emülsiyon difüzyonu yöntemi kullanılmıştır. Protein içermeyen PHBV'nin üretim koşullarının belirlenmesine ilişkin gerçekleştirilen çalışmalarda polimer derişimi, çözücü türü ile çözücü kombinasyonları, yüzey aktif madde türü/derişimi ve homojenizasyon parametreleri incelenmiştir. Sonuç olarak % 2 (w/v) polimer derişiminde, DCM varlığında, % 4 (w/v) non-iyonik PVA ile 17,500 rpm ve 15 dakika homojenizasyon koşullarında PHBV partiküller sentezlenmiştir. PHBV partiküllerin üretim koşullarının belirlenmesinin ardından karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda SEM, TEM, FTIR DSC, parçacık boyut dağılımı ile zeta potansiyeli analizleri yapılmıştır. PHBV partiküllerin ortalama partikül çapı 530 ± 150 nm olarak bulunmuştur. TEM analizinden elde edilen görüntülerde ortalama parçacık boyutu 367 ± 121 nm olarak belirlenmiştir. Benzer olarak DSC analizine ait parçacık boyut dağılımı grafikleri incelendiğinde 300-400 nm arasında partikül boyutu görülmektedir. FTIR analizine ilişkin spektrumlarda ise partikül formundaki PHBV polimerinde yapısal bir değişikliğin meydana gelmediği görülmüştür.
- Jelatin partiküller su-yağ emülsiyonu ile hazırlanmıştır. Jelatin partiküllere ait karakterizasyon çalışmaları kapsamında SEM, su tutma kapasitesi tayini ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda jelatin partiküllerin ortalama boyut dağılımının 50-100 μ m arasında olduğu görülmüştür. Su tutma kapasitesi deneylerinde hidrofilik yapıda

olan jelatine ait denge şişme değeri 19.08 ± 1.86 ml su/gmikroküre olarak belirlenmiştir. Bu değer salım çalışmaları kapsamında yüklenecek proteinin miktarının belirlenmesinde önem taşımaktadır.

- BMP-6 ve PDGF-BB ile gerçekleştirilen çalışmalar öncesinde model protein BSA varlığında salım ve degradasyon çalışmaları yürütülmüştür. BSA yüklü PHBV partiküller ikili emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. BSA yüklü PHBV partiküller için de SEM, TEM, DSC analizleri yapılmıştır. SEM ve TEM analizleri incelendiğinde BSA varlığında partikül boyutunun arttığı ve yapıya homojen olarak katıldığı görülmüştür. DSC analizinde ise BSA varlığında BSA'nın amino grupları ile PHBV'nin karbonil gruplarının etkileşimine bağlı olarak BSA'ya ait olan 45.53°C ve 216.11°C 'de yer değiştirmesi gözlenmiştir. BSA içeren PHBV partiküllerin degradasyon çalışmaları kapsamında 21. günün sonunda partiküllerin mekanik bütünlüğünün bozulup koagüle agregatların oluştuğu görülmüştür.
- Jelatin partiküller emdirme yöntemi ile hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre jelatinden PHBV'ye göre oldukça kısa sürede (5 saat) salımın gerçekleştiği gözlenmiştir. Daha sonra PHBV ve jelatinden BSA salımının matematiksel analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen kinetik parametre değerlerinden PHBV partikülden salımın difüzyon kontrollü, jelatinden salımın ise şişme kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır. BSA'nın PHBV'ye enkapsülasyon verimliliği ise Bradford yöntemi ile $\% 21 \pm 2.20$ olarak hesaplanmıştır. Model protein BSA'nın jelatin partiküllerin denge şişme değerine bağlı olarak emdirme yöntemi ile yüklenmesi nedeniyle enkapsülasyon verimliliği $\% 100$ olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak BMP-6 ve PDGF-BB'nin kullanıldığı çalışma için model oluşturmuştur.
- Kontrollü salım çalışmaları öncesinde PHBV ve jelatin partikülleri ayrı ayrı ve birlikte içeren kitosan doku iskeleleri hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda gözenek boyut dağılımı, şişme deneyleri, mekanik dayanım testleri ve yoğunluk tayini deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde

edilen gözenek boyut dağılımı grafiklerine göre jelatin içeren grupların daha homojen ve dar gözenek boyut dağılımına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Gerçekleştirilen şişme deneyleri kapsamında ise en yüksek su tutma kapasitesine sahip olan grup PHBV içeren grup olarak belirlenmiştir. Mekanik dayanım testlerinde ise jelatin partiküllerin yer aldığı grupta yüksek mekanik dayanım olduğu sonucuna varılmıştır. Yoğunluk tayini deneylerinde ise partiküller varlığında kitosan doku iskelelerinin yoğunluğu artmıştır.

- PHBV partikülere ilişkin olarak yapılan ön çalışmaların ardından hücre farklılaşması ve kemik oluşumu üzerinde etkili olduğu bilinen BMP-6'nın PHBV partiküllere yüklenmesi ikili emülsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre göçü ve üremesi üzerine etkili olan PDGF-BB jelatin partiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında yürütülen denge şişme değerine bağlı olarak yüklenmiş ve enkapsülasyon verimliliği model protein BSA'ya benzer şekilde % 100 olarak kabul edilmiştir.
- Kontrollü salım çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla liyofilize haldeki BMP-6 içeren PHBV ve PDGF-BB içeren jelatin partiküller kitosan doku iskelesine yüklenmiş ve salım kinetiği ELISA analizi ile incelenmiştir. Salım deneyleri 21 gün süre ile gerçekleştirilmiş ve 15. Günde jelatin partiküllere yüklü kitosan doku iskelelerinden PDGF-BB'nin salındığı sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan aynı sürede PHBV'den BMP-6 % 50.21 ± 0.12 oranında salınmıştır.
- MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarında yapılan MTT ve SEM analizleri sonucunda PDGF-BB'nin hücre üremesi ve yapışmasını arttırdığı görülmüştür. Hücre farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla yapılan RT-PCR analizinde BMP-6 varlığında geç dönemde osteojenik farklılaşma gözlenmiştir.
- Sunulan tez çalışması kapsamında PDGF-BB ve BMP-6'nın birlikte yüklendiği ve farklı hızlarda salındığı doku iskelelerinin büyüme faktörlerinin tek tek

kullanıldığı doku iskelelerine göre hücre üremesi ve farklılaşmasında avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioǧlu, M. and Nohutçu, R.M. 2010. Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells, *Artificial Organs*, 34(1); 65-74
- Akman, A.C. 2007. Periodontal Doku Mühendisliǧi Uygulamaları İçin Kitosan Temelli Doku İskelelerinin Üretilmesi, Kemik Morfojenetik Protein-2 (BMP-2), Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF), Deksametazon (DEX) Salım Kinetiklerinin ve In Vitro Etkinliklerinin Tayini. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T. and Nukavarapu, S.P. 2012. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5); 363-408.
- Arıkan, A. 2013. Doku İskelelerinin Süperkiritik Karbondioksit Ortamında Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Astete, C.E. and Sabliov, C.M. 2006. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 17; 247-89.
- Banerjee, I., Mishra, D., and Maiti, K.T. 2009. PLGA 2009. Microspheres incorporated gelatin scaffold: Microspheres modulate scaffold properties. *International Journal of Biomaterials*, 9 pages.
- Baran, E.T., Özer, N. and Hasirci, V. 2002. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *Journal of Microencapsulation*, 19; 363-76.
- Bennett, N.T. and Schultz, G.S. 1993. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *The American Journal of Surgery*, 165 (6); 728-737.
- Beşkardeş, I., Demirtaş, T., Durukan, M. and Gümüşderelioǧlu M. 2012. Microwave assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Baskıda).
- Bhatt, Y. and Shah, D. 2012. Influence of additives on fabrication and release from protein loaded PLGA microparticles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4 (3); 1708-1715.
- Bhardwaj, V., Ankola, D.D., Gupta, S.C., Schneider, M., Lehr, C.M. and Ravi Kumar, M.N.V. 2009. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to tumor chemical-induced breast cancer in rat. *Pharmaceutical Research*, 26 (11); 2495-2503.

- Boerckel, J.D., Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Uhrig, B.A., Phelps, E.A., Stevens, H.Y., Garcia, A.J. and Guldberg, R.E. 2011. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*, 32 (22); 5241-5251.
- Bose, S., Roy, M. and Bandyopadhyay, A. 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30 (10); 546-554.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72; 248-254.
- Budhian, A., Siegel, S. and Winey, K. 2007. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systemic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 336; 367-75.
- Cardea, S. , Pisanti, P. and Reverchon, E. 2010. Generation of chitosan nanoporous structures for tissue engineering applications using a supercritical fluid assisted process. *The Journal of Supercritical Process*, 54 (3); 290-295.
- Chaisri, W., Hennink, W.E. and Okonogi, S. 2009. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Current Drug Delivery*, 6; 69-75.
- Chaudhari, A., Vanmellart, L., Bauwens, M., Vermaelen, P., Deroose, C.M., Naert, I. and Cardoso M.V. 2013. In vitro and in vivo investigation of the potential of amorphous micro porous silica as a protein delivery vehicle. *BioMed Res Int*, 2013, 10 pages.
- Chen, F., Zhang, M. and Wu, Z. 2010. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 6279-6308.
- Chen, G.X. Hao, G.J., Guo, T.Y., Song, M.D., Zhang, B.H. 2002. Structure and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science Letters*. 21; 1587-1589.
- Choi, J. and Park W.H. 2004. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing*, 33; 455-460.
- Croisier, F. and Jérôme, C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49; 780-792.
- Cun, D., Jensen, D.K., Maltesen, M.J., Bunker, M., Whiteside, P., Scurr, D., Foged, C., Nielsen, H.M. 2011. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77; 26-35.

- Çetin, D. 2010. Poli(2-hidroksietil metakrilat) Bazlı Süpergözenekli Doku İskeleleri ile Kemik Rejenerasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- D'Alonzo, R.C., Kowalski, A.J., Denhardt, D.T., Nickols G.A. and Partridge, N.C. 2002. Regulation of collagenase-3 and osteocalcin gene expression by collagen and osteopontin in differentiating MC3T3-E1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (27); 24788-24798.
- De la Riva, B., Sánchez, E., Hernández, A., Reyes, R., Tamimi, F., López-Cabarcos, E., Delgado, A. and Évora C. 2010. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, 143; 45-52.
- Demirtaş, T.T., Karakeçili, A. and Gümşderlioğlu, M. 2008. Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: Synthesis and in vitro characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (2); 729-735.
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H. and Atyabi F. 2011. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*, 6; 877-95.
- Duan, B., Wang, M., Zhou, W.Y. and Cheung, W. L. 2010. Synthesis of Ca-P nanoparticles and fabrication of Ca-P/PHBV nanocomposite microspheres for bone tissue engineering applications. *Applied Surface Science*, 255 (2); 529-533.
- Farago, P.V., Raffin R.P., Pohlmann A.R., Guterss S.S. and Zawadzki S.F. 2008. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(7); 1298-1305.
- Gasparini, G., Kosvintsev, S.R., Stillwell, M.T. and Holdich R.G. 2008. Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61; 199-207.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6; 995-1001.
- Ginty, P.J., Barry, J.J.A, White, L.J., Howdle, S.M. and Shakesheff, K.M. (2008). Controlling protein release from scaffolds using polymer blends and composites. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68; 82-89.
- Gordon, J.A.R., Tye, C.E., Sampaio, A.V., Underhill, T.M., Hunter, G.K. and Goldberg, H.A. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, 41; 462-473.

- Grillo R., de MElo, N., Lima, R., Lourenço, R.W., Rosa, A.H. and Fraceto, R.F. 2010. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Polymers and the Environment*. 18;26-32
- Gümüşderelioğlu, M. 2011. Doku mühendisliği ders notları, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Gürsoy A.Z. 2002. Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:1, İstanbul.
- Higuchi, T. 1963. Mechanism of sustained action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Science* 52;1145–1148
- Holland, T.A., Tabata, Y., Mikos, A.G. In vitro release of transfromin growth factor-beta-1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable injectable oligo(polyethylene glycol) fumarate hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 91 (3); 299-313.
- Hsieh, E., Chang, C., Lin S. 2007. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57; 250-255.
- Huang, W., Shi, X., Rem, L., Du, C., and Wang, Y. 2010. PHBV microspheres-PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31; 4278-4285.
- Hughes, Gareth A. 2005. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1; 22- 30.
- Hui, H.W., Robinson, J.L. 1987. Design and Fabrication of Oral Controlled Release Drug Delivery Systems. *Controlled Drug Delivery*. Eds. J.R.Robinson VHL Lee Marcel Dekker New York, 373.
- Jacklenec, A., Hinckfuss, A., Bilgen, B., Ciombor, D.M., Aaron, R and Mathiowits, E. (2008). Sequential release of bioactive IGF-I and TGF- β 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials*, 29; 1518-25.
- Jana, S., Florczyk, S.J., Leung, M. and Zhang, M. 2012. High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*. 22; 6291-6299.
- Kanczler, J.M., Ginty, P.J., White, L., Clarke, N.M.P, Howdle, S.M., Shakesheff, K.M. and Oreffo, R.O.C. 2010. The effect of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 on osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*, 21; 1242-1250.
- Karageorgiu, V. and Kaplan D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffold and osteogenesis. *Biomaterials*, 26; 5474-5491.

- Kavya, K.C., Jauakumar, R., Nair, S. and Chennazhi, K.P. 2013. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59; 255-263.
- Kempen, D., Lu, L., Heijink, A., Hefferan, T., Creemers, L., Marn, A., Yaszemski, M. and Dhert, W. 2009. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthopedic bone regeneration. *Biomaterials*, 30; 2816-2825.
- Khor, E. and Lim, Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24; 23-39.
- Kim, S., Kang, Y., Krueger, C.A., Sen M., Holcomb J.B., Chen D., 5, Wenke J.C. and Yang Y. 2012. Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomaterialia*, 8 (5); 1768-1777.
- Kim, S.E., Park, J.H., Cho, Y.W., Chung, H. Jeong, S.Y., Lee, E.B. and Kwon, I.C. 2003. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 4 (91); 365-374.
- King, W.J. and Krebsbach, P.H. 2012. Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2); 1239-1256.
- Klouda, L., Mikos, A.G. 2008. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications - a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(1); 34-45.
- Kwon, H., Lee, J., Choi, S., Jang, Y. and Kim, J. 2001. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182; 123-30.
- Lanza, R. Langer, R., and Vacanti, J. 2007. *Principles of Tissue Engineering*. 3rd edn. Elsevier: Boston.
- Lao, L.L., Peppas, N.A., Boey, F.Y.C. and Venkatraman, S.S. 2011. Modeling drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 418; 28-41.
- Lauzon, M.A., Bergeron, E., Marcos, B. and Faucheux, N. 2012. Bone repair: new developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling. *Journal of Controlled Release*, 162; 502-520.
- Lee, K., Eduardo A. S. and Mooney D.J. 2011. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface*, 8; 153-170.

- Lee, J., Nam, S., Im, S., Park, Y., Lee, Y., Seol, Y., Chung, C. and Lee, S. 2002. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*, 78; 187-197.
- Lee, S.J., Kang, S.W., Do, H.J., Han, I., Shin, D.A., Kim, J.H. and Lee, S.H. 2010. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 31(21):5652-5659.
- Levengood, S.K.L. and Zhang, M. 2014. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2; 3161-3184.
- Li, Z., Ramaya, H., Hauch Kip, D., Xiao, D. and Zhang M. 2005. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26; 3919-3928.
- Li, B., Yoshii, T., Hafeman, A.E., Nyman, J.S., Wenke, J.C. and Guelcher S.A. 2009. The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora. *Biomaterials*, 30(35); 6768-6779.
- Lienemann, P.S., Lutolf, M.P. and Ehrbar, M. 2012. Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64; 1078-1089.
- Lima, P.A., Resende, C.X., Soares, G.D., Anselme, K. and Almeida, L.E. 2013. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Material Science and Engineering C*, 33(6); 3389-3395.
- Mantripragada, V.P. and Jayasuriya, A.C. 2014. Injectable chitosan microparticles incorporating bone morphogenetic protein-7 for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1-13.
- Mehta, M., Schmidt-Belek, K., Duda, G.N. and Mooney, D.J. 2012. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64; 1257-1276.
- Mendonça, R.H., Meiga, T., Costa, M. and Thire, R. 2012. Production of 3D scaffolds applied to tissue engineering using chitosan swelling as a porogenic agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(2); 614-625.
- Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.S., Vacanti, J.P. and Langer, R. 1993. Preparation of poly(glycolic) acid bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27; 183-189.

- Nandagiri, V.K., Gentile, P., Chiono, V., Tonda-Turo C., Matsiko, A., Ramtools, Z., Montecvecchi, F.M. and Ciardelli, G. 2011. Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan-gelatin scaffolds: Influence on the physical properties and cell behavior. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4 (7); 1318-1327.
- Oest, M.E., Dupont, K.M., Kong, H.J., Mooney, D.J. and Guldberg, R.E. 2007. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *Journal of Orthopaedic Research*, 25;941–950.
- Palamoor, M. and Jablonski, M.M. (2014). Comparative study on diffusion and evaporation emulsion methods used to load hydrophilic drugs in poly(ortho ester) nanoparticle emulsions. *Powder Technology*, 253; 53-62.
- Park , Y.J., Lee, Y.M., Lee, J.Y., Seol Y.J., Chung, C.P. and Lee, S.J. 2000. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, 67; 385-394.
- Park , Y.J., Lee, Y.M., Park, S.N., Sheen ,S.Y., Chung, C.P. and Lee, S.J. 2000. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal regeneration. *Biomaterials*, 21; 153-159
- Patel, Z.S., Yamamoto, M., Uedea, H., Tabata, Y. and Mikos, A.G. 2008. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of Bone Morphogenetic Protein-2. *Acta Biomaterialia*, 4 (5); 1126-1138.
- Patel, Z.S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J.A., Wong, M.E.K. and Mikos, A.G. 2008. Dula delivery of an angiogenic and osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 43; 931-940.
- Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G. and Cohen, S. 2003. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65 (4); 489-497.
- Peter, M., Ganesh, N., Selvamuragan, N., Nair S.V., Furuike, T., Tamura, H. And Jayakumar, R. 2010. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80; 687-694.
- Poletto, F.S., Fiel, L., Donida, B. and Re, M. 2008. Controlling the size of PHBV nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surfactant agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 324; 105-12.
- Raiche, A.T. and Puleo, D.A. 2004. In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials*, 25 (4); 677-685.

- Rao, J.P. and Geckeler, K.E. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36 (7); 887-913.
- Ratanavaraporn, J., Furuya, H., Kohara, H and Tabata Y. 2011. Synergistic effects of the dual release of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenic protein-2 from hydrogels on bone regeneration. *Biomaterials*, 32; 2797-2811.
- Reis, C.P., Neufeld R.J., Ribeiro, A.J. and Veiga F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2; 8 - 21.
- Reyes, R., De la Riva, B., Delgado, A., Hernandez, A., Sanchez, E. and Evora, C. 2012. Effect of triple growth factor controlled delivery by a brushite-PLGA system on a bone defect. *Injury*, 43; 334-342.
- Sahana, D.K., Mittal, G., Bhardwaj, V. and Ravi Kumar, M.N.V. (2008). PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97; 1530-42.
- Sahoo, Sanjeeb K., Panyama J., Prabha S. and Labhasetwar V. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release* 82; 105-114.
- Salgado, A.J., Coutinho, O.P. and Reis, R.L. 2004. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4; 743-765.
- Simmons, C.A., Alsberg, E., Hsiong, S., Kim, W.J. and Mooney, D.J. 2004. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone*. 35; 562–569.
- Sinno, P. and Prakash S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. 2013. *Plastic Surgery and International*, 7 pages.
- Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., Chai, Z., Li, Y. and Chen, Q. (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systemic study of particle size and drug entrapment efficiency *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69; 445-53.
- Soran Z. 2010. BMP-6 Yüklü Aljinat Mikroküreler ve Kitosan Doku İskeleleri ile Periodontal Doku Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Steenfos, H.H. 1994. Growth factor and wound healing. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 28 (2); 95-105.

- Stevens, M.M. 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11 (5); 18-25.
- Strobel, C., Bormann, N., Kadow-Romacker, A., Schmidmaier, G. and Wildemann B. 2011. Sequential release kinetics of two (genatimicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating implants. *Journal of Controlled Release*, 156; 37-45.
- Subramanian, A. and Lin, H.Y. 2005. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75 (3); 742-753.
- Tabata, Y. 2009. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 6; 311-324.
- Tabata, Y. and Ikada, Y. 1998. Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31; 287-301.
- Tanır, T.E., Hasırcı, V. and Hasırcı, N. 2014. Preparation and characterization of chitosan and PLGA-Based scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Composites*, 1-14.
- Teng, L., Jiang, C., Lin, X., Dong, Y., Li, C., Meng, Q. and Li, Y. (2010). Preparation of tolterodine metabolite loaded biodegradable PLGA microspheres. *Chemical Research in Chinese Universities*, 26; 75-80.
- Tıǧlı, S., Karakeçili, A. and Gümüşderelioğlu, M. 2007. Invitro characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 18; 1665-1674.
- Tunçay, Ö.E. 2013. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Vilos, C., Constandil, L., Herrera, N., Solar, P., Escobar-Fica, J. and Velásquez, L.A. 2012. Ceftiofur-loaded PHBV microparticles: A potential formulation for a long-acting antibiotic to treat animal infections. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (4); 1-13.
- Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. 1991. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*, 51; 2515-2520.
- Vladkova, T.G. 2010. Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *International Journal of Polymer Science*, 1-22.

- Vo, T.N., Kasper, F.K. and Mikos A.G. 2012. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Systems*, 64; 1292-1309.
- Vonau, R.L., Bostrom, M.P., Aspenberg, P. and Sams, A.E. 2001. Combination of growth factors inhibits bone ingrowth in the bone harvest chamber. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 243–251.
- Weast, R.C. 1974. *Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, FL, U. S: CRC Press Inc.
- Wei, G., Jin, Q., Giannobile, W.V. and Ma, P.X. 2007. The enhancement of osteogenesis by nanofibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials*, 28 (12); 2087-2096.
- Yeo, Y. and Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research*, 27; 1-12.
- Yılgör, P., Hasirci, N. and Hasirci, V. 2009. Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93 (2); 528-536.
- Zhang, Z., Guo, X., Herrera, C., Yunlong, T., Wu, Q., Wu, A., Wang H., Bartnikas, T.B. and Wang, F. 2014. Bmp6 expression can be regulated independently of liver iron in mice. *PLoS One*. 9(1); 1-9.

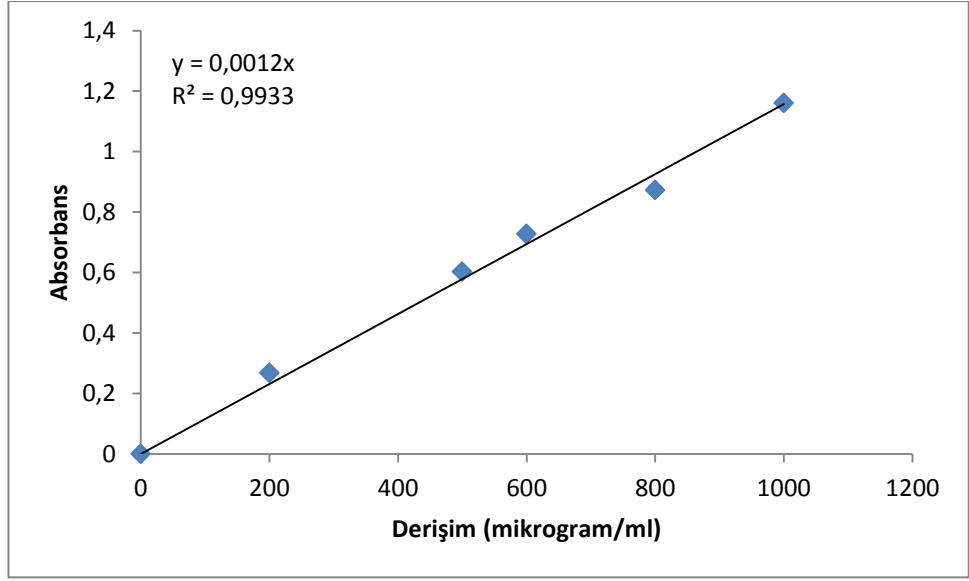
EKLER

EK 1 BSA kalibrasyon grafiği

EK 2 PHBV ve jelatin partikülden BSA salımının matematiksel analizi

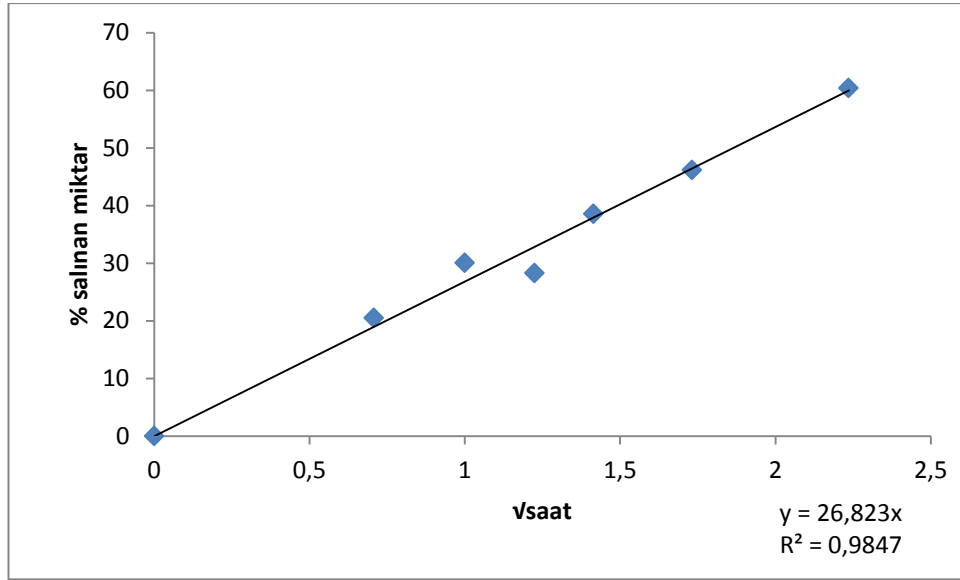
EK 3 Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı

EK 1 BSA kalibrasyon grafiği

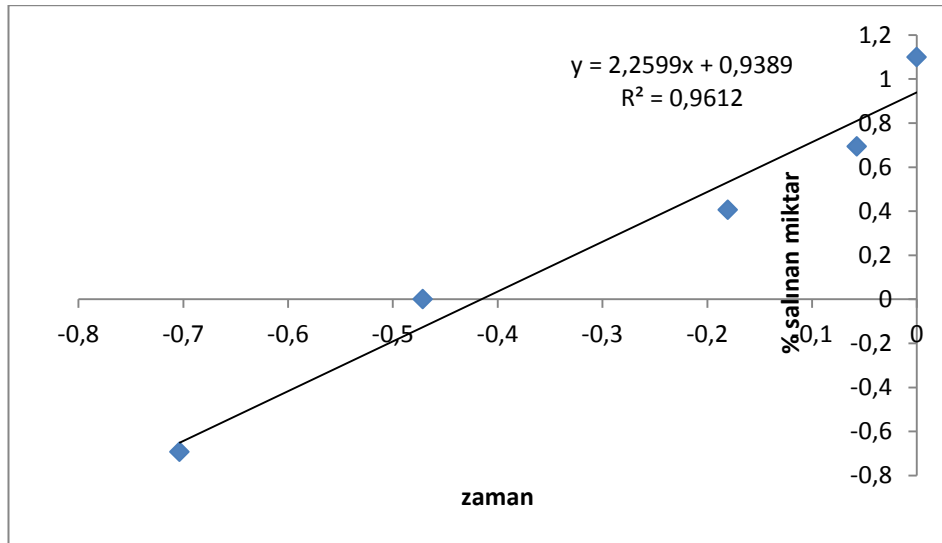


Şekil 1 BSA kalibrasyon grafiği

EK 2 PHBV ve jelatin partikülden BSA salımının matematiksel analizi

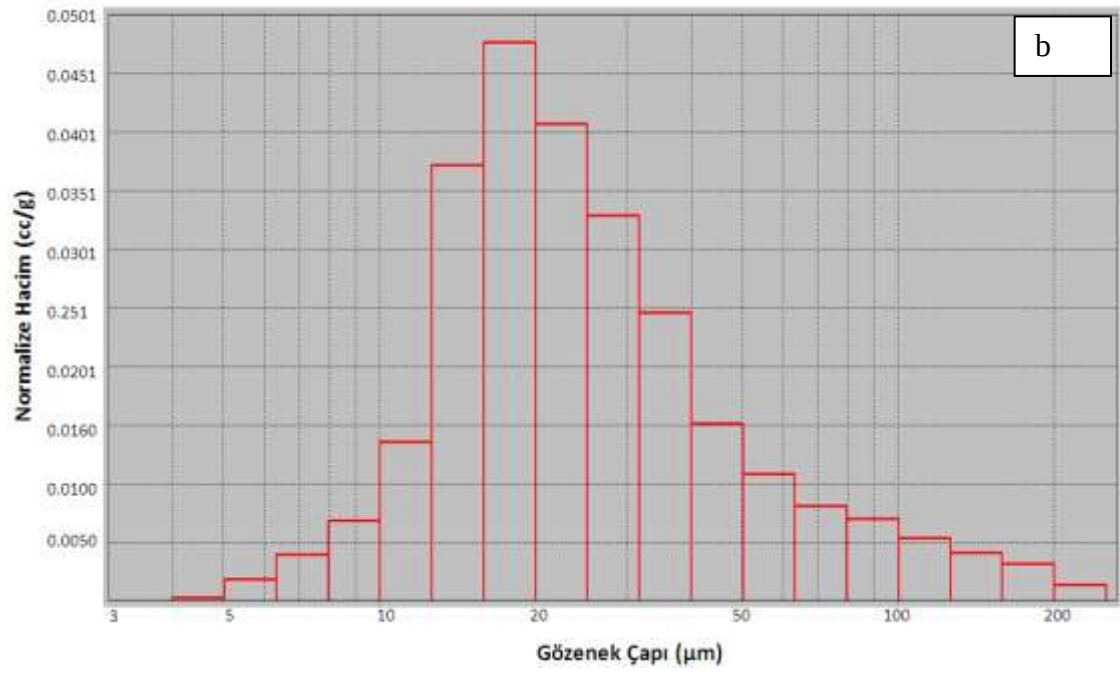
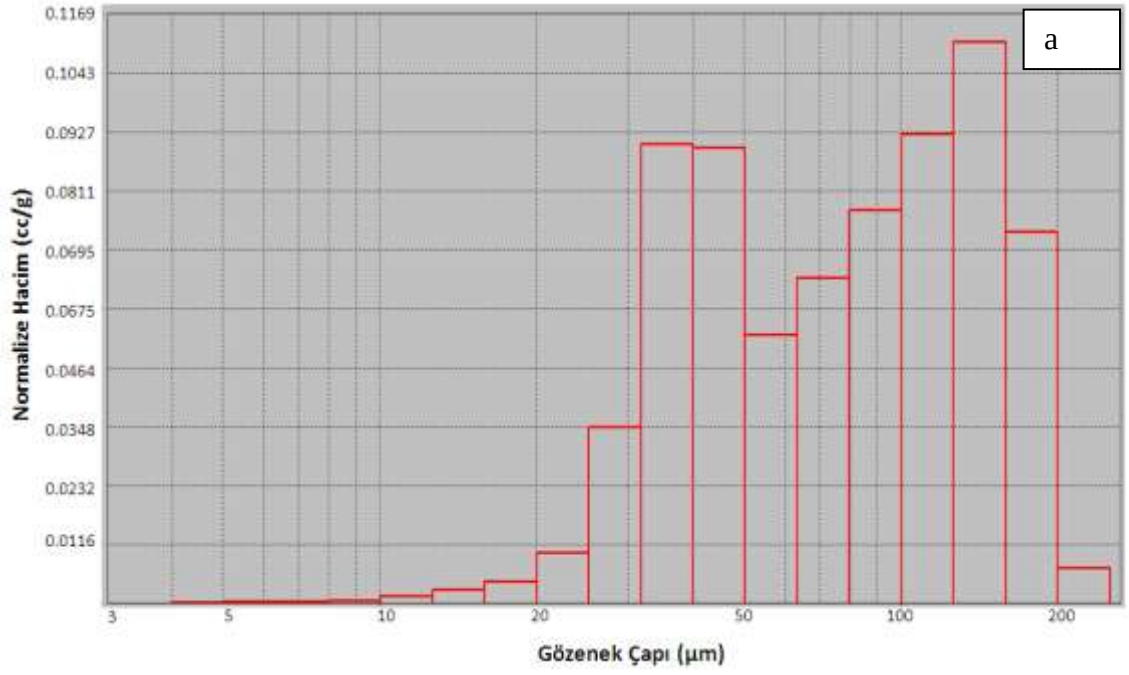


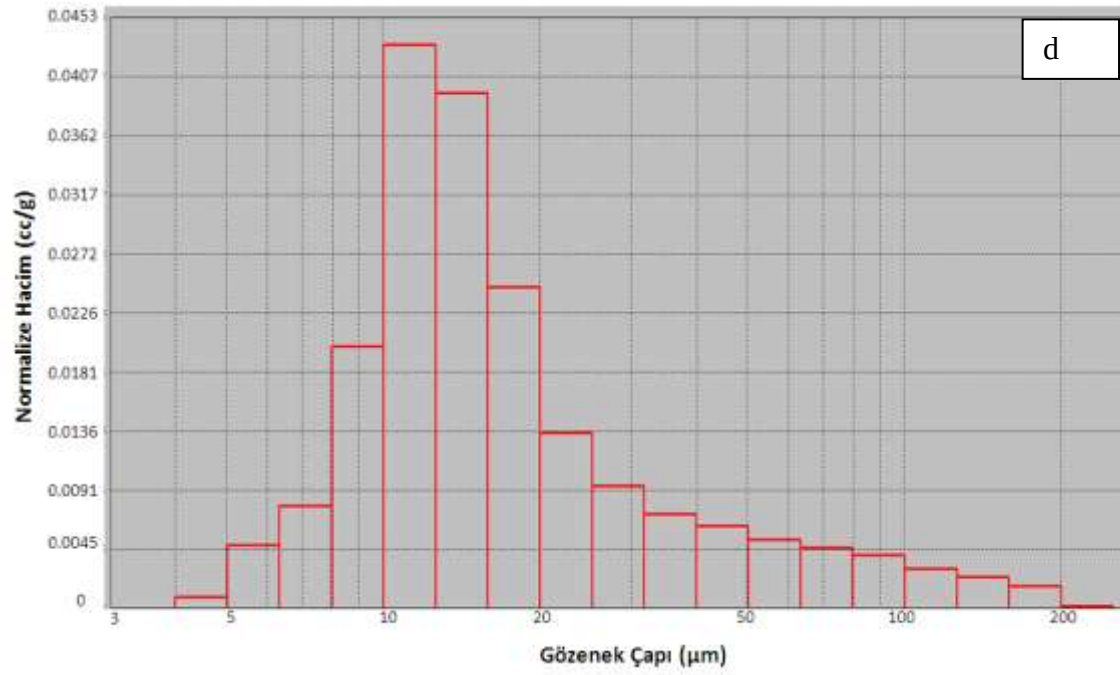
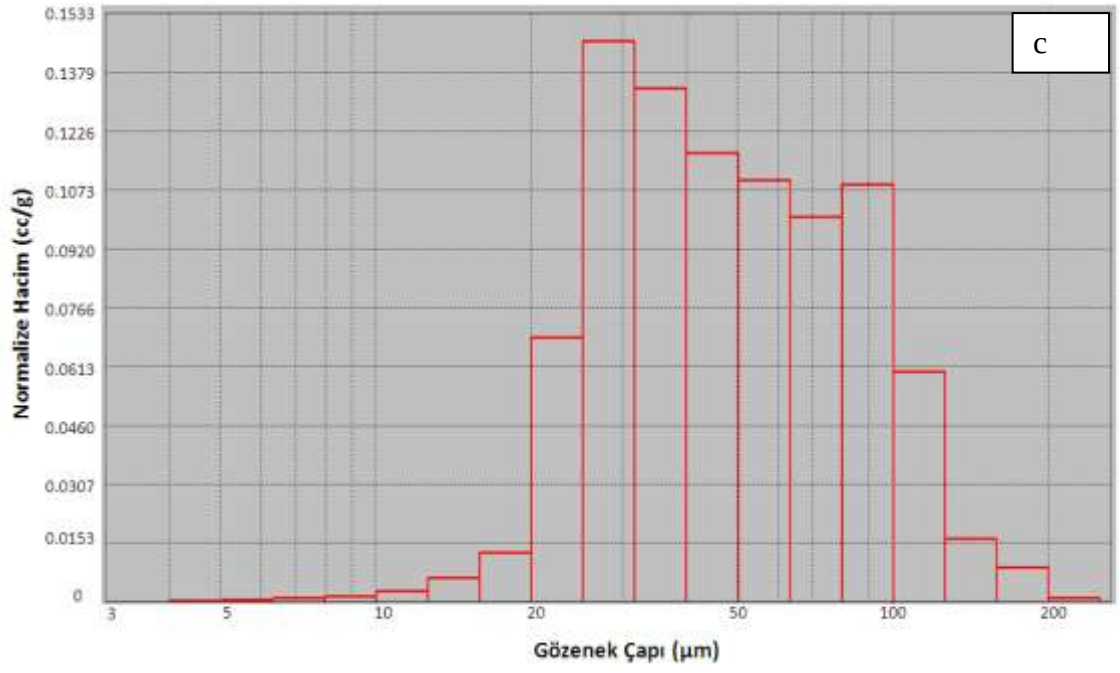
Şekil 1 PHBV partikülden BSA salımının matematiksel analizi



Şekil 2 Jelatin partikülden BSA salımının matematiksel analizi

EK 3 Kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımı





Şekil 1 Gözenek boyut dağılımı (a. CS, b. CS/PDGF-BB, c. CS/BMP-6 d. CS/PDGF-BB+BMP-6)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eda GÖZ (SEMİZER)

Doğum Yeri : Silifke

Doğum Tarihi : 06.12.1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Özel Silifke Lisesi/ Silifke (2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2006)

Yüksek Lisans:Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2009)

Doktora :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Eylül 2009-Temmuz 2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Araştırma Görevlisi- Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2007-halen)

SCI Yayınlar

1. **E. Göz** , A. Karakeçili. Effect of Emulsification-Diffusion Parameters on Formation of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) particles. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology. 2014, (Accepted).

2. M. Kazım Yetik, M. Yüceer, E. Karadurmuş, **E. Semizer**, A. Çalıklı, R. Berber. An Interactive GIS Based Software for Dynamic Monitoring of Rivers. Journal of Environmental Protection and Ecology. 2013, (Submitted).

3. E. Semizer, M. Yüceer, İ. Atasoy, R. Berber. Comparison of Control Algorithms for the Blood Glucose Concentration in a Virtual Patient with an Artificial Pancreas. Chemical Engineering Research and Design. 90 (2012) 926-937.

Uluslararası Kongreler

- 1. Eda Semizer**, Ayşe Karakeçili. Synthesis of PHBV Nanoparticles and BSA Release Kinetics. 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials Applications. 19-22 January 2014, Lisbon Portugal (Shot gun presentation).
- 2. Emre Yüksel, Eda Semizer**, Ayşe Karekeçili. Preperation and Characterization of EGF loaded PLGA Nanofibrous Membranes. 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials Applications. 19-22 January 2014, Lisbon Portugal (Poster presentation).
- 3. E. Semizer**, M. Yüceer, E. Karadurmuş, İ. Atasoy, A. Çalıklı, R. Berber. Online Monitoring and Total Organic Carbon (TOC) Modeling of Yeşilırmak River. 20th International Congress of Chemical and Process Engineering, 25-29 Ağustos 2012 Praque, Czech Republic (Oral presentation.)
- 4. E. Semizer**, M. Yüceer, B. Turan, A. Çalıklı, Support Vector Machine is a Good Tool to Predict Blood Glucose in Diabetes Studies, International Symposium NACD 2011: New Approaches in Cardiovascular Disorders From Genes&Molecules to Clinical Applications, 4-8 May 2011, Ankara, p.39 (Poster presentation)
- 5. Semizer, E.**, Yüceer, M., Atasoy, İ. R. Berber, “Blood Glucose Control Algorithms for Type 1 Diabetes”, EMCC-6, 7-12 March 2010, Belek, Antalya (Poster presentation)
- 6. Karadurmuş, E.**, Yetik, M.K., Yüceer, M., Atasoy, İ., **Semizer, E.**, Çalıklı, A., Berber, R. “On-Line Monitoring System for Yeşilırmak River Water Quality”, EMCC-6, 7-12 March 2010, Belek, Antalya (Poster presentation)
- 7. R. Berber**, E. Karadurmuş, M. Yüceer, İ. Atasoy, **E. Semizer**, E. Akyürek, A. Giwa, A Central River Water Quality Monitoring System for Yeşilırmak, Regional Meeting on Mediterranean Basin, Near East University, Lefkosa, Trnc, 9-11 October 2008, p. 78 (Oral presentation)

Ulusal Kongreler

1. Emre Yüksel, Ayşe Karekeçili, **Eda Semizer**. Production and Characterization of EGF loaded PLGA Nanofibrous Membranes. 9 th Nanoscience and Nanotechnology Conference (NANOTR-9) Atarürk Üniversitesi, 24-28 Haziran 2013, (Sözlü Sunum)
2. **Eda SEMİZER**, Ayşe KARAKEÇİLİ. Poli(3-hidroksibütirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit) (PHBV) Nanokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10), Koç Üniversitesi, 3-6 Eylül 2012, (Poster sunumu)
3. Mehmet Yüceer, Erdal Karadurmuş, Mehmet Ali Çoşkun, **Eda Semizer**, İlknur Atasoy, Ayla Çalıklı, Rıdvan Berber. Yeşilirmak Nehri Toplam Organik Karbon Derişiminin En Küçük Kareler Destek Vektör Makineleri ile Modellenmesi. 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10), Koç Üniversitesi, 3-6 Eylül 2012, (Sözlü sunum)
4. İ. Atasoy, M. Yüceer, **E. Semizer**, E. Karadurmuş, K. Yetik, B. Oz, A. Çalıklı, R. Berber, Nehir Su Kalitesi için Trend Analizi. 9. Ulusal Kimya Mühendisliği UKMK 9, 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Ankara. (Sözlü Sunum)
5. İ. Atasoy, M. Yüceer, **E. Semizer**, E. Karadurmuş, K. Yetik, A. Çalıklı, R. Berber, Nehir Su Kalitesi Veri Yönetimi: Hatalı Verilerin Ayıklanması, . Ulusal Kimya Mühendisliği UKMK 9, 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Ankara. (Poster Sunumu)
6. M. Yüceer, İ. Atasoy, **E. Semizer**, E. Karadurmuş, K. Yetik, A. Çalıklı, R. Berber, Yeşilirmak Nehri İçin Toplam Organik Karbon Öngörü Modelleri. Ulusal Kimya Mühendisliği UKMK 9, 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Ankara. (Sözlü Sunum)
7. **E. Semizer**, M. Yüceer, İ. Atasoy, R. Berber, Tip I Diyabetler için Kan Şekeri Kontrol Algoritmaları. Ulusal Kimya Mühendisliği UKMK 9, 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Ankara. (Sözlü Sunum)
8. **E. Semizer**, R. Berber, Tip 1 Diyabette Kan Şekerinin Model Öngörmeli Kontrolü, 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, 29-31 Mayıs 2008, ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi, Ankara (Poster sunumu).

Diğer Yayınlar

1. R.Berber, E.Karadurmuş, M.Yüceer, İ.Atasoy, **E.Semizer**, E. Akyürek. A central on-line river water quality monitoring system World Water Forum, Istanbul (Topic 6.2 Water Science and Technology - Appropriate and Innovative Solutions for the 21st Century), 16-22 March 2009, İstanbul.